UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



Chladová adaptace ve stacionární fázi u *Bacillus subtilis*

Anna Beranová

Diplomová Práce Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce.

V Praze dne 1. 9. 2010

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří se větší či menší měrou podíleli na vzniku této diplomové práce.

Největší dík patří doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CSc. pod jehož vedením tato práce vznikala. Děkuji za veškerý čas, který mi věnoval, za trpělivost, cenné nápady a připomínky a v neposlední řadě za vlídný přístup.

Dále děkuji RNDr. Radku Fišerovi, za pomoc při fluorescenčních měřeních a jejich následném zpracování, za podnětné připomínky a ochotu.

Děkuji Mgr. Petře Liškové za pomoc při metodách využívajících Tb^{3+}, a to jak po stránce metodologické tak i praktické.

Za analýzu mastných kyselin děkuji Daně Elhottové, PhD.

Poděkování patří RNDr. Janě Beranové a celému kolektivu laboratoře 101 za vytvoření příjemného pracovního prostředí, za praktické rady, pomoc a podporu. Děkuji naší milé laborantce Lucii Jánské za precizní přípravu všeho potřebného.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celé doby studia a příteli Tomášovi za trpělivost, pozitivní přístup, praktickou pomoc při sepisování práce a nejvíce za to, že mi byl stále oporou.

Tato diplomová práce vznikala v letech 2008 až 2010 v rámci grantových projektů:
Výzkumné centrum LC 06066 Centrum environmentální mikrobiologie (2006 – 2010)
Výzkumný záměr MSM0021620858: Signalizace a molekulární mechanismy buněčné odpovědi (2007 – 2013)

Abstract

Cold adaptation in stationary phase in *Bacillus subtilis*

One of the most important abiotic factor which influences life of bacterial cells is the ambient temperature. A decrease of this temperature is usually accompanied usually with the loss of the fluidity of bacterial cytoplasmatic membrane. While the mechanisms of the responses to the cold shock during the exponential phase of growth are well known for *Bacillus subtilis*, the responses of stationary phase cells had not been studied yet (despite the stationary phase is the most common state of microorganism in the nature). There are two independent mechanisms which restores much needed fluidity in *Bacillus subtilis* – short-term adaptation and long-term adaptation. Short-term adaptation is based on the function of fatty acid desaturase coded by *des* gene. Long-term adaptation relies on the change in ratio of iso- and anteiso- branched fatty acids.

In this work we examinated membrane adaptation during stationary phase under two different conditions, namely under cultivation at stable low temperature and after cold shock. The highest activity of *Pdes* was observed for cultivation at 25 °C and for the cold shock applied from cultivation in 37 °C to 25 °C. Anisotropy measurements and fatty acids analysis were also performed. Results indicated, that the cytoplasmatic membrane of stationary cells cultivated in 37 °C is less fluidic than the one of exponential cells. Phospholipids isolated from stationary phase cells were found to contain iso- branched fatty acids as the major constituents.

Since bacterial culture in stationary phase is not homogenous, the obtained findings could not be ascribed to the whole population. It was observed that during the first ten hours of stationary phase, the whole population approximately consist of 45 % vegetative cells, 45 % dead cells (determinated by Live/Dead Kit) and 10 % of spores (determinated by Gram staining and other). However, the flow cytometry analysis did not reveal the expected populations characterized by the differences in *Pdes* activity and cell size.

Key words: *Bacillus subtilis*, cold shock, stationary phase, membrane fluidity, flow cytometry

Klíčová slova: *Bacillus subtilis*, chladový šok, stacionární fáze, membránová fluidita, průtoková cytometrie

Obsah

Obsah **6**
Seznam zkratek **8**
1. Úvod **9**
2. Literární přehled **11**
2.1. Chladový šok u *Bacillus subtilis* **11**
2.1.1. Působení chladového šoku na bakteriální buňku **11**
2.1.2. Adaptace bakteriální buňky na chlad **12**
2.1.2.1. Kompatibilní soluty **13**
2.1.2.2. Adaptace na úrovni nukleových kyselin **13**
2.1.2.3. Proteiny chladového šoku **14**
2.1.2.4. Adaptace na úrovni membrány **17**
2.1.2.4.1. Dlouhodobá adaptace u *Bacillus subtilis* **18**
2.1.2.4.2. Krátkodobá adaptace u *Bacillus subtilis* **18**
2.1.2.4.2.1. Funkce desaturázy Des **19**
2.1.2.4.2.2. Regulace exprese desaturázy Des dvoukomponentovým systémem DesK/DesR **20**
2.2. Stacionární fáze růstu u *Bacillus subtilis* **22**
2.2.1. Morfologické změny **23**
2.2.2. Represor CodY **23**
2.2.3. Regulátory AbrB a Spo0A **25**
2.2.4. Odpověď buňky na stres **27**
2.2.4.1. Stringentní odpověď **27**
2.2.4.2. Alternativní sigma faktor σ^B **28**
2.2.4.3. Obecné stresové proteiny (GSPs) **29**
2.2.4.4. Adaptivní mutageneze **29**
2.2.4.5. Kompetence **30**
2.2.4.6. Degradace proteinů **31**
2.2.4.6.1. Funkce ATP-dependentních Clp proteáz **31**
2.2.4.7. Sporulace **32**
2.2.4.7.1. Sporulační faktor Spo0A **33**
2.3. Odpověď na chladový stres ve stacionární fázi u *Bacillus subtilis* **34**
2.3.1. Vliv chladu na sporulaci **35**
2.4. Shrnutí **36**
3. Materiál a metody **38**
3.1. Modelový mikroorganismus **38**
3.2. Přístroje **39**
3.3. Chemikálie **40**
3.4. Kultivační půdy **41**
3.4.1. Sporulační agar **41**
3.4.2. Komplexní kultivační medium KM1 ..... **41**
3.4.3. Komplexní kultivační medium LB **42**

3.4.4. Pevné kultivační medium LB ... 42
3.5. Sterilizace ... 43
3.6. Příprava sporových konzerv ... 43
3.7. Kultivace bakterií, růstová křivka ... 43
3.8. Určování podílu spor ... 44
3.8.1. Výsev buněk na agarovou plotnu ... 44
3.8.2. Určování podílu spor pomocí komplexu TbDPA ... 45
3.8.3. Určení podílu spor ve fixovaném preparátu ... 46
3.9. Souprava „Live/Dead Kit ... 48
3.9.1. Určení podílu živých buněk během exponenciální fáze růstu ... 48
3.9.2. Určení podílu živých buněk během stacionární fáze růstu ... 49
3.10. Stanovení aktivity β-galaktosidázy ... 50
3.11. Závislost optické denzity na koncentraci biomasy ... 52
3.12. Průtoková cytometrie ... 53
3.13. Izolace membrán ... 59
3.13.1. Stanovení koncentrace proteinů ... 61
3.13.2. Měření anizotropie fluorescence DPH ... 63
3.14. Izolace fosfolipidů ... 65
3.14.1. Analýza mastných kyselin ... 66
4. Výsledky ... 68
4.1. Růstová charakteristika *Bacillus subtilis* kmene *AKP3* ... 68
4.2. Určování podílu spor během stacionární fáze ... 70
4.2.1. Určování podílu spor výsevem ... 70
4.2.2. Určování podílu spor pomocí komplexu TbDPA ... 72
4.2.3. Určení podílu spor ve fixovaném preparátu ... 74
4.3. Souprava „Live/Dead Kit“ pro určení podílu živých a mrtvých buněk ... 75
4.3.1. Podíl živých a mrtvých buněk v kultuře exponenciální fáze ... 76
4.3.2. Podíl živých a mrtvých buněk v kultuře stacionární fáze ... 78
4.4. Aktivita promotoru *des* ... 82
4.4.1. Aktivita promotoru *des* během exponenciální fáze ... 83
4.4.2. Aktivita promotoru *des* během stacionární fáze ... 87
4.4.3. Aktivita promotoru *des* po chladovém šoku ... 92
4.5. Průtoková cytometrie ... 95
4.6. Měření anizotropie fluorescence DPH ... 100
4.7. Analýza mastných kyselin ... 101
5. Diskuze ... 104
6. Souhrn ... 112
7. Seznam citované literatury ... 114

Seznam zkratek

BME	2-merkaptoethanol
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérumalbumin
CSPs	proteiny chladového šoku
CSR	odpověď na chladový stres
DMSO	dimethylsulfoxid
DNáza	deoxyribonukleáza I
DPA	kyselina dipikolinová
DPH	(1E,3E,5E)-1,6-diphenylhexa-1,3,5-trien
FSC	přímý rozptyl
GSPs	obecné stresové proteiny
HSP	proteiny teplotního šoku
$I_{\parallel}$	intenzita polarizované fluorescence rovnoběžná se směrem excitace
$I_{\perp}$	intenzita polarizované fluorescence kolmá ke směru excitace
I_0	celková intenzita fluorescence
KH_3EDTA	ethylendiamintetraoctan monodraselný
LB medium	Luria Broth medium
Live/Dead Kit	LIVE/DEAD® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit
MU	Millerovy jednotky
OD_{450nm}	optická denzita měřená při vlnové délce 450 nm
ONP	o-nitrofenol
ONPG	o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid
P	polarizace fluorescence
Pdes	promotor genu *des*
PI	propidium jodid
PMSF	benzylsulfonyl fluorid
r	anizotropie fluorescence
r_0	limitní anizotropie fluorescence
RNáza	ribonukleáza
rpm	otáčky za minutu
SSC	bočný rozptyl
T	doba zdvojení
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

1. Úvod

Bakterie, stejně jako všechny živé organismy na této planetě, jsou ovlivňovány vnějším prostředím. Podmínky, kterým je daný organismus vystaven, však nejsou vždy ideální, většinou je tomu právě naopak.

Teplota je jedním z nejdůležitějších abiotických faktorů. Každý organismus musí být schopen přizpůsobit se měnící se teplotě a ani bakterie nejsou výjimkou. Změna teploty, stejně jako změna kteréhokoli jiného parametru prostředí, za hranice optima dané buňky, je stresový faktor. Převážnou část života stráví organismus při působení nějakého ze stresových faktorů (mnohdy je jich více). Pokud by organismus nebyl schopen tlumit nepříznivé vlivy okolí, nepřežil by.

Buňka na náhlé snížení teploty odpovídá souborem reakcí, které souhrnně označujeme jako „cold shock response“ (CSR). Zahrnují vše od získání informace o chladu pomocí senzorů, přenos informace do buňky a soubor reakcí vedoucích až ke změně metabolismu a adaptaci na chlad. Jedním ze senzorů je cytoplazmatická membrána bakteriální buňky. Ta je snížením teploty významně pozměněna a její adaptace je klíčová pro adaptaci celé buňky k poklesu teploty v prostředí.

Stacionární fáze růstu následuje po exponenciální fázi a je typická pro buňky žijící v nedostatku jedné či více živin. Je to nejobvyklejší stav, v kterém se mikroorganismy v přírodě vyskytují. Ve stacionární fázi dochází v buňce k metabolickým změnám, kterými se bakterie přizpůsobují změnám v prostředí. Existuje celá řada procesů, kterými se bakterie mohou adaptovat na změnu podmínek, jako příklad lze uvést adaptivní mutagenezi, tvorbu sekundárních metabolitů či sporulaci. Stacionární fáze bakteriálního života dosud není dostatečně zmapována, převážně z důvodu obtížné interpretace získaných dat. Bakteriální kultura v této fázi není fyziologicky homogenní a získané informace neplatí obecně pro celou populaci.

Jako modelový organismus pro studium byl zvolen *Bacillus subtilis*. Je to velmi běžná půdní grampozitivní nepatogenní bakterie. Má tvar tyčinky a tvoří endospory. Ve svém přirozeném prostředí (povrchové vrstvě půdy) se neustále setkává s výkyvy teplot. Z hlediska teplotního optima této bakterie, je řazena mezi mezofilní bakterie. Důvodem výběru této bakterie jako modelového organismu je především snadná kultivovatelnost, šíře dostupných poznatků a fakt, že se nejedná o patogenní druh.

Cíl práce

Tato diplomová práce si kladla za cíl rozšířit poznatky o vlivu chladového šoku působícího na buňky *Bacillus subtilis* během exponenciální fáze i na fázi stacionární.

Prvním úkolem bylo zjistit závislost podílu spor a mrtvých buněk na době kultivace ve stacionární fázi. Informace o podílu těchto buněk je nezbytná pro podrobnější zkoumání chladového šoku v populaci stacionárních buněk.

Dalším cílem bylo sledování odpovědi cytoplazmatické membrány na chladový šok během stacionární fáze. Nejprve byla zjišťována aktivita promotoru *des* při stálé kultivační teplotě, následně aktivita po chladovém šoku.

Dalším úkolem bylo určit fyzikální stav cytoplazmatické membrány a její chemické složení během stacionární fáze. Bylo zjišťováno zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve fosfolipidech membrány stacionárních buněk. Biochemická analýza umožňuje získat informace o složení membrány buněk stacionární fáze a dále umožňuje porovnat tyto data s analogickými výsledky získanými z membrán buněk exponenciální fáze.

2. Literární přehled

2.1. Chladový šok u *Bacillus subtilis*

Organismy můžeme dělit dle teploty, ve které probíhá jejich optimální růst, do několika kategorií. Bakterie dokážou růst a množit se za většího rozmezí teplot než většina živých organismů na Zemi. Nejnižší optimální teploty pro růst nalézáme u psychrofilů. Při vyšších teplotách rostou psychrotolerantní organismy. Následují mezofilové, termofilové a nejvyšší teplotní optima mají extrémní termofilové. Každý z nich má jiné složení mastných kyselin ve fosfolipidech a jiný enzymatický aparát pro syntézu mastných kyselin. K adaptaci membrány na chlad bude tedy u různých bakteriálních druhů docházet rozdílně. Pro buňku a její odpověď na snížení teploty je nesmírně podstatné, jak rychle ke změně teploty došlo. Buňka se lépe vyrovnává s postupnou změnou teploty vnějšího prostředí (v řádu hodin) než se změnou skokovou (v řádu minut). Za chladový šok pak považujeme situaci, kdy ke změně teploty došlo náhle.

2.1.1. Působení chladového šoku na bakteriální buňku

Chladový šok ovlivňuje difúzi, konformaci molekul a dynamiku všech dějů v buňce. Obecně dochází ke zpomalení metabolismu. Nízká teplota zpomaluje děje probíhající na membráně i metabolické děje uvnitř buňky – katabolismus (glykolýza, oxidativní fosforylace atd.) i anabolismus (zpomalení biosyntézy). Snížení teploty o 10 °C vede dle Arrheniova vztahu (Rovnice 1) k snížení reakční rychlosti 1,5 – 4 ×:

$$K = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

kde K je rychlost reakce, A je frekvenční faktor, E_a je aktivační energie, R je univerzální plynová konstanta, a T je absolutní teplota. To vše má za důsledek pomalejší růst bakteriální kultury.

Chladový stres vede ke změnám na úrovni genové exprese. Dochází ke zpomalení či úplnému zastavení tvorby některých proteinů a naopak k indukci proteinů specifických pro nízké teploty. Počet reprimovaných a indukovaných proteinů při chladovém šoku se výrazně liší od situace, kdy jsou buňky přímo v chladu kultivovány – u bakteriální kultury *Bacillus subtilis* kultivované při 15 °C dochází k indukci 279 genů a k represi 301 genů ve srovnání s kultivací v 37 °C. (BUDDE *et al.* 2006). V obou případech může u některých mRNA docházet k posttranskripčním modifikacím.

Chladový stres také ovlivňuje transport látek uvnitř buňky a i transport přes cytoplazmatickou membránu. Nízká teplota snižuje pohyblivost membránových komponent (membrána ztrácí fluiditu), což zpomaluje či úplně zastavuje biochemické děje vázané na membránu a dále zpomaluje výměnu látek mezi vnějším a vnitřním prostředím. Snížením teploty také dochází ke konformačním změnám na ribosomech a mRNA (na mRNA vznikají vlásenky), které vedou k zastavení translace. Zároveň se snižuje hladina (p)ppGpp (souhrnné označení pro molekuly guanosin-5´trifosfát-3´difosfát a guanosin-5´difosfát -3´difosfát). Působením chladu narůstá negativní superhelicita DNA. Obecně dochází k zastavení mnoha buněčných dějů, které probíhají na úrovni celé buňky. Příkladem může být dělení buňky nebo tvorba endospor (u bakterií, které tuto schopnost mají) (viz kapitola 2.2.4.7.). Pokud bakterie není schopna adaptace na změnu teploty prostředí, může být snížení teploty pro buňku letální.

Po chladovém šoku většinou nastává lag fáze, během které se buňka adaptuje na nízkou teplotu. Délka této fáze se výrazně liší u jednotlivých bakteriálních druhů a v závislosti na teplotním intervalu. Po skončení lag fáze se začnou buňky opět množit, avšak s jinou dobou zdvojení než před šokem.

Působení chladu je tedy velmi rozmanité a buňka se s ním i rozmanitě vyrovnává. O nejdůležitějších mechanismech adaptace bakteriální buňky na chlad pojednávají následující kapitoly.

2.1.2. Adaptace bakteriální buňky na chlad

K adaptačním změnám dochází na úrovni složení membránových lipidů a na úrovni genové exprese. Míra a přesný způsob adaptace závisí na druhu bakterie, konkrétní teplotě a prostředí, ve kterém se vyskytuje.

Obecný model adaptace lze stručně popsat následujícími kroky: signál → přenos signálu v rámci buňky → ovlivnění transkripčních/translačních faktorů → změna transkripce/translace → adaptace na úrovni membrány a syntetizovaných proteinů → adaptace na úrovni celé buňky.

Poznatky uvedené v následujících kapitolách byly získány převážně na exponenciálně rostoucích buňkách. Doposud není jasné, jak se na chladový stres adaptují buňky ve stacionární fázi.

2.1.2.1. Kompatibilní soluty

K ochraně vnitřního prostředí buňky za chladového či osmotického stresu slouží nízkomolekulární látky, takzvané kompatibilní soluty. Mezi látky s nízkou molekulovou hmotností patří jednoduché polyoly a polyaminy, deriváty aminokyselin, sacharidy a další látky. Dosud není znám přesný mechanismus působení, ale lze je považovat za chemické chaperony. Stabilizují tedy nativní konformace proteinů, zabraňují denaturaci či vzniku agregátů a podílí se také na zneškodňování volných radikálů. Zvýšení koncentrace těchto látek v cytoplazmě bakteriální buňky vede ke zvýšení viskozity a omezení difúze. Dalším vlastností těchto látek je snížení bodu tuhnutí cytoplazmy, což je velmi příznivé za nízkých teplot. U bakterie *Bacillus subtilis* bylo objeveno, že jako kompatibilní solut používá glycin betain, který se dostává do buňky pomocí ABC transportéru (OpuA) (KEMPF a BREMER 1995, BREMER 2002).

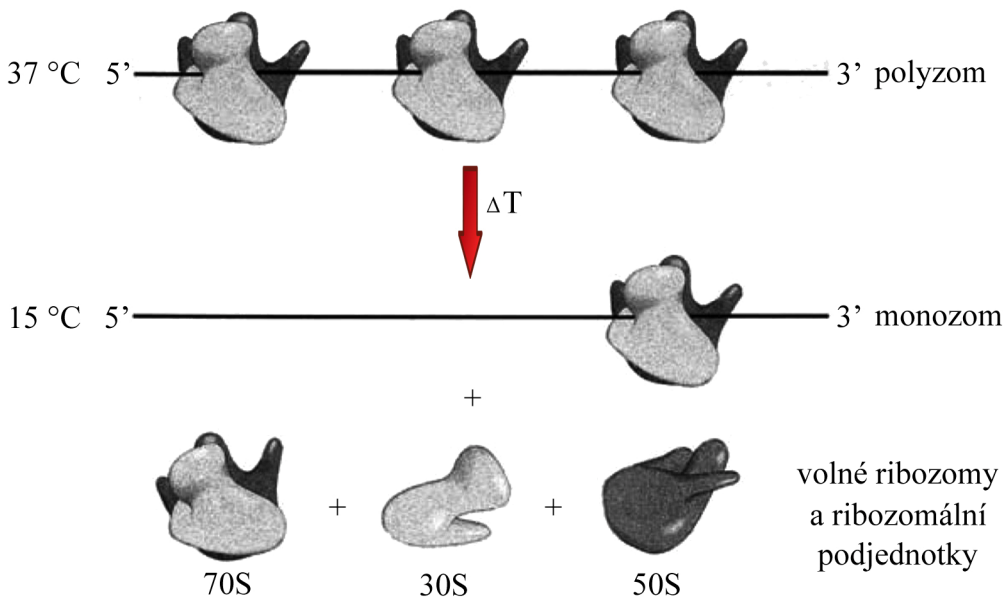
2.1.2.2. Adaptace na úrovni nukleových kyselin

Chladový šok působí na nukleové kyseliny, které se v bakterii vyskytují. Dvojvlákno chromozomální DNA má takzvanou negativní superhelicitu. Nízká teplota způsobuje ještě vyšší negativní superhelicitu (WEBER *et al.* 2001b). To působí jako signál, že se buňka nachází v chladném prostředí. Zároveň se tato molekula DNA stává méně přístupnou pro RNA polymerázu a dochází převážně ke snížení genové exprese (MIZUSHIMA *et al.* 1997).

Konformaci DNA ovlivňují enzymy topoizomerázy I. a II. Konformace je také ovlivňována proteinem H-NS (protein podobný histonům, který se váže na DNA), jehož množství v buňce po chladu stoupá. Ten je zodpovědný za represi bakteriálních genů při chladu a zřejmě brání tvorbě otevřeného komplexu na promotorové oblasti (WILLIAMS a RIMSKY 1997, ERIKSSON *et al.* 2002). Tato represe chladem je pro buňku signálem o snížené teplotě v okolním prostředí.

Působením nízkých teplot vzniká v místě, kde se ribosom váže na mRNA (oblast Shine-Dalgarnovy sekvence), vlásenka, která této vazbě zabrání. Ribosomy se pak odpoutají od mRNA a tím je ukončena translace. V buňce pak lze pozorovat zvýšené množství volných ribosomů (70S) i volných podjednotek (50S a 30S) (viz Obrázek 1).

Bakterie *Bacillus subtilis* se brání vzniku sekundárních struktur na mRNA dvěma způsoby. První možností je vazba proteinů chladového šoku (CSP) (GRAUMANN *et al.* 1997), druhý mechanismus zahrnuje působení RNáz, specializovaných na dsRNA (JONES *et al.* 1996).



Obrázek 1 Vliv snížení kultivační teploty na ribosomy v buňce. Ribosomy jsou uvolňovány od mRNA a zároveň disociovány na jednotlivé podjednotky (převzato a upraveno dle WEBER a MARAHIEL 2003).

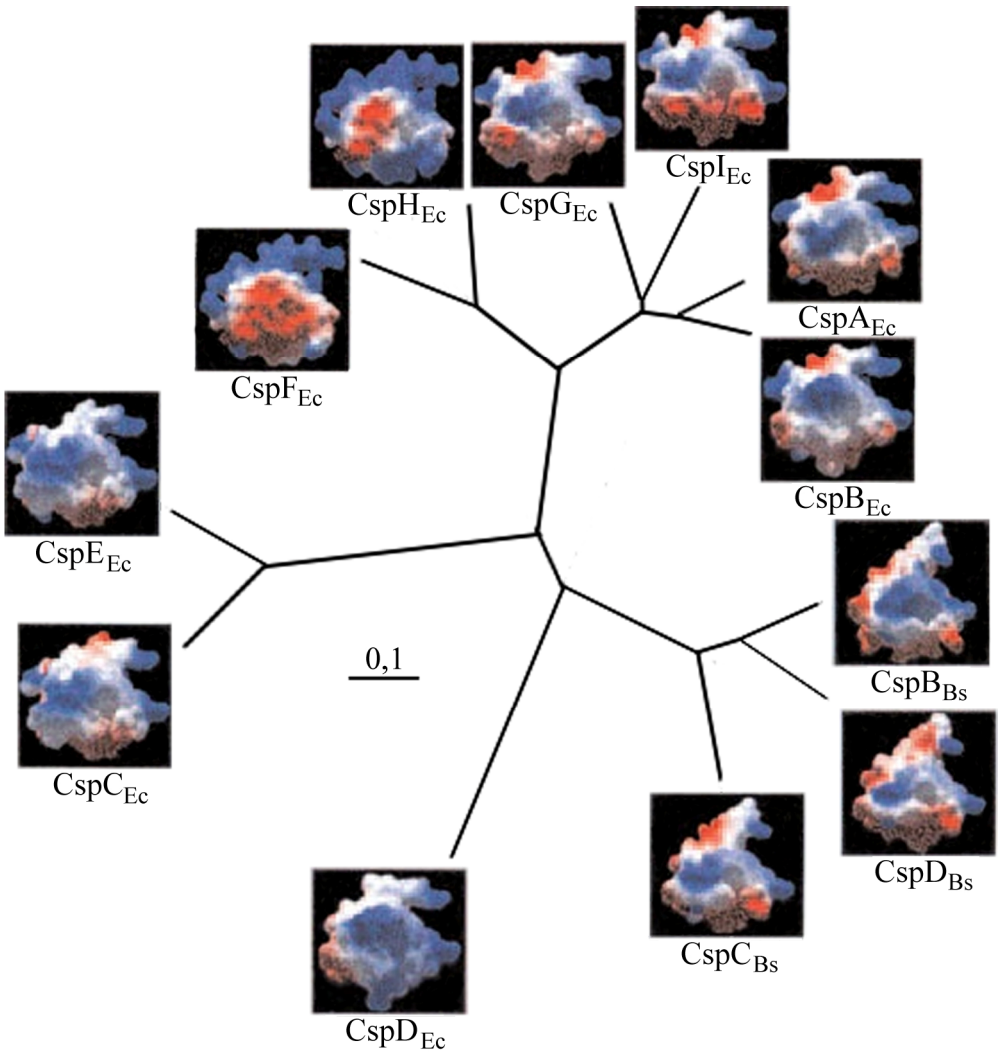
2.1.2.3. Proteiny chladového šoku

Proteiny chladového šoku jsou první proteiny, které jsou syntetizovány po kontaktu se bakterie s chladnějším prostředím. Geny pro tyto proteiny byly nalezeny ve většině psychrofilů, mezofilů, termofilů a také hypertermofilů (WEBER *et al.* 2002). Vyskytují se i u evolučně starších skupin bakterií (GRAUMANN A MARAHIEL 1998), což ukazuje, jak jsou pro přežití buňky podstatné. Buňky mají často více různých CSP (u *Escherichia coli* 15; u *Bacillus subtilis* byly zatím objeveny 3), mezi kterými je patrná strukturní podobnost (viz Obrázek 2). Všechny CSP mají strukturu β-barelu, který je tvořen pěti antiparalelními β-listy.

Nízká teplota vede ke snížení hladiny (p)ppGpp v buňce a ztužení membrány, což jsou signály pro syntézu CSPs. Tyto proteiny jsou syntetizovány, zatímco syntéza běžných proteinů je pozastavena. Zvýšení množství CSPs v buňce po chladovém šoku je způsobeno jednak častějším přepisem genů pro CSP a jednak zvýšenou stabilitou mRNA pro tyto proteiny za nízkých teplot. Všechny CSP, které v buňce nalézáme po chladovém šoku, jsou vytvářeny ribosomy, které nejsou adaptovány na chlad. Tyto proteiny následně pomáhají ribosomy adaptovat (PHADTARE *et al.* 1999).

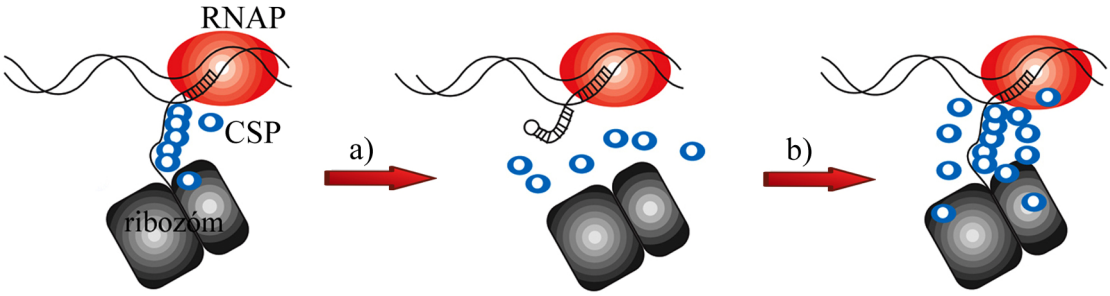
Správná konformace proteinů a nukleových kyselin v buňce je nezbytně nutná pro jejich funkci. Působením chladového šoku na bakteriální buňku může docházet ke kon-

formačním změnám proteinů a nukleových kyselin (WEBER a MARAHIEL 2003). CSP působí jako molekulové chaperony za nízkých teplot (viz Obrázek 3). Jejich funkcí je udržování mRNA v lineární formě, aby na ní nevznikaly vlásenky a mohly nasedat ribosomy. Vazba těchto proteinů na struktury nukleových kyselin je umožněna vysokou afinitou k ss RNA a DNA.

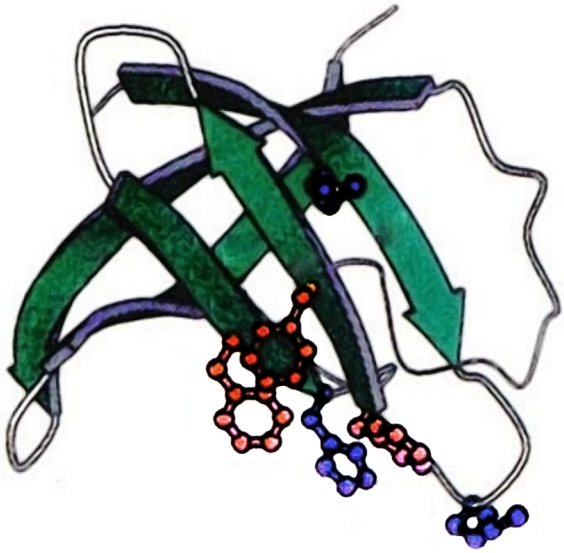


Obrázek 2 Fylogenetický strom rodiny CSP *Bacillus subtilis* (Bs) a *Escherichia coli* (Ec) s třírozměrnými modely jednotlivých proteinů (převzato a upraveno dle WEBER a MARAHIEL 2003).

Nejvýznamnějším proteinem chladového šoku u *Bacillus subtilis* je CspB (viz Obrázek 4), protože jeho delece vede k neschopnosti buňky adekvátně odpovídat na chlad (GRAUMANN a MARAHIEL 1997).



Obrázek 3 Model působení CSP jako mRNA chaperonů. Při 37 °C mají CSP malou afinitu k mRNA – a) vznik vlásenek na mRNA v důsledku chladového šoku, které brání vazbě ribosomu, b) afinita proteinů CSP se zvyšuje a dochází k jejich vazbě na mRNA; CSP svým působením zabraňují vzniku vlásenek a ribosom může opět nasedat na mRNA (převzato a upraveno dle GRAUMANN a MARAHIEL 1998).



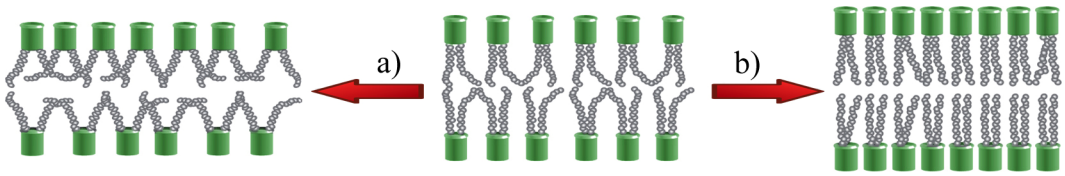
Obrázek 4 Třírozměrný model struktury proteinu CspB z *Bacillus subtilis*. Pět β-listů tvoří β-barel. Červeně a modře jsou zvýrazněny aromatické aminokyseliny, které umožňují vazbu proteinu CspB na molekulu mRNA (převzato a upraveno z GRAUMANN a MARAHIEL 1996).

U bakterie *Bacillus subtilis* byly identifikovány další dva homology CspB – CspC a CspD. Delece všech tří proteinů je letální i za ideálních kultivačních podmínek, mají tedy evidentně vliv i na obvyklé (nestresové) metabolické dráhy a zabezpečují efektivní růst buňky. Studium kombinací delečních mutant ve všech třech CSP ukázalo, že minimálně jeden z proteinů je nezbytný pro přežití za normálních podmínek (stejně jako za nízkých

teplot). Dvojitá delece genů *cspB*/*cspC* způsobuje mimo jiné lysi během vstupu do stacionární fáze a neschopnost tvořit endospory (GRAUMANN *et al.* 1997).

2.1.2.4. Adaptace na úrovni membrány

Membrána je první část bakteriální buňky, která, jak již bylo uvedeno výše, je ovlivněna snížením teploty. Za normální teploty jsou jednotlivé molekuly fosfolipidů v membráně do určité míry pohyblivé. Ztráta této pohyblivosti (tekutosti) má za následek ovlivnění funkcí membrány. V membráně je omezena difúze a enzymy vázané na membránu katalyzují reakce pomaleji. Chladem cytoplazmatická membrána okamžitě ztrácí fluiditu (viz Obrázek 5), což ovlivňuje děje vázané na membránu a těch je v prokaryotické buňce velmi mnoho (McELHANEY 1984, PHADTARE *et al.* 2000, SCHUMANN 2002).



Obrázek 5 Schematické znázornění změn v membránové struktuře a chování lipidové dvojvrstvy po změně teploty ve vnějším prostředí – a) zvýšená fluidizace membrány způsobená nárůstem teploty, b) rigidizace membrány způsobená poklesem teploty (převzato a upraveno dle LOS a MURATA 2004).

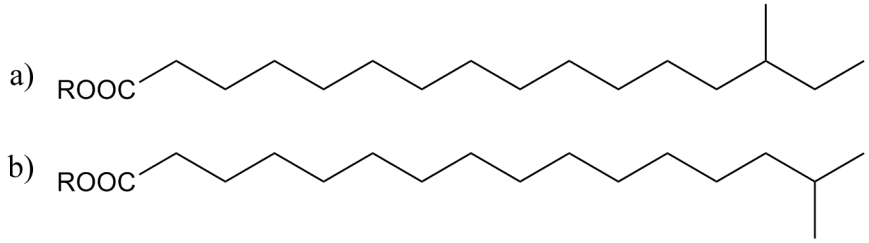
Adaptace bakterie k nízké teplotě tedy spočívá v zachování membránové fluidity, čehož je dosaženo změnou složení mastných kyselin ve fosfolipidech membránové dvojvrstvy. V membráně přibývají mastné kyseliny s nižším bodem fázového přechodu (WEBER A MARAHIEL 2002). Tím je znovu dosažena potřebná membránová fluidita. V případě *Bacillus subtilis* rozlišujeme dva rozdílné mechanizmy – dlouhodobou a krátkodobou adaptaci membrány na chlad (viz kapitoly 2.1.2.4.1. a 2.1.2.4.2.).

Aby mohla bakterie vhodně reagovat na změnu okolní teploty, musí mít senzory, které tuto informaci zachytí. Membrána bakterie je nepochybně primárním senzorem, který vnímá změnu v okolní teplotě. Dostává se jako první komponenta buňky do kontaktu se sníženou teplotou. V membráně *Bacillus subtilis* byl nalezen senzor DesK, který vnímá fluiditu membrány (AGUILAR *et al.* 2001) – ten je součástí dvoukomponentového systému DesK/DesR, který předává informaci o fluiditě membrány do vnitřního prostředí buňky. Zde dochází k fosforylaci odpovědného regulátoru DesR, který následně funguje jako transkripční faktor. Důsledkem je aktivace transkripce genu pro desaturázu mastných kyselin (viz dále).

2.1.2.4.1. Dlouhodobá adaptace u *Bacillus subtilis* na chlad

Za běžných teplotních podmínek převažují v cytoplazmatické membráně *Bacillus subtilis* iso- a anteiso- větvené mastné kyseliny, které se liší pozicí methylové skupiny v hydrofobním řetězci (viz Obrázek 6). Dlouhodobou adaptaci zajišťuje zvýšené množství anteiso- mastných kyselin s nižším bodem tání (převážně anteiso-$C_{15:0}$ a anteiso-$C_{17:0}$) v membránových fosfolipidech.

Větvené mastné kyseliny vznikají pouze *de novo* syntézou (SUUTARI a LAAKSO 1994). Z tohoto důvodu je dlouhodobá adaptace využívána jen v okamžiku, kdy je bakterie schopná růst.



Obrázek 6 Obecná struktura větvených mastných kyselin – a) anteiso- větvená mastná kyselina, b) iso- větvená mastná kyselina. R = fosfoglycerolový zbytek.

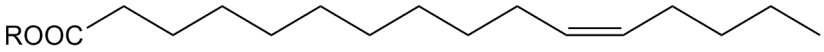
Iso- větvené mastné kyseliny mají podobnou teplotu fázového přechodu jako nevětvené nasycené mastné kyseliny se stejným počtem uhlíkových atomů (KANEDA 1991). Anteiso- větvené mastné kyseliny mají naopak nižší teplotu fázového přechodu než srovnatelné iso- větvené mastné kyseliny (LEWIS a McELHANEY 1985). Anteiso- větvené mastné kyseliny proto tedy efektivněji narušují fosfolipidovou dvojvrstvu a umožňují fluidizaci bakteriální membrány. Za anaerobních podmínek je tento mechanismus jedinou možností, jak adaptovat membránu buněk (BERANOVA *et al.* 2010).

2.1.2.4.2. Krátkodobá adaptace u *Bacillus subtilis* na chlad

Okamžitou adaptaci na snížení teploty zajišťuje desaturáza mastných kyselin. Jedná se o enzym, který zavádí do molekuly již existujícího fosfolipidu dvojnou vazbu. Tento jev se nazývá desaturace (DE MENDOZA *et al.* 1993). Desaturace probíhá u širokého spektra organismů (bakterií, kvasinek, savců i rostlin) analogickým enzymatickým mechanismem. Snížení membránové fluidity spouští signální kaskádu vedoucí ke vzniku enzymu desaturázy, zvýšené zastoupení nenasycených mastných kyselin v membráně naopak tuto signální dráhu zastavuje (AGUILAR, DE MENDOZA 2006). *Bacillus subtilis* má pouze jedinou desaturázu, která je kódována genem *desA* (AGUILAR *et al.*, 1998; ALTABE *et al.* 2003).

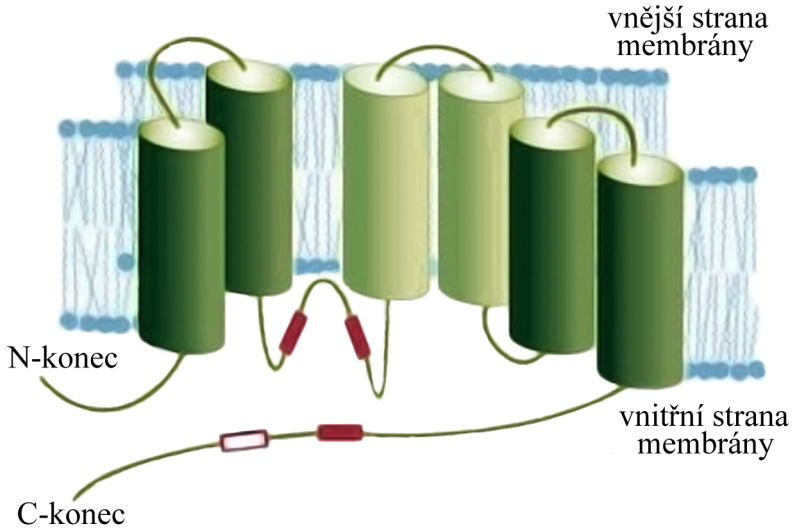
2.1.2.4.2.1. Funkce desaturázy Des

Působením enzymu desaturázy dochází ke změně poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin (viz Obrázek 7) v membráně bakteriální buňky. Zavedením dvojné vazby do molekuly fosfolipidu vznikne ohyb, díky kterému zaujímá molekula větší prostor, což umožní její větší pohyblivost (GRUNER *et al.* 1985). Tím je zajištěna větší fluidita membrány. Při 37 °C je koncentrace tohoto enzymu v buňce velmi nízká, zvyšuje se po přenosu bakterie z 37 °C do 20 °C (AGUILAR *et al.* 1999). Největší nárůst indukce pozorovaný po přesunutí buňky do chladnějšího prostředí má právě gen pro desaturázu. Enzym je regulován v závislosti na fluiditě membrány (RUSSELL 1997).



Obrázek 7 Obecný vzorec cis-nenasycené mastné kyseliny. R = fosfoglycerolový zbytek.

Desaturáza se skládá z šesti transmembránových domén a jedné domény asociované s membránou (viz Obrázek 8). V aktivním místě se pravděpodobně nacházejí konzervované oblasti bohaté na histidin (DIAZ *et al.* 2002).



Obrázek 8 Model trojrozměrné struktury desaturázy Des. Světle jsou vyznačeny transmembránové domény nezbytné pro desaturaci. Červeně jsou znázorněny histidinové domény, bíle neesenciální histidinová doména (převzato a upraveno dle MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

Indukce genu *desA* vede k expresi enzymu desaturázy. Tato desaturáza vytváří dvojnou vazbu v molekule fosfolipidu na pozici 5 (nezávisle na délce řetězce a místě větvení), z tohoto důvodu byla nazvána Δ5-Des (ALTABE *et al.* 2003). Takto upravené mastné kyseliny fluidizují membrány za nízkých teplot.

Obecně může desaturace probíhat u organismů aerobně i anaerobně (RUSSELL 1990). V případě *Bacillus subtilis* je však možná jen aerobní desaturace. Aerobní desaturace je redoxní děj, při kterém desaturáza katalyzuje transport atomů vodíku na molekulu kyslíku. Z tohoto důvodu musí mít bakteriální buňka funkční elektrontransportní řetězec (DENICH *et al.* 2003). Bakterie *Bacillus subtilis* jsou schopny aerobního i anaerobního růstu. Během anaerobního růstu za snížení kultivační teploty dochází k expresi genu *desA*, ale vzniklý enzym je nefunkční. Desaturace nemůže probíhat, protože není přítomen molekulární kyslík (BERANOVA *et al.* 2010).

