

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

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STUDIUM VLIVU GENU *YXKO BACILLUS*
SUBTILIS NA MOTILITU BĚHEM ODPOVĚDI
NA OSMOTICKÝ STRES**

**THE STUDY OF EFFECT OF *BACILLUS*
SUBTILIS YXKO GENE ON MOTILITY DURING
STRESS RESPONSE TO OSMOTIC UPSHIFT**

Eliška Streitová

2009/2010

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s využitím citované literatury.

Poděkování

Děkuji RNDr. Ireně Liché, CSc. za věnovaný čas, trpělivost a pomoc při sepisování mé diplomové práce.

Děkuji Mgr. Vojtěchu Žilovi za cenné rady, ochotu a pomoc při přípravě preparátů a zhotovení snímků z transmisního elektronového mikroskopu.

Dále děkuji:

členům laboratoře elektronové mikroskopie UK za pomoc a rady při přípravě preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii

kolektivu mikrobiologické laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí

mé rodině za zázemí a podporu po celou dobu mého studia

Abstrakt

Bacillus subtilis je gram-pozitivní půdní bakterie. Ve svém přirozeném prostředí je neustále vystavena změnám chemických a fyzikálních podmínek, včetně změn osmolality. Buňka reaguje na zvýšení osmolality prostředí příjmem draselných iontů a následně transportem a/nebo syntézou kompatibilních solutů. V předchozích letech byl v naší laboratoři s využitím nesespecifické inzerční mutagenese (mini *Tn10*) izolován a charakterizován kmen *Bacillus subtilis* L-42. Tento kmen vykazuje sníženou schopnost růstu a osmolabilitu na médiích s koncentrací draselných iontů < 1 mmol/l. Inzercí transpozonu došlo k přerušení genu *yxkO* kódujícího protein prozatím neznámé funkce. Další výsledky získané v naší laboratoři navíc naznačovaly možný vliv přerušení genu *yxkO* na expresi genu *hag* kódujícího protein flagelin - majoritní protein vlákna bakteriálního bičíku.

Cílem této diplomové práce bylo objasnit, zda přerušení genu *yxkO* ovlivňuje motilitu, a zda je ovlivněna exprese genu *hag* na transkripční úrovni.

S využitím integračního vektoru pMUTIN4 byl připraven mutantní kmen se specificky zavedenou mutací v genu *yxkO* v kmeni *Bacillus subtilis* 1A839, jehož genotyp zajišťuje vyloučení známé transkripční regulace genu *hag*. Následně byla sledována motilita buněk s využitím světelné a elektronové mikroskopie. Získané výsledky dokazují vliv přerušení genu *yxkO* na motilitu. Zároveň ukazují, že ztráta motility *Bacillus subtilis* po vystavení buněk osmotickému stresu je způsobena postupnou degradací bičíku a nikoli regulací jeho pohybu. Sledováním změn transkripce genů *hag* a *yxkO* s využitím Northern a Southern blotu se nepodařilo získat průkazné výsledky. Pomocí PCR reakcí byla zjišťována alespoň přítomnost/nepřítomnost transkriptů. Přestože data dokumentující změny transkripce vybraných genů nejsou úplná, zdá se, že protein YxkO nereguluje transkripci genu *hag*. Jeho vliv na motilitu je pravděpodobně způsoben přímou či nepřímou regulací flagelinu na posttrasnlační úrovni. Navíc bylo zjištěno, že přerušení genu *yxkO* má pleiotropní efekt vedoucí nejen ke změnám motility, ale i ke snížené schopnosti osmoadaptace při nízké koncentraci draselných iontů v prostředí (< 1 mmol/l) a k narušení buněčného cyklu, resp. ztrátě schopnosti sporulovat.

Klíčová slova: *Bacillus subtilis*, osmolalita, motilita, regulace transkripce, gen *yxkO*, flagelin, gen *hag*

Abstract

Bacillus subtilis is gram-positive soil bacteria. In its natural environment it is constantly exposed to changes of chemical and physical conditions, including changes of osmolality. It responds to high osmolality by transporting of potassium ions and after that transporting and/or synthesising of compatible solutes. In last years the mutant strain *Bacillus subtilis* L-42 was isolated with non-specific insertional mutagenesis (mini *Tn10*) in our laboratory. This strain displays limited growth and inability to cope with hyperosmotic shock in a defined medium with potassium concentration of < 1 mmol/l. Insertion of transposon was located in *yxkO* gene which encodes a protein of unknown biological function. Some other data also indicate a possible role of disruption of *yxkO* gene in regulation of expression of *hag* gene, which encodes flagelin – a pivotal protein of bacterial flagellum.

