

UNIVERZITA KARLOVA Fysiologie rostlin,
patologie, biologie, mikrobiologie a genetiky.
Přírodovědecká fakulta UK
228 48 Praha 2, Viničná 5

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Regulace obecné stresové odpovědi u *Bacillus subtilis*

Regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis*

Miroslava Petrovová

Školitel: RNDr. Irena Lichá, CSc.

2007 / 2008

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Dr. Ireny Liché s použitím pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze 23.4.2008

Miroslava Pěková

Děkuji Ireně Liché za věnovaný čas, pomoc a ochotu a své rodině za podporu a zázemí.

Obsah

Abstrakt a klíčová slova	5
1. Úvod	6
2. σ^B faktor	7
3. Obecná stresová odpověď	10
3.1. Vnější stres	10
3.2. Hladovění	12
3.3. Funkce obecné stresové odpovědi	14
4. Srovnání σ^B -závislé odpovědi u dalších vybraných grampozitivních bakterií	16
5. Závěr	18
Přehled použité literatury	19

Abstrakt

σ^B faktor řídí transkripci regulonu s více než 150 geny obecného stresu. Aktivita σ^B faktoru je regulována třemi signálními drahami, které odpovídají na vnější stres, hladovění a nízkou teplotu. Během přenosu signálu se uplatňuje tzv. mechanismus partnerského přepínání. Většina ze 150 genů obecného stresu kóduje proteiny s dosud neznámými funkcemi. Předpokládá se, že přispívají k ochraně a opravě buněčných struktur. Obecná stresová odpověď u *B. subtilis* vede k rozvoji mnohonásobné, nespecifické a preventivní stresové rezistence, u příbuzných patogenů může také kontrolovat virulenci.

Klíčová slova

Bacillus subtilis, σ^B faktor, obecná stresová odpověď, vnější stres, hladovění, mechanismus partnerského přepínání

Abstract

σ^B factor controls the transcription of a regulon with more than 150 general stress genes. The activity of σ^B factor is regulated by three signaling pathways that respond to environmental stress, starvation and low temperature. The signal transmission functions via a partner switching mechanism. Most of the 150 general stress genes code for proteins with still-unknown functions. It is assumed that they contribute to the protection and repairing cell structures. The general stress response in *B. subtilis* leads to the development of a multiple, nonspecific and preventive stress resistance, in related pathogens also might control the virulence.

Key words

Bacillus subtilis, σ^B factor, general stress response, environmental stress, starvation, partner switching mechanism

1. Úvod

Bacillus subtilis, jako modelový představitel půdních grampozitivních bakterií, musí v půdě čelit častým změnám podmínek, které mnohdy ohrožují jeho růst. Možná z tohoto důvodu si *B. subtilis* vytvořil vedle sporulace další způsob vyrovnání se se stresy – obecnou stresovou odpověď, na niž je zaměřena tato bakalářská práce. Obecná stresová odpověď vede k expresi sady genů, jejichž hlavním regulátorem je σ^B faktor.

V roce 1997 publikovali Bernhardt et al. výsledky dvourozměrné polyakrylamidové elektroforézy, kde sledovali změny v proteosyntéze u divokého kmene *B. subtilis* a σ^B mutanta při odpovědi na teplotní šok, solný a ethanolový stres a při hladovění na glukózu nebo fosfát. Těmito pokusy zjistili, že nejméně 42 proteinů obecného stresu je absolutně závislých na σ^B faktoru. Samotný σ^B byl objeven již o mnoho let dříve Haldenwangem a Losickem. V roce 1979 vyšel jejich článek v časopise Nature, kde popisovali použití *ctc* a *spoVG* genů jako templátů pro in vitro transkripci. V té době se *spoVG* nazýval "0,4 kb" genem, byl neznámé funkce a vybrali ho kvůli vyšší expresi ve sporulující buňce. *ctc* gen je také neznámé funkce a leží vedle *spoVG*. V této průkopnické studii Haldenwang a Losick zjistili, že σ^B dokáže řídit RNA polymerázu k transkripci *spoVG* a *ctc* genů in vitro, zatímco σ^A , hlavní σ faktor *B. subtilis*, to nedokáže. Na základě těchto výsledků se předpokládalo, že činnost σ^B souvisí se sporulací. Avšak další výzkumy ukázaly, že σ^B mutanti neměli zjevný růstový nebo sporulační fenotyp při standardních laboratorních podmínkách. Také zatímco *ctc* exprese byla in vivo závislá na σ^B , exprese *spoVG* genu byla σ^B -nezávislá. Záhadná fyziologická úloha σ^B faktoru byla vyřešena objevem proteinů obecného stresu Heckerem a spolupracovníky v roce 1987. Převzato z review Price (2000).