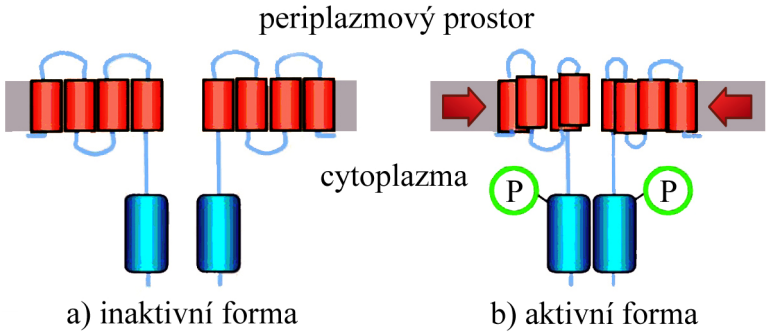
2.1.2.4.2.2. Regulace exprese desaturázy Des dvoukomponentovým systémem DesK/DesR

V membráně *Bacillus subtilis* byl nalezen dvoukomponentový systém kódovaný *desKR* operonem. Tento dvoukomponentový systém registruje informace o teplotě prostředí, ve kterém se buňka nachází. Je to systém tvořený histidinkinázou DesK a DNA vazebným proteinem DesR. Operon *desKR* se v genomu *Bacillus subtilis* vyskytuje v bezprostřední blízkosti genu pro desaturázu mastných kyselin a je nezbytný pro indukci genu *des* (AGUILAR *et al.* 2001).

Histidinkináza DesK je membránový senzor, který registruje membránovou fluiditu. Při snížení membránové fluidity dochází ke změně konformace proteinu DesK, čímž dochází k autofosforylaci histidinu na pozici 188 (viz Obrázek 9). Z hlediska katalytického působení vykazuje DesK tva základní typy aktivit – kinázovou a fosfatázovou. Bližší studium katalytického cyklu DesK odhalilo konformační rozdíly mezi jednotlivými funkčními stavy – krystalové struktury poukazují na specifické změny v sekundární struktuře uspořádání centrálních tetramerních jednotek. Tyto rozdíly v sekundární struktuře zřejmě určují, který z výše uvedených katalytických charakterů DesK bude dominantní. Studiem modifikovaných DesK enzymů bylo potvrzeno, že signály o změně fluidity membrány jsou zaznamenány rotací či asymetrickým ohýbáním helixů. Podobný mechanismus již byl pozorován u několika dalších senzorů – je tedy možné, že analogicky pracují také další hisdinkinázové senzory (ALBANESI *et al*. 2009).

DesK funguje jako kináza i fosfatáza pro protein DesR, v závislosti na okolní teplotě. Nefosforylovaný DesK (při 37 °C) udržuje svou fosfatázovou aktivitou DesR v neaktivní

defosforylované formě. Fosforylovaný DesK pracuje jako kináza, která fosforyluje dimery proteinu DesR a tím ho aktivuje.

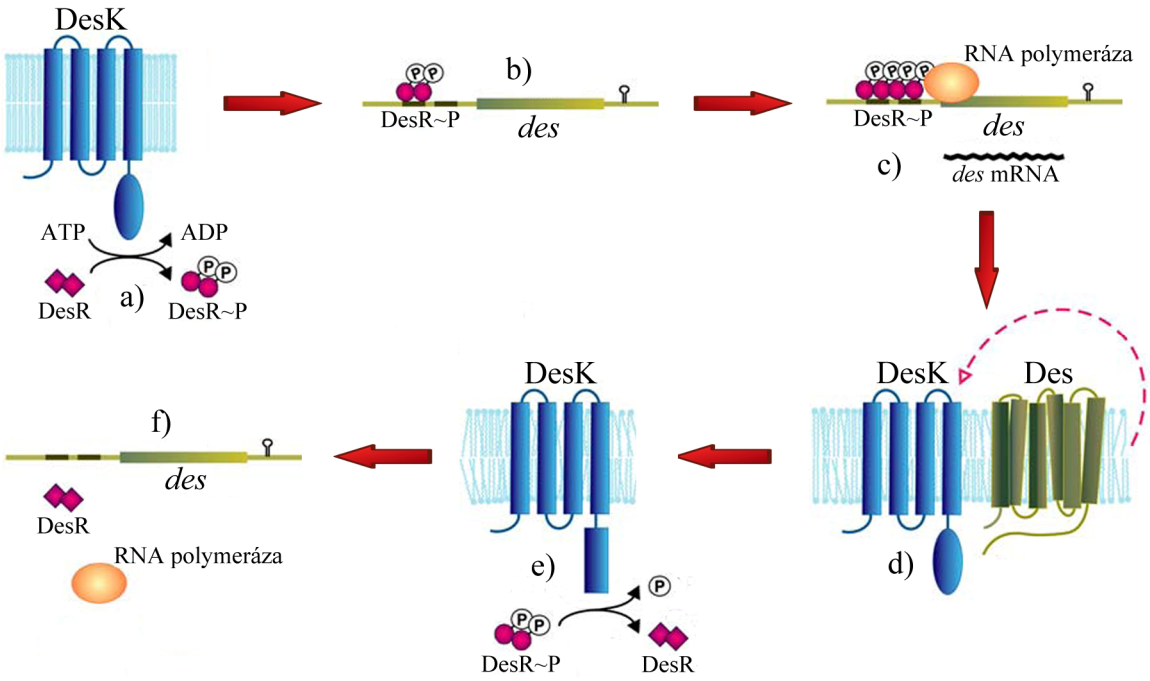


Obrázek 9 Schema struktury a aktivace histidinkinázy senzitivní na změnu membránové fluidity. Aktivace DesK *Bacillus subtilis* za nízkých teplot – a) každá podjednotka DesK má čtyři transmembránové domény, b) při snížení membránové fluidity dochází k autofosforylaci na His188 (převzato a upraveno dle LOS a MURATA 2004).

Fosforylované dimery DesR se váží ve formě tetrameru na promotor genu *des*. Tetramery fosforylovaného DesR se vážou na dvě různá vazebná místa pro fosforylovaný DesR uvnitř *Pdes* (NAJLE *et al.* 2009). Pokud jsou obě vazebná místa pro DesR obsazena fosforylovaným DesR, dochází k vazbě RNA polymerázy na DNA (NAJLE *et al.* 2009) a následně k přepisu genu pro desaturázu mastných kyselin, nezbytné pro krátkodobou adaptaci membrány na chlad. Transkripce genu *des* je regulována přímo koncentrací fosforylovaného DesR v buňce (MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

Důsledkem adaptace je potřebná fluidizace membrány, což zajistí její správnou funkci. Nenasycené mastné kyseliny, které jsou desaturací vytvořeny, ovlivňují konformaci senzoru DesK (viz Obrázek 10), čímž převáží její fosfatázová aktivita vůči DesR a tím je tato signální dráha zastavena (AGUILAR *et al.* 2001).

Bylo zjištěno, že dvoukomponentový systém DesK/DesR se účastní výhradně regulace transkripce genu *des*, nepodílí se na celkové odpovědi buňky na chladový šok (BECKERING *et al.* 2002). Jednotlivé složky systému jsou v buňce přítomny konstitutivně, nikoli dle aktuální potřeby (CYBULSKI *et al.* 2002), chladovým šokem však dochází k jejich aktivaci.



Obrázek 10 Model signální dráhy, která zajišťuje optimální membránovou fluiditu u *Bacillus subtilis* – a) senzor DesK registruje pokles membránové fluidity a fosforyluje DesR, b) DesR se váže na oblast promotoru genu *des*, c) dochází k interakci fosforylovaného DesR s RNA polymerázou a je aktivována transkripce genu *des*, d) desaturáza Des způsobuje fluidizaci membrány, e) DesK přestává fosforylovat DesR, f) transkripce genu *des* ustává (převzato a upraveno dle MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

2.2. Stacionární fáze růstu u *Bacillus subtilis*

Růst bakteriálních buněk je za optimálních podmínek exponenciální. Po vyčerpání jedné nebo více živin, či nahromaděním zplodin metabolismu, přechází bakterie do stacionární fáze. K tomuto přechodu nedochází okamžitě, ale po různě dlouhé přechodové době (anglicky „transition state“). Ve stacionární fázi buňka přestává růst, neznamená to však, že by se metabolické procesy zcela zastavily – dochází pouze k jejich pozměnění. V bakteriální buňce dochází k přestavbě enzymového aparátu, morfologickým změnám a i změnám na úrovni genové exprese. Tím vším se buňka snaží adaptovat na změnu podmínek. Buněčné kultury ve stacionární fázi se adaptují mnoha rozdílnými mechanismy. Například buňky, které přešly do stacionární fáze z důvodu limitace fosfátem, jsou odlišné složením a genovou expresí od buněk, které byly kultivovány při limitaci glukózou (NYSTRÖM 2004).

Bakterie *Bacillus subtilis* se běžně vyskytují v půdě. V tomto prostředí může často docházet k vyčerpání dostupných živin. Pokud jsou buňky *Bacillus subtilis* limitovány

nedostatkem jedné či více živin, přechází do stacionární fáze růstu. Dochází tak k aktivaci adaptivních procesů, jako jsou sekrece makromolekul (degradačních enzymů, proteáz), příjem běžně nevyužívaných živin, chemotaxe a pohyblivost (zvyšuje pravděpodobnost objevení alternativních zdrojů živin), produkce antibiotik (jako metabolický ventil či výhoda v konkurenčním boji o živiny), ochrana proti oxidačnímu stresu, produkce genů kompetence a sporulace. Buněčná odpověď je řízena regulační sítí, která zahrnuje mnoho vstupů a výstupů. Hlavními transkripčními regulátory jsou Spo0A, AbrB a represor CodY (viz kapitoly 2.2.2. a 2.2.3.).

Po vstupu do stacionární fáze, kterou zapříčinila limitace glukózou, dochází k transkripci asi 150 genů, které nebyly transkribovány během exponenciální fáze; oproti tomu je utlumena transkripce asi 400 genů typických pro exponenciální fázi (BERNHARD *et al.* 2008).

2.2.1. Morfologické změny

Po přechodu z exponenciální do stacionární fáze dochází obecně ke zmenšení buněk. Jednak protože některé buňky ještě dokončují dělení na buňky dceřiné, a dále protože dochází k degradaci vlastních zásobních látek případně komponent buňky. Tento jev se nazývá dwarfing (NYSTRÖM 2004).

Buňky ve stacionární fázi dokončují již započaté buněčné dělení, ale vzhledem k nepříznivým podmínkám v prostředí nezačíná dělení nové (NYSTRÖM 2004).

Ke zmenšování buněk dochází při nedostatku živin. Buňka degraduje zásobní látky, část ribozomů (ve stacionární fázi je jich potřeba mnohem méně než v exponenciální) a složky cytoplazmatické membrány a buněčné stěny (REEVE *et al.* 1984).

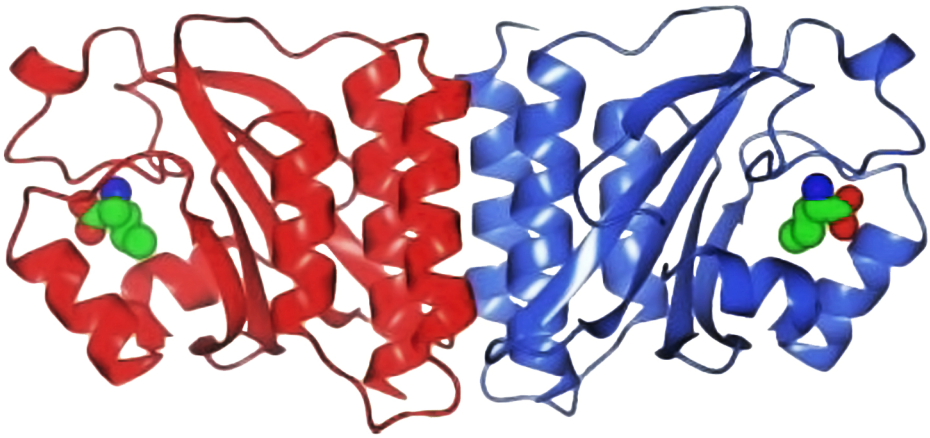
2.2.2. Represor CodY

Pro buňku v určité fázi bakteriálního růstu (například exponenciální či stacionární) je nezbytné efektivně reprimovat geny, které v daný okamžik není potřeba transkribovat. K tomu slouží represory, které se vážou na regulační oblasti genů. V exponenciální fázi je mnoho genů nezbytných pro stacionární fázi reprimováno regulačním proteinem CodY. Tento represor blokuje transkripci nejméně 100 genů během exponenciální fáze a umožňuje jejich transkripci po vstupu do stacionární fáze. Je to GTP vazebný protein (MOLLE *et al.* 2003).

Geny reprimované proteinem CodY mohou být regulovány přímo CodY. Mezi geny reprimované CodY patří *spo0A* (transkripční faktor nezbytný pro sporulaci), *citB* (gen pro

akonitázu), *hag* (gen pro flagelin), geny operonu *dppABCDE* (geny pro transport dipeptidů), degradativní enzymy, geny kompetence, geny antibiotikové rezistence a u patogenních organismů i některé geny virulence (SONENSHEIN 2005, SLACK *et al.* 1993, SLACK *et al.* 1995, MOLLE *et al.* 2003, FERSON *et al.* 1996, FISHER *et al.* 1996, SERROR a SONENSHEIN 1996, WRAY *et al.* 1997, DÉBARBOUILLÉ *et al.* 1999, BERGARA *et al.* 2003, KIM *et al.* 2003, INAOKA *et al.* 2003, SHIVERS a SONENSHEIN 2004).

Protein CodY má velice konzervativní primární strukturu. Jeho hmotnost činí 29 kDa a skládá se z 259 aminokyselin. V buňce funguje ve formě dimeru (viz Obrázek 11) (LEDVIKOV *et al.* 2006).



Obrázek 11 Trojrozměrná struktura represoru CodY. Protein CodY se vyskytuje jako dimer. Barevně jsou odlišeny jednotlivé domény a navázané molekuly izoleucinu (barevné kuličky) (převzato a upraveno dle LEDVIKOV *et al.* 2006).

Aktivita CodY je regulována dvěma způsoby - hladinou GTP a aminokyselinami s postranním větveným řetězcem (valin, leucin a isoleucin). Koncentrace GTP a větvených aminokyselin se v buňce snižuje, pokud buňka přechází do stacionární fáze (LEDVIKOV *et al.* 2006). Tyto dva mechanismy jsou na sobě nezávislé a jejich efekt se sčítá (SONENSHEIN 2005). Pokles intracelulární koncentrace GTP nebo větvených aminokyselin má za následek aktivaci alespoň části genů reprimovaných CodY. GTP vypovídá spíše o aktuálním energetickém stavu buňky, zatímco isoleucin je indikátorem nedostatku živin.

V struktuře proteinu CodY byla objevena doména pro vázání GTP. Pokud je tedy hladina GTP v buňce vysoká, zvyšuje se afinita C-koncové domény proteinu CodY k DNA a protein funguje jako represor genů, které není potřeba transkribovat za příznivých nutričních podmínek. Během hladovění se množství GTP v buňce snižuje a tím i množství GTP vázaného na CodY (RATNAYAKE-LECAMWASAM *et al.* 2001).

Druhou možností, jak regulovat aktivitu CodY, je prostřednictvím větvených aminokyselin. CodY zároveň reguluje operon *ilvBHC leuABCD*, který je zodpovědný za syntézu větvených aminokyselin. Během exponenciálního růstu na bohatém médiu buňka využívá větvené aminokyseliny z prostředí a z tohoto důvodu dochází k represi jejich syntézy. Z větvených aminokyselin má největší vliv na aktivaci represoru CodY isoleucin, a to v koncentraci 10 – 15mM v buňce. Pokud dojde k vyčerpání vnějších zdrojů aminokyselin, CodY přestane reprimovat operony pro jejich syntézu a buňka si větvené aminokyseliny tvoří sama (SHIVERS a SONENSHEIN 2004).

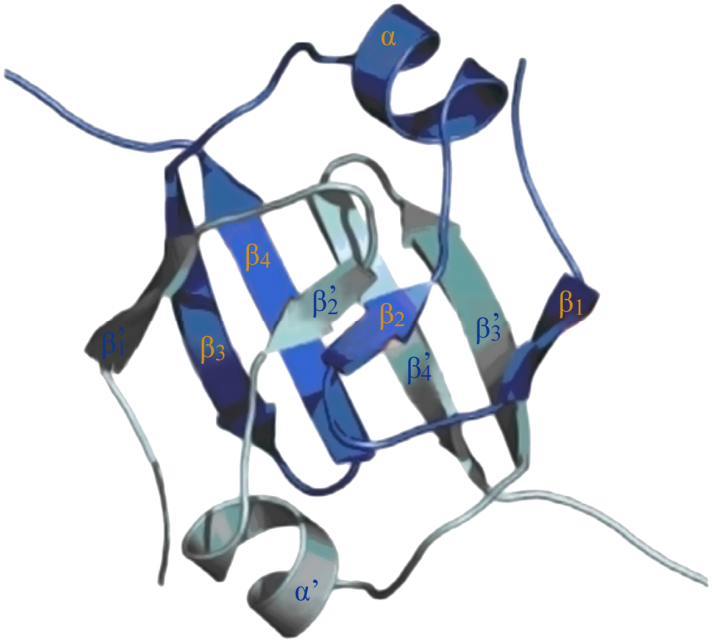
2.2.3. Regulátory AbrB a Spo0A

Protein AbrB (antibiotic resistance protein B) je regulátor přechodu do stacionární fáze. Během exponenciální fáze reprimuje přes 60 genů. Nepřímo (kontrolou jiných regulátorů) reprimuje i další geny (PHILLIPS a STRAUCH 2002). Mezi procesy takto regulované patří produkce degradativních enzymů, geny pro utilizace dusíku, metabolismus aminokyselin, pohyb, syntéza antibiotik, rezistence na antibiotika, přechod do stavu kompetence, transportní systémy, odpověď na oxidativní stres, metabolismus fosfátu, sporulace, regulace buněčného dělení a buněčné diferenciace (BOBAY *et al.* 2004). Nadprodukce AbrB reprimuje sporulaci (HAHN *et al.* 1995).

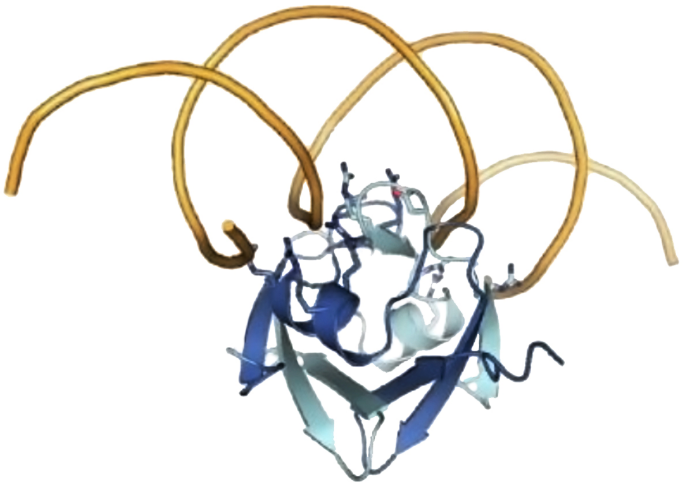
AbrB působí jako represor či jako aktivátor transkripce (často spolu s dalšími transkripčními regulátory). AbrB reprimuje jak geny, které aktivují transkripci, tak i geny, které ji reprimují. Proto může být výsledek jeho působení v buňce dvojí (STRAUCH 1993, STRAUCH a HOCH 1993, STRAUCH 1995). Během růstu buňky je transkripce AbrB autoregulována (STRAUCH *et al.* 1989), regulační kaskáda souvisí s fosforylačním stavem Spo0A (viz dále). AbrB se váže na speciální vazebné místo, a to buď ve formě dimeru (viz Obrázek 12) nebo ve formě tetrametru (VAUGHN *et al.* 2000). Tím je zřejmě dosaženo rozdílného regulačního efektu na dané promotory (VAUGHN *et al.* 2000). AbrB se váže na specifická místa DNA (viz Obrázek 13). Tato afinita je zřejmě způsobena sekundární strukturou DNA. AbrB tedy nereprimuje žádnou typickou sekvenci nukleotidů, ale váže se s různou afinitou na prostorové struktury DNA a brání tak transkripci cílových genů.

Spo0A (hlavní regulátor sporulace) je další důležitý faktor, který ovlivňuje přechod buňky do stacionární fáze a hlavně iniciaci sporulace. Kontrola přechodu buňky do sporulace je řízena složitou regulační síti, což umožňuje bakteriální buňce sporulací odpovídat na různé podněty. Klíčovým faktorem této sítě je fosforylační stav Spo0A. Pokud je v buňce relativně nízká hladina fosforylovaného Spo0A, reprimuje tento protein transkripci *abrB*

(PHILLIPS a STRAUCH 2002). V případě vysoké intracelulární koncentrace fosforylovaného Spo0A dochází ke sporulaci. Spo0A je aktivován fosforylací pomocí fosforylační kaskády. Na začátku této kaskády stojí kinázy Kin (KinA – KinD) schopné vnímat vnitřní i vnější signály (kináza KinA je cytoplazmatický protein, KinB je protein membránový). V dalších krocích se účastní i proteiny, jejichž exprese je závislá na dostupnosti zdrojů dusíku a uhlíku (WANG *et al.* 1997).



Obrázek 12 Protein AbrB ve formě dimeru (převzato a upraveno dle BOBAY *et al.* 2005).



Obrázek 13 Vazba proteinu AbrB na molekulu DNA (převzato a upraveno dle BOBAY *et al.* 2005).

K defosforylaci Spo0A dochází působením nejméně tří fosfatáz. Některé z nich mohou patřit mezi quorum-sensing molekuly, které zprostředkují bakteriální buňce informace o hustotě populace, stavu probíhající replikace DNA či poškození DNA, fungování Krebsova cyklu a poměru GTP a GDP (PHILLIPS a STRAUCH 2002). Funkce Spo0A v rámci iniciace sporulace je zmíněna v samostatné kapitole (viz kapitola 2.2.4.7.1.).

2.2.4. Odpověď buňky na stres

Pokud je buňka vystavena působení stresového faktoru - nedostatku živin, teplotnímu šoku, změně pH, působení ethanolu nebo změně osmolarity prostředí, je první reakcí buňky produkce hlavních stresových proteinů GSPs (anglicky „general stress proteins“) (PRICE 2000). V případě *Bacillus subtilis* je tato odpověď řízena alternativním sigma faktorem σ^B. Další stresovou reakcí je stringentní odpověď (anglicky „stringent response“), která zastavuje proteosyntézu (viz kapitola 2.2.4.1.) (WENDRICH *et al.* 2002). Malá frakce buněk se adaptuje pomocí adaptivní mutageneze (viz kapitola 2.2.4.4.) (SUNG a YASBIN 2002). Buňky ve stacionární fázi jsou vybaveny efektivním systémem specifických proteáz pro degradaci nepotřebných proteinů. Tyto proteázy přispívají k adaptaci buňky (viz kapitola 2.2.4.6.). Určitá subpopulace buněk sporuluje (viz kapitola 2.2.4.7.). Z výše zmíněných adaptivních procesů je energeticky nejnáročnější sporulace, proto k ní buňka přistupuje jako k poslední možnosti adaptace (PHILLIPS a STRAUCH 2002).

Jednotlivé způsoby adaptace se mohou navzájem doplňovat nebo naopak vylučovat. O detailech nejvýznamnějších typů adaptace u *Bacillus subtilis* pojednávají následující kapitoly.

2.2.4.1. Stringentní odpověď

Pokud mají buňky nedostatek glukózy, aminokyselin či rostou kyslíku, dochází k takzvané stringentní odpovědi. Dochází k zastavení transkripce a translace, čímž buňka šetří limitní zdroje. Následně dochází ke změně transkripce a adaptaci na nové podmínky. Signálem o nedostatku aminokyselin je přítomnost nenabité tRNA na ribosomu. Pokud buňka trpí nedostatkem glukózy, dochází k aktivaci proteinu RelA, který katalyzuje syntézu molekuly (p)ppGpp. Molekula (p)ppGpp má schopnost se vázat na molekulu RNA polymerázy a mění její afinitu k určitým promotorům na DNA. Další vlastností (p)ppGpp je schopnost inhibovat enzym nutný pro *de novo* syntézu GTP. Snížení intracelulární koncentrace GTP je tedy dosahováno přímo činností RelA a nepřímo represivní funkcí molekuly (p)ppGpp, která inaktivuje enzym nutný ke vzniku GTP (SONENSHEIN 2005).

2.2.4.2. Alternativní sigma faktor σ^B

V bakterii *Bacillus subtilis* bylo dosud nalezeno 8 alternativních σ faktorů. Alternativní sigma faktor σ^B byl objeven díky asociaci s RNA polymerázovou aktivitou během časné stacionární fáze (HALDENWANG a LOSICK 1980). K transkripci genu *sigB* dochází krátce po začátku stacionární fáze (KALMAN *et al.* 1990). Faktor σ^B kontroluje rozsáhlý regulon stacionární fáze. Jeho součástí jsou proteiny, jejichž exprese je různě závislá na faktoru σ^B (BOYLAN *et al.* 1993). Regulon sigma faktoru σ^B čítá přibližně 150 genů. Faktor σ^B umožňuje transkripci mnoha GSPs, které chrání buňku před možnými stresovými vlivy, které by mohly během stacionární fáze růstu bakterii nastat. Kromě GSPs (které jsou univerzální pro více stresových situací) každý stresový faktor nebo limitující živina vyvolává expresi specifických genů, které působí jako specifická ochrana před konkrétním stresem. (TAM *et al.* 2006). Největší význam má tedy tento transkripční faktor za podmínek, kdy nedochází ke sporulaci (BOYLAN *et al.* 1993).

Gen *sigB* se nachází na *sigB* operonu spolu s dalšími 7 geny, jejichž produkty se podílejí na regulaci exprese faktoru σ^B. Tento operon obsahuje dva promotory. Na promotor, který leží na počátku operonu, nasedá RNA polymeráza s navázaným hlavním transkripčním faktorem σ^A. Ten řídí expresi genů v buňce během exponenciálního růstu a udržuje expresi genů na *sigB* operonu na bazální hladině. Exprese z druhého promotoru je řízena samotným σ^B, čímž dochází k jeho autoregulaci (WISE a PRICE 1995).

Alternativní transkripční faktor σ^B je nezbytný přežití tepelného, chladového i alkoholového šoku (VÖLKER *et al.* 1999).

Během exponenciálního růstu je alternativní transkripční faktor σ^B inaktivován vazbou anti-sigma faktoru RsbW. Tím je znemožněna vazba na RNA-polymerázu a nedochází k expresi GSPs ani k aktivaci signálních drah, jejichž součástí je σ^B. V buňce *Bacillus subtilis* působí i anti-anti sigma faktor RsbV, který se ve své aktivní defosforylované formě váže na RsbW. Tím je znemožněna vazba RsbW na σ^B faktor a ten může ovlivňovat transkripci v buňce. Po snížení intracelulární koncentrace ATP (způsobené nedostatkem živin) se uvolní σ^B a může aktivovat příslušnou odpověď (KANG *et al.* 1996). Fosfatázy RsbU (součást *sigB* operonu) a RsbP jsou schopny defosforylovat RsbV a pozitivně tak regulují aktivaci σ^B. Fosfatáza RsbU je aktivována sníženou koncentrací GTP v buňce, která je způsobena převážně činností RelA proteinu během stringentní odpovědi (viz kapitola 2.2.4.1.). Fosfatáza RbsU tedy defosforyluje RbsV, který se poté váže na RbsW, čímž je uvolněn σ^B. K aktivaci této fosfatázy dochází působením proteinu RsbT. Ten je blokován proteinovým komplexem RsbR-RsbS, který po působení stresu není schopen blokovat RbsT

(CHEN *et al.* 2004). Hladověním a dalšími stresovými faktory je aktivována výše zmíněná fosfatáza RsbP (ZHANG a HALDENWANG 2003). K aktivaci σ^B může docházet i působením jiných stresových faktorů.

2.2.4.3. Obecné stresové proteiny (GSPs)

Obecná stresová odpověď a indukce GSPs je závislá na funkčním alternativním faktoru σ^B. Ten je indukován různými typy stresových situací. Množství jednotlivých GSPs v buňce se liší v závislosti na tom, který stres na buňku působí. Mezi proteiny obecné stresové odpovědi patří například ATP-dependentní Clp protézy (viz kapitola 2.2.4.6.1.), TrxA (thioredoxin, proteinový chaperon), proteiny nespecifické ochrany proti oxidačnímu stresu (např. kataláza KatE, superoxiddismutáza SodA, DNA ochranný protein Dps a další), protein OpuE (transportér pro prolin) či proteomy YtxH a GsiB (jejich funkcí je adaptace na hypotonické prostředí). Další proteiny, které lze zařadit mezi GSPs, jsou GtaB (kóduje UDP-glukózapyrofosforylázu nezbytnou pro výstavbu buněčné stěny) a Dps (nezbytný pro ochranu DNA před oxidativním stresem) (HECKER a VÖLKER 1998, HÖPER *et al.* 2005). U většiny genů z σ^B regulonu není známa přesná funkce, ale pravděpodobně se účastní obecné stresové odpovědi bakteriální buňky (HÖPER *et al.* 2005).

2.2.4.4. Adaptivní mutageneze

Zvýšená schopnost buněk mutovat se nazývá adaptivní mutageneze. Je to jev rozšířený u prokaryot a dokonce se s ním lze setkat u *Saccharomyces cerevisiae* a dalších eukaryot. Konkrétní mechanismus se však pro každý organismus liší (ROSS *et al.* 2006). Jen malá frakce buněk bakteriální kultury ve stacionární fázi uplatňuje adaptivní mutagenezi (SUNG a YASBIN 2002).

K adaptivní mutagenezi dochází ve chvíli, kdy je bakteriální kultura vystavena selektivnímu neletálnímu tlaku (SUNG *et al.* 2003). Mechanismy adaptivní mutageneze mají za následek zvýšení počtu mutací v populaci, čímž je zvýšena genetická rozmanitost bakteriální kultury. Větší diverzita zvyšuje pravděpodobnost přežití nepříznivých podmínek.

Adaptivní mutageneze buněk je stochastický proces (SUNG a YASBIN 2002). U bakterie *Bacillus subtilis* je tento proces ovlivněn například transkripčními faktory ComA a ComK, které jsou nezbytné pro stav buněčné kompetence (SUNG a YASBIN 2002). Mezi další proteiny, které ovlivňují adaptivní mutagenezi, patří DNA polymeráza YgjH, která umožňuje prodlužovat poškozené úseky DNA, čehož jiné polymerázy nejsou schopné (SUNG *et al.* 2003), a proteiny MutS a MutL, které jsou součástí systému na opravu DNA

(anglicky „mismatch repair“). Snížení aktivity tohoto opravného systému má vliv na počet mutací ve stacionární fázi (PEDRAZA-REYES a YASBIN 2004).

Adaptivní mutageneze během stacionární fáze není ovlivněna alternativním transkripčním faktorem σ^B faktorem ani proteinem pro homologní rekombinaci RecA (SUNG a YASBIN 2002).

2.2.4.5. Kompetence

Kompetence je fyziologický stav, kdy je bakteriální buňka schopna přijmout molekulu DNA ze svého okolí a inkorporovat ji do svého genomu. Takto získaná genetická informace může být transkribována a vzniklé proteiny se mohou účastnit adaptace buňky na nové podmínky v prostředí. Do stavu kompetence se buňka dostane, pokud je nějaká živina v nedostatku a zároveň pokud buňka registruje určité quorum-sensing molekuly. Při uměle navozené kompetenci buněk platí, že jen okolo 5 – 10 % buněk, u kterých je indukovaná kompetence, se opravdu stane kompetentní (HADDEN a NESTER 1968, SOLOMON a GROSSMAN 1996). Kompetence je geneticky kódována, ne všechny bakterie mohou být kompetentní. Tato schopnost je regulována dráhou signální transdukce, jejímž výstupem je transkripce genů specifických pro kompetenci. Tyto geny umožňují realizovat děje, které jsou nezbytné pro transformaci. Jedná se o vazbu DNA na membránu, štěpení na jednořetězcovou nukleovou kyselinu, přenos do buňky a inkorporaci do genomu pomocí homologní rekombinace.

Klíčovým genem signální dráhy je *ComK*. ComK je hlavní transkripční faktor pozdních kompetenčních genů, jejichž produkty se uplatňují v procesu transformace a rekombinace, a dále působí pozitivně i na svou vlastní transkripci a ovlivňuje expresi i mnohých dalších genů. ComK působí jako transkripční faktor pro geny účastnící se transformace a rekombinace, SOS odpovědi, metabolismu DNA, sporulace a dalších procesů.

Exprese faktoru ComK je kontrolována na transkripční (přímo i nepřímo) a posttranslační úrovni. Na přímé regulaci transkripce se podílí více proteinů, například DegU, AbrB či CodY. Proteinem AbrB během exponenciální fáze blokuje předčasnou transkripci *comK*. (HAMOEN *et al.* 2003). CodY stejně jako AbrB brání během exponenciální fáze předčasné transkripci genu *comK* a to přímo i nepřímo (RATNAYAKE-LECAMWASAM *et al.* 2001).

Posttranslačních modifikací se účastní produkty genů *mecA* a *clpC* (viz kapitola 2.2.4.6.1.) (MSADEK *et al.* 1994).

2.2.4.6. Degradace proteinů

Po vstupu do stacionární fáze dochází ke změnám genové exprese a tím i ke změně zastoupení jednotlivých proteinů v buňce. Buňka ve stacionární fázi vyžaduje pro své efektivní přežití jiné proteiny než ve fázi exponenciální. Mimo exprese proteinů specifických pro stacionární buňky je nutno degradovat nepotřebné proteiny. Tato degradace je velmi efektivně řízena. Významnou roli v buňce po vstupu do stacionární fáze hrají Clp proteázy, které patří mezi GSPs. Clp proteázy rozeznávají a degradují nefunkční, agregované nebo již nepotřebné proteiny, které v bakteriální buňce přibývají, pokud jsou zdroje pro růst omezeny (GERTH *et al.* 2008).

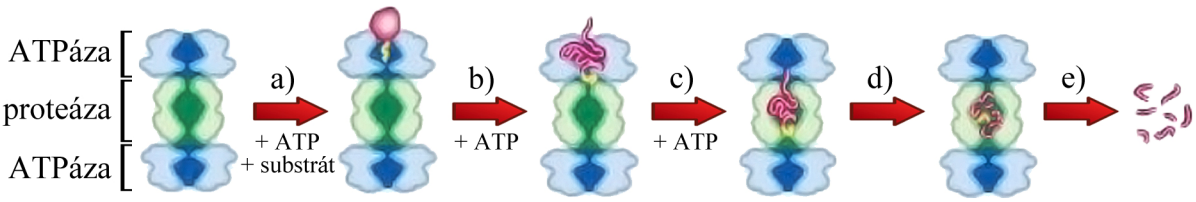
2.2.4.6.1. Funkce ATP-dependentních Clp proteáz

Clp proteázy tvoří hetero-oligomerní komplexy s AAA^+ ATPázami (anglicky „ATPases Associated with Alternative Activities“, skupina ATPáz spojená s různými buněčnými procesy – například replikace DNA, transkripce, hrají i roli jako molekulární chaperony) a proteolytickou komponentou ClpP (GOTTESMAN 2003). U bakterie *Bacillus subtilis* byly nalezeny tři různé Clp ATPázy, které tvoří komplex s proteázou ClpP: ClpC, ClpE a ClpX. ATPázy rozpoznají substrát a dopraví ho k degradaci pomocí ClpP (GOTTESMAN 2003). V doméně proteinu ClpC dochází k postupnému odbourávání proteinu (viz Obrázek 14) pomocí přítomných proteolyticky aktivních míst.

Clp proteáza rozpoznává protein určený k degradaci dle sekvence na N-konci tohoto proteinu. Tato koncová sekvence je přístupná pro proteázy pouze za určitých okolností. Například pokud protein přestane být součástí komplexu, nebo pokud je připojena sekvence určující jeho degradaci. Další možností je přímé zprostředkování vazby mezi degradovaným proteinem a proteázou pomocí adaptorových proteinů (degradace ComK při exponenciálním růstu) (TURGAY *et al.* 1997, WIEGERT a SCHUMANN 2001, GOTTESMAN 2003).

Mezi proteiny, které jsou systémem Clp proteáz degradovány, patří ComK (transkripční aktivátor genů nutných pro kompetenci) a SpoIIAB. SpoIIAB je anti-sigma faktor sigma faktoru σ^F pro sporulaci, SpoIIAB reprimuje funkci σ^F. Dalším cílem Clp proteáz jsou proteiny podílející se na syntéze buněčné stěny MurAA (katalyzují první krok v syntéze buněčné stěny) a enzymy účastnící se metabolismu aminokyselin a nukleotidů. To vše zajišťuje buňkám ekonomické využití zdrojů, které jsou ve stacionární fázi omezeny. Proteolýza realizovaná Clp proteázami má zásadní vliv na proteom buňky přesto, že některé proteiny jsou pravděpodobně degradovány nezávisle na Clp proteázách. Hlavní regulační vliv na biosyntetické dráhy je skrze degradaci proteinů účastnících se počátku biosyntetic-

kých drah v buňce. Zatím nebyl objeven společný motiv ve struktuře substrátů pro Clp proteázy, dle kterého by byly proteiny rozpoznávány (GERTH *et al.* 2008).



Obrázek 14 Schema stavby a funkce Clp proteáz, které degradují proteiny za spotřeby ATP – a) ATPázy rozbalují sbalený protein, b) protein je přemístěn do ClpP domény za spotřeby energie z ATP, c) – e) protein je postupně degradován pomocí proteolyticky aktivních míst v doméně ClpP (převzato a upraveno dle GOTTESMAN 2003).

2.2.4.7. Sporulace

Některé bakteriální druhy (například rody *Bacillus* a *Clostridium*) jsou schopny za nepříznivých podmínek sporulovat. Vegetativní buňka se změní v endosporu, což je metabolicky téměř neaktivní buňka. Nejčastějším důvodem sporulace je vstup do stacionární fáze způsobený nedostatkem živin. Smyslem sporulace je překonat nepříznivé podmínky v okolí za minimální spotřeby energie. Tento proces je od určitého okamžiku nevratný. Rozhodnutí buňky o začátku sporulace je tedy velmi pečlivě regulováno. Hlavním regulátorem vstupu do stacionární fáze je Spo0A. Na celém procesu sporulace se podílí několik sigma faktorů: σ^H, σ^E, σ^F, σ^G, σ^K (ERRINGTON *et al.* 1996).

Během procesu sporulace vznikají z tyčinek *Bacillus subtilis* oválné buňky, které se nazývají endospory. Přeměna buňky v endosporu trvá asi 7 – 8 hodin. Endospory jsou metabolicky neaktivní, velice odolné vůči vnějším vlivům a stabilní po velmi dlouhou dobu. Pokud dojde ke zlepšení podmínek v prostředí, kde se endospora nalézá, může během několika minut buňka vyklíčit. Tento proces se nazývá germinace. Buňka za příznivých podmínek poté prochází obvyklými cykly růstu a dělení.

Bylo pozorováno, že sporuluje vždy jen určitá subpopulace buněk. Zdá se, že rozhodnutí, která buňka bude sporulovat, a která přejde do stavu genetické kompetence nebo adaptivní mutageneze, je stochastický proces (MAUGHAN a NICHOLSON 2004). Bakteriální buňka nemůže být současně kompetentní k přijetí DNA z vnějšího prostředí a sporulovat, musí si vybrat, kterou formu adaptace zvolí (PEREGO a HOCH 1996).

2.2.4.7.1. Sporulační faktor Spo0A

Iniciace sporulace je regulována komplexní sítí regulátorů. Klíčovým regulátorem je protein Spo0A a jeho vlastnost být fosforylován či defosforylován.

Fosforylovaný transkripční faktor Spo0A se váže na tzv. 0A-box (5´- TGTCGAA-3´), který byl nalezen v promotorech genů, které Spo0A reguluje (STRAUCH *et al.* 1990). Zatím bylo identifikováno 121 genů, které jsou pod přímou kontrolou fosforylovaného Spo0A. Mezi nimi je 30 samostatných genů a 24 operonů nebo multigenních cistronů (FUJITA *et al.* 2005). Spo0A je tedy na počátku kaskády dalších alternativních sigma faktorů vedoucích k přeměně buňky na dormantní sporu. Pokud se buněčná koncentrace fosforylovaného Spo0A zvýší nad určitou kritickou hodnotu, působí fosforylovaný Spo0A jako transkripční faktor a umožňuje expresi genů nutných pro sporulaci (PHILLIPS a STRAUCH 2002). Tato regulace je vysvětlena různou afinitou k promotorům genů regulovaných fosforylovaným Spo0A. Tyto promotory mají pravděpodobně nižší afinitu k fosforylovanému Spo0A, tudíž je zapotřebí vyšší intracelulární koncentrace fosforylovaného proteinu k iniciaci sporulace (FUJITA *et al.* 2005). Exprese Spo0A je zároveň regulována pozitivní zpětnou vazbou (STRAUCH *et al.* 1992, STRAUCH *et al.* 1993). Nízká koncentrace fosforylovaného Spo0A při přechodu buňky do stacionární fáze blokuje transkripci *abrB* genu (viz kapitola 2.2.3.).

Fosforylační stav Spo0A se odvíjí od působení proteináz a fosfatáz v rámci fosforylační kaskády. Fosforylační kaskáda jejímž výsledkem je fosforylace (a tím aktivace) transkripčního faktoru Spo0A začíná pěti histidinkinázami (KinA – KinE). Tyto kinázy nejprve fosforylují Spo0F protein. Fosfátová skupina z fosforylovaného Spo0F je poté přenesena fosfotransferázou Spo0B na Spo0A (PHILLIPS a STRAUCH 2002). Jednotlivé kinázy jsou schopny zaregistrovat změny v okolí buňky i změny vnitřního prostředí buňky. Každá kináza je aktivována jiným ligandem, proto je rozhodnutí buňky o sporulaci provedeno na základě více různých signálů. Aktivita kinázy KinC a KinD je pravděpodobně závislá pouze na ligandech, které se vyskytují v buňce během exponenciální fáze. KinC může navíc aktivovat přímo Spo0B, bez účasti faktoru Spo0F. Kinázy KinA a KinB jsou aktivovány ligandy, které se vyskytují v buňce časné stacionární fáze (JIANG *et al.* 2000).