The goal of this thesis was to clarify if the disruption of *yxkO* gene influences motility and whether is affected the transcription of *hag* gene.

With integrative vector pMUTIN4 a mutant strain with specific mutation of *yxkO* gene was prepared. Vector was pasted into chromosome of *Bacillus subtilis* strain 1A839 – genotype of this strain allows to extrude the known transcriptional regulation of *hag* gene. Cell's motility was observed by light and electron microscopy. Gained data prove the effect of disruption of *yxkO* gene on motility and also shows that the loss of motility after hyperosmotic shock is caused by loss of flagellum – probably by gradual degradation – and not by inhibition of its locomotive. We also wanted to observe the effect of mutation on the transcription of *yxkO* and *hag* genes by Northern and Southern blot methods, but no data was gained. At least we detected the presence/absence of transcripts with PCR method. Despite of the data which should documented the changes of transcription is not complete it seems that YxkO does not control the transcription of *hag* gene. It is possible that it controls the expression of flagelin on posttranslational level. Additionally it was documented that disruption of *yxkO* gene has the pleiotropic effect - it causes not only changes of motility, but also inability to cope with high osmolality in medium with low concentration of potassium ions (< 1 mmol/l) and disruption of cell cycle, respectively inability to sporulate.

Key words: *Bacillus subtilis*, osmolality, motility, regulation of transcription, gene *yxkO*, flagelin, gene *hag*

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	10
1. ÚVOD	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1 Osmotický tlak a turgor	13
2.2 Osmotický šok	14
2.3 Adaptace na hyperosmotický šok	14
2.3.1 První fáze osmoadaptace – transport draselných iontů	15
2.3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	15
2.3.1.2 <i>Bacillus subtilis</i>	15
2.3.2 Druhá fáze osmoadaptace –transport/syntéza kompatibilních solutů	17
2.3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	18
2.3.2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	19
2.3.3 Protein YxkO u <i>Bacillus subtilis</i>	23
2.4 Osmoregulace	25
2.4.1 Regulační mechanismy osmoadaptace <i>Escherichia coli</i>	25
2.4.1.1 Transport draselných iontů	25
2.4.1.1.1 Vysoko-afinní transportní systém Kdp	25
2.4.1.1.2 Transportní systém Trk	26
2.4.1.2 Transport kompatibilních solutů	27
2.4.1.2.1 Transportní systém ProP	27
2.4.1.2.2 Transportní systém ProU	29
2.4.2 Regulační mechanismy osmoadaptace <i>Bacillus subtilis</i>	30
2.4.2.1 Obecná stresová odpověď	30
2.5 Motilita a exprese genu <i>hag</i> u <i>Bacillus subtilis</i>	31
2.5.1 Regulace motility	33
2.5.1.1 Regulace na transkripční úrovni	34
2.5.1.1.1 Nutriční represor genů stacionární fáze CodY	34
2.5.1.1.2 Pleiotropní regulátor DegU	35
2.5.1.2 Regulace na posttranskripční úrovni	36
2.5.1.2.1 RNA-vazebný protein CsrA	36
2.5.1.2.2 Anti sigma-faktor FlgM	37
2.5.1.3 Regulace skládání bičíku	38
3. MATERIÁL A METODY	39
3.1 Materiál	39
3.1.1 Bakteriální kmeny	39

