

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

VLIV ENVIRONMENTÁLNÍCH STRESŮ NA
MUTABILITU U *BACILLUS SUBTILIS*
-
ROLE MISMATCH-REPAIR SYSTÉMU

JAROSLAV NUNVÁŘ

PRAHA 2009

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE:

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce, pouze s využitím citované literatury.

Poděkování

V první řadě velice děkuji RNDr. Ireně Liché, CSc. za věnovaný čas, trpělivost, ochotu pomoci a projevenou důvěru. Moc si cením pomoci při sepisování diplomové práce.

Dále děkuji:

- svým kolegyním z laboratoře 101 za vytvoření důstojného pracovního prostředí ve společné laboratoři. Děkuji Tereze Huckové za milou společnost. Velký dík patří laborantce Lucii Jánské za naprosto spolehlivou technickou asistenci.
 - RNDr. Martinu Pospíškovi, CSc. a kolektivu laboratoře biochemie RNA za možnost využívat PCR cyclery
 - RNDr. Radovanu Fišerovi za neocenitelnou pomoc s fluorimetrickým měřením
- Své rodině jsem velice vděčný za neutuchající všestrannou podporu během mých dosavadních studií.

Nakonec bych rád poděkoval svému leguánovi Yokovi za vítané rozptýlení, jehož se mi od něj dostalo během sepisování této práce.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2006-2009 a byla financována z Centra environmentální mikrobiologie LC06066 MŠMT ČR.

EFFECT OF ENVIRONMENTAL STRESSES ON MUTABILITY OF *BACILLUS SUBTILIS* - ROLE OF MISMATCH-REPAIR SYSTEM

Abstract

The everchanging nature of bacterial environment requires adaptation to emerging novel conditions. One proposed way of adaptation involves increased generation of genetic variability in response to harmful conditions – a phenomenon called adaptive mutagenesis. However, the details of mechanisms of adaptive mutagenesis, and even its very existence, are far from clear.

Our goal was to subject the Gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis* to variety of environmental stresses, examine the rate of mutagenesis occurring and compare it to unstressed conditions. Next we wondered if there was a role for mismatch-repair system (MMR), the major pathway for mutation avoidance, in these processes.

To accomplish this, we constructed systems to monitor the expression of MMR components both on transcription and translation level. We also developed a mathematical model for precise mutation rate determination in order to quantify the intensity of mutagenic processes.

The monitoring of MMR proteins translation failed due to high background endogenous fluorescence present in *B. subtilis* cells. However, we found out, using transcription reporter system, that the expression of MMR is not influenced by imposition of harsh hyperosmotic shock upon cells. The expression of MMR was also barely influenced by nutrient limitation in stationary phase of growth. Conversely, we did not detect any significant increase of mutation rate on these and several other conditions.

We conclude that *B. subtilis* does not experience obvious stress-directed adaptive mutagenesis. Our findings also add support to the notion of substantial differences between dynamics of MMR on stress condition in *B. subtilis* and *Escherichia coli*. These might be attributed to strikingly different lifestyles of both prokaryotic models, *i.a.* existence of sporulation in *B. subtilis*.

Keywords

Bacillus subtilis, mismatch-repair system, mutation rate, stationary phase, adaptive mutagenesis, stress response

Klíčová slova

Bacillus subtilis, mismatch-repair systém, mutační rychlost, stacionární fáze, adaptivní mutageneze, stresová odpověď

OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Přehled literatury.....	10
2.1. Adaptivní mutageneze.....	10
2.1.1. Historické souvislosti.....	10
2.1.2. FC40 – model pro studium adaptivní mutageneze <i>Escherichia coli</i>	11
2.1.3. Molekulární mechanismy adaptivní mutageneze.....	13
2.1.3.1. Mutagenní DNA polymerázy.....	13
2.1.3.2. Strukturní vlastnosti DNA.....	16
2.1.3.2.1. Sekundární struktury DNA.....	16
2.1.3.2.2. Repetitivní sekvence.....	19
2.1.4. Příčiny adaptivní mutageneze.....	21
2.1.4.1. Nutriční a environmentální stres.....	21
2.1.4.2. Faktory vyvolávající SOS odpověď.....	23
2.1.4.2.1. Poškození DNA.....	23
2.1.4.2.2. Antibiotika.....	24
2.1.5. Adaptivní mutageneze u <i>Bacillus subtilis</i>	25
2.1.5.1. Popis experimentálního systému.....	25
2.1.5.2. Faktory ovlivňující mutagenezi <i>Bacillus subtilis</i> YB955.....	25
2.2. Mismatch-repair systém (MMR).....	27
2.2.1. Molekulární mechanismy MMR.....	27
2.2.1.1. Specifita antimutačního účinku.....	27
2.2.1.2. Přenos signálu a korekce mutací.....	28
2.2.1.3. Mechanismy MMR u <i>Bacillus subtilis</i>	31
2.2.2. Antirekombinační efekt MMR.....	32
2.2.3. Role MMR v procesech adaptivní mutageneze.....	34
2.2.3.1. Negativní regulace MMR.....	34
2.2.3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	34
2.2.3.1.2. <i>Bacillus subtilis</i>	35
2.2.3.2. Mutační inaktivace MMR.....	35
3. Materiál a metodika.....	37
3.1. Materiál.....	37
3.1.1. Bakteriální kmeny.....	37

3.1.2. Plazmidy.....	37
3.1.3. Primery.....	41
3.1.4. Chemikálie.....	43
3.1.5. Antibiotika.....	44
3.1.6. Enzymy.....	45
3.1.7. Standardy molekulových hmotností DNA.....	45
3.1.8. Komerční sady.....	45
3.1.9. Kultivační média.....	46
3.1.9.1. Minerální médium.....	46
3.1.9.2. Komplexní média.....	47
3.1.10. Roztoky.....	48
3.1.10.1. Pufr Z (pro stanovení β -galaktosidázy).....	48
3.1.10.2. Roztoky pro izolaci chromozomální DNA <i>B. subtilis</i>	48
3.1.10.3. Roztoky pro izolaci plazmidové DNA.....	49
3.1.10.4. Roztoky pro horizontální agarózovou elektroforézu.....	49
3.1.10.5. Sonikační pufr.....	50
3.1.11. Počítačové programy.....	50
3.1.12. Pístroje a laboratorní zařízení.....	50
3.2. Metodika.....	52
3.2.1. Práce s bakteriální kulturou.....	52
3.2.1.1. Kultivace v tekutém médiu.....	52
3.2.1.2. Uchovávání bakteriálních kmenů.....	52
3.2.2. Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	52
3.2.3. Elektroporace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	53
3.2.4. Příprava a transformace přirozeně kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i>	53
3.2.5. Stanovení aktivity β -galaktosidázy.....	54
3.2.6. Práce s bakteriální DNA.....	55
3.2.6.1. Izolace chromozomální DNA <i>Bacillus subtilis</i>	55
3.2.6.2. Izolace plazmidové DNA.....	55
3.2.6.3. Precipitace DNA chloridem lithným a ethanolem.....	57
3.2.6.4. Restrikce DNA.....	57
3.2.6.5. Ligace restrikčních fragmentů DNA.....	58
3.2.6.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	58

3.2.6.7. Horizontální agarózová elektroforéza.....	59
3.2.6.8. Sekvence DNA.....	59
3.2.7. Stanovení fluorescence CFP-fúzních proteinů.....	60
4. Výsledky.....	61
4.1. Značení proteinů MutS a MutL <i>Bacillus subtilis</i> pomocí CFP.....	61
4.2. Stanovení exprese proteinů MMR.....	65
4.3. Konstrukce systému pro měření aktivity promotoru <i>mutSL</i> operonu <i>Bacillus subtilis</i>	67
4.4. Sledování aktivity promotoru <i>mutSL</i> operonu <i>Bacillus subtilis</i>	68
4.5. Metoda měření mutační rychlosti u <i>Bacillus subtilis</i>	71
4.6. Vliv stresů na mutační rychlost <i>Bacillus subtilis</i>	79
5. Diskuze.....	82
6. Souhrn.....	87
7. Seznam citované literatury.....	88

1. ÚVOD

Všechny živé organismy jsou neustále konfrontovány s měnícími se podmínkami jejich životního prostředí – ať už biotickými nebo abiotickými. Mnoho z těchto podmínek působí na bakteriální buňky nepříznivě (např. zpomalují nebo inhibují růst) – jedná se tedy o stresové faktory. Přestože všechny organismy disponují řadou mechanismů, jak se vůči stresům adaptovat, jen mutační procesy a z nich vzešlá genetická variabilita mohou zajistit dlouhodobé přizpůsobení a perzistenci druhů.

Mutabilita (míra rychlosti mutageneze) je u drtivé většiny bakteriálních organismů udržována na velmi nízké úrovni, s cílem zachovat stávající optimální fenotyp, který je výsledkem dlouhodobě působících selekčních tlaků. Podle kontroverzní hypotézy adaptivní mutageneze dochází vlivem stresů (nepříznivých životních podmínek) ke zvýšené tvorbě mutací, z nichž některé pomáhají překonat působení těchto stresů. Velká většina poznatků o procesech souvisejících s adaptivní mutagenezí se týká gramnegativní bakterie *Escherichia coli*. Pro studium adaptivní mutageneze u *Bacillus subtilis* byl dosud používán pouze jeden experimentální systém (ROBLETO *et al.* 2007). Naším cílem bylo vyvinout takové uspořádání, které by umožňovalo všeobecnou kvantifikaci mutageneze, a prozkoumat vliv environmentálních stresů (fyzikálních a nutričních) na tuto veličinu. Dále jsme chtěli zjistit, zda vlivem stresů dochází k omezení funkce mismatch-repair systému, který je hlavním mechanismem opravy mutací a jehož deaktivaci dochází ke značnému zvýšení mutageneze. Účelem práce bylo přispět k potvrzení nebo vyvrácení hypotézy adaptivní mutageneze v širším slova smyslu u *B. subtilis*, tj. zjistit, zda vystavení stresovým podmínkám má na buňky mutagenní efekt.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. ADAPTIVNÍ MUTAGENEZE

Adaptivní mutageneze je hypotetický proces vedoucí ke zvýšené tvorbě mutací, podmiňujících genetickou adaptaci na působící podmínky. Často se lze setkat se synonymními názvy tohoto fenoménu – např. stresem indukovaná mutageneze nebo mutageneze ve stacionární fázi.

Tento oddíl literárního přehledu je zaměřen na popsané mechanismy adaptivní mutageneze a experimentální metody její determinace.

2.1.1. Historické souvislosti

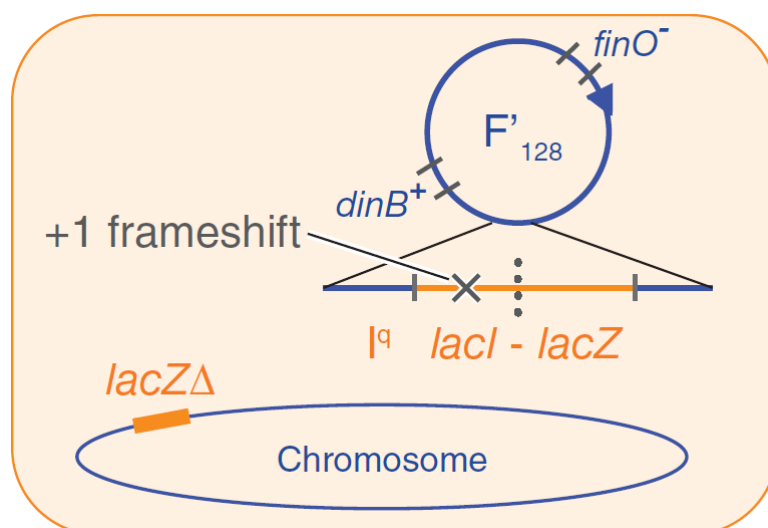
V polovině dvacátého století (LURIA a DELBRUCK 1943) bylo sofistikovanými experimenty prokázáno, že mutace v rostoucích bakteriálních buňkách vznikají náhodně bez přítomnosti selekčního tlaku. Tento poznatek byl v souladu s principy Darwinovy evoluční teorie o selektivní fixaci mutací vlivem jejich pozitivního vlivu na fitness hostitele.

O čtyřicet let později se objevila studie zásadně zpochybňující princip náhodného vzniku mutací (CAIRNS *et al.* 1988). Bylo naznačeno, že tvorba výhodných mutací může být stimulována působením selekčního agens. Při provedených měřeních a v obdobných experimentech, následujících později, byla pozorovaná rychlost vzniku mutací podstatně vyšší než standardní bakteriální mutační rychlost, která je striktně udržovaná na velmi nízké úrovni i za extrémních životních podmínek (SNIEGOWSKI 2001). K mutacím navíc docházelo jen za přítomnosti selekčního agens (FOSTER 2004). Publikace vzbudila velký rozruch, včetně značného zájmu ze strany kreacionistů. V bezprostředně následujících letech započal intenzivní výzkum na objasnění pozorovaných jevů, jimž se dostalo označení adaptivní mutageneze.

2.1.2. FC40 – model pro studium adaptivní mutagenese *Escherichia coli*

Z historických důvodů byl pro většinu experimentů týkajících se adaptivní mutagenese používán kmen *Escherichia coli* FC40.

Genetické pozadí *E. coli* FC40 je následující: kmen nese delecí chromozomálního genu pro utilizaci laktózy (*lacZ*). Vlastní *lacZ* alela je umístěna na nízkokopiovém epizomu, odvozeném od F plazmidu. Součástí této alely je i fúzovaná sekvence *lacI*, nesoucí +1 posuvovou mutaci, která brání správné (ve smyslu čtecího rámce) transkripci sekvence *lacZ* lokalizované downstream. Exprese genu *lacZ* nepodléhá obvyklé regulaci, je konstitutivní. Součástí epizomu je rovněž gen *dinB*, kódující DNA polymerázu s vysokou frekvencí replikačních chyb (**Kap. 2.1.3.1.**). Gen kódující inhibitor transferových funkcí epizomu, *finO*, je inaktivován vložení inzerční sekvence. Genetické uspořádání *E. coli* FC40 je schematicky znázorněno na **Obr. 1**.



OBRÁZEK 1: Schéma genetického uspořádání *E. coli* FC40.

Podle (ROTH *et al.* 2006).

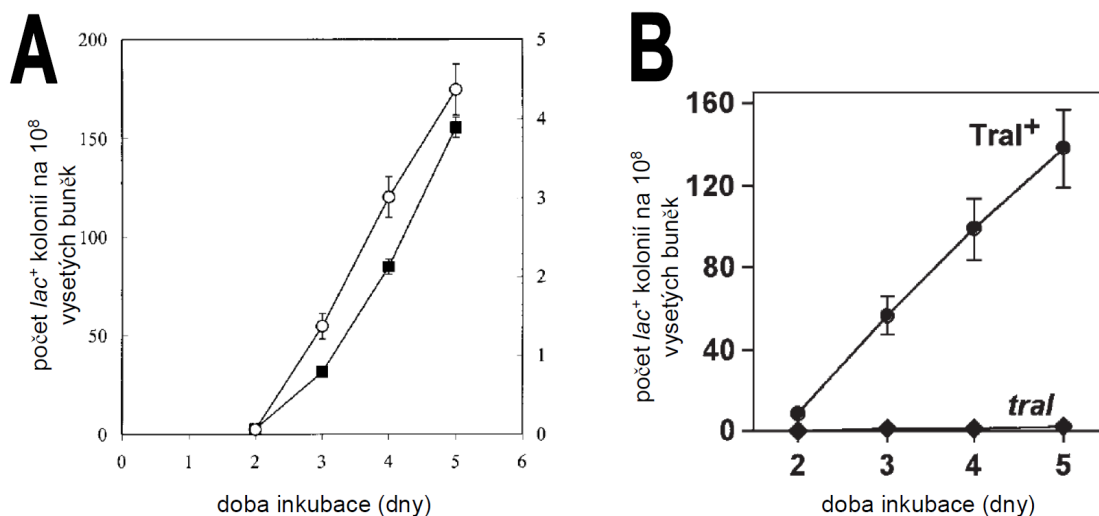
Adaptivní mutagenese, tj. rychlost reverzí k Lac⁺ fenotypu, se zjišťuje vyšetím suspenze *E. coli* FC40 na minerální plotny s laktózou jako jediným zdrojem uhlíku a sledováním počtů narostlých kolonií.

Ukázalo se, že vysoká míra adaptivní mutagenese v tomto experimentálním pojetí je důsledkem právě zmíněného genetického uspořádání. Posuvová mutace se nachází v *lacI* části fúzního genu. Jakákoliv -1 posuvová mutace v celé délce *lacI* tak vede k reverzi,

neboť aminokyselinové složení LacI části fúzního proteinu nemá vliv na enzymatickou aktivitu výsledného LacI-LacZ proteinu (ROTH *et al.* 2006). Tato situace je tedy značně odlišná od mutageneze vedoucí k nukleotidovým substitucím a z nich odvozeným aminokyselinovým záměnám, které jsou jedním z nejvýznamnějších evolučních mutačních procesů. Sama povaha posuvové mutace u *E. coli* FC40 umožňuje expresi nezanedbatelného množství β -galaktosidázy, odpovídající asi 1 % exprese nemutovaného genu, patrně mechanismem ribozomálního posuvu čtecího rámce (ANDERSSON *et al.* 1998). S tím souvisí fakt, že během selekce na minimálních plotnách s laktózou se počet živých buněk nemění po dobu až deseti dní – hladovění tedy nemá letální efekt (ROTH *et al.* 2006).

Hlavním faktorem, přímo i nepřímo zodpovědným za vysokou míru adaptivní mutageneze, je pozice selektované alely na plazmidu. Pokud se tatáž alela nachází v chromozomu, snižuje se intenzita mutageneze padesátkrát (**Obr. 2A**). Za tento poziční efekt je zcela zodpovědná konjugativní relaxáza TraI, která zavádí utajené přerušení v místě *oriT* plazmidu (**Obr. 2B**). Dále se ukázalo, že pro adaptivní mutagenezi je nezbytná přítomnost funkčního rekombinačního aparátu (RecA, RuvABC) a mechanismů zpracovávání dvojřetězcových zlomů v DNA (RecBCD). Je tak vysoce pravděpodobné, že štěpení prostřednictvím TraI spouští kaskádu rekombinačních událostí, které v důsledku vedou k amplifikaci *lac* alely (FOSTER 2004). Amplifikace zvyšuje pravděpodobnost, že některá z namnožených alel prodělá reverzi posuvové mutace. Konečně, na plazmidu kmene FC40 jsou přítomny dvě kopie těžce inserční sekvence. Delece jedné z nich trojnásobně snižuje výtěžek revertantů, což poukazuje na možnou roli rekombinace mezi těmito kopiemi (ROTH *et al.* 2006).

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že většina pozorované mutageneze je důsledkem specifického experimentálního uspořádání. Aplikovatelnost výsledků dosažených s modelem *E. coli* FC40 na geny běžného účinku (např. metabolické) v chromozomální lokaci je tak bohužel značně omezená.



OBRÁZEK 2: Faktory ovlivňující adaptivní mutagenizi *E. coli* FC40.

A) Pozice *lacZ* alely.

Plné čtverce (osa y vlevo): alela na epizomu, prázdná kolečka (osa y vpravo): alela v chromozomu.

Podle (ROSCHE a FOSTER 1999).

B) Štěpení epizomu v *oriT*.

Podle (PONDER *et al.* 2005).

2.1.3. Molekulární mechanismy adaptivní mutagenize

2.1.3.1. MUTAGENNÍ DNA POLYMERÁZY

Mutagenní (angl. error-prone) polymerázy rodiny Y jsou široce rozšířeným typem DNA polymeráz. Jejich vysoká mutagenicita je způsobena absencí korekční aktivity (angl. proofreading) při replikaci templátové DNA (NOHMI 2006). Tyto enzymy jsou molekulárními specialisty - disponují schopností replikovat templát obsahující léze (angl. lesions) – chemicky poškozené nukleotidy (např. TT-dimery), čímž se odlišují od hlavní vegetativní DNA polymerázy III. Tento jejich atribut je dán právě absencí korekční aktivity, neboť vegetativní polymeráza III s inaktivovanou korekční aktivitou je rovněž schopna replikovat templát obsahující léze (STRAUSS 2002). Aktivní centra mutagenních polymeráz mají navíc volnější konformaci než u polymerázy III, což

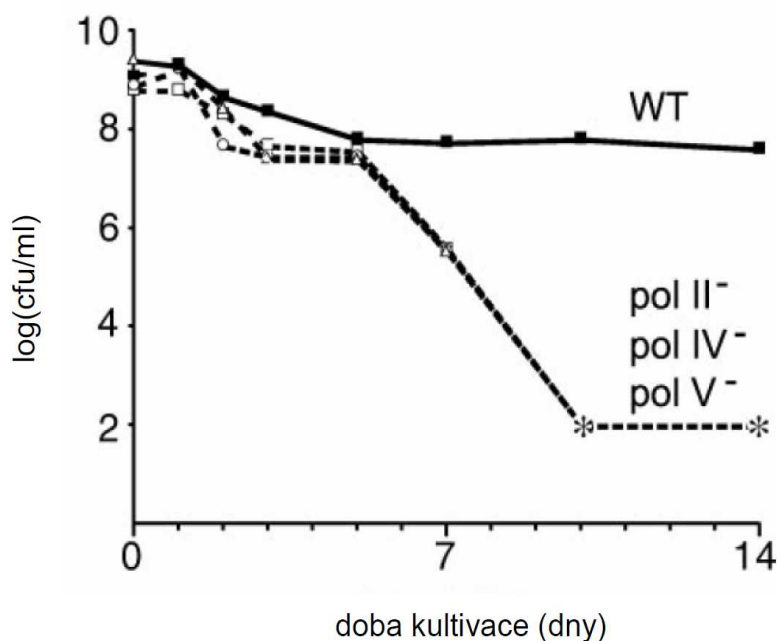
umožňuje lepší akomodaci poškozených nukleotidů a tedy i snadnější replikaci přes léze (JAROSZ *et al.* 2007).

Dalšími charakteristickými vlastnostmi mutagenních polymeráz rodiny Y jsou nízká procesivita replikace (NOHMI 2006) a transkripční indukce prostřednictvím buněčné SOS odpovědi (TIPPIN *et al.* 2004). SOS odpověď (**Kap. 2.1.4.2.**) je zpravidla vyvolána poškozením DNA. Indukce mutagenních polymeráz tak představuje účinný adaptivní mechanismus, jak překonat tento stav ohrožující životně důležité buněčné funkce.

U *E. coli* se vyskytují dvě polymerázy z Y rodiny: PolIV (syn. DinB) a PolV (syn. UmuD₂C). PolIV se skládá z katalytické podjednotky (UmuC) a dvou procesivitu zajišťujících podjednotek (UmuD₁). Aktivní UmuD₁ vzniká autoproteolytickým štěpením UmuD proteinu za spoluúčasti RecA-ssDNA nukleoproteinového filamentu. Tato reakce probíhá stejným mechanismem jako štěpení LexA represoru SOS odpovědi a cI represoru lytického cyklu fága λ, což je podpořeno signifikantní homologií v aminokyselinovém složení aktivního místa proteolýzy (LUO *et al.* 2001). PolV je tak regulována v rámci SOS odpovědi dvakrát: na transkripční a posttranslační úrovni.

Široké taxonomické rozšíření polymeráz rodiny Y svědčí o jejich pozitivním významu pro dlouhodobou fitness hostitele. Studie na sbírce izolátů *E. coli* ukázala, že fylogenetická historie genů kódujících mutagenní polymerázy odpovídá historii kontrolní skupiny metabolických genů. Rovněž procento nesynonymních aminokyselinových záměn se nelišilo od kontrolní skupiny genů. Obojí svědčí o prezervaci funkce těchto polymeráz, což nepřímo poukazuje na jejich výhodnost z hlediska dlouhodobé konkurenceschopnosti jejich hostitele (BJEDOV *et al.* 2003).

Selekční výhoda mutagenních polymeráz u *E. coli* byla dále prokázána v kompetičních experimentech. Selekční výhoda kmene proficientního z hlediska mutagenních polymeráz pravděpodobně tkví v jimi produkovaných výhodných mutacích. Mutantní kmeny s deaktivovanými polymerázami nevykazují sníženou zdatnost ve stacionární fázi, pokud jsou samostatně kultivovány v čisté kultuře (YEISER *et al.* 2002). Při jednorázové kultivaci společně s divokým kmenem se počínaje pátým dnem stacionární fáze začne proporce jednoduchých polymerázových mutantů snižovat, až po desátém dni kultivace téměř vymizí (**Obr. 3**). Kompetiční vytěsnění je značně urychleno u dvojitého mutantu s oběma polymerázami inaktivovanými (YEISER *et al.* 2002).



OBRÁZEK 3: Efekt mutagenních polymeráz na kompetiční zdatnost hostitele při dlouhodobém hladovění.

Použité symboly: prázdné kolečko – PolIV⁻, prázdný trojúhelník – PolV⁻, prázdný čtverec – PolIII⁻ (polymeráza rodiny B s podobnými vlastnostmi jako mutagenní polymerázy).

Hvězdička označuje hodnoty menší než 100 cfu/ml.

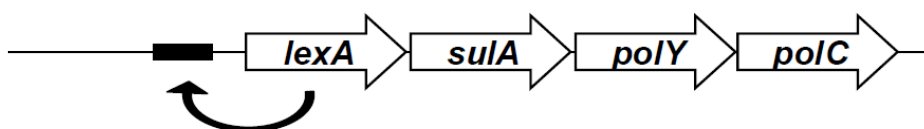
Podle (YEISER *et al.* 2002).

U další SOS-inducibilní mutagenní polymerázy (náležící do rodiny C), původem z *Mycobacterium tuberculosis*, byl také prokázán významný přínos pro fitness hostitelské bakterie. V tomto případě je přítomnost polymerázy nezbytná pro efektivní průběh infekce myšního modelu a její patogenicitu, stejně jako pro vznik rezistence vůči terapeutickým antibiotikům (BOSHOF *et al.* 2003).

Na rozdíl od většiny genů, jejichž proteinové produkty se zúčastní procesů zpracování informace kódované v DNA, se geny mutagenních polymeráz rodiny Y často vyskytují na mobilních genetických elementech plazmidového typu. Homology *umuCD* operonu s biochemicky potvrzenou funkcí (SOS-inducibilní mutagenicita) byly nalezeny např. na katabolickém plazmidu *Pseudomonas putida* (TARK *et al.* 2005), konjugativním transpozonom *Providencia rettgeri* (MEAD *et al.* 2007) a plazmidu podmiňujícím antibiotikovou rezistenci *E. coli* (GOLDSMITH *et al.* 2000). Vzhledem k tomu, že plazmidy jsou dynamické replikony z hlediska např. hostitelského spektra nebo počtu

kopí na buňku, může tato asociace potencovat selekční výhodu (viz výše) danou přítomností homologu mutagenní PolV v buňce.

Geny kódující mutagenní polymerázy jsou rovněž obligátní součástí tzv. SOS genové kazety. Tento operon sestávající ze dvou až čtyř genů je vždy regulován LexA represorem, jehož vazebné místo obsahuje ve své promotorové oblasti, a je tak indukován poškozením DNA. Dva z genů, jejichž přítomnost v kazetě je nejvíce konzervovaná, kódují mutagenní polymerázy rodiny Y a C (**Obr. 4**). Tato „kazeta adaptivní mutagenese“ se vyskytuje napříč celým spektrem fylogenetických skupin bakteriální říše (ERILL *et al.* 2006), což je opět dokladem o významné roli mutagenních polymeráz v bakteriální evoluci.



OBRÁZEK 4: Schéma typické proteobakteriální SOS-inducibilní genové kazety.

Pořadí genů zleva: *lexA* – represor SOS odpovědi, *sulA* – inhibitor buněčného dělení, *polY* – mutagenní polymeráza rodiny Y, *polC* – mutagenní polymeráza rodiny C. Šipka znázorňuje autoregulaci promotoru SOS kazety prostřednictvím kódovaného LexA represoru.

Podle (ABELLA *et al.* 2004, ERILL *et al.* 2006).

