

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



**Molekulární mechanismy chladové adaptace
v cytoplazmě a bakteriální membráně**

Anna Beranová

Bakalářská práce
Praha 2008

Vedoucí bakalářské práce : doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Obsah | 2 |
| 1. ABSTRAKT | 3 |
| 2. ÚVOD | 4 |
| 2.1 Působení chladového stresu na bakteriální buňku | 5 |
| 3. CHLADOVÁ ADAPTACE | 8 |
| 3.1 Teplotní senzory | 8 |
| 3.2 Časový rozvrh adaptace | 10 |
| 3.3 Přizpůsobení na úrovni membrány | 11 |
| 3.4 Děje probíhající v cytoplazmě..... | 12 |
| 3.4.1 Kompatibilní soluty | 12 |
| 3.4.2 Vliv chladu na sbalování proteinů a proteinové chaperony..... | 13 |
| 3.4.3 Transport proteinů..... | 13 |
| 3.4.4 Adaptace na úrovni proteinů, CSP..... | 14 |
| 3.4.4.1 Struktura CSP..... | 16 |
| 3.4.4.2 CSP u <i>E. coli</i> | 17 |
| 3.4.4.2.1 Regulace CSP na úrovni transkripce u <i>E. coli</i> | 18 |
| 3.4.4.2.2 Regulace CSP na úrovni translace | 19 |
| 3.4.4.2.3 CSP vyskytující se u <i>E. coli</i> | 20 |
| 3.4.4.3 CSP u <i>B. subtilis</i> | 22 |
| 3.4.4.3.1 Regulace na úrovni transkripce | 23 |
| 3.4.4.3.2 Regulace na úrovni translace | 23 |
| 3.4.4.3.3 CSP vyskytující se u <i>B. subtilis</i> | 23 |
| 3.4.5 Nekódující RNA, alternativní sigma faktory, PNP, faktory RelA/SpoT, Y protein..... | 24 |
| 3.5 Vliv chladu na sporulaci | 26 |
| 4. MOŽNOSTI DALŠÍHO VÝZKUMU A ZÁVĚR | 26 |
| 5. CITOVANÁ LITERATURA..... | 28 |

1. Abstrakt/Abstract

Všechny organismy potřebují mechanismy, které jim umožní přežití v širokém rozmezí teplot. Při snížení teploty ztrácí membrána tekutost, nukleové kyseliny v buňce mění svou konformaci a ribosomy nejsou schopny překládat běžné buněčné proteiny. Bakterie se umí velmi rychle adaptovat na nepříznivé účinky teplot a brzy po chladovém šoku obnovují růst. Adaptace probíhá na úrovni složení membránových fosfolipidů a na úrovni exprese proteinů. Tato práce se zaměřuje na chladovou adaptaci u bakterií na úrovni cytoplazmy a především na proteiny chladového šoku (cold shock proteins – CSP), které jsou charakteristické pro bakterie. Tyto proteiny pomáhají potlačit vliv snížení teploty a chladu na buněčné funkce. Popsány budou i adaptace membrány, DNA a RNA a metabolismu celkově.

Klíčová slova: chladový šok, *Bacillus subtilis*, proteiny chladového šoku

All organisms need some mechanisms that enable them to survive in a broad temperature range. If temperature decreases, the membrane is losing its fluidity, nucleic acids in a cell change their conformation and ribosomes are not able to translate common cellular proteins. Bacteria can adapt to adverse temperature effects very quickly and their growth is renewed soon after a cold shock. The adaptation takes place on the level of membrane phospholipids as well as on the level of protein expression. The paper focuses on cold adaptation of bacteria on the cytoplasm level and especially on cold shock proteins (CSP) which are characteristic of bacteria. These proteins help suppress an effect of both temperature decrease and cold on cell functions. Adaptation of a membrane, DNA and RNA and metabolism as a whole are described as well.

Key words: cold shock, *Bacillus subtilis*, cold shock proteins

2. Úvod

Každý organismus na této planetě je ovlivňován svým prostředím. Podmínky, ve kterých se daný organismus vyskytuje, však nejsou vždy ideální, většinou je tomu právě naopak. Převážnou část života stráví organismus při působení nějakého ze stresových faktorů (mnohdy je jich i více). To vyžaduje najít dostatečně účinný způsob, jak stres překonat.

Teplota je jedním z abiotických faktorů, který působí na všechny organismy na Zemi, na všech místech. Každý organismus se musí umět přizpůsobit měnící se teplotě. Bakterie nejsou výjimkou. Změna teploty, stejně jako změna kteréhokoli jiného parametru prostředí za hranice optima dané buňky, je stresový faktor. Na tento stres je potřeba adekvátně reagovat, aby buňka přežila. Bakterie musí kompenzovat negativní působení okolí.

Důvodů, proč studovat reakce prokaryotické buňky na chladový šok, je mnoho. Hlavním předmětem výzkumu je porozumění jednotlivým buněčným funkcím. Poznatky o chladové adaptaci lze uplatnit v potravinářství (výroba potravin či ochrana před nežádoucím působením mikroorganismů), biotechnologiích (např. čištění odpadních vod, využití enzymů působících za nižších teplot, v genovém inženýrství) či lékařství (patogenní mikroorganismy často poznají příznivé prostředí hostitele právě podle okolní teploty) a farmaceutickém průmyslu.

Schopnost přežít při negativním vlivu chladu díky udržení membránové fluidity a produkcí proteinů chladového šoku se nazývá kryotolerance. Buňka na náhlé snížení teploty odpovídá souborem reakcí. Ty 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.

Tématem této práce je chladový stres a odpověď na něj u bakteriální buňky. Jako modelové organismy pro studium chladové adaptace byli zvoleni *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. *Bacillus* byl vybrán s ohledem na budoucí diplomovou práci. Je to velmi běžná půdní grampozitivní nepatogenní bakterie. Má tvar tyčinky a tvoří endospóry. Ve svém přirozeném prostředí (povrchové vrstvě půdy) se neustále setkává s výkyvy teplot. Důvodem výběru této bakterie jako modelového organismu je především snadná kultivovatelnost a to, že se nejedná o patogenní druh. Pokud jde

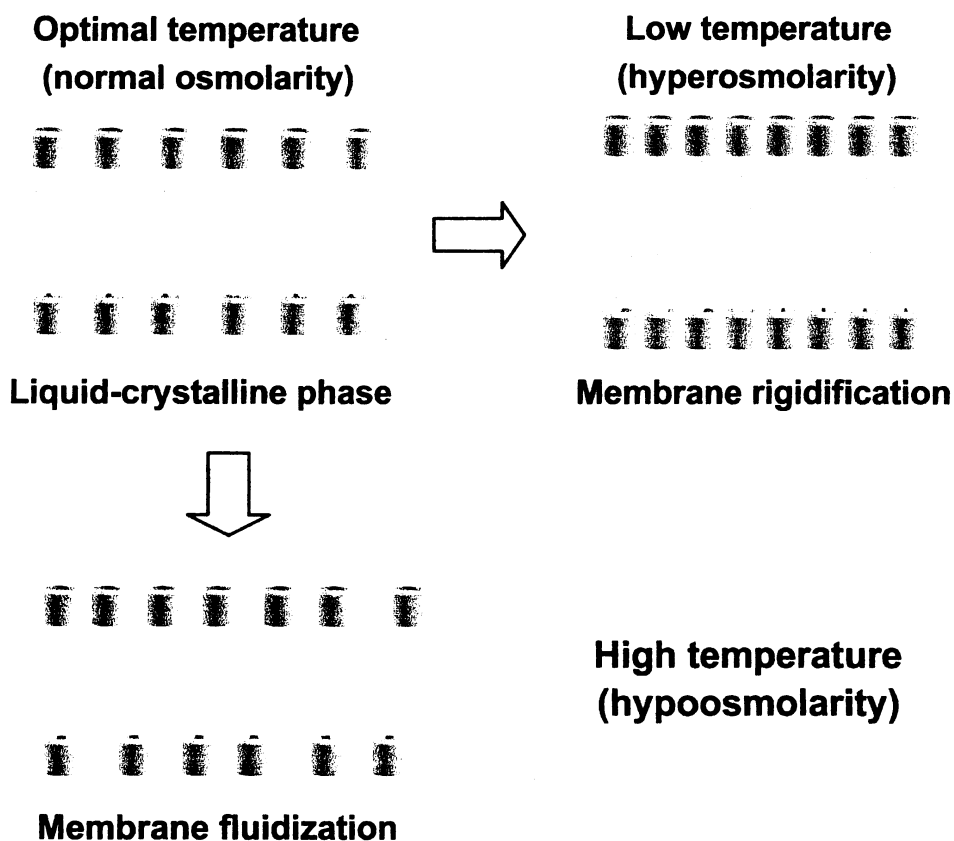
o teplotní optimum této bakterie, patří mezi mezofily (viz 1.1). *Escherichia coli* je nejběžnější laboratorně používanou bakterií, proto je velká část výzkumu provedena na ní.

2.1 Působení chladového stresu na bakteriální buňku

Organismy můžeme dělit dle teploty, ve které probíhá jejich optimální růst, do několika kategorií. Nejnižší optimální teploty pro růst nalézáme u psychrofilů. Při vyšších teplotách rostou psychrotolerantní organismy. Následují mesofilové, termofilové a nejvyšší teplotní optima mají hypertermofilové. 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. Bakterie dokáží růst za většího rozmezí teplot, avšak různě efektivně.