3.1.2	Plasmidy	40
3.1.2.1	pMUTIN4	40
3.1.3	Primery pro PCR	43
3.1.4	Enzymy a protilátky	44
3.1.5	DNA/RNA standardy	44
3.1.6	Komerční sady	45
3.1.7	Antibiotika	45
3.1.8	Chemikálie	46
3.1.9	Kultivační média	48
3.1.9.1	Komplexní médium	48
3.1.9.2	Minerální médium	48
3.1.9.3	Médium pro přípravu kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i>	49
3.1.10	Roztoky	50
3.1.11	Internetové databáze a programy	56
3.1.12	Přístroje a laboratorní zařízení	56
3.2	Metody	57
3.2.1	Práce s bakteriální kulturou	57
3.2.1.1	Kultivace na pevném médiu	57
3.2.1.2	Kultivace v tekutém médiu	57
3.2.1.3	Uchovávání bakteriálních kmenů	57
3.2.1.4	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	57
3.2.1.5	Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> elektroporací	58
3.2.1.6	Příprava kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i>	58
3.2.1.7	Transformace kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i>	58
3.2.1.8	Měření optické denzity bakteriální kultury	59
3.2.2	Práce s bakteriální DNA	60
3.2.2.1	Izolace chromozomální DNA	60
3.2.2.2	Izolace plasmidové DNA	60
3.2.2.2.1	Mini preparace plasmidové DNA	60
3.2.2.2.2	Izolace plasmidové DNA pomocí sady Plasmid Miniprep Kit	61
3.2.2.3	Čištění vzorku DNA pomocí sady DNA Extraction Kit	61
3.2.2.4	Horizontální agarózová elektroforéza DNA	61
3.2.2.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	62
3.2.2.6	Štěpení DNA restrikčními enzymy	63
3.2.2.7	Ligace restrikčních fragmentů	63
3.2.2.8	Neradioaktivní značení DNA sond	64
3.2.2.8.1	Značení sond s využitím Klenowova fragmentu	64
3.2.2.8.2	Značení polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)	64
3.2.2.9	Čištění vzorku gelovou filtrací	65
3.2.2.10	Vyhodnocení sond chromogenní detekcí	65
3.2.2.11	Southern blot	66
3.2.2.12	Sekvence DNA	66
3.2.3	Práce s bakteriální RNA	67
3.2.3.1	Izolace totální RNA	67
3.2.3.2	Horizontální agarózová elektroforéza RNA	68
3.2.3.3	Northern blot	68
3.2.3.4	Hybridizace	69

3.2.3.5	Chemiluminiscenční detekce	70
3.2.3.6	Převod RNA na cDNA	70
3.2.3.7	Amplifikace cDNA	71
3.2.4	Světelná a elektronová mikroskopie	72
3.2.4.1	Příprava nativních preparátů pro světelnou mikroskopii	72
3.2.4.2	Gramovo barvení	72
3.2.4.3	Příprava vzorku pro skenovací elektronovou mikroskopii	72
3.2.4.4	Příprava vzorku pro transmisní elektronovou mikroskopii –negativní barvení	73
4.	VÝSLEDKY	74
4.1	Příprava kmene s mutací v genu <i>yxkO</i> s využitím vektoru pMUTIN4	74
4.1.1	Příprava rekombinantního plasmidu a kmene	74
4.1.2	Ověření integrace do chromozomu	77
4.1.3	Ověřování růstových vlastností mutantních kmenů za různých kultivačních podmínek	80
4.2	Sledování změn exprese vybraných genů metodou hybridizace	84
4.2.1	Příprava neradioaktivně značených DNA sond pro hybridizaci	84
4.2.2	Hybridizace metodou Northern blot a detekce	87
4.2.3	Příprava cDNA a amplifikace transkriptů metodou PCR	89
4.2.4	Hybridizace metodou Southern blot a detekce	96
4.3	Studium motility a morfologie	98
4.3.1	Studium motility s využitím světelného mikroskopu	98
4.3.2	Studium změn motility pomocí elektronové mikroskopie	99
4.3.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie	99
4.3.2.2	Transmisní elektronová mikroskopie	103
4.3.3	Prokázání narušení schopnosti sporulace s využitím Gramova barvení	108
5.	DISKUZE	113
6.	ZÁVĚR	119
7.	SEZNAM LITERATURY	120

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CRP	cAMP receptorový protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
ECF	extracytoplasmatic function (extracytoplazmatická funkce)
GTP	guanosintrifosfát
HBB komplex	hook and basal body (háček a bazální tělísko bakteriálního bičíku)
K_m	koncentrace, při níž je rychlost transportu rovna 1/max. rychlosti transportu
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetězová reakce
RBS	ribosomal-binding sequence (ribzom-vazebná sekvence)
RNA	ribonukleová kyselina
SD sekvence	Shine-Delgarno sekvence
sRNA	small RNA (malá RNA)
V_{max}	maximální transportní kapacita

1. Úvod

Bakterie jsou považovány za nejpřízpůsobivější organizmy na Zemi. Obývají téměř všechna známá prostředí – půdu, slané i sladké vody či těla jiných organismů. Ve svém přirozeném prostředí jsou neustále vystaveny fyzikálním a chemickým změnám jako jsou změny teploty, pH či osmolality. Jejich schopnost přežít i v prostředích často zcela nevhodných pro ostatní formy života souvisí s vývojem různých adaptačních strategií, které umožňují rychlou reakci a adaptaci na měnící se podmínky.