2.1.3.2. STRUKTURNÍ VLASTNOSTI DNA

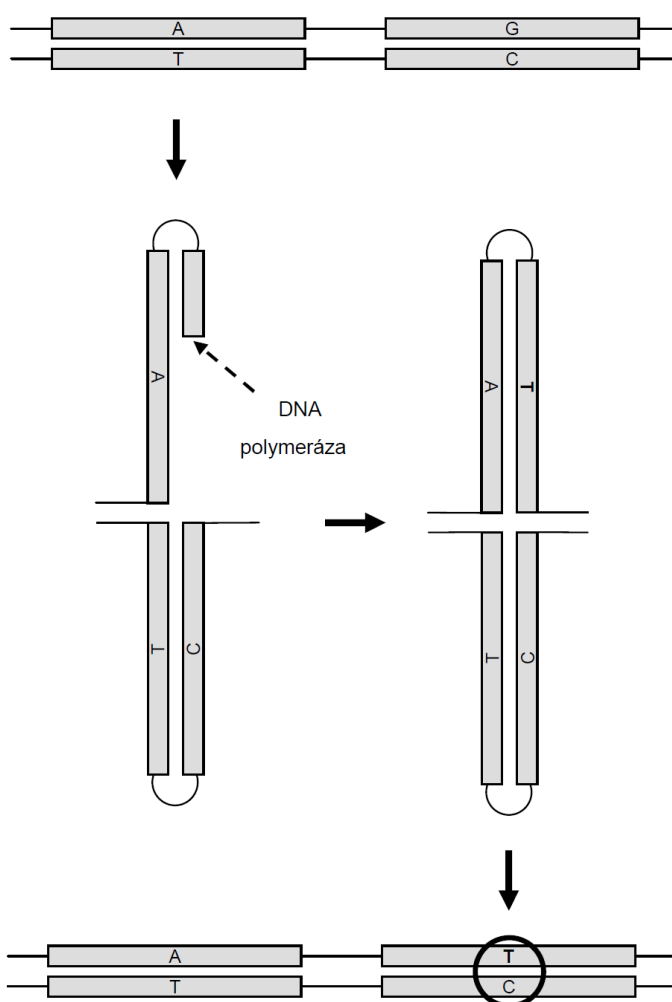
2.1.3.2.1. Sekundární struktury DNA

Díky komplementaritě bází v sekvenci DNA může docházet nejen k párování komplementárních antiparalelních řetězců, jak je tomu běžné u dvojřetězcové šroubovice, ale také k intramolekulárnímu párování v rámci jednoho řetězce. Produktem takového párování jsou tzv. kruciformní struktury (angl. cruciform structures, stem-loop structures).

Kruciformní struktury jsou podmíněny přítomností palindromických motivů v sekvenci DNA (blízkých inverzních repetit). Pokud nejsou palindromické sekvence zcela navzájem komplementární, dávají vzniknout kruciformním strukturám, které obsahují nespárované dvojice nukleotidů. Báze postrádající komplementární protipól jsou náchylné k chemickým modifikacím. Například rychlost deaminace cytosinu je stokrát

vyšší v jednořetězcové DNA než pokud je součástí dvojšroubovice. Deaminace cytosinu na uracil vede k C→T tranzicím, což jsou nejčastější přirozeně se vyskytující mutace u *E. coli* (WRIGHT 2000). Lze tedy předpokládat, že kruciformní struktury jsou místy zvýšené mutageny (angl. hot spots) díky časté přítomnosti nekomplementárních nukleotidů.

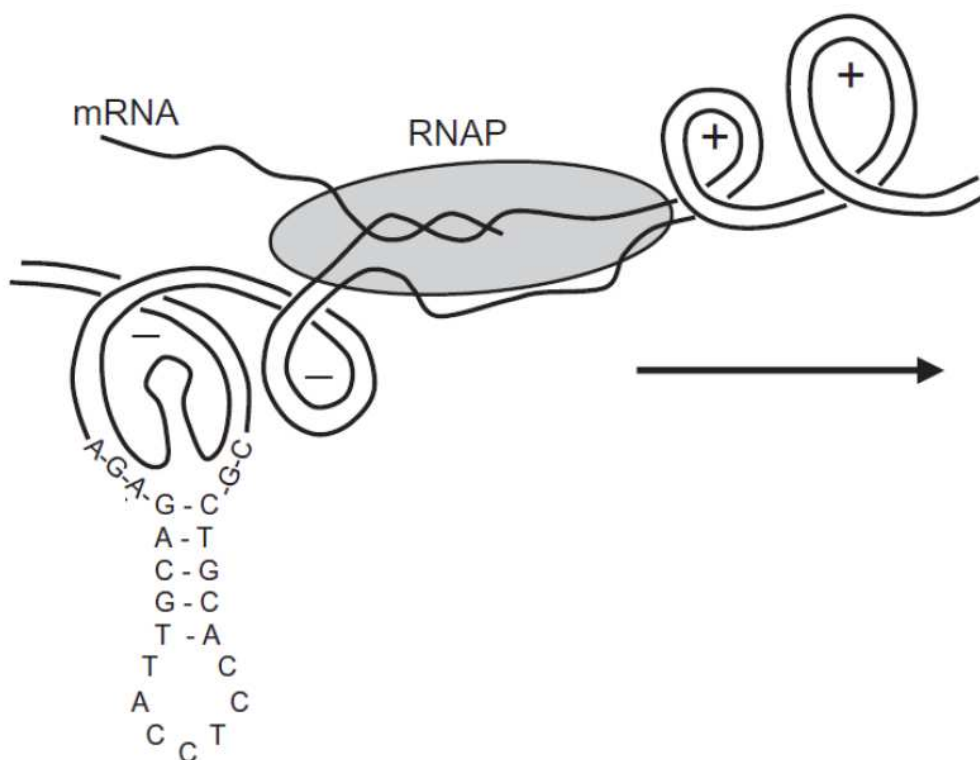
Kromě expozice nespárovaných bází vůči mutagenním modifikacím je známý další mechanismus mutageny u kruciformních struktur. Jeho znakem je konverze původně imperfektní (ne zcela komplementární) palindromické sekvence v perfektní palindrom. Děje se tak mechanismem replikace DNA na templátu komplementární části palindromu (**Obr. 5**).



OBRÁZEK 5: Schéma templátem řízené mutageny v kruciformních strukturách.

Komplementární (palindromické) úseky jsou vyznačeny jako šedé obdélníky. Vzniklá mutace (zde G→T) je zakroužkována.

Tato templátem řízená mutageneze v kruciformních strukturách byla několikrát experimentálně prokázána (VISWANATHAN *et al.* 2000, BURKALA *et al.* 2007). Sekundární struktury, predikované pomocí *in silico* sekvenčního modelování, se ukázaly být preferenčními místy mutageneze (WRIGHT *et al.* 2003, BURKALA *et al.* 2007). Kruciformní struktury jsou méně termodynamicky stabilní než standardní dvojšroubovicová forma DNA. Pro jejich vznik je nutná negativní superhelicita - podvinutí dvojřetězce DNA. Ve zvýšené míře se objevují na plazmidech, pro něž je vysoká negativní superhelicita charakteristická (WRIGHT 2000). *In vivo* se kruciformní struktury vyskytují preferenčně v transkribovaných oblastech v blízkosti komplexu RNA polymerázy, což je podmíněno negativní superhelicitou, která je generována transkripční aktivitou enzymu (RAHMOUNI a WELLS 1992) (**Obr. 6**).



OBRÁZEK 6: Vliv transkripce na superhelicitu a vznik kruciformních struktur.

Směr transkripce je vyznačen šipkou. Matematické symboly znázorňují úroveň lokální superhelicity (pozitivní vs. negativní). Dále je uvedena sekvence kruciformní struktury. RNAP – RNA polymeráza. Podle (WRIGHT 2004).

Intenzivní transkripce tak může prostřednictvím superhelicitou-indukovaných kruciformních struktur zvyšovat rychlost mutagenese, což je jedním z možných vysvětlení pozorované transkripční-indukované mutagenese (WRIGHT *et al.* 1999). Zvýšení mutagenese kruciformních struktur bylo také pozorováno u *E. coli* s defektní topoizomerázou I (BURKALA *et al.* 2007), což dále svědčí o roli superhelicity v mutagenních procesech.

Popsaný mechanismus představuje jednu z možností cílení mutací na konkrétní geny, v tomto případě geny podléhající intenzivní transkripci. Při nedostatku živin na počátku stacionární fáze růstu dochází u *E. coli* k prudkému nárůstu negativní superhelicity v souvislosti s derepresí mnoha metabolických a stresových genů (WRIGHT 2000). Je tak možné, že vedlejším produktem této stresové transkripční aktivity je mutagenese vyvolaná superhelicitou-podmíněnými kruciformními strukturami.

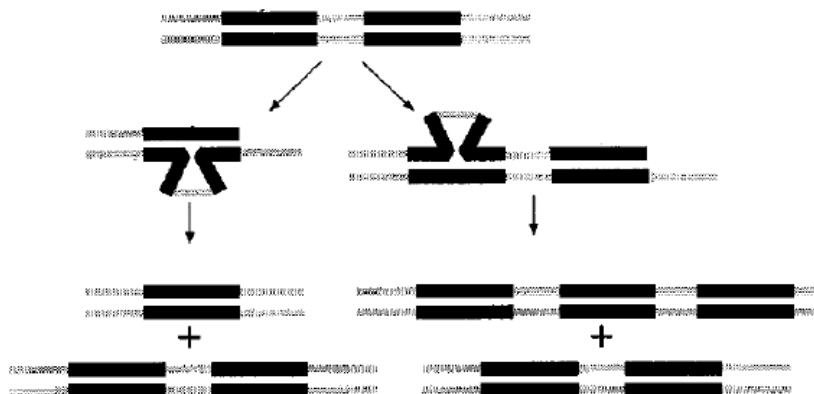
2.1.3.2.2. Repetitivní sekvence

Některé typy repetitivních sekvencí podléhají ve zvýšené míře mutačním procesům. Úseky kontingence (angl. contingency loci) jsou tvořené tandemově uspořádanými repetitivními sekvencemi jednotek délky jednoho až čtyř párů bází. Vyskytují se téměř výhradně u patogenních bakterií s malým genomem, z nichž většina je schopna přirozené transformace (MOXON *et al.* 2006).

Díky své repetitivní povaze jsou úseky kontingence značně náchylné k mutacím způsobeným sklouznutím templátu DNA polymerázy při replikaci (viz dále). Intenzivně v nich probíhají reverzibilní procesy expanze a redukce, tedy přibývání a ubývání repetitivních jednotek.

Úseky kontingence se z velké části vyskytují v regulačních oblastech faktorů patogenese a antigenní specifity (VAN DER WOUDE a BAUMLER 2004) a jejich dynamika je zodpovědná za příslušnou fenotypovou variabilitu. Z evolučního hlediska jsou tedy mutační procesy postihující úseky kontingence typem lokalizované adaptivní mutagenese, propůjčující svému nositeli zjevnou selekční výhodu v překonání hostitelských obranných mechanismů.

Dalším typem repetitivních sekvencí s vysokým mutačním potenciálem jsou přímé DNA repetice. Mutace postihující přímé repetice vznikají mechanismem sklouznutí templátu DNA polymerázy (angl. slipped-strand mispairing, syn. replication misalignment). Tímto způsobem vznikají delece a duplikace (**Obr. 7**).



OBRÁZEK 7: Schéma vzniku delecí a duplikací mechanismem sklouznutí templátu.

Přímé repetice jsou vyznačeny černě. Replikační intermediát je znázorněn ve druhém řádku. Mutace (delece – vlevo, duplikace – vpravo) je segregována během další replikace a buněčného dělení (dole). Podle (BZYMEK a LOVETT 2001).

Frekvence mutačních událostí mezi přímými repeticemi exponenciálně klesá s jejich rostoucí vzdáleností (CHEDIN *et al.* 1994), s rostoucí délkou repetice naopak frekvence mutací exponenciálně stoupá (PIERCE *et al.* 1991). Sekvenční divergence mezi jednotlivými kopiemi přímých repetití snižují frekvenci mutací o několik řádů (LOVETT 2004).

Bylo zjištěno, že u *E. coli* je počet krátkých přímých repetití (délka minimálně 9 párů bází, maximální vzdálenost 1 kilobáze) v genech, jejichž produkty se účastní stresové odpovědi, statisticky významně zvýšen (ROCHA *et al.* 2002). Přítomnost krátkých přímých repetití tedy může mít adaptivní charakter – zvyšovat verzatilitu stresové odpovědi.

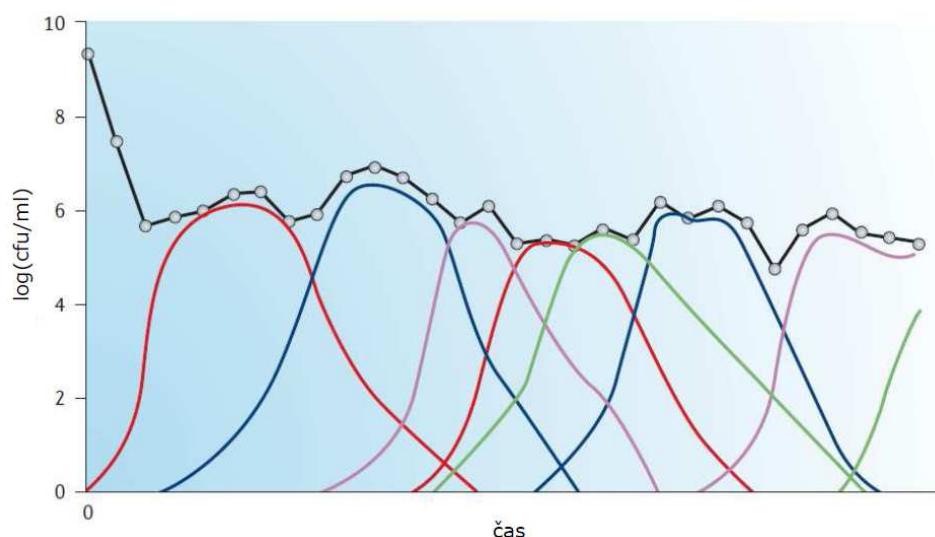
Poslední z hlavních mechanismů adaptivní mutagenese, inaktivace opravných systémů DNA, je pojednán v samostatném oddílu (**Kap. 2.2.3**).

2.1.4. Příčiny adaptivní mutageneze

2.1.4.1. NUTRIČNÍ A ENVIRONMENTÁLNÍ STRES

Limitace živinami je pro bakteriální buňku v jejím přirozeném prostředí velmi častá, stejně jako intenzivní kompetice o dostupné potravní zdroje. V laboratorních podmínkách jsou procesy způsobené nedostatkem živin (hladověním) studovány především v souvislosti se stacionární fází růstu jednorázové kultivace. Stacionární fáze v komplexním médiu trvá u *E. coli* dva až tři dny, načež následuje fáze odumírání, v jejímž průběhu dochází k poklesu počtu živých buněk o 99 %. Od této chvíle se překvapivě počet buněk přestává dále snižovat – nastává „dlouhodobá stacionární fáze“. V tomto stavu (za nezměněných kultivačních podmínek) může být daná kultura udržována po řadu let, aniž by koncentrace živých buněk klesla pod hodnotu milion na mililitr kultury (FINKEL 2006).

Procesy probíhající v dlouhodobé stacionární kultuře jsou vysoce dynamické. Panuje zde přibližná rovnováha mezi odumíráním buněk a růstem jiných, které využívají živiny uvolněné rozpadem mrtvých buněk (ZINSER a KOLTER 2004). V průběhu dlouhodobé stacionární fáze dochází k opakované proliferaci klonů nesoucích mutace umožňující efektivní využívání dostupných živin. Vlivem těchto výhodných mutací jednotlivé klony kompetičně zcela vytěsní zbytek populace (**Obr. 8**).



OBRÁZEK 8: Proliferace mutantů během dlouhodobé stacionární fáze.

Barevné křivky odpovídají jednotlivým mutantním klonům. Černě je znázorněna koncentrace veškerých živých buněk v kultuře.

Podle (FINKEL 2006).

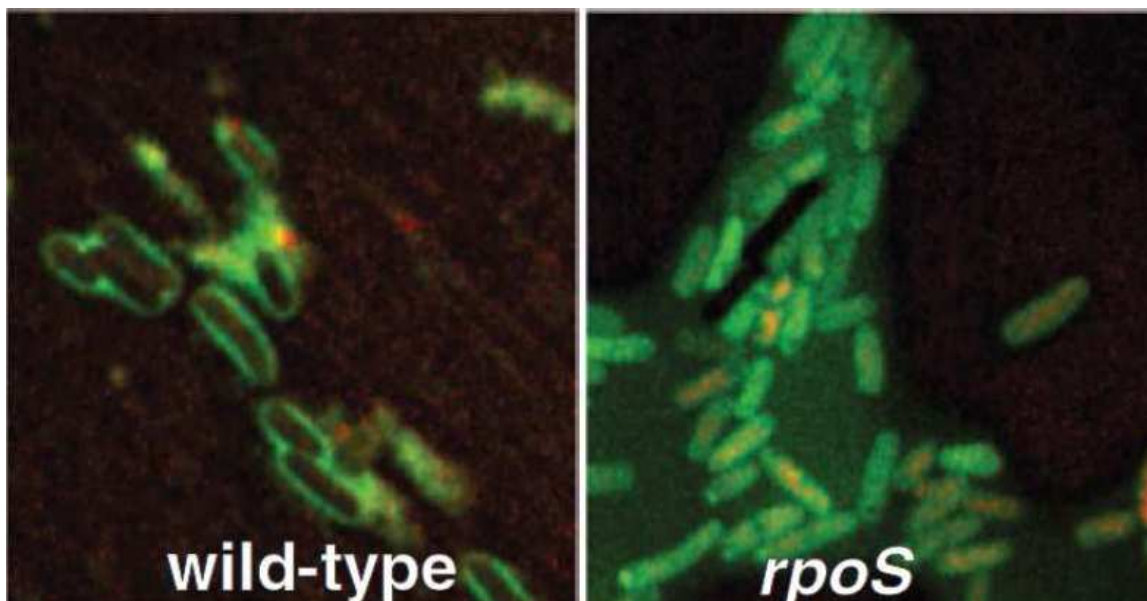
Pro selekční výhodu těchto klonů se používá název GASP (angl. growth advantage in stationary phase) (ZAMBRANO *et al.* 1993). GASP je důsledkem čistě mutačních procesů – je možné jej genetickými technikami přenést do WT buněk. Ukázalo se, že GASP je způsoben mj. mutacemi v *rpoS*. Tento gen kóduje alternativní sigma faktor komplexu RNA polymerázy, který sehrává klíčovou roli v bakteriálních stresových odpovědích. Inaktivace RpoS vede k rapidnímu snížení viability vlivem chladového a oxidačního stresu, hyperosmolarity a hyperacidit (FERENCI 2003).

K fixaci defektních alel *rpoS* obecně dochází za podmínek limitace živinami. *rpoS* mutanti se akumulují v tekuté kultuře počínaje pátým dnem stacionární fáze (FARRELL a FINKEL 2003), důsledkem čehož vzniká GASP. Podobně dochází k pravidelné selekci těchto alel při kontinuální kultivaci v chemostatu limitovaném zdrojem uhlíku nebo zdrojem dusíku (NOTLEY-MCROBB *et al.* 2002) v širokém rozmezí experimentálních podmínek (KING *et al.* 2006).

Inaktivace *rpoS* umožňuje buňkám účinnější využití živin. Mutace v tomto genu jsou zodpovědné za významné rozšíření spektra růstových substrátů využitelných hostitelem (KING *et al.* 2004). Například testováním schopnosti růstu na sukcinátu jako jediném zdroji uhlíku a energie je možné vyselektovat výlučně *rpoS*⁻ mutanty, neboť divoký kmen není schopen sukcinát využít (CHEN *et al.* 2004). Inaktivace *rpoS* rovněž umožňuje efektivnější využívání zdrojů (KING *et al.* 2004).

U izolátů *E. coli* byl zjištěn vysoký polymorfismus v genu *rpoS*. Důsledkem toho je široké spektrum fenotypů od nulového po plně RpoS⁺, což svědčí o intenzivní selekci (FERENCI 2003). Subjektem selekce jsou v tomto případě dvě funkce: odolnost vůči stresům (pozitivně regulovaná RpoS) a konkurenceschopnost v boji o živiny (negativně regulovaná RpoS) (KING *et al.* 2004).

RpoS hraje zásadní roli v regulaci buněčných procesů, z nichž některé mohou mít mutagenní účinky. Prostřednictvím RpoS dochází k indukci mutagenní PolIV (**Kap. 2.1.3.1.**), jejímž působením vzniká velká většina mutací u kmene *E. coli* FC40 (**Kap. 2.1.2.**) (LAYTON a FOSTER 2003, LOMBARDO *et al.* 2004). Na druhou stranu, inaktivace RpoS má za následek represi mechanismů zabraňujících tvorbě reaktivních forem kyslíku (**Obr. 9**), jimiž způsobené oxidační poškození DNA může také vést ke zvýšené mutagenzi. Environmentální stresy a nedostatek živin tak mohou odlišnými cestami spouštět procesy adaptivní mutagenese.



OBRÁZEK 9: Role RpoS v ochraně buňky před oxidačním poškozením.

Buňky z jednodenní kolonie byly barveny látkou, která získává schopnost fluorescence působením reaktivních forem kyslíku.

Podle (SAINT-RUF a MATIC 2006).

2.1.4.2. FAKTORY VYVOLÁVAJÍCÍ SOS ODPOVĚĎ

2.1.4.2.1. Poškození DNA

Mnoho faktorů, způsobujících poškození DNA, funguje jako induktor SOS odpovědi, jejímž cílem je toto poškození zmírnit. Vedlejším produktem opravy poškozené DNA je zvýšená mutagenese, uskutečňovaná prostřednictvím činnosti mutagenních polymeráz (**Kap. 2.1.3.1.**), jak je tomu např. u klasických pozorování mutagenese fága λ v UV-indukovaných buňkách *E. coli* (WEIGLE 1953).

Oxidační stres způsobuje oxidaci guaninu na 8-oxoguanin, což je silný mutagen, jehož prostřednictvím vznikají s vysokou frekvencí transverze. Míra oxidačního stresu se zvyšuje ve stacionární fázi růstu (SCHURIG-BRICCIO *et al.* 2009) a vlivem defektů v RpoS, častých v přirozených izolátech (**Kap. 2.1.4.1.**). Kromě přímého mutagenního účinku vyvolává oxidační poškození DNA také SOS odpověď (GOERLICH *et al.* 1989),

kteřá tyto účinky potencuje. Mutageneze tak může být modulována prostřednictvím regulace míry rezistence vůči oxidačnímu stresu.

2.1.4.2.2. Antibiotika

Působením β -laktamových antibiotik dochází k aktivaci SOS odpovědi (MILLER, C. *et al.* 2004, MAIQUES *et al.* 2006). Mechanismus této indukce zahrnuje aktivaci dvoukomponentového systému DpiAB podmíněnou inhibicí funkce penicilin-vazebného proteinu 3 (PBP3). Efektorový protein DpiA inhibuje iniciaci replikace DNA vazbou sekvence replikačního počátku, čímž dochází k indukci SOS odpovědi. Biologickou funkcí této aktivační dráhy je SOS-závislá indukce inhibitoru buněčného dělení SulA, což zmírňuje baktericidní efekt β -laktamových antibiotik inhibujících PBP3, která působí jen na dělící se buňky (MILLER, C. *et al.* 2004). Subletální koncentrace β -laktamových antibiotik tak prostřednictvím SOS odpovědi působí zvýšení mutageneze (BLAZQUEZ *et al.* 2006) a mohou tím přispívat ke vzniku rezistence např. při kombinované antibiotikové terapii.

Zcela jiným mechanismem dochází k indukci SOS odpovědi působením fluorochinolonových antibiotik. Za indukci jsou zde zodpovědné dvojřetězcové zlomy v DNA – intermediát reakce katalyzované DNA gyrázou. Následkem inhibice gyrázy působením fluorochinolonů dochází k perzistenci a rekombinační opravě těchto zlomů, což vyvolává SOS odpověď (CIRZ a ROMESBERG 2007). Tento proces má za následek podstatné zvýšení frekvence mutací podmiňujících rezistenci k fluorochinolonům (CIRZ a ROMESBERG 2006) a vykazuje tak charakteristiky typické pro adaptivní mutagenezi. Role komponent SOS odpovědi v mutagenezi způsobené fluorochinolony byla přímo prokázána (CIRZ *et al.* 2005).

2.1.5. Adaptivní mutagenese u *Bacillus subtilis*

2.1.5.1. POPIS EXPERIMENTÁLNÍHO SYSTÉMU

Ke studiu procesů adaptivní mutagenese byl dosud využíván jediný experimentální systém. Podobně jako u kmene *E. coli* FC40 je zde měřena frekvence reverzí mutací při dlouhodobém hladovění na minerálních plotnách. V tomto případě se jedná o auxotrofní mutace v genech biosyntézy aminokyselin. Používaný kmen *B. subtilis* YB955 nese tři chromozomálně lokalizované auxotrofní mutace: dvě nonsense (*hisC952* – amber, *metB* – ochre) a jednu missense (*leuC427* - Gly→Arg) záměnu (SUNG a YASBIN 2002). V tomto experimentálním systému probíhá mutagenese za podmínek restriktivních pro růst a replikaci DNA, což je způsobeno neschopností syntetizovat esenciální živinu.

2.1.5.2. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MUTAGENEZI *B. SUBTILIS* YB955

Byl studován vliv řady genů na mutagenesi u *B. subtilis* YB955.

Výtěžek revertantů není, na rozdíl od *E. coli* FC40, ovlivněn inaktivací rekombinačních funkcí (RecA) ani stresového sigma faktoru RNA polymerázy (σ^B) (SUNG a YASBIN 2002). Kompletní inaktivace systému opravy poškození způsobeného 8-oxoguaninem zvyšuje výtěžek reverzí nonsense mutací o dva řády, což naznačuje, že tento DNA-opravný mechanismus je během hladovění na selekčních plotnách z velké části funkční (VIDALES *et al.* 2009).

V genomu *B. subtilis* jsou přítomné geny kódující homology mutagenních polymeráz PolIV a PolV (**Kap. 2.1.3.1.**), z nichž pouze u homologu PolIV byl prokázán pozitivní vliv na mutagenesi kmene YB955. Činností této polymerázy vzniká přibližně polovina selektovaných mutací za podmínek hladovění (SUNG *et al.* 2003), což je v souladu s pozorovanou zvýšenou mutagenesí, která nastává při umělém zvýšení její exprese (DUIGOU *et al.* 2004).

Dále byl prokázán pozitivní vliv několika transkripčních regulátorů na mutagenesi *B. subtilis* YB955. Inaktivace *comK* snižuje frekvenci reverzí nonsense mutací *hisC952* a *metB*, zatímco inaktivací *comA* dochází ke specifickému, trojnásobnému snížení frekvencí reverzí *hisC952* (SUNG a YASBIN 2002). Další protein, Mfd, podílející se kromě transkripce i na katabolické represi, je zodpovědný za vznik poloviny z celkového množství reverzí alel *hisC952* a *metB* a všech reverzí *leuC427* (ROSS *et al.* 2006).

U Mfd-deficientního kmene navíc nebyla reverze nonsense mutace *metB* v žádném

z testovaných případů produktem zpětné mutace, nýbrž suprese prostřednictvím modifikované tRNA (ROSS *et al.* 2006). Zdá se, že pozitivní vliv Mfd na mutagenézi je realizován stimulací transkripce genů podléhajících selekci (ROBLETO *et al.* 2007).

Vliv mismatch-repair systému na mutagenézi *B. subtilis* YB955 je pojednán samostatně (Kap. 2.2.3.1.2.).