Chladový šok nepochybně ovlivňuje difúzi, konformaci molekul a dynamiku všech dějů v buňce. Vede k zastavení tvorby některých proteinů a k indukci proteinů specifických pro nízké teploty. Obecně dochází ke zpomalení metabolismu, čehož se v praxi hojně využívá při konzervaci potravin chladem. Nízká teplota může být letální. Po chladovém šoku většinou nastává lag fáze, během které se buňka na nízkou teplotu adaptuje. Délka této fáze se liší u jednotlivých bakteriálních druhů.

Chladem **membrány** ztrácí fluiditu (pohyblivost membránových komponent) (viz Obr. 1), což ovlivňuje děje vázané na membránu a těch je v prokaryotické buňce velmi mnoho, např. transport látek do buňky a z buňky ven (McElhaney 1984, Phadtare *et al.* 2000, Schumann 2002).



Obr. 1 Schématické znázornění změn v membránové struktuře a chování lipidové dvojvrstvy během chladového a teplotního šoku. Nízká teplota způsobuje rigidifikaci, zatímco vysoká fluidizaci membrány. (převzato z Los a Murata 2004)

Chladový šok působí na nukleové kyseliny, které se v bakterii vyskytují. Dvojvlákno DNA je v buňce zavinuto do složitých struktur – má takzvanou negativní superhelicitu. Nízká teplota způsobuje ještě větší utažení těchto struktur DNA. Zároveň jsou stabilizovány sekundární struktury RNA (konkrétně oblast Shine-Dalgarnovy sekvence), vznikají vlásenky, což znesnadní nasednutí ribosomu a translaci. Působením chladu stoupá v buňce počet volných ribosomů, které nejsou vázány na mRNA a zároveň se i zvyšuje počet volných podjednotek ribosomů, které se vyskytují v buňce, což zpomaluje translaci.

Chlad ovlivňuje i konformaci již vytvořených proteinů a jejich difúzi buňkou či transport proteinů mimo ni.

Nízká teplota zastavuje mnoho buněčných dějů, které probíhají na úrovni celé buňky. Příkladem mohou být dělení buňky a diferenciacie v endospóry u bakterií, které mají tuto schopnost.

Snížení teploty o 10°C vede ke snížení reakční rychlosti 1,5 – 4x (dle Arrheniova vztahu $K = A \cdot e^{-E_a/RT}$). Nízká teplota zpomaluje děje probíhající na membráně a metabolismus, a to jak na úrovni katabolismu (glykolýza, oxidativní fosforylace atd.), tak na úrovni anabolismu (zpomalení biosyntézy).

Mechanismus působení chladu je tedy velmi rozmanitý a buňka se s ním i rozmanitě vyrovnává. O tom pojednávají následující kapitoly.

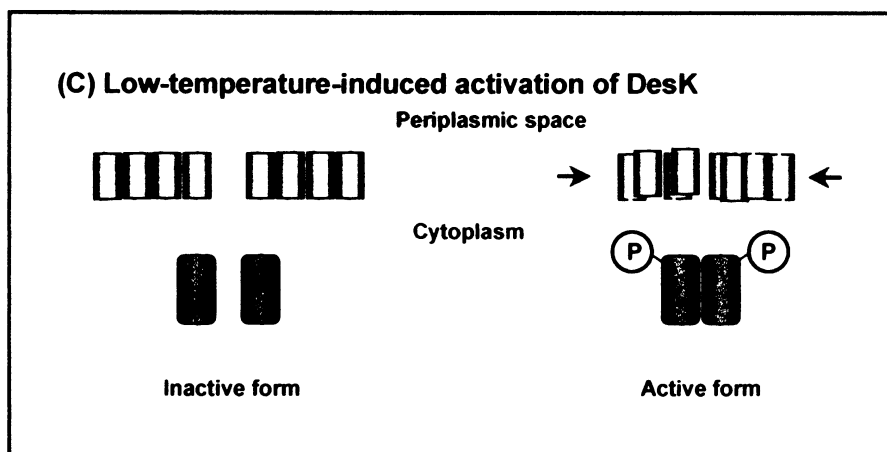
3. Chladová adaptace

K adaptačním změnám dochází na úrovni složení membránových lipidů a na úrovni genové exprese. Dochází k produkci proteinů, které mění konformace stávajících proteinů a konformace nukleových kyselin. Míra a přesný způsob adaptace závisí na druhu bakterie, konkrétní teplotě a kultivačním médiu.

3.1 Teplotní senzory

Aby mohla bakterie vhodně reagovat na změnu okolní teploty, musí mít senzory, které tuto informaci zachytí. V bakterii nalézáme takových sensorů několik. Bylo zjištěno, že stejné senzory registrují jak snížení, tak zvýšení teploty. Bakteriální senzor je schopen informaci o změně okolní teploty přijmout, vyhodnotit i poskytnout dál.

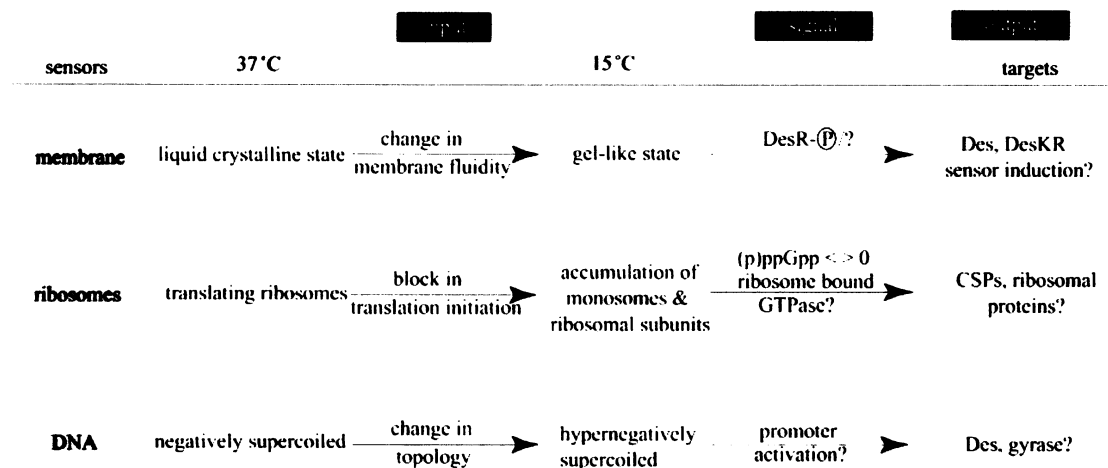
Membrána bakterie je nepochybně primárním senzorem, který registruje změnu v okolní teplotě. Dostává se jako první komponenta buňky do kontaktu se sníženou teplotou. V membráně *B. subtilis* nalézáme dvoukomponentový systém kódovaný *desKR* operonem (viz Obr. 2), který registruje informace o teplotě prostředí, ve kterém se buňka nachází. Je to systém tvořený histidin kinázou a vazebným proteinem. Histidin kináza DesK funguje jako kináza i fosfatáza pro protein DesR, v závislosti na okolní teplotě. Při 37°C udržuje DesK svou fosfatázovou aktivitou DesR v neaktivní defosforylované formě. Při snížení teploty prostředí mění DesK svou konformaci, to vede k autofosforylaci, což změní funkci DesK z fosfatázy na kinázu. Ta fosforyluje DesR, čímž ho aktivuje (viz Obr. 3). DesR se váže na oblast *des* promotoru, kde působí jako transkripční aktivátor. Dochází k expresi enzymu desaturázy, nezbytné pro adaptaci membrány na chlad (viz 2.3). Důsledkem adaptace je fluidizace membrány, což zajistí její správné fungování a zároveň vrací DesK jeho fosfatázovou aktivitu, čímž zastaví tuto signální dráhu (Aguilar *et al.* 2001).



Obr. 2 Schéma struktury a aktivace na chlad senzitivní histidin kinázy. Aktivace DesK *B. subtilis* za nízkých teplot. Každá podjednotka DesK má čtyři transmembránové domény. Po zatuhnutí membrány následuje fosforylace a přiblížení transmembránových domén. To vede k autofosforylaci. (převzato z Los a Murata 2004)

Dalším senzorem informujícím o změně teploty je **ribosom**, jehož činnost je snížením teploty ovlivněna. Chlad způsobí inaktivaci ribosomálních funkcí, jelikož dochází k rozpadu ribosomu na podjednotky, což je pravděpodobně signál pro buňku vedoucí k CSR (viz Obr. 3). To bylo dokázáno použitím antibiotika, které zastavuje činnost ribosomů (např. chloramfenikol). Po jeho přidání do média došlo k blokování ribosomu, což vedlo k indukci proteinů chladového šoku (VanBogelen a Neidhardt 1990, Graumann *et al.* 1997, Etchegaray a Inouye 1999).