Sporulačního proces je regulován i fosfatázami. Ty mají za úkol defosforylovat fosforylovaný Spo0F (čímž dojde k jeho inaktivaci), aby nedocházelo ke sporulaci v případě, že je pro buňku výhodnější jiná forma adaptace na vnější podmínky. Všechny výše zmíněné histidinkinázy (KinA – KinE) mají také fosfatázovou aktivitu vůči fosforylovanému Spo0F – ta je však aktivována jinými ligandy, než aktivita kinázová. Další možností jak defosforylovat fosforylovaný Spo0A je působením Spo0E. Tato fosfatáza

působí přímo na Spo0A a vrací ho do nefosforylované formy. Mezi regulačními proteiny nalézáme i RapA (Spo0L a GsiA) a RapB (Spo0P), které defosforylují fosforylovaný Spo0F (PEREGO *et al.* 1994). K expresi genu *rapB* dochází pouze během exponenciálního růstu. Exprese genu pro *rapA* je pro změnu aktivovaná dvousložkovým systémem ComP/ComA, který je podstatný pro stav kompetence. Bakteriální buňka nemůže být současně kompetentní k přijetí DNA z vnějšího prostředí a sporulovat (PEREGO a HOCH 1996).

Z výše uvedeného je zřejmé, že iniciace sporulace je adaptací, ke které buňka přistupuje na základě rozmanitých podnětů. Komplexní regulace je zásadní pro přežití buněk se schopností sporulace, protože pro bakterii není výhodné sporulovat, pokud je možná jiná adaptace a růst (i když pomalý). Sporulující bakterie by totiž mohla prohrát v kompetici s ostatními organismy o místo i živiny v prostředí (GOTTIG *et al.* 2005).

2.3. Odpověď na chladový stres ve stacionární fázi u *Bacillus subtilis*

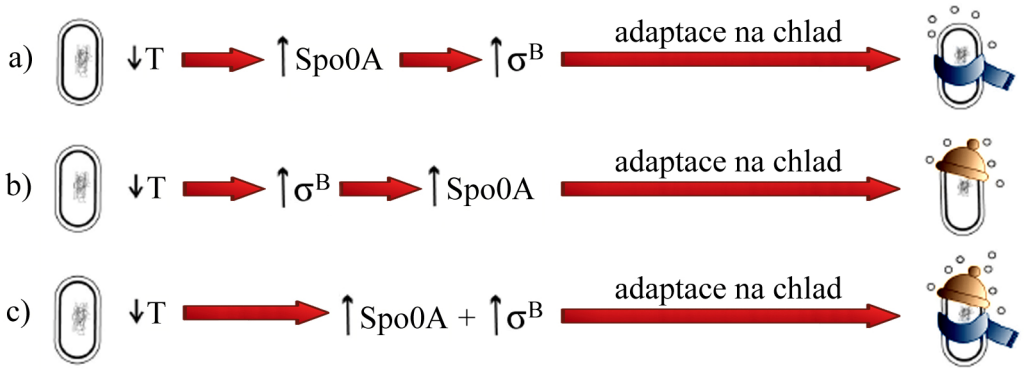
Vývoj spor a odolnost vůči stresu jsou u bakterie *Bacillus subtilis* řízeny transkripčními faktory Spo0A a σ^B. Oba faktory jsou výrazně indukovány po chladovém šoku (z 37 °C na 20 °C). Ztráta σ^B snižuje životaschopnost buněk ve stacionární fázi při chladovém šoku 10 – 50 ×, ztráta Spo0A až 10 000 ×. Obecná stresová odpověď u *Bacillus subtilis* je řízena alternativním sigma faktorem σ^B, který nasedá na RNA polymerázu. Spo0A je klíčový regulátor při zahájení sporulace (viz kapitola 2.2.4.7.1.) a je zodpovědný i za odolnost nesporulujících chladově adaptovaných buněk – jeho ztráta například snižuje schopnost přežití tepelného šoku (MÉNDEZ *et al.* 2004).

Kompletní adaptace na chlad u *Bacillus subtilis* probíhá třemi možnými způsoby. V důsledku chladového šoku buď dochází k fosforylaci Spo0A, který je esenciální pro indukci *sigB* (viz Obrázek 15a), k vzniku σ^B, který je esenciální pro indukci *Spo0A* (viz Obrázek 15b), anebo k nezávislé indukci exprese genů *sigB* i *Spo0A.* (viz Obrázek 15c) (MÉNDEZ *et al.* 2004).

Po přenesení buněk z 37 °C do 20 °C nedochází u *Bacillus subtilis* k lagu kultury a i přes nízkou rychlost růstu dosahuje kultura na konci exponenciální fáze stejné optické denzity, jako při 37 °C. Dochází k 10násobnému nárůstu exprese σ^B a k 4 – 5násobnému nárůstu indukce *spo0A.* Při 37 °C jsou oba proteiny vytvářeny jen na počátku stacionární fáze (MÉNDEZ *et al.* 2004).

Jak již bylo uvedeno výše, σ^B je alternativní transkripční faktor, který nasedá na RNA polymerázu. Kontroluje přes 200 genů (asi 5 % genomu) bakterie *Bacillus subtilis* a jeho

ztráta vede ke snížení odolnosti na stresové situace (HECKER a VÖLKER 1998, PETERSOHN *et al.* 2001, PRICE 2002). Je nezbytný pro růst (BRIGULLA *et al.* 2003) a přežití nesporulujících buněk za snížené teploty a pro sporulaci (MÉNDEZ *et al.* 2004). GSPs (jejichž expresi řídí σ^B) se zdají být nezbytné pro optimální růst (BRIGULLA *et al.* 2003) i pro efektivní přežití ve stacionární fázi za nízkých teplot (MÉNDEZ *et al.* 2004). Je zajímavé, že nástup exprese GSPs se liší v závislosti na teplotních podmínkách růstu. Při nižší kultivační teplotě nastupuje až po 4 – 5 hodinách růstu, zatímco k expresi genů způsobené chladovým stresem či nedostatkem živin dochází už po 15 minutách (MÉNDEZ *et al.* 2004).



Obrázek 15 Tři možné způsoby kompletní adaptace na chlad u *Bacillus subtilis* po působení chladového šoku – a) vznik fosforylovaného Spo0A, který je esenciální pro indukci *sigB*, b) vznik σ^B, který je esenciální pro indukci *Spo0A*, c) nezávislá indukce exprese genů *sigB* i *Spo0A* (převzato a upraveno dle MÉNDEZ *et al.* 2004).

2.3.1. Vliv chladu na sporulaci

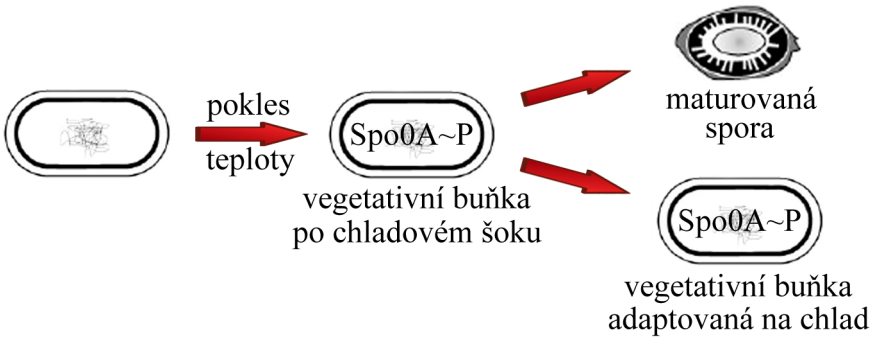
Jak již bylo uvedeno dříve, některé bakterie (například rody *Bacillus* a *Clostridium*) mají schopnost tvořit za nepříznivých podmínek endospory. Vliv chladu na sporulaci není dosud přesně prozkoumán – tuto adaptaci bakterie při působení chladového šoku většinou neuplatňují. Je to zřejmě proto, že chlad brání správné funkci enzymů, klíčových pro tuto přeměnu. Zároveň je omezena transkripce příslušných genů, pouze 15 % genů nezbytných pro sporulaci je indukováno chladovým stresem (BUDDE *et al.* 2006). Podíl dormantních spor v populaci kultivované při 15 °C je až 1 000 × menší než v populaci kultivované při 37 °C, pokud ostatní okolnosti indukují sporulaci (BRIGULLA *et al.* 2003, BUDDE *et al.* 2006). Schopnost bakterie sporulovat se však působením chladu neztrácí, po opětovném

zvýšení kultivační teploty (a při působení potřebných signálů z vnějšího i vnitřního prostředí buňky) buňka normálně zahájí sporulaci.

Pokud je v bakterii provedena delece genů pro proteiny chladového šoku (viz kapitola 2.1.2.3.) – v různých kombinacích (*cspB* a *cspC* nebo *cspB* a *cspD*), buňka není schopna zahájit sporulaci. Z toho je zřejmé, že tyto proteiny mají i velký regulační význam v buněčné diferenciaci (WEBER *et al.* 2001a, WEBER *et al.* 2001b, MOVAHEDI a WAITES 2002).

Pokud působí chladový šok na již sporulující buňky, dochází k indukci 13 proteinů, které před chladovým šokem indukovány nebyly (MOVAHEDI a WAITES 2002). Patří mezi ně i proteiny teplotního šoku (HSP, anglicky „heat shock proteins“).

Prozkoumán byl vliv sporulačního faktoru Spo0A. Jeho ztráta vede k vyšší citlivosti buňky na chladový stres. V exponenciální fázi růstu po chladovém šoku dochází k jeho nadprodukci, má tedy zjevně vliv i na adaptaci na stres (viz Obrázek 16). Jednou z jeho hlavních funkcí je reprimovat gen *abrB* (viz kapitola 2.2.3.). Tato vlastnost pravděpodobně souvisí s přežíváním nesporulujících buněk během stacionární fáze (MÉNDEZ *et al.* 2004).



Obrázek 16 Schematické znázornění dvou klíčových funkcí sporulačního faktoru Spo0A v bakteriální buňce – zahajuje sporulaci a pomáhá adaptovat buňku na nízkou teplotu (přejato a upraveno dle MÉNDEZ *et al.* 2004).

2.4. Shrnutí

Chování buňky při snížené teplotě jistě zasluhuje pozornost, protože teplota je velmi snadno ovlivnitelný parametr během kultivace bakterií. Navíc řada mechanismů chladové adaptace dosud není známa – např. vliv chladu na sporulaci. Během stacionární fáze růstu dochází ke změnám v metabolismu buněk a populace se rozrůzňuje na subpopulace, z nichž každá vykazuje určité metabolické odlišnosti. Pro přežití za nízkých teplot je nezbytný funkční regulon σ^B. Mechanismy, které buňka uplatňuje během stacionární fáze, jsou velmi

rozmanité a lze těžko odlišit, který mechanismus má v daný okamžik největší vliv na fyziologii buňky. Některé metabolické změny mohou probíhat současně, jiné se navzájem vylučují (např. kompetence a sporulace).

3. Materiál a metody

3.1. Modelový mikroorganismus

Experimenty pro tuto práci byly prováděny na mikroorganismu *Bacillus subtilis*. Bylo použito více kmenů. Všechny použité kmeny byly odvozeny od kmene *Bacillus subtilis JH642*, který byl izolován z přírody. Laboratorně připravené kmeny: *AKP3 (JH642 amyE*::*Pdes-lacZ), AKP4 (JH642 des*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ) a AKP21 (JH642 desKR*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ)* byly připraveny (AGUILAR *et al.* 1998) pro studium chladového stresu.

Rod *Bacillus* patří mezi grampozitivní bakterie s nízkým obsahem GC párů. *Bacillus subtilis* je bakterie nepatogenní. Do stejného rodu patří dalších 47 bakteriálních druhů. Buňky rodu *Bacillus* mají tyčinkovitý tvar, někdy mohou tvořit řetízky. Velikost buněk se obvykle pohybuje v rozmezí 0,5 – 2,5 × 1,2 – 10 µm, v závislosti na růstových podmínkách. Pro tento rod je charakteristická tvorba velmi odolných endospor, které jsou nejčastěji oválné, světlolomné, špatně barvitelné a rezistentní k mnoha faktorům, např. k vysoké teplotě, dehydrataci či ozáření (HARWOOD a ARCHIBALD 1990).

Přirozeně obývá *Bacillus subtilis* svrchní vrstvy půdy. Je to mezofilní, fakultativně aerobní bakterie. Teplotní optimum je 39 °C, ale je schopna růst v rozmezí od 11 °C do 53 °C (WEBER a MARAHIEL 2002). Je nenáročný na kultivační podmínky, roste na běžných komplexních mediích. Jedná se o častý modelový organismus pro studium bakterií.

Bakteriální kmen byl uchováván ve formě sporových konzerv (viz kapitola 3.6.).

3.2. Přístroje

Seznam přístrojů použitých pro experimenty, jejich typů a výrobců je uveden v tabulce (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Přehled použitých přístrojů.

přístroj	typ přístroje	výrobce přístroje
centrifuga	Centra CL3	IEC
centrifuga	Mikro 22R	Hettich
centrifuga	Optima L-90K, rotor SW 41	Beckman
průtokový cytometr	BD LSR II Flow cytometer	BD Scientific
fluorometr	FluoroMax3	Jobin Yvon
chladič	FT 200	Julabo
inkubátor	INE 200	Memmert
inkubátor	Major Scientific MD-02-220	BioTech
pH metr	Orion 2 Star	Thermo
automatická pipeta	Multipette Xstream	Eppendorf
spektrofotometr	DU 530	Beckman
teploměr	Testo 735-2	Fischer Scientific
třepačka	NB-205	N-Biotek
třepačka	Classic C76	New Brunswick Scientific
třepačka	Orbi safe	Gallenkamp
třepačka	PS-3D	Grant Bio
analytická váha	ExplorerPro	OHAUS
vodní lázeň	ED	Julabo
vodní lázeň	MB	Julabo
vortex	Lab dancer	IKA
vývěva	N 811kt. 18	Fischer Scientific

3.3. Chemikálie

Seznam použitých chemikálií a výrobců je uveden v tabulce (viz Tabulka 2).

Tabulka 2 Přehled použitých chemikálií.

chemikálie	Výrobce
C_2FDG	Invitrogen
DL-alanin	Lachema
BSA	Pierce
Bacto beef extrakt	Difco
Bacto yeast extrakt	Oxoid
Bactopepton	Oxoid
BME	Roth
DNáza	Sigma Aldrich
DMSO	Sigma Aldrich
DPH	Sigma Aldrich
chloramfenikol	Sigma Aldrich
chloroform	Lachner
isopropanol	Lachner
Live/Dead Kit	Molecular Probes
lysozym	Sigma Aldrich
methanol	Lachner
Nutrient agar	Difco
ONPG	Sigma Aldrich
Tris	Roth
Triton-X 100	Sigma Aldrich
trypton	Oxoid

Ostatní použité chemikálie byly chemické čistoty p.a. od firmy Lachema a nebyly dále modifikovány.

3.4. Kultivační půdy

3.4.1. Sporulační agar

Sporulační agar byl připraven ze základu A a roztoku B (příprava viz Tabulka 3). Obě složky byly sterilizovány odděleně. Po částečném zchladnutí (na cca 50 °C) byl k 1000 ml základu A přidán 1 ml roztoku B. Ještě teplé medium bylo nalito do sterilních Petriho misek o průměru 9 cm (cca 20 ml media na misku). Po ztuhnutí vysychaly misky (otočené dnem vzhůru) cca 4 dny ve sterilním boxu, kde byly následně i uchovávány.

Tabulka 3 Příprava základu A a roztoku B.

složky		**množství**
A	NaCl	1,00 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
	Nutrient agar	23,00 g
	destilovaná H_2O	ad 1000 ml
B	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,28 g
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,98 g
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147,00 g
	destilovaná H_2O	ad 1000 ml

3.4.2. Komplexní kultivační medium KM1

Kultivační medium KM1 bylo připraveno z roztoků A – C (příprava viz Tabulka 4). Tyto roztoky byly sterilizovány odděleně. Po vychladnutí byly asepticky slity a doplněny sterilní destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml.

Komplexní kultivační medium KM1 bylo použito pro kultivaci *Bacillus subtilis AKP 3*. Před začátkem kultivace bylo do media přidáno antibiotikum (chloramfenikol, 5 μg na 1 ml media), které zabraňuje kontaminaci kultury jinými bakteriemi, a na které je kmen *AKP 3* rezistentní.

Tabulka 4 Příprava roztoků A – C. Před sterilizací bylo pH roztoku C upraveno na 7,0 pomocí 1M KOH či 1M HCl.

složky		**množství**
A	Bactopepton	5,00 g
	destilovaná H_2O	ad 100 ml

složky		množství
B	glukóza	5,00 g
	destilovaná H_2O	ad 100 ml
C	Bacto beef extract	1,50 g
	Bacto yeast extract	1,50 g
	NaCl	3,50 g
	KH_2PO_4	1,32 g
	K_2HPO_4	3,50 g
	destilovaná H_2O	ad 500 ml

3.4.3. Komplexní kultivační medium LB

Komplexní kultivační medium LB bylo připraveno podle Tabulky 5. Před začátkem kultivace byla do media přidána antibiotika, která zabraňují kontaminaci kultury, a na které jsou dané kmeny rezistentní – pro kmen *AKP 3* byl přidán chloramfenikol (5 μg na 1 ml media) a pro kmeny *AKP 4* a *AKP 21* byl přidán chloramfenikol (5 μg na 1 ml media) a kanamycin (5 μg na 1 ml media).

Tabulka 5 Příprava komplexního kultivačního media LB. Před sterilizací bylo pH upraveno na 7,0 pomocí 1M KOH či 1M HCl.

složky	množství
Bacto yeast extract	5,00 g
trypton	10,00 g
NaCl	10,00 g
destilovaná H_2O	ad 1000 ml

3.4.4. Pevné kultivační medium LB

Kultivační medium LB bylo připraveno podle Tabulky 5. Při přípravě agarových misek byl do kultivačního LB media přidán agar (25 g/1000 ml media). Ještě teplé medium bylo nalito do sterilních Petriho misek o průměru 9 cm (cca 20 ml media na misku). Po ztuhnutí misky vysychaly (otočené dnem vzhůru) cca 4 dny ve sterilním boxu, kde byly následně i uchovávány.

Tabulka 6 Příprava komplexního kultivačního media LB. Před sterilizací bylo pH upraveno na 7,0 pomocí 1M KOH či 1M HCl.

složky	množství
Bacto yeast extract	5,00 g
trypton	10,00 g
NaCl	10,00 g
destilovaná H_2O	ad 1000 ml

3.5. Sterilizace

Kultivační média, roztoky, destilovaná voda, plastové jednorázové špičky pro automatické pipety a plastové mikrozkumavky Eppendorf byly sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut při přetlaku vodní páry (0,15 MPa). Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušné sušárně 1 hodinu při 160 °C.

3.6. Příprava sporových konzerv

Bakteriální kultura byla napěstována na komplexním mediu KM1 do OD_{450nm} 0,5. Z takto narostlé kultury bylo zaočkováno 20 misek se sporulačním agarem. Sterilně bylo zaočkováno 0,1 ml na každou misku a rozetřeno sterilní skleněnou hokejkou. Misky byly kultivovány dnem vzhůru v termostatu při 37 °C po dobu 4 dnů.

Na každou misku byly napipetovány 3 ml sterilní H_2O, biomasa byla resuspendována sterilní hokejkou a sterilně přenesena do plastové centrifugační zkumavky Falkon 50 ml (sterilní od výrobce). Poté byla suspenze 3 × promyta 30 ml sterilní H_2O (centrifuga CL3R, vždy po dobu 20 minut při 4600 rpm). Supernatant byl odpipetován, sediment resuspendován v cca 2 ml sterilní H_2O a převeden do centrifugační zkumavky. Po 15 minutách centrifugace byl pelet resuspendován v 15% glycerolu a rozdělen do mikrozkumavek Eppendorf (objem 50 μl nebo 100 μl). Sporové konzervy byly uchovávány při –20 °C.

Před použitím byly spory aktivovány zahříváním sporové konzervy po dobu 15 minut při 70 °C.

3.7. Kultivace bakterií, růstová křivka

Bakterie byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách v třepačkách temperovaných na požadovanou teplotu. V případě potřeby rychlého snížení teploty byla využívána třepač-

ka vodní (Brunswick), v ostatních případech třepačky vzdušné (pro objemy do 30 ml třepačky NB 205, pro větší objemy či nízké teploty třepačka Gallenkamp). Pro zajištění dostatečné aerace byly baňky plněny do 20 % celkového objemu. Třepačky byly nastaveny na 170 rpm.

Růst bakteriální kultury byl sledován pomocí měření optické denzity. Optická denzita bakteriální suspenze byla měřena na spektrofotometru Beckman DU 530 ve skleněné kyvetě o optické dráze 10 mm, při vlnové délce 450 nm (OD_{450nm}). Jako referenční vzorek byla použita destilovaná voda. Od naměřené hodnoty byla vždy odečtena hodnota optické denzity pro příslušné kultivační medium, naměřená před zahájením pokusu. Optická denzita se obecně měří jen během exponenciálního růstu, po vstupu do stacionární fáze se již optická denzita kultury neměnila (nebo jen minimálně).

Sporová konzerva byla zahřívána 15 minut při 70 °C. Poté z ní bylo zaočkováno do 30 ml sterilního kultivačního LB media. V závislosti na teplotě kultivace bylo zaočkováno 2 – 20 µl suspenze ze sporové konzervy. Kultivace probíhala většinou přes noc (cca 8 h) ve vzdušněné třepačce za příslušné kultivační teploty, ve které probíhaly další pokusy (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C nebo 37 °C).

Exponenciální kultura byla použita pro přeočkování do vytemperovaného kultivačního media na OD_{450nm} cca 0,010 – 0,005. Odběry určené pro sledování růstu byly prováděny sterilně a odebrané vzorky měřeny při OD_{450nm}. Intervaly mezi odběry kultury pěstované v 37 °C byly 15 minut a pro kultury pěstované v 25 °C byly 45 minut. Odebraný vzorek (250 ml) byl naředěn tak, aby se měřená OD_{450nm} pohybovala mezi hodnotami 0,1 – 0,5. Získaná hodnota byla korigována dle ředění a dle optické denzity samotného kultivačního media. Do grafu byly vynášeny hodnoty logaritmu (o základu 2) tisícinásobku korigované OD_{450nm} proti kultivačnímu času. Je-li použit tento způsob vynesení, leží body odpovídající exponenciálnímu růstu kultury na přímce, z jejíž směrnice lze vypočítat dobu zdvojení T.

3.8. Určování podílu spor

Určování podílu spor v kultuře *Bacillus subtilis* během stacionární fáze bylo prováděno třemi různými postupy, uvedenými níže.

3.8.1. Výsev buněk na agarovou plotnu

Kultura bakteriálních buněk byla napěstována výše uvedeným způsobem. Buňky byly kultivovány a od počátku stacionární fáze byly odebírány vzorky.

Odebíráno bylo vždy 0,5 ml vzorku po 2 hodinách (později po delších intervalech). Těsně před ředěním byl vzorek promíchán. Vzorky byly ředěny destilovanou vodou,

nejčastěji milionkrát. Později bylo ředění upraveno tak, aby na agarové misce narostlo mezi 30 až 300 koloniemi. Pro každý odběr byly použity čtyři agarové plotny s LB kultivačním mediem – dvě plotny byly určeny pro naředěnou odebranou kulturu a další dvě pro tepelně opracovanou naředěnou kulturu. Buňky byly tepelně opracovány takovým způsobem, aby přežily pouze odolné spory a nikoli vegetativní buňky. Toho bylo docíleno ohřátím vzorku na 10 minut na 80 °C (AHIMOU *et al.* 2001). V praxi byly buňky ohřívány 20 minut (10 minut bylo zapotřebí na prohřátí zkumavky) v temperovaném bločku s destilovanou vodou o teplotě 80 °C. Poté byly oba typy vzorků (objem 0,1 ml) vysety na agarovou plotnu s LB mediem a rozetřeny sterilní či jednorázovou hokejkou. První pokusy byly prováděny se skleněnou hokejkou, která byla sterilizována lihem. Další pokusy byly provedeny s jednorázovými hokejkami. Kultury byly umístěny do termostatu (37 °C) dnem vzhůru.

Počet narostlých kolonií na jednotlivých plotnách byl odečítán po cca 20 – 30 hodinách.

Vzhledem k velkým rozptylům u paralelně proběhlých pokusů, jsem došla k závěru, že je skleněná hokejka při sterilizaci v ethanolu nestandardně kontaminována sporami, proto byla pro další pokusy místo skleněné hokejky použita hokejka jednorázová. Výsledky však byly srovnatelné s předchozími. Kontaminace tedy byla zanesena jiným způsobem nebo je metoda zabíjení vegetativních buněk v našem provedení nespolehlivá.

3.8.2. Určování podílu spor pomocí komplexu TbDPA

Ionty Ca^{2+} mají schopnost vázat se na molekulu dipikolinové kyseliny (DPA). Ionty Tb^{3+} jsou fosforescenční analogy pro ionty Ca^{2+} (LAKOWICZ 1999). DPA je přítomna ve značném množství v bakteriálních endosporách. Po uvolnění této kyseliny z endospor a jejím následném navázáním na ionty Tb^{3+} je možné (díky fosforescenci takto vzniklých komplexů) kvantifikovat podíl spor v bakteriální kultuře (PELLEGRINO *et al.* 1998).

Příprava vzorků

Kultura *Bacillus subtilis* byla pěstována na LB mediu. Při OD_{450nm} 0,5 bylo 0,1 ml kultury zaočkováno na připravený sporulační agar. Kultura na plotně byla rovnoměrně rozprostřena pomocí sterilní hokejky a umístěna dnem vzhůru do termostatu, kde byla kultivována 4 dny při 37 °C.

Po 4 dnech byly na každou misku napipetovány 3 ml sterilní H_2O, biomasa byla resuspendována sterilní hokejkou a sterilně přenesena do sterilní plastové centrifugační zkumavky Falcon 50 m. Poté byla suspenze 4 × promyta 6 ml sterilní H_2O (centrifuga

Beckman, rotor SW 41, 10 000 rpm vždy 15 minut při 4 °C). Supernatant byl odpipetován a sediment resuspendován v cca 10 ml Tris HCl o pH 7,4. Dále byla napěstována kontrolní kultura exponenciálních buněk v LB mediu, která sloužila jako zdroj vegetativních buněk.

Pro ověření použitelnosti této metody byly připraveny čtyři typy vzorků (viz Tabulka 7). Dva vzorky obsahovaly pouze buňky ze sporulačního agaru, dva vzorky směs buněk ze sporulačního agaru a buňky kultury exponenciální fáze. Celkový objem vzorků byl přibližně 3 ml (bližší koncentraci buněk nelze určit). Jeden vzorek obsahující pouze spory a jeden vzorek obsahující směs spor a vegetativních buněk byly zahřívány 10 minut při 80 °C. To vede k usmrcení vegetativních buněk.

Tabulka 7 Příprava 4 typů vzorků. Dva vzorky obsahují pouze spory, dva vzorky tvoří směs spor a vegetativních buněk. Od každého typu vzorku byl jeden zahříván celkově 20 minut při 80 °C. Z celkové doby inkubace bylo 10 minut potřeba na prohřátí zkumavky.

vzorek	složení	inkubace
S_{80}	2,5 ml spor + 0,5 ml pufru	20 minut při 80 °C
S_{25}	2,5 ml spor + 0,5 ml pufru	–
SB_{80}	2,5 ml spor + 0,5 ml kultury exponenciální fáze	20 minut při 80 °C
SB_{25}	2,5 ml spor + 0,5 ml kultury exponenciální fáze	–

Ke všem vzorkům byl následně přidán DL-α-alanin v konečné koncentraci 10mM, který indukoval vyklíčení spor (WHITE *et al.* 1976). S přídavkem alaninu byly vzorky inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. U jednoho ze vzorků byla průběžně měřena OD_{625nm}, která při klíčení spor klesá kvůli změně optických vlastností buněk bez sporového obalu. Po 30 minutách byly vzorky zfiltrovány přes PVDF filtr (velikost pórů 0,22 µm, průměr 2 cm). Ke všem vzorkům byl přidán roztok $TbCl_3$ do výsledné koncentrace 5µM. Jako slepé vzorky byly použity zfiltrované kultury bez přídavku $TbCl_3$.

U vzorků byla na fluorometru FluoroMax 3 měřena intenzita fosforescence Tb^{3+}. Tb3+ bylo excitováno při vlnové délce 240 nm, emise byla měřena v emisním maximu v poloze 545 nm. Byl použit 405 nm „Long pass“ filtr, který odstraní rozptyly vyšších řádů.

3.8.3. Určení podílu spor ve fixovaném preparátu

Pro určení podílu spor ve fixovaném preparátu bylo použito barvení dle Grama. Gramovo barvení je diferenciální barvení, dle něhož lze rozlišit bakterie grampozitivní a gramnegativní. Zároveň je možno odlišit buňky, které začaly sporulovat.

Provedení

Kultura bakteriálních buněk byla napěstována ze sporových konzerv na komplexním kultivačním mediu LB. Během exponenciální fáze růstu byla přeočkována do nového kultivačního media. Buňky byly kultivovány a od počátku stacionární fáze byly odebírány vzorky. Odebíráno bylo vždy po 2 hodinách, poslední odběr byl proveden 10 hodin po začátku stacionární fáze. Z každého odběru byly zhotoveny dva preparáty. Na čisté podložní sklíčko byla umístěna kapka vody a do ní přeneseno cca 50 µl. Suspenze byla rozetřena po celé ploše sklíčka. Následně bylo sklíčko ponecháno na vzduchu až do zaschnutí a zafixováno v plameni. Po vychladnutí byly preparáty nabarveny.

Gramovo barvení se provádí pomocí tří roztoků – roztoku krystalové violeti, Lugolova roztoku a roztoku safraninu (příprava viz Tabulka 8). Nejprve bylo podložní sklíčko barveno roztokem krystalové violeti po dobu 90 sekund. Poté bylo sklíčko opláchnuto vodou. Na sklíčko byl nakapán Lugolův roztok, který působil 60 sekund. Sklíčko bylo poté opláchnuto vodou a opatrně osušeno filtračním papírem. Následně bylo sklíčko oplachováno 96% ethanolem až do odbarvení. Po osušení filtračním papírem byl preparát 80 sekund dobarvován safraninem. Nakonec byl preparát opláchnut vodou a osušen.

Obarvené bakterie byly pozorovány olejovou imerzí.

Tabulka 8 Příprava roztoků pro gramovo barvení – roztok krystalové violeti (V, připraven smícháním ethanolového roztoku krystalové violeti a roztoku oxalátu amonného), Lugolův roztok (L) a roztok safraninu (S, destilovaná voda byla přidána až po úplném rozpuštění safraninu v ethanolu).

složky		**množství**
V	krystalová violeť	2,0 g
	ethanol	20 ml
	oxalát amonný	0,8 g
	destilovaná H_2O	80 ml
L	jód	1,0 g
	jodid draselný	2,0 g
	destilovaná H_2O	300 ml
S	safranin	0,25 g
	ethanol	10 ml
	destilovaná H_2O	100 ml

3.9. Souprava „Live/Dead Kit“ pro určení podílu živých a mrtvých buněk

V bakteriální kultuře, která se nenachází v exponenciální fázi růstu, se vždy vyskytuje určité množství mrtvých buněk. V případě *Bacillus subtilis* se v kultuře navíc vyskytují i spory, této problematice je věnována samostatná kapitola (viz kapitola 3.8.). Pokud zkoumáme například aktivitu určitého enzymu v bakteriální buňce, je výpočet této aktivity závislý na biomase celé analyzované kultury. V kultuře buněk stacionární fáze se však může nacházet neznámá frakce buněk, která je již mrtvá a metabolicky se neprojevuje. Což nutně zanáší do výpočtů nemalou chybu. Proto je vhodné vědět, jaký je podíl živých a mrtvých buněk v bakteriální kultuře. K tomuto účelu slouží komerčně dostupný Kit LIVE/DEAD® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit.

Tato souprava obsahuje dvě fluorescenční sondy, které se liší ve vazbě na živé bakteriální buňky. Sonda SYTO® 9 je zelená fluorescenční sonda, která se váže na všechny buňky v kultuře (živé i mrtvé). Propidium jodid je červená fluorescenční sonda, která se váže jen na buňky s poškozenou membránou (buňky mrtvé), což snižuje fluorescenci SYTO 9. Smícháním těchto sond ve vhodném poměru jsme schopni rozlišit živé a mrtvé buňky v bakteriální kultuře.

3.9.1. Určení podílu živých buněk během exponenciální fáze růstu

Nejprve bylo nutno ověřit použití soupravy Live/Dead Kit na kultuře exponenciálních buněk. Následně byla souprava použita i pro buňky stacionární fáze (viz kapitola 3.9.2.).

Příprava vzorků

Kultura bakteriálních buněk byla napěstována ze sporových konzerv na komplexním kultivačním mediu LB. Během exponenciální fáze růstu byla přeočkována do nového kultivačního media. Při OD_{450nm} cca 0,4 bylo odebráno 25 ml bakteriální kultury, která byla centrifugována (centrifuga CL3R, 4600 rpm) po dobu 10 minut při 4 °C. Poté byl sediment resuspendován v 25 ml 0,85% roztoku NaCl. Suspenze byla centrifugována stejným způsobem jako v předchozím kroku. Sediment byl opět resuspendován, tentokrát ve 2 ml 0,85% roztoku NaCl. Ze vzniklé suspenze byl odebrán 1 ml, který byl přidán k 20 ml 0,85% roztoku NaCl (suspenze s živými buňkami; suspenze „Z“), 1 ml suspenze byl přidán k 20 ml 70% isopropanolu (isopropanol usmrtí buňky, suspenze „M“). Suspenze Z a M byly inkubo-

vány při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny, každých 15 minut byly promíchány. Poté byly obě tyto suspenze centrifugovány za výše uvedených podmínek a sedimenty byly resuspendovány v 20 ml 0,85% roztoku NaCl (čímž byl odstraněn isopropanol). Dále byla provedena další centrifugace a sedimenty Z a M byly resuspendovány v 10 ml 0,85% roztoku NaCl.

Provedení

Suspenze Z a M o objemu 10 ml byly použity k vytvoření 6 směsných vzorků (jeden z nich byl referenční), ve kterých byly živé a mrtvé buňky v různém poměru (příprava viz Tabulka 9). Dále byl připraven roztok, který se skládal z 30 µl Komponenty A a Komponenty B komerčního Kitu L7012. Vzniklý roztok byl přidáván k předem připraveným směsím živých a mrtvých buněk (9 µl roztoku na 3 ml směsi), s výjimkou vzorku kontrolního. Následně byly vzorky ponechány ve tmě a inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly měřeny na fluorometru FluoroMax3. Bylo snímáno emisní spektrum v rozsahu 490 – 700 nm, excitace 470 nm, šířka propouštěného pásma ±3 nm. Vlnová délka excitačního světla byla 470 nm. Integrační čas byl 0,5 sekundy. Výsledky byly sledovány počítačovým softwarem DataMax.

Tabulka 9 Příprava vzorků pro Live/Dead Kit. Buňky kultury ošetřené (suspenze M) a buňky neošetřené isopropanolem (suspenze Z) byly smíchány v daném poměru. Vzniklé vzorky, kromě vzorku kontrolního, byly obarveny (podrobnosti v textu).

poměr živých a mrtvých buněk	roztok Z, ml	roztok M, ml
0 : 100	0,0	3,0
10 : 90	0,3	2,7
50 : 50	1,5	1,5
90 : 10	2,7	0,3
100 : 0	3,0	0,0
kontrola	1,5	1,5

3.9.2. Určení podílu živých buněk během stacionární fáze růstu

V případě buněk stacionární fáze byla nejprve ověřena metoda – analogicky jako u pokusu, který byl proveden s buňkami exponenciální fáze. Po tomto ověření byl zjišťován poměr živých a mrtvých buněk během prvních deseti hodin po začátku stacionární fáze.

Příprava vzorků

Kultura bakteriálních buněk byla napěstována ze sporových konzerv na komplexním kultivačním mediu LB. Během exponenciální fáze růstu byla přeočkována do nového kultivačního media. Dvě hodiny po začátku stacionární fáze bylo odebráno 25 ml bakteriální kultury, se kterou bylo pracováno stejně jako se vzorky z exponenciální fáze. Takto byly připraveny kontrolní vzorky pro ověření platnosti metody během stacionární fáze.

V případě sledování stacionární fáze byly prováděny odběry na počátku stacionární fáze a poté v dvouhodinovém intervalu až do 10. hodiny stacionární fáze.

Provedení

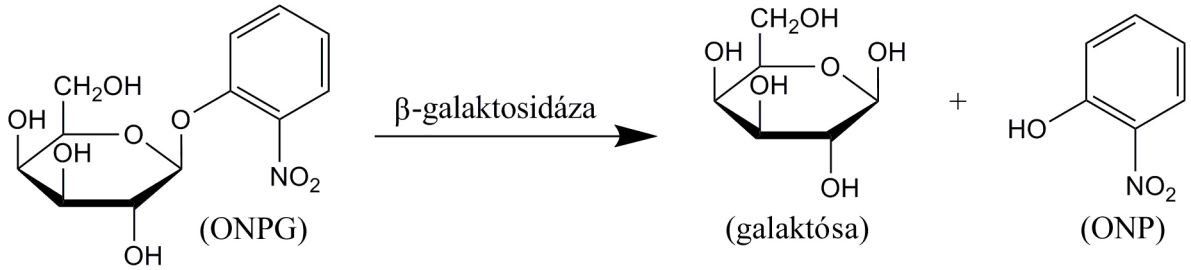
Kontrolní vzorky byly zpracovány stejně jako vzorky exponenciální fáze.

Vzorky buněk získaných v průběhu stacionární fáze byly připraveny, jak je výše uvedeno, avšak nebyl použit isopropanol. Vzorky z jednotlivých časových úseků byly obarveny Kitem L7012 (viz výše), 9 µl reagentu na 3 ml měřeného vzorku. Následně byly vzorky ponechány ve tmě a inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly měřeny na fluorometru. Bylo snímáno emisní spektrum v rozsahu 490 – 700 nm, excitace 470 nm, šířka propouštěného pásma 3 nm. Vlnová délka excitačního světla byla 470 nm. Excitační štěrbiny byly nastaveny na 3 nm. Integrační čas byl 0,5 sekundy. Výsledky byly sledovány počítačovým softwarem DataMax.

3.10. Stanovení aktivity β-galaktosidázy

Kmeny *Bacillus subtilis AKP3*, *AKP4* a *AKP21* mají do *amyE* lokusu vložen promotor genu pro desaturázu (*Pdes*) fúzovaný s genem *lacZ*, který kóduje β-galaktosidázu (AGUILAR *et al.* 1998). Stanovením aktivity β-galaktosidázy lze sledovat hladinu exprese genu *des*. *Bacillus subtilis* ale exprimuje i vlastní β-galaktosidázu. Odlišení exprese β-galaktosidázy fúzované s *Pdes* a vlastní β-galaktosidázy je možné pomocí kmene *JH642*, který nemá daný inzert v *amyE* lokusu, proto u něj měřená β-galaktosidáza vypovídá pouze o přirozené hladině enzymu v buňce.

Pro určení β-galaktosidázové aktivity se používá substrát o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG), který je bezbarvý. Pokud je ve sledovaném vzorku přítomen enzym β-galaktosidáza, dochází ke štěpení ONPG na galaktózu a o-nitrofenol (ONP) (viz Obrázek 17). Výsledný produkt reakce ONP je žlutý a jeho množství ve vzorku lze stanovit kolorimetricky na spektrofotometru.



Obrázek 17 Schema β-galaktosidázové reakce. Bezbarvý substrát ONPG je štěpen enzymem β-galaktosidázou na galaktózu a žlutě zbarvený ONP.

Příprava vzorků

Bakteriální kultura byla pěstována v LB mediu. Vzorky pro měření β-galaktosidázové aktivity byly odebírány z exponenciální nebo ze stacionární fáze růstu bakteriální kultury. Odběry byly prováděny ze střední části exponenciální fáze a od počátku stacionární fáze. V případě kultury vystavené chladovému šoku byly prováděny odběry od 5. hodiny po začátku stacionární fáze. Odebírán byl vzorek 1,0 ml po 30 minutách, v případě nižších kultivačních teplot po delší době. Vzorek byl centrifugován v mikrozkumavce Eppendorf (objem 1,5 ml) při 15 400 rpm (centrifuga Mikro 22R), za teploty 4 °C, po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn pomocí skleněné Pasteurovy pipety, sediment byl okamžitě zmražen v tekutém dusíku a vzorek uskladněn při –20 °C.

Provedení

Pro stanovení aktivity β-galaktosidázy byly vzorky resuspendovány v 1 ml Z-pufru (příprava viz Tabulka 10) a opakovaně resuspendovány pipetou (při pokojové teplotě). U všech vzorků byla změřena OD_{525nm}. Z každého vzorku bylo odebráno 100 – 250 µl roztoku do čisté polystyrenové zkumavky o objemu 5 ml. Každý vzorek byl stanoven v triplikátech. Vzorky byly naředěny Z-pufrem tak, aby výsledný objem ve zkumavce byl 730 µl. K těmto vzorkům bylo přidáno 10 µl roztoku lysozymu (10 mg/ml). Poté byly vzorky důkladně promíchány na vortexu a inkubovány ve vodní lázni při 37 °C po dobu 20 minut. Po vyjmutí z lázně bylo ke vzorkům přidáno 10 µl 10% roztoku Tritonu X-100 a 100 µl 15mM roztoku ONPG. Vzorky byly opět promíchány na vortexu a umístěny do vodní lázně vytemperované na 28 °C. Po 15 minutách ve vodní lázni byla reakce ukončena přidáním 150 µl 1,2M roztoku Na_2CO_3. U všech vzorků byla stanovena absorbance při 420 nm.

Aktivita β-galaktosidázy byla vypočítána dle vztahu (Vztah 2):

$$MU = \frac{1000OD_{420}}{OD_{525}Vt} \quad (2)$$

kde t je doba, po kterou probíhala reakce, V je objem vzorku a OD je optická denzita měřená při 420 nm a 525 nm. Výsledná hodnota aktivita enzymu β-galaktosidázy byla uváděna v Millerových jednotkách (MU).

Tabulka 10 Příprava Z-pufru. BME byl přidán až těsně před stanovením β-galaktosidázové aktivity.

složky	**množství**
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	2,14 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,10 g
1M KCl	2,0 ml
100mM $MgSO_4$	2,0 ml
50mM BME	0,54 ml
destilovaná H_2O	ad 200 ml

3.11. Závislost optické denzity na koncentraci biomasy

Pokud popisujeme metabolické vlastnosti bakteriální kultury, vztahujeme získané údaje na hodnotu biomasy bakterií. V praxi je obtížné měřit biomasu bakterií při každém prováděném měření. Proto řada výpočtů, týkajících se charakteristik mikrobiálních kultur, pracuje s hodnotou optické denzity bakteriální kultury. Optická denzita bakteriální suspenze je přímo úměrná koncentraci bakteriální biomasy, za předpokladu, že zjistíme kalibraci pro dané podmínky vážením vysušených buněk.