Jelikož bakterie postrádají aktivní transportní systémy pro vodu, je obsah buněčné vody závislý na osmolalitě okolního prostředí. Změny osmolality prostředí vedou k toku vody z buňky či do buňky po koncentračním gradientu. Hydrostatický tlakový rozdíl mezi vnitřním a vnějším osmotickým tlakem je označován jako turgor a udržení jeho pozitivní hodnoty je klíčovým faktorem pro buněčný růst bakterií. Z tohoto důvodu je pro bakteriální buňky nezbytné udržovat jeho víceméně konstantní hodnotu po celý buněčný cyklus. To je zajištěno změnami koncentrace látek rozpuštěných v cytoplasmě v závislosti na měnících se vnějších podmínkách.

Studium mechanismů osmoadaptace a její regulace u modelové gram-pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* jsou předmětem výzkumu naší laboratoře. Primární odpovědí této bakterie na zvýšení osmolality je aktivace transportu draselných iontů do buňky. Z důvodu jejich toxicity ve vysokých koncentracích jsou však tyto ionty v druhé fázi osmoadaptace nahrazeny organickými látkami označovanými jako kompatibilní soluty. Ty jsou buď transportovány z prostředí, nebo syntetizovány de novo.

Regulační mechanismy osmoadaptace u *Bacillus subtilis* nejsou dosud podrobně popsány. Je však prokázáno, že osmotický stres indukuje obecnou stresovou odpověď. Indukce této odpovědi zajišťuje buňce mnohonásobnou rezistenci k mnoha dalším stresům, s nimiž by se mohla setkat. Dosavadní poznatky naznačují, že indukce obecné stresové odpovědi představuje okamžitou odpověď na hyperosmotický stres/šok. (Höper et al. 2005)

V rámci diplomové práce Vladislavy Holanové byl inzerční mutagenézí s pomocí minitranspozonu *Tn10* připraven osmosenzitivní mutantní kmen *Bacillus subtilis* L-42. Fyziologická analýza kmene následně prokázala neschopnost růstu na médiích s velmi nízkou koncentrací draselných iontů (< 1 mmol/l) a sníženou schopnost osmoadaptace na médiích s takto nízkou koncentrací draselných iontů. (Holanová 2000)

Později bylo prokázáno, že k vložení minitranspozonu došlo v oblasti kódující sekvence genu *yxkO*. Tento gen kóduje protein prozatím neznámé funkce, jehož aminokyselinové složení vykazuje homologii se sacharidovými kinázami ribokinázového typu. Osmolabilita tohoto kmene na médiích s nízkou koncentrací draslíku naznačuje možné zapojení tohoto proteinu v první fázi osmoadaptace. Analýza proteinových profilů mutantního a divokého kmene za

podmínek osmotického stresu navíc prokázala rozdíly v expresi některých proteinů, což naznačuje regulační roli proteinu YxkO. (Ulanova et al. 2007; Lichá, nepublikovaná data)

Jedním z těchto proteinů byl protein flagelin tvořící vlákno bakteriálního bičíku. Tento protein je kódován genem *hag*, jehož exprese je při hyperosmotickém stresu výrazně down-regulována. (Steil et al. 2003)

Cíle této diplomové práce byly:

1. připravit konstrukt umožňující vytvoření mutantních kmenů s umlčeným genem *yxkO*
2. vytvořit mutantní kmen s přerušným genem *yxkO* v genetickém pozadí mutací regulátorů syntézy bičíku (CodY a DegU)
3. zjistit, zda přerušení genu *yxkO* ovlivňuje motilitu *Bacillus subtilis* při osmotickém šoku
4. přispět k objasnění funkce proteinu YxkO v regulaci genu *hag*
 - I. zjistit vliv mutace v genu *yxkO* při osmotickém šoku na transkripci vlastní mRNA a transkripci mRNA genu *hag* kodující hlavní protein vlákna bičíku flagelin
 - II. zjistit případný vliv pleiotropních regulátorů DegU a CodY na transkripci genů *yxkO* a *hag*

2. Literární přehled

2.1 Osmotický tlak a turgor

Cytoplazmatická membrána je volně propustná pouze pro malé množství molekul, mezi něž patří voda a malé nenabitě molekuly jako glycerol či močovina. Membrána tak tvoří velmi efektivní bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky, které se odlišují složením a koncentrací jednotlivých rozpuštěných látek. To vede k ustavení rozdílného chemického potenciálu na jednotlivých stranách membrány. (Record et al. 1998; Wood 1999)

S různou koncentrací rozpuštěných látek souvisí osmolarita a osmotický tlak, což jsou termodynamické vlastnosti roztoků. Osmotický tlak vodného roztoku je měřen mezi tímto roztokem a čistou vodou, které jsou odděleny polopropustnou membránou. Hodnota tlaku je určena jako síla vyvinutá na jednotku plochy membrány nutná k zabránění toku vody membránou po osmotickém gradientu, tedy do koncentrovanějšího prostředí. (Record et al. 1998)

Při dostatečně vysokém zředění roztoků, kdy lze interakce mezi roztoky zanedbat, platí pro osmotický tlak vztah : $\Pi = R \cdot T \cdot c_s$, kde

Π – osmotický tlak (Pa)

R – plynová konstanta (J/mol . K)

T – absolutní teplota (K)

c_s - molární koncentrace rozpuštěné látky (mol/l).