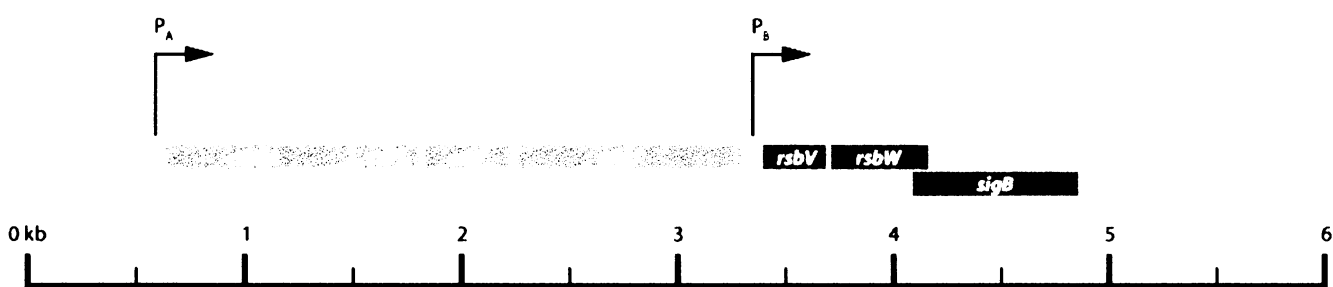
2. σ^B faktor

σ^B je prvním alternativním faktorem objeveným u *Bacillus subtilis* (Haldenwang, 1995). Mnoha pokusy bylo zjištěno, že ztráta σ^B faktoru vede k citlivosti na různé typy stresů, mezi které patří vysoká a nízká teplota, osmotický, ethanolový, oxidační a kyselý stres, přidání některých antibiotik, hladovění na glukózu, fosfát a kyslík a modré světlo (Benson et al., 1993, Boylan et al., 1993, Price, 2000, Gaidenko et al., 2006, Mascher et al. 2003). σ^B mutanti jsou například až tisíckrát citlivější k teplotnímu stresu, 50-200krát citlivější k solnému stresu a vykazují 50-100 násobný pokles v přežití při hodinovém kyselém nebo ethanolovém šoku než divoký kmen (Völker et al., 1999). U divokého kmene tyto stresy vyvolávají indukci velkého počtu proteinů obecného stresu, z nichž většina leží v regulonu, který je jedním z největších u *B. subtilis* (Petersohn et al., 2001). Hlavním regulátorem tohoto regulonu je σ^B faktor, ale mnoho genů je pod kontrolou dalších σ faktorů, což umožňuje širokou regulační obšírnost (Hecker, Völker, 1998). Typickým příkladem jsou geny teplotního stresu, jejichž transkripce je indukována nejméně třemi mechanismy (Hecker et al., 1996). Třída I neboli specifické proteiny teplotního stresu jsou indukovány buď teplotním stresem nebo ethanolem. Do této skupiny patří chaperony GroEL, GroES, DnaK, DnaJ a GrpE. Operon, ve kterém leží geny pro GroEL a GroES, a operon s genem pro DnaK tvoří tzv. CIRCE (for controlling inverted repeat of chaperone expression) regulon, který je pod negativní kontrolou HrcA represoru. Expresse těchto genů je řízena σ^A faktorem (Mogk et al., 1998). Indukce genů teplotního stresu II. třídy je zcela pod kontrolou σ^B , je tedy spouštěna dalšími vnějšími stresy a hladověním (Hecker, Völker, 1998). Tyto geny mají často druhý promotor, který je rozeznáván dalšími σ faktory - nejčastěji σ^A , ale také σ^F (Petersohn et al., 1999), σ^H (Drzewiecki et al., 1998) a σ^X (Huang, Helmann, 1998). Teplotní šok indukuje ještě III. třídu genů, které jsou nezávislé na CIRCE/HrcA a σ^B kontroly (Hecker et al., 1996). Transkripce těchto genů je také spouštěna dalšími stresovými podmínkami, nikoliv však hladověním (Hecker, Völker, 1998).

V σ^B regulonu leží geny pro více než 150 proteinů, u většiny z nich však dosud není známa jejich funkce. Předpokládá se, že jejich úloha spočívá v ochraně DNA, proteinů a lipidů proti škodlivým účinkům stresů, zejména proti reaktivnímu kyslíku, a v jejich opravě (Price, 2000). Pouze u přibližně 20 proteinů je jasně definováno jejich působení. Mezi ně patří proteiny rezistence na oxidační stimuly (KatB, KatX, Dps, OhrB, TrxA), na osmotický stres, které jsou zodpovědné za příjem kompatibilních solutů (OpuD, OpuE), rezistence na teplotní

šok (ClpC, ClpP), proteiny antibiotikové rezistence, chladové rezistence a proteiny buněčné membrány (Hecker et al., 2001, Price, 2000).

Gen pro σ^B leží v operonu tvořeném osmi geny. Geny z tohoto operonu postranslačně regulují σ^B aktivitu. Transkripce operonu je řízena ze dvou promotorů, které jsou rozeznávány σ^A -like a σ^B faktory (Price, 2000). Proteiny tří genů transkribovaných spolu se strukturálním genem pro σ^B , RsbV, RsbW a RsbX, primárně regulují hladinu volného σ^B faktoru v buňce.

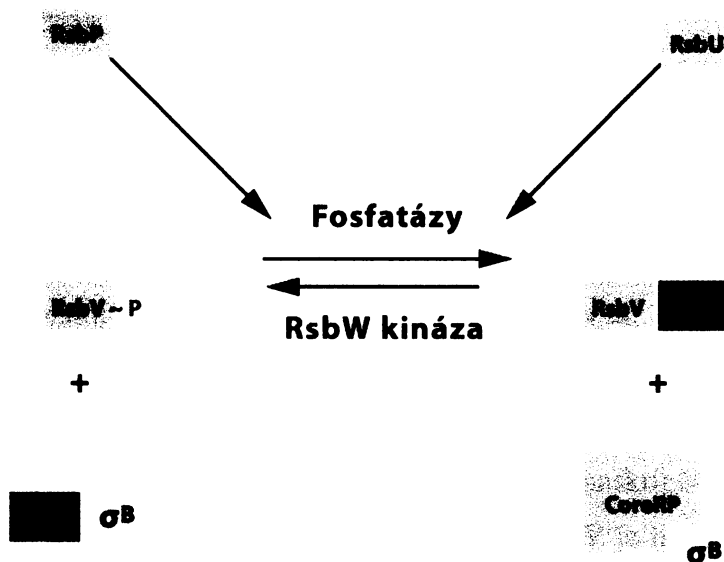


Obr. 1: Schéma operonu s genem pro σ^B faktor. Transkripce z σ^A -like-závislého promotoru (P_A) zajišťuje nízkou hladinu σ^B faktoru i během nestresového růstu. Produkty modře znázorněných genů patří do větve odpovědi na vnější stres. Geny označené červeně kódují regulátory společné pro vnější i energetický stres. Fosfatáza RsbX (Rsb znamená „regulator of sigmaB“) je transkripčně spojená se σ^B faktorem. Převzato z Hecker et al. (2007) a Price (2000).