Jako senzor funguje i **DNA**. Při chladu má vyšší negativní superhelicitu. To působí jako signál, že se buňka nachází v chladném prostředí. Zavinutí DNA ovlivňuje enzymy topoizomerázy I. a II (viz Obr. 3). Konformace je také ovlivňována proteinem H-NS (histonům podobný protein, který se váže na DNA), jehož množství v buňce po chladu stoupá. Ten je zodpovědný za represi bakteriálních genů při chladu. Pravděpodobně brání tvorbě otevřeného komplexu na promotorové oblasti (Williams a Rimsky 1997, Eriksson *et al.* 2002). Tato represe působí pro buňku jako signál o snížené teplotě v okolí.



Obr. 3 Organizace CSR (cold shock response) u *B. subtilis*. Membrána, translační aparát a DNA slouží jako senzory, jejichž fyzikální vlastnosti se mění po snížení teploty prostředí, která působí jako signál. To nakonec vede k adaptaci na úrovni proteinů. (převzato z Weber a Marahiel 2002)

3.2 Časový rozvrh adaptace

Snížení kultivační teploty může být letální. Pokud letální není, buňka vstupuje do různě dlouhé lag fáze. Během ní dochází k adaptaci buňky na nové podmínky.

Obecný model lze shrnout asi takto: 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.

Weber a Marahiel navrhli třístupňový model adaptace (viz Obr. 4). První fáze je nazvána **aklimatizační fáze** („acclimatization phase“) a následuje těsně po chladovém šoku. Trvá většinou několik hodin. Dochází k zpomalení růstové rychlosti a změně syntézy proteinů. Syntéza běžných proteinů je utlumena a vzrůstá produkce proteinů chladového šoku (CSP, „cold shock protein“). Následuje fáze označovaná jako **fáze zotavení** („recovery phase“). Bakterie již roste rychleji, proteom se liší od proteomu předchozí fáze. Ve třetí fázi je již buňka adaptována na chlad. Jsou produkovány běžné proteiny, které bylo možné v buňce najít před šokem.

Okamžitě po chladovém šoku zaregistruje změnu okolní teploty membrána, ve které nalézáme senzory registrující snížení okolní teploty (Jedním z nich je DesK u *B. subtilis*). Senzor předává informaci do vnitřního prostředí buňky. Zde dochází ke změně transkripčních faktorů, které v danou chvíli regulují transkripci. Důsledkem je

aktivace či represe transkripce. V případě fosforylační kaskády vedoucí od DesK dochází k přepisu genu pro desaturázu. Ta zavádí dvojné vazby do mastných kyselin ve fosfolipidech membrán. Takto upravené mastné kyseliny fluidizují membrány za nízkých teplot.

Krátce po ztužení membrány dochází ke změnám i uvnitř buňky. Konformační změny na ribosomech a mRNA vedou k zastavení translace (viz 1.1). Zároveň se sníží hladina (p)ppGpp (souhrnné označení pro molekuly guanosin-5′trifosfát-3′difosfát a guanosin-5′difosfát-3′difosfát), což je společně se ztužením membrány impulz ke změně genové exprese. Dochází k omezení syntézy běžných proteinů a k indukci syntézy CSP. Společně s tím dochází ke konformačním změnám na vláknech DNA a dochází ke změně transkripční aktivity. Změna konformace určitých míst na DNA přitahuje gyrázu.

V případě *E.coli* (kmen ML30) máme k dispozici konkrétní časové údaje o postupu adaptace. Při přenesení kultury z 37°C do 10°C syntéza běžných proteinů začala po 4h a dělení buňky po 11h od chladového šoku. Pokud je buňka přenesena do 15°C, indukuje první protein chladového šoku po 2 hodinách lagu; tímto proteinem je CspA. (Shaw a Ingraham 1967).

Pro *B. subtilis* byly zjištěny odlišné údaje. Po cca 2h od chladového šoku jsou již produkovány běžné proteiny (Graumann *et al.* 1996)

3.3 Přizpůsobení na úrovni membrány

Membrána, je první komponenta bakterie, která je ovlivněna snížením teploty. Slouží i jako senzor, který informuje o teplotním šoku. Působením chladu membrána ztrácí fluiditu. Za normální teploty jsou jednotlivé molekuly fosfolipidů 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. Pokud se má membrána adaptovat, musí dojít k jejímu ztekucení. V případě *B. subtilis* se to děje dvěma odlišnými mechanismy. Standardně převažují v cytoplazmatické membráně *B. subtilis* iso- a anteiso- mastné kyseliny (liší se pozicí methylové skupiny, která nahrazuje vodík vázaný na uhlíkovém atomu alifatického řetězce). Dlouhodobou adaptaci zajišťuje zvýšené množství anteiso- mastných kyselin s nižším bodem tání (převážně a-15:0 a a-17:0) v membránových fosfolipidech.

Okamžitou adaptaci zajišťuje syntéza desaturázy mastných kyselin. Indukce genu *desA* vede k expresi enzymu desaturázy, která zavádí do mastných kyselin již existujících fosfolipidů dvojně vazby. Takto upravené mastné kyseliny udrží membránu dostatečně fluidní i za nízkých teplot. Tento jev se nazývá desaturace (de Mendoza *et al.* 1993). Gen pro desaturázu je nejsilněji indukovaný gen po přesunutí buňky do chladnějšího prostředí. Regulace syntézy tohoto enzymu probíhá na úrovni transkripce.

3.4 Děje probíhající v cytoplazmě

3.4.1 Kompatibilní soluty

K ochraně vnitřního prostředí buňky před nepříznivými podmínkami slouží nízkomolekulární látky, takzvané kompatibilní soluty. Brání buňku před působením příliš alkalického prostředí, teplem, volnými radikály a samozřejmě i chladem. Mezi těmito látkami s nízkou molekulovou hmotností nalézáme polyoly, polyaminy, sacharidy, deriváty aminokyselin a další látky. Přesný mechanismus jejich působení není znám, ale dají se považovat za chemické chaperony. Stabilizují nativní konformace proteinů, brání denaturaci či vzniku agregátů, podílí se na zneškodňování volných radikálů. Zvýšení koncentrace těchto látek v cytoplazmě buňky vede ke zvýšení viskozity, ale zároveň omezuje difúzi. Dalším efektem těchto látek je snížení bodu tuhnutí cytoplazmy, což je velmi výhodné za nízkých teplot.

Pokud přemístíme buňku do nižší teploty, zvýší se množství volných radikálů v její cytoplazmě. V případě *E. coli* dochází při snížení kultivační teploty z 37°C na 16°C k nahromadění disacharidu trehalózy, slouží k neutralizaci volných radikálů). Dalším příkladem může být *Listeria monocytogenes* (významný lidský patogen). U ní jsou jako kompatibilní soluty při snížení teploty využívány glycin betain, karnitin a pravděpodobně i další látky. U *B. subtilis* je také používán glycin betain, který se dostává do buňky pomocí ABC transportéru (OpuA) (Kempf a Bremer 1995, Bremer 2002).

3.4.2 Vliv chladu na sbalování proteinů a proteinové chaperony

Správné sbalení (folding) proteinu do nativní konformace je nezbytnou podmínkou pro jeho řádnou funkci v organismu. Nízké teploty samozřejmě ovlivňují produkci proteinů v buňce (viz 1.1). Působením nízkých teplot vzniká v místě, kde se ribosom váže na mRNA, vlásenka, která tomuto nasednutí zabrání. Ribosomy se odpoutají od mRNA a tím je ukončena translace. Jako doklad slouží zvýšené množství volných ribosomů (70S) i volných podjednotek (50S a 30S) v buňce. Buňka se brání vzniku sekundárních struktur na mRNA dvěma způsoby. Jednak vazbou CSP (Graumann *et al.* 1997) a v případě *E. coli* i pomocí chladem indukovaných helikáz (Jones *et al.* 1996). CSP fungují jako molekulové chaperony, to znamená, že pomáhají sbalovat např. mRNA nebo proteiny do jejich nativní konformace (viz Obr. 5). V případě velké produkce proteinu buňkou (např. v biotechnologických provozech) je tento rys chladové adaptace buněk velmi ekonomicky výhodný.

V cytoplazmě *B. subtilis* byly při působení chladu pozorovány peptidyl-prolyl isomerázy a spouštěcí faktor TF asociovaný s ribosomy. Ty katalyzují *cis/trans* izomeraci peptidové vazby N-terminálního konce prolinových zbytků (Fischer *et al.* 1998). Tato reakce je pokládána za limitující krok při balení proteinů hlavně za nízkých teplot (Stoller *et al.* 1995). Existují doklady o tom, že se TF zároveň účastní i sekrece proteinů (Lee *et al.* 2002) (viz 2.4.3).

3.4.3 Transport proteinů

U všech známých bakteriálních druhů proteiny difundují v rámci buňky a jsou transportovány přes cytoplazmatickou membránu ven z buňky (např. proteiny buněčné stěny). Při působení chladu se tento transport stává méně účinným.

Většina proteinů v buňce je transportována na místo upotřebení pomocí sekretorické dráhy Sec (Hirose *et al.* 2000). Tato cesta je využívána jak k transportu ven z buňky, tak k zavádění proteinů do membrány. V membráně je zakotven systém zvaný translokáza. Translokáza *E. coli* se skládá z minimálně sedmi proteinů, část z nich je zanořena do membrány, část se nachází v periplazmovém prostoru. Transport tímto systémem pravděpodobně potřebuje hydrolýzu ATP. Proteiny se k němu dostávají díky

SRP (signal recognition particle), a to buď kotranslačně nebo posttranslačně. SRP se skládá z proteinové a RNA složky, váže se na protein a určuje, kam daný protein patří. Obdobnou funkci jako SRP má i molekulární chaperon SecB (Tjalsma *et al.* 2000).