V předchozích pokusech jsme určovali aktivitu β-galaktosidázy pro buňky ve stacionární fázi (viz kapitola 3.10.). Při výpočtu Millerových jednotek se pracuje s hodnotou OD bakteriální kultury. Při vyhodnocování výsledků jsme zjistili, že aktivita β-galaktosidázy je nečekaně vysoká. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda vysoká aktivita enzymu není způsobena tím, že závislost OD na biomase pro buňky stacionární fáze je velmi odlišná od závislosti, která platí pro buňky exponenciální fáze (která byla dosud používána). Pro stanovení závislosti OD_{450nm} na koncentraci buněk stacionárních buněk kultury byla provedeno vážení suché mikrobiální kultury a byla zjišťována závislost na optické denzitě.

Provedení

Pro stanovení závislosti optické denzity na koncentraci biomasy ve stacionární fázi byl použit protokol ke stanovení suché hmotnosti bakteriální kultury (KAPRÁLEK 1999).

Kultura bakteriálních buněk byla napěstována ze sporových konzerv na komplexním kultivačním mediu LB. Během exponenciální fáze růstu byla přeočkována do nového kultivačního media. Buňky byly kultivovány a bylo odebráno 100 ml kultury z exponenciálně narostlé kultury a ze stacionární kultury (byly odebírány stacionární buňky ze dvou časových úseků; cca 2 hodin a cca 6 hodin po začátku stacionární). Buňky odebraných kultur byly centrifugovány (centrifuga CL3, 4600 rpm, 4 °C) a sedimenty byly resuspendovány v 10 ml destilované H_2O (suspenze typu „A“). Z takto vzniklých suspenzí bylo z každé odebráno 7 × 1 ml a přeneseno na předem zvážené alobalové mističky. Ty byly sušeny při 105 °C po dobu 24 hodin. Následně byly mističky zváženy a zjištěna průměrná suchá hmotnost biomasy obsažená v 1 ml 10 × koncentrované suspenze. Suspenze typu A byly naředěny 100 ×, čímž byly získány suspenze typu B a byly připraveny ředící řady (viz Tabulka 11) pro exponenciální i stacionární kultury buněk. U těchto ředících řad byla měřena optická denzita.

Tabulka 11 Ředící řada pro bakteriální bakteriální suspenzi. Suspenze B je 100 × naředěná suspenze typu A.

složka	**vzorek**										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
suspenze B, ml	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
destilovaná H_2O, ml	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0

3.12. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (anglicky „flow cytometry“) je spektroskopická metoda, která umožňuje měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Díky tomu lze v poměrně krátkém čase analyzovat velké množství částic, které lze vyhodnocovat statisticky.

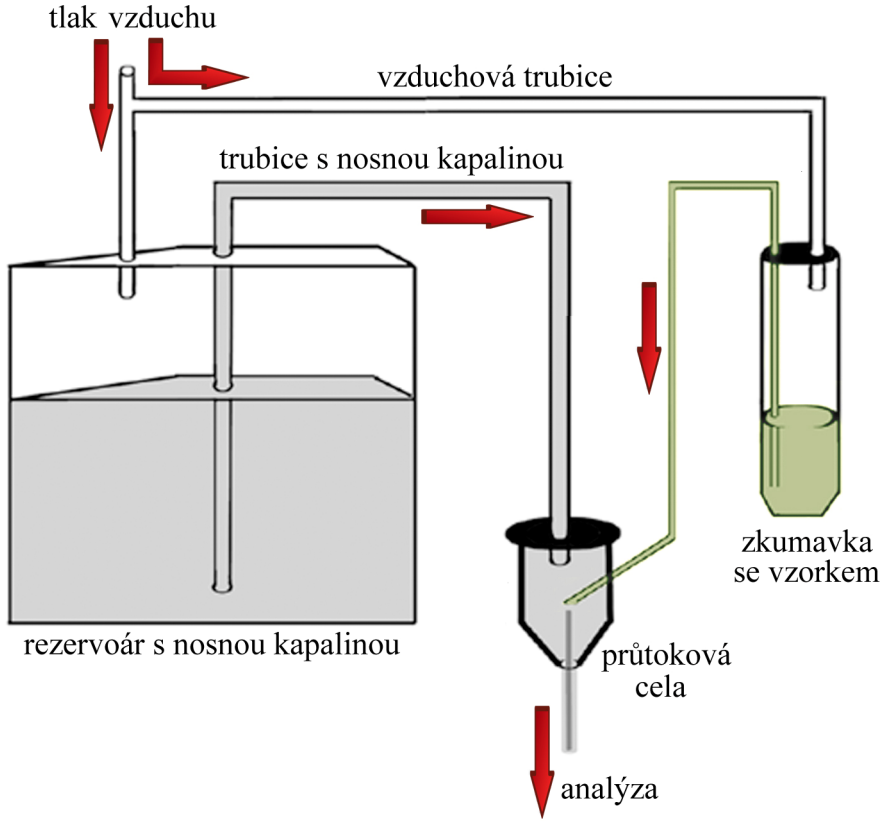
Mezi výhody této metody patří možnost analyzovat buňky v rámci velké populace jednotlivě (s rychlostí 500 – 5000 buněk za sekundu). V principu u každé buňky tak může být určena její velikost a tvar. Naměřená data se však vyhodnocují statisticky – populaci buněk pak můžeme rozdělit na subpopulace, tedy frakce buněk vykazující podobný tvar

i velikost. Nevýhodou této techniky je nutnost pracovat s neagregovanými buňkami – shluky buněk nelze metodou průtokové cytometrie měřit.

Technika průtokové cytometrie se nejčastěji používá k analýze krve, bakteriálních buněk (LLOYD 1993, ALBERGHINA *et al.* 2000) spermií (FUGGER *et al.* 1998, GLEDHILL *et al.* 1990) a planktonu. Kromě sledování buněk je možné aplikovat tuto metodu i na viry (MARIE *et al.* 1990), jádra buněk (HEDLEY 1989), chromozomy (GRAY & CRAM 1990) a fragmenty DNA (HABBERSETT *et al.* 2000).

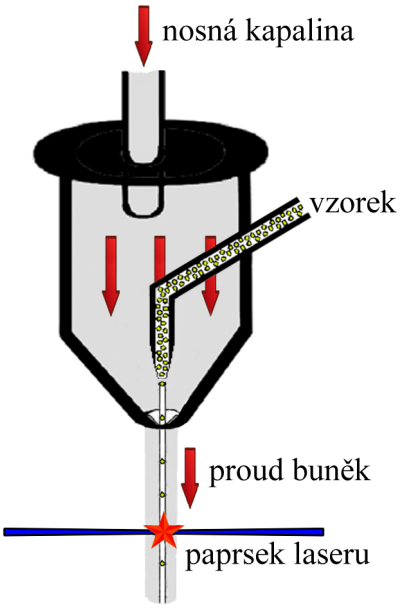
Velikost částic pro měření musí být v rozmezí 1 – 30 μm v průměru. Speciální cytometry mohou mít i větší citlivost. Osvícení jednotlivých buněk je prováděno laserovým paprskem. Jeho výhodou je intenzivní záření a úzký paprsek světla.

Přístroj, který se pro tuto metodu používá, se nazývá průtokový cytometr (viz Obrázek 18). Lze u něj rozlišit část fluidní, optickou a elektronickou. Pomocí fluidního systému jsou buňky obaleny nosnou kapalinou (nejčastěji PBS či jinými komerčně dostupnými pufry).



Obrázek 18 Schematický obrázek fluidní části průtokového cytometru. Z rezervoáru nosné kapaliny je nasávána tekutina, která se mísí se vzorkem. Proud nosné tekutiny unáší buňky jednotlivě do místa analýzy (převzato a upraveno dle HAWLEY a HAWLEY 2004).

Buňky jsou unášeny nosnou kapalinou a strhávány po jedné do místa, kde prochází laserový paprsek (viz Obrázek 19). Laserový paprsek je součástí části optické.

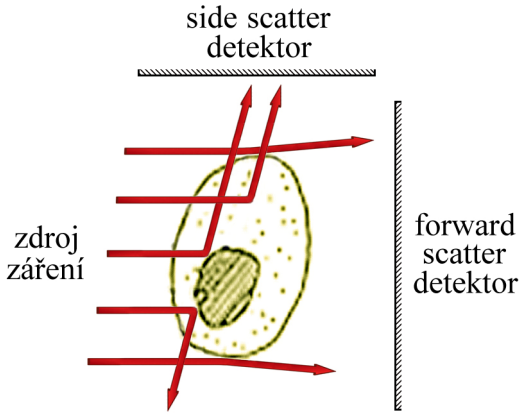


Obrázek 19 Buňky v průtokovém cytometru jsou unášeny po jedné do místa, kde se setkávají s paprskem laseru (převzato a upraveno dle HAWLEY a HAWLEY 2004).

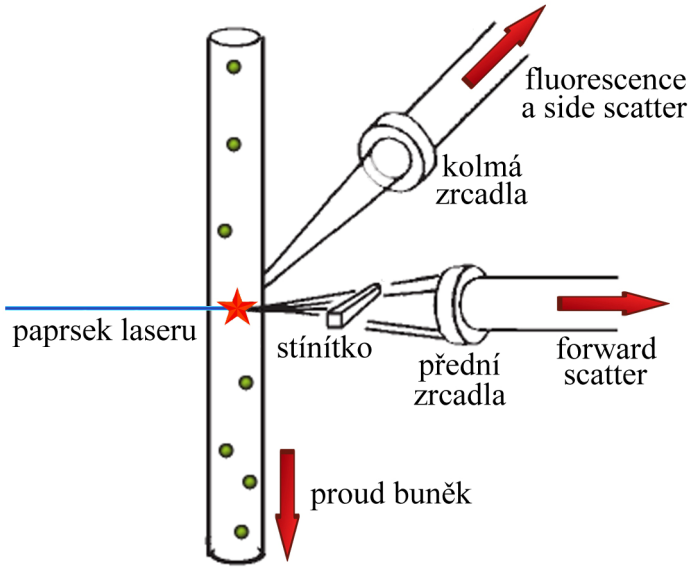
Ve chvíli, kdy se buňka dostane do optické dráhy paprsku, dochází k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu lomu bývá označován jako přímý rozptyl (anglicky „forward scatter“, FSC) a boční rozptyl („side scatter“, SSC). Vyhodnocení signálu umožňují obvykle dvě čočky, umístěné ve dvou různých směrech. Jedna vyhodnocuje signál FCS, který je úměrný velikosti buňky; druhá signál SSC vypovídající o komplexitě částice (viz Obrázek 20). Kromě těchto parametrů je možno detekovat i fluorescenční záření (viz Obrázek 21). Měření SSC a fluorescence je v principu stejné, liší se tím, že pro měření fluorescence jsou použity speciální hranoly a filtry.

Průtokové cytometry používají jako světelného zdroje totiž nejčastěji argonový laser o excitační vlnové délce 488 nm. Nejčastěji používané lasery jsou shrnuty v Tabulce 11.

Poslední část přístroje je elektronická. Signál získaný od buněk je převeden na napětí, to je amplifikováno a jsou vypočítány intenzity FSC, SSC a fluorescence pro danou buňku. Výstupem je digitální signál. Ten je zpracován počítačovým softwarem. Výsledky jsou zobrazeny v grafu (nejčastěji v bodovém či v histogramu). Jednotlivé populace buněk jsou vyneseny do grafu dle sledovaných parametrů – např. velikost či intenzita fluorescence (viz Graf 1).



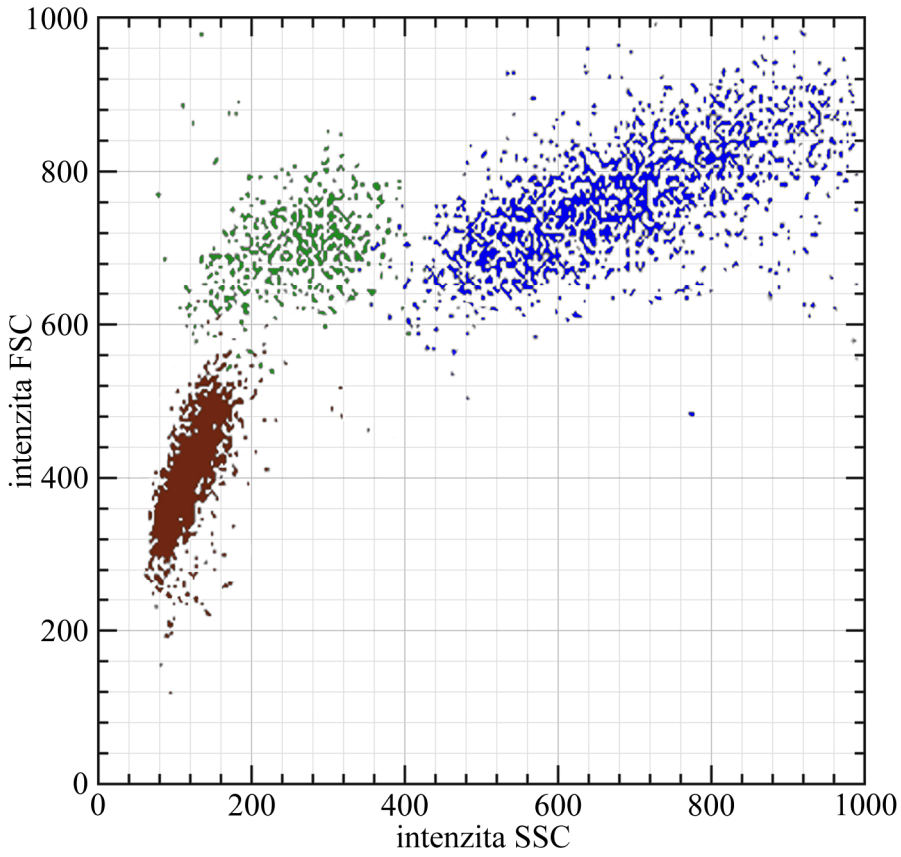
Obrázek 20 Znázornění forward scatter a side scatter. FSC je světelný signál detekovaný ve směru laserového paprsku, SSC je světelný signál odražený mimo osu paprsku (převzato a upraveno dle HAWLEY a HAWLEY 2004).



Obrázek 21 Paprsek laseru se odráží od částice. Dochází k rozptylu světla, který je zaznamenáván ve dvou směrech. Směrem dopředu ve směru paprsku laseru je měřen FSC, odraz světla bočným směrem označujeme jako SSC. Stejným způsobem jako SSC je měřena i fluorescence (převzato a upraveno dle HAWLEY a HAWLEY 2004).

Tabulka 12 Nejčastěji používané lasery pro průtokovou cytometrii (anglický název) (převzato a upraveno dle HAWLEY a HAWLEY 2004).

typ laseru	vlnová délka emise, nm
argon ion	351, 364, 488, 514
red helium-neon	633
green helium-neon	543
krypton ion	568, 647
violet diode	408
blue solid state	488

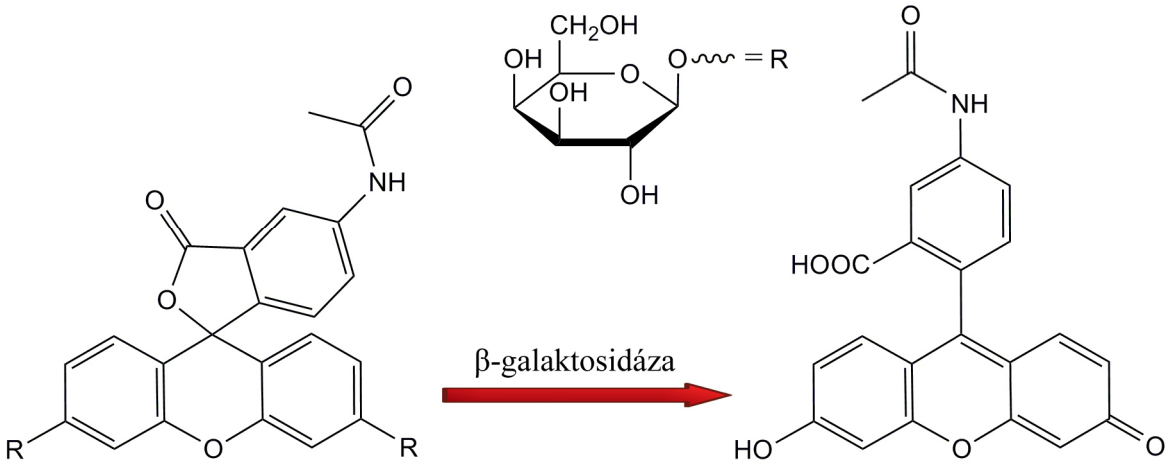


Graf 1 Příklad bodového grafu, kterým bývají obvykle zobrazeny výsledky získané měřením na průtokovém cytometru. Na základě měření intenzity fluorescence rovnoběžné s excitačním zářením (FCS) a kolmé k excitačnímu záření (SSC) lze v kultuře pozorovat subpopulace buněk, rozlišitelných podle velikosti a tvaru. ■ = lymfocyty, ■ = monocyty, ■ = neutrofily (převzato a upraveno dle HAWLEY a HAWLEY 2004).

Fluorescenční sondy

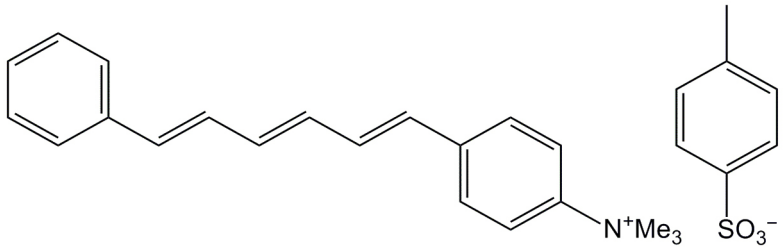
Fluorescenční barviva jsou látky, které lze navázat na analyzované buňky nebo částice a absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují (emitují) část takto absorbovaného světla avšak již o odlišné (delší) vlnové délce. V rámci průtokové cytometrie se používají barviva s různými emisními spektry.

Sonda C_2FDG je komerčně dostupná sonda, která proniká do buňky, kde je štěpena enzymem β-galaktosidázou za vzniku fluorescenčního produktu (viz Obrázek 22). Díky tomu je možné ji použít k určení hladiny tohoto enzymu v buňce. Zároveň by po štěpení β-galaktosidázou neměla unikat z buňky.



Obrázek 22 Schematické znázornění glykolytického štěpení sondy C_2FDG (vlevo) v buňce enzymem β-galaktosidázou za vzniku fluorescenčního derivátu.

Jako další fluorescenční sonda byla použita sonda TMA-DPH (viz Obrázek 23), která má schopnost vázat se do hydrofobní části membrány (fluorescence nenavázané sondy je zanedbatelná). U *Bacillus subtilis* je intenzita fluorescence této sondy přímo úměrná povrchu membrány, na kterou se váže. Z intenzity fluorescence TMA-DPH lze tedy získat představu o objemu buňky a její velikosti za předpokladu, že se průměr buňky nemění.



Obrázek 23 Struktura sondy TMA-DPH, která se váže do membrány.

Příprava vzorků

Bakteriální kultury pro měření na průtokovém cytometru byly kultivovány při 37 °C a 25 °C. Z technických důvoů (vzhledem k době barvení) byly pro exponenciální pokusy použity buňky z 25 °C (jelikož u nich biomasa přirůstá pomaleji, což poskytuje čas na obarvení fluorescenční sondou C_2FDG), jakkoli by bylo vhodnější použít buňky z 37 °C (z této teploty byly prováděny chladové šoky). Vzorky buněčných kultur byly obarveny pomocí fluorescenčních sond TMA-DPH (M_R = 461,62) a C_2FDG (M_R = 723,65). Sondu C_2FDG je třeba používat v koncentraci 33μM (ROWLAND *et al*. 1999). Pro lepší manipulaci se sondou byla naředěna DMSO a v něm byla také uchovávána (1 mg sondy do 100 ml DMSO). Sonda TMA-DPH byla používána v koncentraci 1 μM.

Oběma sondami byly buňky značeny ve tmě a při kultivaci v dané teplotě a při 170 rpm. Barvení sondou C_2FDG probíhalo 1 hodinu, pokud byla kultura kultivována při 37 °C a 2 hodiny, pokud kultivace probíhala v 25 °C. Barvení sondou TMA-DPH probíhalo 10 minut. Exponenciální kultury byly na průtokovém cytometru měřeny v okamžiku, kdy dosáhly při OD_{450nm} hodnoty 0,2 – 0,5 (v závislosti na délce barvení). Stacionární kultury byly měřeny 2 – 5 h (v závislosti na délce barvení) po začátku stacionární fáze. Vzorky byly ředěny dle aktuální potřeby, nejčastěji 20 ×.

Měření

Pro měření připravených vzorků byl použit průtokový cytometr (BD LSR II Flow Cytometer). Sonda C_2FDG byla excitována laserem o vlnové délce 488 nm při použití emisního filtru pro FITC. Sonda TMA-DPH byla excitována při 405 nm a byl použit filtr Pacific blue. Hodnota snímané intenzity byla upravena na prahovou hodnotu FSC a zároveň SSC, čímž byl zmírněn rušivý vliv přirozené fluorescence pozadí. V případě každého vzorku bylo měřeno nejméně 20 000 buněk. Nejčastěji bylo měřeno 100 000 buněk. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí software BD FACSDiva a následně pomocí software GNUPlot a Excel.

3.13. Izolace membrán

Pro izolaci membránové frakce bakteriálních buněk byla použita enzymatická metoda (BISSCHOP a KONINGS 1976). Pomocí této izolační metody dochází ke vzniku membránových váčků s proteiny orientovanými stejným směrem jako v buňce.

Provedení

Kultura bakteriálních buněk byla napěstována ze sporových konzerv na komplexním kultivačním mediu LB. Během exponenciální fáze růstu byla přeočkována do nového kultivačního media. Buňky byly kultivovány při 37 °C až do 5. hodiny po začátku stacionární fáze. Poté bylo cca 300 ml kultury zfiltrováno za použití vodní vývěvy (filtry Pragopor, velikost pórů 0,4 mm, Pragochema). Filtrát buněk byl 3 × propláchnut 50mM fosfátovým pufrem o pH 8,0 (příprava viz Tabulka 13) o stejné teplotě, v jaké probíhala kultivace (buňky nesmí na filtru vyschnout). Pomocí sklíčka a tyčinky byla biomasa z filtru přenesena do kádinky a resuspendována v tomtéž pufru a doplněna do objemu 10 ml. Bylo přidáno 120 µl 100 mM roztoku PMSF (inhibitor proteáz) v isopropanolu, 20 µl roztoku DNázy (připraveného rozpuštěním 1 mg DNázy I v 1 ml roztoku 50% glycerolu v 20 mM Tris o pH 7,5 a 1 mM $MgCl_2$) a 200 µl roztoku RNázy (připraveného rozpuštěním 1 mg RNázy v 1 ml roztoku 15mM NaCl v 10 mM Tris o pH 7,5 a povařením výsledné směsi při teplotě 100 °C po dobu 15 minut) a 6 mg lysozymu. Vzorek byl promíchán. Poté byl přidán 500mM roztok $MgSO_4$ na konečnou koncentraci 10 mM.

Dalším krokem byla inkubace při teplotě shodné s teplotou kultivace (37 °C) po dobu cca 30 minut. Následně byl přidán roztok 150 mM KH_3EDTA na konečnou koncentraci 15 mM. Inkubace probíhala 1 minutu při 37 °C. Poté byl přidán roztok 500mM $MgSO_4$ na konečnou koncentraci 10 mM. Suspenze byla rozdělena do plastových zkumavek a centrifugována (centrifuga Mikro 22R, 4 °C, 16 000 rpm) po dobu 60 minut. Získaný sediment byl promyt 50mM Tris pufrem (pH 7,0) a centrifugován (centrifuga Mikro 22R, 4 °C, 16 000 rpm) po dobu 10 minut. Získaný sediment byl resuspendován cca 1 ml stejného pufru a rozplněn do plastických mikrozkumavek Eppendorf po 50 – 100 µl.

Vzorky byly uchovávány při –78 °C v hlubokomrazícím boxu (Heraeus).

U vzorků byla stanovena koncentrace proteinů (viz kapitola 3.13.1.). Vzorky byly použity pro další experimenty.

Tabulka 13 Příprava 50mM fosfátového pufru o pH 8,0.

složky	množství
0,2M K_2HPO_4	94,7 ml
0,2M KH_2PO_4	5,3 ml
destilovaná H_2O	ad 400 ml

3.13.1. Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bylo provedeno pomocí sady BCA Protein Assay Reagent (příprava viz Tabulka 14) (SMITH *et al.* 1985). Základem metody je schopnost proteinů reagovat s měďnatými ionty za vzniku měďných iontů, které následně reagují s BCA za vzniku barevného komplexu, který je rozpustný ve vodě a absorbuje světelné záření při vlnové délce 562 nm. Koncentraci proteinů ve vodném rozpouštědle lze díky tomu určit spektrofotometricky, koncentrace proteinů se odečítá ze standardní kalibrační křivky (viz dále). Tuto metodu lze použít pro stanovení koncentrace proteinů v rozmezí cca 20 – 2000 µg/ml.

Tabulka 14 Příprava sady BCA Protein Assay Reagent. Roztok P (Pierce) byl před použitím smíchán s roztokem M v poměru 50:1. Roztoky P a M jsou při laboratorní teplotě dlouhodobě stálé.

složky		**množství**
P	BCA	1,00 g
	vínan sodný	0,16 g
	$Na_2CO_3 \cdot H_2O$	2,00 g
	$NaHCO_3$	0,95 g
	NaOH	0,40 g
	destilovaná H_2O	100 ml
M	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	4 g
	destilovaná H_2O	100 ml

Provedení

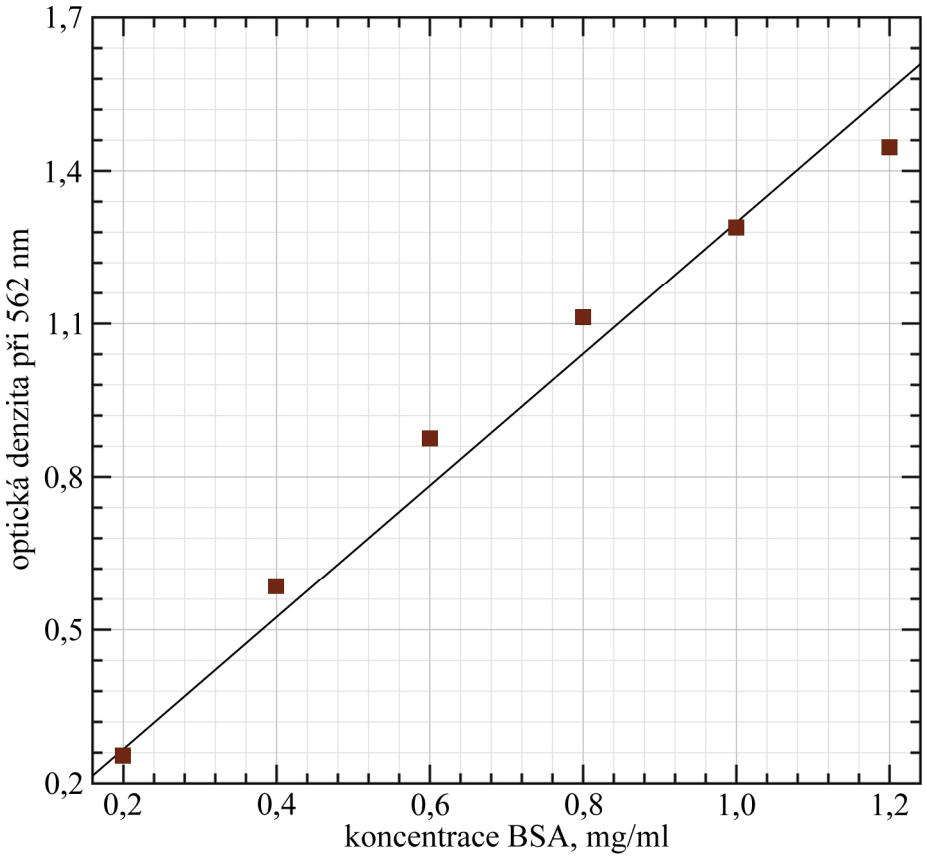
Ke stanovovanému vzorku byl přidán 20násobek objemu čerstvě připraveného BCA Protein Assay Reagent. Takto vzniklý roztok byl inkubován 30 min při 37 °C. Poté byl vzorek zchlazen na laboratorní teplotu a byla změřena absorbance při 562 nm (spektrofotometr Beckman). Jako referenční vzorek (blank) byl použit vzorek bez proteinů (pouze s destilovanou vodou), který byl ošetřen stejně jako ostatní vzorky.

Kalibrační přímka byla sestrojena s použitím standardního roztoku 2% BSA v 0,9% NaCl a 0,05% NaN_3 (BSA standard) dle předpisu (viz Tabulka 15)

Hodnoty absorbance pro příslušné koncentrace standardního vzorku BSA byly vyneseny do grafu (viz Graf 2). Z grafu byla určena směrnice kalibrační přímky, která byla následně použita pro výpočet koncentrace proteinů v analyzovaných vzorcích.

Tabulka 15 Kalibrační vzorky pro stanovení proteinů.

kalibrační vzorek	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
BSA standard, ml	5	10	15	20	25	30
destilovaná H_2O, ml	55	40	35	30	25	20
výsledná koncentrace proteinu, mg/ml	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2



Graf 2 Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů. Závislost absorbance (OD_{562nm}) na koncentraci proteinů s rovnicí přímky y = 1,2997x (závislost je ve sledovaném intervalu lineární).

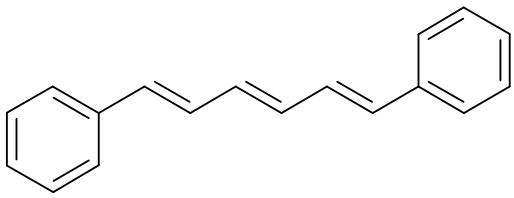
Stanovovaný vzorek byl naředěn destilovanou vodou tak, aby výsledná koncentrace proteinů ležela v intervalu, který udává kalibrační přímka (v tomto případě 25 ×), a byl analyzován stejným způsobem jako standardní vzorek. Pro každý vzorek bylo provedeno pět paralelních stanovení. Z hodnot naměřené absorbance při 562 nm byla pomocí směrnice kalibrační přímky vypočtena koncentrace proteinů ve stanovovaném vzorku.

3.13.2. Měření anizotropie fluorescence DPH

Měření anizotropie fluorescence je biofyzikální metoda, která je součástí metod fluorescenční spektroskopie. Tato technika vhodná pro zkoumání biofyzikálních vlastností biologických membrán a k zjišťování jejich změn. Přehlednou publikací o metodách fluorescenční spektroskopie je publikace Lakowicze (LAKOWICZ 1999).

Anizotropie fluorescence je veličina závislá na rotační difúzi molekul. Z tohoto důvodu jde o metodu vhodnou pro měření např. míry denaturace proteinů, stanovení rotačních rychlostí proteinů a s použitím na membránu vázané fluorescenční sondy i pro měření fyzikálních vlastností biologických membrán.

Při studiu biomembrán prostřednictvím metod fluorescenční spektroskopie se používají fluorescenční sondy, které různým způsobem interagují s membránami, a které prostřednictvím měřitelných fyzikálních vlastností vypovídají o dynamice membránových komponent. Nejčastěji využívanou sondou při studiu dynamiky membrán je DPH (viz Obrázek 24).



Obrázek 24 Struktura (1E,3E,5E)-1,6-diphenylhexa-1,3,5-trienu (DPH), schopného vázat se do hydrofobní části membrán.

Sonda DPH je hydrofobní molekula, která se zabudovává mezi řetězce mastných kyselin, převážně kolmo k rovině membrány. Absorpční maximum DPH zabudovaného do membrán je 355 nm, emisní maximum je 425 nm. DPH má výhodné fluorescenční vlastnosti – v polárních rozpouštědlech tvoří mikroagregáty, které nefluoreskující. Zároveň se ale po zabudování do nepolární části membrány zvýší intenzita fluorescence až tisíckrát. Charakter doby života (dohasínání fluorescence) DPH je ovlivněn okolím sondy, v biologických membránách je většinou multiexponenciální (HERMAN *et al*. 1994).

Měření anizotropie fluorescence je založeno na polarizaci emisního záření sondy způsobené excitací polarizovaným světlem. K depolarizaci může dojít například vlivem rotační difúze fluoroforu, tedy pootočením sondy v okamžiku mezi absorpcí a emisí fotonu.

Sonda je excitována polarizovaným světlem, jehož vektor intenzity elektrického pole (E) má konstantní směr. Přednostně jsou excitovány ty molekuly fluoroforu, jejichž excitační dipól je paralelní s vektorem E (fotoselekce). Excitované molekuly následně emitují

fluorescenční záření, které je rovněž polarizované. Veličiny polarizace (P), anizotropie fluorescence (r) a celková intenzita fluorescence (I_0) jsou definovány následujícími vztahy (3):

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \qquad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \qquad I_0 = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \tag{3}$$

kde $I_{\parallel}$ představuje intenzitu vertikálně polarizované a $I_{\perp}$ horizontálně polarizované emise, při excitaci fluorescenční sondy vertikálně polarizovaným světlem. Polarizace i anizotropie fluorescence jsou veličiny popisující stejný jev, tedy jak dalece je emise depolarizována vzhledem k excitaci. Častěji se v praxi používá anizotropie, která je vhodnější pro popis složitějších situací (například přítomnost více populací fluorescenčních sond ve vzorku).

Pro přírodní nebo nepolarizované světlo platí $I_{\parallel} = I_{\perp}$, tedy r = 0. Pro zcela polarizované světlo platí $I_{\perp} = 0$, tedy r = 1.

Pokud během doby života excitovaného stavu molekuly sondy rotují a mění se tak orientace jejich emisního dipólu, vede to ke snižování hodnoty anizotropie fluorescence. Rychlost a rozsah pohybu sondy závisí na vlastnostech okolního prostředí – v tekutějším prostředí sonda rotuje rychleji, ve viskóznějším pomaleji. Rychlost rotace malých molekul ve velmi málo viskózních roztocích je velmi vysoká, emisní dipóly se během doby života excitovaného stavu uspořádají zcela náhodně a emitované záření je zcela depolarizováno – za takových podmínek je hodnota anizotropie blízká nule. Změny hodnoty anizotropie tedy mohou odrážet změny fluidity membrán. Pokud měříme anizotropii za stálého osvětlení, hovoříme o ustálené anizotropii fluorescence. Takové měření je poměrně jednoduché, hodnoty anizotropie postihují souhrnně všechny změny pohyblivosti a uspořádanosti membránových komponent. Fluidní membrána představuje málo viskózní prostředí a anizotropie v něm je nízká.

Příprava vzorků

Vzorky izolovaných membrán byly naředěny do 3 ml 50 mM Tris pufru, pH 7,0 na finální koncentraci 10 µg proteinů na 1 ml pufru (pokojové teploty). Pomocí mikropipety Hamilton byl přidán 1mM roztok DPH v acetonu na finální koncentraci 10^{-6}M. Vzorky byly inkubovány ve tmě při 37 °C po dobu 30 minut.

Měření ustálené anizotropie fluorescence DPH

Měření anizotropie fluorescence DPH probíhala na fluorometru FluoroMax3 v křemenných kyvetách o rozměrech 1 × 1 cm, objem vzorku v kyvetě byl 2 ml. Vzorky byly před vlastním měřením temperovány na požadovanou teplotu. Kyvetový prostor byl tempe-

rován pomocí průtokového termostatu (MB, Julabo). Teplota byla měřena digitálním teploměrem (Testo 735-2). Vlnová délka excitačního světla byla 360 nm a vlnová délka emitovaného záření 425 nm. Excitační i emisní štěrbiny byly nastaveny na 4 a 2 nm. Integrační čas byl 3 sekundy pro $I_{\parallel}$ a $I_{\perp}$. Snímání intenzit probíhalo v pravidelném intervalu 20 sekund. Fluorometr FluoroMax3 a digitální teploměr Testo 735-2 byly ovládány počítačovým softwarem DataMax a Testo Comfort-Software X35. Výstupem z programu DataMax je závislost anizotropie na čase, program Testo Comfort-Software X35 poskytuje záznam o teplotě. Synchronizace těchto dvou parametrů byla provedena v programu Excel.

3.14. Izolace fosfolipidů

Extrakce fosfolipidů byla provedena pomocí extrakční směsi chloroform – methanol – fosfátový pufr (příprava viz Tabulka 16). Byly získány dvě fáze – spodní chloroformová, která obsahovala fosfolipidy, a horní vodná fáze, do které byly extrahovány ve vodě rozpustné složky bakteriální buňky (DNA, proteiny apod.).

Tabulka 16 Příprava 60mM fosfátového pufru o pH 7,4.

složky	**množství**
0,2M K_2HPO_4	81 ml
0,2M KH_2PO_4	19 ml
destilovaná H_2O	233 ml

Provedení

Bakterie byly kultivovány při 37 °C a 170 rpm do 5. hodiny po začátku stacionární fáze. Kultura o objemu 400 ml byla zfiltrována pomocí vodní vývěvy (filtry Pragopor, průměr 0,4 μm, Pragochema). Filtrát byl 3 × promyt 10 ml 60mM fosfátovým pufrem pH 7,4 o stejné teplotě, v jaké probíhala kultivace (buňky na filtru nesmí vyschnout). Pomocí sklíčka a tyčinky byla biomasa z filtru přenesena do kádinky a resuspendována v 1 ml téhož pufru. Bakteriální suspenze byla napipetována do teflonové centrifugační zkumavky a byla přidána směs čerstvě destilovaného methanolu (5 ml) a chloroformu (2,5 ml). Suspenze byla míchána na vortexu cca 1 minutu. Směs byla extrahována na třepačce Grant Bio (20 rpm) po dobu 2 hodin.

Poté byla směs centrifugována (centrifuga IEC, 4 600 rpm, 4 °C) po dobu 10 minut. Supernatant byl přenesen do čisté teflonové centrifugační zkumavky. Bylo přidáno 3,75 ml

čerstvě destilovaného chloroformu a 3,75 ml destilované vody. Směs byla míchána na vortexu cca 1 minutu. Směs byla ponechána při 4 °C po dobu 12 hodin.

Směs byla směs centrifugována (centrifuga IEC, 4 600 rpm, 4 °C) po dobu 10 minut. Pasteurovou pipetou byla odebrána horní fáze. Spodní chloroformová byla odpařena dusíkem na menší objem a přenesena do zvážené skleněné zkumavky s teflonovým víčkem a odpařena úplně pod proudem dusíku. Tím získáme fosfolipidy membrány. Vzorek byl zvážen a uchováván v exsikátoru při –20 °C.

3.14.1. Analýza mastných kyselin

Připravený vzorek fosfolipidů (viz kapitola 3.14) byl zpracován dle manuálu Identification Bacteria Gas Liquid Chromatography (Midi, 2001, www.midi-inc.com) v laboratoři Ústavu půdní biologie Akademie věd České republiky.

Analyzovaná látka musí být dostatečně těkavá a tepelně stabilní. Proto jsou vzorky fosfolipidů saponifikovány na směs mastných kyselin a následně převedeny na methylestery mastných kyselin.

Zastoupení mastných kyselin bylo porovnáváno pomocí software Scherlock® 6.1 Microbial Identification System s knihovnou pro aerobní bakterie Aerobic Bacteria Library (Midi, www.midi-inc.com).

Provedení

Vzorek lipidů byl nejprve saponifikován přidáním 1 ml směsi připravené z 45 g NaOH, 150 ml methanolu a 150 ml destilované vody. Vzorek byl krátce zamíchán a zahříván ve vodní lázni (100 °C) přibližně 10 minut. Poté byly vzorky znovu promíchány a zahřívány dalších 30 minut. Vzorky byly nechány chladnout. Poté byla provedena methylace pomocí 2 ml směsi připravené z 325 ml HCl (6N HCl) a 275 ml methanolu. Vzorky byly zahřívány 10 minut při 80 °C. Vznikají methylestery, které jsou nerozpustné ve vodné fázi. Vzorky byly nechány chladnout. Dalším krokem byla extrakce methylesterů do organické fáze, která byla provedena za použití 1,25 ml směsi připravené z 200 ml hexanu a 200 ml methyl tert-butyl etheru. Po desetiminutové inkubaci je vodní fáze odsáta. Takto upravené vzorky jsou připraveny pro analýzu.

Připravená směs methylesterů byla umístěna do přístroje Agilent 6850 a analyzována. Před analýzou samotného vzorku byl vždy měřen standard Microbial ID, Inc. tvořený směsí nevětvených mastných kyselin s 9 – 20 uhlíky a 5 hydroxykyselin, který je nutný pro

srovnání maxim vyhodnocených plynovým chromatografem s názvy mastných kyselin pomocí software Sherlock® 6.1 MIS.

Sherlock Microbial Identification je vysoce automatizovaný systém, který po získání chromatogramu neznámého vzorku automaticky porovnává zjištěná maxima s maximy vybrané knihovny. Systém identifikuje maxima na chromatogramu a pojmenovává mastné kyseliny, které jim odpovídají. Pro srovnání byla použita knihovna pro aerobní bakterie (Aerobic Bacteria Library).

4. Výsledky

Tato diplomová práce se zabývala studiem chladové adaptace ve stacionární fázi u bakterie *Bacillus subtilis*. Zatímco exponenciální fáze růstu je z hlediska působení chladového stresu relativně dobře prozkoumána, o stacionární fázi je dostupných informací výrazně méně. Předmětem studia této práce bylo sledování fluidity bakteriální membrány po chladovém šoku ve stacionární fázi.

Výsledky byly zpracovány v programu Excel, graficky byly upraveny v programu Adobe Photoshop. V experimentech, kde byla prováděna paralelní měření, jsou zobrazeny směrodatné odchylky. Pokud byla směrodatná odchylka překryta znakem pro zobrazovanou hodnotu, nebyla odchylka pro přehlednost zobrazena.