2.2. MISMATCH-REPAIR SYSTÉM (MMR)

2.2.1. Molekulární mechanismy MMR

2.2.1.1. SPECIFITA ANTIMUTAČNÍHO ÚČINKU

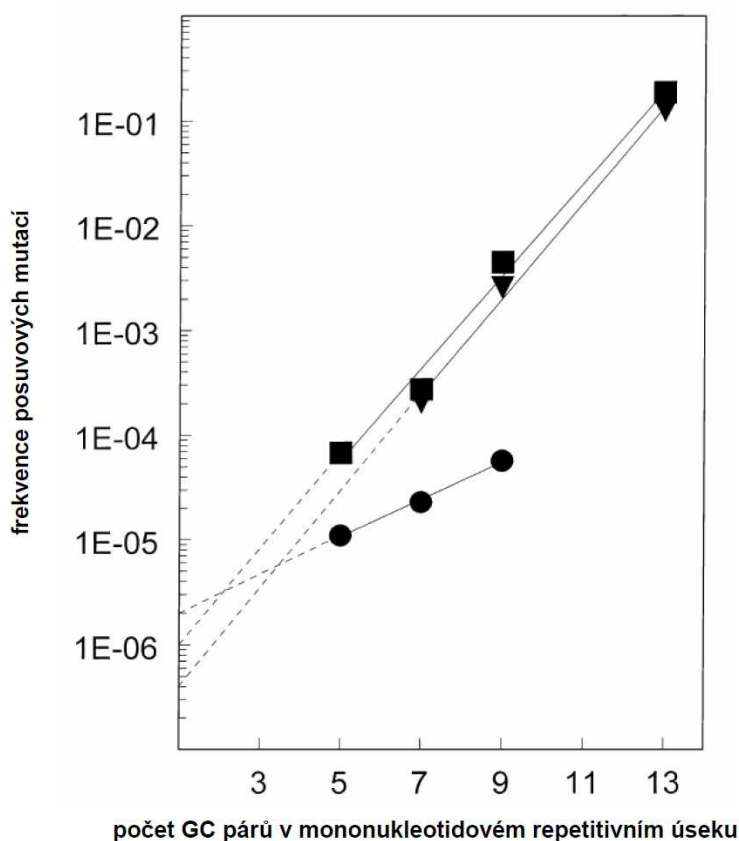
Mismatch-repair systém (dále jen MMR) je jedním z nejdůležitějších mechanismů zajištění genetické stability organismů (HARFE a JINKS-ROBERTSON 2000). Jeho působením dochází k prevenci široké škály mutačních událostí.

MMR snižuje frekvenci vzniku obou typů tranzicí, a to nejméně o dva řády (CUPPLES a MILLER 1989). Dále je schopen zabránit mutacím způsobeným chemickou modifikací bází, kam patří např. 8-oxoguanin, endogenně se vyskytující ve vysoké míře (WYRZYKOWSKI a VOLKERT 2003). V tomto případě může funkční MMR zcela zastoupit činnost specifických enzymů zabraňujících mutagenézi způsobené 8-oxoguaninem – MutT, MutM a MutY (VIDALES *et al.* 2009).

MMR také významně snižuje četnost inzercí a delecí u repetitivních DNA sekvencí typu úseky kontingence (**Kap. 2.1.3.2.2.**). S vysokou účinností zabraňuje posuvovým mutacím u mononukleotidových tandemových repetitiv (Obr. 10) (CUPPLES *et al.* 1990). Oprava heteroduplexů DNA nesoucích jeden až tři nespárované nukleotidy (intermediáty tohoto typu mutagenéze) byla prokázána *in vivo* (PARKER a MARINUS 1992).

Za rozpoznání potenciálních mutací je zodpovědný první protein kaskády MMR, MutS. MutS se v buňce vyskytuje ve formě homodimerů, prstencovitě obklopujících dvojřetězcovou molekulu DNA. Kromě DNA vazebných vlastností mají tyto dimery schopnost štěpit ATP, přičemž aktivní místo této enzymatické aktivity je hybridní, na jeho konformaci se podílejí aminokyseliny z obou podjednotek dimeru (OBMOLOVA *et al.* 2000). ATPázová aktivita je zodpovědná za dynamickou povahu interakce mezi MutS a DNA, cyklus hydrolyzy ATP umožňuje dimeru přemísťovat se podél dvojšroubovice DNA (JUNOP *et al.* 2001).

K vlastnímu rozpoznání mutagenního místa, tj. špatně spárovaných nebo nespárovaných (extrahelikálních) nukleotidů, dochází při ohnutí DNA pod úhlem 60°. Tehdy nastává změna konformace MutS vlivem interakce (angl stacking) aromatického kruhu konzervovaného fenylyalaninu a mutagenní báze (NATRAJAN *et al.* 2003). Následkem toho ztrácí MutS ATPázovou aktivitu, což umožňuje jeho perzistenci na mutagenním místě a specifickou aktivaci dalšího proteinu kaskády MMR, MutL.



OBRÁZEK 10: Vliv MMR na mutagenizi mononukleotidových tandemových repetič.

Použité symboly: kolečka – *E. coli* K-12 (WT), trojúhelníky – *E. coli* K-12 (MMR⁻),

čtverce – *E. coli* O157:H7 (MMR⁻).

Podle (LEVY a CEBULA 2001).

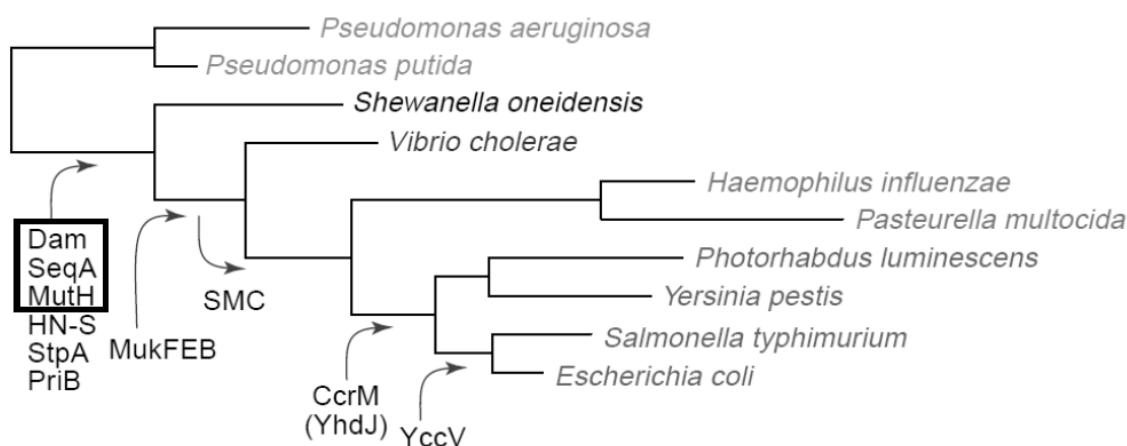
2.2.1.2. PŘENOS SIGNÁLU A KOREKCE MUTACÍ

Následkem rozpoznání mutagenního místa prostřednictvím MutS dochází k aktivaci proteinu MutL. MutL patří spolu s DNA gyrázou a histidinovými kinázami do velké skupiny strukturně příbuzných GHKL ATPáz, má tedy schopnost štěpit ATP (BAN a YANG 1998). Rápidní hydrolýza ATP je podmíněna vazbou DNA (ROBERTSON *et al.* 2006). Strukturu MutL tvoří dvě samostatné N- a C-terminální domény, spojené neuspořádaným linkerem, jehož délka a sekvence jsou hypervariabilní mezi různými organismy (GUARNE *et al.* 2004). Stejně jako MutS se MutL vyskytuje *in vivo* ve formě homodimerů. Za dimerizaci je zodpovědná C-terminální doména (GUARNE *et al.* 2004).

MutL je patrně asociován s komplexem holoenzymu DNA polymerázy III. Byla prokázána ATP-závislá interakce s γ a δ podjednotkami tohoto komplexu (LI, F. *et al.* 2008). Dále byla zjištěna interakce MutL s β -svorkou polymerázového komplexu, nezbytná pro správnou funkci MMR *in vivo* (LOPEZ DE SARO *et al.* 2006). V evolučně původním uspořádání MMR, soudě dle situace u fylogeneticky bazálních organismů, je součástí C-terminální části MutL vysoce konzervovaná doména s endonukleázovou aktivitou (KADYROV *et al.* 2006, FUKUI *et al.* 2008, DUPPATLA *et al.* 2009). Endonukleolytická funkce MutL závisí na přítomnosti dvojmocných kationtů kovů (KOSINSKI *et al.* 2008) a interakci s β -svorkou (KADYROV *et al.* 2006). Ačkoliv role endonukleázové aktivity MutL nebyla zatím jednoznačně objasněna, lze se důvodně domnívat, že právě ona je zodpovědná za kritický krok dráhy MMR – incizi vlákna DNA nesoucího mutaci, následovanou excizní opravou.

MMR u *E. coli* představuje odvozené uspořádání tohoto opravného mechanismu.

Endonukleázová doména MutL *E. coli* je dezintegrovaná mutačními procesy (KADYROV *et al.* 2006). Endonukleolytickou funkci přebírá samostatný protein, MutH, jehož nukleázová aktivita je cílená na nemetylovanou sekvenci GATC v hemimetylované dvojřetězcové DNA (WELSH *et al.* 1987). Homology MutH se vyskytují pouze v jedné monofyletické větvi gamaproteobakterií, a to vždy společně s Dam a SeqA proteiny, jejichž funkce je také spjata s GATC palindromy (**Obr. 11**).

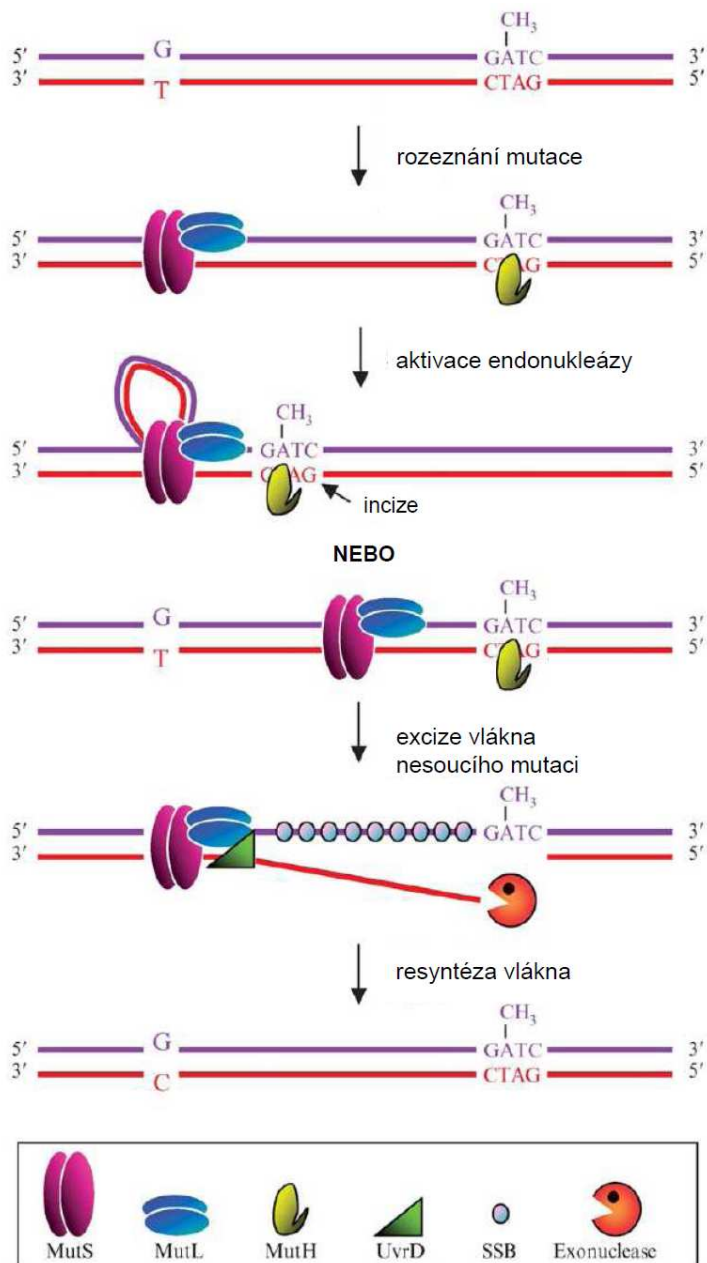


OBRÁZEK 11: Fylogenetický strom vybraných gamaproteobakterií.

Je vyznačena evoluční událost vedoucí k zisku MutH, Dam a SeqA (zarámováno).

Podle (LOBNER-OLESEN *et al.* 2005).

MutH vykazuje strukturální a sekvenční homologii s typickými endonukleázami restriktivně-modifikačních systémů (BAN a YANG 1998), Dam metyláza je naopak příbuzná modifikačním enzymům těchto systémů (BUJNICKI 2001). Dam-závislá metylace slouží v rámci MMR u *E. coli* jako signál odlišující templátové vlákno dvojšroubovice DNA od vlákna nově syntetizovaného (**Obr. 12**). Je tedy pravděpodobné, že Dam a MutH, esenciálních komponenty MMR u *E. coli*, se vyvinuly z dvojice proteinů jednoho restriktivně-modifikačního systému.



OBRÁZEK 12: Schéma mechanismu MMR u *Escherichia coli*.

SSB – vazebný protein jednořetězcové DNA. Bližší vysvětlení v textu.

Podle (JOSEPH *et al.* 2006).

Schopnost MutH endonukleolyticky štěpit DNA je za normálních okolností latentní. K její aktivaci dochází pouze prostřednictvím kontaktu s C-terminální doménou MutL (HALL a MATSON 1999). MutL-závislá stimulace endonukleázové aktivity MutH je závislá na hydrolýze ATP (LI, G. M. 2008) a patrně zahrnuje pohyb komplexu MutS-MutL podél DNA (PLUCIENNIK a MODRICH 2007). Po té, co MutH zavede do nově syntetizovaného vlákna utajené přerušení v GATC místě, dojde k oddělení obou vláken dvoušroubovice činností helikázy UvrD (**Obr. 12**). Za dopravení UvrD k místě incize je zodpovědná jeho vazba s MutL. MutL rovněž výrazně stimuluje helikázovou aktivitu UvrD procesem závislým na hydrolýze ATP (MATSON a ROBERTSON 2006). Vzniklý jednořetězcový úsek DNA obsahující mutaci je následně nespecificky degradován buněčnými exonukleázami (**Obr. 12**) (BURDETT *et al.* 2001). Mezera v dvojřetězci DNA je pak zaplněna činností replikativní DNA polymerázy a ligázy.

2.2.1.3. MECHANISMY MMR U *BACILLUS SUBTILIS*

Na rozdíl od velmi dobře prostudovaného MMR *E. coli* byla věnována tomuto mechanismu u *B. subtilis* jen malá pozornost.

U *B. subtilis* je přítomno evolučně původní uspořádání MMR– je zachována endonukleázová doména MutL (KADYROV *et al.* 2006) a zároveň chybí homolog MutH. Geny kódující oba známé komponenty MMR jsou uspořádány v *mutSL* operonu (GINETTI *et al.* 1996), což je typické pro grampozitivní bakterie skupiny *Firmicutes* (LIN *et al.* 2007). Rozsah antimutačního efektu MMR je podobný jako u *E. coli* (SMITH *et al.* 2001).

Byla prokázána důležitost interakce mezi C-terminální oblastí MutS a β -svorkou komplexu DNA polymerázy pro správnou funkci MMR (SIMMONS *et al.* 2008). Inaktivace genu, kódujícího jednu ze dvou alternativních β -svorek u příbuzného druhu *Bacillus anthracis*, způsobuje silný mutátorový fenotyp, jehož mutační spektrum se neliší od spektra MMR-deficientního kmene, což potvrzuje zásadní význam této interakce pro funkci MMR u rodu *Bacillus* (YANG a MILLER 2008). To je v souladu se pozorováním, že proteinový komplex MMR v polovině případů kolokalizuje s holoenzymem replikativní DNA polymerázy (SMITH *et al.* 2001). Fyzické propojení MMR a replikace DNA tak patrně usnadňuje rozpoznávání a korekci replikačních chyb.

2.2.2. Antirekombinační efekt MMR

Kromě opravy mutací hraje MMR zásadní roli v prevenci rekombinace mezi homeologními sekvencemi (tj. lišícími se v řádu jednotek procent).

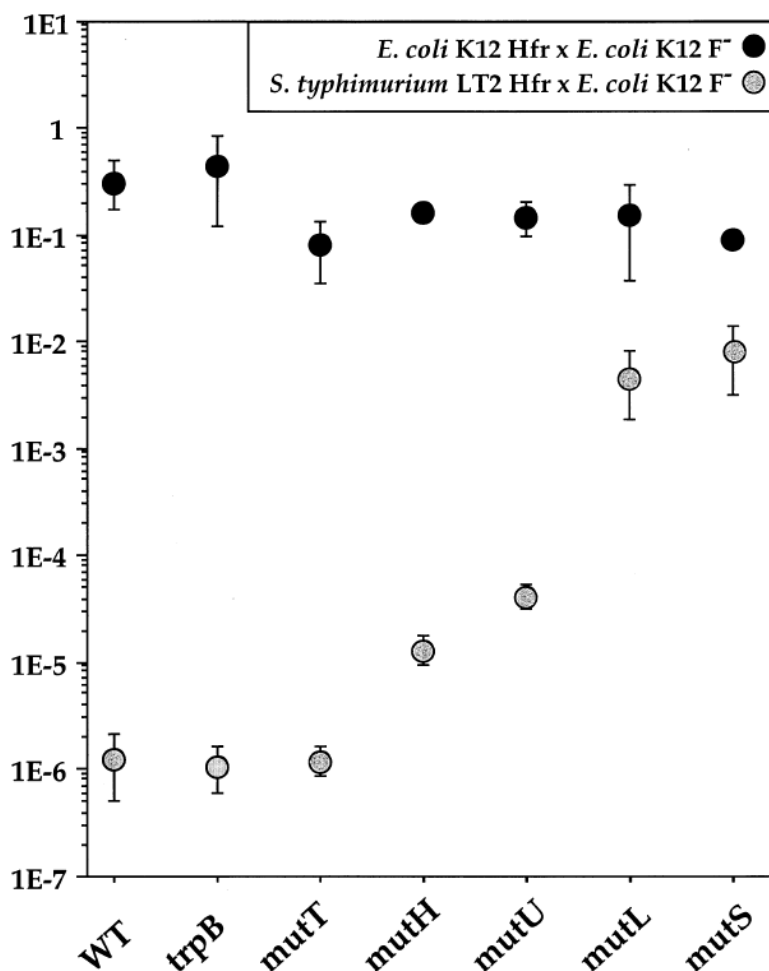
Proces inhibice rekombinace je závislý na přítomnosti obou esenciálních proteinů MMR, MutS a MutL. Pro inhibici rekombinace je nezbytná existence sekvenční heterologie mezi rekombinovanými molekulami – rekombinace zcela homologních sekvencí není prostřednictvím MMR inhibována (WORTH *et al.* 1994). Mechanismus inhibice patrně zahrnuje detekci chybně spárovaných bází ve vznikajícím heteroduplexu pomocí MutS, stejně jako v případě opravy replikací vzniklých mutací (**Kap. 2.2.1.1.**). Bylo prokázáno, že všechny mutace v MutS a MutL, které negativně ovlivňují typické antimutační funkce MMR, se stejně výrazně projevují i na jeho antirekombinačním účinku (JUNOP *et al.* 2003).

Jelikož k rekombinaci mezi homeologními sekvencemi dochází u bakterií při parasexuálních procesech, MMR svými antirekombinačními vlastnostmi velmi významně přispívá k sexuální izolaci druhů (MATIC *et al.* 1996, MAJEWSKI 2001). Například mutační nebo chemicky indukovaná inaktivace MMR u *E. coli* zvyšuje úspěšnost mezirodového křížení o tři až čtyři řády (DENAMUR *et al.* 2000, MATIC *et al.* 2003) a prakticky tak umožňuje velmi účinnou rekombinaci mezi evolučně vzdálenějšími bakteriálními druhy (**Obr. 13**). MMR naopak neovlivňuje frekvenci konjugace v rámci stejného druhu.

Dalším rekombinačním procesem, u něž dochází k inhibici prostřednictvím MMR, je genová konverze duplikovaných sekvencí DNA. Rozsah inhibice je obdobný jako u konjugace (ABDULKARIM a HUGHES 1996). Genové duplikace představují významný motor evoluce, neboť poskytují bezpečný genetický substrát pro intenzivní selekční procesy (ANDERSSON a HUGHES 2009). MMR se tak prostřednictvím stabilizace duplikovaných úseků DNA může z dlouhodobého hlediska podílet na evoluci genové rozmanitosti.

Na RecA-katalyzované homeologní rekombinaci, procesu inhibovaném prostřednictvím MMR, rovněž závisí přirozená transformace *B. subtilis* – schopnost aktivně přijímat cizí DNA z prostředí a integrovat ji do svého genomu. Jediná studie zabývající se efektem MMR na účinnost mezidruhové transformace neprokázala žádný negativní vliv (MAJEWSKI a COHAN 1998). Nicméně, vzhledem k tomu, že v těchto pokusech byly

použity saturující koncentrace transformující DNA, může se jednat o experimentální artefakt, který neodráží situaci u transformace probíhající v přírodním prostředí, kde bývají koncentrace exogenní DNA podstatně nižší. Navíc je známo, že MMR u přirozeně transformovatelných grampozitivních bakterií je snadno satureovatelný vyššími koncentracemi cizorodé DNA (HUMBERT *et al.* 1995). Pro věrohodnou determinaci vlivu MMR na transformaci *B. subtilis* je potřeba další výzkum.



OBRÁZEK 13: Efekt MMR na účinnost konjugace.

Genotyp recipienta je vyznačen na ose *x*. Konjugační frekvence (počet transkonjugantů/počet donorových Hfr bakterií) je vyznačena na ose *y*. *mutU* = *uvrD*.

Podle (DENAMUR *et al.* 2000).

2.2.3. Role MMR v procesech adaptivní mutagenese

2.2.3.1. NEGATIVNÍ REGULACE MMR

Jedním z předpokládaných mechanismů, jakými lze přechodně dosáhnout zvýšené mutagenese, je dočasná inaktivace MMR.

2.2.3.1.1. *Escherichia coli*

Při růstu *E. coli* v minerálním médiu dochází po vstupu do stacionární fáze k poklesu buněčné koncentrace MutS. Tento pokles se zvětšuje s postupující dobou trvání stacionární fáze, přičemž po dvou dnech kultivace dosahuje hladina buněčného MutS jedné desetiny hladiny exponenciální (FENG *et al.* 1996). V menší míře klesá i hladina endonukleázy MutH. Bylo ukázáno, že u enterohemoragického kmene je pokles koncentrace MutS mnohem výraznější než u standardního laboratorního kmene (LI, B. *et al.* 2003).

Za negativní regulaci množství buněčného MutS a MutH je zodpovědný hlavní regulátor stresových odpovědí, sigma faktor RNA polymerázy RpoS, spolu s RNA chaperonem Hfq (TSUI *et al.* 1997). RpoS je z hlediska funkčních vlastností vysoce variabilní v rámci přirozených izolátů *E. coli* (**Kap. 2.1.4.1.**). Pozorovaný rozdíl mezi mírou poklesu hladiny MutS u komenzálního a patogenního kmene tak může reflektovat různou sílu RpoS-závislé negativní regulace.

Teoretickým důsledkem pozorované negativní, RpoS-závislé regulace MMR během stacionární fáze je omezení jeho funkcí (oprava mutací a prevence rekombinace). Umělé zvýšení exprese RpoS má za následek zvýšenou mutační rychlost (YANG *et al.* 2004), což je patrně důsledkem této negativní regulace. Vzhledem k tomu, že k indukci RpoS dochází vlivem mnoha stresů, mohou tyto stresy prostřednictvím negativní regulace MMR způsobovat zvýšenou mutagenesi.

Dále bylo zjištěno, že spektrum posuvových mutací, dávajících vznik reverzi *lacZ* alely kmene *E. coli* FC40 při hladovění na minimálním médiu (**Kap. 2.1.2.**), se neliší od spektra mutací exponenciálně rostoucího kmene s deaktivovaným MMR. Tato nápadná podobnost značí, že adaptivní mutagenese *E. coli* FC40 je alespoň zčásti způsobena nefunkčností MMR, podmíněnou RpoS. Pro omezenou funkci MMR svědčí i pozorované

snížení schopnosti buněk ve stacionární fázi opravovat uměle introdukovanou DNA obsahující substrátové mutace MMR (SAINT-RUF a MATIC 2006).

2.2.3.1.2. *Bacillus subtilis*

Jediná studie zkoumající vliv MMR na procesy adaptivní mutagenese u *B. subtilis* byla provedena s využitím systému reverzí auxotrofních mutací kmene YB955 (Kap. 2.1.5.1.). Porovnání rozsahu mutagenese u kmene defektního v MMR, divokého kmene a kmene s uměle zvýšenou expresí MMR (vykazujícího maximální efektivitu MMR) ukázalo, že při hladovění na selekčních plotnách je MMR funkční asi z 80 % (PEDRAZA-REYES a YASBIN 2004). Měření exprese komponent MMR při kultivaci v tekutém minerálním médiu bylo zjištěno, že ani po čtyřech hodinách stacionární fáze nedochází k poklesu buněčné koncentrace použitého reportéru pod úroveň raně exponenciální fáze (GINETTI *et al.* 1996). Je zřejmé, že dynamika MMR během stacionární fáze a patrně i jeho účinky se podstatně liší od situace u *E. coli*.

2.2.3.2. MUTAČNÍ INAKTIVACE MMR

Mutace v genech kódujících komponenty MMR, které inaktivují schopnost jimi kódovaných proteinů plnit antimutační funkce, mají za následek zvýšení mutability jejich hostitelského kmene. Takový kmen, deficientní v MMR, se nazývá mutátor a vykazuje konstitutivní mutátorový fenotyp (řádově zvýšená mutační rychlost).

Podle teoretických kalkulací by měla být frekvence mutátorů v populaci velmi nízká, přibližně 10^{-6} (FUNCHAIN *et al.* 2001). Nicméně, například u izolátů patogenních druhů bakterií je v mnoha případech udáván výskyt mutátorových klonů v řádu procent. Vysoká prevalence mutátorů byla prokázána například u *Salmonella enterica* (LECLERC *et al.* 1996), uropatogenní *E. coli* (DENAMUR *et al.* 2002), *Neisseria meningitidis* (RICHARDSON *et al.* 2002), *Staphylococcus aureus* (PRUNIER *et al.* 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (OLIVER *et al.* 2000) a *Haemophilus influenzae* (WATSON *et al.* 2004). V případě dlouhodobých evolučně-simulačních experimentů, které využívaly periodických efektů hrdla láhve (angl. bottleneck), došlo u čtvrtiny experimentálních populací rovnou k fixaci mutátorového fenotypu (SNIEGOWSKI *et al.* 1997). Podobně byl při kontinuální kultivaci v glukózou limitovaném chemostatu pozorován rapidní vzestup frekvence mutátorového klonu (NOTLEY-MCROBB a FERENCI 2000). Je zřejmé, že za zvýšeným výskytem mutátorů stojí nějaký typ evoluční výhody. Ukázalo se, že mutátorové jsou zvýhodněni právě díky své zvýšené mutabilitě a z ní odvozené

schopnosti se snadno adaptovat. Při kompetičních experimentech mezi mutátory a MMR-proficientními kmeny v prvních fázích kompetice zřetelně vyhrávají mutátorové – v případě infekce močových cest uropatogenní *E. coli* (LABAT *et al.* 2005) a kolonizace zažívacího traktu bezmikrobní myši rovněž *E. coli* (GIRAUD *et al.* 2001). Zmíněný případ selekce mutátora v chemostatu byl rovněž důsledkem sekundární mutace, zvyšující efektivitu utilizace limitující glukózy (NOTLEY-MCROBB a FERENCI 2000). Selekční výhoda mutátorů tak tkví ve výhodných mutacích, které produkují s relativně vysokou frekvencí, díky inaktivaci MMR. (DENAMUR a MATIC 2006). To bylo ukázáno i v experimentálních simulacích. Při selekci na reverzi mutace dochází k selektivnímu obohacení mutátorů mezi revertanty (MAO *et al.* 1997, LECLERC *et al.* 1998). Při sukcesivní selekci na dvě posuvové mutace se selektují již pouze mutátorové klony (MILLER, J. H. *et al.* 1999). Podobný účinek má i selekce na dvojnásobný horizontální přenos DNA konjugací (FUNCHAIN *et al.* 2001), proces silně inhibovaný funkčním MMR (**Kap. 2.2.2.**).