Při nestresovém exponenciálním růstu je σ^B inaktivován, protože tvoří stabilní komplex s RsbW, který brání jeho navázání na core RNA polymerázy (Benson et al., 1993). RsbW je proto nazýván „anti- σ faktorem“ a kromě této funkce je také serinovou proteinkinázou, jež specificky fosforyluje „anti-anti- σ faktor“ RsbV, který je esenciální pro aktivaci σ^B -závislé transkripce, na jeho serinovém zbytku, a tím ho umlčuje (Dufour, Haldenwang, 1994). U *rsbW* mutantů byla sledována exprese σ^B -závislých proteinů obecné stresové odpovědi i během exponenciálního růstu, proto byl značně omezen jejich růst (Price, 2000).

Uvolnění σ^B faktoru z inhibičního RsbW/ σ^B komplexu nastává v případě, když je RsbV protein defosforylován jednou ze dvou RsbV~P specifických PP2C fosfatáz, a to buď fosfatázou RsbP v případě energetického stresu, nebo RsbU fosfatázou v případě vnějšího stresu. Defosforylovaný RsbV váže RsbW, a tím dochází k uvolnění σ^B (Vijay et al., 2000). Tento mechanismus, kdy RsbW přepíná své vazebné partnery, byl nazván „mechanismem partnerského přepínání“ (Alper et al., 1996). *rsbV* mutanti neaktivují σ^B v odpověď na vnější

stres nebo hladovění, protože je u nich σ^B neustále inhibován proteinem RsbW (Völker et al., 1995).



Obr. 2: Schéma aktivace σ^B faktoru. Červeně znázorněný anti- σ faktor RsbW přepíná své vazebné partnery. Při stresu je RsbV defosforylován a váže inhibitor σ^B faktoru. Částečně převzato z Hecker et al. (2007).

K aktivaci σ^B faktoru dochází třemi rozdílnými signálními cestami, z toho jsou dvě indukovány širokými škálami stresů: 1) energetickými stresy způsobenými hladověním na glukózu, fosfát a kyslík nebo přidáním oxidačních činidel do živného média, 2) vnějšími stresy jako jsou kyselý, ethanolový, teplotní, osmotický stres nebo modré světlo. Tyto dvě třídy stresových signálů jsou vedeny k σ^B oddělenými signálními drahami, které se sbíhají na RsbV anti-anti- σ faktoru (Kim et al., 2004).

3. Obecná stresová odpověď

3.1. Vnější stres

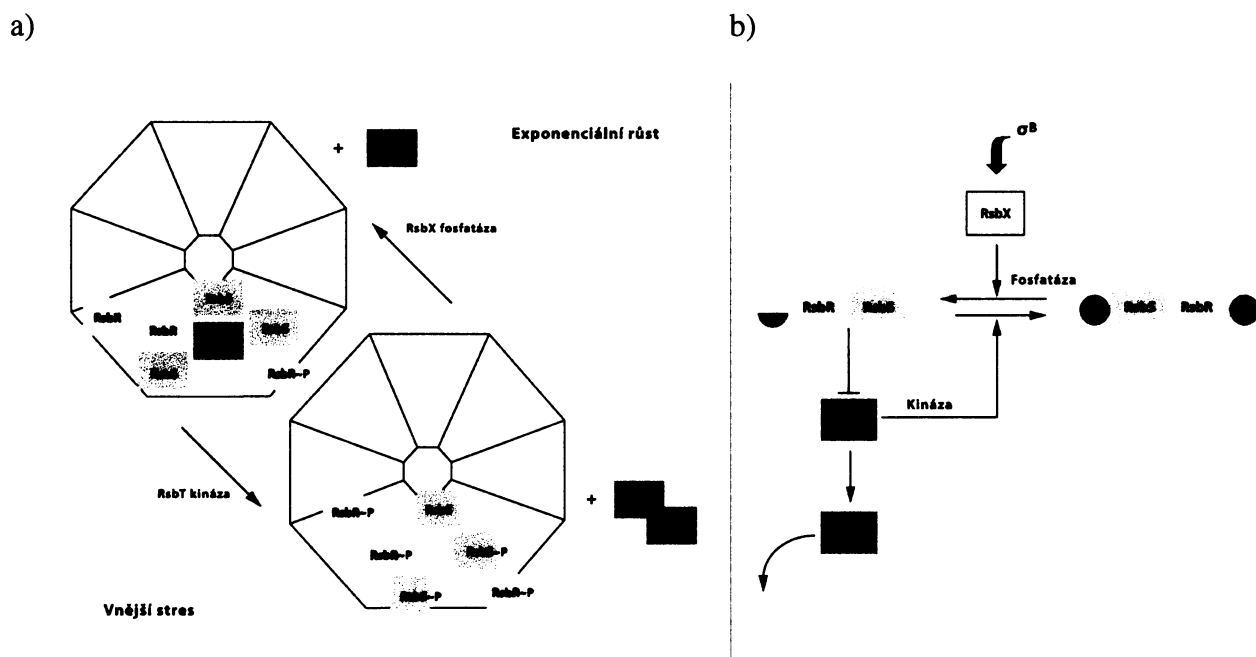
Při vnějším stresu je RsbV~P defosforylován PP2C fosfatázou RsbU. To bylo dokázáno na *rsbU* mutantovi, který neaktivoval σ^B v odpověď na vnější stres, ale mutace neměla žádný vliv na rozvoj reakce na hladovění (Völker et al., 1996). RsbU fosfatáza je aktivována předchozími členy signální kaskády vnějšího stresu. Dva členové této kaskády, RsbS a RsbT, jsou homology RsbV a RsbW regulátorů a rovněž fungují mechanismem partnerského přepínání (Kang et al., 1996). Avšak mezi těmito dvěma modely jsou tři rozdíly:

- 1) přepínání RsbS/RsbT/RsbU řídí činnost enzymu, nikoliv transkripčního faktoru,
- 2) RsbT pozitivně reguluje aktivitu fosfatázy, zatímco RsbW je negativním regulátorem σ^B faktoru, a interakce mezi partnery RsbS/RsbT/RsbU jsou mnohem méně stabilní než interakce RsbV/RsbW/ σ^B , patrně pro rychlou a krátkodobou reakci,
- 3) RsbS není jediným antagonistickým proteinem k RsbT, ale vyžaduje komplex koantagonistů (Hecker et al., 2007).