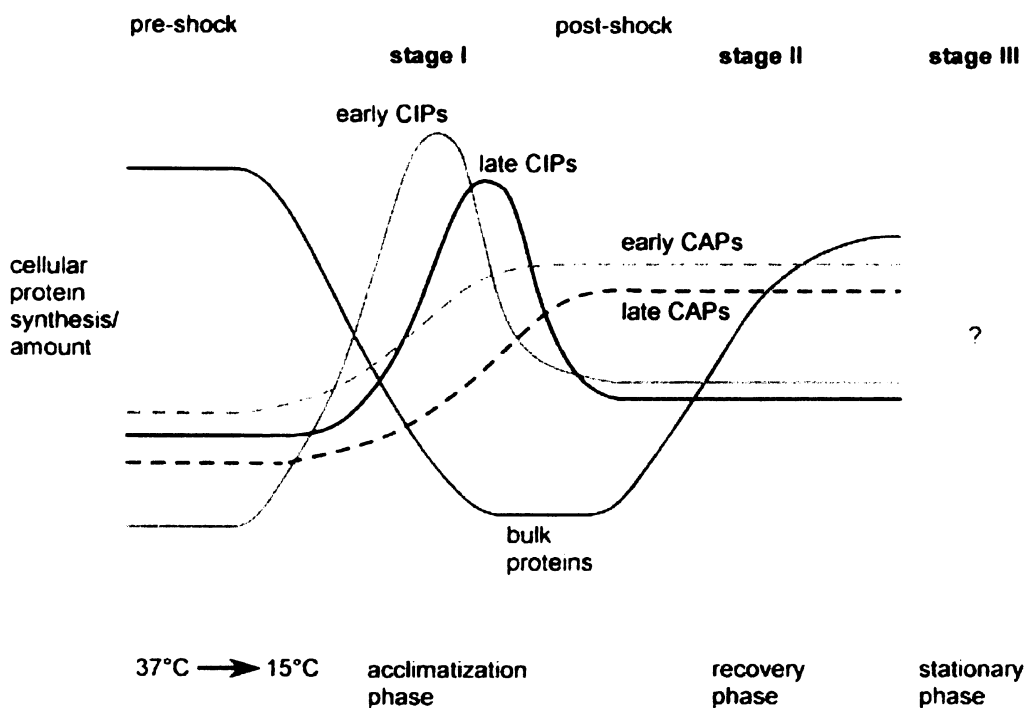
Při chladové adaptaci *E. coli* působí v transportu i TF asociovaný s ribosomy, který zastavuje transport (Lee *et al.* 2002). Během chladu jeho množství v buňce stoupá (Graumann *et al.* 1996, Graumann a Marahiel 1999, Kandror a Goldberg 1997). Jeho působení je prevencí před nevhodnou sekrecí proteinů do membrány ve chvíli, kdy teprve dochází k adaptaci membránových fosfolipidů. Úloha TF v transportu i jeho funkce během sbalování proteinů dokazuje, nakolik je chladová adaptace komplexní děj.

3.4.4 Adaptace na úrovni proteinů, CSP

Chladový stres ovlivňuje složení proteinů, které buňka vytváří. Syntéza většiny standardně se vyskytujících proteinů je potlačena ve prospěch indukce CSP. Ty pomáhají v adaptaci organismu na nové podmínky okolí (viz Obr. 4).

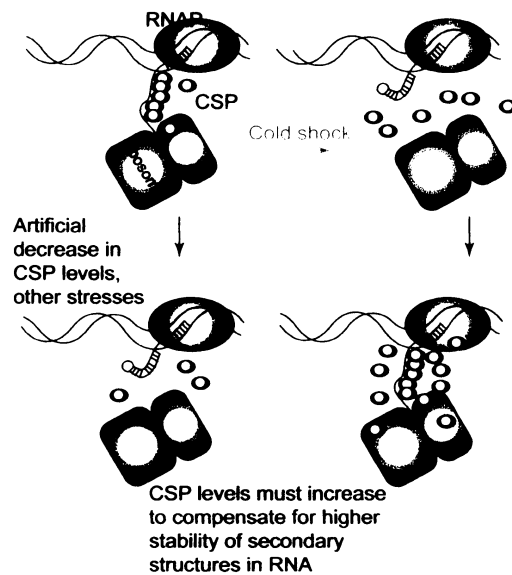
Jsou to první proteiny, které se objevují po přenesení buňky do chladnějšího prostředí. Geny pro tyto proteiny byly nalezeny ve většině psychofilů, mesofilů, termofilů a také hypertermofilů (Weber *et al.* 2002). Vyskytují se i u evolučně starších skupin bakterií (Graumann a Marahiel 2002), což ukazuje, jak jsou pro přežití buňky podstatné.

Proteiny, které jsou produkovány v důsledku chladového šoku, můžeme rozdělit do tří skupin. První skupina jsou takzvané chladem indukované proteiny (cold induced proteins CIP). V buňce se před šokem nevyskytují. Jejich množství rapidně vzrůstá během aklimační fáze adaptace, v následující fázi je jejich produkce částečně, ale nikoli zcela, utlumena. Druhou skupinou jsou tzv. chladové aklimatizační proteiny (cold acclimatization proteins, CAP). CAP nacházíme v psychofilních mikroorganismech a organismech, které jsou dlouhodobě adaptované na chlad. Tyto proteiny můžeme najít v buňce i za běžných kultivačních teplot psychofilních organismů. Jejich exprese po chladovém šoku nevzrůstá tak rychle a výrazně jako u předchozí skupiny. Maxima indukce dosahují na konci aklimatizační fáze a tato hodnota přetrvává i nadále. Obě skupiny proteinů mohou být děleny ještě na časně a pozdní (v závislosti na okamžiku, kdy dochází k expresi po chladovém šoku). Třetí skupinou jsou proteiny chladového šoku (cold shock proteins, CSP), mnohé z nich mohou být řazeny mezi CAP a CIP.



Obr. 4 Třístupňový model pro fyziologii bakteriální chladové adaptace. CSP jsou proteiny chladového šoku. Cap jsou proteiny aklimatizační. CIP jsou proteiny chladem indukované. (převzato z Weber a Marahiel 2003)

Vážou se především na ss RNA a DNA a působí jako chaperony za nízkých teplot (viz Obr. 5). Udržují mRNA v lineární formě, aby na ni mohly nasedat ribosomy. Chlad by bez jejich působení způsoboval sekundární struktury na mRNA, takže by byl znemožněn kontakt s ribosomy a translace. Oblast, na kterou se CSP navazují, je bohatá na pyrimidiny.



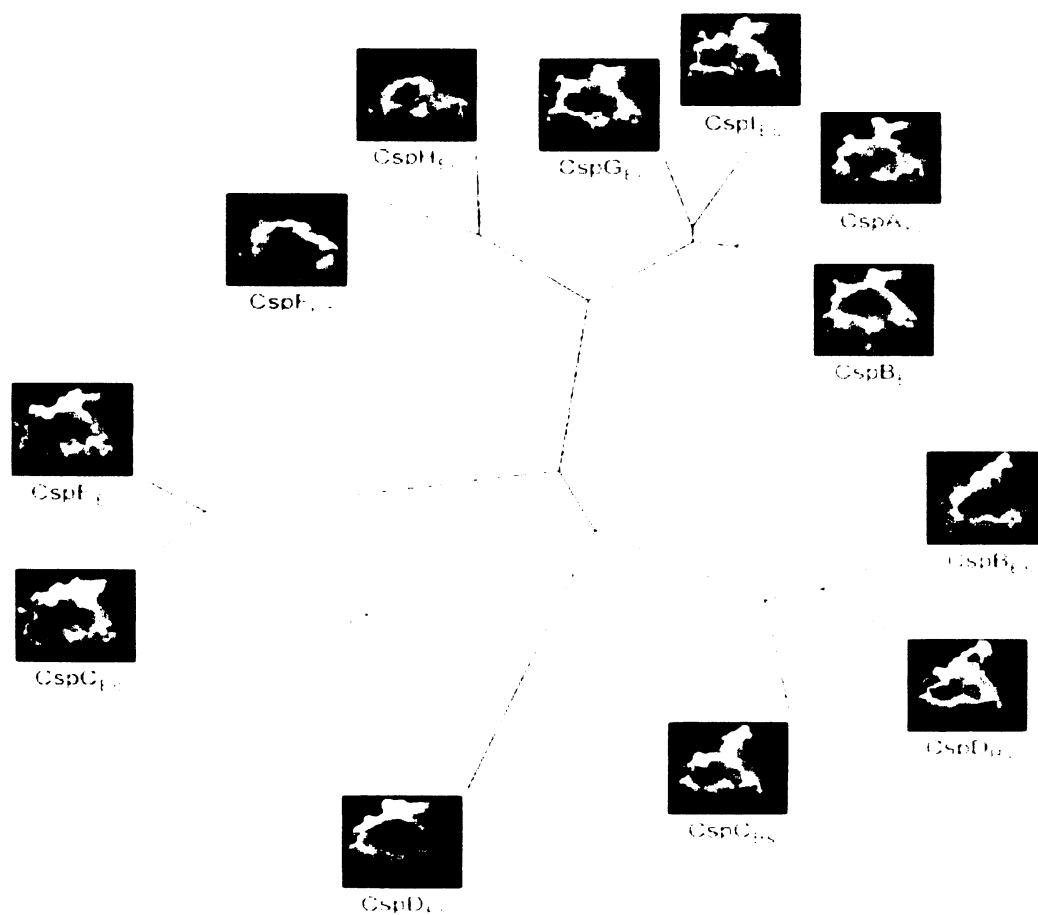
Obr. 5 Model působení CSP jako mRNA chaperonů, které spojují transkripci s translací. Při 37° mají CSP malou afinitu k mRNA. Po chladovém (či jiném stresu) se afinita těchto proteinů zvyšuje a dochází ke vazbě CSP na mRNA. CSP svým působením ochraňují mRNA před vznikem vlásenek. (převzato z Graumann a Marahiel 1998)