Defekty v MMR tak představují velmi významný zdroj mutací pro dostatečně rychlou a účinnou adaptivní evoluci.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. MATERIÁL

3.1.1. Bakteriální kmeny

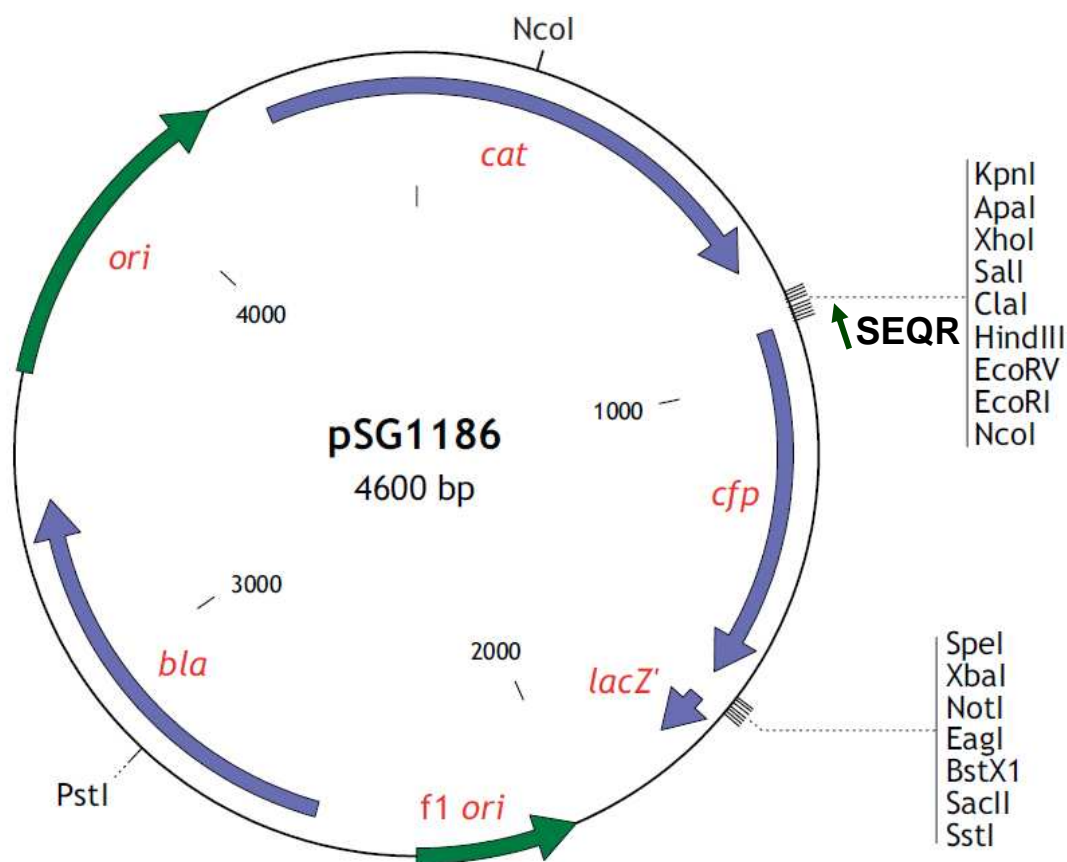
- Kmeny získané z Bacillus Genetic Stock Center, Ohio University, USA:
 - Bacillus subtilis* 168 (*trpC2*) – standardní, divoký kmen
(také uváděn jako WT - wild type)
 - Bacillus subtilis* 1A680 (*trpC2 xglA1 xglR1*) – derivát kmene *B. subtilis* 168 s mutací v genu kódujícím β -galaktosidázu
(ERRINGTON a VOGT 1990)
 - Escherichia coli* ECE157 – zdroj plazmidu pSG1186
 - Escherichia coli* ECE112 – zdroj plazmidu pDG1661
- Kompetentní buňky
 - Escherichia coli* DH5 α (*deoR endA1 gyrA96 hsd R17(r_k⁻, m_k⁺) recA1 relA1 supE44 thi-1 (lac ZYA-arg F)U169 ϕ 80lacZ M15 F⁻ λ ⁻) – výrobce Clontech*
- Rekombinantní kmeny *B. subtilis* (BSMS1, BSML4 a BSPSL6), připravené v rámci diplomové práce, jsou popsány v příslušných oddílech sekce „Výsledky“.

3.1.2. Plazmidy

- pSG1186

Plazmid pSG1186 je integrační vektor, určený pro konstrukci fúzí studovaných proteinů s modrým fluorescenčním proteinem (CFP) u *B. subtilis* (FEUCHT a LEWIS 2001). Genu *cfp* předchází polyklonovací místo, kam lze vložit 3'-konec genů (**Obr. 14**). Při zachování čtecího rámce s ohledem k *cfp* dochází k expresi fúzního proteinu, přičemž je CFP připojen na C- konec studovaného proteinu. K integraci konstruktů odvozených od pSG1186 do chromozomu *B. subtilis* dochází jednoduchým crossing-overem mezi klonovaným fragmentem genu *B. subtilis* a tímto genem v jeho přirozené chromozomální pozici. Expese takto vzniklých fúzních proteinů podléhá stejné regulaci jako expese

samotných proteinů ve WT kmeni, neboť integrací není zasažena promotorová oblast ani ribozom-vazebné místo.



OBRÁZEK 14: Struktura integračního plazmidu pSG1186.

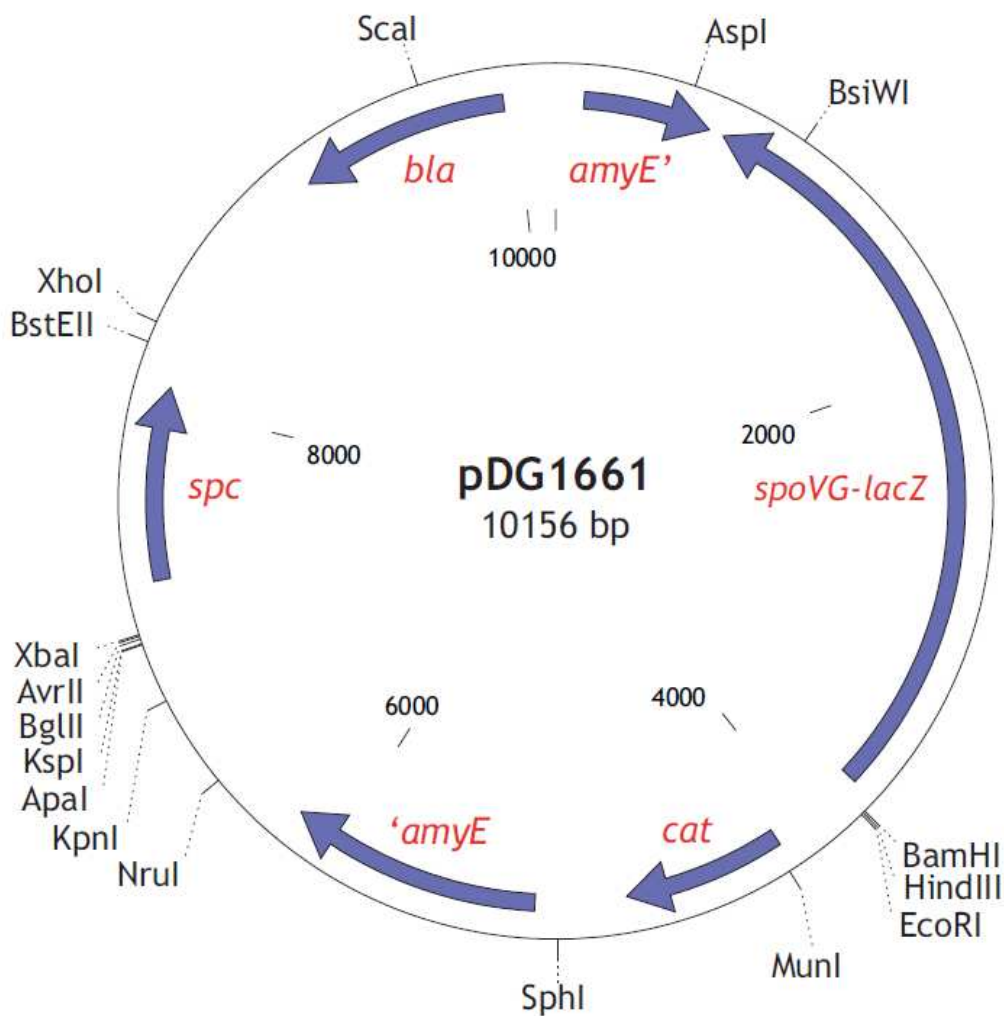
Legenda:

- cfp** gen kódující modrý fluorescenční protein
- cat** gen kódující chloramfenikol-acetyltransferázu, selektovatelný v *E. coli* a *B. subtilis* (chloramfenikol 5 µg/ml)
- bla** gen kódující β-laktamázu, selektovatelný v *E. coli* (ampicilin 100 µg/ml)
- ori, f1 ori** počátky replikace v *E. coli*
- SEQR** pozice a orientace stejnojmenného primeru (**Kap. 3.1.3.**)

- pDG1661

Plazmid pDG1661 je integrační vektor, umožňující sestavit systém pro sledování aktivity promotorů *B. subtilis* (GUEROUT-FLEURY *et al.* 1996). Příslušný promotor je klonován do polyklonovacího místa, které předchází genu *lacZ* (původem z *E. coli*) a ribozom-vazebnému místu z genu *spoVG* *B. subtilis*. Vzniklý konstrukt je integrován do chromozomu *B. subtilis* dvěma crossing-overy mezi fragmenty genu *amyE* (součást pDG1661) a chromozomálním *amyE* (**Obr. 15**). Exprese β -galaktosidázy, jež je produktem genu *lacZ*, pak odráží míru exprese genu, jehož promotor byl do pDG1661 klonován.

- Rekombinantní plazmidy (pJNMS1, pJNML10 a pJNPSL10), připravené v rámci diplomové práce, jsou popsány v příslušných oddílech sekce „Výsledky“.



OBRÁZEK 15: Struktura integračního plazmidu pDG1661.

Legenda:

amyE'... *'amyE* 5' a 3' segmenty *amyE* z *B. subtilis*

spoVG-lacZ *lacZ* (*E. coli*) fúzovaný s ribozom-vazebným místem *spoVG* (*B. subtilis*)

spc gen kódující spektinomycin-adenyltransferázu, selektovatelný v *E. coli* a *B. subtilis* (spektinomycin 100 µg/ml)

cat gen kódující chloramfenikol-acetyltransferázu, selektovatelný v *E. coli* a *B. subtilis* (chloramfenikol 5 µg/ml)

bla gen kódující β-laktamázu, selektovatelný v *E. coli* (ampicilin 100 µg/ml)

3.1.3. Primery

Použité primery a jejich vlastnosti jsou shrnuty v **Tab. 1**. Místo nasedání primeru SEQR je vyznačeno na **Obr. 14**. Místa nasedání ostatních primerů jsou znázorněna na **Obr. 16**.

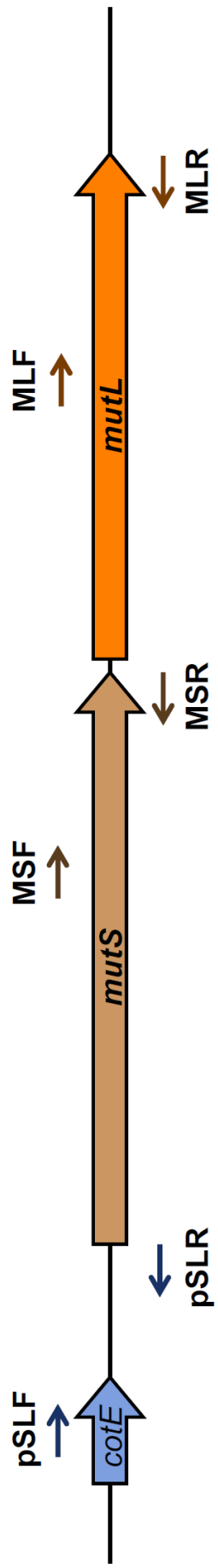
Název	Sekvence (5'→3') ^{A)}	Restrikční místo	T _m /T _m (kompl.) ^{B)}
pSLF	CATAG <u>GAATTC</u> CATGATATAAACGTATGGTAC	EcoRI	54,8/43,6 °C
pSLR	TTTAG <u>GGATCC</u> TGTTTAATCCCTCACTATGT	BamHI	57,5/45,6 °C
MSF	CTAG <u>GTACC</u> CAGCTTGCAAAACAGATGA	KpnI	58,2/46,8 °C
MSR	TCCG <u>CTCGAG</u> ATGTAATTTCTTTTGCAG	XhoI	58,5/39 °C
MLF	CTAG <u>GTACC</u> CGGTTGATGCGGAGGAAA	KpnI	62,8/53,2 °C
MLR	TCCG <u>CTCGAG</u> CATCACGCGTTTGAACAT	XhoI	62,9/45,8 °C
SEQR	CATCACTACACCATGGTGGCGAATTC	-	59,5/50,3 °C

TABULKA 1. Použité primery.

A) v sekvenci primeru je vyznačeno restrikční místo (tučně, podtrženo)

a sekvence komplementární k templátu (šedé pozadí)

B) teploty tání: celý primer/pouze část komplementární k templátu



OBRÁZEK 16.: *mutSL* operon – pozice použitých primerů.

3.1.4. Chemikálie

Název	Výrobce
acetát sodný	Lachema
agar	Roth
agaróza	Sigma
bromfenolová modř	Sigma
β -merkaptoethanol	Roth
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	BDH
citrát sodný (dihydrát)	Lachema
DMSO (dimethyl sulfoxid)	Merck
dNTP mix (směs deoxyribonukleotidtrifosfátů)	Fermentas
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	Lachema
ethanol	Lachema
ethidium bromid	Sigma
fenol (ekvilibrovaný pro použití v molekulární biologii)	Roth
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Lachema
glukóza	Penta
glycerol	Sigma
HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanosířičitá)	Sigma
chloroform	Lach-Ner
inhibitory proteáz SIGMAFAST	Sigma
jód	Lachema
izopropanol	Lachema
K_2HPO_4	Lachema
KCl	Lachema
KH_2PO_4	Lachema
kvasničný autolyzát	Oxoid
kyselina octová (ledová)	Lachema
kyselý hydrolyzát kaseinu	Oxoid
LiCl	BDH
methanol	Penta

MgCl ₂ .6H ₂ O	BDH
MgSO ₄ .7H ₂ O	Lachema
MnCl ₂ .2H ₂ O	Lachema
Na ₂ CO ₃	Lachema
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Lachema
NaCl	Penta
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Lachema
NaI	Lachema
NaOH	BDH
(NH ₄) ₂ SO ₄	Lachema
ONPG (<i>orto</i> -nitrofenyl-β-D-galaktosid)	Serva
sacharóza	Lachema
SDS (dodecylsulfát sodný)	Sigma
škrob (rozpustný)	Lachema
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma
Triton X-100	Serva
tryptofan	Lachema
trypton	Oxoid
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid)	Fermentas
xylen cyanol	Merck
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Lachema

3.1.5. Antibiotika

Název	Zásobní roztok	Výrobce
ampicilin	100 mg/ml	Serva
chloramfenikol	35 mg/ml (ethanol)	Roth
kyselina nalidixová	30 mg/ml (300 mM NaOH)	Sigma
rifampicin	10 mg/ml (methanol)	Fluka
spektinomycin	50 mg/ml	Serva
streptomycin	300 mg/ml	Galenica

Vodné roztoky byly sterilizovány filtrací. Všechny zásobní roztoky antibiotik byly uchovávány v -20 °C. Při přípravě pevných agarových půd byla antibiotika přidána do sterilních médií po jejich zchlazení na 50 °C.

3.1.6. Enzymy

Název	Výrobce
BamHI	Fermentas
EcoRI	Fermentas
EcoRV	Fermentas
KpnI	Fermentas
lysozym	Fluka
proteináza K	Sigma
ribonukleáza A	Sigma
Taq DNA polymeráza	Fermentas
T4 DNA ligáza	Fermentas
XbaI	Fermentas
XhoI	Fermentas

Enzymy od firmy Fermentas byly dodány společně s patřičným pufrem.

3.1.7. Standardy molekulových hmotností DNA

- Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (Fermentas)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

3.1.8. Komerční sady

- **GeneJET Plasmid Miniprep Kit** (Fermentas) – izolace plazmidové DNA
- **MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit** (Epicentre) – izolace chromozomální DNA *B. subtilis*

- **PureYield Plasmid Midiprep System** (Promega) – izolace velkého množství plazmidové DNA
- **Silica Bead DNA Gel Extraction Kit** (Fermentas) – izolace DNA z agarózového gelu, přečištění DNA od zbytků reakce

Při používání komerčních sad bylo postupováno podle návodů dodaných výrobcem.

3.1.9. Kultivační média

Ke kultivaci bakteriálních kultur byla používána pevná a tekutá média. Média byla sterilizována v autoklávu při 120 °C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa po dobu 20 minut. Do pevných půd byl před sterilizací přidáván agar na konečnou koncentraci 2 % (w/v).

3.1.9.1. MINERÁLNÍ MÉDIUM

Na přípravu minerálního média bylo použito:

200 ml zásobního fosfátového pufru

2 ml 0,5 M sterilního roztoku citrátu sodného

1 ml roztoku $\text{MnCl}_2 + \text{ZnSO}_4$

40 ml 50 % (w/v) sterilního roztoku glukózy

10 ml 1 % (w/v) sterilního roztoku tryptofanu

Doplněno sterilní destilovanou vodou na objem 1 litr.

Zásobní fosfátový pufr

10,15 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4,35 g K_2HPO_4

1,32 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,625 ml 0,1 % (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,12 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Doplněno destilovanou vodou na objem 250 ml. Sterilizace autoklávováním.

$\text{MnCl}_2 + \text{ZnSO}_4$

320 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

57 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

20 ml destilované vody

Sterilizace filtrací.

3.1.9.2. KOMPLEXNÍ MÉDIA

LB (Luria – Bertani) médium

10 g tryptonu

5 g kvasničného autolyzátu

10 g NaCl

rozpuštěno v destilované vodě, pH upraveno na 7,0 pomocí 1 M NaOH

Doplněno na objem 1 litr.

LBG médium

100 ml LB média

2 ml 50 % (w/v) glukózy

Připraveno smícháním výchozích sterilních roztoků.

Média pro přípravu kompetentních buněk

Médium A

10 ml 10 x báze média A

9 ml 10 x „*Bacillus salts*“

81 ml sterilní destilované vody

10 x báze média A

1 g kvasničného autolyzátu

0,2 g kyselého hydrolyzátu kaseinu

70 ml destilované vody

5 g glukózy

30 ml destilované vody

Obě složky autoklávovány samostatně a následně smíchány.

10 x „*Bacillus salts*“

2 g (NH₄)₂SO₄

15,2 g K₂HPO₄

6 g KH₂PO₄

1,14 g dihydrátu citrátu trisodného

0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml. Sterilizace autoklávováním.

Médium B

10 ml Média A

0,1 ml 50 mM CaCl_2 (sterilní)

0,1 ml 250 mM MgCl_2 (sterilní)

3.1.10. Roztoky

3.1.10.1. PUFR Z (PRO STANOVENÍ β -GALAKTOSIDÁZY)

1,07 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,63 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,074 g KCl

0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 ml destilované vody

V den použití byla přidána 1 tableta inhibitorů proteáz a 0,35 ml β -merkapt ethanolu.

3.1.10.2. ROZTOKY PRO IZOLACI CHROMOZOMÁLNÍ DNA *B. SUBTILIS*

Lytický pufr

25 g sacharózy

0,6 g Tris

0,03 g EDTA

0,1 g lysozymu

100 ml vody

pH upraveno na hodnotu 8,0. Sterilizace filtrací.

TE pufr

10 mM Tris, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

Sterilizace filtrací.

3.1.10.3. ROZTOKY PRO IZOLACI PLAZMIDOVÉ DNA

Roztok I.

0,3 g Tris

0,9 g glukózy

0,3 g EDTA

100 ml destilované vody, pH upraveno na 8,0 pomocí 1 M HCl.

Sterilizace autoklávováním, uchováváno při 4 °C.

Roztok II

1 díl 10 % (w/v) SDS

7 dílů destilované vody

2 díly 1 M NaOH

připravován vždy čerstvý smícháním výše uvedených přísad

Roztok III

24,6 g acetátu sodného

rozpuštěno v destilované vodě, pH upraveno ledovou kyselinou octovou na hodnotu 4,8

Doplněno na celkový objem 100 ml.

3.1.10.4. ROZTOKY PRO HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVOU ELEKTROFORÉZU

50 x TAE pufr

36,3 g Tris

8,57 ml ledové kyseliny octové

doplněno destilovanou vodou na objem 135 ml

smícháno s 15 ml 0,5 M EDTA

Nanášecí pufr

0,25 % (w/v) bromfenolová modř

0,25 % (w/v) xylen cyanol

30 % (w/v) glycerol

uchováváno při 4 °C

3.1.10.5. SONIKAČNÍ PUFŘ

2,4 g HEPES

rozpuštěno v destilované vodě, pH upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu 7,5.

Doplněno na celkový objem 1 litr.

3.1.11. Počítačové programy

- **pDRAW32** (<http://www.acaclone.com/>) – vyhledávání restrikčních míst, predikce restrikčních elektroforetogramů
- **Chromas** (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) – vyhodnocování výsledků sekvenční analýzy
- **Melting Temperature Calculator**
(http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php) – určení teplot tání primerů

3.1.12. Přístroje a laboratorní zařízení

Kultivační zařízení

- vzdušná třepačka Orbi-Safe (Gallenkamp)
- vzdušná třepačka NB-205 (N-BIOTEK)
- vodní třepačka C76 (New Brunswick Scientific)
- vodní třepačka Elpan 357
- termostat Memmert

Centrifugy

- Centra CL3R (IEC)
- Mikro 22R (Hettich)
- Mikro 20 (Hettich)
- MiniSpin (Eppendorf)

Ostatní

- spektrofluorimetr Fluoromax-3 (Horiba Jobin Yvon)
- PCR cycler MasterCycler (Eppendorf)

- ultrasonikátor Soniprep 150 (SANYO) – 23 kHz, průměr hrotu próby 3 mm
- elektroporátor Gene Pulser (BIO-RAD)
- spektrofotometr DU530 (Beckman)
- fotoaparát SP-565UZ (Olympus)
- pHmetr Orion 2 Star (Thermo)

3.2. METODIKA

3.2.1. Práce s bakteriální kulturou

3.2.1.1. KULTIVACE V TEKUTÉM MÉDIU

Bakterie byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách. Za účelem dobré aerace byl objem kultur vždy udržován pod hodnotou 1/10 objemu kultivační baňky. Kultury byly pěstovány při 37 °C a třepány s frekvencí 210 otáček za minutu (dále uváděno jako standardní podmínky). Byla používána vodní a vzdušná třepací zařízení.

3.2.1.2. UCHOVÁVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

Pro dlouhodobé uchování byl k bakteriálním buňkám (buněčná suspenze nebo masa) přidán glycerol na koncentraci 20 % (v/v). Po patnáctiminutové inkubaci na ledu byly tyto glycerolové konzervy umístěny do -70 °C.

Krátkodobě byly bakteriální kultury skladovány na agarových plotnách při 4 °C.

3.2.2. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

1. LB médium, zaočkované *E. coli* DH5 α , bylo kultivováno za standardních podmínek přes noc.
2. Noční kulturou bylo zaočkováno 50 ml vytemperovaného LB média na OD₅₂₅ = 0,1.
3. Kultivováno za standardních podmínek do doby, než OD₅₂₅ kultury dosáhla hodnoty 0,7-0,9.
4. Kultura centrifugována 10 minut při 3200 x g a 4 °C. Další kroky rovněž probíhaly za důsledného chlazení.
5. Pelet důkladně resuspendován v 50 ml ledové deionizované vody s použitím vortexu.
6. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
7. Pelet důkladně resuspendován ve 25 ml ledové deionizované vody s použitím vortexu.
8. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
9. Pelet důkladně resuspendován v 50 ml ledového 10 % glycerolu ředěného deionizovanou vodou s použitím vortexu.
10. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.

11. Pelet důkladně resuspendován ve 20 ml ledového 10 % glycerolu ředěného deionizovanou vodou s použitím vortexu.
12. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
13. Pelet důkladně resuspendován v 5 ml ledového 10 % glycerolu ředěného deionizovanou vodou s použitím vortexu.
14. Suspenze byla rozdělena do mikrozkušavek po 200 µl a uchovávána v -70 °C.

3.2.3. Elektroporace kompetentních buněk *Escherichia coli*

1. Ve sterilní elektroporační kyvetě (vzdálenost elektrod 2 mm) bylo smícháno 100 µl na ledu rozmražené suspenze kompetentních buněk *E. coli* a 10 µl roztoku DNA.
2. Na elektroporátoru byl aplikován pulz při kapacitanci 25 µF, napětí 2,5 kV a odporu 200 Ω.
3. Ihned po pulzu byl přidán 1 ml LB média.
4. Inkubováno 1 hodinu za standardních podmínek.
5. Vyseto na příslušné selekční plotny.

3.2.4. Příprava a transformace přirozeně kompetentních buněk

Bacillus subtilis

Tento postup umožňuje získání buněk *B. subtilis* vysoce kompetentních pro přirozenou transformaci. Protokol byl převzat z katalogu Bacillus Genetic Stock Center (<http://www.bgsc.org/Catalogs/Catpart4.pdf>).

1. 10 ml Média A bylo zaočkováno kmenem recipienta na OD₆₅₀ přibližně 0,05.
2. Kultivováno za standardních podmínek, dokud OD₆₅₀ kultury nedosáhlo přibližně hodnoty 0,6. Empiricky bylo zjištěno, že za této optické denzity dochází k přechodu do stacionární fáze růstu. Exponenciální růst probíhá s dobou zdvojení 30 minut.
3. Ponecháno kultivovat po dobu dalších 90 minut.
4. Jedním mililitrem této kultury bylo zaočkováno 9 ml vytemperovaného Média B a ponecháno kultivovat dalších 90 minut.
5. 0,5 ml této kultury bylo přeneseno do 15 ml Erlenmeyerovy baňky a přidán 1 µg transformující DNA.
6. Kultivováno 30 minut.

7. Přidáno 0,5 ml vytemperovaného LB média a kultivováno dalších 30 minut.
8. Vyseto na selekční plotny neředěné a v desetinásobném a stonásobném zředění.

3.2.5. Stanovení aktivity β -galaktosidázy

Protokol byl (s úpravami) převzat z katalogu Bacillus Genetic Stock Center (<http://www.bgsc.org/Catalogs/Catpart4.pdf>).

Kultivace a odběr vzorků

1. 1 - 0,2 ml kultury (podle optické denzity) bylo odebráno do mikrozkuhavky a centrifugováno 10 minut při 4 °C a 22000 x g. Paralelně byla měřena OD₅₉₅ kultury.
2. Supernatant byl důkladně odstraněn Pasteurovou pipetou a pelet zamražen v tekutém dusíku a dále uchováván při -20 °C.

Příprava vzorků a stanovení enzymatické aktivity

1. Buněčný pelet byl důkladně resuspendován v 0,5 ml Pufu Z.
2. 50 μ l této suspenze bylo přidáno k 0,75 ml Pufu Z s lysozymem (0,5 mg/ml) a promícháno.
3. Inkubováno 30 minut při 37 °C v termobloku. Občas promícháváno.
4. Přidáno 8 μ l 10 % (v/v) Tritonu X-100, vortexováno a ponecháno 5 minut na ledu.
5. Necháno vytemperovat 5 minut v 30 °C vodní lázni.
6. Přidáno 0,2 ml Pufu Z s ONPG (4 mg/ml) a inkubováno do lehkého zežloutnutí.
7. Reakce byla zastavena přidáním 0,4 ml 1 M roztoku Na₂CO₃.
8. Změřena absorbance vzorků při 420 nm. Jako slepý vzorek sloužila reakce bez přidané bakteriální suspenze.
9. Buněčná koncentrace β -galaktosidázy (v arbitrárních jednotkách) byla vypočítána podle vztahu:

$$\frac{10000 \times A_{420}}{T \times V \times OD_{595}}$$

kde **T**.....celkový čas enzymatické reakce (od přidání ONPG po přidání Na₂CO₃)
v minutách

V.....objem odebrané kultury v mililitrech

3.2.6. Práce s bakteriální DNA

3.2.6.1. IZOLACE CHROMOZOMÁLNÍ DNA *BACILLUS SUBTILIS*

Tento protokol pro izolaci chromozomální DNA z grampozitivních bakterií byl převzat z manuálu „Molecular biological methods for *Bacillus*“ (HARWOOD a CUTTING 1990). Navíc byl přidán krok vedoucí k odstranění proteinů – přečištění fenolem a chloroformem.