V exponenciálně rostoucí buňce je RsbU fosfatáza v inaktivním stavu a ke své aktivaci potřebuje navázání přepínacího proteinu RsbT. Ten je ale za těchto okolností držen v 25S proteinovém komplexu zvaném stresozóm, který je odlišný od ribozómů (Delumeau et al., 2006). Stresozóm se skládá z antagonistického proteinu RsbS a koantagonistů RsbR rodiny. Všechny proteiny z RsbR rodiny obsahují konzervovanou C-koncovou STAS (sulfate transporter anti-sigma) doménu, která je ekvivalentní k celému RsbS antagonistovi, a je tedy zodpovědná za držení RsbT proteinu (Delumeau et al., 2006). Kromě držení RsbT při nepřítomnosti vnějšího stresu má stresozóm možná ještě další, ne navzájem se vylučující úlohy. Například by tento komplex mohl fungovat jako receptor vnějšího stresu, případně jako zeslabovač nebo zesilovač stresového signálu řízením počtu RsbT molekul, které jsou ze stresozómu uvolněny, v závislosti na intenzitě stresu (Delumeau et al., 2006). První objevený člen z RsbR rodiny byl RsbRA (dříve RsbR nebo OrfR), jehož strukturní gen leží v σ^B operonu vedle *rsbS* genu (Wise et al., 1995). Ostatní členové, RsbRB (YkoB), RsbRC (YojH), RsbRD (YqhA) a YtvA, nejsou ze σ^B operonu a jsou oddělené i od sebe navzájem (Kim et al., 2004). YtvA je nejnověji objeveným příslušníkem RsbR rodiny obsahujícím kromě STAS domény ještě LOV (light-oxygen-voltage) doménu, která je zodpovědná

za vnímání modrého světla. (Gaidenko et al., 2006). RsbS je v rostoucích buňkách nefosforylovaný, RsbR koantagonisti jsou částečně fosforylovány kinázovou činností RsbT (Kim et al., 2004).

Při náhlém vnějším šoku je doposud neznámým mechanismem stimulována RsbT kinázová aktivita a dochází k úplné fosforylaci proteinů z rodiny RsbR a částečné fosforylaci RsbS (Kim et al., 2004). Tím je RsbS inaktivován, RsbT je uvolněn ze stresozómu a interaguje s RsbU fosfatázou na její N-koncové doméně (Hecker et al., 2007). Fosfatáza RsbU defosforyluje RsbV~P, což má za následek uvolnění σ^B faktoru. Působení σ^B trvá 10-40 minut, poté jeho aktivita rychle klesá na úroveň před šokem (Völker et al., 1995). Dočasný charakter obecné stresové odpovědi nejspíš zajišťuje RsbX, jejíž strukturální gen leží v σ^B operonu. RsbX je fosfatáza, která defosforyluje RsbS~P a RsbR~P (Yang et al., 1996), čímž působí proti kinázové aktivitě RsbT. Činnost této fosfatázy pozitivně reguluje σ^B faktor. Hladina RsbX po stresu stoupá spolu s hladinou σ^B faktoru, a tak rychle vrací RsbS~P a RsbR~P do formy schopné znovu navázat RsbT. Tímto mechanismem je pravděpodobně zajištěna autoregulace σ^B faktoru (Hecker et al., 2007).



Obr. 3: a) Model stresozómu. Při exponenciálním růstu je RsbT kináza držena v proteinovém komplexu zvaném stresozóm. RsbR značí proteiny RsbRA, RsbRB, RsbRC, RsbRD a YtvA. Převzato z Hecker et al. (2007). b) Schéma signální dráhy vnějšího stresu. Stresozóm zjednodušen na antagonistický protein RsbS a koantagonistu z rodiny RsbR. V nestresové buňce jsou proteiny rodiny RsbR částečně fosforylovány. Převzato z Kim et al. (2004) a Price (2000).

Při teplotním šoku dochází k syntéze proteinů, u nichž byla, jako u několika málo dalších ze σ^B regulonu, popsána jejich biochemická funkce. Jsou to ClpP ATP-závislá proteáza (Gerth et al., 1998) a její ClpC ATPázová regulační podjednotka (Krüger et al., 1996), které patří do III. třídy proteinů teplotního stresu (Price, 2000). ClpC patří mezi Hsp104 proteiny a kromě chaperonové aktivity také třídí poškozené peptidy. Nenávratně poškozené proteiny směřuje k degradaci ClpP proteázou, zatímco ty méně poškozené k opravě (Gottesman et al., 1997). Ačkoli jsou ClpP a ClpC považovány za proteiny teplotního šoku, mohly by vykazovat podobnou recyklaci nebo opravu vůči proteinům poškozeným solí, ethanolem nebo oxidačním stresem. Tuto představu potvrdili *clpP* a *clpC* mutanti, kteří byli citlivější na solné a ethanolové stresy (Gerth et al., 1998, Krüger et al., 1994).