Zvýšení jejich množství v buňce po chladovém šoku je způsobeno jednak častějším přepisem genů pro CSP a jednak zvýšenou stabilitou mRNA pro tyto proteiny za nízkých teplot. Regulace exprese proteinů chladového šoku probíhá na úrovni transkripční a post-transkripční. To potvrzují studie prováděné na genomu, transkriptomu a proteomu. Při těchto regulacích působí jak aktivátory tak represory transkripce. Některé z nich jsou specifické pro určitý gen, jiné mají širší spektrum působení.

3.4.4.1 Struktura CSP

CSP jsou malé, nukleovou kyselinu vázající proteiny, velikosti kolem 70 aminokyselin. Jsou kyselé a velmi hydrofilní (Goldstein *et al.* 1990). CSP různých organismů sdílejí velice podobnou strukturu, jelikož všechny vznikly z duplikovaného genu *cspA*. Skládají se z pěti β listů, které tvoří β barel. Mají vyšší stabilitu *in vivo* díky vazbě na nukleovou kyselinu než *in vitro* (Schindler *et al.* 1999). CSP jsou mezi prvními proteiny indukovanými po chladovém šoku a jejich produkce se zvyšuje

při snížení úrovně (p)ppGpp v buňce (Jones *et al.* 1992a) a pravděpodobně reagují i na další signály. Obsahují tzv. doménu chladového šoku (cold shock domain, CSD), která je vysoce konzervovaná v genomu organismů počínaje bakteriemi a člověkem konče (Wistow 1990, Schindelin *et al.* 1993). V této doméně lze rozlišit dva motivy (RNP-1 a RNP-2), které se vážou na DNA (Landsman 1992). Díky těmto motivům mohou CSP ovlivňovat transkripci.



Obr. 6 Fylogenetický strom rodiny CSP *B. subtilis* (Bs) a *E. coli* (Ec). (převzato z Weber a Marahiel 2003)

3.4.4.2 CSP u *E. coli*

U *E. coli* bylo zatím bylo nalezeno více než 15 CSP. Nejlépe prozkoumaný je CspA. Byla studována jeho struktura, funkce, regulace na úrovni transkripce, translace i stabilita mRNA. Homology tohoto proteinu byly nalezeny v mnoha bakteriích kromě archebakterií a sinic. V případě *E. coli* nalzáme homologů devět (CspA – CspI), ale ne

všechny jsou indukovány chladem. Po chladovém šoku dochází k tvorbě proteinů CspA, CspB, CspG, CspI. CSP této bakterie dělíme do dvou skupin dle rozsahu exprese po chladovém šoku. Do první skupiny patří ty, jejichž produkce je nízká při 37°C a po šoku velmi rychle vzrůstá (více než 10x). Do druhé skupiny řadíme ty, jejichž exprese nevzrůstá tak výrazně (Thieringer *et al.* 1998).

CspA je zástupcem první skupiny. Spolu s ním sem řadíme CspB, CspG a patří sem rovněž proteiny CsdA, RbfA, NusA a PNP (Thieringer *et al.* 1998) (viz 2.4.4.2.3).

Do druhé skupiny podle stejného autora můžeme počítat rekombinační faktor RecA. RecA nalézáme při jakýchkoli stresových reakcích buňky. Ovlivňuje superhelicitu DNA (La Teana *et al.* 1991). Dále iniciační faktor IF-2, který váže nabitě tRNA (konkrétně tRNA pro formylmethionin) k 30S podjednotce ribosomu, čímž umožňuje zahájení translace. Dalším členem této skupiny je DNA vázající faktor H-NS a GyrA (podjednotka gyrasy). Poslední dva jmenované jsou schopné ovlivnit konformaci DNA, a to tím způsobem, že zvyšují počet negativních nadobrátek (Jones *et al.* 1992b, La Teana *et al.* 1991). Dalším proteinem této skupiny je TF, který je indukován po chladovém šoku a zvyšuje životaschopnost buňky (Kandror a Goldberg 1997). Působí při syntéze a skládání proteinů (viz 2.4.2). Byly identifikovány ještě další proteiny, které se v buňce po chladovém šoku objevují, ale jejich funkce je buď neznámá, nebo ji považujeme za méně významnou.

Všechny CSP, které v buňce nalézáme po chladovém šoku, jsou překládány ribosomy, které nejsou na chlad adaptovány. Neadaptované ribosomy jsou schopny překládat jen mRNA pro CSP. Tyto proteiny následně pomáhají ribosomy adaptovat.

3.4.4.2.1 Regulace CSP na úrovni transkripce u *E. coli*

Regulace na úrovni transkripce probíhá převážně na základě stability mRNA. Tato stabilita se mění při různých teplotách.

Přepisem genu *cspA* vzniká mRNA, která je vysoce nestabilní při 37°C a naopak velmi stabilní při 15°C.

Geny pro CspA, CspB, CspG a CspI obsahují vysoce konzervovanou 5' nepřekládanou oblast (5'- UTR), která stabilizuje jejich mRNA za nízkých teplot. Tato oblast obsahuje 11 unikátních bazí (UGAGGUACAGA), nazývaných „cold box“ (Xia *et al.* 2001). Ten je pravděpodobně zapojen do potlačení přepisu genu *cspA*, a to

tak, že předčasně ukončí transkripci (Bae *et al.* 1997). To se stane při aklimatizační fázi nebo za běžné kultivační teploty, kdy se CspA váže na svou vlastní mRNA a destabilizuje elongační komplex. Pokud je tato oblast deletována, dochází k produkci CspA i za běžných kultivačních podmínek (Fang *et al.* 1999).

Dalším místem, které reguluje transkripci, je tzv. UP element („upstream element“). Je to oblast bohatá na AT báze a pozitivně reguluje přepis *cspA* genu (Graumann *et al.* 1997).

3.4.4.2 Regulace CSP na úrovni translace

Během aklimatizační fáze dochází k indukci proteinů asociovaných s ribosomy, např. CsdA a RbfA (zástupci CSP). RbfA se váže na malou podjednotku ribosomu (Jones a Ynouye 1996). Ty nejspíš modifikují translační aparát, aby mohly být i za působení chladu syntetizovány běžné proteiny. V případě CsdA bylo pozorováno, že tento protein destabilizuje dvouvláknové sekundární struktury na mRNA (Jones *et al.* 1996), které jsou stabilnější během nízkých teplot. Pro tuto svou funkci protein nepotřebuje ATP. Díky působení CsdA zůstává mRNA přístupná pro nasednutí ribosomu a dalších faktorů a CsdA tedy ulehčuje iniciaci translace. Platí to například pro *cspA* transkript. Ribosom vázající faktor RbfA naopak přímo působí na konformaci ribosomu a tím ovlivňuje iniciaci translace. Pomocí těchto proteinů tedy dochází k regulaci více různými cestami. Buňka se adaptuje na chlad a syntéza CsdA a RbfA vede až k obnovení tvorby obvyklých nestresových proteinů.

Existuje oblast, která byla nazvána „downstream box“ (DB). Nachází se 14 bází ve směru průběhu transkripce od iniciačního kodonu daného CSP (popsána byla například u CspA). DB obsahuje 16 bází, pomocí kterých se protein může vázat na rRNA. DB pomáhá při iniciaci translace, a to tak, že se váže na 16S rRNA do preiniciačního komplexu. Na existenci downstream boxu existují různé názory. Dle posledních publikovaných údajů (2006) však zřejmě DB nemá regulační význam.

Byla navržena i koncepce tzv. „upstream box“ na 16S RNA na základě toho, že byly provedeny delece v této oblasti. Je lokalizován 11 bází od Shine Dalgarnovy sekvence. Pravděpodobně uspořádává sekundární struktury mRNA za různých teplot a zvyšuje efektivitu translace za nízkých teplot (Yamanaka *et al.* 1999).