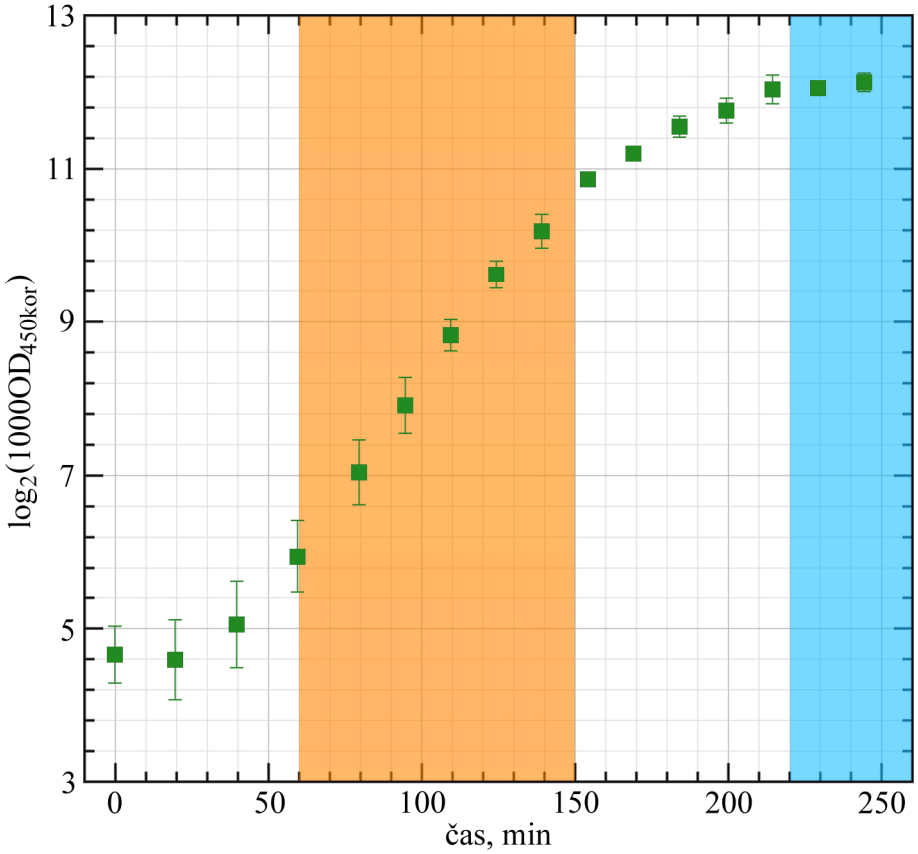
4.1. Růstová charakteristika *Bacillus subtilis* kmene *AKP3*

Růstová charakteristika dává informaci o době zdvojení buněk v bakteriální populaci, o časovém průběhu exponenciální fáze a nástupu fáze stacionární. Na základě těchto informací umožňuje srovnání jednotlivých bakteriálních kmenů mezi sebou.

Experimenty pro tuto práci byly prováděny na mikroorganismu *Bacillus subtilis*. Bylo použito více kmenů. Všechny použité kmeny byly odvozeny od kmene *Bacillus subtilis JH 642*. Jedná se o kmeny: *AKP 3* (*JH 642 amyE*::*Pdes-lacZ*), *AKP 4* (*JH 642 des*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ*) a *AKP 21* (*JH 642 desKR*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ*). Pro většinu pokusů byl použit kmen *AKP 3*.

Nejprve byl zmapován růst během exponenciální fáze. *Bacillus subtilis AKP3* byl kultivován v komplexním kultivačním mediu LB při 37 °C, v pravidelných intervalech byla zjišťována OD odebraných vzorků. Výsledky byly zpracovány graficky – do grafu byly vyná-šeny hodnoty logaritmu (o základu 2) tisícinásobku korigované OD_{450nm} proti kultivačnímu času. Je-li použit tento způsob vynesení, leží body odpovídající exponenciálnímu růstu kultury na přímce (viz Graf 3), z jejíž směrnice lze vypočítat dobu zdvojení (T). Doba zdvojení u kmene *AKP 3* byla přibližně 20 minut. V okamžiku, kdy se křivka začne odklánět od směru přímky, kultura přechází do stacionární fáze. Exponenciální fáze růstu je snadno definovatelná na základě fyziologických vlastností bakteriální kultury. V zobrazeném grafu (viz Graf 3) se jedná o oblast, kdy lze touto částí proložit přímku (cca od šedesáté minuty kultivace do cca stopadesáté minuty kultivace). Stacionární fáze se při tomto grafickém vynesení zobrazuje jako oblast, kdy se OD již téměř nemění (od cca

dvěstědvacáté minuty kultivace). Exponenciální fáze nepřechází do fáze stacionární skokově – oblast mezi nimi se označuje jako doba přechodová. Počátek stacionární fáze bylo třeba pro následující pokusy zvolit. Jako počátek stacionární fáze byla z technických důvodů definována střední hodnota doby přechodové (v tomto konkrétním případě odpovídá času cca 170 minut po začátku kultivace, viz Graf 3). Stacionární fáze má své charakteristické rysy (viz kapitola 2.2.), jedním z nich je, že optická denzita se nemění.



Graf 3 Růstová křivka *Bacillus subtilis AKP 3* při 37 °C. Bylo použito kultivační medium LB, doba zdvojení bakteriální kultury byla 20 minut. Růst kmene je srovnatelný s růstovou charakteristikou kmene *JH 642* (J. Beranová, osobní sdělení) ■ = růstová křivka, ■ = přibližná oblast exponenciální fáze, ■ = přibližná oblast stacionární fáze. Mezi exponenciální fází a stacionární fází je doba přechodová. V grafu jsou zobrazena tři nezávislá provedení.

Růstová charakteristika kmene *AKP 3* odpovídá hodnotám, které byly experimentálně zjištěny pro kmen *JH 642* (J. Beranová, osobní sdělení) – oba kmeny mají shodné doby zdvojení, průběh exponenciální fáze a dobu nástupu fáze stacionární.

Další růstové křivky (i v jiných kultivačních teplotách) nejsou uváděny, protože pro následující pokusy byly použity kultury již ve stacionární fázi.

4.2. Určování podílu spor během stacionární fáze

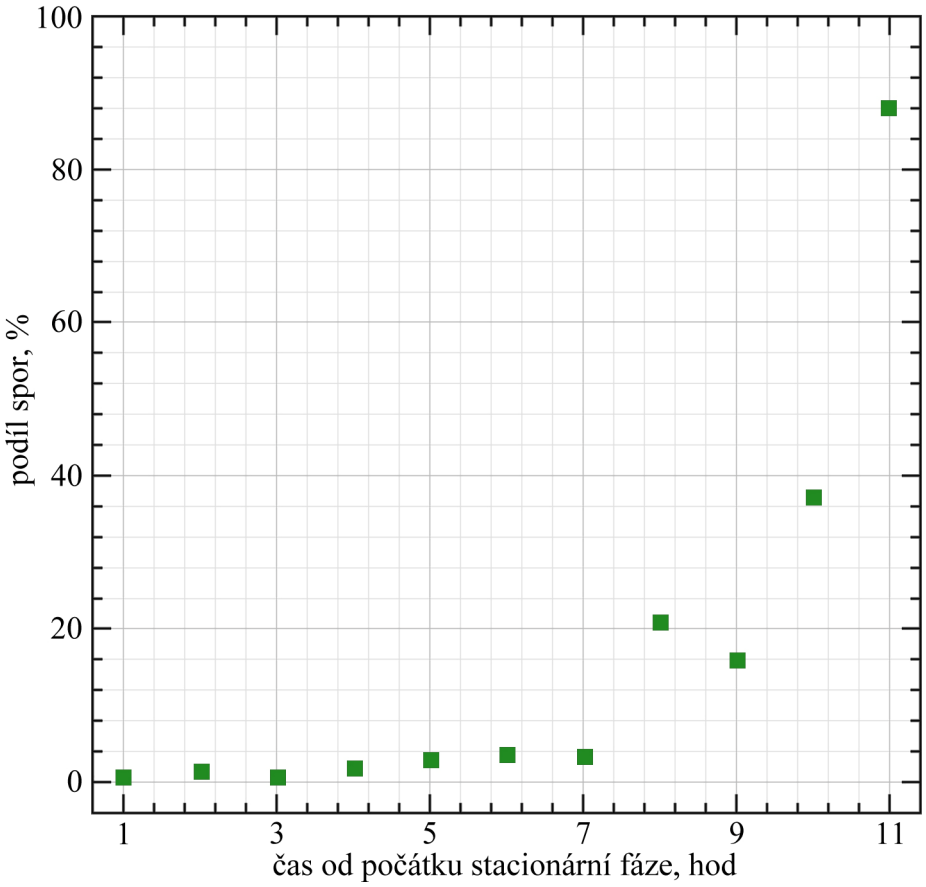
Zkoumání stacionární fáze má několik komplikací. Jednou z nejpodstatnějších je přítomnost spor v bakteriální kultuře. Spory jsou sice metabolicky neaktivní, ale jelikož jsou součástí biomasy, nutně zanášejí chyby do metabolických charakteristik bakteriální kultury. Při zkoumání buněk ve stacionární fázi by bylo ideální pracovat s takovou bakteriální kulturou, která bakteriální spory neobsahuje, nebo jich obsahuje zanedbatelný podíl. Byla snaha najít takový časový úsek během stacionární fáze, kdy by podíl spor v kultuře nepřesáhl 10 %. Za tímto účelem byl proveden pokus s výsevem buněk na agarovou plotnu (viz kapitola 3.8.). Výsledky nebyly dostatečně reprodukovatelné, proto byl podíl spor dále určován pomocí komplexu TbDPA (DPA vázaná na iont Tb^{3+}). Tyto výsledky však také nebyly přesvědčivé, proto bylo provedeno ještě Gramovo barvení fixních preparátů.

4.2.1. Určování podílu spor výsevem

Podíl spor *Bacillus subtilis AKP 3* během stacionární fáze růstu v kultivačním mediu LB, při 37 °C byl zjišťován výsevem 2 typů vzorků na agarovou plotnu (viz kapitola 3.8.1.). Vzorky naředěné bakteriální kultury a tepelně opracované vzorky téže kultury (tak, aby přežily pouze spory) byly vysety na pevnou agarovou plotnu. Počet kolonií na agarových plotnách byl odečten a byl vypočítán podíl spor v kultuře v okamžiku odběru. Výsledky byly vyneseny do grafu v procentech (viz Graf 4).

Touto metodou bylo určeno, kdy se v bakteriální kultuře začnou objevovat spory a jak velké procento spor se v kultuře vyskytuje. Běžně trvá tvorba spory přibližně 6 – 10 hodin. Proto bylo překvapením, že podíl spor začíná výrazně narůstat již od desáté hodiny po začátku stacionární fáze. Pokus byl několikrát zopakován. Výsledky však nebyly uspokojivé, jelikož při dalších provedeních byl podíl spor během časné stacionární fáze ještě vyšší, než bylo zjištěno původně a všechna provedení vykazovala velký rozptyl výsledných hodnot. Nejpravděpodobnější chybou se jevila kontaminace agarových ploten bakteriálními sporami, které ulpěly na skleněné hokejce. Spory *Bacillus subtilis* dokážou přežít v ethanolu, kterým byly hokejky sterilizovány. Ani použití jednorázových hokejek v dalších pokusech však nevedlo k přesvědčivějšímu určení podílu spor. Nejpravděpodobnější variantou, proč další pokusy nepotvrdily předchozí pozorování, byla chyba způsobená

během důkladného míchání. Míchání (v našem případě opakované při vytváření ředící řady) však mohlo vegetativní buňky usmrtit (G. Seydlová, osobní sdělení). Vzorky buněk, které byly vysévány na plotny, pochází z několikanásobných ředění. Je tedy pravděpodobné, že podíl vegetativních buněk byl ve skutečnosti vyšší, než kolik nárůst na agarové plotně ukázal.



Graf 4 Podíl spor v bakteriální kultuře *Bacillus subtilis AKP 3* od počátku stacionární fáze. Buňky byly kultivovány v LB mediu při 37 °C. Vzorků naředěné bakteriální kultury a tepelně opracované vzorky byly vysety na agarovou plotnu, byly odečteny narostlé kolonie a bylo vypočítáno procento spor v bakteriální kultuře v jednotlivých časových úsecích. K výraznému nárůstu počtu spor v bakteriální kultuře dochází od desáté hodiny po začátku stacionární fáze.

Ani opakovaným provedením pokusu (celkem 5 ×) se tedy nepotvrdil předpoklad, že do desáté hodiny stacionární fáze je podíl spor v bakteriální kultuře relativně nízký, avšak byl pozorován určitý trend, kdy v tomto časovém úseku podíl spor nepřevyšuje 10 – 15 %.

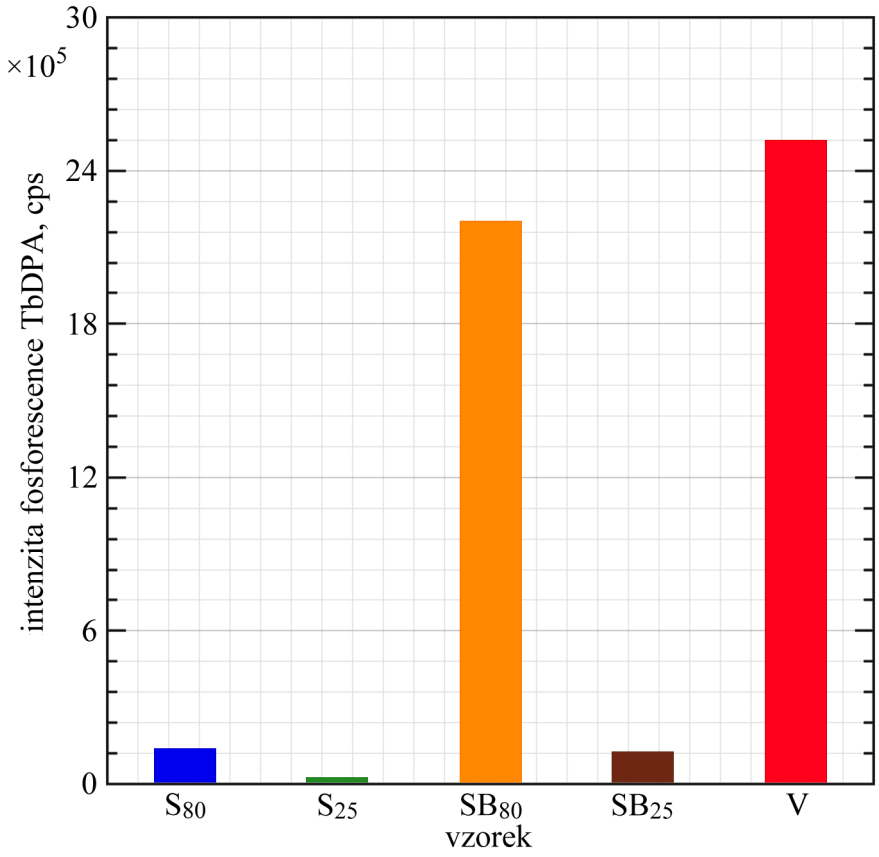
Proto byly navrženy další metody k ověření podílu spor během stacionární fáze (viz dále). Určení podílu spor se zaměřilo na časnou stacionární fázi, kde se nižší výskyt spor očekává.

4.2.2. Určování podílu spor pomocí komplexu TbDPA

Předchozí výsledky poskytly pouze částečnou informaci o tom, kdy se v bakteriální kultuře začnou objevovat dormantní spory. Pro zpřesnění dosavadního pozorování byla navržena metoda pro stanovení podílu spor pomocí DPA vázané na iont Tb^{3+} (viz kapitola 3.8.2.). DPA je ve značném množství přítomna v bakteriální endospoře. Principem metody bylo, že uvolněním DPA ze spory, následným navázáním na iont Tb^{3+} a změřením fosforescence komplexu TbDPA by bylo možno kvantifikovat množství DPA, resp. spor v bakteriální kultuře. Nejprve bylo provedeno ověření této metody na různých směsích živých buněk a spor. Bylo připraveno 3 typy vzorků – vzorky obsahující pouze spory (tepelně opracované při 80 °C S_{80} a tepelně neopracované S_{25}), směs spor a vegetativních buněk (2,5 ml spor a 0,5 ml vegetativních buněk, tepelně opracované při 80 °C SB_{80} a tepelně neopracované SB_{25}), vegetativní buňky (V). Objem všech typů vzorků byl přibližně 3 ml, vzhledem k tomu, že se jedná o rozdílné typy buněk, nelze blíže specifikovat koncentraci. Bylo předpokládáno, že použitím stejného objemu bude koncentrace alespoň řádově stejná. Koncentrace v rámci jednotlivých typů vzorků (S, SB) však byla díky použití stejného typu buněk stejná. Tepelné opracování vzorku obsahujících pouze spory by nemělo mít vliv na intenzitu fosforescence. Vzorky SB_{80} a SB_{25} obsahují i vegetativní buňky, které měly být v případě vzorku SB_{80} zabity. Vzorek SB_{80} by tedy měl vykazovat obdobné intenzity fosforescence jako vzorky S_{80} a S_{25}. Vzorek SB_{25} měl ukázat fosforescenci směsi vegetativních buněk a spor, která se očekávala nižší než u vzorků spor. U vzorku V se předpokládala fosforescence nejnižší, jelikož neobsahuje DPA.

Jako kontrola sloužily stejné vzorky bez přídavku $TbCl_3$ (v grafu není zobrazeno). Všechny vzorky (kromě vzorku V) byly inkubovány s DL-α-alaninem (který umožnil vyklíčení spor) a následně zfiltrovány tak, aby byla získána pouze DPA. K té byl přidán $TbCl_3$ a byla změřena fosforescence. Výsledky jsou shrnuty v grafu (viz Graf 6).

Z výsledků je patrné, že předpokládaná vyšší intenzita fosforescence u vzorků obsahujících převážně spory se nepotvrdila. Nelze bohužel specifikovat, zda je výsledek způsoben rozdílnou koncentrací buněk ve vzorcích nebo jinou chybou v metodě. Největšího fosforescenčního signálu dosahují vzorky SB_{80} a V.



Graf 6 Intenzita fosforescence TbDPA u vzorků spor, vegetativních buněk a jejich směsí. Vzhledem k různé koncentraci buněk mezi jednotlivými typy vzorků, lze přímo porovnávat pouze hodnoty v rámci těchto typů. ■ (S_{80}) = spory tepelně opracované při 80 °C, ■ (S_{25}) = spory tepelně neopracované, ■ (SB_{80}) = směs spor a vegetativních buněk opracovaná při 80 °C, ■ (SB_{25}) = směs spor a vegetativních buněk tepelně neopracovaná, ■ (V) = vegetativní buňky. Nejvyšší intenzitu fosforescence Tb^{3+} vykazují vzorky V a SB_{80}. Očekávaný trend nebyl potvrzen – intenzita fosforescence komplexu TbDPA je zřejmě překryta fosforescencí od komplexů Tb^{3+} s jinými strukturami.

Byl proveden druhý pokus, při kterém bylo přidáno dvojnásobné množství $TbCl_3$ (výsledky nejsou zobrazeny). Tento pokus měl zvýraznit rozdíly ve fosforescenci v rámci jednotlivých vzorků. U všech vzorků však došlo ke srovnatelnému nárůstu intenzity fosforescence, z čehož lze vyvodit vazebnou nespecifitu iontu Tb^{3+} – kromě DPA tvoří komplexy s Tb^{3+} i proteiny, ale vzniklé komplexy dosahují nižších intenzit fosforescence. Nejpravděpodobnějším vysvětlením pro selhání metody je zřejmě schopnost vegetativních buněk vázat Tb^{3+} na mnoho buněčných struktur a tento signál pak zřejmě značně převyšuje intenzitu fosforescence komplexu TbDPA. Vzorek SB_{80} vykazuje vysokou intenzitu

fosforescence oproti vzorku SB_{25} pravděpodobně proto, že DPA zřejmě není uvolněna ze spor a iont Tb^{3+} je vázán na jiné struktury.

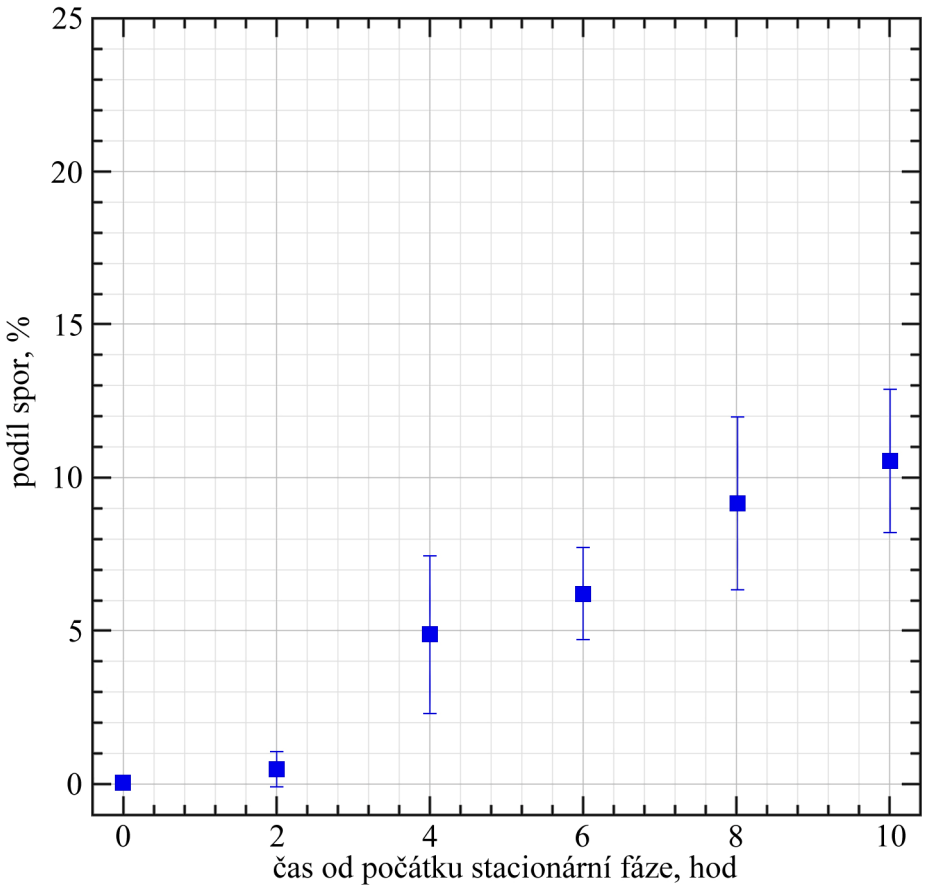
4.2.3. Určení podílu spor ve fixovaném preparátu

Vzhledem k nevysvětlenému selhání předchozí metody bylo rovnou přistoupeno k barvení dle Grama – jedná se o diferenciální barvení fixovaného preparátu, které umožňuje odlišit grampozitivní a gramnegativní bakteriální buňky na základě odlišností jejich buněčné stěny. Tento způsob barvení umožňuje obarvit vegetativní buňky *Bacillus subtilis*, avšak nikoli spory (složení sporového obalu neumožňuje navázání barviva). V bakteriální kultuře *Bacillus subtilis* je možno v takto připraveném preparátu pozorovat kromě vegetativních buněk i buňky, které začaly tvořit endospory jako světlolomná tělíska uvnitř mateřských buněk (lze je rozeznat až do okamžiku, kdy se endospora uvolní z mateřské buňky).

Bylo připraveno několik fixních preparátů z různých časových úseků po začátku stacionární fáze (0, 2, 4, 6, 8, 10 hodin po začátku stacionární fáze). Preparáty byly obarveny dle protokolu a byly pozorovány imerzním objektivem (viz kapitola 3.8.3.).

Z pozorování jednotlivých preparátů lze usuzovat na přibližné množství spor v daném vzorku (viz Graf 7). Z každého časového úseku byly vytvořeny tři fixní preparáty, vyhodnocováno bylo 50 buněk v každém preparátu. Bylo zjištěno, že první předspory se v odebraných vzorcích objevují ve 4. hodině po začátku stacionární fáze. U odběru z desáté hodiny po začátku stacionární fáze je patrné, že podíl spory se v kultuře vyskytují ve zvýšeném množství (v daném místě pozorovaného preparátu tvořily předspory cca 10 % buněk).

Celkově tento pokus prokázal, že spory se v kultuře *Bacillus subtilis* objevují již od počátku stacionární fáze a jejich podíl v kultuře s časem stoupá. Konkrétnější závěr vyvodit nelze, jelikož odečítání podílu spor je závislé na vybrané oblasti v rámci nehomogenního preparátu (biomasa není na preparátu rovnoměrně rozprostřena).



Graf 7 Podíl spor v bakteriální kultuře *Bacillus subtilis* od počátku stacionární fáze. Z grafu vyplývá, že podíl spor v průběhu kultivace pomalu vzrůstá a v desáté hodině od počátku stacionární fáze se pohybuje okolo 10 %.

4.3. Souprava Live/Dead Kit

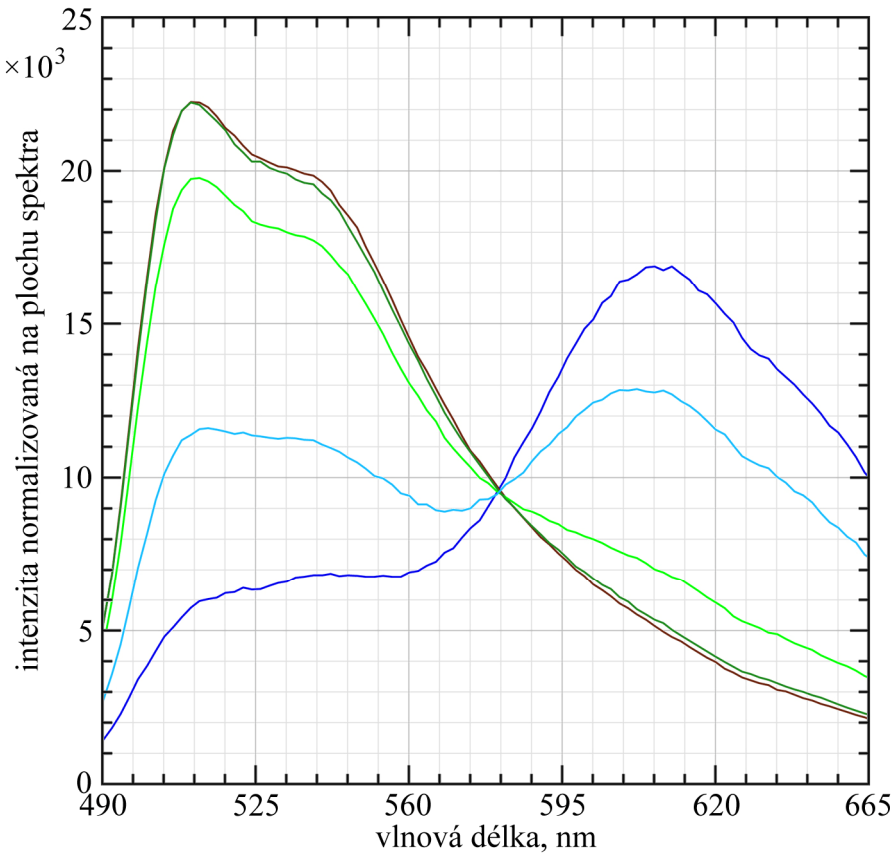
Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, bakteriální kultura ve stacionární fázi není fyziologicky jednotná, lze ji rozlišit na různé frakce buněk, které se s limitací živin vyrovnávají různými způsoby. Vedle vegetativních buněk a spor (o kterých pojednávala předchozí kapitola), se v bakteriální kultuře ve stacionární fázi vyskytují i buňky mrtvé. Ty, podobně jako spory, představují neaktivní biomasu a komplikují zkoumání fyziologických adaptací populace. Pro zjištění podílu živých a mrtvých buněk v bakteriální kultuře byl použit komerčně dostupný Live/Dead Kit (viz kapitola 3.9.).

Pro všechny pokusy byl použit kmen *Bacillus subtilis AKP 3*, v kultivačním mediu LB, při 37 °C.

4.3.1. Podíl živých a mrtvých buněk v kultuře exponenciální fáze

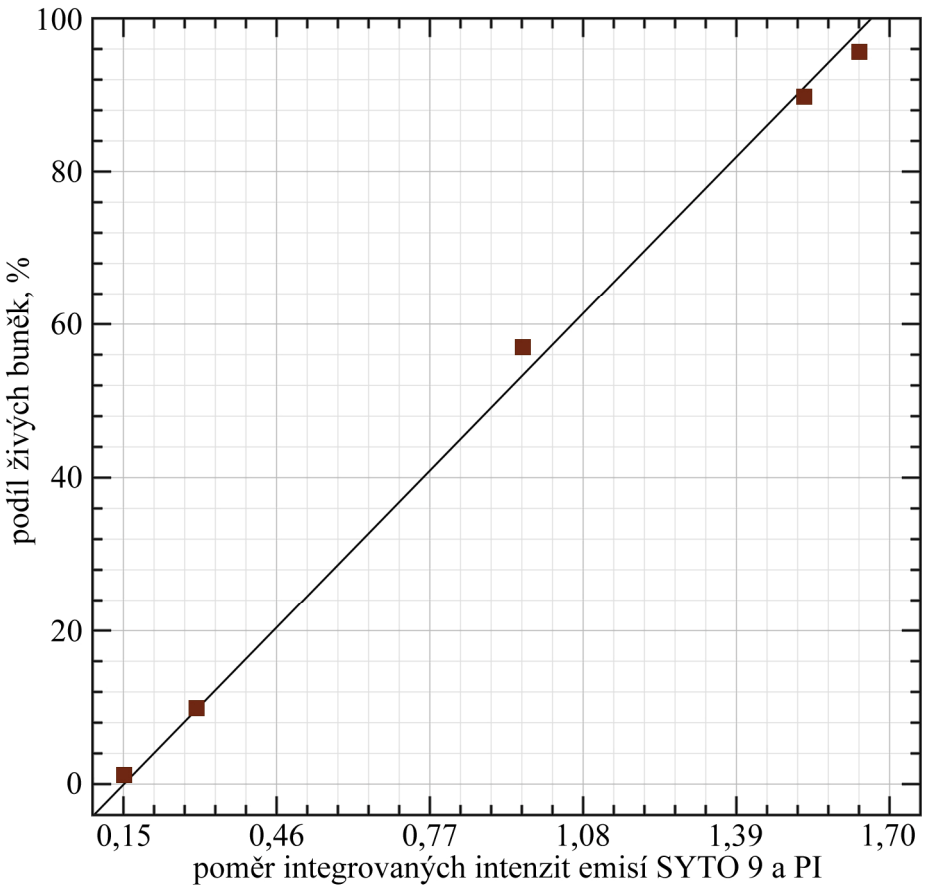
Cílem pokusu bylo ověřit použití soupravy Live/Dead Kit na buňkách exponenciální fáze. Použitá sada umožňuje určit poměr živých a mrtvých buněk. Pro tento účel bylo nutné část buněk usmrtit (působením isopropanolu). V tomto kalibračním experimentu byly připraveny vzorky směsí vegetativních buněk a usmrcených buněk (v různém poměru obou složek) (viz kapitola 3.9.1.). Poté byly vzorky obarveny sondami SYTO 9 a PI, které jsou součástí soupravy Live/Dead Kit.

U všech připravených vzorků byla naměřena fluorescenční spektra v rozsahu vlnových délek 490 – 700 nm. Hodnoty mezi 500 a 560 nm (zelená oblast spektra) vypovídají o živých buňkách, které byly označeny barvivem SYTO 9. Hodnoty mezi 600 a 660 nm (červená oblast spektra) vypovídají o signálu mrtvých buněk, které byly označeny převážně PI. Výsledky jsou graficky shrnuty (viz Graf 8). Z grafu je patrné, že živé a mrtvé buňky lze zřetelně rozeznat za použití zelené a červené fluorescenční sondy – sonda SYTO 9 se váže na živé i mrtvé buňky, zatímco sonda PI označuje převážně mrtvé buňky. Na základě toho můžeme vypočítat závislost zastoupení živých buněk na poměru integrovaných intenzit pro zelenou a červenou emisi u kultury exponenciálních buněk (viz Graf 9).



Graf 8 Emisní spektra suspenzí, které obsahují různý poměr živých a iso-propanolem zabitých buněk. Vzorky byly získány během exponenciální fáze. Suspenze byly obarveny pomocí soupravy Live/Dead Kit. ■ (0-100) = vzorek obsahující pouze mrtvé buňky, ■ (10-90) = vzorek obsahující 10 % živých buněk, ■ (50-50) = vzorek s ekvivalentním množstvím živých a mrtvých buněk, ■ (90-10) = vzorek obsahující 90 % živých buněk, ■ (100-0) = vzorek obsahující pouze živé buňky. V grafu jsou zobrazena spektra, od kterých bylo odečteno pozadí.

Použitelnost soupravy Live/Dead Kit byla vyzkoušena na buňkách exponenciální fáze – výsledný podíl živých buněk určený z grafu je přímo úměrný podílu živých buněk v připravených vzorcích. Tato metoda byla následně použita i pro buňky stacionární fáze (viz dále).

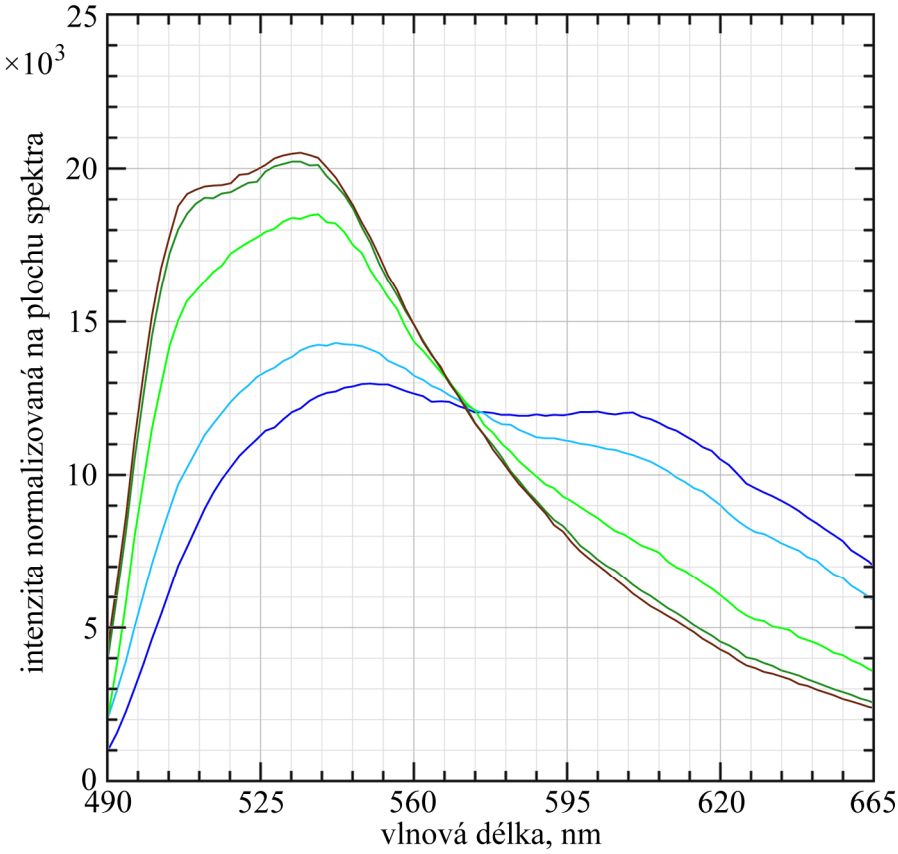


Graf 9 Závislost zastoupení živých buněk na poměru integrovaných intenzit pro zelenou (500 – 560 nm) a červenou emisi (600 – 600 nm) u kultury exponenciálních buněk. Poměr integrovaných intenzit byl získán podělením příslušných ploch získaných v Grafu 8, podíl živých buněk byl dán přípravou vzorků. Získaná kalibrační data vykazují velmi dobrou lineární korelaci (s rovnicí přímky y = 65,83x – 9,90).

4.3.2. Podíl živých a mrtvých buněk v kultuře stacionární fáze

Použití soupravy Live/Dead Kit bylo vyzkoušeno i pro kulturu stacionární fáze. Byly měřeny buňky z 2. hodiny po začátku stacionární fáze. Byly připraveny vzorky směsí vegetativních buněk a usmrcených buněk (v různém poměru obou složek) (viz kapitola 3.9.2.). Byl proveden analogický pokus jako s buňkami exponenciální fáze – nejprve byla naměřena fluorescenční spektra v oblasti vlnových délek 490 – 700 nm (viz Graf 10), na základě toho bylo opět možno vypočítat závislost zastoupení živých buněk na poměru integrovaných

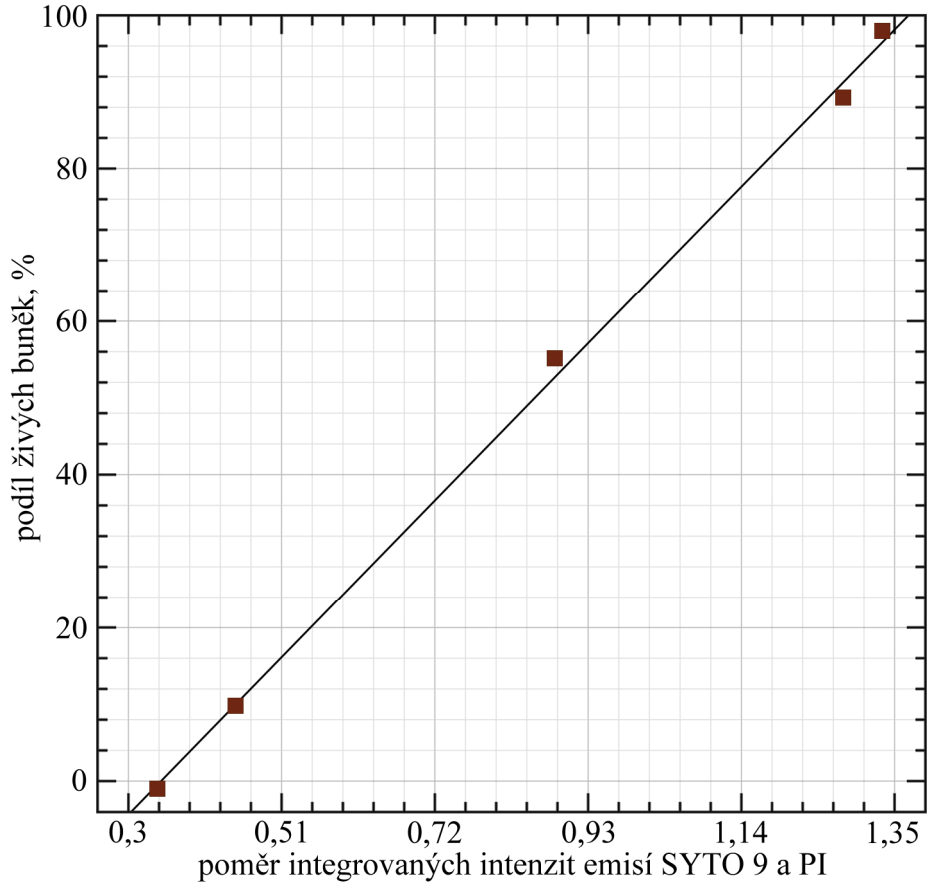
intenzit pro zelenou (500 – 560 nm) a červenou emisi (600 – 660 nm) u kultury stacionárních buněk (viz Graf 11).



Graf 10 Emisní spektra suspenzí, které obsahují různý poměr živých a iso-propanolem zabitých buněk. Vzorky byly získány během druhé hodiny po začátku stacionární fáze. Suspenze byly opět obarveny pomocí soupravy Live/Dead Kit. ■ (0-100) = vzorek obsahující pouze mrtvé buňky, ■ (10-90) = vzorek obsahující 10 % živých buněk, ■ (50-50) = vzorek s ekvivalentním množstvím živých a mrtvých buněk, ■ (90-10) = vzorek obsahující 90 % živých buněk, ■ (100-0) = vzorek obsahující pouze živé buňky. V grafu jsou zobrazena spektra, od kterých bylo odečteno pozadí.

Použití soupravy Live/Dead Kit bylo tedy ověřeno i na buňkách stacionární fáze. Z grafu je opět patrné, že buňky živé a mrtvé lze zřetelně rozeznat za použití zelené a červené fluorescenční sondy. Možnost aplikace této metody i na buňky stacionární fáze nám umožňuje určit podíl metabolicky neaktivních buněk během stacionární fáze. Ze srov-

nání směrnic získaných z kalibračních grafů lze usuzovat na rozdílnou afinitu použitých fluorescenčních sond k exponenciálním a stacionárním buňkám.

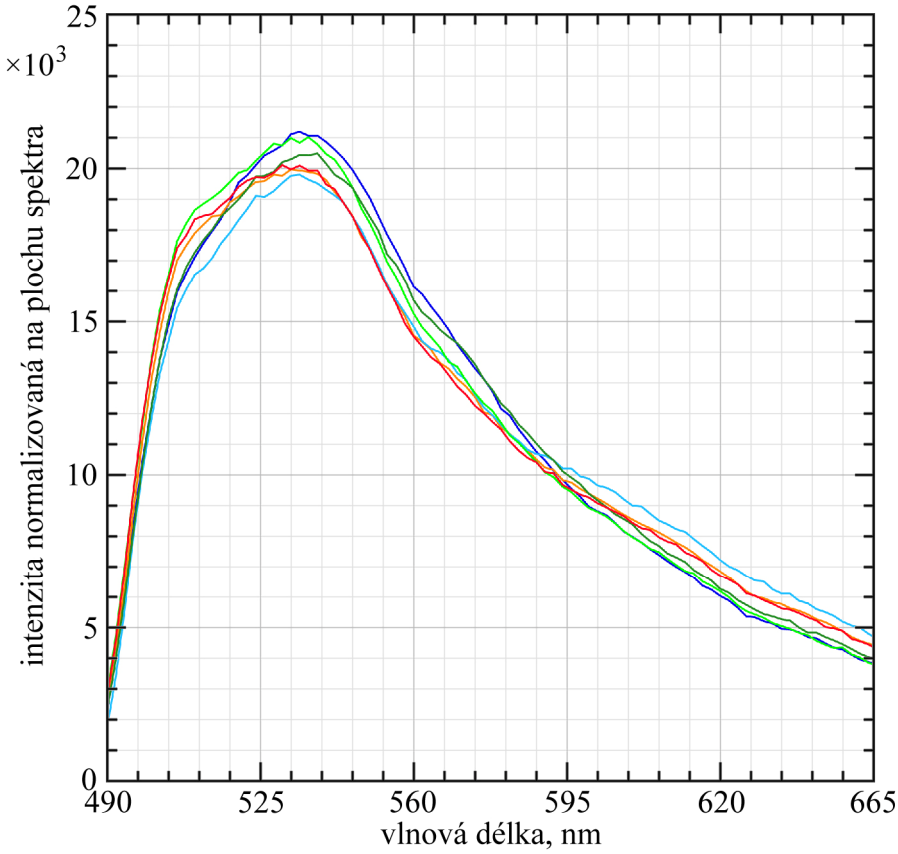


Graf 11 Závislost zastoupení živých buněk na poměru integrovaných intenzit pro zelenou (500 – 560 nm) a červenou emisi (600 – 600 nm) u kultury stacionárních buněk. Poměr integrovaných intenzit byl získán poděleným příslušných ploch získaných v Grafu 10, podíl živých buněk byl dán přípravou vzorků. Stejně jako v předešlém pokusu vykazují získaná kalibrační data velmi dobrou lineární korelaci (s rovnicí přímky y = 97,77x – 33,55).