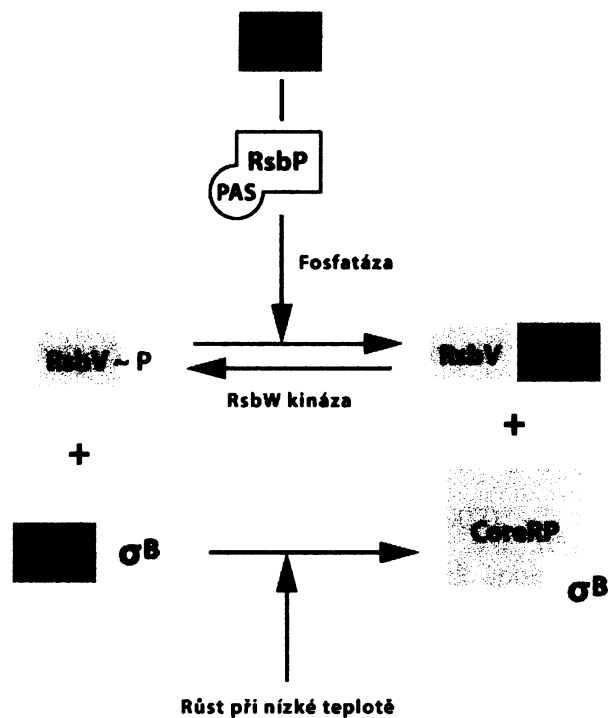
Na osmotický šok odpovídá *B. subtilis* syntetizováním nebo importováním kompatibilních solutů jako je např. trehalóza, prolin nebo glycinbetain (Kempf, Bremer, 1998). Prolin je přijímán nezávisle na transporteru pro glycinbetain. Transporter prolinu je kódován *opuE* lokusem, který je pod dvojitou kontrolou σ^A -podobného a σ^B -promotoru. Je to samostatný integrální membránový protein, který provádí symport prolinu spolu se sodnými kationty (von Blohn et al., 1997). Spiegelhalter a Bremer (1998) objevili, že σ^B -promotor je odpovědný za *opuE* expresi v odpovědích na tepelný a ethanolový stres, fyziologická úloha příjmu prolinu během těchto šoků však zůstává neobjasněna. σ^B -závislý promotor je okamžitě a dočasně indukován hned po osmotickém šoku, zatímco σ^A -podobný promotor je zodpovědný za *opuE* transkripci při dlouhodobém působení stresu (Spiegelhalter, Bremer, 1998). Z těchto pokusů vyplývá, že σ^B není potřebný pro rezistenci k ustálenému stresu, ale způsobuje dočasnou rezistenci, která okamžitě následuje osmotický šok.

3.2. Hladovění

Hladovění na glukózu, fosfát nebo kyslík, případně přidání oxidačních činidel do živného média, spouští σ^B -závislou stresovou odpověď dvěma oddělenými cestami. První cesta, která byla objevena z in vitro studií Alpera et al. (1996), ukázala, že hladinu ATP během energetického vyčerpání vnímá přímo RsbW kináza. Když hladina ATP klesá, snižuje se i kinázová aktivita RsbW. Nefosforylovaný RsbV potom může tuto kinázu vázat a dochází k uvolnění σ^B a spuštění obecné stresové odpovědi (Alper et al., 1996). V tomto pohledu by se mohlo zdát, že RsbV a RsbW regulátory jsou samy schopny vnímat úroveň ATP v buňce,

avšak pro reakci na energetický stres je esenciální druhá RsbV~P specifická fosfatáza PP2C typu, RsbP, analog RsbU fosfatázy vnějšího stresu. Vijay a spolupracovníci (2000) ve svých experimentech prokázali, že v *rsbP* mutantovi nedochází k aktivaci σ^B faktoru v odpověď na hladovění, ale mutace má malý vliv na rozvoj reakce na vnější šok. Skrz RsbP fosfatázu vede druhá signální cesta, která spouští σ^B odpověď. RsbP obsahuje kromě katalytické PP2C C-koncové domény ještě N-koncovou PAS (Per-ARNT-Sim) doménu, která je zodpovědná za vnímání změn v energetické hladině buňky (Vijay et al., 2000). Signály, jež spouští aktivitu RsbP fosfatázy, nejsou známy (Zhang, Haldenwang, 2005). RsbP fosfatáza funguje při podmínkách, které snižují buněčnou úroveň ATP nebo GTP. Avšak PAS doména této fosfatázy vnímá změny v elektronovém transportu, protonovém gradientu a redoxním potenciálu, které předcházejí měřitelný pokles hladiny ATP (Zhang, Haldenwang, 2005). Tyto dva potenciační mechanismy aktivace σ^B po hladovění se navzájem nevylučují, ale protože *rsbP* mutant nevykazoval žádnou indukci obecné stresové odpovědi po vyčerpání energie, předpokládá se, že řízení RsbW kinázové aktivity hladinou ATP hraje pouze menší úlohu, nebo se stává důležitým jen ve specifických situacích (Hecker et al., 2007). Spolu RsbP je kotranskribována RsbQ hydroláza, jejíž katalytickou funkci RsbP potřebuje pro svou činnost (Kaneko et al., 2005). RsbQ patří do rodiny alfa/beta hydroláz, má specifitu pro malou hydrofóbní sloučeninu a pravděpodobně dodává RsbP fosfatáze esenciální kofaktor (Kaneko et al., 2005).

Před několika lety (2003) byla objevena zcela nová, třetí cesta indukce σ^B -závislé obecné stresové odpovědi během růstu při nízké teplotě (15°C), která vede k vysoké expresi σ^B regulonu. Brigulla a spolupracovníci (2003) při tomto podnětu pozorovali zvýšenou produkci RsbV, RsbW, σ^B a RsbX proteinů, avšak nikoliv RsbU a RsbS regulátorů. Tato skupina také zjistila, že na vyrovnávání se s nízkou teplotou má velký vliv kompatibilní solut glycinbetain. U divokého kmene glycinbetain zvyšuje růst při nízké teplotě a snižuje indukci σ^B -závislých genů. Růst σ^B mutantu při 15°C je drasticky snížen, ale přidání tohoto kompatibilního solutu umožňuje jeho přežití. Tito badatelé dále objevili, že σ^B je překvapivě aktivován při nízké teplotě v *rsbV* mutantovi, což nebylo pozorováno při žádném jiném typu stresu. Charakter této aktivace je, narozdíl od přechodné povahy σ^B odpovědi po vnějším šoku, stálý, nezávislý na RsbV anti-anti- σ^B faktoru i na regulačních fosfatázách RsbU a RsbP a není ještě zcela objasněn (Brigulla et al., 2003).