3.4.4.2.3 CSP vyskytující se u *E. coli*

CspA byl objeven jako první ze všech CSP, už v roce 1987. Po přesunu kultury z 37°C do prostředí o 10°C byla jeho exprese zvýšena více než 30x (Jones *et al.* 1987). Maximální hodnoty dosahuje produkce tohoto proteinu 2h po chladovém šoku. Je to hlavní protein chladového šoku u *E. coli*. Skládá se z 70 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost je 7,4kDa (Goldstein *et al.* 1990). V primární struktuře byly lokalizovány 2 motivy, s převážně aromatickými a bazickými AK, vážící RNA (RNP-1 a RNP-2). Nacházejí se na $\beta 2$ a $\beta 3$ listu. To umožňuje tomuto proteinu měnit konformace RNA a ovlivňovat transkripci. Působí jako chaperon mRNA a transkripční aktivátor (minimálně pro *gyrA* a *hns*) (Jones *et al.* 1992b, La Teana *et al.* 1991, Brandi *et al.* 1994). CspA působí jako transkripční svůj vlastní terminátor, a to v případě, že se kultivační teplota pohybuje v normálním (stres nevyvolávajícím) rozsahu. Existují názory, že tato represe je zprostředkována HNS. Pokud se účastní HNS, nepůsobí CspA na transkripci *cspA* přímo, ale ovlivňuje množství HNS v buňce. Zvyšuje koncentraci HNS, který následně blokuje transkripci genu *cspA*. CspA má i funkci antiterminátoru (Bae *et al.* 2000).

Pokud v buňce CspA chybí, může být nahrazen zvýšenou indukcí jiného CSP. U kombinovaných delecí, kdy dojde ke ztrátě více CSP, záleží přežití buňky na kombinaci deletovaných proteinů.

Mnohonásobnými duplikacemi genu *cspA* vznikly všechny ostatní proteiny této rodiny (viz Obr. 6). Mají přibližně stejnou velikost a jejich homologie s CspA se pohybuje v rozmezí 40%-80%. Tyto údaje se u různých literárních zdrojů liší, pravděpodobně záleží jak na použitém kmeni bakterie, tak i na metodě výzkumu. Je však jisté, že nejpodobnější je CspB. Každý z takto odvozených genů se účastní některé ze stresových reakcí bakteriální buňky.

CspB a CspG mají stejně jako CspA funkci chaperonů RNA za nízkých teplot.

Mutovaná buňka s delecí čtyř CSP (CspA, CspB, CspE a CspG) je citlivá na chlad a má vláknitý tvar. Ale tento fenotyp může být potlačen zvýšenou expresí kteréhokoli člena CspA rodiny kromě CspD (Xia *et al.* 2001).

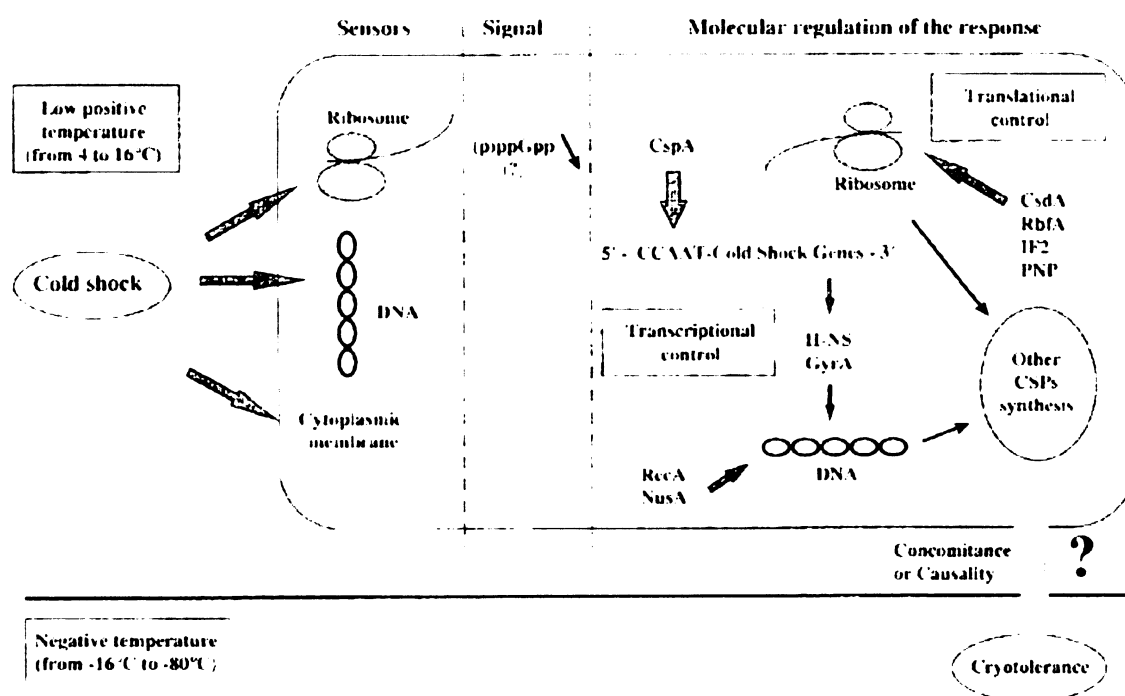
CsdA je protein asociovaný s ribosomy. Má schopnost destabilizovat dvouvláknové sekundární struktury RNA za nízkých teplot. **RbfA** je faktor vážící se

na ribosomy. Po chladovém šoku nastává represe syntézy běžných proteinů. Jako jediné jsou po chladovém šoku syntetizovány CSP. Aby mohl ribosom translatovat proteiny nejen chladového šoku, musí dojít k jeho adaptaci, což umožňují produkty genů *rbfA* a *csdA* (viz Obr. 7). Bylo prokázáno, že limitujícím faktorem pro růst bakterií za nízkých teplot je právě iniciace translace (Broeze *et al.* 1978). RbfA a CsdA právě tento krok translace regulují (viz 2.4.4.2.2).

NusA (N utilization substance A) se účastní terminace i antiterminace transkripce.

PNP má exonukleázovou aktivitu a je tedy schopen degradovat mRNA (Thieringer *et al.* 1998). Ovlivňuje stabilitu mRNA například pro CspA. Nedávno bylo zjištěno, že jeho úloha v buňce je rozsáhlejší, neboť mutantní kmen deficitní na PNP neodpovídá dostatečně efektivně na chlad. Toto zjištění zřejmě platí jen pro *E. coli*.

Z posledních studií vyplývá, že RNasa H je také CSP. Je post-transkripčně regulována aktivitou PNP. RNasa H ovlivňuje životnost ostatních mRNA díky své exonukleázové aktivitě (Cairrão *et al.* 2003).



Obr. 7 Schéma reakce buňky na chladový šok. Změna teploty je registrována různými senzory. Informace se přenáší buňkou pomocí signálu (například (p)ppGpp). Dochází k ovlivnění transkripce a translace. Jsou syntetizovány různé CSP, které adaptují buněčné komponenty na chlad. (převzato z Panoff *et al.* 1998)

CspC není indukován chladem. Funguje jako vícekopiový represor *mukB106* mutanty, která vykazuje defekt při dělení chromosomu. Má i funkci transkripčního antiterminátoru a účastní se regulace faktoru RpoS (Niki *et al.* 1991, Yamanaka *et al.* 1994, Bae *et al.* 2000).

CspD také nepatří mezi chladem indukované proteiny. Je v buňce přítomen při hladovění na glukózu a ve stacionární fázi, kde zastavuje replikaci buňky. Je pozitivně regulován hladinou (p)ppGpp. Nadprodukce CspD je letální. Má i funkci transkripčního antiterminátoru (Yamaka a Inouye 1997, Yamanaka *et al.* 1998, Bae *et al.* 2000, Yamaka *et al.* 2001).

CspE je buňkou produkován stále. Byl původně objeven jako vícekopiový represor *mukB106* mutanty (Yamanaka *et al.* 1994). Později bylo zjištěno, že interaguje s nascentní mRNA a slouží v buňce jako antiterminátor. Zároveň působí jako represor pro *cspA* při 37°C, jelikož interaguje s transkripčním elongačním komplexem (Bae *et al.* 1999). Nedávno bylo objeveno, že CspE váže poly(A) konce různých mRNA a brání 3'→5' exonukleázové aktivitě PNP (Feng *et al.* 2001). Zřejmě má vliv i na odolnost vůči jiným stresům, jelikož reguluje obecný stresový protein RpoS (viz 2.4.5). Celkově tedy tento protein, jakkoli není indukován chladem, hraje v buňce velmi důležitou úlohu. Reguluje translaci i dělení chromosomu v rostoucí buňce.

Homology CspA nazvané CspF a CspH mají dosud neznámou funkci.

3.4.4.3 CSP u *B. subtilis*

Minimální růstová teplota u této mesofilní bakterie se pohybuje mezi 8°C a 9°C na komplexním médiu a mezi 12°C a 13°C na minimálním médiu. Při snížení kultivační teploty z 37°C na 15°C dochází k indukci 37 proteinů. Ty se účastní například transportu glukózy (Hpr), chemotaxe (CheY), translace (ribosomální proteiny S6, L7/L12) nebo sbalování proteinů (peptidyl-prolyl *cis/trans* izomeráza). Dále je indukován gen pro desaturázu mastných kyselin *des*. Buňka produkuje ještě některé další enzymy účastnící se běžného metabolismu. Nejaktivnější odpověď na úrovni genové exprese na chladový stres nastává mezi 1-1,5h po šoku.