Stěžejním pokusem bylo ověření podílu živých a mrtvých buněk v různé době od počátku stacionární fáze – cílem bylo zjistit, jak se podíl živých buněk v kultuře bakteriálních buněk v závislosti na kultivační době mění. Vzhledem k nedostatku živin ve stacionární fázi lze očekávat postupné ubývání živých buněk.

Bylo odebráno celkem 6 vzorků (0, 2, 4, 6, 8 a 10 hodin po začátku stacionární fáze), u kterých byla změřena fluorescenční spektra v oblasti vlnových délek 490 – 700 nm

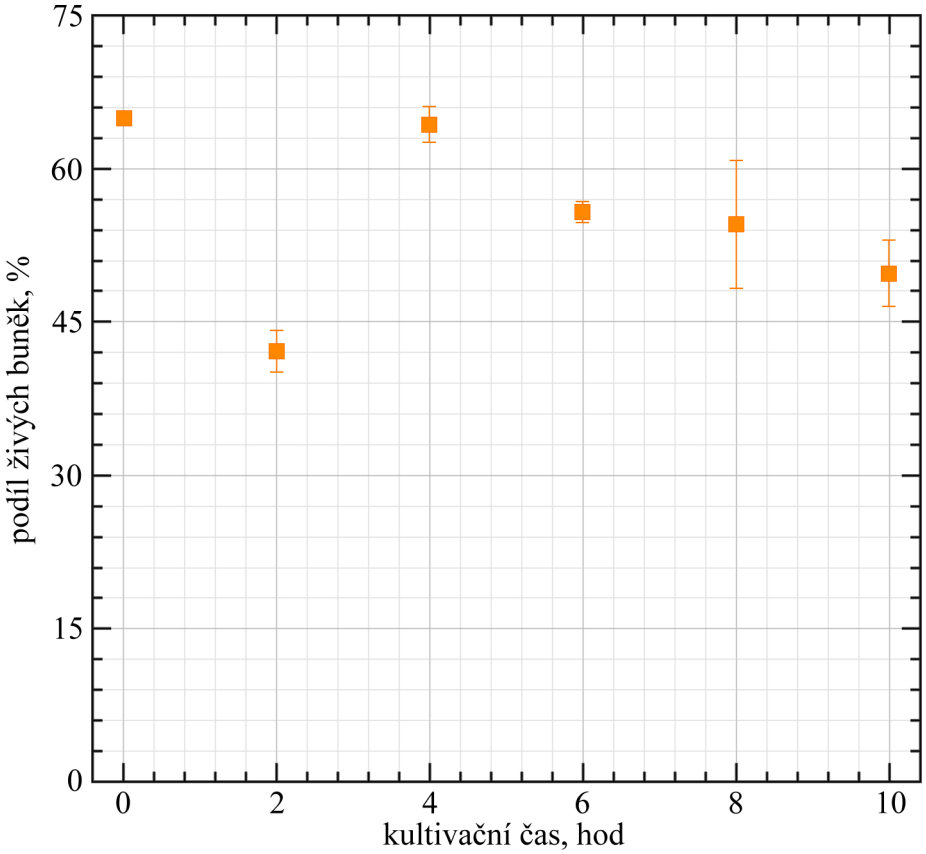
(viz Graf 12). Každý vzorek byl měřen dvakrát – výsledky těchto paralelních měření jsou navzájem srovnatelné (v grafu je tedy pro přehlednost zobrazeno jen jedno měření).



Graf 12 Emisní spektra vzorků suspenzí odebíraných v průběhu stacionární fáze, u kterých byl zjišťován poměr živých a mrtvých buněk. Vzorky byly odebírány od po začátku stacionární fáze ve dvouhodinových intervalech. Suspenze byly opět obarveny pomocí soupravy Live/Dead Kit. ■ = 0 h, ■ = 2 h, ■ = 4 h, ■ = 6 h, ■ = 8 h, ■ = 10 h. V grafu jsou zobrazena spektra, od kterých bylo odečteno pozadí.

Integrací příslušných oblastí vlnových délek (zelené oblasti spektra 500 – 560 a červené oblasti spektra 600 – 660 nm) byla získána data k vytvoření závislosti zastoupení živých buněk na kultivačním čase u kultury stacionárních buněk (viz Graf 13). K přepočtu poměru integrálních intenzit příslušných ploch fluorescenčního spektra na podíl živých buněk byla použita kalibrační rovnice z Grafu 11. Kromě vzorku, který byl odebrán v druhé hodině od začátku stacionární fáze, popisují ostatní vzorky trend, při kterém se procento živých buněk snižuje (odchylka této hodnoty od nalezeného trendu nebyla uspokojivě

vysvětlena). Celkově byl podíl živých buněk do desáté hodiny stacionární fáze přibližně 55 %. Zároveň bylo zjištěno, že i v desáté hodině po začátku stacionární fáze je procento živých buněk stále relativně vysoké (50 %), což umožnilo dále zkoumat metabolické změny v populaci.



Graf 13 Vývoj podílu živých buněk po začátku stacionární fáze. Podíl živých buněk byl opět měřen pomocí soupravy Live/Dead Kit. K přepočtu poměru integrálních intenzit příslušných ploch fluorescenčního spektra na podíl živých buněk byla použita kalibrační rovnice z Grafu 11. Kromě vzorku, který byl odebrán v druhé hodině od začátku stacionární fáze, popisují ostatní vzorky trend, při kterém se procento živých buněk snižuje. Celkově je podíl živých buněk do 10. hodiny stacionární fáze přibližně 55 %.

4.4. Aktivita promotoru *des*

Dosavadní pokusy odhalily, že bakteriální kultura ve stacionární fázi se skládá ze tří základních typů buněk – vegetativních buněk, mrtvých buněk a bakteriálních spor. Pro kvantifikování podílu spor v bakteriální kultuře byly provedeny pokusy s výsevy buněk

a pokusy založené na fosforescenci komplexu TbDPA – výsledky z obou experimentů však jednoznačnou kvantifikaci neumožnily. Přesnější informaci o podílu spor poskytlo Gramovo barvení fixních preparátů (10 – 20 % spor do desáté hodiny stacionární fáze bakteriální kultury). Pro kvantifikování podílu mrtvých buněk byla použita souprava Live/Dead Kit. Na základě této metody bylo zjištěno, že podíl živých buněk bakteriální kultury činil přibližně 55 % do desáté hodiny stacionární fáze.

Další pokusy tedy byly prováděny od počátku stacionární fáze do přibližně 10. hodiny stacionární fáze, kdy je podíl mrtvých buněk ještě relativně nízký (viz kapitola 4.3.2.) a bakteriální kultura (viz kapitola 4.2.) vykazuje nižší podíl spor. Situováním pokusů do tohoto časového úseku byly minimalizovány chyby, které vznikají přítomností frakcí metabolicky neaktivních spor a mrtvých buněk.

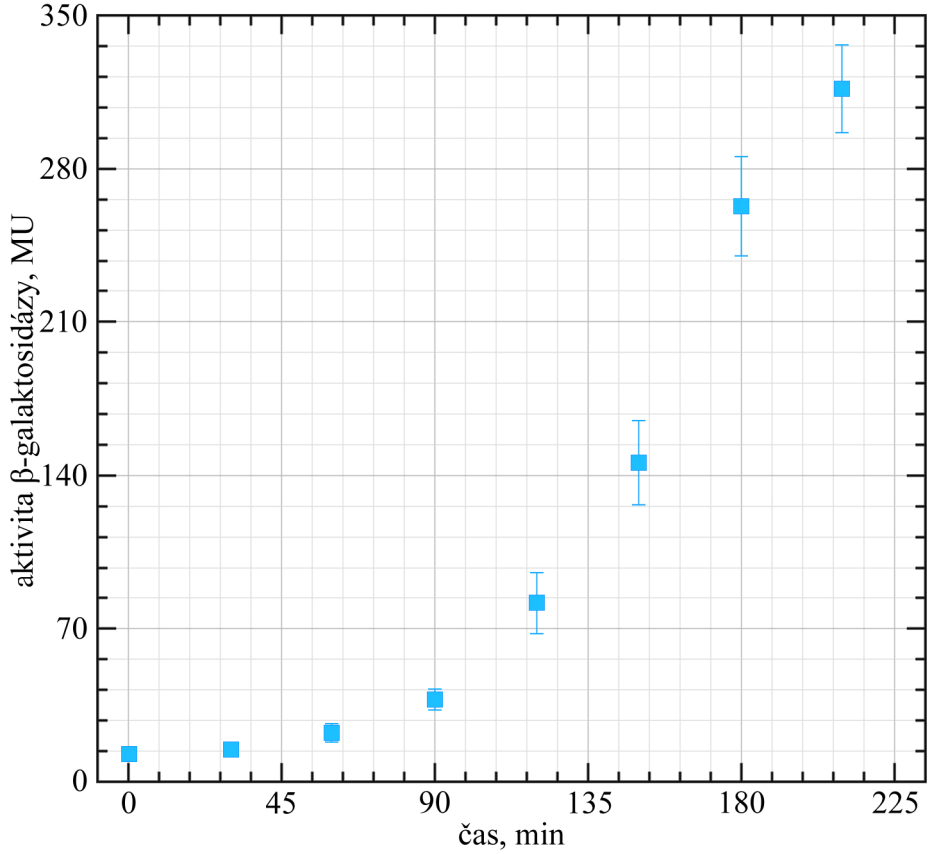
Senzor membránové fluidity DesK vnímá změny fluidity membrány – snížení membránové fluidity v buňce indukuje syntézu desaturázy mastných kyselin (kódovanou genem *des*). Aktivitu *Pdes* lze sledovat pomocí reportérového genu *lacZ*, jehož přepisem vzniká enzym β-galaktosidáza (viz kapitola 3.10.). Tato aktivita byla nejprve sledována během exponenciální fáze (ověření metody a možnost srovnání s již publikovanými výsledky) a během stacionární fáze. Byla zkoumána exprese β-galaktosidázy za stálých kultivačních teplot a po teplotním šoku. Všechny pokusy byly provedeny v komplexním LB mediu.

Tato metoda byla již dříve v naší laboratoři použita k zjištění schopnosti bakteriální populace odpovídat na chladový stres. Z již publikovaných výsledků (SCHROMMOVA 2008) je znám přibližný rozsah aktivity β-galaktosidázy po teplotních šocích provedených během exponenciální fáze. Metoda byla v této práci ověřena pro exponenciální buňky kmene *AKP 3* a následně aplikována na buňky stacionární fáze. V dostupné literatuře není použití této metody pro stacionární buňky doposud popsáno. Předpokladem bylo, že bakteriální populace ve stacionární fázi bude rovněž odpovídat na chladový šok tvorbou desaturázy. Vzhledem k limitaci živinami během stacionární fáze byl očekáván pokles tvorby enzymu ve srovnání s buňkami exponenciální fáze (a tedy snížení aktivity β-galaktosidázy).

4.4.1. Aktivita promotoru *des* během exponenciální fáze

Nejprve bylo třeba zjistit, jakou expresi β-galaktosidázy vykazují buňky exponenciální fáze kmene *AKP 3* po chladovém šoku. Za tímto účelem byl proveden experiment, kdy byla bakteriální kultura kultivována při 40 °C a po dosažení OD_{450nm} cca 0,2 byla přenesena do 20 °C. Po tomto přenosu byly prováděny odběry vzorků (po 30 minutách) pro určení

aktivity β-galaktosidázy. Vzorky byly zpracovány dle postupu uvedeného výše (viz kapitola 3.10.) a výsledné roztoky byly měřeny na spektrofotometru. Průběh β-galaktosidázové aktivity je zaznamenám graficky (viz Graf 14). Získané výsledky byly porovnány s již publikovanými (SCHROMMOVA 2008).



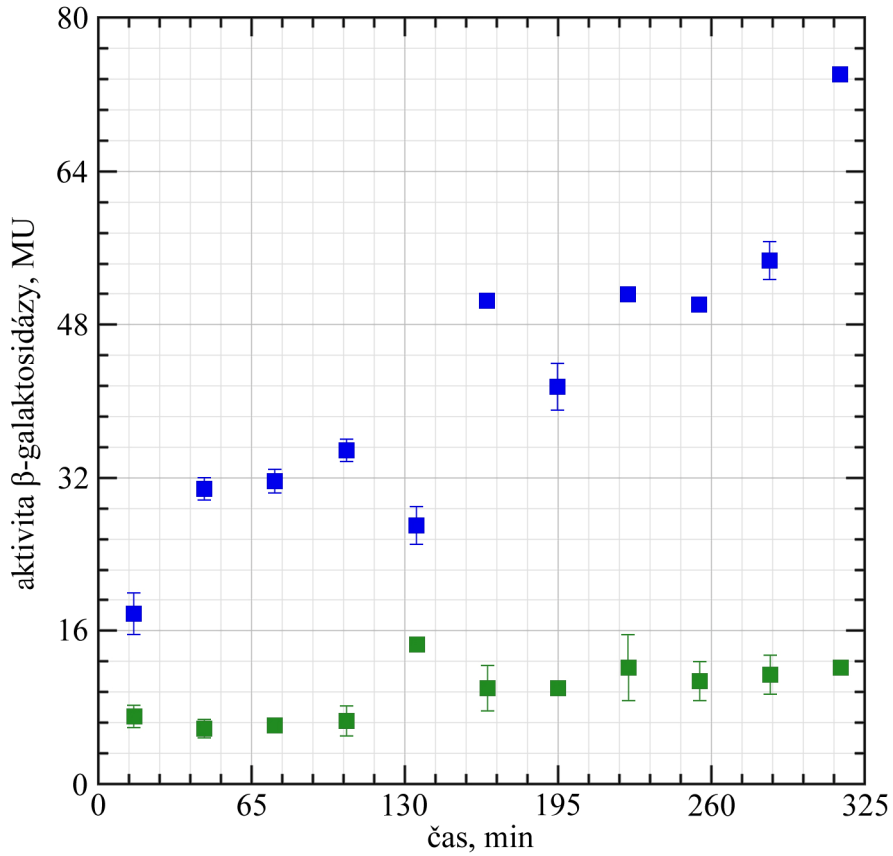
Graf 14 Aktivita β-galaktosidázy u kmene *AKP 3* po přenosu ze 40 °C do 20 °C. Nárůst aktivity β-galaktosidázy po třech hodinách po teplotním šoku je 265 MU. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení.

Po přenosu bakteriální kultury ze 40 °C do 20 °C (ke chlazení byla použita vodní třepačka) byl pozorován nárůst aktivity β-galaktosidázy. Po třech hodinách ve 20 °C vystoupala aktivita enzymu až k hodnotě přibližně 260 MU, což je ve shodě s analogickým experimentem v literatuře, kde pro kmen 168 a kultivační medium KM byla aktivita enzymu β-galaktosidázy 250 MU (SCHROMMOVA 2008). Tímto pokusem bylo ověřeno, že aktivitu *Pdes* u kmene *AKP 3* je srovnatelná s jinými kmeny *Bacillus subtilis* a závěry získané studiem různých kmenů *Bacillus subtilis* lze porovnávat mezi sebou.

Dále byl proveden pokus, který ověřil nutnost použití vodní třepačky pro provedení teplotního šoku. Chlazení baňky po teplotním šoku ve třepačce chlazené vzduchem je poma-

lejší, než ve třepačce s vodou jako chladícím médiem. Proto byl proveden následující pokus, který srovnává použití obou systémů k ochlazení bakteriálních kultur.

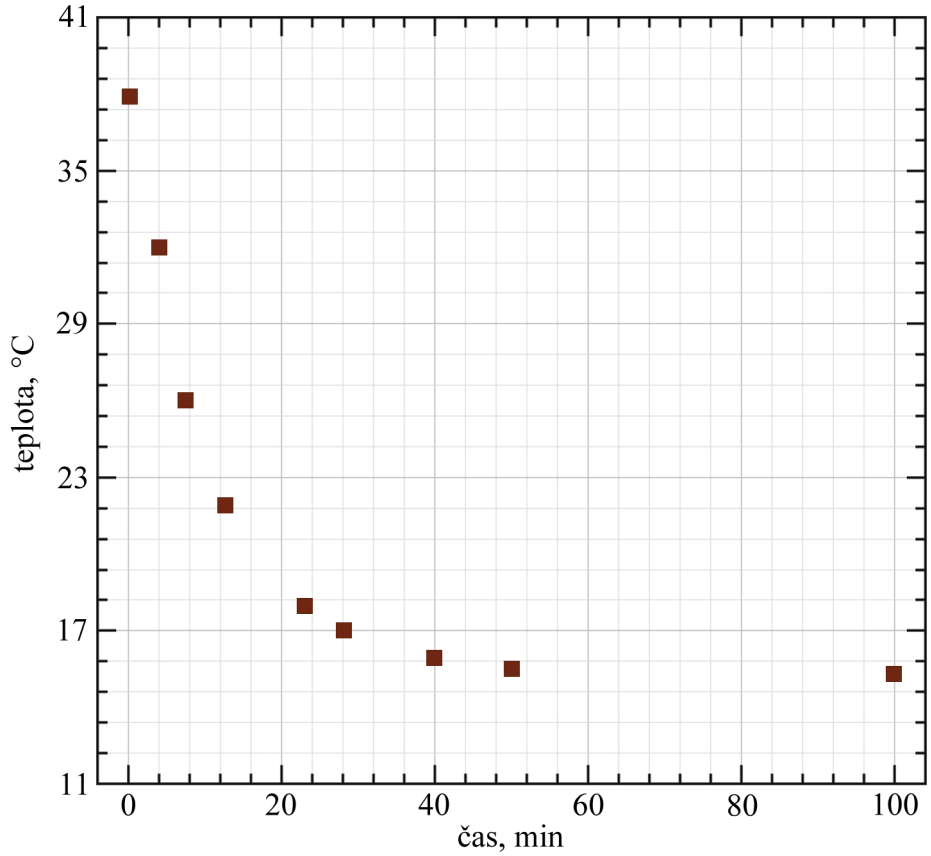
Buňky *AKP 3* byly kultivovány v teplovzdušné třepačce ve dvou baňkách při 40 °C. Při OD_{450nm} 0,2 byly přeneseny do 2 různých třepaček temperovaných na 15 °C. Jedna baňka byla přenesena do vzduchem chlazené třepačky, druhá do třepačky vodní. Při tomto teplotním šoku již buňky *Bacillus subtilis* nejsou schopny reagovat na změnu teploty syntézou desaturázy mastných kyselin (SCHROMMOVA 2008). Od okamžiku přenosu byly opět prováděny odběry pro určení aktivity β-galaktosidázy (viz Graf 15).



Graf 15 Aktivita β-galaktosidázy po přenosu exponenciální kultury *AKP 3* ze 40 °C do 15 °C. ■ = aktivita ve vodou chlazené třepačce, ■ = aktivita ve vzduchem chlazené třepačce. Z grafu vyplývá, že chlazení vzduchem je příliš pomalé, bakterie vnímají pokles teploty jako postupný a jsou schopny na něj reagovat syntézou desaturázy.

Zároveň byl k tomuto pokusu proveden kontrolní experiment, kdy bylo změřeno, za jak dlouho dobu se ochladí medium v baňce přenesené ze 40 °C do 15 °C ve vzduchem

chlazené třepačce. Byl zaznamenán i časový průběh tohoto ochlazování (viz Graf 16). Teplota v baňce byla průběžně zaznamenávána teploměrem Testo 735-2. Během prvních 20 minut došlo k výraznému chlazení media až na přibližně 18 °C. Dále už byl pokles teploty pozvolný. Po 100 minutách bylo měření ukončeno na teplotě 15,3 °C (rozdíl oproti teplotě třepačky 15 °C je způsoben jen přesnějším měřením digitálního teploměru, který byl pro pokus použit).



Graf 16 Průběh poklesu teploty kultivačního media ve vzdušněné třepačce po přenosu ze 40 °C do 15 °C. Snížení teploty media na 15,3 °C bylo zaznamenáno až po 100 minutách od přenosu z kultivačního media.

Z výsledků je patrné, že při kultivaci ve vodou chlazené třepačce nedochází k expresi β-galaktosidázy (chlazení bakteriální kultury je dostatečně rychlé). Při chlazení vzdušněnou třepačkou k expresi β-galaktosidázy dochází - chlazení je příliš pomalé a bakteriální buňky jsou schopny se lépe vypořádat se změnou teploty (vnímají ji jako postupnou a nikoli náhlou). Z tohoto důvodu byly další pokusy přizpůsobeny tomuto zjištění a bakteriální kultura byla chlazena ve vodou temperované třepačce.

4.4.2. Aktivita promotoru *des* během stacionární fáze

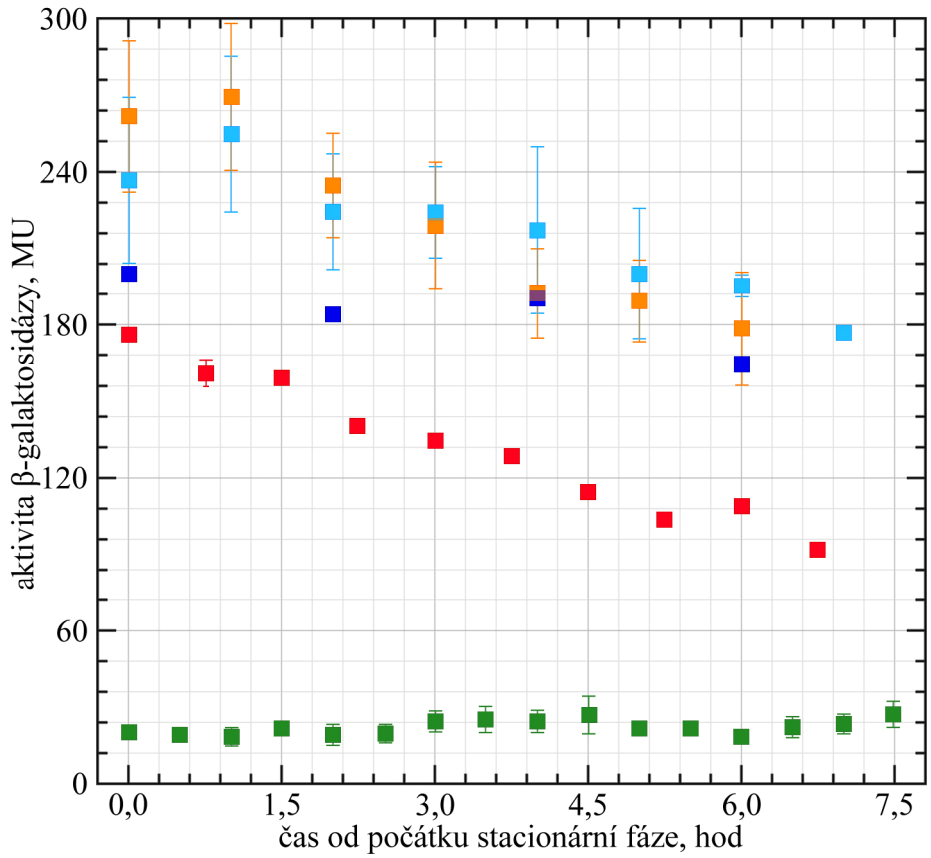
Jak již bylo uvedeno, aktivita *Pdes* během stacionární fáze dosud nebyla prostudována. Buňky stacionární fáze byly tedy zkoumány za při stálé kultivační teplotě (37 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C a 15 °C) a po teplotních šocích, které byly provedeny ze základní teploty 37 °C (kultury byly přeneseny do 25 °C, 20 °C a 15 °C). Počáteční teplota 37 °C byla zvolena proto, aby ještě mohl být proveden i teplotní přenos do 15 °C (buňky od jisté velikosti rozdílu kultivačních teplot přestávají odpovídat zvýšenou transkripcí z *Pdes*). Hladina aktivity β-galaktosidázy při stálé kultivační teplotě sloužila jako kontrola pro pokusy, při kterých byl prováděn chladový šok. Cílem bylo zjistit, zda nárůst aktivity enzymu po šoku není způsoben jen vyrovnáním hladiny enzymu v buňce na hodnotu, která je typická pro danou teplotu kultivace. Analogický experiment na exponenciálních kulturách prokázal, že se o vyrovnávání hladin nejedná (SCHROMMOVA 2008).

4.4.2.1. Aktivita promotoru *des* při stálé kultivační teplotě ve stacionární fázi

Pro experimenty se snížením kultivační teploty bylo nutno nejprve zjistit, jaká je aktivita *Pdes* pro stálé teploty kultivace ve stacionární fázi. Bakteriální kultura kmene *AKP 3* byla kultivována ve stálé kultivační teplotě (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C). Od počátku stacionární fáze byly prováděny odběry pro stanovení aktivity β-galaktosidázy, která vypovídaly o aktivitě *Pdes*. Výsledky byly získány stejným způsobem jako u analogického pokusu v exponenciální fázi (viz kapitola 4.4.1.) a zpracovány (viz Graf 17).

Zjištěné hodnoty aktivity β-galaktosidázy byly porovnány s literaturou – aktivita na počátku stacionární fáze vykazovala výrazné odchylky od aktivity na konci exponenciální fáze, uvedené v literatuře (SCHROMMOVA 2008). Z tohoto porovnání (viz Graf 17) vyplynulo, že naměřená aktivita β-galaktosidázy ve stacionární fázi je možná způsobena nesprávným výpočtem této aktivity. Při výpočtu Millerových jednotek (viz Rovnice 2) byla totiž použita hodnota OD naměřená při 525 nm, která odpovídala určité koncentraci biomasy, naměřené zvážením sušiny exponenciálních buněk. Vzhledem k různé předpokládané velikosti stacionárních a exponenciálních buněk je možno očekávat, že vztah pro výpočet biomasy na základě měření OD nebude pro oba typy buněk stejný.

Vzhledem ke zmíněným pochybnostem byl proveden pokus, který měl srovnat vztah mezi OD a koncentrací biomasy pro buňky stacionární a exponenciální fáze.

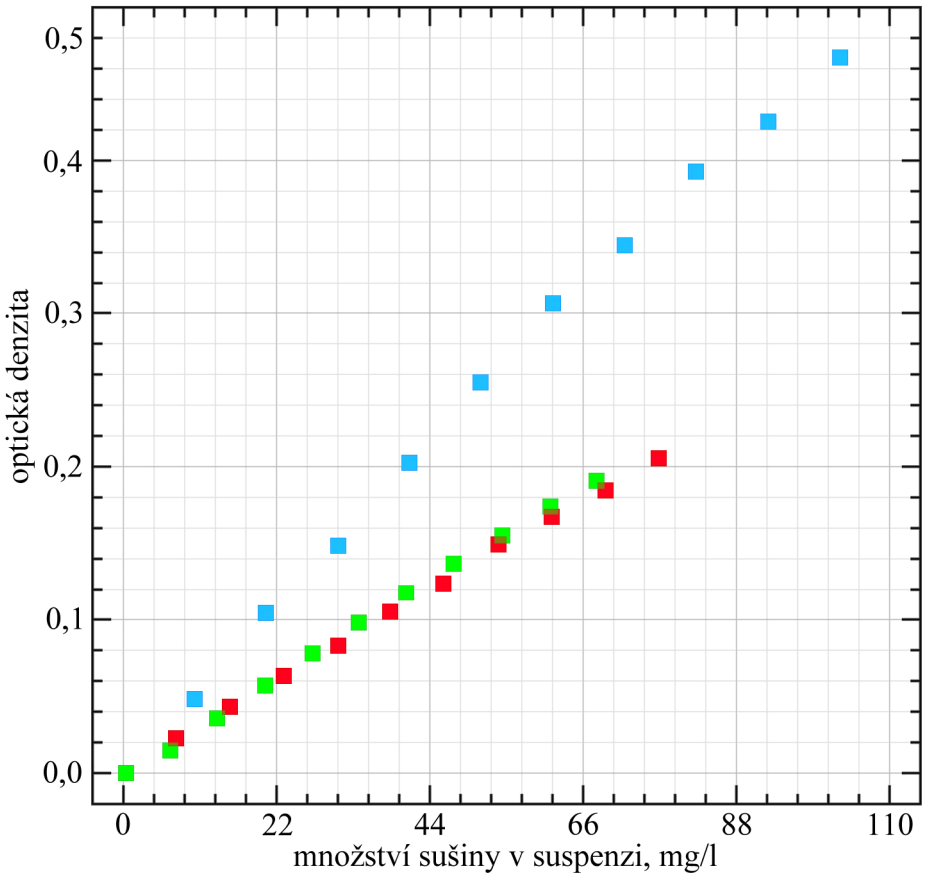


Graf 17 Aktivita β-galaktosidázy od počátku stacionární fáze u kmene *AKP 3* při různých stálých kultivačních teplotách. ■ = 37 °C, ■ = 30 °C, ■ = 25 °C, ■ = 20 °C, ■ = 15 °C. Nejvyšší aktivitu vykazuje tento kmen při 25 °C, nejnižší při 37 °C. Graf zobrazuje průměr tří nezávislých provedení.

Kmen *AKP 3* byl kultivován při 37 ºC. Byly napěstovány jak buňky exponenciální kultury tak buňky stacionární fáze. Vztah mezi biomasou a OD byl zjištěn pomocí metody popsané v kapitole 3.11. Závislost optické denzity na koncentraci biomasy byla vynesena graficky (viz Graf 18) a dále byla určena směrnice pro exponenciální a stacionární buňky. Stacionární buňky byly odebrány z časné stacionární fáze (cca druhá hodina stacionární fáze) a pozdější stacionární fáze (cca šestá hodina stacionární fáze). Směrnice závislosti OD na koncentraci biomasy se výrazně liší mezi exponenciálními a stacionárními buňkami, mezi dvěma typy stacionárních buněk je již srovnatelná.

Pro stacionární buňky odpovídá stejná hodnota OD skoro dvojnásobné biomase než v případě exponenciálních buněk. Rozdíly v aktivitě β-galaktosidázy při kultivaci ve stálé teplotě u buněk stacionární fáze (viz 4.4.2) a buněk exponenciální fáze (SCHROMMOVA 2008) jsou tedy zřejmě způsobeny rozdílem ve vztahu OD a biomasy mezi exponenciálními a stacionárními buňkami. Tento rozdíl je třeba při výpočtu Millerových jednotek zohlednit.

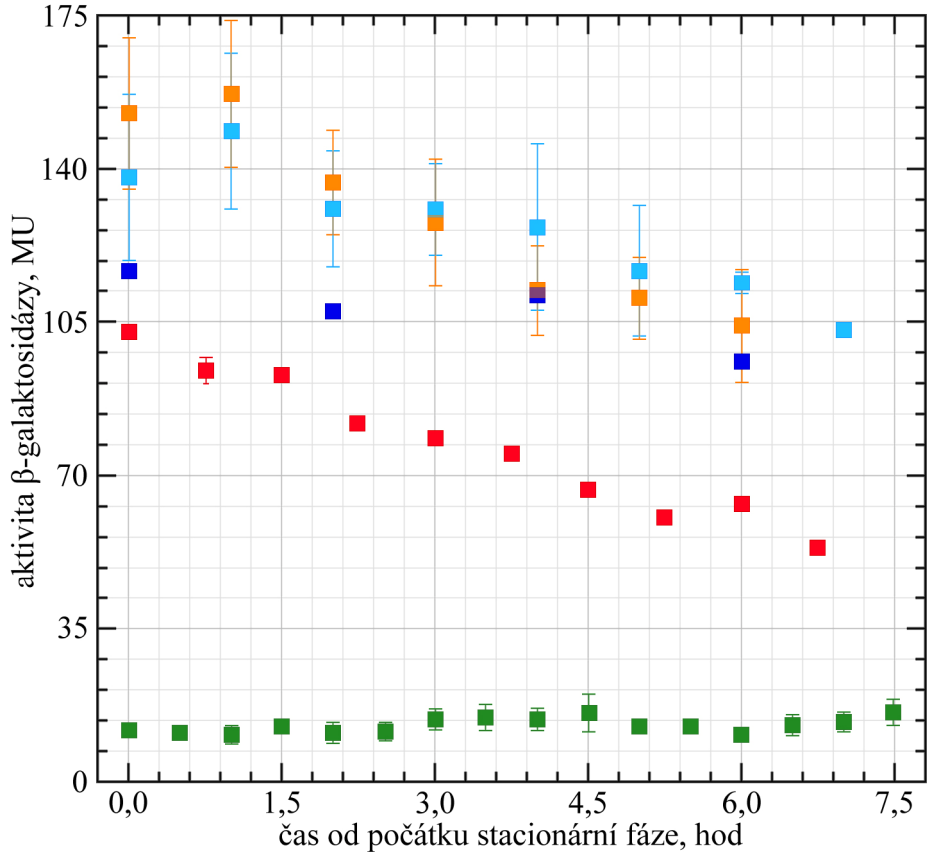
Při výpočtu MU se pracuje s hodnotou OD, která reprezentuje biomasu (viz Rovnice 2). Ta je v případě stacionárních buněk přibližně 1,7 × vyšší než u exponenciálních buněk. Aktivita β-galaktosidázy u stacionárních buněk je tedy ve skutečnosti 1,7 × nižší, než bylo v Grafu 17 uvedeno. Aktivity β-galaktosidázy ve všech následujících pokusech byly dle uvedeného zjištění korigovány a zpětně byl korigován graf 17 (viz Graf 19).



Graf 18 Závislost OD na koncentraci biomasy pro exponenciální a stacionární buňky kmene *AKP 3* při kultivační teplotě 37 ºC. Stacionární buňky byly odebrány z časné stacionární fáze (cca z druhé hodiny) a pozdější stacionární fáze (cca šesté hodiny). ■ = buňky exponenciální fáze s rovnicí regrese y = 4,7132x, ■ = buňky odebírané z časné stacionární fáze (cca z druhé hodiny) s rovnicí regrese y = 2,6983x, ■ = buňky odebírané z pozdní stacionární fáze (cca z šesté hodiny) s rovnicí regrese y = 2,8369x.

Z výsledku korigovaného grafu 19 je patrné, že i v teplotě 37 °C dochází od počátku stacionární fáze k expresi enzymu β-galaktosidázy. Aktivita enzymu dosahuje přibližně 15 MU (jak bude uvedeno později, jedná se o indukci původní β-galaktosidázy

ve stacionární fáze pod kontrolou vlastního promotoru, nezávislou na *Pdes* – viz kapitola 4.4.3.). Je tedy nutné brát tuto hodnotu indukce jako základní a všechny ostatní hodnoty nárůstu aktivity β-galaktosidázy je třeba korigovat dle této základní hladiny.



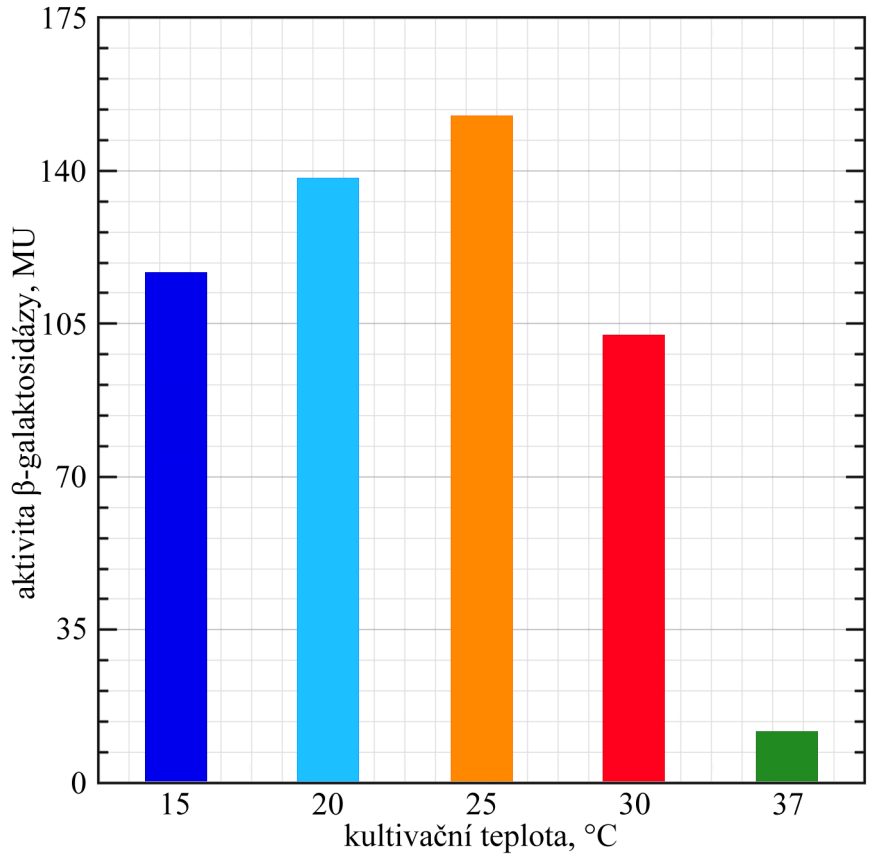
Graf 19 Korigovaná aktivita β-galaktosidázy od počátku stacionární fáze kultivace kmene *AKP 3* při různých stálých kultivačních teplotách. ■ = 37 °C, ■ = 30 °C, ■ = 25 °C, ■ = 20 °C, ■ = 15 °C. Aktivita β-galaktosidázy při 37 °C je základní hladina enzymu v buňce během stacionární fáze. Nejvyšší aktivita β-galaktosidázy byla pozorována při kultivaci v 25 °C. U všech zobrazených teplot kultivace dochází k poklesu aktivity enzymu (s výjimkou teploty 37 °C).

Při všech pozorovaných stálých kultivačních teplotách (kromě 37 °C) dochází k poklesu aktivity β-galaktosidázy. Tento pokles je u všech teplot srovnatelný, s výjimkou teploty 15 °C (tento pozvolný pokles u 15 °C vysvětlen nebyl).

Nejvyšší aktivity dosahuje β-galaktosidáza teplotě 25 °C (nárůst oproti aktivitě při 37 °C je 140 MU). Nižší aktivitu než při 25 °C má β-galaktosidáza při 20 °C (nárůst oproti

aktivitě při 37 °C je 120 MU). Analogická situace je i při kultivaci v 15 °C (nárůst oproti aktivitě při 37 °C je 100 MU). Nižší aktivita enzymu než při 15 °C je při 30 °C. V této teplotě lze nízkou aktivitu *Pdes* vysvětlit tím, že se jedná o relativně vysokou teplotu a membrána buňky je ještě dostatečně fluidní, ve srovnání s teplotami 25 °C, 20 °C a 15 °C.

Pro přehlednost byly hodnoty aktivity β-galaktosidázy z počátku stacionární fáze vyneseny do samostatného grafu (viz Graf 20).



Graf 20 Aktivita β-galaktosidázy na počátku stacionární fáze pro jednotlivé stálé kultivační teploty. ■ = 15 °C, ■ = 20 °C, ■ = 25 °C, ■ = 30 °C, ■ = 37 °C. Aktivita β-galaktosidázy při 37 °C určuje základní hladinu tohoto enzymu v buňce během stacionární fáze. Nejvyšší aktivita β-galaktosidázy byla pozorována při kultivaci v 25 °C. Aktivita β-galaktosidázy v 37 °C je 15 MU.

Obdobné pokusy realizovala ve své diplomové práci Kateřina Schrommová (SCHROMMOVA 2008). Jednalo se o pokusy během exponenciální fáze. Bylo zjištěno, že aktivita enzymu je nízká při teplotách nad 30 °C (v rozmezí 0 – 60 MU) a vysoká při teplotách pod 30°C (150 – 300 MU). Zároveň byl u nižších teplot pozorován nárůst

a opětovný pokles aktivity β-galaktosidázy v čase, který nebyl vysvětlen. Hodnoty aktivity β-galaktosidázy v poslední fázi pokusu (konec exponenciální fáze) byly srovnány s výsledky získanými na buňkách stacionární fáze. V případě stacionárních buněk byla změna aktivity β-galaktosidázy při kultivaci v 30 °C přibližně 85 MU (po korekci na základní hladinu β-galaktosidázy při 37 °C). U teplot nižších než 30 °C byl zaznamenán rozdíl této aktivity v rozmezí 100 – 140 MU.