(Record et al. 1998)

Pro uvedení velikosti osmotického tlaku jsou využívány pojmy osmolalita a osmolarita. Osmolalita bývá uváděna v molech rozpuštěné látky na kilogram rozpouštědla a jedná se o experimentální hodnotu podílu $\Pi / (R \cdot T)$. Může být změřena, ale nikoli spočítána. Naopak osmolarita vypočtena být může, a to jako součet koncentrací osmoticky aktivních látek v roztoku. Bývá vyjádřena v molech látky na litr roztoku. (Record et al. 1998; Wood 1999)

Vnitřní osmotický tlak buňky je větší než osmotický tlak v okolním prostředí a tento rozdíl mezi osmotickými tlaky vnitřního a vnějšího prostředí je vyrovnáván turgorem. Pozitivní turgor je nezbytný pro růst buňky a pro buňku je tedy životně důležité udržovat jeho hodnotu víceméně konstantní po celý buněčný cyklus. Hodnota turgoru u gram-negativních bakterií je 0,3 - 10 MPa, zatímco u gram-pozitivních bakterií 20 MPa. To souvisí s rozdílnými vlastnostmi buněčných stěn gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, jež jsou dány jejich odlišnou stavbou . (Whatmore a Reed 1990; Kempf a Bremer 1998)

2.2 Osmotický šok

Bakterie žijí ve velmi proměnlivém prostředí a musí být proto schopny vyrovnávat se s různými změnami tohoto prostředí. K nim samozřejmě patří i změny osmolality a s tím související změny dostupnosti vody. Změny osmolality vnějšího prostředí způsobují pohyb vody po osmotickém gradientu. Při zvýšení extracelulární osmolality dochází k toku vody ven z buňky, a tím i k poklesu buněčného turgoru. U gram-negativních bakterií může dojít až k plazmolýzi, neboli oddělení cytoplazmatické membrány od buněčné stěny, a dalšímu poklesu buněčného objemu. U gram-pozitivních bakterií toto možné není a konečný objem cytoplazmy je určen pevností buněčné stěny. (Whatmore a Reed 1990)

Naopak při snížení extracelulární osmolality dochází ke vtoku vody do buňky a objem buňky se zvětší. Při překročení maximální hodnoty vnitřního tlaku (cca 10 MPa), který je buňka schopna snést, dochází k prasknutí buňky a tedy plazmoptýze. (Csonka a Hanson 1991)

2.3 Adaptace na hyperosmotický šok

Jak již bylo uvedeno, při zvýšení osmolality prostředí dochází k toku vody ven z buňky, což vede k dehydrataci, a v případě, že buňka není schopna rychlé adaptační odpovědi, i k smrti buňky. Bakterie vyvinuly dvě základní strategie jak se vyrovnat se změnami osmolality a s tím souvisejícími změnami turgoru. První z nich je strategie označovaná jako „sůl v cytoplazmě“. Ta je založena na tom, že buňka upravuje koncentrace anorganických iontů - především K^+ a Cl^- - v cytoplazmě tak, aby vnitřní a vnější koncentrace solí byly vyrovnány. Tato strategie je běžná především u extrémně halofilních bakteriálních druhů. (Galinsky a Truper 1994)

Většina bakterií však jako reakci na hyperosmotický šok využívá druhou strategii založenou nejprve na příjmu draselných iontů, které jsou následně nahrazeny kompatibilními osmolyty. Jako kompatibilní osmolyty jsou označovány malé, vysoce rozpustné organické molekuly, které zvyšují růstovou rychlost bakterií v prostředí s vysokou osmolalitou, a zároveň narozdíl od draselných iontů neinterferují s centrálním buněčným metabolismem. (Brown 1976; Arakawa a Timasheff 1985).

V následující části této kapitoly budou stručně popsány a shrnuty fáze osmoadaptace u zástupce gram-negativních bakterií *Escherichia coli* a zástupce gram-pozitivních bakterií *Bacillus subtilis*.