V této bakterii byly nalezeny tři homology CspA a to CspB, CspC a CspD. Jsou nezbytné pro účinnou adaptaci na nízké teploty a pro přežití během stacionární fáze.

3.4.4.3.1 Regulace na úrovni transkripce

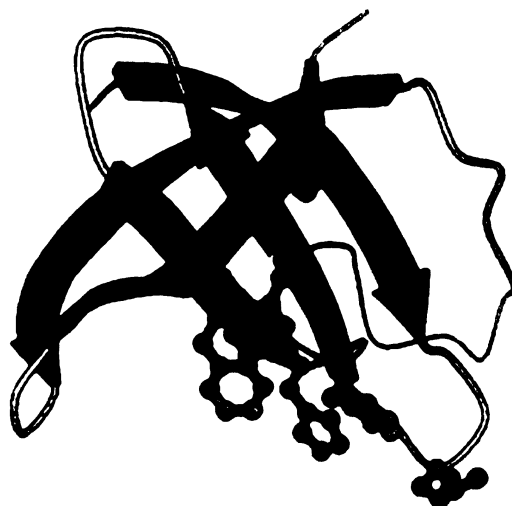
Podobně jako u CspA *E.coli* jsou mRNA proteinů chladového šoku u *B. subtilis* rychle degradované při standardní kultivační teplotě a naopak velmi stabilní při nízkých teplotách. Opět zde hraje vliv 5' nepřekládaná oblast a tzv. „cold box“. CSP a ribosomy nacházíme v místech, která obklopují nukleotid a závisí na aktivní transkripci a současně na struktuře nukleoidu. Pokud není transkripce spojená s translací, k čemuž po chladovém šoku dochází, CSP nalézáme volně v buněčné cytoplazmě (Weber *et al.* 2001b). Kromě vlastních CSP a regulátorů obsažených v genech pro tyto proteiny nalézáme ještě další faktory, které ovlivňují transkripci. Mezi ně patří například histonům podobný protein HBSu.

3.4.4.3.2 Regulace na úrovni translace

B. subtilis má homology genů pro CsdA i RbfA, ale jejich syntéza nebyla dosud prokázána pomocí 2D elektroforéze, pravděpodobně pro jejich příliš bazické vlastnosti. Regulace translace probíhá analogicky regulaci u *E. coli*, jelikož CSP sdílejí mnoho homologních struktur.

3.4.4.3.3 CSP vyskytující se u *B. subtilis*

Pokud jde o důležitost, nejvýznamnějším proteinem chladového šoku u *Bacillus* je CspB (viz Obr. 8), protože jeho delece vede k neschopnosti buňky adekvátně odpovídat na chlad. Tento protein má zároveň vliv na indukci 15 dalších CIP. V jeho struktuře také nalézáme motivy RNP1 a RNP2 jako u *E. coli*. Díky tomu může fungovat jako mRNA chaperon za nízkých teplot. Dále zvyšuje stabilitu komplexu RNA polymerázy a DNA za nízkých teplot, čímž usnadňuje transkripci. Vazba k DNA je umožněna přítomností AATTG sekvence na DNA, na toto místo se protein váže svou CSD (viz 2.4.4.1). CspB zesiluje expresi *hns* (Graumann a Marahiel 1997).



Obr. 8 Třírozměrný model struktury CspB z *B. subtilis*. Pět β listů tvoří β barel. (převzato z Graumann a Marahiel 1996)

Byly identifikovány další dva homology CspB – CspC a CspD. Jejich velikost se pohybuje stejně jako u CspB mezi 7 a 9kDa. Jsou CspB velmi podobné svou strukturou. Jejich homologie k CspB je přes 70%. Dá se tedy očekávat, že budou mít i podobnou funkci v buněčné adaptaci na chlad. Oba dva jsou indukovány snížením teploty. Oba působí jako chaperony mRNA. Udržují ji ve formě přístupné pro ribosom. Odlišují se navzájem tím, kdy po chladovém šoku nastává maximum jejich exprese.

Delece všech tří proteinů je letální i za nestresových podmínek, mají tedy zjevně vliv i na běžné (nestresové) metabolické dráhy a zajišťují efektivní růst buňky. Studium kombinací delečních mutant ve všech třech CSP ukázalo, že alespoň jeden z proteinů je esenciální pro přežití za normálních podmínek stejně jako za nízkých teplot (Graumann *et al.* 1997).

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

3.4.5 Nekódující RNA, alternativní sigma faktory, PNP, faktory RelA/SpoT, Y protein

Existují další úrovně, na kterých dochází ke chladové adaptaci. S největší pravděpodobností budou nalezeny ještě další, dosud neznámé regulační systémy.

Dochází k regulaci na úrovni transkripce díky alternativním sigma faktorům. Na post-transkripční úrovni reguluje odpověď buňky PNP. Na úrovni translace regulují buněčné děje nekódující RNA, faktory RelA/SpoT a protein Y.

Nekódující RNA modifikují translaci. Zároveň je jejich produkce buňkou závislá na teplotě. Přinejmenším to platí pro *micF* a *dsrA*, které ovlivňují translaci většího počtu mRNA kódujících vnější membránový protein u *E. coli* a sigma faktor během stacionární fáze (Delihias a Forst 2001, Lease a Belfort 2000). Chladová stimulace promotoru genu *dsrA* vede k jeho aktivaci a vznikající mRNA je výrazně stabilnější než při 37°C (Repoila a Gottesman 2001). DsrA působí jako represor na translaci *hns*. Na konci chladové adaptace však přestává být translace *hns* reprimována. Pravděpodobně je to způsobeno interakcí *hns* mRNA s CspA, jehož koncentrace je v této fázi již velmi vysoká. DsrA zároveň stimuluje ke zvýšené translaci mRNA proteinu RpoS. **Alternativní sigma faktory** RpoS a SigB jsou obecně působící regulátory. RpoS je vysoce nestabilní protein, jehož degradace je inhibována stresovými signály. Proto má obecný účinek při stresu jakéhokoli původu. V rámci chladové adaptace RpoS působí v kaskádě reakcí vedoucích k syntéze trehalózy (Kandror *et al.* 2002) (viz 2.4.1). SigB má vliv mimo jiné i na adaptaci buňky na růst při nízké teplotě. Tento regulátor se u *B. subtilis* účastní indukce 40% genů, které buňka vytváří při chladové adaptaci (Budde *et al.* 2006). Účastní se také kaskády reakcí, které fosforylují sporulační faktor Spo0A.

PNP (polynukleotid fosforyláza) selektivně ovlivňuje stabilitu mnoha mRNA díky své exonukleázové aktivitě. Účastní se i degradace mRNA pro jednotlivé proteiny CSP. Exprese PNP koreluje se snížením množství mRNAs pro CSP (Yamanaka a Inouye 2001) a opětovným růstem buňky na konci aklimační fáze.

Faktory **RelA/SpoT** určují hladinu (p)ppGpp a v závislosti na stavu translačního aparátu. RelA syntetizuje (p)ppGpp a SpoT ho hydrolyzuje. Pokud *E. coli* nemá dostatek aminokyselin pro výrobu proteinů, vzrůstá v buňce množství nenabitých tRNA. Pokud se takováto tRNA dostane na A-místo ribosomu, dochází k zastavení syntézy proteinu. Na to reaguje faktor RelA, který se pohybuje od jednoho nefungujícího ribosomu k druhému a umožňuje syntézu (p)ppGpp, který se váže na klíčové enzymy jako je RNA polymeráza a mění genovou expresi (Cashel *et al.* 1996, Wendrich *et al.* 2002). Tato regulace se nazývá „stringent response“. Až na několik výjimek lze tuto regulační dráhu pozorovat u většiny gram pozitivních

i gramnegativních bakterií. U mutanta, které chybí RelA a SpoT, není schopna tvořit (p)ppGpp. To vede k vyšší indukci CSP po chladovém šoku (Jones *et al.* 1992a).

Agafonov *et al.* (2001) popisuje nově objevený protein v *E. coli* nazvaný Y (další označení také PY, Yfia). Váže se k ribosomu za stresových podmínek a inhibuje translaci. Brání totiž vazbě A-místa ribosomu „k nabitě“ aminoacyl-tRNA. Tato jeho schopnost může být potlačena proteiny chladového šoku, jako je CspA. Tento regulační mechanismus se zdá být jedním z důvodů potlačení genové exprese, pokud se buňka dostane do chladnějšího prostředí.

3.5 Vliv chladu na sporulaci

Některé bakterie jako například *B. subtilis* mají schopnost tvořit za nepříznivých podmínek endospóry. Buňka přistupuje k tvorbě endospór při hladovění, nedostatku vody či různých jiných stresových podmínkách. Transformace v endospóru vyžaduje změnu genové exprese.

Vliv chladu na sporulaci není dosud přesně prozkoumán. Jisté je jen to, že buňka neuniká chladovému stresu přeměnou v endospóru. Je to zřejmě proto, že chlad ovlivní klíčové enzymy nutné pro tuto přeměnu. Schopnost bakterie sporulovat se však neztrácí, po opětovném zvýšení kultivační teploty (a při působení potřebných signálů) buňka normálně zahájí sporulaci.

Pokud je v bakterii provedena delece genů pro CSP (v různých kombinacích – *cspB* a *cspC*, *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).