1. 2 ml noční kultury *B. subtilis* byly naočkovány do 40 ml vytemperovaného LB média.
2. Kultivováno 3 hodiny za standardních podmínek.
3. Buňky sklizeny centrifugací (10 minut, 3200 x g, 4 °C).
4. Pelet opláchnut 10 ml TE pufru, buňky stočeny a resuspendovány v 1 ml lytického pufru. Suspenze přenesena do mikrozkušavky a inkubována 30 minut při 37 °C.
5. Suspenze ochlazena v ledové lázni. Přidáno 400 µl roztoku proteinázy K (20 mg/ml).
6. Suspenze mírně promíchána a přidáno 250 µl 10 % (w/v) SDS.
7. Inkubováno 20 minut v ledové lázni a 2 hodiny při 55 °C.
8. Protřepáno 1/3 objemu neutrálního fenolu a 1/3 objemu chloroformu.
9. Centrifugováno 10 – 20 minut při 3200 x g a 4 °C.
10. Horní (vodná) fáze odebrána a protřepána stejným objemem chloroformu.
11. Centrifugováno 10 minut při 3200 x g a 4 °C.
12. Do odebrané vodné fáze přidáno 10 µl RNázy A (10 mg/ml).
13. Inkubováno 1 hodinu při 37 °C.
14. DNA vysrážena dvěma objemy izopropanolu a 1/10 objemu 10 M LiCl. Zchlazeno na 4 °C.
15. Gelózní DNA odebrána sterilní skleněnou tyčinkou do sterilní mikrozkušavky.
16. DNA opláchnuta ethanolem a vysušena ve vakuovém exsikátoru.
17. DNA rozpuštěna v TE pufru a uchovávána při 4 °C.

3.2.6.2. IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Minipreparace plazmidové DNA

1. Buňky nesoucí plazmid byly zaočkovány do 10 ml LB média s patřičným antibiotikem.
2. Kultivováno přes noc za standardních podmínek.
3. Buňky sklizeny centrifugací (10 minut, 3200 x g, 4 °C), zbytky média pečlivě odstraněny.

4. Pelet důkladně resuspendován v 0,1 ml Roztoku I s přídatkem 5 μ l RNázy A (10 mg/ml).
5. Přidáno 0,2 ml Roztoku II a jemně promícháno převrácením zkumavky. Ponecháno 5 minut na ledu.
6. Přidáno 0,15 ml Roztoku III, důkladně promícháno převrácením zkumavky.
7. Centrifugováno 10 minut při 22000 x g.
8. Opatrně odebráno 0,4 ml supernatantu a přesunuto do nové mikrozkušavky.
9. Přidáno 0,8 ml ledového ethanolu a umístěno na 30 minut do -20 °C.
10. Centrifugováno 10 minut při 4 °C a 22000 x g.
11. Supernatant důkladně odstraněn, DNA pelet vysušen ve vakuovém exsikátoru.
12. Pelet rozpuštěn ve sterilní vodě a uchováván v -20 °C.

Takto připravená plazmidová DNA byla dále přečištěna precipitací LiCl (**Kap. 3.2.6.3.**).

Maxipreparace plazmidové DNA

1. Buňky nesoucí plazmid byly zaočkovány do 50 ml LB média s patřičným antibiotikem.
2. Kultivováno přes noc za standardních podmínek.
3. Buňky sklizeny centrifugací (10 minut, 3200 x g, 4 °C), zbytky média pečlivě odstraněny.
4. Pelet důkladně resuspendován ve 4 ml Roztoku I s přídatkem 50 μ l RNázy A (10 mg/ml). Suspenze převedena do sterilní kyvety pro vysokorychlostní centrifugu.
5. Přidán 1 ml Roztoku I s lysozymem (25 mg/ml). Inkubováno 10 minut při laboratorní telpotě.
6. Přidáno 10 ml Roztoku II. Inkubováno 10 minut na ledu.
7. Přidáno 7,5 ml Roztoku III, důkladně promícháno převrácením kyvety. Inkubováno 10 minut na ledu.
8. Centrifugováno 10 minut při 20 000 x g a 4 °C.
9. Supernatant přenesen do nové centrifugační kyvety.
10. Přidáno 0,6 objemu izopropanolu, promícháno převrácením kyvety. Inkubováno 1 hodinu při -20 °C.
11. Centrifugováno 10 minut při 15 000 x g a 4 °C.

12. Pelet opláchnut 2 ml 70 % (v/v) ethanolu a krátce centrifugován. Po odstranění ethanolu byl pelet vysušen ve vakuovém exsikátoru.
13. Pelet rozpuštěn ve sterilní vodě a uchováván v -20 °C.

Takto připravená plazmidová DNA byla dále přečištěna precipitací LiCl (**Kap. 3.2.6.3.**).

Kromě těchto postupů byly k izolacím DNA používány komerční sady (**Kap. 3.1.8.**).

3.2.6.3. PRECIPITACE DNA CHLORIDEM LITHNÝM A ETHANOLEM

Tento postup slouží k přečištění DNA od ostatních složek roztoku, zejména iontů solí.

1. Roztok DNA byl naředěn destilovanou vodou na objem 100 μ l.
2. Přidáno 10 μ l 5 M LiCl a 200 μ l ledového ethanolu.
3. Promícháno a umístěno na 1 hodinu do -20 °C.
4. Centrifugováno 10 minut při 4 °C a 22000 x g.
5. Pelet opláchnut 300 μ l 70 % (v/v) ethanolu a krátce centrifugován. Po odstranění ethanolu byl pelet vysušen ve vakuovém exsikátoru.
6. Pelet rozpuštěn ve sterilní vodě a uchováván v -20 °C.

3.2.6.4. RESTRIKCE DNA

Restrikce DNA probíhala v mikrokumavkách s následujícím složením reakční směsi:

složka	množství
pufr	2,5 μ l
DNA	0,1 – 1 μ g
restrikční endonukleáza	5 jednotek
destilovaná voda	doplněna na konečný objem 25 μ l

Reakční směs byla inkubována 2 – 10 hodin při 37 °C.

Po skončení restrikce byla restrikční endonukleáza tepelně deaktivována dle pokynů výrobce.

Nakonec byla štěpená DNA precipitována pomocí LiCl (**Kap. 3.2.6.3.**).

3.2.6.5. LIGACE RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ DNA

Ligace DNA fragmentů probíhala v mikrozkuvkách s následujícím složením reakční směsi:

složka	množství
ligační pufr	2 μ l
vektorový plazmid	0,1 – 0,5 μ g
inzerční DNA	množství odpovídající dvojnásobné molární koncentraci vektorové DNA
T4 DNA ligáza	2 jednotky
destilovaná voda	doplněna na konečný objem 20 μ l

Inkubace probíhala přes noc v PCR cycleru s nastavením:

16 °C.....50 minut

20 °C.....3 minuty

24 °C.....5 minut

37 °C.....1 minuta

Po skončení ligace byla ligáza tepelně deaktivována dle pokynů výrobce.

3.2.6.6. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

PCR probíhala v tenkostěnné PCR mikrozkuvce s následujícím složením reakční směsi:

složka	množství
Taq pufr (s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	5 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	6 μ l
přímý primer (0,1 mM)	2 μ l
reverzní primer (0,1 mM)	2 μ l
templátová DNA	200 μ g – 1 μ g
Taq DNA polymeráza	2 jednotky
destilovaná voda	doplněna na konečný objem 50 μ l

Po umístění do PCR cycleru proběhla reakce podle programu:

1.	počáteční denaturace	94 °C	3 minuty	} 5 x
2.	denaturace	94 °C	1 minuta	
3.	nasedání primerů	$T_{m\text{parc.}}^{\text{A)}$	0,5 minuty	
4.	replikace DNA	72 °C	1 minuta/1 kbp	
5.	denaturace	94 °C	1 minuta	
6.	nasedání primerů	$T_m^{\text{B)}$	0,5 minuty	} 25 x
7.	replikace DNA	72 °C	1 minuta/1 kbp	
8.	konečné prodloužení	72 °C	5 minut	

A) teplota tání částí primerů komplementárních k templátu

B) teplota tání celých primerů – viz **Tab. 1**.

Pokud se se parciální nebo celkové teploty tání primerů v rámci dvojice „přímý - reverzní“ lišily (např. MSF x MSR), byla vždy použita nižší z dvojice teplot.

3.2.6.7. HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Horizontální agarózová elektroforéza byla používána pro určení velikosti molekul DNA, topologických forem plazmidů, pro odhad koncentrace molekul DNA ve vzorku a k oddělení jednotlivých fragmentů DNA. K vizualizaci DNA byl používán ethidium bromid, přidávaný ze zásobního 1 % roztoku do roztoku rozpuštěné agarózy v poměru 1/20 000.

Pro všechny aplikace byly používány gely s koncentrací agarózy 1 % (w/v). Na přípravu gelu a k naplnění elektroforetické nádoby byl používán 1 x koncentrovaný TAE pufr. Vzorky byly nanášeny ve vzorkovém pufru s obsahem pigmentů, umožňujícím sledování průběhu elektroforézy. Bylo používáno stejnosměrné napětí o velikosti 5 V/cm² gelu.

3.2.6.8. SEKVENACE DNA

Sekvenční analýzy byly prováděny na servisním pracovišti PřF UK.

3.2.7. Stanovení fluorescence CFP-fúzních proteinů

Kultivace a odběr vzorků

1. 500 ml minerálního média bylo zaočkováno noční kulturou *B. subtilis* (pěstovanou v minerálním médiu) na $OD_{450} = 0,05$.
2. Kultivováno za standardních podmínek. V průběhu kultivace byly odebírány vzorky (za současného měření optické denzity) tak, aby celková biomasa *B. subtilis* přibližně odpovídala 50 ml kultury o $OD_{450} = 0,2$.
3. Odebrané vzorky kultury zchlazeny 10 minut ponořením do vodní lázně s ledem.
4. Centrifugováno 10 minut při $3200 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
5. Pelet resuspendován ve 20 ml ledového sonikačního pufru. Centrifugováno 10 minut při $3200 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
6. Supernatant odebrán, ponecháno přibližně 2 ml, v nichž byl resuspendován pelet.
7. Suspenze uchovávána v $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zpracování vzorků a stanovení fluorescence buněčných lyzátů

1. 1,8 ml buněčné suspenze přeneseno do 50 ml Falcon zkumavky. Přidáno 0,2 ml 10 x koncentrovaného roztoku inhibitorů proteáz.
2. Sonikováno (amplituda $15 \text{ } \mu\text{m}$) ve dvou pulzech po 45 vteřinách za stálého chlazení ve vodní lázni s ledem.
3. 1,6 ml lyzátu odebráno do mikrozkušavky a centrifugováno 10 minut při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a $22000 \times g$. 1,4 ml supernatantu bylo odebráno a krátkodobě uchováváno při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. 1,4 ml supernatantu přeneseno do kyvety pro spektrofluorimetr. Přidáno 0,4 ml destilované vody plus eventuálně 0,15 ml 6 M roztoku NaI.
5. Měřeno synchronní spektrum buněčného lyzátu. Rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emitovaného světla byl nastaven na hodnotu 43 nm, což je rozdíl mezi absorpčním a emisním maximem CFP (PATTERSON *et al.* 2001). Aby nedocházelo ke zkreslení spekter kvůli nerovnoměrnému výkonu xenonové lampy při různých vlnových délkách, byla použita korekce na referenční signál lampy.

4. VÝSLEDKY

4.1. ZNAČENÍ PROTEINŮ MUTS A MUTL *BACILLUS SUBTILIS* POMOCÍ CFP

Cíl: Připravit kmeny exprimující proteiny MMR značené C-terminálně připojeným CFP.

Negativní regulace MMR je jedním z předpokládaných mechanismů, jejichž prostřednictvím dochází ke zvýšené mutagenезi za stresových podmínek (**Kap. 2.2.3.1.**). Vzhledem ke skutečnosti, že dynamice proteinů MMR u *B. subtilis* za nepříznivých podmínek byla věnována jen malá pozornost, bylo rozhodnuto vytvořit systém umožňující sledovat jejich expresi. K tomuto účelu bylo vybráno značení pomocí modrého fluorescenčního proteinu – CFP. Integrovaný plazmid pSG1186 dovoluje připravit kmeny *B. subtilis* nesoucí chromozomální fúze zvolených genů s genem *cfp* (**Kap. 3.1.2.**). U takových kmenů dochází k tvorbě fúzních proteinů. Kvantifikace označených proteinů je pak možná na základě měření fluorescence CFP. U *B. subtilis* jsou známy pouze dva komponenty dráhy MMR – MutS a MutL. Rozhodli jsme se proto připravit fúze obou proteinů s CFP.

4.1.1. Příprava rekombinantních plazmidů a kmenů

S plazmidem pSG1186 bylo pracováno v souladu s principy doporučenými jeho konstruktéry (FEUCHT a LEWIS 2001). Primery pro amplifikaci fragmentů genů *mutS* a *mutL* byly navrženy tak, aby

1. při ligaci fragmentů se štěpeným plazmidem nedošlo k posunu čtecího rámce mezi vloženým fragmentem genu MMR a plazmidovým genem *cfp*
2. součástí fragmentu byl 3' - konec genu MMR
3. fragmenty neobsahovaly STOP kodon genů MMR
4. byly vkládané fragmenty orientovány stejně jako *cfp*.

Jen za dodržení těchto podmínek může docházet k expresi fúzních proteinů. Součástí primerů byly nástavce s restričními místy, umožňující snadné vložení vzniklých fragmentů do polyklonovacího místa pSG1186.

S použitím navržených primerů (**Obr. 16**) byly fragmenty genů MMR amplifikovány pomocí PCR (**Kap. 3.2.6.6.**) na templátu chromozomální DNA *B. subtilis* 168.

Následovala restrikce endonukleázami KpnI a XhoI (**Kap. 3.2.6.4.**). Stejnému restričnímu štěpení byl podroben plazmid pSG1186. Štěpený plazmid a fragment byly

spojeny enzymatickou ligací (**Kap. 3.2.6.5.**) a ligační směs transformována do kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5a elektroporací (**Kap. 3.2.3.**).

Transformované buňky byly podrobeny selekci na LB plotnách s ampicilinem (100 µg/ml).

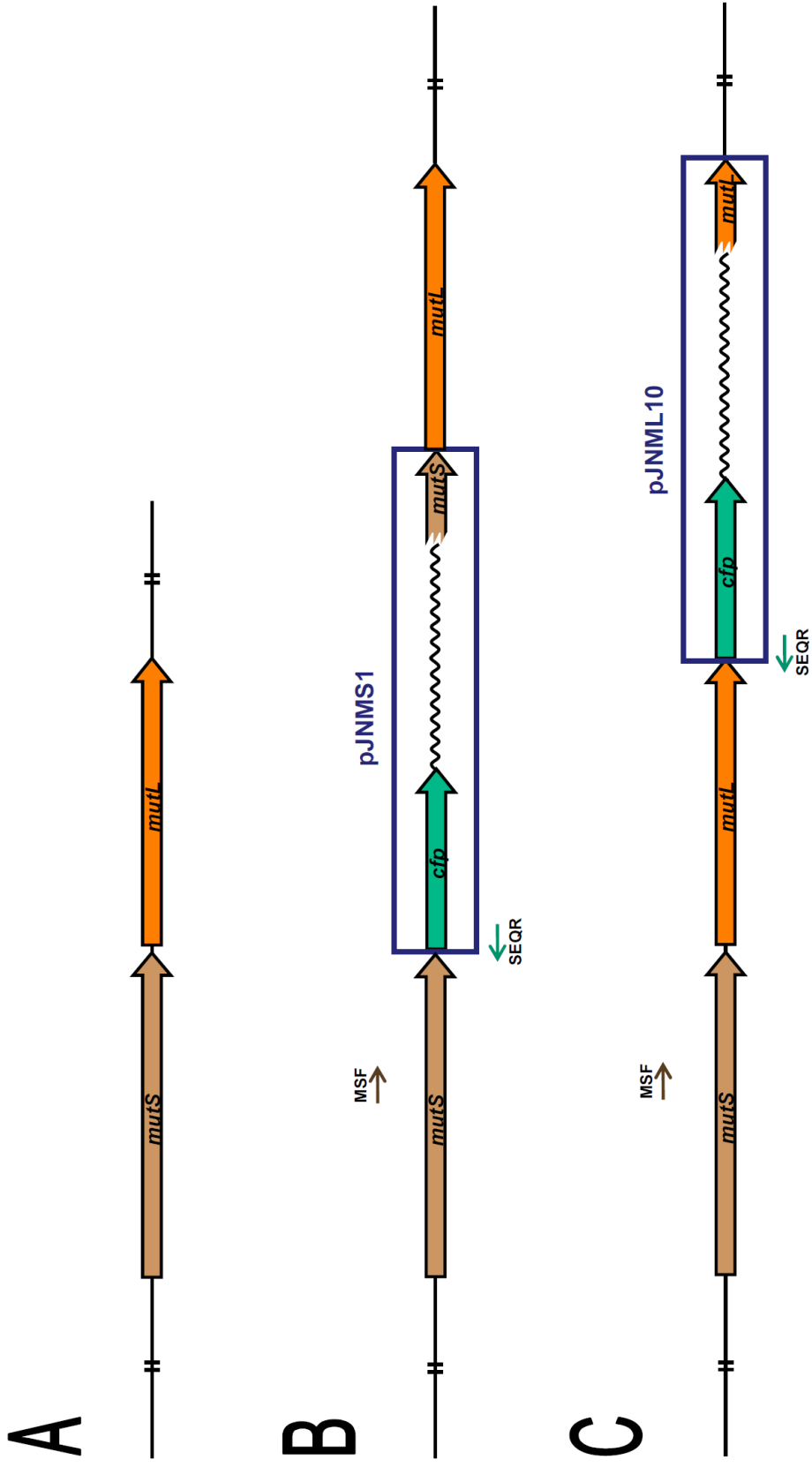
Z deseti ampicilin-rezistentních klonů od každé transformace byly izolovány plazmidy (**Kap. 3.2.6.2.**). Izolované plazmidy spolu s kontrolním plazmidem pSG1186 byly linearizovány restrikcí KpnI. Při následném elektroforetickém rozdělení a vizualizaci linearizovaných plazmidů (**Kap. 3.2.6.7.**) byly identifikovány potenciální plazmidy nesoucí inzert jako proužky migrující pomaleji než pSG1186. Dva vybrané plazmidy byly sekvenovány s použitím primeru SEQR (**Obr. 14**). Sekvenční analýza potvrdila přítomnost inzertu a správné uspořádání konstruktů. Ověřené plazmidy byly pojmenovány pJNMS1 (nese fragment genu *mutS*) a pJNML10 (nese fragment genu *mutS*).

Dalším krokem byla transformace divokého kmene *B. subtilis* 168 připravenými konstrukty (**Kap. 3.2.4.**). Selekcí na rezistenci k chloramfenikolu (5 µg/ml) byly získány klony, u nichž byla vysoká pravděpodobnost, že se jedná o transformanty. Ke spontánnímu vzniku rezistence k chloramfenikolu u *B. subtilis* nedochází (OSAWA *et al.* 1973).

4.1.2. Ověření integrace do chromozomu

K integraci konstruktů odvozených od pSG1186 do chromozomu *B. subtilis* dochází prostřednictvím jednoduchého crossing-overu, v našem případě mezi fragmentem genu MMR (*mutS* – pJNMS1, *mutL* – pJNML10) a tímto genem v jeho chromozomální lokaci. Uspořádání dotyčné chromozomální oblasti po integraci plazmidů je znázorněno na **Obr 17**.

Pro potvrzení integrace byla z vybraných potenciálních transformantů izolována chromozomální DNA. Tato DNA pak sloužila jako templát pro PCR reakci, při níž byl použit primery MSF a SEQR. Ve všech případech došlo k masivní amplifikaci produktu o předpokládané délce (**Obr. 18**). Protože primer SEQR je specifický pro sekvenci plazmidu pSG1186, byla tímto postupem jednoznačně potvrzena správná integrace připravených konstruktů do chromozomu a fúze genů MMR s *cfp* (**Obr. 17**). Ověřené klony byly pojmenovány BSMS1 (MutS-CFP) a BSML4 (MutL-CFP).



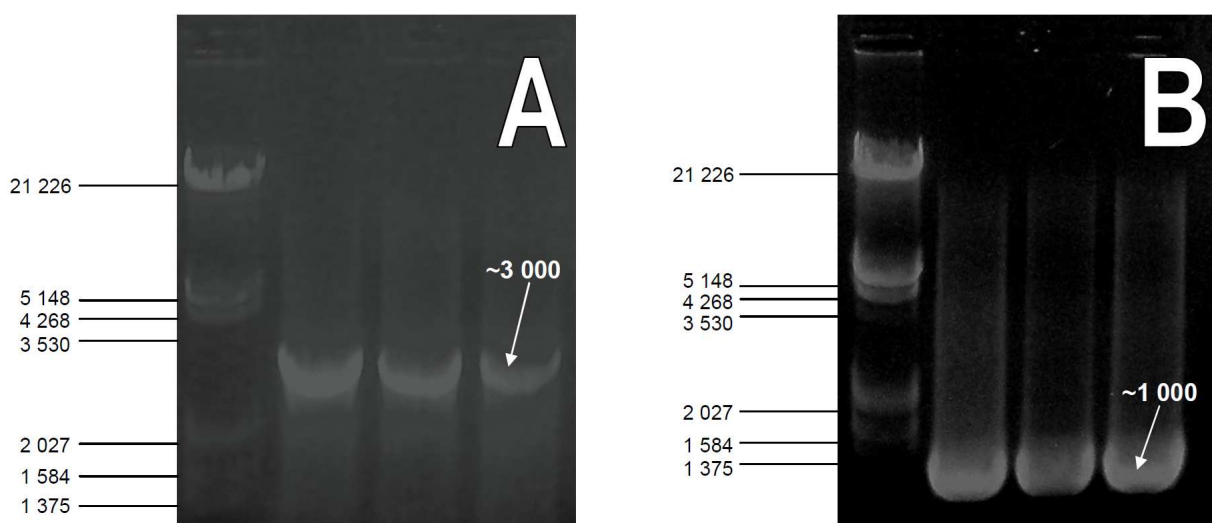
OBRÁZEK 17: Chromozomální *cfp* fúze.

A) WT

B) BSMS1

C) BSML4

Integrované plazmidy jsou označeny modrým rámečkem. Dále jsou vyznačeny primery použité v ověřovací PCR reakci.



OBRÁZEK 18: Ověření integrace pJNMS1 a pJNML10 do chromozomu pomocí agarózové elektroforézy.

- A)** zleva: hmotnostní standard, PCR produkt s použitím primerů MSF a SEQR a chromozomální DNA z kmenů: BSML4, BSML7, BSML8
- B)** zleva: hmotnostní standard, PCR produkt s použitím primerů MSF a SEQR a chromozomální DNA z kmenů: BSMS1, BSMS3, BSMS7

4.2. STANOVENÍ EXPRESE PROTEINŮ MMR

Cíl: Změřit buněčnou koncentraci fúzních proteinů MMR s využitím fluorescence CFP.

Poté, co byly připraveny kmeny exprimující proteiny MMR fúzované s CFP, bylo přikročeno k fluorimetrickému stanovení úrovně exprese těchto proteinů

Pro kultivaci bylo použito minerální médiu, neboť kromě tryptofanu neobsahuje fluoreskující molekuly. Většina proteinů MutL se, na rozdíl od MutS, nachází volně v cytoplazmě buňky (SMITH *et al.* 2001), a snadno se tak při lyzi uvolňují. Proto byl jako pokusný kmen zvolen BSML4.

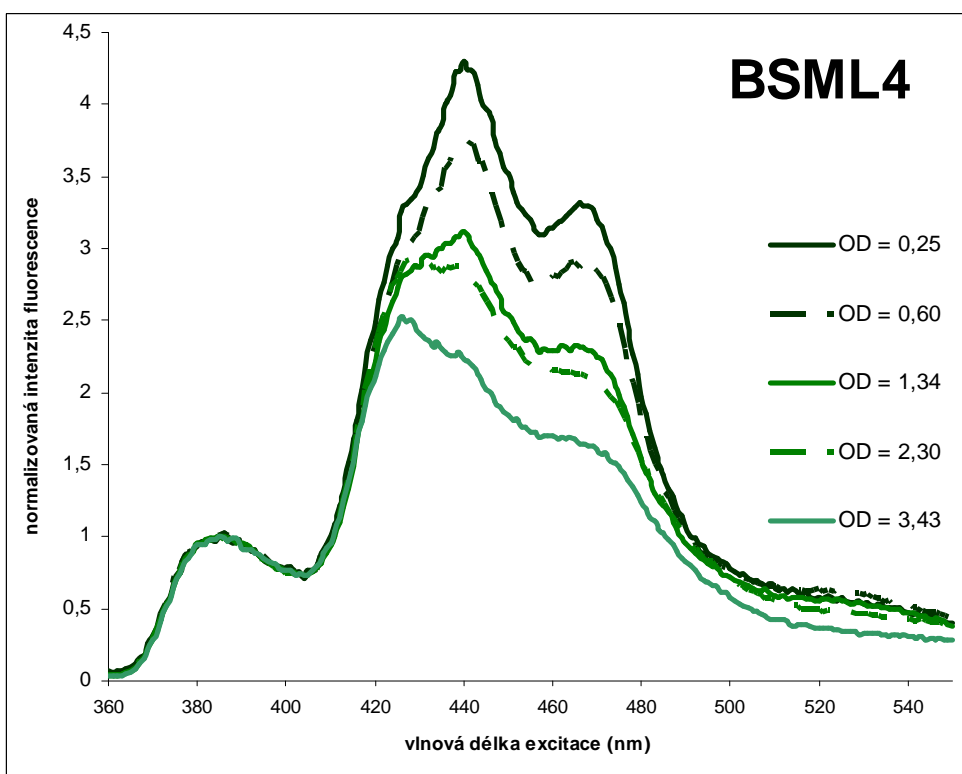
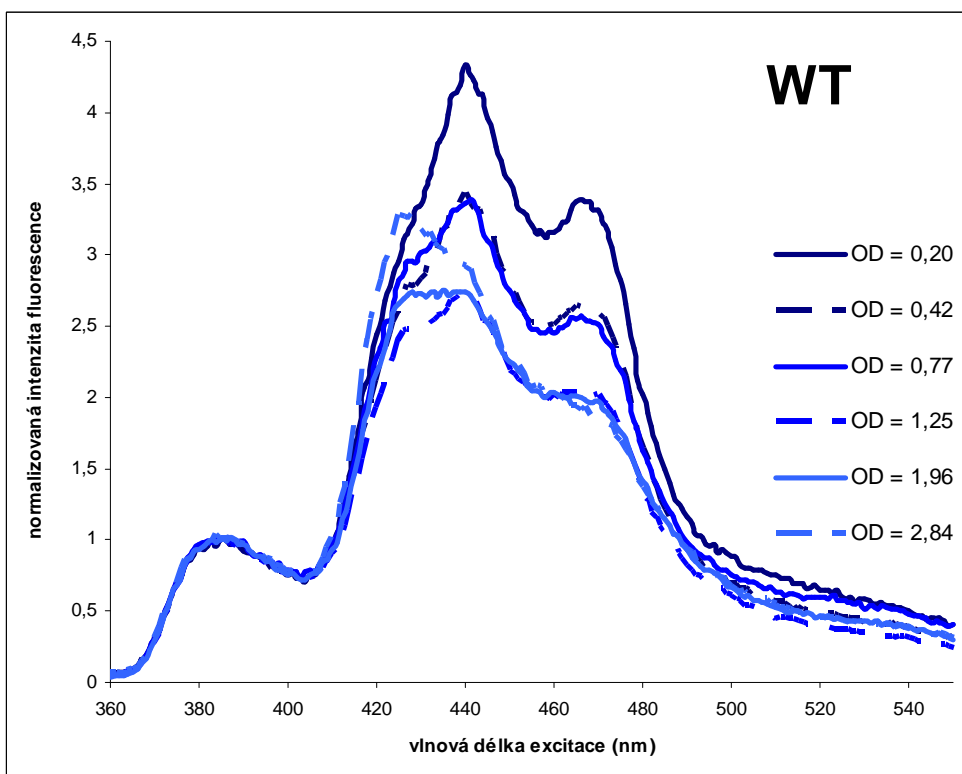
Kultivace a příprava vzorků probíhaly tak, jak je popsáno v **Kap. 3.2.7**. Použití synchronní spektroskopie značně akcentuje fluorescenci studovaného fluoroforu oproti dalším fluorescenčně aktivním látkám, neboť používá optimální interval mezi vlnovou délkou absorpce a emise.