2.3.1 První fáze osmoadaptace – transport draselných iontů

Bakterie obecně mají velké množství transportních systémů draselných iontů, jež mohou být transportovány specifickými systémy či mechanismem symportního nebo antiportního transportu. Transportní systémy pak mohou být nízko-afinní či vysoko-afinní. Možnost využít více systémů s různou afinitou a kapacitou přenosu pak buňce umožňuje reagovat na případné změny prostředí adekvátním, maximálně ekonomickým způsobem.

2.3.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli využívá k transportu draselných iontů tři typy transportérů – Kup, Trk a Kdp. Nízko-afinní systém Kup je exprimován konstitutivně a jeho exprese není ovlivněna zvýšením osmolality prostředí. Naopak exprese a/či aktivita systémů Trk a Kdp jsou změnami osmolality prostředí ovlivněny. (Stupme et al. 1996)

Trk systém je nízko-afinním transportním systémem, který je aktivní v prostředích s koncentrací draselných iontů vyšší než 1mM. Proteiny tvořící systém jsou kódovány čtyřmi geny – *trkA*, *trkG/trkH* a *trkE*. Funkční systém je tvořen integrálním proteinem TrkH/TrkG a periferním proteinem TrkA. Systém TrkH se od systému TrkG liší pouze hodnotami parametrů K_m a V_{max} . Afinitu Trk komplexu k iontům zvyšuje protein TrkE. Pro translokaci draselných iontů je nutný membránový potenciál i přítomnost ATP, které pravděpodobně plní regulační funkci. (Schlösser et al. 1995; Wood 1999)

Multi-podjednotkový vysoko-afinní transportní systém Kdp s hodnotou K_m 2 μ M je tvořen čtyřmi proteiny: podjednotka KdpA je velmi hydrofobní a zajišťuje vazbu a samotnou translokaci draselných iontů, podjednotka KdpB představuje katalytickou složku komplexu a obsahuje acylfosforylační místo, podjednotka KdpC zajišťuje strukturní a funkční spojení celého komplexu a podjednotka KdpF plní stabilizační funkci. (Altendorf a Epstein 1996; Altendorf et al. 1998; Gassel et al. 1998) Operon kódující tyto strukturní proteiny je indukován při zvýšení osmolality. Exprese je řízena dvou-složkovým systémem KdpD-KdpE, kde KdpD je senzorová kináza předávající po aktivaci fosfátovou skupinu na transkripční regulátor KdpE, který působí jako transkripční aktivátor operonu *kdpFABCDE*. (Jung et al. 1997) Více v kapitole 2.4.1.1.1.

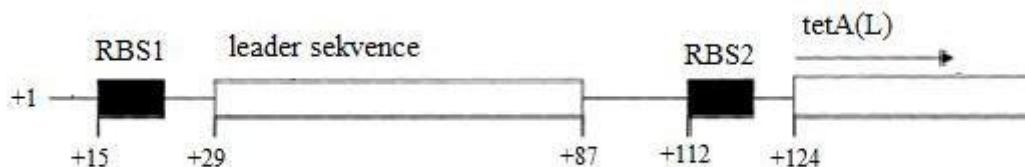
2.3.1.2 *Bacillus subtilis*

Transportní systémy draselných iontů u *Bacillus subtilis* jsou mnohem méně prozkoumány a popsány než je tomu v případě *Escherichia coli*. Prozatím byly identifikovány transportní systémy draselných iontů KtrAB a KtrCD. Taktéž byla biochemicky prokázána přítomnost ATPázy P-typu a přítomnost tetracyklinového efluxního protieny TetA(L) schopného transportovat draselné ionty.

Transportní systém Ktr typu byl identifikován nejprve u bakterie *Vibrio alginolyticus*. Tento systém je složen z integrálního proteinu KtrB a periferního proteinu KtrA. (Nakamura et al. 1998). Obdobný systém byl později objeven i u *Bacillus subtilis*, jehož chromozom obsahuje geny *ktrA* a *ktrC* (homologní ke genu *ktrA* *Vibrio alginolyticus*) a geny *ktrB* a *ktrD* (homologní ke genu *ktrB* *Vibrio alginolyticus*). (Holtmann et al. 2003) Integrální protein KtrB (KtrD) zajišťuje přenos draselných iontů přes membránu a periferně vázaný cytoplazmatický protein KtrA (KtrC) ovlivňuje aktivitu transportní podjednotky. Obě složky systému jsou nezbytné pro funkci transportéru. Systémy KtrAB a KtrCD se liší afinitou k draselným iontům. Systém KtrAB vykazuje střední afinitu s hodnotou K_m 1mM, zatímco systém KtrCD je nízko-afinní s hodnotou K_m 10 mM. Kmeny defektní v obou transportních systémech vykazují jen velmi nízkou aktivitu v příjmu draselných iontů, což dokazuje, že tyto systémy plní úlohu hlavních transportních systému draselných iontů u *Bacillus subtilis*. Geny jsou přepisovány konstitutivně a nejsou ovlivněny změnami osmolality prostředí. (Holtman et al. 2003)