4. Možnosti dalšího výzkumu a závěr

Chování buňky při snížené teplotě jistě zasluhuje pozornost, protože teplota je velmi snadno ovlivnitelný parametr během kultivace bakterií. Řada mechanismů chladové adaptace dosud není známa. Mikrobiální buňka má pravděpodobně více senzorů, které ji informují o chladu, než bylo dosud popsáno. Jedněmi z nich by mohly být karotenoidy v membránách. Zatím nebyly identifikovány všechny chladem indukované geny. Nejsou dopodrobna popsány veškeré interakce CSP s ostatními regulačními komponentami buňky, ani funkce CSP v jiných bakteriích. Další pozornost

si zaslouží regulace transkripce. V regulaci translačního aparátu není zatím přesně popsána role (p)ppGpp, známa je ponejvíce v *E. coli*. Nedostatečné znalosti jsou i v oblasti chemotaktického aparátu při nízkých teplotách. Dosud nebyly prozkoumány ani energetické poměry v bakteriální buňce při chladové adaptaci. Zajímavé by mohly být informace o poměru ATP:ADP a úrovni GTP. Množství těchto látek přítomných v buňce by mohlo vypovídat o metabolické aktivitě, případně sloužit i jako signál k regulaci genové exprese.

Kromě porozumění buněčným dějům zaslouží pozornost i výzkum jejich uplatnění. V genovém inženýrství by bylo velmi výhodné používat teplotu jako spouštěče transkripce určitého genu. Teplota je velmi jednoduše ovlivnitelná, v jakémkoli biotechnologickém provozu. Z tohoto důvodu se zkoumají iniciační faktory transkripce, které by reagovaly na chlad. Jako příklad uvádím využití DesK-DesR operonu. V roce 2007 zkonstruovali Le a Schumann chladem indukovaný expresní systém pro *B. subtilis*, využívající *des* promotor. Jeho praktické využití je možné při produkci rekombinantních proteinů jako varianta k použití IPTG. Další uplatnění může být v potravinářství. Přesné pochopení teplotních adaptací u bakterií může vést ke zvýšení množství fermentujících a omezení počtu patogenních bakterií v mléčných výrobcích. Dosud není přesně znám vliv chladu na sporulaci. Výzkum v této oblasti by byl velmi prospěšný, neboť bakteriální spóra je extrémně odolná a snadno se šíří.

5. Citovaná literatura

- Agafonov, D. E., Kolb, V. A. & Spirin, A. S. (2001): Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Rep.* **2**: p. 399–402.
- 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*. *EMBO J.* **20**: p. 1681–1691.
- Bae, W., Jones, P. G. & Inouye, M. (1997): CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression. *J. Bacteriol.* **179**: p. 7081–7088.
- Bae, W., Phadtare, S., Severinov, K. & Inouye, M. (1999): Characterization of *Escherichia coli* cspE, whose product negatively regulates transcription of cspA, the gene for the major cold shock protein. *Molec. Microbiol.* **31**: p. 1429–1441.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M. & Severinov, K. (2000): *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**: p. 7784–7789.
- Brandi, A., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1994): Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with promoter region of hns. *Biochimie* **76**: p. 1090–1098.
- 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.
- Broeze, R., Solomon, C. J. & Pope, D. H. (1978): Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **134**: p. 861–874.
- 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.
- Cairrão, F., Cruz, A., Mori, H. & Arraiano, C. M. (2003): Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Molec. Microbiol.* **50**: p. 1349–1360.
- Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J. & Vinella, D. (1996): The stringent response. In: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (eds.): *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. p. 1458–1496.
- de Mendoza, D., Grau, R. & Cronan jr., J. E. (1993): Biosynthesis and function of membrane lipids. In: Sonstein, A. L., Hoch, J. A. and 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.
- Delihis, N. & Forst, S. (2001): MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J. Mol. Biol.* **313**: p. 1–12.
- Eriksson, S., Hurme, R. & Rhen, M. (2002): Low temperature sensors in bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357**: p. 887–893.
- Etchegaray, J. P. & Inouye, M. (1999): CspA, CspB and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. *J. Bacteriol.* **181**: p. 1827–1830.

- Fang, L., Xia, B. & Inouye, M. (1999): Transcription of *cspA*, the gene for the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is negatively regulated at 37 degrees C by the 5'-untranslated region of its mRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: p. 39–43.
- Feng, Y., Huang, H., Liao, J. & Cohen, S. N. (2001): *Escherichia coli* Poly(A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E. *J. Biol. Chem.* **276**: p. 31651–31656.
- Fischer, G., Tradler, T. & Zarnt, T. (1998): The mode of action of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases *in vivo*: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* **426**: p. 17–20.
- Goldstein, J., Pollitt, N. S. & Inouye, M. (1990): Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(1): p. 283–287.
- Graumann, P., & Marahiel, M. A. (1996): A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays* **18**: p. 309–315.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R. & Marahiel, M. A. (1996): Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**: p. 4611–4619.
- Graumann, P. & 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., 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.
- 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. & Marahiel, M. A. (1999): Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: p. 203–209.
- Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K. & Yamane, K. (2000): Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a twodimensional protein electrophoretic study. *Microbiology* **146**: p. 65–75.
- Jones, P. G., VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1987): Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: p. 2092–2095.
- Jones, P. G., Cashel, M., Glaser, G. & Neidhardt, F. C. (1992a): Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: p. 3903–3914.
- Jones, P. G., Krah, R., Tafuri, S. R. & Wolffe, A. P. (1992b): DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: p. 5798–5802.
- Jones, P. G. & Inouye, M. (1996): RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* **21**: p. 1207–1218.
- 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. USA* **93**: p. 76–80.
- Kandror, O. & Goldberg, A. L. (1997): Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**: p. 4978–4981.
- Kandror, O., DeLeon, A. & Goldberg, A. L. (2002): Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: p. 9727–9732.

- 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.
- McElhane, 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.
- 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.
- La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1991): Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: p. 10907-10911.
- Landsman, D. (1992): RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Res.* **20**: p. 2861–2864.
- Le, A. T. T. & Schumann, W. (2007): A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification* **53**: p. 364-269
- Lease, R. A. & Belfort, M. (2000): Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Mol. Microbiol.* **38**: p. 667–672.
- Lee, H. C. & Bernstein, H. D. (2002): Trigger factor retards protein export in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **277**: p. 43527–43535.
- Los, D. A. & Murata, N. (2004): Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta* **1666**: p. 142–157
- Niki, H., Jaffe, A., Imamura, R., Ogura, T. & Hiraga, S. (1991): The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* **10**: p. 183–193.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., Guéguen, M. & Boutibonnes, P. (1998): Cold stress response in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**: p. 75–83
- Phadtare, S., Yamanaka, K. & Inouye, M. (2000): The Cold Shock Response. In: Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.): *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington D.C.
- Repoila, F. & Gottesman, S. (2001): Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J. Bacteriol.* **183**: p. 4012-4023.
- Schindelin, H., Marahiel, M. A. & Heinemann, U. (1993): Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major coldshock protein. *Nature* **364**: p. 164–168.
- Schindler, T., Graumann, P. L., Perl, D., Ma, S., Schmid, F. X. & Marahiel, M. A. (1999): The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*. Stability and dynamics *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **274**: p. 3407–3413.
- Schumann, W. (2002): Cold Shock Response in Microorganisms. *The Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London / www.els.net
- Shaw, M. K. & Ingraham, J. L. (1967): Synthesis of Macromolecules by *Escherichia coli* near the Minimal Temperature for Growth. *J. Bacteriol.* **94**: p. 157–164.
- Stoller, G., Rucknagel, K. P., Nierhaus, K. H., Schmid, F. X., Fischer, G. & Rahfeld, J. U. (1995): A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* **14**: p. 4939–4948.

- Thieringer, H. A., Jones, P. G. & Inouye, M. (1998): Cold shock and adaptation. *Bioassays* **20**: p. 49–57.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2000): Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: p. 515–547.
- VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1990): Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: p. 5589–5593.
- Weber, M. H. W., 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., 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.
- Weber, M. H. & Marahiel, M. A. (2002): Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* **357**: p. 895–907
- Weber, M. H. W., 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. & Marahiel, M. A. (2003): Bacterial cold shock response. *Science Progress* **86**: p. 9–75
- 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**: p. 779–788.
- 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.
- Wistow, G. (1990): Cold shock and DNA binding. *Nature* **344**: p. 823–824.
- Xia, B., Ke, H. & Inouye, M. (2001): Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the CspA family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**: p. 179–188.
- Yamanaka, K., Mitani, T., Ogura, T., Niki, H. & Hiraga, S. (1994): Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**: p. 301–312.
- Yamanaka, K. & Inouye, M. (1997): Growth-phase-dependent expression of *cspD*, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: p. 5126–5130.
- Yamanaka, K., Fang, L. & Inouye, M. (1998): The CspA family in *Escherichia coli*: Multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.* **27**: p. 247–255.
- Yamanaka, K., Mitta, M. & Inouye, M. (1999): Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: p. 6284–6291.
- Yamanaka, K. & Inouye, M. (2001): Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: p. 2808–2816.
- Yamanaka, K., Zheng, W., Crooke, E., Wang, Y. H. & Inouye, M. (2001): CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **39**: p. 1572–1584.