Při pilotních měřeních byla oblast fluorescence CFP značně stíněna fluorescencí endogenního fluoroforu (maximum absorpce: 467 nm), pravděpodobně flavinové povahy. Tato nežádoucí fluorescence byla úspěšně minimalizována přidáním 0,5 M iodidových iontů, v jejichž přítomnosti dochází ke koliznímu zhášení flavinů (RADOVAN FIŠER, osobní sdělení). U proteinů odvozených od GFP, tedy i CFP, ke zhášení iodidem nedochází, neboť vlastní fluorofor je chráněn β -barelovou strukturou proteinu (JUNG *et al.* 2005).

Rovněž bylo nutné absolutní hodnoty fluorescence vzorků vhodným způsobem normalizovat, neboť sonikace není plně kvantitativní proces, navíc se jednotlivé odebrané vzorky lišily koncentrací buněk. Pro normalizaci bylo zvoleno lokální fluorescenční maximum (absorpce 385 nm).

Výsledná spektra jsou ukázána na **Obr. 19**. I po omezení fluorescence flavinů zůstává v oblasti odpovídající absorpci CFP (434 nm) silné pozadí autofluorescence buněčných molekul, jak je patrné z porovnání WT a kmene BSML4. Spektra obou kmenů jsou si podobná do té míry, že není patrné zvýšení fluorescence způsobené přítomností CFP u BSML4.

Fluorescenci proteinů MMR značených CFP není tedy možné měřit vzhledem k vysokému pozadí přirozených fluoroforů *B. subtilis*.



OBRÁZEK 19: Synchronní spektra buněčných lyzátů WT a BSML4.

Rozdíl mezi vlnovou délkou excitace a emise je nastaven na konstantní hodnotu 43 nm.

K maximální excitaci CFP dochází při 434 nm.

Optická denzita vzorků (v legendě) byla měřena při 450 nm.

4.3. KONSTRUKCE SYSTÉMU PRO MĚŘENÍ AKTIVITY PROMOTORU *MUTSL* OPERONU *BACILLUS SUBTILIS*

Cíl: Připravit fúzi promotoru mutSL operonu s reportérovým genem β-galaktosidázy.

K tomuto kroku bylo přistoupeno po neúspěšné snaze o sledování exprese genů MMR s využitím fúzí s *cfp* (**Kap. 4.2.**).

Fúze promotoru s bezpromotorovým genem β-galaktosidázy umožňuje sledovat míru transkripce genů regulovaných tímto promotorem. Většina mechanismů regulace genové exprese působí právě na transkripční úrovni. Pro vytvoření fúzního konstruktů byl použit integrativní plazmid pDG1661 (**Kap. 3.1.2.**).

S použitím primerů pSLF a pSLR (**Obr. 16**) byla oblast promotoru *mutSL* operonu amplifikována pomocí PCR reakce (**Kap. 3.2.6.6.**) na templátu chromozomální DNA *B. subtilis* 168. Následovala restrikce endonukleázami EcoRI a BamHI (**Kap. 3.2.6.4.**), jejichž restrikční místa byla zahrnuta do sekvence primerů ve formě nástavců. Stejněmu štěpení byl podroben plazmid pDG1661. Štěpený plazmid a fragment byly spojeny enzymatickou ligací (**Kap. 3.2.6.5.**) a ligační směs transformována do kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α elektroporací (**Kap. 3.2.3.**). Transformované buňky byly podrobeny selekci na LB plotnách s ampicilinem (100 µg/ml).

Z deseti ampicilin-rezistentních klonů byly izolovány plazmidy (**Kap. 3.2.6.2.**).

Izolované plazmidy spolu s kontrolním plazmidem pDG1661 byly podrobeny restrikci EcoRV. Při následném elektroforetickém rozdělení a vizualizaci štěpených plazmidů (**Kap. 3.2.6.7.**) byly identifikovány potenciální plazmidy nesoucí inzert jako proužky migrující pomaleji odpovídající proužky pDG1661. Jeden vybraný plazmid byl sekvenován s použitím primeru pSLF. Sekvenční analýza potvrdila přítomnost inzertu a správné uspořádání tohoto konstruktů. Plazmid byl pojmenován pJNPSL10.

Dalším krokem byla transformace *B. subtilis* připraveným konstruktem (**Kap. 3.2.4.**).

Jako recipientní kmen byl použit *B. subtilis* 1A680, který má mutačně inaktivovanou endogenní β-galaktosidázu. Plazmid pJNPSL10 byl před transformací linearizován restrikcí XbaI za účelem snížení pravděpodobnosti integrace do chromozomu jedním crossing-overem. Selekcí na rezistenci k chloramfenikolu (5 µg/ml) byly získány potenciální transformanty. Tyto klony byly testovány na ztrátu rezistence ke spektinomycinu (potvrzení integrace dvojitým crossing-overem) a ztrátu produkce extracelulární amylázy, doklady správně proběhnuvší rekombinace mezi pJNPSL10 a

chromozomem recipienta. Produkce amylázy byla zjišťována na LB plotnách se škrobem, škrob byl vizualizován jódem.

Jeden z takto ověřených kmenů byl používán v dalších pokusech.

4.4. SLEDOVÁNÍ AKTIVITY PROMOTORU *MUTSL* OPERONU *BACILLUS SUBTILIS*

Cíl: Zjistit vliv různých stresů na míru transkripce mutSL operonu.

Po vytvoření rekombinantního kmenu, který nese promotor *mutSL* operonu fúzovaný k reportérovému genu β -galaktosidázy (**Kap. 4.3.**), bylo přistoupeno k měření transkripce genů MMR stanovením β -galaktosidázové aktivity.

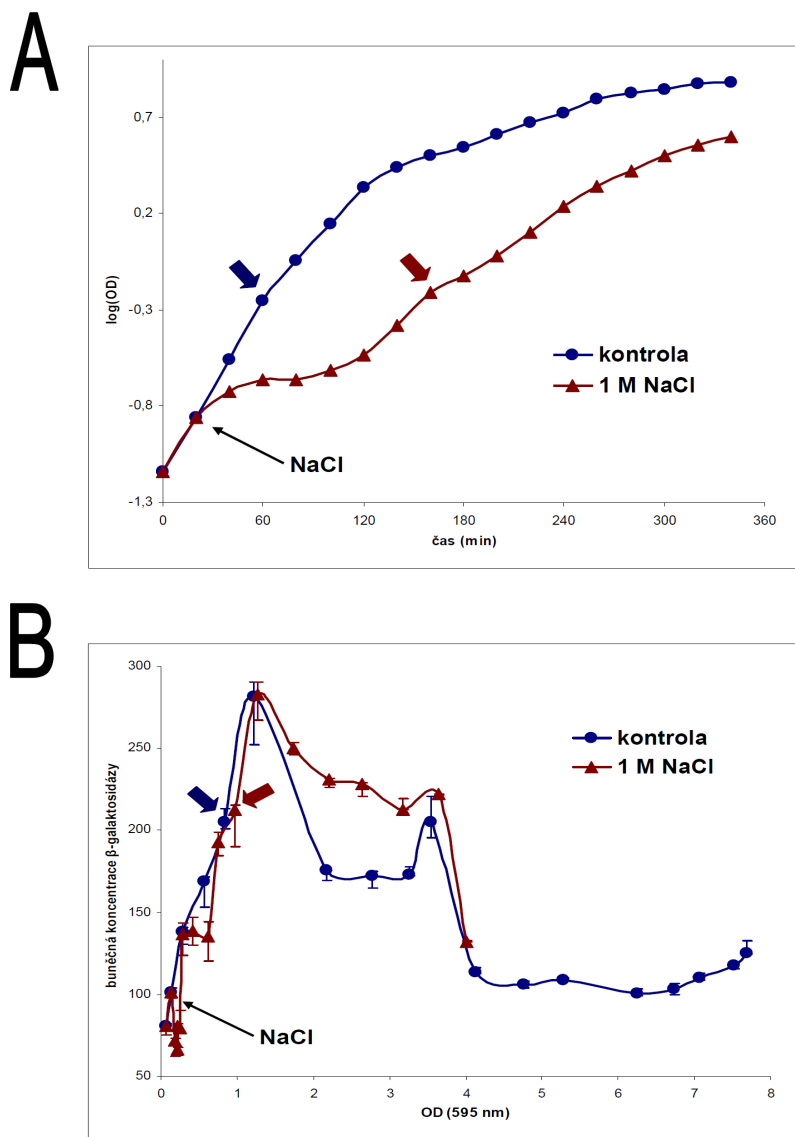
K účelům kultivace bylo zvoleno LBG médium. Toto médium obsahuje komplexní soubor růstových požadavků (vitamínů, aminokyselin), původem z kvasničného autolyzátu, a glukózu, ideální zdroj uhlíku a energie pro růstové procesy. Tekuté kultury byly pěstovány za standardních podmínek (**Kap. 3.2.1.1.**).

Byly sledovány změny v expresi *mutSL* operonu způsobené deprivací nedostatkem živin po přechodu do stacionární fáze růstu a dále vlivem silného hyperosmotického stresu (1 M NaCl).

Při jednorázové kultivaci, stoupá hladina β -galaktosidázy v buňce v průběhu exponenciálního růstu a vrcholu dosahuje krátce po přechodu do stacionární fáze (**Obr. 20B**). V průběhu stacionární fáze hladina reportéru mírně, avšak stabilně klesá. Při optické denzitě (595 nm) okolo hodnoty 4 dochází k jejímu prudkému jednorázovému poklesu, který je způsoben intracelulární proteolýzou β -galaktosidázy (úbytek je zřetelně větší než hypotetický pokles způsobený pouhým vyředováním proteinu buněčným dělením při jeho nulové expresi). Od tohoto okamžiku zůstává koncentrace β -galaktosidázy na přibližně stejné úrovni až do dosažení plateau růstové křivky (**Obr. 20A**). Po celou dobu kultivace neklesá koncentrace reportéru pod úroveň raně exponenciální fáze.

V paralelně probíhajícímu experimentu byla exponenciálně rostoucí kultura *B. subtilis* vystavena hyperosmotickému šoku přidáním sterilního krystalického NaCl (1 M koncentrace). Následujících 80 minut kultura lagovala. Poté došlo k obnovení exponenciálního růstu, přibližně dvakrát pomalejšímu než za bezstresové kultivace (**Obr. 20A**). Expresie β -galaktosidázy v kultuře rostoucí v hyperosmotickém a normálním

LBG médiu byla porovnána v rámci vzorků s obdobnou optickou denzitou (a tedy růstovou fází). Ukázalo se, že i přes značný efekt na růst kultury, zůstal po přidávku 1 M NaCl průběh exprese reportéru velmi podobný jako u nestresované kultury (**Obr. 20B**).



OBRÁZEK 20: Aktivita promotoru *mutSL* operonu během jednorázové kultivace a při hyperosmotickém stresu

A) Růstová křivka – semilogaritmické vynesení.

Optická denzita kultur byla měřena při 595 nm. Vstup do stacionární fáze je vyznačen šipkami barevně odpovídajícími příslušným kultivačním podmínkám.

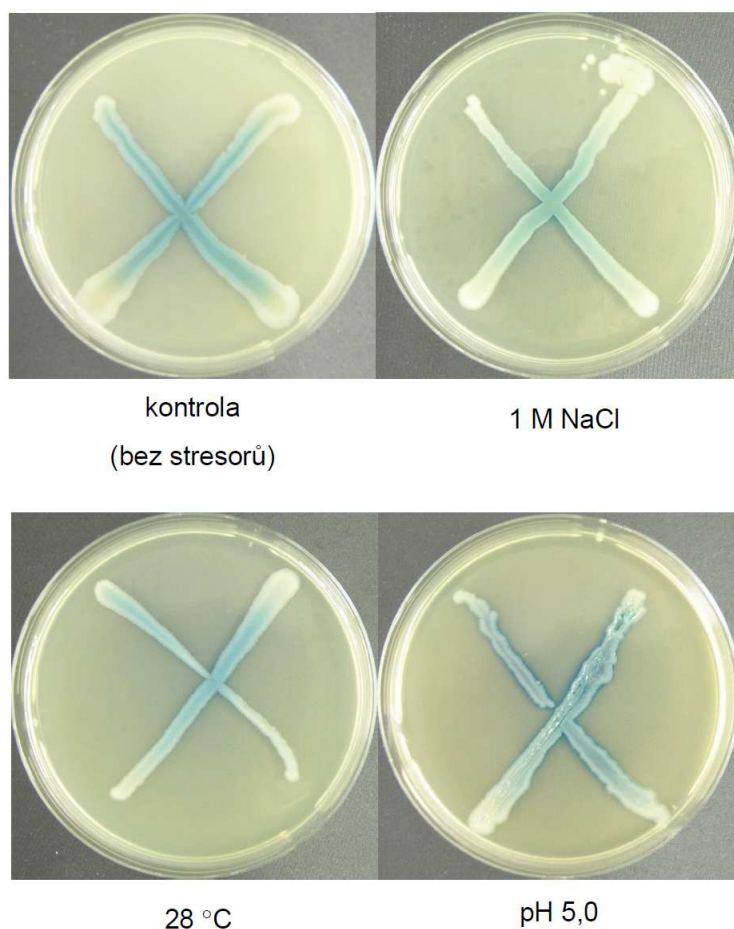
B) Buněčná hladina β -galaktosidázy v průběhu jednorázové kultivace.

Vzorky byly odebírány a analyzovány v triplicátech, rozptyl hodnot je znázorněn chybovými úsečkami. Koncentrace β -galaktosidázy je uvedena v relativních (arbitrárních) jednotkách.

Na základě těchto výsledků bylo rozhodnuto testovat efekt dalších stresů na expresi MMR *B. subtilis*. Místo kultivace v tekutém médiu byla exprese vizualizována na agarových LBG plotnách s přidavkem chromogenního substrátu. Na každou plotnu bylo sterilně rozetřeno 80 μ l roztoku X-gal (20 mg/ml v DMSO, sterilizovaný filtrací). X-gal proniká do buněk a je štěpen β -galaktosidázou na indigově zbarvený pigment. Tento postup umožňuje semikvantitativní stanovení exprese β -galaktosidázy podle intenzity modrého zbarvení.

Jako stresové faktory byla zvoleny nízká kultivační teplota a pH média. Pro experiment s efektem nízké teploty byly plotny kultivovány při 28 °C. Acidického stresu byly dosaženo použitím LBG média s přidavkem K_2HPO_4 (na 0,1 M koncentraci) jako pufovacího agens a s pH upraveným na hodnotu 5,0. Plotny byly inkubovány po dobu 24 hodin v termostatu.

Z **Obr. 21** je patrné, že při kultivaci za testovaných stresových podmínek je úroveň exprese MMR z velké části podobná kontrolnímu, nestresovému experimentu.



OBRÁZEK 21: Vizualizace aktivity promotoru *mutSL* operonu při růstu na plotnách za kontrolních a stresových podmínek

4.5. METODA MĚŘENÍ MUTAČNÍ RYCHLOSTI U *BACILLUS SUBTILIS*

Cíl: Zvolit vhodný experimentální systém pro určení mutační rychlosti.

Aby bylo možné charakterizovat procesy adaptivní mutageneze, je nutné míru mutageneze (neboli mutabilitu) kvantifikovat. K tomu slouží veličina zvaná mutační rychlost.

Mutační rychlost je definována jako frekvence mutací, k nimž dochází u konkrétní pozice nukleotidu v DNA při jeho replikaci. Pro zjednodušení se kalkulací předpokládá, že mutační rychlost je stejná pro všechny nukleotidy v genomu, což nemusí odpovídat realitě, neboť existují tzv. „hot spots“, místa se zvýšenou mutabilitou (ROGOZIN a PAVLOV 2003).

Ohledně metod určování mutačních rychlostí nepanuje mezi vědci konsenzus, nicméně drtivá většina experimentů na prokaryotních organismech využívá jedné ze dvou metod: mutační frekvence nebo fluktuační analýza. Mutační frekvence se vypočítá pouhým vydělením počtu buněk nesoucích danou mutaci celkovým počtem buněk v kultuře. Bohužel nemůže být tato metoda použita pro odhad skutečné mutační rychlosti, neboť mutační frekvence se v průběhu růstu kultury zvětšuje, zatímco vlastní mutační rychlost zůstává konstantní (ROSCHE a FOSTER 2000). Při fluktuační analýze se zjišťuje, v jakém procentu z několika desítek paralelních kultur nevznikl během kultivace žádný mutant. S využitím znalosti o celkovém počtu buněk v jednotlivých paralelních kulturách se pak vypočítá pravděpodobnost vzniku mutací, tj, mutační rychlost, z Poissonova rozdělení pravděpodobnosti (FOSTER 2006). Nevýhodou použití fluktuační analýzy je její experimentální náročnost (analýza desítek kultur) a nutnost prekalibrace dosažených počtů buněk.

Metaanalýza publikovaných hodnot mutačních rychlostí ukázala značný rozptyl naměřených dat (**Tab. 2**). Naším cílem bylo tedy vyvinout přesnou, rychlou a spolehlivou metodu stanovení mutačních rychlostí u *B. subtilis*, která by byla použitelná i pro kultivace za stresových podmínek.

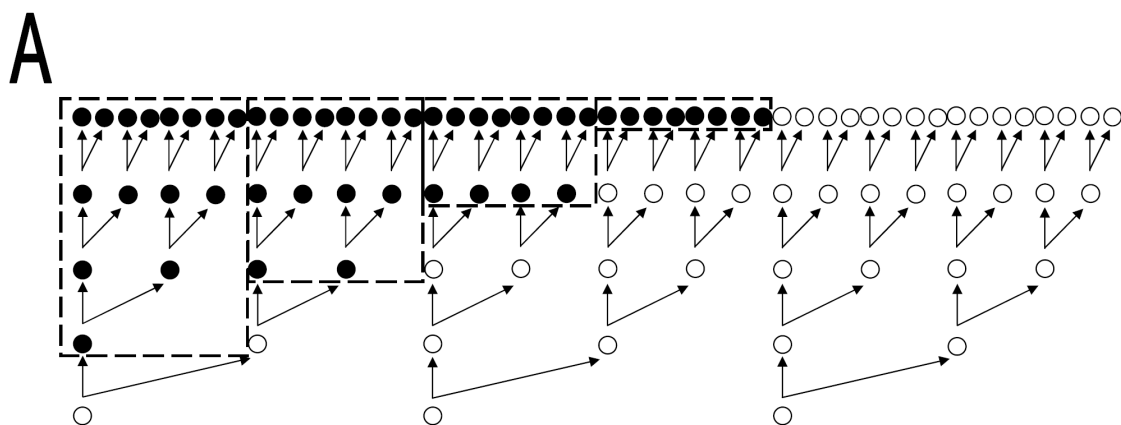
Kultivační médium	Selekční koncentrace rifampicinu	Hodnota mutační rychlosti	Metoda měření	Zdroj
Penassay broth	10 µg/ml	$1,2 \times 10^{-9}$	mutační frekvence	CASTELLANOS-JUAREZ <i>et al.</i> 2006
neuvedeno	50 µg/ml	$8,9 \times 10^{-9}$	flukтуаční analýza	MAUGHAN a NICHOLSON 2004
LB	10 µg/ml	2×10^{-8}	mutační frekvence	LE CHATELIER <i>et al.</i> 2004
minerální médium	10 µg/ml	$9,1 \times 10^{-8}$	mutační frekvence	ROSSOLILLO a ALBERTINI 2001
LB	10 µg/ml	1×10^{-8}	mutační frekvence	DUIGOU <i>et al.</i> 2004
Penassay broth	5 µg/ml	$1,7 \times 10^{-9}$	mutační frekvence	VIDALES <i>et al.</i> 2009
Penassay broth	5 µg/ml	$2,5 \times 10^{-9}$	flukтуаční analýza	SUNG a YASBIN 2002
LB	20 µg/ml	$3,1 \times 10^{-9}$	mutační frekvence	SASAKI <i>et al.</i> 2000
Penassay broth	5 µg/ml	2×10^{-9}	mutační frekvence	PEDRAZA-REYES a YASBIN 2004
Penassay broth	neuvedeno	8×10^{-8}	mutační frekvence	GINETTI <i>et al.</i> 1996

TABULKA 2: Přehled publikovaných mutačních rychlostí u *Bacillus subtilis*.

Všechna data se týkají mutací podmiňujících rezistenci k rifampicinu. Použitý kmen *B. subtilis* vykazoval vždy divoký fenotyp z hlediska mutability.

Matematický model

Při tvorbě matematického modelu jsme vycházeli z teoretického průběhu akumulace mutantů během růstu bakteriální kultury (**Obr. 22**). Na počátku kultivace neobsahuje kultura sledované mutace, populace je geneticky čistá. Poté, co velikost populace dosáhne převrácené hodnoty mutační rychlosti (tj. frekvence vzniku mutací), začnou se tyto mutace objevovat v kultuře. Od této chvíle vznikají v každé nové generaci mutanti s frekvencí rovnou mutační rychlosti. Jedná se o kumulativní proces – celková frakce mutantů v populaci s přibývajícimi generacemi lineárně roste, neboť se hromadí nově vzniklí mutanti spolu s mutanty vzniklými v předcházejících generacích.



B

Generace	Celkový počet buněk	Celkový počet mutantů	Frakce mutantů
0.	3	0	0
1.	6	1	1/6
2.	12	4	2/6
3.	24	12	3/6
4.	48	32	4/6

OBRÁZEK 22: Model akumulace mutantů v rostoucí bakteriální kultuře.

A) Grafické schéma modelu. Mutanti (buňky nesoucí sledovanou mutaci) jsou znázorněni vyplněným kolečkem. Mutanti nově vzniklí v rámci jedné generace, spolu s veškerým jejich potomstvem, jsou společně orámováni.

B) Parametry kultury během akumulace mutantů.

Mutační rychlost je nastavena na hodnotu 1/6.

Zákonitosti akumulace mutantů (**Obr. 22**) je pak možno vyjádřit pomocí matematických vztahů

$$M = (k + 1) \times 2^k \quad (1)$$

$$\mu = 2^k \div B \quad (2)$$

kde **M**..... celkový počet mutantů v kultuře

B..... celkový počet buněk v kultuře

k..... hodnota vyjádřená z první rovnice (odpovídá počtu generací, po které vznikali mutanti)

μ **mutační rychlost**

Známe-li tedy počet mutantů v kultuře o daném počtu buněk, můžeme dosazením do vztahů (1) a (2) získat hodnotu mutační rychlosti. Hodnotu **k** nelze určit přesně, neboť rovnice (1) není řešitelná standardními matematickými postupy. Pro její odhad byla používána numerická aproximace s pomocí tabulky MS Excel, s iterací hodnoty **k** o jednu desetinu v intervalu 0-100.

Testování modelu

Pro determinaci mutačních rychlostí u *B. subtilis* jsme v souladu se zavedenými zvyklostmi zvolili mutace podmiňující rezistenci k rifampicinu (**Tab. 2**). Tyto mutace se nacházejí v genu *rpoB*, který kóduje katalytickou podjednotku RNA polymerázy. Jejich spektrum je značně omezené, neboť se jedná o esenciální gen s klíčovou rolí v procesu transkripce. U vegetativně rostoucích buněk *B. subtilis* dochází ke vzniku rifampicinové rezistence (50 µg/ml) pouze prostřednictvím čtyř nukleotidových substitucí, vedoucích k záměnám 469Q→K, 469Q→R, 482H→Y a 482H→R (NICHOLSON a MAUGHAN 2002). Protože každá báze v DNA může podléhat třem různým jednoduchým substitucím (jedné tranzici a dvěma transverzím), jsou mutace podmiňující rifampicinovou rezistenci z tohoto hlediska vhodné jako měřítko obecné rychlosti mutagenese (za předpokladu, že mutační rychlost je v rámci všech nukleotidových pozic neměnná – viz dříve).

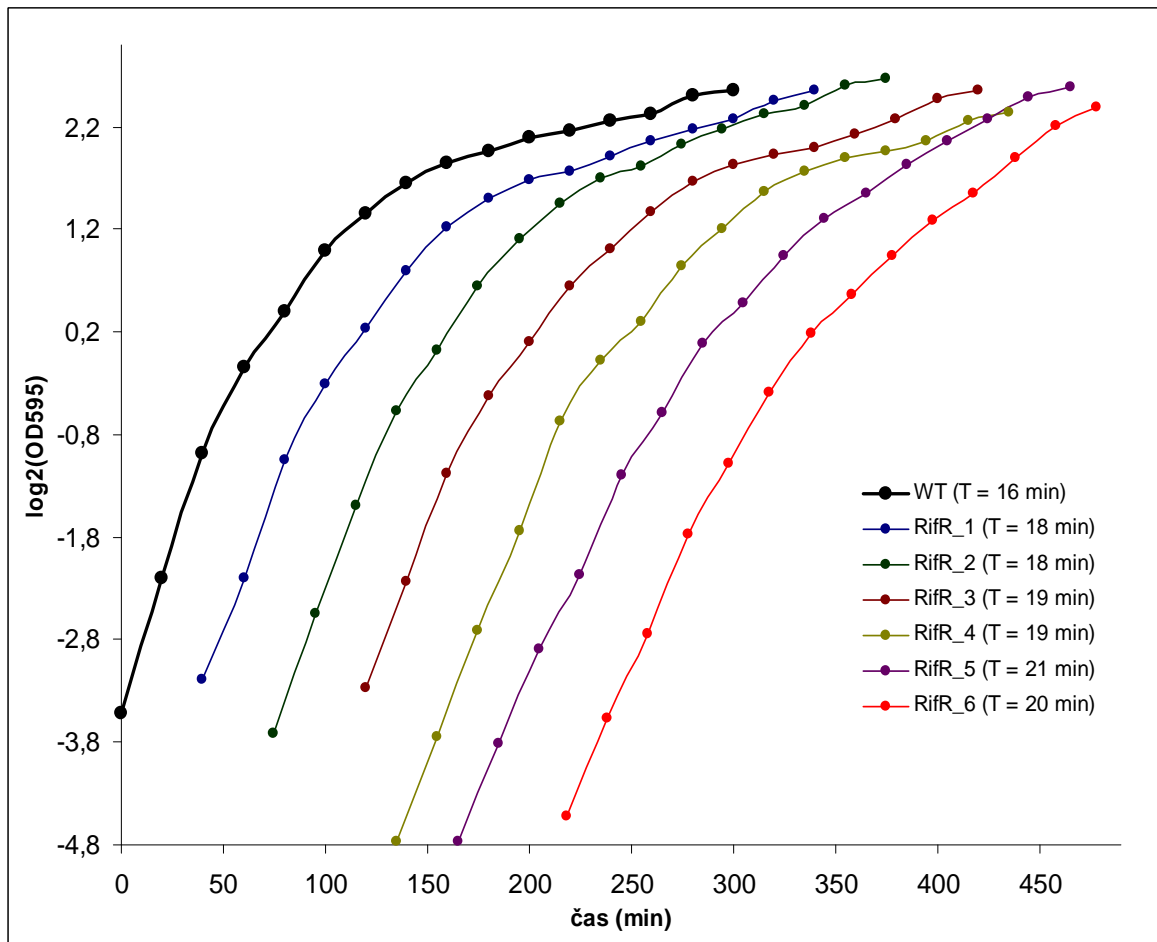
Pro platnost uvedených vztahů popisujících akumulaci mutantů v kultuře je nutné, aby se selektované mutace významně neovlivňovaly růstové vlastnosti buňky. Pro zjištění parametrů růstu byly izolovány kolonie rifampicin-rezistentních buněk: 2 nezávislé kultivace WT kmene (v LBG médiu za standardních podmínek) byly vysety na selekční plotny s 50 µg/ml rifampicinu a inkubovány 24 hodin při 37 °C (**Obr. 23**).



OBRÁZEK 23: Reprezentativní selekční LB plotna s rifampicinem (24 h inkubace).

U tří rezistentních klonů z každé kultivace (vybrány kolonie různých velikostí) pak byla měřena růstová křivka při kultivaci v tekutém LBG médiu (bez rifampicinu) za standardních podmínek, abychom zjistili, jak se liší jejich růstová rychlost od růstové rychlosti rodičovského kmene.