4.4.3. Aktivita promotoru *des* po chladovém šoku ve stacionární fázi

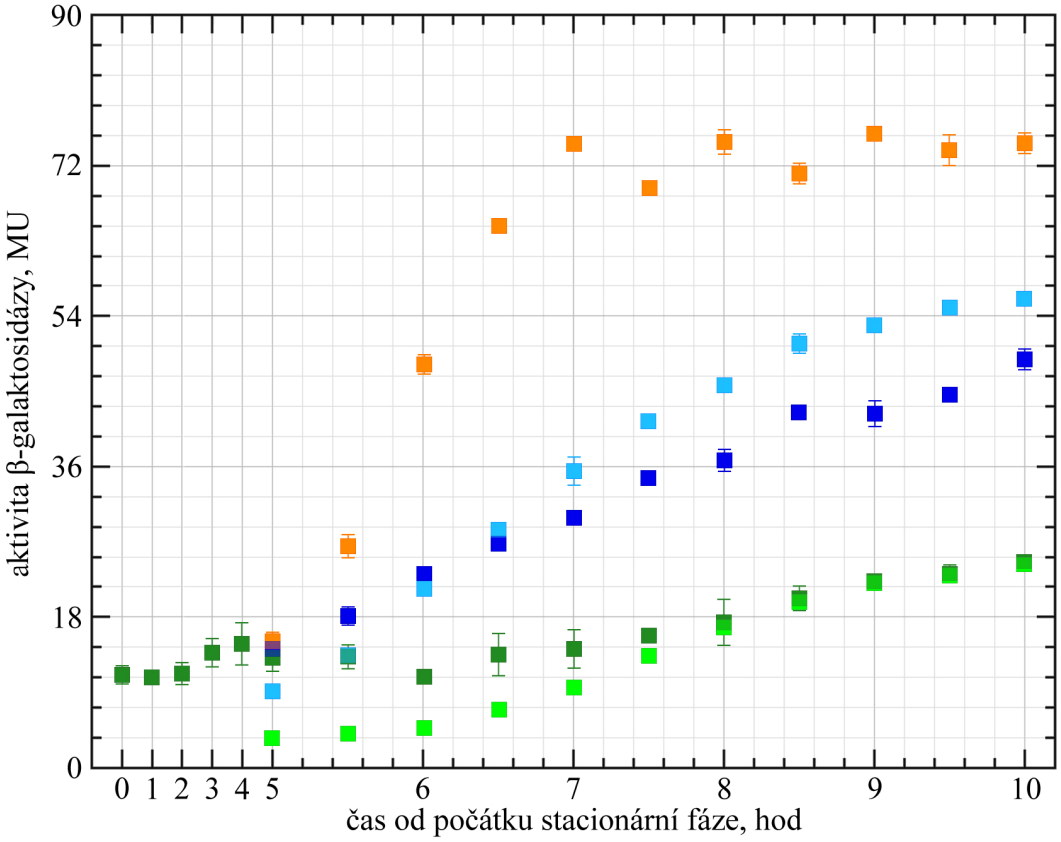
Stěžejním pokusem této práce bylo zjistit aktivitu *Pdes* po teplotním šoku způsobeným náhlou změnou kultivačních teplot. Za tímto účelem byly kultury kmenu *AKP 3* pěstované při 37 °C přeneseny v páté hodině po začátku stacionární fáze do nižších kultivačních teplot (25 °C, 20 °C a 15 °C), kde byly kultivovány dalších 5 hodin (doba byla zvolena na základě pokusů, které určily podíl spor (viz kapitola 4.2.) a podíl mrtvých buněk (viz kapitola 4.3.2.) v bakteriální kultuře během stacionární fáze.). Podíl spor nepřesáhl 10 % a podíl mrtvých buněk byl 45 %. Počáteční teplota 37 °C byla zvolena proto, aby ještě mohl být proveden i teplotní přenos do 15 °C. Jak bylo uvedeno výše, buňky od jisté velikosti rozdílu kultivačních teplot přestávají odpovídat zvýšenou transkripcí z *Pdes* – po přenosu ze 40 °C do 15 °C neodpovídají zvýšenou indukcí β-galaktosidázy, zatímco při přenosu z 37 °C do 15 °C indukcí odpovídají.

Od okamžiku přenosu byly v půlhodinových intervalech odebírány vzorky pro určení aktivity β-galaktosidázy. Zároveň byla provedena kultivace kmene *JH 642* při 37 °C, jejímž cílem bylo zjistit aktivitu původní β-galaktosidázy (nezávislé na *Pdes*). Výsledky jsou shrnuty v grafu (Graf 21).

Z grafu vyplývá, že aktivita β-galaktosidázy při 37 °C je srovnatelná pro kmeny *AKP 3* a *JH 642*. Jelikož kmen *JH 642* vypovídá o aktivitě β-galaktosidázy nezávislé na *Pdes*, je naměřená aktivita u kmene *AKP 3* způsobena jen vnitřní β-galaktosidázou a *Pdes* není v této teplotě aktivní. Zároveň byl pozorován jasný trend, kdy s postupující stacionární fází dochází k nárůstu aktivity β-galaktosidázy nezávislé na *Pdes* a to přibližně o 10 MU za pět hodin kultivace.

Po přenosu bakteriální kultury do nižší kultivační teploty (25 °C, 20°C a 15 °C) došlo ve všech třech případech k nárůstu aktivity β-galaktosidázy – při přenosech do teplot 15 °C a 20 °C je však nárůst aktivity výrazně nižší než při přenosu do teploty 25 °C. Na rozdíl od přenosu do 25 °C nemají buňky zřejmě v ostatních případech dostatečnou metabolickou

kapacitu pro výraznější tvorbu desaturázy. Nejvýraznější nárůst aktivity byl pozorován po přenosu kultury do 25 °C, kde navíc po 2 hodinách od přenosu dochází k zastavení nárůstu aktivity β-galaktosidázy.



Graf 21 Aktivita β-galaktosidázy po přenosu bakteriální kultury *AKP 3* v páté hodině po začátku stacionární fáze z 37 °C do nižších kultivačních teplot. ■ = původní kultivační teplota 37 °C, ■ = přenos do 25 °C, ■ = přenos do 20 °C, ■ = přenos do 15 °C, ■ = kmen *JH 642* kultivovaný při 37 °C (pro srovnání), který produkuje β-galaktosidázu nezávisle na *Pdes*. Nejvyšší nárůst aktivity byl pozorován u přenosu do teploty 25 °C. Hodnoty pro kmen *AKP 3* jsou průměrem ze tří nezávislých provedení.

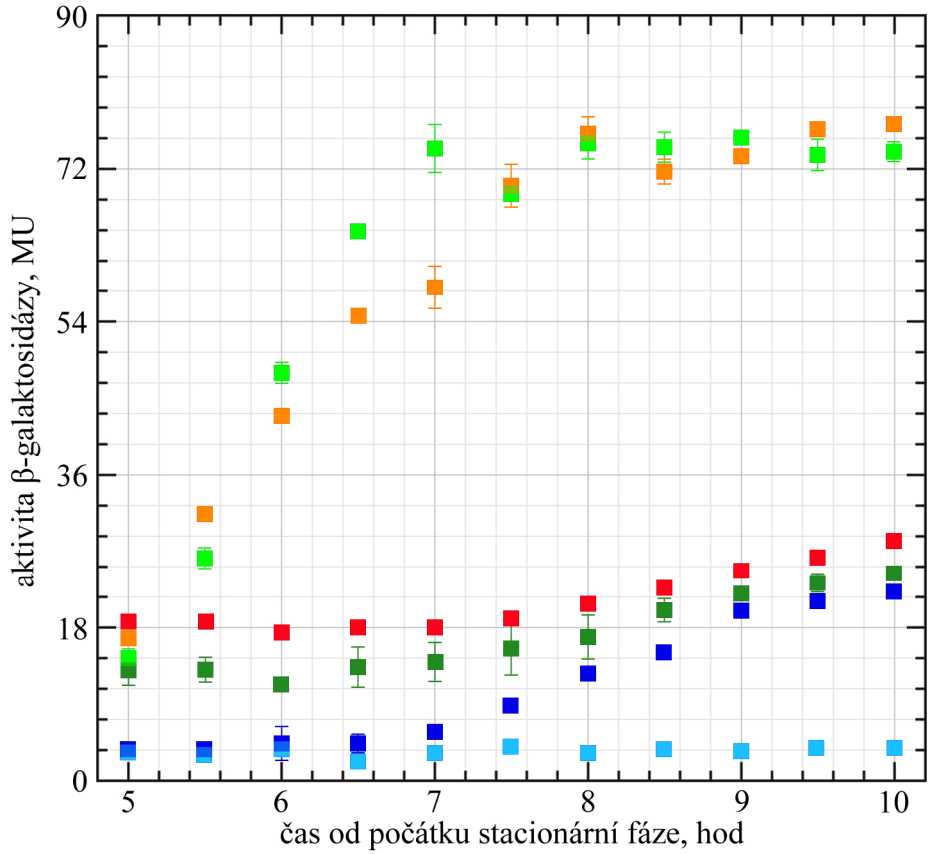
Nárůsty aktivit po chladovém šoku byly srovnány s pokusem provedeným v exponenciální fázi (viz kapitola 4.4.1.). Nárůst aktivity β-galaktosidázy po chladovém šoku, provedeném během exponenciální fáze, byl zaznamenán v řádech stovek MU (přibližně 300 MU, viz Graf 14). V případě stacionární fáze byly zaznamenány nárůsty aktivit oproti běžné hladině β-galaktosidázy v buňkách kultivovaných při 37 °C o 65 MU (změna teploty na 25 °C), 48 MU (změna teploty na 20 °C) a 26 MU (změna teploty na 15 °C). Získané údaje byly

porovnány i s výsledky dostupnými v literatuře (SCHROMMOVA 2008). Konkrétně je při přenosu do 25 °C nárůst ve stacionární fázi 7 × nižší, při přenosu do 20 °C je 6 × nižší a při přenosu do 15 °C je 2 × nižší.

Po teplotním přenosu z 37 °C do 25 °C dochází u buněk stacionární fáze po dvou hodinách k zastavení nárůstu aktivity β-galaktosidázy. Příčinou tohoto jevu může být buď situace, kdy buňky registrují dostatečně fluidní membránu a senzor DesK nespouští signální dráhu vedoucí ke tvorbě desaturázy, nebo situace, kdy buňka již nemá další metabolickou kapacitu pro tvorbu desaturázy. Pro určení této příčiny byl proveden následující experiment.

Kromě kmene *AKP3* (*JH642 amyE*::*Pdes-lacZ*) byly použity i další dva bakteriální kmeny odvozené od *Bacillus subtilis JH 642* – kmeny *AKP4* (*JH642 des*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ*) a *AKP21* (*JH642 desKR*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ*). Výše zmíněné kmeny byly kultivovány při 37 °C a 5 hodin po začátku stacionární fáze přeneseny do 25 °C. Aktivita β-galaktosidázy jednotlivých kmenů je shrnuta v grafu (viz Graf 22).

Aktivita u kmene *AKP 3* je srovnatelná s předchozími pokusy. K indukci β-galaktosidázy 5 hodin po začátku stacionární fáze při teplotě 37ºC a při šoku 37 ºC – 25 ºC u *AKP 21* (nemá DesK/DesR) nedochází. K indukci u *AKP 4* (nemá funkční gen *des*) dochází jen při šoku 37 ºC – 25 ºC. Aktivita β-galaktosidázy při přenosu 37 ºC – 25 ºC je srovnatelná pro kmen *AKP 3* a *AKP 4.*



Graf 22 Aktivita β-galaktosidázy po přenosu bakteriální kultury *AKP 3*, *AKP 4* a *AKP 21* z kultivační teploty 37 °C do 25 °C v páté hodině po začátku stacionární fáze. ■ = kmen *AKP 3* při teplotě 37 °C, ■ = kmen *AKP 3* po přenosu do 25 °C, ■ = kmen *AKP 4* při teplotě 37 °C, ■ = kmen *AKP 4* po přenosu do 25 °C, ■ = kmen *AKP 21* při teplotě 37 °C, ■ = kmen *AKP 21* po přenosu do 25 °C. Nárůst aktivity po přenosu do 25 °C byl pozorován u kmenů *AKP 3* a *AKP 4*. Zobrazená data jsou průměrem tří nezávislých měření.

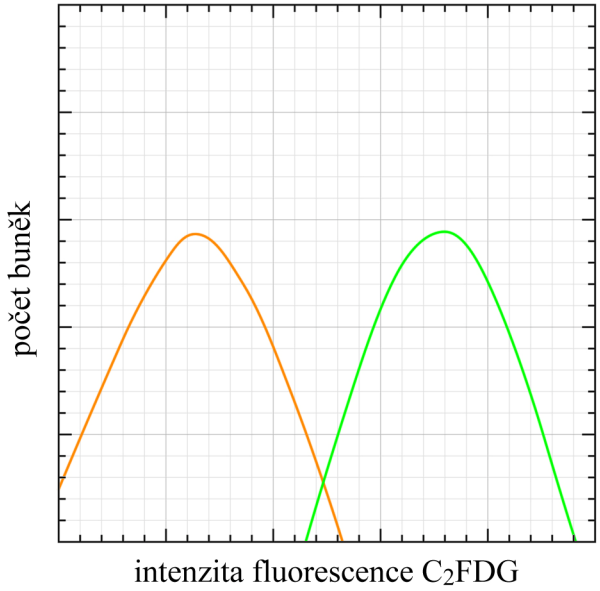
4.5. Průtoková cytometrie

Jak již bylo uvedeno výše, bakteriální kultura ve stacionární fázi je tvořena živými buňkami, mrtvými buňkami a sporami. Ani živé buňky bakteriální kultury ve stacionární fázi však nejsou fyziologicky homogenní – není tedy jasné, zda je zaznamenaná aktivita β-galaktosidázy odpovědí celé kultury buněk na sníženou kultivační teplotu, či na chladový šok odpovídá jen určitá frakce živá frakce buněk.

K odlišení různých frakcí buněk, které se vyskytují v bakteriální kultuře *Bacillus subtilis AKP 3* během stacionární fáze, byla použita metoda průtokové cytometrie. Pokusy byly prováděny ve dvou kultivačních teplotách (25 ºC a 37 ºC) a použity byly dvě

fluorescenční sondy (C_2FDG a TMA-DPH) (viz kapitola 3.12.). Jelikož je sonda C_2FDG štěpena enzymem β-galaktosidázou za vzniku fluorescenčního produktu, byla tato sonda použita k odlišení populace buněk, které β-galaktosidázu syntetizují. Sonda TMA-DPH sloužila k označení membrány buněk a umožnila určit přibližnou velikost buněk.

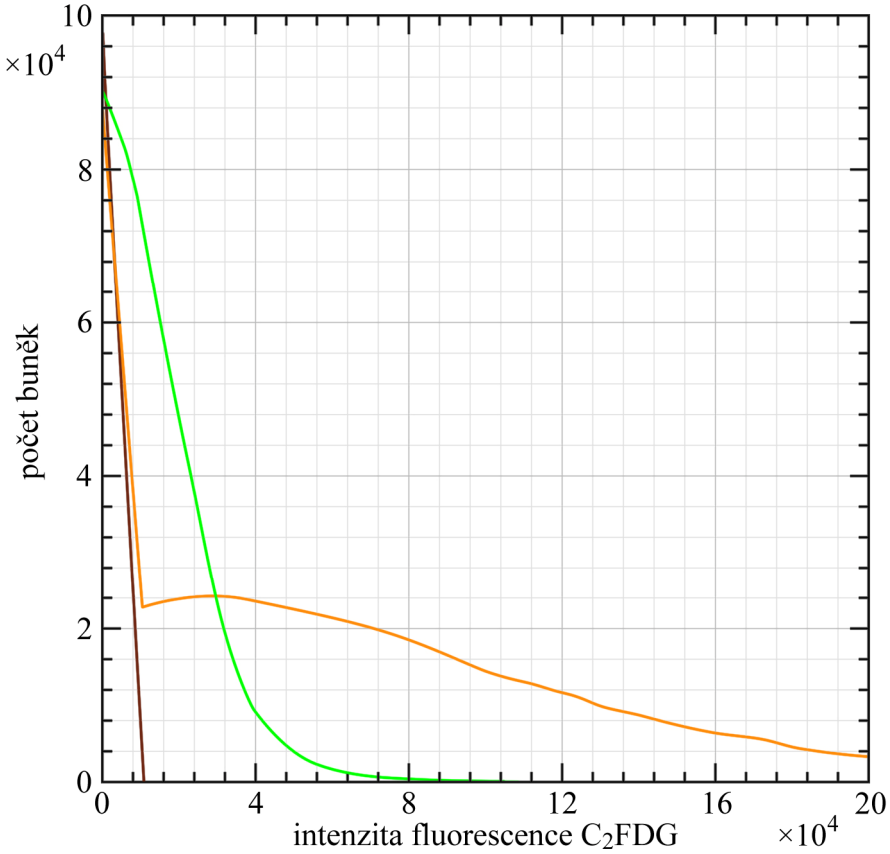
Teplota 37 ºC sloužila jako kontrola – v této kultivační teplotě buňky *Bacillus subtilis* přirozeně produkují velmi málo β-galaktosidázy v exponenciální fázi, na rozdíl od stacionární fáze, kdy již k jisté produkci dochází. Nejprve bylo nutno ověřit, jestli lze sondou C2FDG rozlišit jednotlivé frakce buněk, které jsou fyziologicky odlišné. Proto byly sondou C_2FDG označovaly buňky stacionární a exponenciální (pokus byl proveden v 37 ºC). Předpokládaný výsledek je zobrazen na obrázku (viz Obrázek 25) – stacionární buňky by měly vykazovat nižší intenzitu fluorescence sondy C_2FDG, protože jsou menší (viz kapitola 2.2.1) a vzhledem k menší velikosti membrány syntetizují méně desaturázy oproti buňkám v exponenciální fázi.



Obrázek 25 Předpokládaná závislost počtu buněk na intenzitě fluorescence sondy C_2FDG. Uvedené škály obou os jsou relativní. ■ = stacionární buňky, ■ = exponenciální buňky. Exponenciální buňky by měly mít vyšší intenzitu fluorescence než buňky stacionární, které jsou menší, mají tedy menší velikost membrány a syntetizují méně desaturázy.

Tento předpoklad však nebyl potvrzen (viz Graf 23). Ukázalo se, stacionární buňky vykazují vyšší intenzitu fluorescence C_2FDG než exponenciální buňky. Tento experiment vypovídá o rozmanitosti buněk v populaci během stacionární fáze – existuje mnoho frakcí buněk, které syntetizují různá množství enzymu β-galaktosidázy. To však může být

způsobeno tím, že některé buňky jsou větší a jiné menší – mají tedy různě velikou membránu a úměrně tomu různou syntézu desaturázy (resp. aktivitu β-galaktosidázy). Exponenciální buňky vykazují nižší intenzitu fluorescence C_2FDG u velké frakce buněk, zatímco stacionární buňky vykazují vyšší intenzitu fluorescence C_2FDG u mnoha různě početných subpopulací buněk.

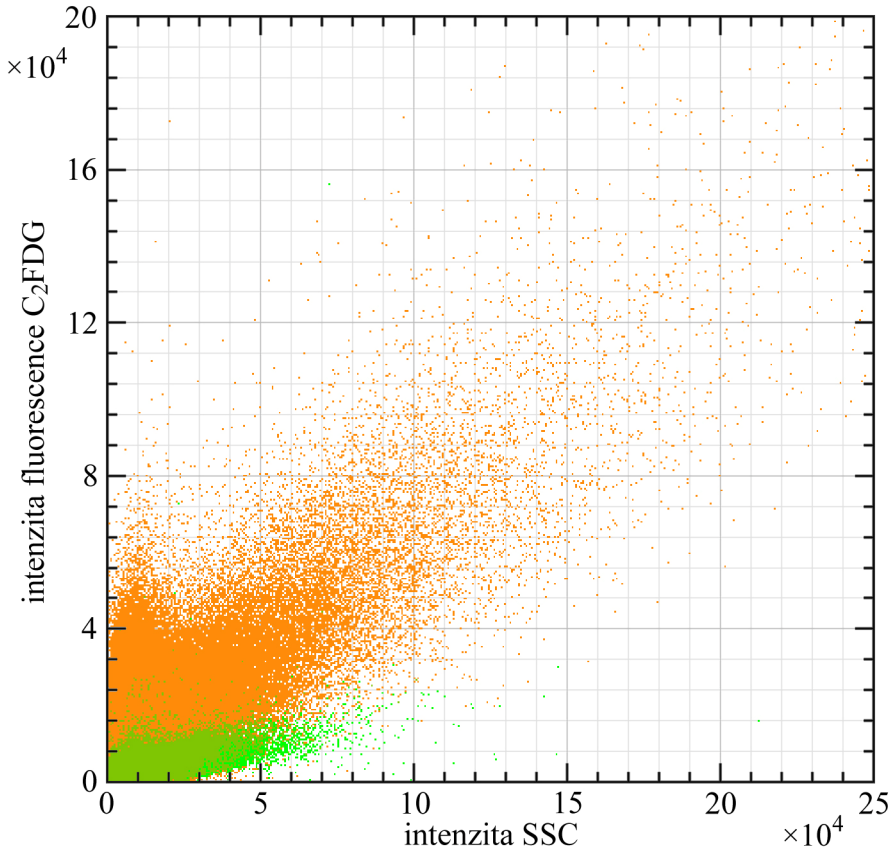


Graf 23 Intenzita fluorescence u exponenciálních a stacionárních buněk. Barevně jsou odlišeny jednotlivé populace buněk. ■ = stacionární buňky, ■ = exponenciální buňky, ■ = pozadí (kontaminace a mrtvé buňky). Stacionární buňky vykazují vyšší intenzitu fluorescence než exponenciální buňky.

Pro ověření výše zmíněné domněnky, byl proveden pokus, kdy byla použita i sonda TMA-DPH, která se váže na bakteriální membránu. Bylo ověřeno, že intenzita fluorescence TMA-DPH je přímo úměrná SSC (bočný rozptyl, anglicky „side scatter“) a vypovídá tedy o velikosti buňky (data nejsou zobrazena). Pokus s použitím obou fluorescenčních sond byl proveden v 25 ºC, jelikož při této teplotě dochází k větší indukci β-galaktosidázy. Vzhledem k době nutné pro značení kultury sondou C_2FDG (2 hodiny) je výhodné použít buňky z této

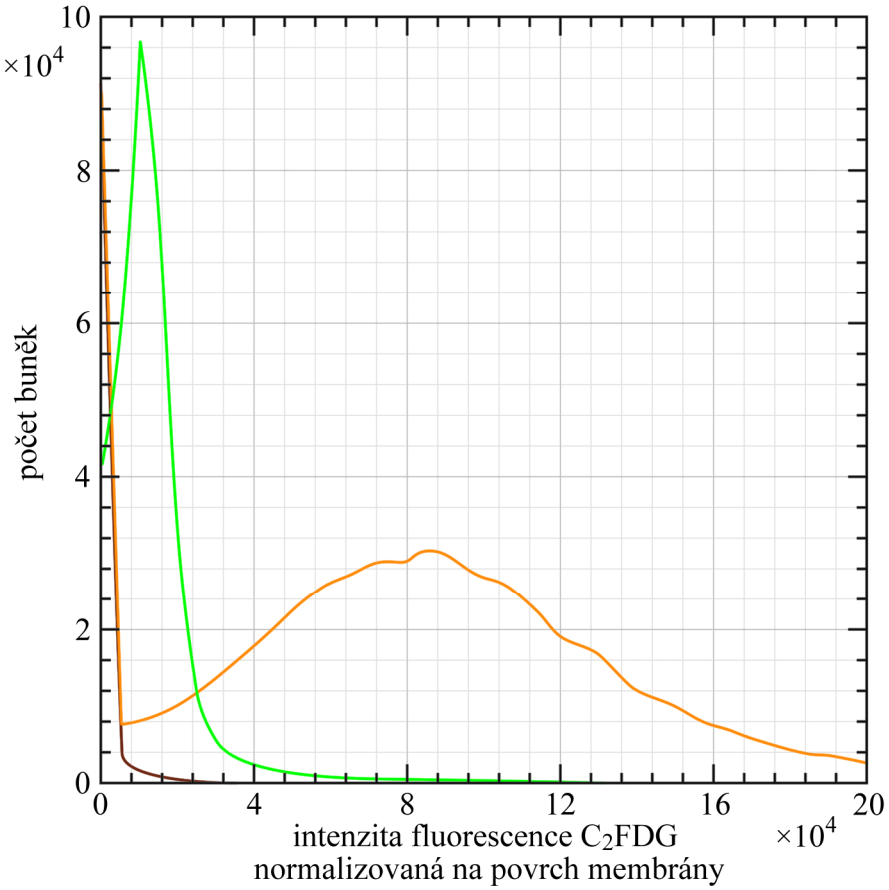
kultivační teploty, kdy buňky v exponenciální fáze zůstávají déle (kvůli delší době zdvojení), než při použití buněk z kultivační teploty 37 ºC.

Závislost intenzity fluorescence C2FDG na SSC je zobrazena na následujícím grafu (viz Graf 24). Intenzita fluorescence C_2FDG je přímo úměrná aktivitě β-galaktosidázy. Intenzita fluorescence TMA-DPH vypovídá o velikosti membrány a tím i velikosti buňky. Zároveň bylo zjištěno, že část buněk stacionární fáze je menší než buňky exponenciální (což odpovídá údajům z literatury), ale rozhodně nejde o frakci výrazně převládající.



Graf 24 Závislost intenzity fluorescence na SSC (bočný rozptyl). Barevně jsou odlišeny jednotlivé populace buněk. ■ = stacionární buňky, ■ = exponenciální buňky, ■ = překryv buněk. Buňky stacionární fáze se lépe značí sondou C_2FDG než buňky exponenciální a jsou rozmanitější tvarem a velikostí.

V dalším pokusu provedeném v 25 ºC bylo třeba zjistit, jaká je aktivita β-galaktosidázy, pokud ji normalizujeme na povrch membrány jednotlivých buněk. Takto vzniklým grafickým vynesením můžeme srovnávat intenzitu fluorescence C_2FDG nezávisle na velikosti buňky. Výsledky jsou shrnuty v Grafu 25.



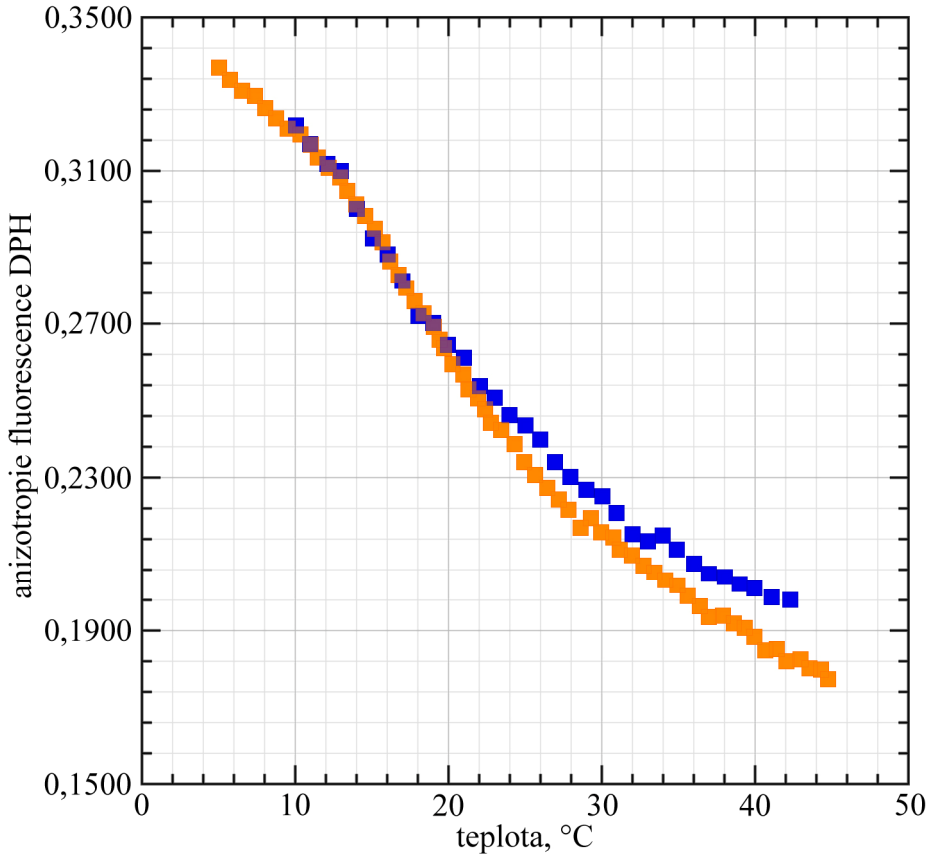
Graf 25 Intenzita fluorescence C_2FDG u exponenciálních a stacionárních buněk korigovaná dle povrchu membrány. Barevně jsou odlišeny jednotlivé populace buněk. ■ = stacionární buňky, ■ = exponenciální buňky, ■ = pozadí (kontaminace a mrtvé buňky).

Z grafu je zřejmé, že ani po korekci na plochu membrány nevykazuje intenzita fluorescence C_2FDG ve vzorku stacionárních buněk jasný trend, který by umožnil určit frakce buněk, které rozdílně syntetizují β-galaktosidázu. Celkově platí, že u exponenciálních buněk je nižší intenzita fluorescence normalizovaná na povrch membrány a zároveň užší distribuce výsledných hodnot. Jelikož buňky v 25 ºC během exponenciální fáze odpovídají vyšší indukcí β-galaktosidázy, měly by vykazovat i vyšší intenzitu fluorescence. Tento jev může být vysvětlen horší barvitelností buněk exponenciální fáze či unikáním sondy z buňky do prostředí. Výsledky získané pomocí průtokové cytometrie prokázaly, že populace stacionárních buněk je velmi heterogenní – což znemožňuje odlišit jednotlivé frakce buněk na základě jejich velikosti a jim příslušející syntézy β-galaktosidázy.

4.6. Měření anizotropie fluorescence DPH

Další metodou pro zjištění fluidity cytoplazmatické membrány je měření anizotropie. Fyzikální stav bakteriální membrány u *Bacillus subtilis AKP 3* byl sledován pomocí měření anizotropie fluorescence sondy DPH (viz kapitola 3.13.2.). Byla změřena anizotropie vzorků bakteriálních membrán odebraných během páté hodiny po začátku stacionární fáze. Kultivace *Bacillus subtilis AKP 3* probíhala při 37 ºC. Vzorek izolovaných membrán (viz kapitola 3.13.2) v pufru byl vytemperován na 40 ºC a pomalu ochlazován na 10 ºC, přitom byla měřena anizotropie. Výsledky byly porovnány s anizotropií naměřenou u vzorků z exponenciální fáze, kde byly vzorky až na přítomnost glukózy v kultivačním mediu připravovány analogicky (BERANOVA *et al.* 2010). Přítomnost glukózy v kultivačním mediu by v případě kultivace buněk stacionární fáze neměla mít zásadní vliv – odlišnost obou experimentů byla proto zanedbána. Výsledky teplotní závislost anizotropie fluorescence DPH jsou shrnuty v grafu (viz Graf 26).

Z grafu vyplývá, že se anizotropie obou zkoumaných typů membrán se liší – při teplotě 40 ºC dosahuje anizotropie fluorescence DPH hodnot 0,1883 pro membrány exponenciálních buněk a 0,2016 pro membrány buněk stacionárních. Z toho lze usuzovat na ztrátu fluidity membrány po nástupu do stacionární fáze. Při teplotě měření zhruba pod 18 ºC dosahují oba typy membrán téměř stejné anizotropie.

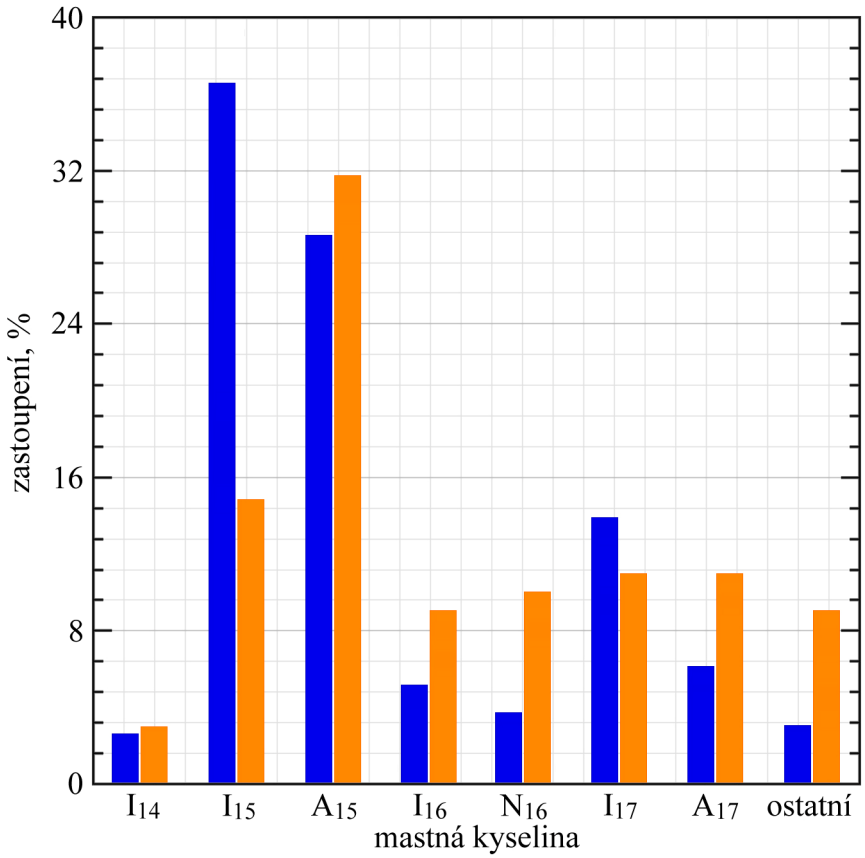


Graf 26 Anizotropie fluorescence DPH pro membrány buněk kmene *AKP 3* izolované za stálé kultivační teploty 37 ºC. Vzorky membrán byly pomalu ochlazovány ze 40 ºC na 10 ºC a paralelně s tímto ochlazováním byla měřena anizotropie. ■ = exponenciální buňky, data převzata z literatury (BERANOVA *et al.* 2010), ■ = stacionární buňky.

4.7. Analýza mastných kyselin

Výsledky anizotropie ukázaly, že jsou fyzikální vlastnosti membrán exponenciálních a stacionárních buněk podobné. Konkrétní informaci o složení membrány poskytuje analýza mastných kyselin – cílem analýzy bylo zjistit složení membránových lipidů stacionární fáze u kmene *AKP 3*.

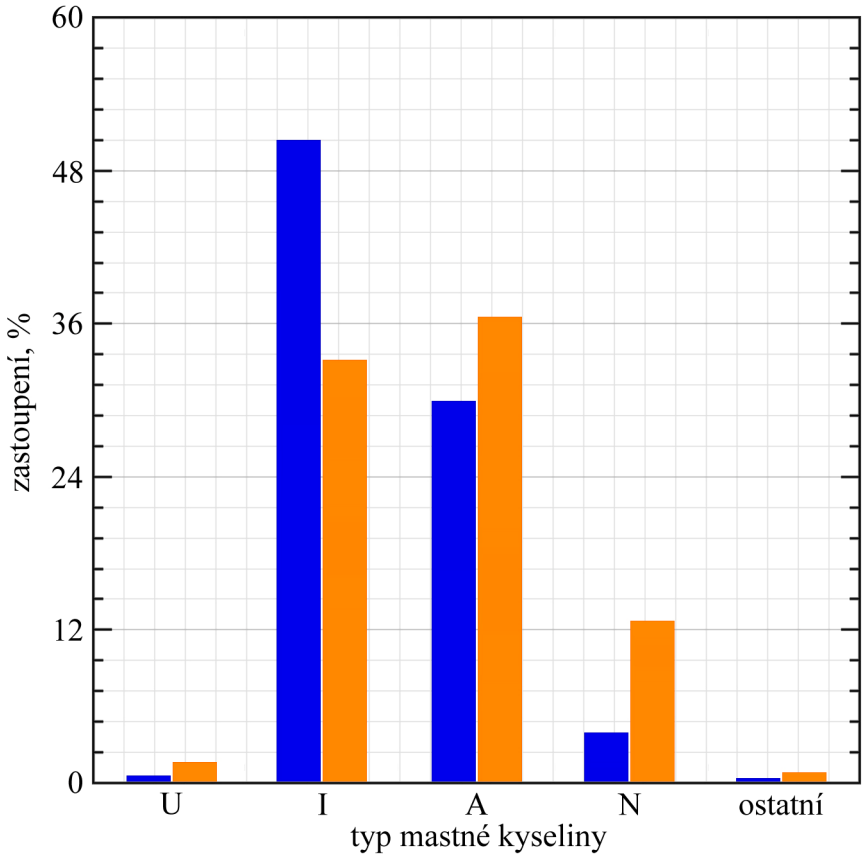
Izolované membránové lipidy byly analyzovány podle protokolu Identification Bacteria Gas Liquid Chromatography (viz kapitola 3.14.1.). Složení mastných kyselin bylo zjišťováno u vzorků kmene *AKP 3* kultivovaných při 37 ºC, 5 hodin po začátku stacionární fáze. Procentuální zastoupení konkrétních mastných kyselin (viz Graf 27) a procentuální zastoupení různých typů mastných kyselin (viz Graf 28) je zobrazeno níže.



Graf 27 Srovnání procentuálního zastoupení jednotlivých mastných kyselin v membráně *Bacillus subtilis AKP 3* kultivovaného při teplotě 37 °C. ■ = vzorky z páté hodiny od počátku stacionární fáze, ■ = vzorky z exponenciální fáze, data převzata z literatury (BERANOVA *et al.* 2010). Symboly označují typ mastné kyseliny (I = iso- větvená, A = anteiso- větvená a N = nevětvená). Indexy pak označují délku hlavního uhlíkatého řetězce hydrofobní části mastné kyseliny. Z analýzy vyplývá, že nejvíce jsou zastoupeny iso- a anteiso- větvené mastné kyseliny s 15 atomy uhlíku.

Z analýzy mastných kyselin vyplývá, že zastoupení nenasycených mastných kyselin ve vzorku je nižší než jsme očekávali. Při porovnání složení membrán stacionárních buněk s buňkami exponenciálními (BERANOVA *et al.* 2010) bylo zjištěno, že mastné kyseliny ve fosfolipidech stacionárních buněk jsou méně rozmanité než mastné kyseliny ve fosfolipidech buněk exponenciálních. Podíl nenasycených mastných kyselin je u membrán stacionárních buněk nižší než u membrán buněk exponenciálních. Na složení fosfolipidů mají majoritní podíl mastné kyseliny iso- a anteiso- s patnácti atomy uhlíku. Ve složení fosfolipidů exponenciálních buněk mírně převládá podíl anteiso- větvených mastných kyselin nad iso- větvenými (BERANOVA *et al.* 2010). Oproti tomu ve fosfolipidech

izolovaných ze stacionární fáze výrazně převládá zastoupení iso- větvených mastných kyselin (viz Graf 27). Složení mastných kyselin v membránách tedy dobře koreluje s výsledky anizotropie – membrána stacionárních buněk kultivovaných při 37 °C je přirozeně méně fluidní než membrána exponenciálních buněk.



Graf 28 Srovnání procentuálního zastoupení jednotlivých typů mastných kyselin v membráně *Bacillus subtilis AKP 3* v páté hodině po začátku stacionární fáze a během exponenciální fáze při kultivační teplotě 37 °C. ■ = vzorky z páté hodiny od počátku stacionární fáze, ■ = vzorky z exponenciální fáze, data převzata z literatury (BERANOVA *et al.* 2010). Symboly označují typ mastné kyseliny (U = nenasycená, I = iso- větvená, A = anteiso- větvená a N = nevětvená). Z analýzy vyplývá, že v membráně stacionárních buněk jsou nejvíce zastoupeny iso- větvené mastné kyseliny.

5. Diskuze

Tato práce se zabývala chladovým stresem ve stacionární fázi a odpovědí na něj u bakteriální buňky *Bacillus subtilis*. Byl sledován fyzikální stav cytoplazmatické membrány a její chladové adaptace pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod. Nejprve bylo nutno zjistit závislost podílu spor a mrtvých buněk na kultivačním době během stacionární fáze – informace o podílu těchto buněk je nezbytná pro podrobnější zkoumání chladového šoku v populaci stacionárních buněk.

Teplota prostředí je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují život bakteriální buňky. Snížení teploty ovlivňuje řadu metabolických procesů uvnitř buňky i procesy vázané na membránu. Vlivem nízké teploty dochází k snížení fluidity membrány. Bakteriální buňky jsou schopny se s touto změnou vyrovnat díky adaptačním mechanismům, které jim umožňují regulovat fluiditu membrán. V případě snížení teploty dochází ke zvyšování obsahu těch typů mastných kyselin, které navrací membráně potřebnou fluiditu.

V této práci byly bakterie *Bacillus subtilis* kultivovány na komplexním mediu při stálé teplotě (37 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C a 15°C) a také při náhlé změně teploty během stacionární fáze (z 37 °C na 25°C, 20 °C a 15 °C). Byla zjišťována aktivita promotoru genu *des* (jehož transkripcí vzniká enzym desaturáza mastných kyselin) ve stacionární fázi při působení nízkých teplot. Tato aktivita ukazuje, jak dalece bakterie registruje změnu fluidity membrány, a jak na ni reaguje tvorbou nenasycených mastných kyselin desaturací nasycených.

Jelikož jsou bakterie rodu *Bacillus* schopny tvořit endospory, bylo nutné zjistit, podíl endospor během stacionární fáze. To bylo zjišťováno určením podílu spor v dané populaci. Pomocí komerční soupravy Live/Dead Kit bylo dále zjišťováno, jaké procento buněk kultury je živé (metabolicky aktivní).

Zároveň byl brán v úvahu fakt, že vegetativní buňky ve stacionární fázi nejsou z metabolického hlediska homogenní směsí buněk. Pomocí metody průtokové cytometrie bylo zkoumáno, zda se bakteriální kultura ve stacionární fázi rozděluje na frakce buněk, a jak jsou tyto frakce z hlediska tvorby enzymu desaturázy odlišné.

Byla provedena měření anizotropie cytoplazmatické membrány při kultivaci stacionárních buněk při 37 °C a bylo zjištěno složení mastných kyselin v membráně buňky také při kultivaci stacionárních buněk při 37 °C.

Podíl spor během stacionární fáze

Jedním z primárních cílů této práce bylo určit podíl spor v bakteriální kultuře ve stacionární fázi při kultivační teplotě 37 ºC. Za tímto účelem byly použity tři různé metody – výsev na pevnou agarovou plotnu, metoda založená na měření fosforescence komplexu TbDPA a odečítání podílu spor na barveném fixovaném preparátu.

První zmíněná metoda (výsev buněk na agarovou plotnu) předpokládá, že působením teploty 80 ºC na směs vegetativních buněk a spor dojde k usmrcení všech vegetativních buněk (přežijí jen spory). Pokus byl proveden několikrát – první provedení ukázalo, že podíl spor je relativně nízký (přibližně 10 %) do desáté hodiny od počátku stacionární fáze (viz Graf 4). Další provedení pokusu však tento prvotní závěr nepotvrdila (viz Graf 5). Nekonzistentní výsledky jsou pravděpodobně důsledkem mnohonásobného míchání při ředění vzorků (stejný efekt pozorovala i G. Seydlová, osobní sdělení). Vegetativní buňky pravděpodobně nesnesou opakované míchání a umírají, čímž se snižuje počet kolonií, které vyrostou z vegetativních buněk na kontrolní plotně. Následně vypočítaný podíl spor je tedy kvůli tomuto efektu navýšen. Vzhledem k nepřesvědčivým závěrům z této metody, byla pro zjištění podílu spor navržena další metoda.