Obr 4: Schéma aktivace σ^B během hladovění a růstu při nízké teplotě. Převzato z Hecker et al. (2007)

Oxidační stres často hladovění doprovází. Ochrana buněčných bílkovin, DNA a tuků proti reaktivnímu kyslíku se zdá být hlavní úlohou σ^B regulonu (Hecker, Völker, 1998), u striktních a některých fakultativních anaerobních grampozitivních bakterií totiž σ^B -závislá odpověď chybí (Hecker et al., 2007). Při podmínkách, jež omezují růst, jsou syntetizovány katalázy KatB (KatE) (Engelmann et al., 1995) a KatX, přispívající k odstraňování škodlivých molekul (Petersohn et al., 1999). Oxidaci proteinů částečně brání thioredoxin TrxA, který v buňkách *B. subtilis* funguje namísto glutathion systému (Scharf et al., 1998).

3.3. Funkce obecné stresové odpovědi

Obecnou stresovou odpověď indukuje široké spektrum stimulů. Při exponenciálním růstu je regulon umlčen, ale k jeho silné expresi dochází velmi rychle po okamžiku šoku. Tato reakce je krátkodobá a vytváří pro buňku velkou zátěž, protože produkce proteinů obecného stresu zaujímá značnou část z celkové translační kapacity, až 40 %. (Bernhardt et al., 1997). Buňka si rychle a přechodně vytváří mnohonásobnou rezistenci v odpověď na mnoho různých

stimulů. Rezistence je také nespecifická, poněvadž dovoluje buňce vyrovnat se se stresy, s nimiž se dosud nesešla (Hecker et al., 2007). Až po určité době nebo v případě opakovaného stresu dochází k rozvoji specifické stresové odpovědi, která je reakcí na daný typ stimulu (Hecker et al., 2007).

B. subtilis na přechodu z exponenciální do stacionární fáze indukuje obecnou stresovou odpověď, jež zajišťuje preventivní ochranu před stresy, které se mohou kdykoli objevit během dlouhé doby, kdy buňka neroste. Tato funkce je prozíravá, protože nerostoucí buňka po nějaké době hladovění už nemá takový potenciál k rychlému jednání s akutním stresem jako buňka aktivně rostoucí (Hecker, Völker, 1998). Předem nasyntetizované proteiny obecného stresu poskytují počáteční ochranu před stimuly a dávají buňce dostatečný čas pro indukci specifické stresové odpovědi (Hecker et al., 2007).

Obecná stresová odpověď je spouštěna jinak než sporulace, vedle níž se zdá být jednou z alternativních strategií pro přežití. Sporuluje jen část populace hladovějících buněk *B. subtilis*, zbytek se se stresem vyrovnává pomocí alternativních strategií (Hecker et al., 2007). V některých podmínkách, jako například při vysoké osmolaritě, není dokonce sporulace možná, a proto je obecná stresová odpověď v těchto případech ještě významnější (Price, 2000).

Kompletní popis všech členů σ^B regulonu je podmínkou pro úplné porozumění jeho fyziologické funkce. Petersohn a spolupracovníci (2001) popsali 125 genů ze σ^B regulonu pomocí rozsáhlých DNA arrayových studií. U většiny z nich se nepodařilo zjistit jejich působení, ale u několika genů popsali jejich překvapivou fyziologickou úlohu. Např. protein YfhF při některých stresech pravděpodobně inhibuje buněčné dělení, a tím dává buňce čas na obnovení vitality. Další popsané funkce spočívaly v detoxifikaci, údržbě redoxní rovnováhy a degradaci poškozených proteinů. Tyto navržené fyziologické úlohy je však ještě třeba potvrdit biochemickými studiemi (Petersohn et al., 2001).

Zatím je předmětem zkoumání, zda při jednotlivých stresech dochází k aktivaci stejných adaptačních genů a které indukované geny se podílejí v stresové odpovědi u více stresů najednou. Höper a kolegové (2005) ve své práci provedli fenotypovou analýzu 94 mutantů v některém z důležitých členů σ^B regulonu a sledovali jejich přispívání k adaptačním mechanismům u jednotlivých stresů (teplotní, chladový, osmotický, ethanolový). Dospěli k závěru, že 85 % prokazovalo sensitivitu k více jak jednomu ze čtyř sledovaných stresů (Höper et al., 2005).

4. Srovnání σ^B -závislé odpovědi u dalších vybraných grampozitivních bakterií

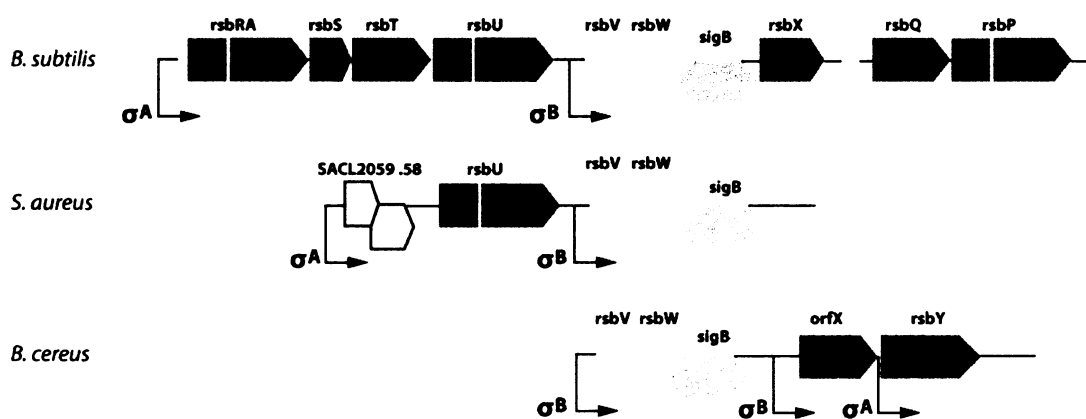
σ^B -závislá odpověď je konzervovaná u příbuzných grampozitivních bakterií, ale její regulace a fyziologická úloha se u různých představitelů odlišuje - od vytváření nespecifické rezistence po řízení virulence u patogenů. Spolu se σ^B jsou také u grampozitivních bakterií konzervovány autoregulátory RsbV a RsbW (Hecker et al., 2007). U většiny druhů jsou konzervovány proteiny rodiny RsbR, jejichž geny bývají jako u *B. subtilis* rozptýlené po celém chromozómu. Naopak operon pro RsbP a RsbQ regulátory se vyskytuje pouze u *B. subtilis* (Hecker et al., 2007). V této kapitole jsou funkce a regulace σ^B faktoru *B. subtilis* srovnány se σ^B -závislou odpovědí u zástupců patogenních bakterií: *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*.