Chromozomální gen *tetA(L)* kóduje efluxní protein poskytující svému nositeli rezistenci k tetracyklinu. Protein TetA(L) je multifunkčním tetracyklin-kov/ H^+ antiportérem, který je však schopen katalyzovat i přenos monovalentních kationtů. Monovalentními kationty mohou být sodné či draselné ionty. Systém je schopen přenosu tetracyklin-kov/ K^+ či Na^+/K^+ . (Guffanti et al. 1995; Cheng et al. 1996; Guffanti et al. 1998; Jin et al. 2002) Protein TetA(L) tak zajišťuje nejen rezistenci k tetracyklinu, ale plní i velmi podstatnou roli v Na^+ rezistenci při zvyšujícím se pH, v udržení homeostáze a v příjmu draselných iontů. (Cheng et al. 1996; Krulwich et al. 2001)

Je prokázána indukce exprese TetA(L) v přítomnosti tetracyklinu. V práci Stasinopoulose a spoluautorů bylo prokázáno, že hlavní podíl na indukci způsobené tetracyklinem má translační a nikoli transkripční mechanismus regulace. *tetA(L)*-mRNA obsahuje dvě ribozom-vazebné sekvence (RBS) a leader sekvenci. RBS1 předchází leader sekvenci, zatímco RBS2 je umístěna za leader sekvencí v těsné blízkosti před kódující sekvencí *tetA(L)* (Obr. 1). (Stasinopoulose et al. 1998)



Obr. 1 Schematické zobrazení leader oblasti *tetA(L)*-mRNA

Znázorněny jsou obě ribozom-vazebné sekvence (RBS1 a RBS2), mezi nimi leader sekvence *tetA(L)*-mRNA a začátek kódující sekvence *tetA(L)* za RBS2.

Převzato a upraveno z Stasinopoulos et al. 1998

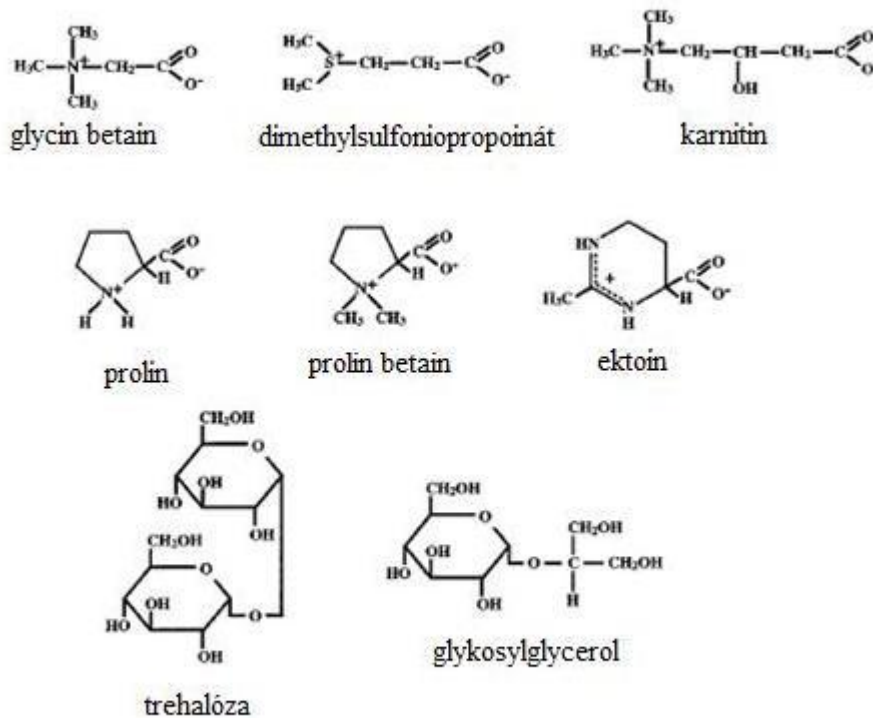
Původní dva modely regulace, z nichž jeden byl založen na klasické translační atenuaci a druhý předpokládal vytvoření sekundární struktury zasahující do oblasti RBS2 a negativně regulující translaci v neindukovaných buňkách, byly v práci Stasinopoulose a spolupracovníků vyvráceny. V této práci byl autory navržen model tzv. translační re-iniciace. Dle tohoto modelu je indukce tetracyklinem zprostředkována mechanismem „přeskoku“ ribozomu asociovaného s leader sekvencí na iniciační kodon kódující sekvence *tetA(L)*. (Stasinopoulose et al. 1998)