Obr. 24 ukazuje, že růstové parametry rifampicin-rezistentních klonů jsou do značné míry shodné s parametry WT kmene. Je tedy možné sledovat akumulaci těchto mutantů v kultuře za účelem měření mutační rychlosti, aniž by došlo k významnému zkreslení výsledků způsobenému jejich růstovými vlastnostmi.



OBRÁZEK 24: Vliv mutací podmiňujících rezistenci k rifampicinu na růst

B. subtilis.

Měření optických denzit kultur *B. subtilis* 168 (WT) a jeho šesti rifampicin-rezistentních derivátů (RifR_1-RifR_6) probíhalo současně, pro přehlednost jsou růstové křivky odděleny časovými intervaly. Exponenciální doba zdvojení (T) je u každého klonu uvedena v legendě.

Platnost uvedeného modelu byla následně ověřena pro reálná experimentální data. Jako pokusný kmen byl zvolen BSMS1. U tohoto kmene je integrita *mutSL* operonu přerušena integrací plazmidu pJNMS1 do 3'- oblasti *mutS* (Obr. 17). Nedochozí tak k transkripci *mutL*, BSMS1 proto vykazuje MMR⁻ fenotyp spojený s řádově zvýšenou mutační rychlostí.

Při kultivacích jsme vycházeli z exponenciálně rostoucí kultury BSMS1 v LBG médiu. Tato kultura byla vhodně naředěna (za použití převodního vztahu získaného sériovým ředěním a výsevem: 1 ml kultury o OD₄₅₀=0,25 obsahuje 1x10⁷ buněk) a inokulum čítající přibližně 100-1 000 buněk bylo přeneseno do 25 ml LBG média. Kultivace probíhala za standardních podmínek do dosažení exponenciální fáze (OD₄₅₀ = 0,3-0,9).

V tomto bodě byly odebrány tři alikvóty po 200 µl a vysety na rifampicinové plotny (50 µg/ml), zároveň byla změřena o OD₄₅₀ kultury. Po 24 hodinové inkubaci byly spočteny Rif^R kolonie a zpětně dopočítán počet všech Rif^R buněk v 25 ml kultuře. Celkový počet všech buněk kultury byl zjištěn z její optické denzity a objemu podle výše uvedeného převodního vztahu.

Podle uvedeného schématu bylo provedeno pět nezávislých experimentů. Tři z pěti získaných hodnot mutačních rychlostí byly navzájem shodné a odchylka zbylých dvou hodnot spadala do mezí typických pro takovýto typ experimentu (**Tab. 3**).

Číslo experimentu	Celkový počet Rif ^R mutantů v kultuře	Celkový počet buněk v kultuře	Mutační rychlost
1	2340	4,6x10 ⁸	5x10 ⁻⁷
2	3250	6,5 x10 ⁸	5x10 ⁻⁷
3	2050	3,7 x10 ⁸	6,6x10 ⁻⁷
4	1275	4,1 x10 ⁸	4,7x10 ⁻⁷
5	1400	3,3 x10 ⁸	5x10 ⁻⁷

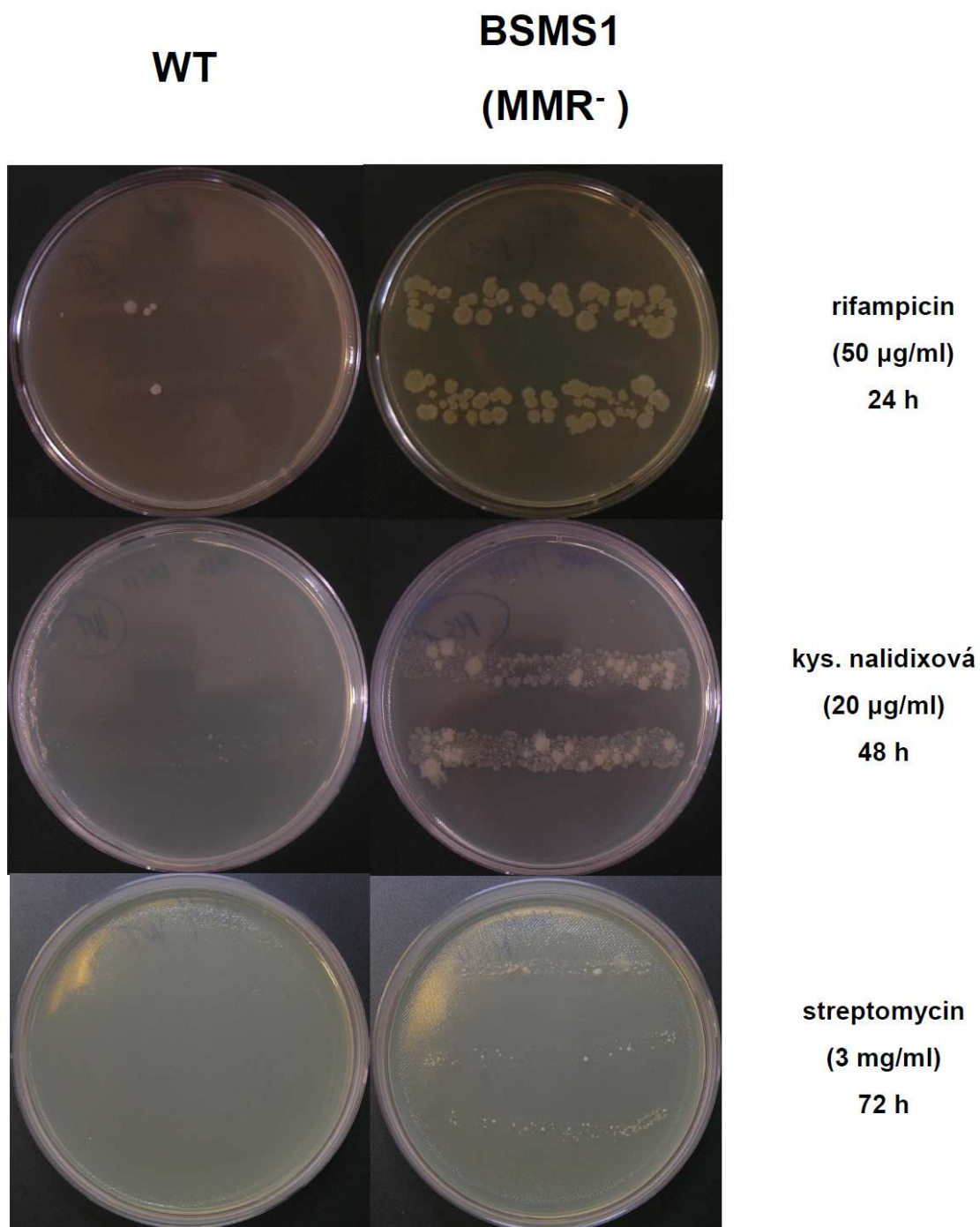
TABULKA 3: Mutační rychlost u hypermutátorového kmene BSMS1.

Mutageneze na plotnách

Dále nás zajímalo, jakým způsobem je možné determinovat mutační rychlost při povrchovém růstu *B. subtilis* na agarových plotnách. Vyzkoušeli jsme k tomu účelu použít razítkovací metodu.

Na LBG plotny byla nanášena suspenze příslušného kmene ve formě dvou až tří rovnoběžných čárek. Plotny byly inkubovány 24 hodin při 37 °C a poté s pomocí bakteriologického razítka a sterilního sametu přerazítkovány na selekční LB plotny s různými antibiotiky.

Při tomto postupu se velmi zřetelně projevuje řádově zvýšená mutační rychlost u hypermutátorového kmene BSMS1 v porovnání s divokým kmenem, a to u mutací podmiňujících rezistenci ke všem testovaným antibiotikům (**Obr. 25**). Tato metoda, byť není zcela kvantitativní, tedy dovoluje porovnat hodnoty mutačních rychlostí za různých podmínek.



**OBRÁZEK 25: Vznik mutací podmiňujících rezistenci k antibiotikům
při povrchovém růstu na agarových plotnách.**

Je uveden použitý kmen, antibiotikum + selekční koncentrace a doba inkubace selekčních ploten (při 37 °C).

4.6. VLIV STRESŮ NA MUTAČNÍ RYCHLOST *BACILLUS SUBTILIS*

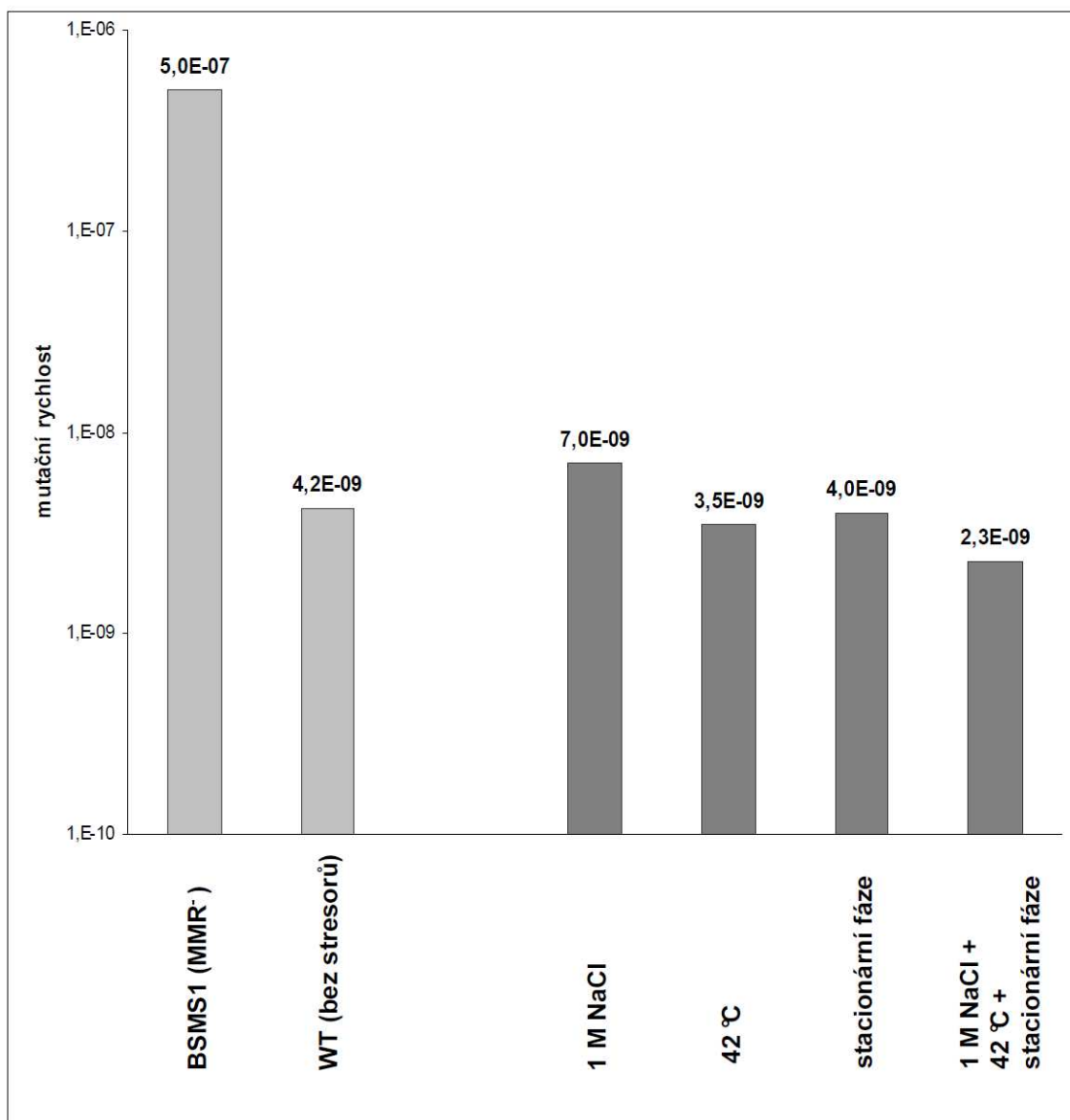
Cíl: Zjistit, zda se mutační rychlost mění působením různých stresů.

Hypotéza adaptivní mutagenese předpokládá zvýšenou mutabilitu organismů pod vlivem stresových podmínek. Pokusili jsme se tuto hypotézu simulovat v laboratorních podmínkách vystavením bakteriálních kultur různým stresům za současného měření mutačních rychlostí.

Postup měření mutačních rychlostí byl stejný jako u evaluace modelu akumulace mutantů (**Kap. 4.5.**). Jelikož ale tyto pokusy probíhaly s WT kmenem, jehož předpokládaná mutační rychlost je řádově nižší než u mutátorového BSMS1, bylo zapotřebí vysít na selekční plotny všechny buňky přítomné v kultuře. Proto byly buňky z celého objemu kultury po dosažení žádané optické denzity sklizeny centrifugací (10 minut, 3200 x g, 25 °C) a poté vysety.

Změřené hodnoty mutačních rychlostí byly porovnány s hodnotou mutačních rychlostí exponenciálně rostoucího divokého kmene a exponenciálně rostoucího kmene BSMS1, jehož MMR je deaktivovaný (**Kap. 4.5.**). Je patrné, že zvýšení kultivační teploty o 5 °C ani hyperosmotický stres (1 M NaCl) nezpůsobily významné zvýšení mutační rychlosti v porovnání se standardními podmínkami (**Obr. 26**).

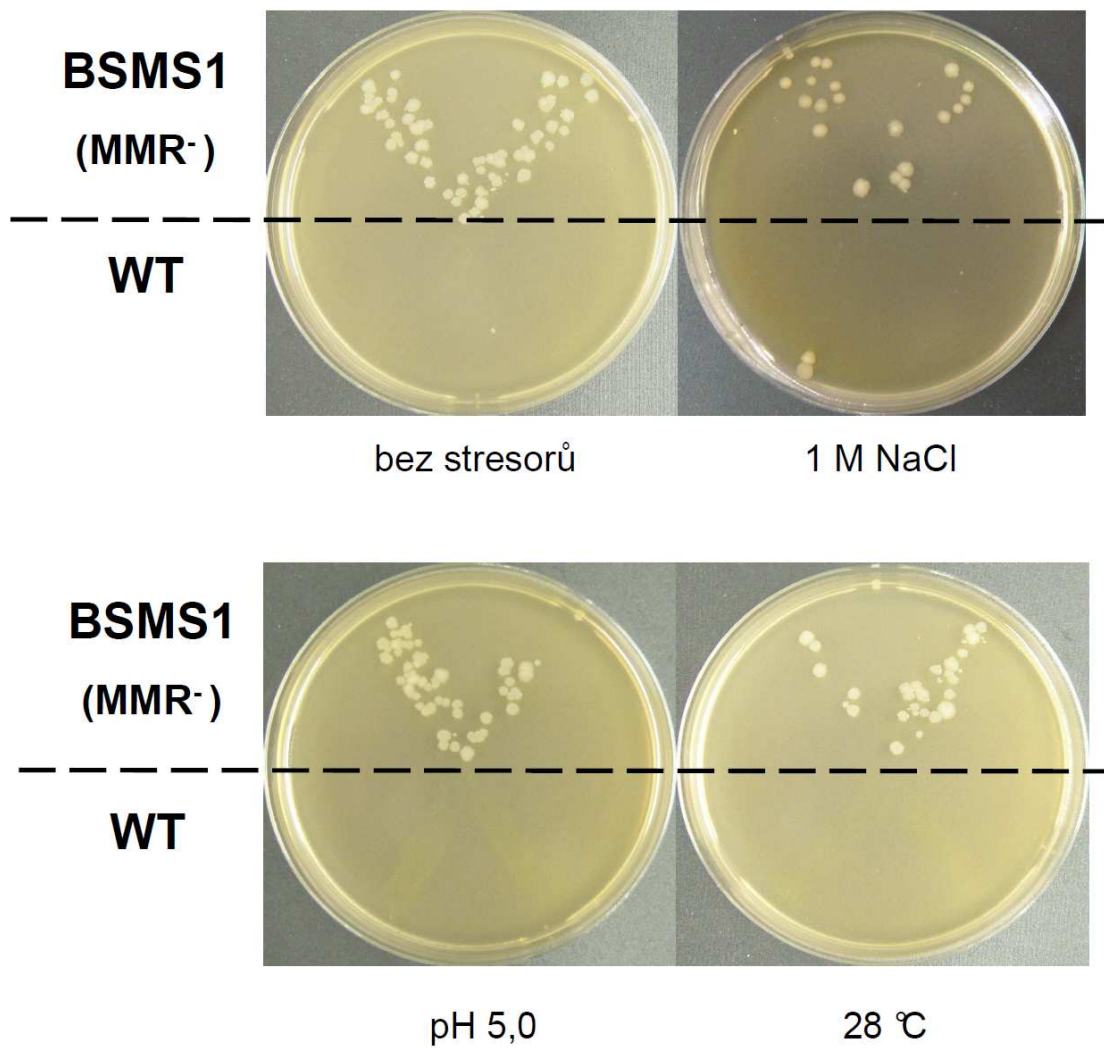
Stejným postupem byla mutační rychlost měřena i u kultury v pokročilé stacionární fázi růstu ($OD_{450} = 5,0-5,5$). V tomto případě nemohla být mutační rychlost s jistotou stanovena přesně, neboť je možné, že se, podobně jako mnoho dalších buněčných parametrů, mění po přechodu do stacionární fáze. Nicméně, pokud by došlo k významnému (řádovému) zvýšení reálné mutační rychlosti po vstupu do stacionární fáze, na vypočtené hodnotě by se to projevilo. Žádné zvýšení však pozorováno nebylo, dokonce ani když byly všechny tři stresové faktory (hyperosmolarita, zvýšená teplota, stacionární fáze) kombinovány.



OBRÁZEK 26: Vliv stresů na mutační rychlost *B. subtilis*

Všechny stresové experimenty probíhaly s divokým kmenem *B. subtilis* 168. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů. Osa y je vynesena logaritmicky.

Za účelem rychlého screeningu vlivu dalších stresorů (nízké pH, nízká kultivační teplota) byla mutační rychlost sledována s použitím razítkovací metody (**Kap. 4.5.**). Ani v těchto případech nebyla prokázána zvýšená mutabilita za stresových podmínek (**Obr. 27**).



OBRÁZEK 27: Vliv stresů na mutagenizi při povrchovém růstu na agarových plotnách.

LBG plotny byly po 24 hodinové inkubaci (působící stresový faktor je uveden pod příslušným obrázkem) přerazítkovány na selekční plotny s rifampicinem (50 µg/ml) a inkubovány 24 hodin.

5. DISKUZE

Fenomén adaptivní mutagenese předpokládá, že mikroorganismy jsou schopny aktivně modulovat svou mutabilitu s cílem generovat výhodné mutace, které jim zajistí přežití za nepříznivých podmínek jejich životního prostředí. Bylo navrženo a do různé míry prokázáno několik mechanismů zvýšené mutagenese za stresových podmínek (**Kap. 2.1.3.**). Jedním z takových mechanismů je stresem indukovaná deaktivace MMR a následné zvýšení mutační rychlosti díky absenci opravy chybné inkorporace nukleotidů při replikaci DNA (**Kap. 2.2.3.**).

Cílem našeho projektu bylo rozšířit dosavadní úroveň znalostí o procesech adaptivní mutagenese u gram pozitivního modelového organismu *Bacillus subtilis*, kterým byla věnována podstatně menší pozornost než u nejvýznamnější modelové bakterie *Escherichia coli*. Vzhledem ke specifickým přizpůsobením daným odlišným habitatem a životní strategií (včetně unikátních jevů stacionární fáze jako přirozená kompetence a tvorba endospor) je možné očekávat, že se procesy a rozsah adaptivní mutagenese budou lišit. Rovněž vlastnosti MMR se mezi oběma modelovými organismy významně liší, přičemž u *B. subtilis* je přítomno evolučně původní uspořádání (**Kap. 2.2.1.3.**). Dosud byla adaptivní mutagenese u *B. subtilis* studována s využitím jediného experimentálního systému specifického restriktivními podmínkami dlouhodobého hladovění na minerálním médiu (**Kap. 2.1.5.1.**). Naším cílem bylo nahlédnout na problematiku adaptivní mutagenese ze všeobecného úhlu, s použitím škály jasně definovaných stresorů za podmínek permisivních pro růst.

První část práce se týkala dynamiky exprese komponent MMR za stresových podmínek. K tomu účelu bylo vybráno C-terminální značení proteinů MutS a MutL modrým fluorescenčním proteinem (CFP). Pro konstrukci fúzních proteinů byl využit komerčně dostupný integrativní vektor pSG1186 (**Obr. 14**). Při použití tohoto postupu je možno rychle stanovit buněčné koncentrace proteinů. Fluorescenční značení dále umožňuje detekci proteinů MMR *in vivo* pomocí fluorescenčně-mikroskopických technik. Exprese proteinů není fúzí s CFP ovlivněna, stanovení koncentrace CFP tak poskytuje relevantní údaje.

Metodami genového inženýrství byly zkonstruovány kmeny *B. subtilis* exprimující oba proteiny MMR označené CFP (**Obr. 17**) a správnost integrace plazmidového konstruktů

byla ověřena pomocí PCR reakce (**Obr. 18**). V lyzátech kmenů pak byla měřena synchronní spektra, optimalizovaná pro maximální fluorescenci CFP (**Kap. 3.2.7.**). První měření ukázala na velmi intenzivní dlouhovlnnou fluorescenci flavinů, která značně zkreslovala spektrum v oblasti fluorescence CFP. Proto bylo přistoupeno k selektivnímu zhášení flavinové fluorescence pomocí iodidových iontů. Maximálního zhášení bylo dosaženo při 0,5 M koncentraci iodidu.

Ani po přidavku iodidu jsme v buněčných lyzátech nezaznamenali signál odpovídající fluorescenci CFP, zatímco fluorescence pozadí se měnila v závislosti na fázi kultivace odebraných vzorků. Experiment byl proto zopakován s divokým kmenem, aby bylo možno jednoznačně odlišit fluorescenci CFP od buněčného pozadí. Porovnání obou měření ukázalo, že u kmene exprimujícího MutL-CFP fúzi nedochází k detekovatelnému zvýšení fluorescence v oblasti odpovídající excitaci CFP (**Obr. 19**). Tento postup tedy není možné použít pro kvantifikaci proteinů MMR v buňce.

Po nezdaru fluorescenčního stanovení bylo přistoupeno k alternativní metodě měření exprese MMR. Byl zkonstruován kmen umožňující monitoring transkripce *mutSL* operonu. Většina známých regulací genové exprese probíhá na transkripční úrovni, proto můžeme očekávat, že tento systém, byť nereflektuje translační a posttranslační regulace, poskytne relevantní informace o průběhu exprese komponent MMR. Pro účely sledování transkripce jsme využili integrativní plazmid pDG1661 (**Obr. 15**), jehož prostřednictvím byl fúzován promotor *mutSL* operonu s reportérovým genem β -galaktosidázy. Jako rodičovský kmen byl použit *B. subtilis* 1A680, který jsme zvolili kvůli absenci endogenní β -galaktosidázové aktivity.

Cílem prvního experimentu bylo zjistit, jak se mění exprese reportéru, pokud jsou buňky vystaveny stresu z nedostatku živin po přechodu do stacionární fáze růstu v tekutém komplexním médiu. Ukázalo se, že poté, co ustane exponenciální růst, dochází k jednorázové silné indukci transkripce operonu (**Obr. 20B**). Toto pozorování je v souladu s výsledky obdobného pokusu s použitím minerálního média, kdy došlo k podobně silné indukci na přelomu exponenciální a stacionární fáze (GINETTI *et al.* 1996). V dalším průběhu stacionární fáze jsme pozorovali jen mírný pokles hladiny reportéru. Výjimkou byla jednorázová rapidní proteolýza β -galaktosidázy (**Kap. 4.4.**), která ovšem nevypovídá o případné proteolýze MutS nebo MutL. Přesto dosahovala na konci stacionární fáze, kdy došlo k zastavení růstu kultury, hladina reportéru vyšších

hodnot než v rané exponenciální fázi, což je opět analogický výsledek jako při kultivaci v minerálním médiu (GINETTI *et al.* 1996).

Při limitaci živinami ve stacionární fázi tedy nebyl pozorován takový pokles exprese, který by jednoznačně ukazoval na negativní regulaci MMR a naznačoval tak omezenou funkčnost tohoto antimutačního mechanismu. Je zajímavé toto zjištění porovnat s vlivem MMR na mutagenезi při dlouhodobém hladovění na minerálních plotnách. Za těchto podmínek si MMR z velké části svou funkčnost zachovává (**Kap. 2.2.3.1.2.**).

Získali jsme tedy podpůrná data vyvracející programovanou, nutričním stresem indukovanou negativní regulaci MMR u *B. subtilis*. Je pozoruhodné, že k silné stimulaci exprese *mutSL* operonu dochází právě při vstupu buněk do stacionární fáze růstu, a to u obou typů kultivačních médií, fundamentálně se lišících svým složením. Z toho můžeme usoudit, že za zvýšení exprese je zodpovědný dosud neidentifikovaný časný signál o nedostatku živin. Je otázkou, jaký jaký může mít taková indukce smysl. Nabízí se vysvětlení, že zvýšená exprese zabezpečuje dostatečnou zásobu proteinů MMR pro nadcházející nepříznivé období, jak naznačuje i **Obr. 20B**. Pak by ovšem platil opak hypotézy programované adaptivní mutagenезe – aktivní prevence mutagenезe při nutričním stresu. Všechna tato zjištění jsou v ostrém kontrastu se situací u *E. coli*, kde dochází k výrazné, RpoS- a Hfq-závislé negativní regulaci MMR (FENG *et al.* 1996, TSUI *et al.* 1997, LI, B. *et al.* 2003), jejímž důsledkem je potlačení jeho funkcí (HARRIS *et al.* 1999, SAINT-RUF a MATIC 2006) – viz **Kap. 2.2.3.1.1.**

Dále jsme s využitím stejného reportérového systému sledovali, jak se projeví vystavení kultury silnému hyperosmotickému stresu (1 M NaCl) na expresi MMR. Po přidání NaCl došlo k zastavení růstu na 80 minut (**Obr. 20A**). Během této doby koncentrace reportéru mírně klesala. Po obnovení růstu došlo i k obnově syntézy β -galaktosidázy. Kinetika exprese se téměř nelišila od nestresované paralelní kultury (**Obr. 20B**), přestože růstová rychlost byla výrazně nižší (**Obr. 20A**). Z uvedených výsledků jasně vyplývá, že hyperosmotický stres nemá na expresi MMR negativní vliv, na rozdíl od růstové rychlosti, kterou snižuje přibližně o polovinu.

Jako další environmentální stresy, jejichž vliv na expresi reportéru byl sledován, jsme zvolili nízkou kultivační teplotu a kyselé pH. Působením obou stresů opět došlo k významnému snížení růstové rychlosti. Například použité pH 5 vyvolává silnou stresovou odpověď, neboť se značně odlišuje od neutrálních pH hodnot, které jsou pro růst optimální (VOELKER *et al.* 1995, KOVACS *et al.* 1998). Podobně jako hyperosmotického stresu, úroveň exprese MMR byla v případě obou stresů obdobná jako

u nestresované kontroly (**Obr. 21**). Žádný z výsledků tedy neprokázal stresem indukovanou negativní regulaci této opravné dráhy.

Dalším úkolem diplomové práce bylo měření mutačních rychlostí *B. subtilis* při stresových podmínkách s cílem kvantifikovat probíhající procesy mutagenese. Za tímto účelem byl vytvořen matematický model, vycházející z kinetiky akumulace mutantů při růstu bakteriální kultury v tekutém médiu (**Obr. 22**). Jako sledované mutace jsme v souladu s většinou podobně zaměřených experimentů zvolili substituce podmiňující rezistenci k inhibitoru transkripce rifampicinu. Měření růstových parametrů reprezentativního vzorku rifampicin-rezistentních mutantů ukázalo, že se svými vlastnostmi od divokého typu liší jen nepatrně (**Obr. 24**) a splňují tak kritéria pro využití v uvedeném modelu.