Funkce σ^B odpovědi u *B. cereus* není doposud známa, vliv na regulaci genů virulence nebyl prokázán (Hecker et al., 2007). K aktivaci σ^B faktoru dochází u tohoto druhu po vnějším stresu a po vstupu do stacionární fáze (van Schaik et al., 2004). Zajímavá je však kaskáda, vedoucí stresový signál k σ^B faktoru, jež funguje odlišným mechanismem než u *B. subtilis* (van Schaik et al., 2005). U *B. cereus* řídí činnost σ^B pouze jeho primární regulátory RsbV a RsbW. Úlohu RsbU fosfatázy plní homolog RsbY, unikátní pro *B. cereus*, který kromě PP2C domény obsahuje N-koncovou CheY doménu zodpovědnou za vnímání signálu (van Schaik et al., 2005). Srovnání σ^B regulonu u *B. subtilis* a *B. cereus* ukazuje pouze malé překrytí genů (van Schaik et al., 2004).

Regulace σ^B aktivity je u *S. aureus* pravděpodobně dost odlišná od regulace v *B. subtilis* (Hecker et al., 2007). U *S. aureus* nedochází k aktivaci σ^B faktoru po vyčerpání hladiny ATP a při ethanolovém stresu, tento druh totiž postrádá komponenty stresozómu (RsbR, RsbS a RsbT), stejně jako regulační proteiny RsbP a RsbQ vnímající energetický stres (Pané-Farré et al., 2006). K silné indukci σ^B odpovědi dochází u *S. aureus* při vstupu do stacionární fáze a v reakci na alkalický šok, k mírnější aktivaci ve srovnání s *B. subtilis* dochází při solném a teplotním stresu (Pané-Farré et al., 2006). Primární regulátory σ^B RsbV a RsbW fungují mechanismem partnerského přepínání a stejně jako u *B. subtilis* je aktivace σ^B faktoru závislá na RsbU fosfatáze. Narozdíl od *B. subtilis* ale k indukci σ^B -závislé odpovědi stačí nadprodukce RsbU fosfatázy, jelikož i její bazální exprese je vysoká (Senn et al., 2005). Doposud ale není známo, jak je činnost této fosfatázy při vstupu do stacionární fáze a při alkalickém stresu řízena (Pané-Farré et al., 2006).

Nicholas a spolupracovníci (1999) nepotvrdili nižší přežití σ^B mutantů v podmínkách omezujících růst, avšak aktivita σ^B faktoru vede ke zvětšení tloušťky buněčné stěny, což způsobuje zvýšenou rezistenci vůči antibiotikům, které poškozují buněčnou stěnu (Morikawa et al., 2001). Stejně jako u *B. cereus* je i u *S. aureus* malý překryv genů z σ^B regulonu s geny σ^B regulonu u *B. subtilis*, shoduje se jen asi 12 % genů (Höper et al., 2005). σ^B regulon u *S. aureus* obsahuje asi 200 genů, které jsou zapojeny také do mnoha základních buněčných procesů, jako jsou přestavby buněčné stěny, membránový transport a některé typy metabolismu (Pané-Farré et al., 2006).

Narozdíl od *B. cereus* byl u *S. aureus* prokázán vliv σ^B faktoru na jeho virulenci. Ziebandt a spolupracovníci (2004) zjistili, že σ^B inhibuje expresi extracelulárních proteinů virulence. Další objev ukázal, že některé proteiny buněčné stěny, důležité pro adhezi k hostitelské tkáni, jsou σ^B -závislé, tudíž σ^B je spíše důležitý během raného stádia infekce, kdy se patogen přichycuje k hostiteli a potlačuje expresi exotoxinů (Entenza et al., 2005).



Obr. 5: Schéma σ^B operonu u *B. subtilis*, *S. aureus* a *B. cereus*. Geny pro σ^B a jeho primární regulátory jsou konzervovány. Převzato z Hecker et al. (2007).

5. Závěr

Obecná stresová odpověď u *Bacillus subtilis* vede k výrazné indukci více než 150 genů obecného stresu ze σ^B regulonu. Úloha většiny proteinů kódovaných těmito geny není zatím známa, pravděpodobně se podílejí na ochraně buněčných struktur před škodlivým působením stresů. Kromě zvláštního případu, kterým je nízká teplota, vedou k aktivaci σ^B dvě oddělené signální cesty, během nichž se uplatňuje mechanismus partnerského přepínání, kdy jeden protein je schopen vázat různé partnery v závislosti na fosforylaci jednoho z nich. Signální dráhy, vedoucí k σ^B , nejsou zcela objasněné, především není prokázáno, které stimuly buňka vnímá při rozpoznávání jednotlivých stresů. Dále také ještě není známo, zda se proteiny σ^B regulonu podílejí na adaptaci při jednom stresu, nebo mohou působit při více stresech. Obecná stresová odpověď je automaticky spouštěna na přechodu do stacionární fáze a uděluje buňce nescifickou, mnohonásobnou a preventivní rezistenci na různé stresy.

Obecná stresová odpověď je konzervovaná u příbuzných grampozitivních bakterií, může se ale lišit její úloha a regulace. U *S. aureus* byl prokázán vliv σ^B faktoru na virulenci, což ještě více zdůrazňuje význam úplného poznání σ^B -závislé odpovědi. *B. subtilis* je dostupným modelem pro studium fyziologické úlohy a regulace této adaptační reakce.