Ionty Tb^{3+} mají schopnost tvořit komplex s DPA, která je hojně zastoupena v bakteriálních endosporách. Fosforescence takto vzniklého komplexu je měřitelná na fluorometru. Pokud zkoumáme směsnou kulturu (obsahující vegetativní buňky i bakteriální endospory), můžeme po uvolnění DPA ze spor a jejím následném navázání na Tb^{3+} zjistit zastoupení DPA ve směsi (a tedy podíl spor, který směs obsahovala). Předpoklad, že intenzita fosforescence bude vyšší u vzorků, které obsahují převážně spory, se v námi provedených experimentech nepotvrdil. Fosforescence vzorku vegetativních buněk (viz Graf 6) výrazně převyšovala signál ostatních vzorků. Ionty Tb^{3+} se mohou vázat i do jiných struktur (zejména proteinů) a fosforescence takto vzniklých komplexů je zřejmě výrazně vyšší než fosforescence komplexu TbDPA. Zjištěný rozdíl lze nejpravděpodobněji vysvětlit i nedostatečným uvolněním DPA ze spor. Průběžně měřená OD (po indukci klíčení spor DL-α-alaninem) neklesala, jakkoli je tento postup ověřen v literatuře (PELLEGRINO *et al.* 1998). Použití této metody za zvolených podmínek tedy nebylo zvládnuto a nevedlo k určení podílu spor během stacionárni fáze.

Třetí a nejjednodušší metodou použitou pro určení podílu spor bylo barvení fixních preparátů. Bylo použito barvení dle Grama. Při použití tohoto typu barvení jsou v kultuře *Bacillus subtilis* obarveny vegetativní buňky a předspory, nikoli spory samotné, které jsou vůči barvivu inertní. Sledováním preparátů během stacionární fáze bylo zjištěno, že podíl spor v kultuře se pohybuje kolem 10 – 15 % do desáté hodiny kultivace (viz Graf 7). Tento

výsledek je vyšší, než údaje získané z literatury, kde za srovnatelných kultivačních podmínek (medium, teplota kultivace) byl pozorován podíl spor ve stacionární fázi nižší než 1 % (AGUILAR *et al*. 1998).

Vzhledem k získaným závěrům byly další pokusy situovány do časového intervalu mezi počátkem stacionární fáze a desátou hodinu stacionární fáze.

Podíl živých a mrtvých buněk během stacionární fáze

Bakteriální kultura ve stacionární fázi obsahuje kromě spor i mrtvé buňky, jejichž kvantifikace je také nezbytně nutná pro podrobnější zkoumání fyziologie buněk ve stacionární fázi. Podíl živých buněk během stacionární fáze byl určen pomocí komerční soupravy Live/Dead Kit. Bylo zjištěno, že tento podíl během prvních deseti hodin stacionární fáze je přibližně 55 %. Je třeba brát v úvahu, že pomocí soupravy Live/Dead Kit lze rozeznat pouze živé a mrtvé buňky, nikoli však endospory, které kultura během stacionární fáze také obsahuje. Ze závěrů z předchozích pokusů vyplývá, že podíl spor v kultuře stacionární fáze do desáté hodiny od jejího počátku činí přibližně 10 %. Z kombinace výše uvedených výsledků (získaných z metod barvení fixních preparátu dle Grama a z použití soupravy Live/Dead Kit) vyplývá, že metabolicky aktivní je v průběhu prvních deseti hodin stacionární fáze jen přibližně 45 % biomasy přítomné v bakteriální kultuře. Veškeré získané údaje o metabolismu v dalších experimentech jsou tedy projevem frakce buněk, která není ve stacionární kultuře majoritní.

Aktivita promotoru genu *des* při stálé kultivační teplotě

Senzor membránové fluidity DesK vnímá změny fluidity membrány – snížení membránové fluidity v buňce indukuje syntézu desaturázy mastných kyselin (kódovanou genem *des*). Aktivitu *Pdes* lze u kmene *AKP 3* sledovat pomocí reportérového genu *lacZ*, jehož přepisem vzniká enzym β-galaktosidáza – naměřená aktivita β-galaktosidázy pak vypovídá o tom, jakou fluiditu vnímá senzor v membráně DesK. Méně fluidní membrána má za následek aktivaci signální dráhy vedoucí od DesK a důsledkem je zvýšení aktivity *Pdes*. Aktivita β-galaktosidázy při kultivaci ve stálé teplotě představuje aktivitu nezávislou na chladovém šoku. Znalost hodnoty této aktivity je užitečná pro další experimenty, ve kterých je kultura stacionární fáze vystavena chladovému šoku – umožňuje kvalitativně zhodnotit působení chladového šoku; zda po chladovém šoku nedochází k vyrovnání aktivity β-galaktosidázy na úroveň typickou pro stálou kultivační teplotu. Výsledky dokládají (viz Graf 19), že nejnižší aktivitu β-galaktosidázy ze zkoumaných vzorků vykazují buňky pěstované při 37 ºC. Nejvyšší aktivity dosahují vzorky buněk kultivovaných při 25 ºC

(nárůst hodnoty aktivity oproti 37 °C je 140 MU). Tato kultivační teplota je pravděpodobně dostatečně nízká na to, aby docházelo k výrazné aktivaci signální dráhy vedoucí od DesK, a zároveň není nízká natolik, aby výrazně omezovala metabolické pochody v bakteriální buňce. Ještě nižší aktivitu β-galaktosidázy vykazují vzorky kultivované při 20 °C (nárůst hodnot aktivity oproti 37 °C je 120 MU) a při 15 °C (nárůst hodnot aktivity oproti 37 °C je 100 MU). Přestože jsou tyto teploty nižší (a buňky by tedy měly více indukovat signální dráhu vedoucí k syntéze desaturázy), pravděpodobně jsou nízké natolik, že omezují fyziologickou kapacitu buněk a k indukci β-galaktosidázy dochází jen v malé míře. Hladinu tohoto enzymu v buňce při teplotě 30 °C (nárůst hodnot aktivity oproti 37 °C je 80 MU) lze vysvětlit dostatečnou adaptací fluidity membrány (ve srovnání s teplotami 25 °C, 20 °C a 15 °C).

Byl zjišťován podíl živých buněk v populaci stacionární fáze. Výsledky ukázaly, že jen přibližně 45 % buněk v této fázi je živých a tím i metabolicky aktivních. Získané hodnoty aktivity β-galaktosidázy jsou tedy vyšší, pokud ji vztáhneme jen na metabolizující frakci buněk. Přesto po všech provedených korekcích dojdeme k závěru, že aktivita β-galaktosidázy během stacionární fáze je nižší než během exponenciální (s výjimkou kultivace při 30 °C).

Při všech zkoumaných kultivačních teplotách dochází k poklesu aktivity β-galaktosidázy v čase. Tento pokles má přibližně stejnou směrnici u všech teplot (kromě kultivace při 15 °C). Jiná směrnice u poklesu aktivity při 15 °C nebyla spolehlivě vysvětlena. Jedním z efektů, které mohou hrát roli je dlouhá doba zdvojení bakteriální populace při této teplotě – při prodloužení experimentu by možná došlo ke zřetelnějšímu poklesu aktivity.

Zároveň byla zjištěna hladina vnitřní β-galaktosidázy, nezávislá na inzerci *LacZ* za promotor *des* (viz kapitola 3.1.). Hladina tohoto enzymu v buňce stoupá s postupující stacionární fází (viz Graf 20) až na hodnotu přibližně 18 MU v desáté hodině po začátku stacionární fáze. Ve srovnání s kultivací při stálé teplotě v exponenciální fázi (SCHROMMOVA 2008) je aktivita β-galaktosidázy u buněk ve stacionární fázi nižší (s výjimkou aktivity při 30 °C, která je překvapivě vyšší). Pokles aktivity může být uspokojivě vysvětlen tím, že při nižších teplotách je metabolismus buněk stacionární fáze omezen natolik, že k vyšší syntéze enzymu desaturázy nedochází. Dalším možným vysvětlením nárůstu aktivity v 30 °C ve stacionární fázi oproti exponenciální může být efekt dlouhodobé adaptace, kdy se v buněčné membráně zvyšuje podíl anteiso- větvených mastných kyselin, které také fluidizují membránu. Oproti tomu nárůst aktivity enzymu při 30 °C oproti kultivaci během exponenciální fáze lze vysvětlit obtížně – je však možné, že během kultivace ve stacionární fázi při této teplotě je již fluidita membrány vnímána buňkou jako nedostatečná a dochází k transkripci z *Pdes*.

Aktivita promotoru genu *des* po náhlém snížení kultivační teploty

Hlavním cílem této práce bylo zjistit aktivitu *Pdes* po teplotním šoku provedeném 5 hodin po začátku stacionární fáze a srovnat tyto výsledky s výsledky získanými z exponenciální fáze. Za tímto účelem byly kultury *AKP 3* pěstované při 37 °C přeneseny do nižších kultivačních teplot (25 °C, 20 °C a 15 °C). Výsledky jsou shrnuty v Grafu 20. Bylo zjištěno, že přenos bakteriální kultury z kultivační teploty 37 °C do nižších teplot vede, v závislosti na velikosti teplotní změny, ke zvýšení aktivity β-galaktosidázy, což je v souladu s dříve publikovanými daty (CYBULSKI *et al.* 2002). Nejvýraznější nárůst aktivity byl pozorován po přenosu kultury do 25 °C (nárůst oproti aktivitě při 37 °C odpovídá 65 MU). Při větším teplotním skoku dochází k menší aktivaci *Pdes*, jelikož buňka nemá dostatečnou metabolickou kapacitu pro výraznější transkripci z *Pdes*.

Nárůst β-galaktosidázy aktivit byl nejprve porovnán s aktivitou během kultivace ve stálé teplotě (teplotě, do které byla kultura přenesena z 37 °C). Bylo ověřeno, že nedochází k „dorovnání hladin“ aktivity β-galaktosidázy na hodnotu, která je typická pro danou kultivační teplotu. Aktivita po šoku je navíc přibližně o polovinu nižší, než během kultivace v neměnné teplotě.

Nárůsty aktivit po chladovém šoku byly srovnány s pokusem provedeným v exponenciální fázi, kde byl zaznamenán nárůst v řádech stovek MU (přibližně 300 MU, viz Graf 14). V případě stacionární fáze byly zaznamenány nárůsty aktivit oproti běžné hladině β-galaktosidázy v buňkách kultivovaných při 37 °C o 65 MU (změna teploty na 25 °C), 48 MU (změna teploty na 20 °C) a 26 MU (změna teploty na 15 °C). Porovnáním získaných údajů s výsledky dostupnými v literatuře (SCHROMMOVA 2008) bylo zjištěno, že nárůst ve stacionární fázi při přenosu do 25 °C je 7 × nižší, při přenosu do 20 °C je 6 × nižší a při přenosu do 15 °C je 2 × nižší než u buněk exponenciální fáze. Bakteriální buňky ve stacionární fázi jsou tedy od buněk exponenciálních výrazně metabolicky odlišné. V úvahu opět přichází zjištění, že jen 45 % biomasy jsou metabolicky aktivní buňky. Získané údaje o aktivitě β-galaktosidázy mohou být tedy podhodnocené a aktivita přepočtená na aktivní biomasu by byla vyšší. Přesto po všech provedených korekcích je aktivita β-galaktosidázy po chladovém šoku během stacionární fáze obecně nižší než při srovnatelném pokusu s buňkami exponenciální fáze.

Nárůst aktivity β-galaktosidázy po přenosu kultury z 37 °C do 25 °C ustává po dvou hodinách od provedení chladového šoku. Je to způsobeno tím, že bakteriální buňky nejsou schopny vyšší transkripce z *Pdes* kvůli narušení fyziologie chladovým šokem, což bylo ověřeno dalším pokusem. Kromě kmene *AKP3* (*JH642 amyE*::*Pdes-lacZ*) byly použity i další

dva bakteriální kmeny odvozené od *Bacillus subtilis JH 642* – kmeny *AKP4* (*JH642 des*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ*) a *AKP21* (*JH642 desKR*::*Km*^{r} *amyE*::*Pdes-lacZ*).

K indukci β-galaktosidázy 5 hodin po začátku stacionární fáze při teplotě 37 ºC a při šoku z 37 ºC do 25 ºC u *AKP 21* (nemá DesK/DesR) nedochází (viz Graf 21). Zaznamenaná indukce odpovídá pravděpodobně vnitřní β-galaktosidáze, nezávislé na DesK/DesR. Nízká aktivita enzymu u kmene *AKP 21* po přenosu do nižší kultivační teploty nebyla spolehlivě vysvětlena. K indukci u *AKP 4* (nemá funkční gen *des*) dochází jen při šoku z 37 ºC do 25 ºC. Aktivita β-galaktosidázy při přenosu z 37 ºC do 25 ºC je srovnatelná pro kmeny *AKP 3* a *AKP 4*. Protože kmen *AKP 4* nemá funkční desaturázu, nedochází k fluidizaci membrány a senzor DesK stále registruje rigidní membránu. Aktivita β-galaktosidázy u kmene *AKP 3* tedy ustává přibližně po 3 hodinách od provedení chladového šoku kvůli omezeným metabolickým schopnostem buňky a nikoli kvůli dostatečné fluidizaci membrány.

Rozdílnost populací buněk v kultuře stacionární fáze

Bakteriální kultura ve stacionární fázi obsahuje tři frakce buněk – vegetativní buňky, mrtvé buňky a endospory. Veškerá naměřená aktivita β-galaktosidázy, která byla naměřena v pokusech provedených během stacionární fáze, byla tedy syntetizována frakcí vegetativních buněk. Naměřená aktivita je relativně nízká, což může být způsobeno buďto nízkou aktivitou *Pdes* u všech buněk během stacionární fáze, nebo vysokou aktivitou u jedné frakce buněk (která odpovídá na chladový stres stejně jako buňky exponenciální) a nízkou aktivitou u druhé frakce (která neodpovídá na chladový stres například z důvodu velkého poškození nízkou teplotou). K rozlišení těchto možných populací buněk byla použita metoda průtokové cytometrie. Cílem bylo zřetelně odlišit jednotlivé frakce dle produkce β-galaktosidázy.

Pokusy byly prováděny s kmenem *Bacillus subtilis AKP 3* ve dvou kultivačních teplotách (25 ºC a 37 ºC) a použity byly fluorescenční sondy C_2FDG a TMA-DPH. Sonda C_2FDG je štěpena enzymem β-galaktosidázou za vzniku fluorescenčního produktu, umožňuje tedy odlišení populace buněk, které syntetizují β-galaktosidázu. Sonda TMA-DPH sloužila k označení membrány buněk a umožnila určit přibližnou velikost buněk.

Oproti očekávání bylo zjištěno, že stacionární buňky vykazují vyšší intenzitu fluorescence než exponenciální buňky. Zároveň experiment potvrdil rozmanitost buněk během stacionární fáze – existuje mnoho frakcí buněk, které jsou rozdílné velikostí a které syntetizují různá množství enzymu β-galaktosidázy. Pouze část buněk je nepochybně menší než buňky exponenciální, některé buňky jsou větší a mají tedy větší povrch membrány

a úměrně tomu větší syntézu desaturázy (resp. aktivitu β-galaktosidázy). Buňky exponenciální fáze jsou obtížněji značitelné sondou C_2FDG než buňky stacionární. Byl proveden pokus, který odhalil příčinu tohoto jevu – v případě buněk stacionární fáze uniká významná část fluorescenční sondy do media (data nejsou zobrazena).

Dalším pokusem provedeným v 25 ºC bylo zjištěno, jaká je aktivita enzymu β-galaktosidázy přepočtená na jednotku plochy bakteriální membrány. Bylo zjištěno, že ani po korekci na plochu membrány nevykazuje intenzita fluorescence C_2FDG ve vzorku stacionárních buněk jasný trend, který by umožnil rozlišit frakce buněk, které rozdílně syntetizují β-galaktosidázu. Nebyly nalezeny optimální podmínky experimentu, při kterých by bylo možno zřetelně odlišit frakce buněk dle hladiny syntetizované β-galaktosidázy. Výsledky získané pomocí průtokové cytometrie tedy prokázaly, že populace stacionárních buněk je natolik heterogenní, že znemožňuje kvantifikaci poznatků.

Fyzikální stav cytoplazmatické membrány a složení mastných kyselin v jejích fosfolipidech

Fyzikální stav bakteriální membrány u *Bacillus subtilis AKP 3* byl sledován pomocí měření anizotropie fluorescence sondy DPH. Byla změřena anizotropie vzorků bakteriálních membrán z buněčné kultury pěstované při 37 ºC odebraných během páté hodiny po začátku stacionární fáze. Výsledky byly porovnány s anizotropií naměřenou u vzorků z exponenciální fáze (BERANOVA *et al.* 2010). Anizotropie obou zkoumaných vzorků membrán jsou mírně odlišné (viz Graf 26). Při teplotě 40 ºC dosahuje anizotropie fluorescence DPH měřených vzorků pro membrány exponenciálních buněk hodnoty 0,1883 a pro membrány buněk stacionárních hodnoty 0,2016. Vyšší hodnota anizotropie vypovídá o nižší fluiditě membrány. Ze získaných údajů lze usuzovat na ztrátu fluidity membrány s nástupem stacionární fáze.

Výsledky anizotropie ukázaly podobnost fyzikálních vlastností membrán exponenciálních a stacionárních buněk. Konkrétní informaci o složení membrány poskytla analýza mastných kyselin. Složení mastných kyselin bylo zjišťováno u vzorků kmene *AKP 3* kultivovaných při 37 ºC, pět hodin po začátku stacionární fáze.

Z analýzy vyplývá, že v membráně stacionárních buněk jsou pět hodin po začátku stacionární fáze nejvíce zastoupeny iso- větvené mastné kyseliny. Při porovnání složení membrán stacionárních buněk s buňkami exponenciálními (BERANOVA *et al.* 2010) bylo zjištěno, že podíl nenasycených mastných kyselin je u membrán stacionárních buněk nižší než u membrán buněk exponenciálních (viz Graf 27). Na složení fosfolipidů mají majoritní podíl mastné kyseliny iso- a anteiso- s patnácti atomy uhlíku. Podíl nenasycených mastných

kyselin je u membrán stacionárních buněk nižší než u membrán buněk exponenciálních. Nenasycené mastné kyseliny vznikají v membráně buněk výhradně aerobní desaturací, pro jejich tvorbu musí mít bakteriální buňka nutně funkční elektrontransportní řetězec (DENICH *et al.* 2003). S postupující stacionární fází se však snižuje dostupnost kyslíku a nezanedbatelná frakce buněk přežívá v téměř anaerobních podmínkách – tyto buňky nejsou schopny tvořit nenasycené mastné kyseliny. Ve složení fosfolipidů exponenciálních buněk mírně převládá podíl anteiso- větvených mastných kyselin nad iso- větvenými (BERANOVA *et al.* 2010). Oproti tomu ve fosfolipidech izolovaných ze stacionární fáze výrazně převládá zastoupení iso- větvených mastných kyselin (viz Graf 27).

Složení mastných kyselin v membránách tedy dobře koreluje s výsledky anizotropie – membrána stacionárních buněk kultivovaných při 37 °C je méně fluidní než membrána exponenciálních buněk.

6. Souhrn

U bakterie *Bacillus subtilis* byla sledována chladová adaptace během stacionární fáze. Byla zjišťována heterogenita buněk ve stacionární fázi – byly zjišťovány podíly vegetativním buněk, mrtvých buněk a spor na celkové koncentraci biomasy. Různými biofyzikálními a biochemickými metodami byla zjišťována aktivita promotoru genu *des*, jehož transkripcí vzniká enzym desaturáza mastných kyselin. Tato aktivita odráží schopnost buňky registrovat fluiditu membrány senzorem DesK, který je v membráně umístěn.

Podíl různých typů buněk během stacionární fáze

Bakteriální kultura ve stacionární fázi (při kultivaci v 37 °C) obsahuje tři frakce buněk – vegetativní buňky, mrtvé buňky a endospory. Během prvních deseti hodin stacionární fáze je podíl vegetativních buněk přibližně 45 % procent, podíl mrtvých buněk také přibližně 45 % a podíl spor přibližně 10 %.

Aktivita promotoru genu *des* při stálé kultivační teplotě

Ve stálé kultivační teplotě ve stacionární fázi byla zjištěna aktivita *Pdes*. Nejvýraznější aktivita u buněk *Bacillus subtilis* byla pozorována při 25 °C, nejnižší při 37 °C. Oproti buňkám stacionárním byla zaznamenána aktivita i při 30 °C.

Aktivita promotoru genu *des* po náhlém snížení kultivační teploty

Po náhlém snížení teploty byla zaznamenána aktivita *Pdes*. Nejvýraznější nárůst byl zaznamenán při teplotním přenosu z 37 °C do 25 °C. Po třech hodinách od přenosu do nižší teploty ustává nárůst aktivity *Pdes*, jelikož buňka nemá další metabolickou kapacitu k vyšší transkripci enzymu desaturázy.

Rozmanitost buněk v kultuře stacionární fáze

Výsledky získané pomocí průtokové cytometrie prokázaly, že populace stacionárních buněk je natolik heterogenní, že znemožňuje kvantifikaci získaných poznatků a odlišení frakce buněk dle syntézy β-galaktosidázy.

Fyzikální stav cytoplazmatické membrány a složení mastných kyselin v jejích fosfolipidech

Membrána stacionárních buněk kultivovaných při 37 °C je méně fluidní než membrána exponenciálních buněk. Ve fosfolipidech izolovaných ze stacionární fáze výrazně převládá zastoupení iso- větvených mastných kyselin, oproti buňkám exponenciální fáze, kde převládají anteiso- větvené mastné kyseliny.

7. Seznam citované literatury

Aguilar, P. S., Cronan, J. E., Jr., de Mendoza, D. (1998): A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J. Bacteriol. **180**(8): p. 2194 – 2200.

Aguilar, P. S., de Mendoza, D. (2006): Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. Mol. Microbiol. **62**(6): p. 1507 – 1514.

Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C., de Mendoza, D. (2001): Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. Eur. Mol. Biol Organ J. **20**: p. 1681 – 1691.

Aguilar, P. S., Lopez, P., de Mendoza, D. (1999): Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the Δ5 desaturase of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **181**(22): p. 7028 - 7033.

Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., Rouxhet, P. G. (2001): Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. J Microbiol Methods **45**: p. 119 – 126.

Albanesi, D., Martin, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M. C., Haouz, A., Alzari, P. M., de Mendoza, D., Buschiazzo, A. (2009): Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**(38): p.16185 – 16190.

Alberghina, L., Porro, D., Shapiro, H., Srienc, F., Steen, H. eds. (2000): Analysis of Microbial Cells at the Single Cell Level. J. Microbiol. Methods **42**.

Altabe, S. G, Aguilar, P., Caballero, G. M., de Mendoza, D. (2003): The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a Δ5 desaturase. J. Bacteriol. **185**(10): p. 3228 – 3231.

Beckering, C. L., Steil, L., Weber, M. H., Volker, U., Marahiel, M. A. (2002): Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **184**(22): p. 6395 – 6402.

Beranová, J., Mansilla, M. C., de Mendoza, D., Elhottová, D., Konopásek, I. (2010): Differences in Cold Adaptation of *Bacillus subtilis* under Anaerobic and Aerobic conditions. J. Bacteriol. **192**(16): p. 4164 – 4171.

Bergara, F., Ibarra, C., Iwamasa. J., Patarroyo, J. C., Aguilera, R., Marque-Magan, L. M. (2003): CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **185**: p. 3188 – 3126.

Bernhardt, J., Büttner, K., Scharf, C., Hecker, M. (1999): Dual channel imaging of two-dimensional electropherograms in *Bacillus subtilis*. Electrophoresis **20**: 2225 – 2240.

Bisschop, A., Konings, W. N. (1976): Reconstitution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity with menadione in membrane vesicles from the menaquinone- deficient *Bacillus subtilis* aro D. Relation between electron transfer and active transport. Eur J Biochem **67**(2): p. 357 – 65.

Bobay, B. G., Andreeva, A., Mueller, G. A. Cavanagha, J., Murzin, A. G. (2005): Revised structure of the AbrB N-terminal domain unifies a diverse superfamily of putative DNA-binding proteins. FEBS Lett. **579**(25): p. 5669 – 5674.

Bobay, B. G., Benson, L., Naylor, S., Feeney, B., Clark, A. C, Goshe, M. B., Strauch, M. A., Thompson, R., Cavanagh, J. (2004): Evaluation of the DNA binding tendencies of the transition state regulator AbrB. Biochemistry. **43**(51): p. 16106 – 16118.

Boylan, S. A., Redfield, A. R., Price, C. W. (1993): Transcription factor σ^B of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon. J. Bacteriol. **175**(13): p. 3957 – 3963.

Bremer, E. (2002): Adaptation to changing osmolarity. In *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives: from Genes to Cells. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. American Society for Microbiology. Washington, D. C.: p. 385 – 391.

Brigulla, M., Hoffmann, T., Krips, A., Völker, A., Bremer, E., Völker, U. (2003): Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaption. J. Bacteriol. **185**(15): p. 4305 – 4314.

Budde I., Steil, L., Scharf, Ch., Völker, U., Bremer, E. (2006): Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. Microbiology **152**: p. 831 – 853.

Chen, Ch.-Ch., Yudkin, M. D., Delumeau, O. (2004): Phosphorylation and RsbX-dependent dephosphorylation of RsbR in the RsbR-RsbS complex of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriology. **186** (20): p. 6830 – 6836.

Cybulski, L. E., Albanesi, D., Mansilla, M. C., (2002): Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. Mol. Microbiol. **45**(5): p. 1379 – 1788.

de Mendoza, D., Grau, R., Cronan, J. E., Jr. (1993): Biosynthesis and function of membrane lipids. In: Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R. (eds.): *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington D. C.: p. 411 – 421.

Débarbouillé, M., Gardan, R., Arnaud, M., Rapoport, G. (1999): Role of *bkdR*, a transcriptional activator of the *sigL*-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **181**: p. 2059 – 2066.

Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., Trevors, J. T. (2003): Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. J. Microbiol. Methods **52**: p. 149 – 182.

Diaz, A. R., Mansilla, M. C., Vila, A. J., de Mendoza, D. (2002): Membrane topology of theacyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **277**(50): p. 48099 – 48106.

Eriksson, S., Hurme, R., Rhen, M. (2002): Low temperature sensors in bacteria. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **357**: p. 887 – 893.

Errington, J., Feucht, A., Lewis, P. J., Lord, M, Magnin, T., Najafi, M. A., Wilkinson, J. F., Yudki, M. D. (1996): Control of cell-specificity of σ^F activity in *Bacillus subtilis*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **351** (1339): p. 537 – 542.

Ferson, A. E., Wray, L. V., Jr., Fisher, S. H. (1996): Expression of the *Bacillus subtilis gabP* gene is regulated independently in response to nitrogen and amino acid availability. Mol. Microbiol. **22**: p. 693 – 701.

Fisher, S. H., Rohrer, K., Ferson, A. E. (1996): Role of CodY in regulation of the *Bacillus subtilis hut* operon. J. Bacteriol. **178**: p. 3779 – 3784.

Fugger, E. F., Black, S. H., Keyvanfar, K., Schulman, J. D. (1998): Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod. (Oxf.) **13**: p. 2367 – 2370.

Fujita, M., González-Pastor, J. E., Losick, R. (2005): High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **187**(4): p. 1357 – 1368.

Gerth, U., Kock, H., Kusters, I., Michalik, S., Switzer, R. L., Hecker, M. (2008): Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose starved *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **160**(1): p. 321 – 331.

Gledhill, B. L., Evenson, D. P., Pinkel, D. (1990): Flow cytometry and sorting of sperm and male germ cells. In: Melamed, M. R., Lindmo, T., Mendelsohn, M. L. (eds.): Flow Cytometry and Sorting. 2nd ed., Wiley-Liss, New York, p. 531 – 551.

Gottesman, S. (2003): Proteolysis in bacterial regulatory circuits. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **19**: p. 565 – 587.

Gottig, N., Pedrido, M. E., Méndez, M., Lombardía, E. Rovetto, A., Philippe, V., Orsaria, L., Grau, R. (2005): The *Bacillus subtilis* SinR and RapA developmental regulators are responsible for inhibition of spore development by alcohol. J. Bakteriol. **187**(8): p. 2662 – 2672.

Graumann, P. L., Marahiel, M. A. (1996): A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. BioEssays **18**: p. 309 – 315.

Graumann, P. L., Marahiel, M. A. (1997): Effect of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein in *Bacillus subtilis*, on protein synthesis in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **253**: p. 745 – 752.

Graumann, P. L., Marahiel, M. A. (1998): A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. Trends Biochem. Sci. **23**: p. 286 – 290.

Graumann, P. L., Wendrich, T. M., Weber, M. H. W., Schröder, K., Marahiel, M. A. (1997): A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. Mol. Microbiol. **25**: p. 741 – 756.

Gray, J. W., Cram, L. S. (1990): Flow karyotyping and chromosome sorting, In: Melamed, M. R., Lindmo, T., Mendelsohn, M. L. (eds.): Flow Cytometry and Sorting. 2nd ed., Wiley-Liss, New York.

Gruner, S. M., Cullis, P. R., Hope, M. J., Tilcock, C. P. (1985): Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. Annu. Rev. Biophys. Chem. **14**: p. 211 – 38.

Habbersett, R. C., Jett, J. H., Keller, R. A. (2000): Single DNA fragment detection by flow cytometry. In: Durack, G., Robinson, J. P. (eds.): Emerging Tools for Single-Cell Analysis, Wiley-Liss, New York, p. 115 – 138.

Hadden, C., Nester, E. W. (1968): Purification of competent cellls in the *Bacillus subtilis* transformation system. J. Bacteriol. **95**: p. 876 – 885.

Hahn, J., Roggiani, M., Dubnau, D. (1995): The major role of Spo0A in genetic competence is to downregulate *abrB*, an essential competence gene. J. Bacteriol. **177**: p. 3601 – 3605.

Haldenwang, W. G., Losick, R. (1980): A novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **77**: p. 7000 – 7005.

Hamoen, L. W., Vemena G., Kuipers O. P. (2003): Controling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. Microbiol. **149**: p. 9 – 17.

Hawley, T. S., Hawley, R. G. (eds.) (2004): Flow Cytometry Protocols. In: Methods in Molecular Biology **263**, 2nd ed.; Humana Press Inc., Totowa.

Hecker, M., Völker, U. (1998): Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the σ^B regulon. Mol. Microbiol. **29**: p. 1129 – 1136.

Hedley, D. W. (1989): Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. Cytometry **10**: p. 229 – 241.

Heřman, P., Konopásek, I., Plášek, J., Svobodová, J. (1994): Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescent probes. Biochim Biophys Acta **1190**(1): p. 1 – 8.

Höper, D., Völker, U., Hecker, M. (2005): Comprehensive characterization of the contribution of individual *SigB*-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **187**(8) p. 2810 – 2826.

Inaoka, T., Takahashi, K., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Ochi, K. (2003): Guanine nucelotides guanosine 5´-diphosphate 3´-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **278**: p. 2169 – 2176.

Jiang, M., Shao, W., Perego, M., Hoch, J. A. (2000): Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. **38**(3): p. 535 – 542.

Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., Inouye, M. (1996): Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**: p. 76 – 80.

Kalman, S., Duncan, M. L., Thomas, S. M., Price, C. W. (1990): Similar organization of the *sigB* and *spoIIA* operons encoding alternative sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. J. Bacteriol. **172**: p. 5575 – 5585.

Kaneda, T. (1991): Iso- and anteiso- fatty acids in bacteria: biusynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiol. Rev. **55**(2): p. 288 – 302.

Kang, Ch. M., Brody, M. S., Akbar, S., Yang, X., Price, C. W. (1996): Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B in response to environmental stress. Journal of bacteriology. **178**(13): p. 3846 – 3853.

Kaprálek, F. (1999): Mikrobiologické praktikum. Skripta. Karolinum, Praha

Kempf, B., Bremer, E. (1995): OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **270**: p. 16701 – 16713.

Kim, H. J., Kim, S. I., Ratnayake-Lecamwasam, M., Tachikawa, K., Sonenshein A. L., Strauch, M. (2003): Complex regulation of the *Bacillus subtilis* aconitase gene. J. Bacteriol. **185**: p. 1672 – 1680.

Lakowicz, J. R. (1999): Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.

Ledvikov, V. M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A. L., Wilkinson, A. J. (2006): The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive Bacteria. J. Biol. Chem. **281**(16): p. 11366 – 11373.

Lewis, R. N., McElhaney, R. N. (1985): Thermotrophic phase behavoir of model membranes composed of phosphatidylcholines containing iso-branched fatty acids.1. Differential scanning calorimetric studies. Biochemistry **24**(10): p. 2431 – 2439.

Lloyd, D. (1993): Flow Cytometry in Microbiology. Springer-Verlag, London.

Los, D. A., Murata, N. (2004): Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim. Biophys. Acta **1666**: p. 142 – 157.

Mansilla, M. C., de Mendoza, D. (2005): The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. Arch. Microbiol. **183**(4): p. 229 – 235.

Marie, D., Brussard, C. P. D., Thyrhaug, R., Bratbak, G., Vaulot, D. (1999): Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. **59**: p. 905 – 911.

Maughan, H., Nicholson, W., L. (2004): Stochastic processes influence stationary-phase decision in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **186**(7): p. 2212 – 2214.

McElhaney, R. N. (1984): The relationship between membrane lipid fluidity and phase state and the ability of bacteria and mycoplasmas to grow and survive at various temperatures. In: Kates, M. and Manson, L. A. (eds.): Membrane Fluidity. Plenum Publishing Corporation. p. 249 – 278.

Méndez, M., B., Orsaria, L. M., Philippe, V., Pedrigo, M. E., Grau, R. R. (2004): Novel roles of the master transcription factors Spo0A and σ^B for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. Journal of bacteriology. **186**(4): p. 989 – 1000.

Mizushima, T., Kataoka, K., Ogata, Y., Inoue, R., Sekimizu, K. (1997): Increase in negative supercoiling of plasmid DNA in *Escherichia coli* exposed to cold shock. Mol. Microbiol. **23**(2): p. 381 – 386.

Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., Sonenshein, A. L. (2003): Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. J. Bacteriol. **185**: p. 1911 – 1922.

Movahedi, S., Waites, W. (2002): Cold shock response in sporulating *Bacillus subtilis* and its effect on spore heat resistance. J. Bacteriol. **184**: p. 5275 – 5281.

Msadek, T., Kunst F., Rapoport, G. (1994): MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **91**: p. 5788 – 5792.

Najle, S. R., Inda, M. E., de Mendoza, D., Cybulski, L. E. (2009): Oligomerization of Bacillus subtilis DesR is required for fine tuning regulation of membrane fluidity. Biochim. Biophys. Acta **1790**: p. 1238 – 1243.

Nyström, T. (2004): Stationary-phase physiology. Annu. Rev. Microbiol. **58**: p. 161 – 181.

Pedraza-Reyes, M., Yasbin, R. E. (2003): Contribution of the mismatch DNA repair System to the generation of stationary-phase-induced mutants of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **186**(19): p. 6485 – 6491.

Pellegrino, P. M, Fell, N., F, Rosen, D. L., Gillespie, J. (1998): Bacterial endospore detection using terbium dipicolinate photoluminescence in the presence of chemical and biological materials. Anal. Chem. **70**: p. 1755 – 1760.

Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P., Hoch, J. A. (1994): Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. Cell. **79**(6): p. 1047 – 1055.

Perego, M., Hoch, J. A. (1996): Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**(4): p. 1549 – 1553.

Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., Hecker, M. (2001): Global analysis of the general sress response of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **183**: p. 5617 – 5631.

Phadtare, S., Alsina, J., Inouye, M. (1999): Cold-shock response and cold-shock proteins. Curr. Opin. Microbiol. **2**: p. 175 – 180.

Phadtare, S., Yamanaka, K., Inouye, M. (2000): The cold shock response. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (eds.): Bacterial Stress Responses. ASM Press, Washington D. C.

Phillips, Z. E. V., Strauch, M. A. (2002): *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. CMLS Cell. Mol. Life Sci. **59**(3): p. 392 – 402.

Price, C. W. (2000): Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. In: Stroz, G and Hengge-Aronis, R (eds.): General stress response. ASM press, Washington, D. C.: p. 369 – 384.

Price, C. W. (2002): General stress response. In: Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R. (eds.): *Bacillus subtilis* and its closest relatives. ASM Press, Washington, D. C.: p. 369 – 384.

Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K. W., Sonenshein, A. L. (2001): *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. Genes Dev. **15**: p. 1093 – 1103.

Reeve, C. A., Bockman, A. T., Abdul, M. (1984): Role of protein degradation in the survival of carbon-starved. J. Bacteriol. **157**(3): p. 758 – 763.

Ross, Ch., Pybus, C., Pedraza-Reyes, M. Sung, H.-M., Yasbin, R. E., Robleto, E.(2006): Novel role of mfd: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **188**(21): p. 7512 – 7620.

Rowland, B., Purkayastha, A., Monserrat, C., Casart, Y., Takiff, H., McDonough, K. A. (1999): Fluorescence-based detection of *lacZ* reporter gene expression in intact and viable bacteria including *Mycobacterium* species. FEMS Microb Letters **179**: p. 317 – 325.

Russell, N. J. (1990): Cold adaptation of microorganisms. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **326**(1237): p. 595 – 611.

Russell, N. J. (1997): Psychrophilic bacteria-molecular adaptative of membrane lipids. Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. **118**(3): p. 489 – 493.

Schrommová, K. (2008): Membránově aktivní látky a regulace membránové fluidity u *Bacillus subtilis*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha

Schumann, W. (2002): Cold shock response in microorganisms. The Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, www.els.net.

Serror, P., Sonenshein, A. L. (1996): CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. J. Bacteriol. **178**: p. 5910 – 5915.

Shivers, R. P., Sonenshein, A. L. (2004): Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. Mol. Microbiol. **53**(2): p. 599 – 611.

Slack, F. J., Mueller, J. P., Sonenshein, A. L. (1993): Mutations that relieve nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. J. Bacteriol. **175**: p. 4605 – 4614.

Slack, F. J., Serror, P., Joyce, E., Sonenshein, A. L. (1995): A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. Mol. Microbiol. **15**: p. 689 – 702.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem **150**(1): p. 76 – 85.

Solomon, J. M., Grossman, A. D. (1996): Who‘s competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. Trends Genet. **12**: p. 150 – 155.

Sonenshein, A. L. (2005): CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. **8**(2): p. 203 – 207.

Strauch, M. A. (1993): Regulation of *Bacillus subtilis* gene expression during the transition from exponencial growth to stationary phase. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **64**: p. 121 – 153.

Strauch, M. A. (1995): AbrB modulates expression and catabolite repression of *Bacillus subtilis* ribose transport operon. J. Bacteriol. **177**: p. 6726 – 6731.

Strauch, M. A., Hoch, J. A. (1993): Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponencila gene expression. Mol. Microbiol. **7**: p. 337 – 342.

Strauch, M. A., Perego, M., Burbulys, D., Hoch, J. A. (1989): The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. Mol. Microbiol. **3**: p. 1203 – 1209.

Strauch, M. A., Trach, K. A., Day, J., Hoch, J. A. (1992): Spo0A activates and represses its own synthesis by binding at its dual promotores. Biochimie (Paris). **74**: p. 619 – 626.

Strauch, M. A., Webb, V., Spiegelman, G., Hoch, J. A. (1990): The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**(5): p. 1801 - 1805.

Strauch, M. A., Wu, J.-J., Jonas, R. H., Hoch, J. A. (1993): A positive feedback look controls transcription of the *spo0F* gene, a component of the sporulation phosphorelay in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **7**: p. 967 – 974.

Sung ,H.-M., Yasbin, R. E. (2002): Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **184**(20): p: 5641 – 5653.

Sung, H.-M., Yeamans, G., Ross, Ch. A. & Yasbin, R. E. (2003): Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriology. **185**(7): p. 2153 – 2160.

Suutari, M., Laakso, S. (1994): Microbial fatty acids and thermal adaptation. Crit. Rev. Microbiol. **20**(4): p. 258 – 328.

Tam, L. T., Antelmann, H., Eymann, E. Albrecht, D., Bernhardt, J., Hecker, M. (2006): Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. Proteomics. **6**(16): p. 4565 – 4585.

Turgay, K., Hamoen, L. W. Venema, G., Dubnau, D. (1997): Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. Genes Dev. **11**(1): p. 119 – 128.

Vaughn, J., L., Feher, V., Naylor, S. Strauch, M., A., Cavanagh, J. (2000): Novel DNA binding domain and genetic regulation model of *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB. Nature Struct. Biol. **7**: p. 1139 – 1146.

Völker, U. Maul, B., Hecker, M (1999): Expression of the σ^B-dependent general stress response in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **181**: p. 175 – 187.

Wang, L., Grau, R., Perego, M. & Hoch, J., A. (1997): A novel histidine kinase inhibitor regulating development in *Bacillus subtilis*. Genes Dev. **11**: p. 2569 – 2579.

Weber, M. H., Beckering, C. L., Marahiel, M. A. (2001a): Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 *in vivo*. J. Bacteriol. **183**: p. 7381 – 7386.

Weber, M. H., Fricke, I., Doll, N., Marahiel, M. A. (2002): CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. Nucleic Acids Res. **30**: p. 375 – 378.

Weber, M. H., Klein, W., Muller, L., Niess, U. M., Marahiel, M. A. (2001c): Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. Mol. Microbiol. **39**(5): p. 1321 – 1329.

Weber, M. H., Marahiel, M. A. (2003): Bacterial cold shock response. Sci. Prog. **86**: p. 9 – 75.

Weber, M. H., Volkov, A. V., Fricke, I., Marahiel, M. A., Graumann, P. L. (2001b): Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. J. Bacteriol. **183**: p. 6435 – 6443.

Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., Nierhaus, K. H. (2002): Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. Mol. Cell. **10**(4): p. 779 – 88.

White, C. H., Chang, R. R., Martin, J. H., Loewenstein, M. (1976): Factors affecting L-Alanine induced germination of *Bacillus* spores. Journal of diary science **57**(11): p. 1309 – 1315.

Wiegert, T., Schumann, W. (2001): SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **183**(13): p. 3885 - 3889.

Williams, R. M. Rimsky, S. (1997): Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: A central controller of gene regulatory networks. FEMS Microbiol. Lett. **156**: p. 175 – 185.

Wise, A. A., Price, Ch. W. (1995): Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor σ^B in response to environmental signals. J. Bacteriol. **177**(1): p. 123 – 133.

Wray, L. V. Jr., Ferson, A. E., Fisher, S. H. (1997): Expression of the *Bacillus subtilis ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. J. Bacteriol. **179**: p. 5494 – 5501.

Zhang, S., Haldenwang, W. G. (2003): RelA is a component of the nutritional stress activation pathway of the *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B. J. Bacteriol. **185** (19): p. 5714 – 5721.