Následně byl model testován v praxi. Nejprve bylo posuzováno, nakolik je tento způsob měření mutačních rychlostí odolný vůči fluktuacím způsobeným stochastickými procesy. Pětinasobné opakování stejného pokusu ukázalo minimální rozptyl ve zjištěných hodnotách (**Tab. 3**), což platilo rovněž pro veškerá následující měření. Dalším podpurným argumentem pro validitu modelu byly vlastní hodnoty naměřených mutačních rychlostí (**Obr. 26**), které se velmi dobře shodovaly s publikovanými daty o mutačních rychlostech u divokého kmene (**Tab. 2**) a mutantů defektních v MMR, jejichž mutační rychlost je zvýšena o dva řády (SASAKI *et al.* 2000, SMITH *et al.* 2001, PEDRAZA-REYES a YASBIN 2004, SIMMONS *et al.* 2008).

Byly měřeny hodnoty mutační rychlosti za podmínek hyperosmotického stresu, zvýšené kultivační teploty na 42 °C, stacionární fáze růstu a kombinace všech tří uvedených faktorů. U žádného z uvedených případů nebylo pozorováno významné zvýšení mutační rychlosti v porovnání s hodnotou naměřenou při kultivaci za bezstresových podmínek v exponenciální fázi (**Obr. 26**).

Dále byla semikvantitativně stanovena mutační rychlost při povrchovém růstu na agarových plotnách s využitím razítkovací metody. V tomto případě byl sledován vliv nízké kultivační teploty a kyselého pH živné půdy, a to u divokého i hypermutátorového kmene. Porovnáním s nestresovaným kontrolním pokusem nebyly ani zde zjištěny významné rozdíly v mutační rychlosti (**Obr. 27**). Ukázalo se rovněž, že mutační rychlost hypermutátorového kmene se za těchto stresových podmínek nemění (zůstává vysoká), což značí, že se během stresu nesnižuje četnost vzniku replikačních chyb, které jsou substrátem MMR. Z toho je možné usoudit, že MMR je v těchto případech plně funkční.

Tento závěr je zcela v souladu s pozorovanou absencí negativní regulace exprese *mutSL* operonu (viz dříve).

Máme-li shrnout poznatky získané během našeho výzkumu, pak všechna experimentální data ukazují, že u *B. subtilis* nedochází k programovanému zvyšování mutability vlivem vystavení stresům, jak bylo ukázáno přímým měřením mutační rychlostí. Rovněž nedochází k negativní regulaci exprese MMR ani k omezení jeho efektivity. Testovali jsme širokou škálu kultivačních podmínek (teplotní rozmezí 28-42 °C, zvýšená osmolarita a acidita, limitace živinami ve stacionární fázi), lze se tedy důvodně domnívat, že se jedná o obecně platný jev. Toto zjištění je v zásadním rozporu s hypotézou stresem indukované adaptivní mutagenese (TENAILLON *et al.* 2004, FOSTER 2007).

Existence stresem indukované adaptivní mutagenese (jakkoliv lákavá tato představa je) ovšem nebyla jednoznačně prokázána a je stále velmi diskutovaná (ROTH *et al.* 2006, WRANDE *et al.* 2008). Přesto uvedeme několik důvodů, proč nemusí mít absence adaptivní mutagenese pro *B. subtilis* negativní důsledky z hlediska dlouhodobého přežívání.

Životním prostředím této bakterie je půda, biotop přítomný na Zemi stovky milionů let. Za tu dobu se *B. subtilis* pravděpodobně dostatečně geneticky adaptoval na spektrum fyzikálních stresových faktorů, s nimiž se lze v půdním prostředí setkat. To je v kontrastu se situací u komenzálních a patogenních bakterií (včetně *E. coli*), které čelí silnému, neustále se měnícímu selekčnímu tlaku ze strany imunitního systému jejich hostitelů. Inherentně nízká mutabilita tak může primárně odrážet rozdílné potřeby adaptace dané specifitou stresů přítomných v životním prostředí příslušného druhu. Jiná je situace u limitace živinami (hladovění). Zde je možné se adaptovat na jejich nedostatek zvýšením efektivity využívání limitujícího zdroje potravy nebo utilizací alternativních zdrojů přítomných v prostředí. Nicméně, u *B. subtilis* dochází při nedostatku živin ke spuštění procesu sporulace. Vzniklé endospory nemají žádné metabolické nároky, jsou vysoce dlouhověké a za příznivých nutričních podmínek se mění ve vegetativně rostoucí buňku. Přítomnost stadia endospory v životním cyklu tedy podstatně zmírňuje selekční tlak za podmínek nedostatku živin, neboť dovoluje bakterii snadno přežít letální efekt dlouhodobého hladovění, bez nutnosti mutačního přizpůsobení. Domníváme se, že tímto způsobem je možné vysvětlit absenci zvýšené mutagenese ve stacionární fázi růstu.

6. SOUHRN

Cílem mé diplomové práce bylo zkoumání mutagenese za stresových podmínek u *B. subtilis* a určení, jaký význam v těchto procesech má mismatch-repair systém (MMR).

Bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Byly připraveny kmeny *B. subtilis* exprimující proteiny MMR (MutS a MutL) označené pomocí modrého fluorescenčního proteinu (CFP).
2. U těchto kmenů byla měřena fluorescence CFP. Vzhledem k vysokému pozadí endogenních buněčných fluoroforů nebylo možné tímto způsobem určit míru exprese MMR jako funkci koncentrace CFP.
3. Byl sestaven kmen *B. subtilis* umožňující monitorování aktivity promotoru *mutSL* operonu prostřednictvím reportéru β -galaktosidázy.
4. Byla zjištěna konstitutivní exprese *mutSL* operonu při limitaci živinami v celém průběhu stacionární fáze v komplexním médiu. Ačkoliv došlo ke zpomalení exprese ve stacionární fázi, hladina reportéru neklesla pod úroveň časné exponenciální fáze. Dále se ukázalo, že během kultivace při silném hyperosmotickém stresu se kinetika exprese *mutSL* operonu po adaptaci na hyperosmolaritu nemění v porovnání s nestresovaným kontrolním experimentem. Rovněž nebyl prokázán negativní vliv snížené kultivační teploty a kyselého pH na expresi tohoto operonu.
5. Byla otestována metoda měření mutačních rychlostí na základě modelu akumulace mutací při růstu bakterií v tekuté kultuře. Metoda poskytovala konzistentní výsledky, které byly v dobré shodě s dříve publikovanými hodnotami.
6. Byl zkoumán vliv limitace živinami ve stacionární fázi, hyperosmotického stresu, snížené a zvýšené kultivační teploty a kyselého pH na mutační rychlost *B. subtilis*. Nebylo pozorováno zvýšení hodnot mutačních rychlostí za těchto stresových podmínek.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Abdulkarim, F., Hughes, D. (1996): Homologous recombination between the *tuf* genes of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 260: 506-522.
2. Abella, M., Erill, I., Jara, M., Mazon, G., Campoy, S., Barbe, J. (2004): Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum. *Mol Microbiol* 54: 212-222.
3. Andersson, D.I., Slechta, E.S., Roth, J.R. (1998): Evidence that gene amplification underlies adaptive mutability of the bacterial *lac* operon. *Science* 282: 1133-1135.
4. Andersson, D.I., Hughes, D. (2009): Gene Amplification and Adaptive Evolution in Bacteria. *Annu Rev Genet*.
5. Ban, C., Yang, W. (1998): Structural basis for MutH activation in *E.coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *Embo J* 17: 1526-1534.
6. Ban, C., Yang, W. (1998): Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* 95: 541-552.
7. Bjedov, I., Lecointre, G., Tenailon, O., Vaury, C., Radman, M., Taddei, F., Denamur, E., Matic, I. (2003): Polymorphism of genes encoding SOS polymerases in natural populations of *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 2: 417-426.
8. Blazquez, J., Gomez-Gomez, J.M., Oliver, A., Juan, C., Kapur, V., Martin, S. (2006): PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 62: 84-99.
9. Boshoff, H.I., Reed, M.B., Barry, C.E., 3rd, Mizrahi, V. (2003): DnaE2 polymerase contributes to *in vivo* survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 113: 183-193.
10. Bujnicki, J.M. (2001): Understanding the evolution of restriction-modification systems: clues from sequence and structure comparisons. *Acta Biochim Pol* 48: 935-967.
11. Burdett, V., Baitinger, C., Viswanathan, M., Lovett, S.T., Modrich, P. (2001): In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6765-6770.
12. Burkala, E., Reimers, J.M., Schmidt, K.H., Davis, N., Wei, P., Wright, B.E. (2007): Secondary structures as predictors of mutation potential in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Microbiology* 153: 2180-2189.
13. Bzymek, M., Lovett, S.T. (2001): Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8319-8325.

14. Cairns, J., Overbaugh, J., Miller, S. (1988): The origin of mutants. *Nature* 335: 142-145.
15. Castellanos-Juarez, F.X., Alvarez-Alvarez, C., Yasbin, R.E., Setlow, B., Setlow, P., Pedraza-Reyes, M. (2006): YtkD and MutT protect vegetative cells but not spores of *Bacillus subtilis* from oxidative stress. *J Bacteriol* 188: 2285-2289.
16. Cirz, R.T., Chin, J.K., Andes, D.R., De Crecy-Lagard, V., Craig, W.A., Romesberg, F.E. (2005): Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol* 3: e176.
17. Cirz, R.T., Romesberg, F.E. (2006): Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 220-225.
18. Cirz, R.T., Romesberg, F.E. (2007): Controlling mutation: intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 341-354.
19. Cupples, C.G., Miller, J.H. (1989): A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5345-5349.
20. Cupples, C.G., Cabrera, M., Cruz, C., Miller, J.H. (1990): A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of specific frameshift mutations. *Genetics* 125: 275-280.
21. Denamur, E., Lecointre, G., Darlu, P., Tenaillon, O., Acquaviva, C., Sayada, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Elion, J., Taddei, F., Radman, M., Matic, I. (2000): Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* 103: 711-721.
22. Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andremont, A., Picard, B., Taddei, F., Matic, I. (2002): High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol* 184: 605-609.
23. Denamur, E., Matic, I. (2006): Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol Microbiol* 60: 820-827.
24. Duigou, S., Ehrlich, S.D., Noirot, P., Noirot-Gros, M.F. (2004): Distinctive genetic features exhibited by the Y-family DNA polymerases in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 54: 439-451.
25. Duppatla, V., Bodda, C., Urbanke, C., Friedhoff, P., Rao, D.N. (2009): The carboxy-terminal domain is sufficient for endonuclease activity of *Neisseria gonorrhoeae* MutL. *Biochem J*.
26. Erill, I., Campoy, S., Mazon, G., Barbe, J. (2006): Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res* 34: 66-77.

27. Errington, J., Vogt, C.H. (1990): Isolation and characterization of mutations in the gene encoding an endogenous *Bacillus subtilis* beta-galactosidase and its regulator. *J Bacteriol* 172: 488-490.
28. Farrell, M.J., Finkel, S.E. (2003): The growth advantage in stationary-phase phenotype conferred by *rpoS* mutations is dependent on the pH and nutrient environment. *J Bacteriol* 185: 7044-7052.
29. Feng, G., Tsui, H.C., Winkler, M.E. (1996): Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells. *J Bacteriol* 178: 2388-2396.
30. Ferenci, T. (2003): What is driving the acquisition of *mutS* and *rpoS* polymorphisms in *Escherichia coli*? *Trends Microbiol* 11: 457-461.
31. Feucht, A., Lewis, P.J. (2001): Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 264: 289-297.
32. Finkel, S.E. (2006): Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol* 4: 113-120.
33. Foster, P.L. (2004): Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 4846-4852.
34. Foster, P.L. (2006): Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods Enzymol* 409: 195-213.
35. Foster, P.L. (2007): Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 373-397.
36. Fukui, K., Nishida, M., Nakagawa, N., Masui, R., Kuramitsu, S. (2008): Bound nucleotide controls the endonuclease activity of mismatch repair enzyme MutL. *J Biol Chem* 283: 12136-12145.
37. Funchain, P., Yeung, A., Stewart, J., Clendenin, W.M., Miller, J.H. (2001): Amplification of mutator cells in a population as a result of horizontal transfer. *J Bacteriol* 183: 3737-3741.
38. Ginetti, F., Perego, M., Albertini, A.M., Galizzi, A. (1996): *Bacillus subtilis mutS mutL* operon: identification, nucleotide sequence and mutagenesis. *Microbiology* 142 (Pt 8): 2021-2029.
39. Giraud, A., Matic, I., Tenaillon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M., Taddei, F. (2001): Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* 291: 2606-2608.
40. Goerlich, O., Quillardet, P., Hofnung, M. (1989): Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 171: 6141-6147.

41. Goldsmith, M., Sarov-Blat, L., Livneh, Z. (2000): Plasmid-encoded MucB protein is a DNA polymerase (pol RI) specialized for lesion bypass in the presence of MucA', RecA, and SSB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11227-11231.
42. Guarne, A., Ramon-Maiques, S., Wolff, E.M., Ghirlando, R., Hu, X., Miller, J.H., Yang, W. (2004): Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. *Embo J* 23: 4134-4145.
43. Guerout-Fleury, A.M., Frandsen, N., Stragier, P. (1996): Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180: 57-61.
44. Hall, M.C., Matson, S.W. (1999): The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. *J Biol Chem* 274: 1306-1312.
45. Harfe, B.D., Jinks-Robertson, S. (2000): DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* 34: 359-399.
46. Harris, R.S., Feng, G., Ross, K.J., Sidhu, R., Thulin, C., Longerich, S., Szigety, S.K., Hastings, P.J., Winkler, M.E., Rosenberg, S.M. (1999): Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation. *Mutat Res* 437: 51-60.
- Harwood, C.R., Cutting, S.M. (eds.) (1990): *Molecular biological methods for Bacillus*. J. Wiley and Sons LTD., England.
47. Humbert, O., Prudhomme, M., Hakenbeck, R., Dowson, C.G., Claverys, J.P. (1995): Homeologous recombination and mismatch repair during transformation in *Streptococcus pneumoniae*: saturation of the Hex mismatch repair system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9052-9056.
48. Chedin, F., Dervyn, E., Dervyn, R., Ehrlich, S.D., Noirot, P. (1994): Frequency of deletion formation decreases exponentially with distance between short direct repeats. *Mol Microbiol* 12: 561-569.
49. Chen, G., Patten, C.L., Schellhorn, H.E. (2004): Positive selection for loss of RpoS function in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 554: 193-203.
50. Jarosz, D.F., Beuning, P.J., Cohen, S.E., Walker, G.C. (2007): Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 15: 70-77.
51. Joseph, N., Duppatla, V., Rao, D.N. (2006): Prokaryotic DNA mismatch repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81: 1-49.
- Jung, K., Park, J., Maeng, P. J. and Kim, H. (2005): Fluorescence quenching of green fluorescent protein during denaturation by guanidine. *Bull. Korean Chem. Soc.* 26: 413-417.
52. Junop, M.S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P., Yang, W. (2001): Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol Cell* 7: 1-12.

53. Junop, M.S., Yang, W., Funchain, P., Clendenin, W., Miller, J.H. (2003): In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair (Amst)* 2: 387-405.
54. Kadyrov, F.A., Dzantiev, L., Constantin, N., Modrich, P. (2006): Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 126: 297-308.
55. King, T., Ishihama, A., Kori, A., Ferenci, T. (2004): A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 5614-5620.
56. King, T., Seeto, S., Ferenci, T. (2006): Genotype-by-environment interactions influencing the emergence of *rpoS* mutations in *Escherichia coli* populations. *Genetics* 172: 2071-2079.
57. Kosinski, J., Plotz, G., Guarne, A., Bujnicki, J.M., Friedhoff, P. (2008): The PMS2 subunit of human MutLalpha contains a metal ion binding domain of the iron-dependent repressor protein family. *J Mol Biol* 382: 610-627.
58. Kovacs, T., Hargitai, A., Kovacs, K.L., Mecs, I. (1998): pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 165: 323-328.
59. Labat, F., Pradillon, O., Garry, L., Peuchmaur, M., Fantin, B., Denamur, E. (2005): Mutator phenotype confers advantage in *Escherichia coli* chronic urinary tract infection pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 317-321.
60. Layton, J.C., Foster, P.L. (2003): Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 50: 549-561.
61. Le Chatelier, E., Becherel, O.J., D'alencon, E., Canceill, D., Ehrlich, S.D., Fuchs, R.P., Janniere, L. (2004): Involvement of DnaE, the second replicative DNA polymerase from *Bacillus subtilis*, in DNA mutagenesis. *J Biol Chem* 279: 1757-1767.
62. Leclerc, J.E., Li, B., Payne, W.L., Cebula, T.A. (1996): High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 274: 1208-1211.
63. Leclerc, J.E., Payne, W.L., Kupchella, E., Cebula, T.A. (1998): Detection of mutator subpopulations in *Salmonella typhimurium* LT2 by reversion of *his* alleles. *Mutat Res* 400: 89-97.
64. Levy, D.D., Cebula, T.A. (2001): Fidelity of replication of repetitive DNA in *mutS* and repair proficient *Escherichia coli*. *Mutat Res* 474: 1-14.
65. Li, B., Tsui, H.C., Leclerc, J.E., Dey, M., Winkler, M.E., Cebula, T.A. (2003): Molecular analysis of *mutS* expression and mutation in natural isolates of pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149: 1323-1331.
66. Li, F., Liu, Q., Chen, Y.Y., Yu, Z.N., Zhang, Z.P., Zhou, Y.F., Deng, J.Y., Bi, L.J., Zhang, X.E. (2008): *Escherichia coli* mismatch repair protein MutL interacts with the clamp loader subunits of DNA polymerase III. *Mutat Res* 637: 101-110.

67. Li, G.M. (2008): Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18: 85-98.
68. Lin, Z., Nei, M., Ma, H. (2007): The origins and early evolution of DNA mismatch repair genes - multiple horizontal gene transfers and co-evolution. *Nucleic Acids Res* 35: 7591-7603.
69. Lobner-Olesen, A., Skovgaard, O., Marinus, M.G. (2005): Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol* 8: 154-160.
70. Lombardo, M.J., Aponyi, I., Rosenberg, S.M. (2004): General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Genetics* 166: 669-680.
71. Lopez De Saro, F.J., Marinus, M.G., Modrich, P., O'donnell, M. (2006): The beta sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS. *J Biol Chem* 281: 14340-14349.
72. Lovett, S.T. (2004): Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol Microbiol* 52: 1243-1253.
73. Luo, Y., Pfuetzner, R.A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E.A., Cherney, M., Kim, B., Little, J.W., Strynadka, N.C. (2001): Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* 106: 585-594.
74. Luria, S.E., Delbruck, M. (1943): Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511.
75. Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R.P., Barbe, J., Penades, J.R. (2006): Beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188: 2726-2729.
76. Majewski, J., Cohan, F.M. (1998): The effect of mismatch repair and heteroduplex formation on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics* 148: 13-18.
77. Majewski, J. (2001): Sexual isolation in bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 199: 161-169.
78. Mao, E.F., Lane, L., Lee, J., Miller, J.H. (1997): Proliferation of mutators in a cell population. *J Bacteriol* 179: 417-422.
79. Matic, I., Taddei, F., Radman, M. (1996): Genetic barriers among bacteria. *Trends Microbiol* 4: 69-72.
80. Matic, I., Babic, A., Radman, M. (2003): 2-aminopurine allows interspecies recombination by a reversible inactivation of the *Escherichia coli* mismatch repair system. *J Bacteriol* 185: 1459-1461.
81. Matson, S.W., Robertson, A.B. (2006): The UvrD helicase and its modulation by the mismatch repair protein MutL. *Nucleic Acids Res* 34: 4089-4097.

82. Maughan, H., Nicholson, W.L. (2004): Stochastic processes influence stationary-phase decisions in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186: 2212-2214.
83. Mead, S., Vaisman, A., Valjavec-Gratian, M., Karata, K., Vandewiele, D., Woodgate, R. (2007): Characterization of polVR391: a Y-family polymerase encoded by rumA'B from the IncJ conjugative transposon, R391. *Mol Microbiol* 63: 797-810.
84. Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N. (2004): SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305: 1629-1631.
85. Miller, J.H., Suthar, A., Tai, J., Yeung, A., Truong, C., Stewart, J.L. (1999): Direct selection for mutators in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 1576-1584.
86. Moxon, R., Bayliss, C., Hood, D. (2006): Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annu Rev Genet* 40: 307-333.
87. Natrajan, G., Lamers, M.H., Enzlin, J.H., Winterwerp, H.H., Perrakis, A., Sixma, T.K. (2003): Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res* 31: 4814-4821.
88. Nicholson, W.L., Maughan, H. (2002): The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 184: 4936-4940.
89. Nohmi, T. (2006): Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annu Rev Microbiol* 60: 231-253.
90. Notley-Mcrobbs, L., Ferenci, T. (2000): Experimental analysis of molecular events during mutational periodic selections in bacterial evolution. *Genetics* 156: 1493-1501.
91. Notley-Mcrobbs, L., King, T., Ferenci, T. (2002): *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J Bacteriol* 184: 806-811.
92. Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P., Yang, W. (2000): Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* 407: 703-710.
93. Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., Blazquez, J. (2000): High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254.
94. Osawa, S., Takata, R., Tanaka, K., Tamaki, M. (1973): Chloramphenicol resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 127: 163-173.
95. Parker, B.O., Marinus, M.G. (1992): Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1730-1734.

96. Patterson, G., Day, R.N., Piston, D. (2001): Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* 114: 837-838.
97. Pedraza-Reyes, M., Yasbin, R.E. (2004): Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary-phase-induced mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186: 6485-6491.
98. Pierce, J.C., Kong, D., Masker, W. (1991): The effect of the length of direct repeats and the presence of palindromes on deletion between directly repeated DNA sequences in bacteriophage T7. *Nucleic Acids Res* 19: 3901-3905.
99. Pluciennik, A., Modrich, P. (2007): Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12709-12713.
100. Ponder, R.G., Fonville, N.C., Rosenberg, S.M. (2005): A switch from high-fidelity to error-prone DNA double-strand break repair underlies stress-induced mutation. *Mol Cell* 19: 791-804.
101. Prunier, A.L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J.F., Leclercq, R. (2003): High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* 187: 1709-1716.
102. Rahmouni, A.R., Wells, R.D. (1992): Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling *in vivo*. *J Mol Biol* 223: 131-144.
103. Richardson, A.R., Yu, Z., Popovic, T., Stojiljkovic, I. (2002): Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6103-6107.
104. Robertson, A., Pattishall, S.R., Matson, S.W. (2006): The DNA binding activity of MutL is required for methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 281: 8399-8408.
105. Robleto, E.A., Yasbin, R., Ross, C., Pedraza-Reyes, M. (2007): Stationary phase mutagenesis in *B. subtilis*: a paradigm to study genetic diversity programs in cells under stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 327-339.
106. Rogozin, I.B., Pavlov, Y.I. (2003): Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutat Res* 544: 65-85.
107. Rocha, E.P., Matic, I., Taddei, F. (2002): Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions? *Nucleic Acids Res* 30: 1886-1894.
108. Rosche, W.A., Foster, P.L. (1999): The role of transient hypermutators in adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6862-6867.
109. Rosche, W.A., Foster, P.L. (2000): Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 20: 4-17.

110. Ross, C., Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Sung, H.M., Yasbin, R.E., Robleto, E. (2006): Novel role of *mfd*: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 7512-7520.
111. Rossolillo, P., Albertini, A.M. (2001): Functional analysis of the *Bacillus subtilis* *yshD* gene, a *mutS* paralogue. *Mol Gen Genet* 264: 809-818.
112. Roth, J.R., Kugelberg, E., Reams, A.B., Kofoid, E., Andersson, D.I. (2006): Origin of mutations under selection: the adaptive mutation controversy. *Annu Rev Microbiol* 60: 477-501.
113. Saint-Ruf, C., Matic, I. (2006): Environmental tuning of mutation rates. *Environ Microbiol* 8: 193-199.
114. Sasaki, M., Yonemura, Y., Kurusu, Y. (2000): Genetic analysis of *Bacillus subtilis* mutator genes. *J Gen Appl Microbiol* 46: 183-187.
115. Schurig-Briccio, L.A., Farias, R.N., Rodriguez-Montelongo, L., Rintoul, M.R., Rapisarda, V.A. (2009): Protection against oxidative stress in *Escherichia coli* stationary phase by a phosphate concentration-dependent genes expression. *Arch Biochem Biophys* 483: 106-110.
116. Simmons, L.A., Davies, B.W., Grossman, A.D., Walker, G.C. (2008): Beta clamp directs localization of mismatch repair in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell* 29: 291-301.
117. Smith, B.T., Grossman, A.D., Walker, G.C. (2001): Visualization of mismatch repair in bacterial cells. *Mol Cell* 8: 1197-1206.
118. Sniegowski, P., Gerrish, P.J., Lenski, R.E. (1997): Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 387: 703-705.
119. Sniegowski, P. (2001): Evolution: constantly avoiding mutation. *Curr Biol* 11: R929-931.
120. Strauss, B.S. (2002): The "A" rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity. *DNA Repair (Amst)* 1: 125-135.
121. Sung, H.M., Yasbin, R.E. (2002): Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184: 5641-5653.
122. Sung, H.M., Yeaman, G., Ross, C.A., Yasbin, R.E. (2003): Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185: 2153-2160.
123. Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Horak, R., Kivisaar, M. (2005): A DNA polymerase V homologue encoded by TOL plasmid pWW0 confers evolutionary fitness on *Pseudomonas putida* under conditions of environmental stress. *J Bacteriol* 187: 5203-5213.

124. Tenaillon, O., Denamur, E., Matic, I. (2004): Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Trends Microbiol* 12: 264-270.
125. Tippin, B., Pham, P., Goodman, M.F. (2004): Error-prone replication for better or worse. *Trends Microbiol* 12: 288-295.
126. Tsui, H.C., Feng, G., Winkler, M.E. (1997): Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 179: 7476-7487.
127. Van Der Woude, M.W., Baumler, A.J. (2004): Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17: 581-611, table of contents.
128. Vidales, L.E., Cardenas, L.C., Robleto, E., Yasbin, R.E., Pedraza-Reyes, M. (2009): Defects in the error prevention oxidized guanine system potentiate stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191: 506-513.
129. Viswanathan, M., Lacirignola, J.J., Hurley, R.L., Lovett, S.T. (2000): A novel mutational hotspot in a natural quasipalindrome in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 302: 553-564.
130. Voelker, U., Voelker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., Haldenwang, W.G. (1995): Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol* 177: 3771-3780.
131. Watson, M.E., Jr., Burns, J.L., Smith, A.L. (2004): Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* 150: 2947-2958.
132. Weigle, J.J. (1953): Induction of mutations in a bacterial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 39: 628-636.
133. Welsh, K.M., Lu, A.L., Clark, S., Modrich, P. (1987): Isolation and characterization of the *Escherichia coli mutH* gene product. *J Biol Chem* 262: 15624-15629.
134. Worth, L., Jr., Clark, S., Radman, M., Modrich, P. (1994): Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3238-3241.
135. Wrande, M., Roth, J.R., Hughes, D. (2008): Accumulation of mutants in "aging" bacterial colonies is due to growth under selection, not stress-induced mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11863-11868.
136. Wright, B.E., Longacre, A., Reimers, J.M. (1999): Hypermutation in derepressed operons of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5089-5094.
137. Wright, B.E. (2000): A biochemical mechanism for nonrandom mutations and evolution. *J Bacteriol* 182: 2993-3001.

138. Wright, B.E., Reschke, D.K., Schmidt, K.H., Reimers, J.M., Knight, W. (2003): Predicting mutation frequencies in stem-loop structures of derepressed genes: implications for evolution. *Mol Microbiol* 48: 429-441.
139. Wright, B.E. (2004): Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Mol Microbiol* 52: 643-650.
140. Wyrzykowski, J., Volkert, M.R. (2003): The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. *J Bacteriol* 185: 1701-1704.
141. Yang, H., Wolff, E., Kim, M., Diep, A., Miller, J.H. (2004): Identification of mutator genes and mutational pathways in *Escherichia coli* using a multicopy cloning approach. *Mol Microbiol* 53: 283-295.
142. Yang, H., Miller, J.H. (2008): Deletion of *dnaNI* generates a mutator phenotype in *Bacillus anthracis*. *DNA Repair (Amst)* 7: 507-514.
143. Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F., Finkel, S.E. (2002): SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8737-8741.
144. Zambrano, M.M., Siegele, D.A., Almiron, M., Tormo, A., Kolter, R. (1993): Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* 259: 1757-1760.
145. Zinser, E.R., Kolter, R. (2004): *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Res Microbiol* 155: 328-336.