Přehled použité literatury

Alper, S., Dufour, A., Garsin, D.A., Duncan, L., Losick, R. (1996): Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 260:165-77

Benson, A.K., Haldenwang, W.G. (1993): *Bacillus subtilis* σ^B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2330-4

Bernhardt, J., Völker, U., Völker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M. (1997): Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* – a two dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* 143:999-1017

Boylan, S.A., Redfield, A.R., Brody, M.S., Price, C.W. (1993): Stress-induced activation of the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175:7931-37

Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Völker, A., Bremer, E., Völker, U. (2003): Chill induction of the σ^B -dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol* 185:4305-14

Delumeau, O., Chen, C.C., Murray, J.W., Yudkin, M.D., Lewis, R.J. (2006): High-molecular-weight complexes of RsbR and paralogues in the environmental signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188:7885-92

Drzewiecki, K., Eymann, C., Mittenhuber, G., Hecker, M. (1998): The *yvyD* gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of σ^B and σ^H . *J Bacteriol* 180:6674-6680

Dufour, A., Haldenwang, W.G. (1994): Interactions between a *Bacillus subtilis* antisigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J Bacteriol* 176:1813-20

Engelmann, S., Lindner, C., Hecker, M. (1995): Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *katE* encoding a σ^B -dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177:5598-5605

Entenza, J.M., Moreillon, P., Senn, M.M., Kormanec, J., Dunman, P.M., Berger-Bächi, B., Projan, S., Bischoff, M. (2005): Role of σ^B in the expression of *Staphylococcus aureus* cell wall adhesins ClfA and FnbA and contribution to infectivity in a rat model of experimental endocarditis. *Infect Immun* 73:990-8

Gaidenko, T.A., Kim, T.J., Weigel, A.L., Brody, M.S., Price, C.W. (2006): The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188:6387-95

Gerth, U., Krüger, E., Derre, I., Msadek, T., Hecker, M. (1998): Stress induction of the *Bacillus subtilis* *clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* 28:787-802

- Gottesman, S., Maurizi, M.R., Wickner, S. (1997): Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell* 91:435-438
- Haldenwang, W.G. (1995): The sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 59:1-30
- Hecker, M., Pané-Farré, J., Völker, U. (2007): SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:215-36
- Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1996): Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:417-28
- 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* 29:1129-36
- Hecker, M., Völker, U., (2001): General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* 44:35-91
- 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* 187:2810-26
- Huang, X., Helmann, J.D. (1998): Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* σ^X factor using a consensus-directed search. *J Mol Biol* 279:165-73
- Kaneko, T., Tanaka, N., Kumasaka, T. (2005): Crystal structures of RsbQ, a stress-response regulator in *Bacillus subtilis*. *Protein Sci* 14:558-65
- Kang, C.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. *J Bacteriol* 178:3846-3853
- Kempf, B., Bremer, E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* 170:319-30
- Kim, T.J., Gaidenko, T.A., Price, C.W. (2004): A multicomponent protein complex mediates environmental stress signaling in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 341:135-50
- Kim, T.J., Gaidenko, T.A., Price, C.W. (2004): In vivo phosphorylation of partner switching regulators correlates with stress transmission in the environmental signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186:6124-32
- Krüger, E., Msadek, T., Hecker, M. (1996): Alternate promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon. *Mol Microbiol* 20:713-23
- Krüger, E., Völker, U., Hecker, M. (1994): Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol* 176:3360-7

- Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W., Helmann, J.D. (2003): Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol* 50:1591-604
- Mogk, A., Völker, A., Engelmann, S., Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1998): Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J Bacteriol* 180:2895-900
- Morikawa, K., Maruyama, A., Inose, Y., Higashide, M., Hayashi, H., Ohta, T. (2001): Overexpression of sigma factor, SigB, urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist beta-lactams. *Biochem Biophys Res Commun* 288:385-9
- Nicholas, R.O., Li, T., McDevitt, D., Marra, A., Socoloski, S., Demarsh, P.L., Gentry, D.R. (1999): Isolation and characterization of a sigB deletion mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 67:3667-9
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Forstner, K., Engelmann, S., Hecker, M. (2006): The SigB regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol* 296:237-58
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Völker, U., Hecker, M. (2001): Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:5617-31
- Petersohn, A., Engelmann, S., Setlow, P., Hecker, M. (1999): The *katX* gene of *Bacillus subtilis* is under control of σ^B and σ^F . *Mol Gen Genet* 262:173-9
- Price, C.W. (2000): Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. In *Bacterial Stress Responses*, ed. G. Storz, R. Hengge-Aronis, pp. 179-97. Washington, D.C. ASM Press
- Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Völker, U., Hecker, M. (1998): Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180:1869-77
- Senn, M.M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., Flückiger, U., Berger-Bächi, B., Bischoff, M. (2005): Molecular analysis and organization of the sigB operon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187:8006-19
- Spiegelhalter, F., Bremer, E. (1998): Osmoregulation of the opuE proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the σ^A - and σ^B -dependent stress-responsive promoters. *Mol Microbiol* 29:285-96
- van Schaik, W., Tempelaars, M.H., Wouters, J.A., de Vos, W.M., Abee, T. (2005): Analysis of the role of RsbV, RsbW, and RsbY in regulating SigB activity in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 187:5846-51
- Vijay, K., Brody, M.S., Fredlund, E., Price, C.W. (2000): A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 35:180-8

Völker, U., Maul, B., Hecker, M. (1999): Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 181:3942-8

Völker, U., Völker, A., Haldenwang, W.G. (1996): Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti- σ^B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. J Bacteriol 178:5456-63

Völker, U., Völker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., Haldenwang, W.G (1995): Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stress. J Bacteriol 177:3771-80

von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R.M., Bremer, E. (1997): Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor σ^B . Mol Microbiol 25:175-87

Wise, A., Price, C.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 177:123-33

Yang, X.F., Kang, C.M., Brody, M.S., Price, C.W. (1996): Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. Genes Dev 10:2265-75

Zhang, S., Haldenwang, W.G. (2005): Contributions of ATP, GTP, and redox state to nutritional stress activation of the *Bacillus subtilis* sigmaB transcription factor. J Bacteriol 187:7554-60

Ziebandt, A.K., Becher, D., Ohlsen, K., Hacker, J., Hecker, M., Engelmann, S. (2004): The influence of agr and sigmaB in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. Proteomics 4:3034-47