Práce Lodatové a spolupracovníků zaměřená na objasnění regulace genu *tet* neseného na plasmidu pBC16 však předkládá model regulace, který představuje určitou variaci modelu klasické translační atenuace. Podle tohoto modelu translace leader sekvence vede k vytvoření stabilní sekundární struktury na mRNA, což vede k expozici ribozom-vazebného místa kódující sekvence. Autoři předpokládají platnost tohoto regulačního modelu i u dalších *tet* genů, včetně chromozomálního genu *tetA(L)*, neboť jejich výsledky zpochybňují platnost modelu translační reiniciace. (Lodato et al. 2006) Objasnění přesného mechanismu regulace exprese genu *tetA(L)* tak vyžaduje ještě další výzkum.

2.3.2 Druhá fáze osmoadaptace –transport/syntéza kompatibilních solutů

Jak je uvedeno výše (Kap. 1.3 – úvodní část) představují kompatibilní osmolyty organické, vysoce rozpustné látky akumulované bakteriemi při hyperosmotickém šoku. Spektrum takto využívaných látek je relativně limitované na několik typů sloučenin, k nimž patří především cukry (např. trehalóza), polyalkoholy (např. glycerol), volné aminokyseliny a jejich deriváty (např. prolin) či kvartérní aminy (glycin betain) – viz Obr. 2. (Kempf a Bremer 1998)

Tyto látky mohou být akumulovány buňkami ve vysokých koncentracích, neboť neinterferují s buněčným metabolismem. Bylo prokázáno, že přispívají ke stabilizaci makromolekul i při působení jiných typů stresů než je osmotický stres – např. prolin a glycin betain stabilizují proteiny i při opakovaných cyklech zmrazení a rozmrazení buněk, threhalóza zvyšuje toleranci buněk *Escherichia coli* k vysychání apod. Efekt těchto látek při stresových podmínkách je tak spíše důsledkem jejich obecných stabilizačních vlastností než specifickou adaptací na osmotický stres. Pojem osmolyt či osmoprotektant tak není zcela přesný a proto je přednostněován termín kompatibilní solut/y. (Roessler a Müller 2001)



Obr. 2 Struktura vybraných kompatibilních solutů

Převzato a upraveno z Kempf a Bremer 1998

2.3.2.1 *Escherichia coli*

V druhé fázi adaptace na hyperosmotický stres dochází k nahrazení draselných iontů kompatibilními soluty. U *Escherichia coli* procházejí tyto molekuly do periplazmatického prostoru pasivní difúzí nescifickými kanály OmpC a OmpF. Transportními systémy v cytoplazmatické membráně jsou pak systémy ProP, ProU a BetT.

ProP je jednosložkový H⁺-symportér zajišťující příjem širokého spektra kompatibilních solutů vykazujících strukturní podobnost s prolinem a glycine betainem, a zároveň umožňuje i transport ektoinu. Transkripce genu *proP* je řízena ze dvou promotorů, přičemž oba jsou aktivovány při hyperosmotickém stresu. Zároveň bylo prokázáno, že dochází i ke zvýšení aktivity již přítomného transportéru ProP, což naznačuje, že plní vedle transportní funkce i funkci osmosenzoru (Kempf a Bremer 1998; Racher et al. 1999; Culham et al. 2008).

ProU je transportní systém náležející k tzv. ABC rodině transportérů a sestává z membránově-vázané ATPázy ProV, integrálního membránového proteinu ProW a substrát-vazebného periplazmatického proteinu ProX. Systém opět vykazuje schopnost přenosu širokého spektra kompatibilních solutů. Vysokou afinitu má především ke glycine betainu a prolin betainu.

Transkripce genu *proU* se zvyšuje po hyperosmotickém šoku a je udržována na vysoké úrovni po dobu trvání osmotického stresu. (Kempf a Bremer 1998)

Transportní systém BetT zajišťuje import cholinu sloužícího jako prekurzor pro syntézu glycin betainu, není-li tento solut přítomen v prostředí/médiu. Systém je regulován různými vlivy prostředí jako je osmolalita, přítomnost cholinu či obsah kyslíku v médiu. (Kempf a Bremer 1998)

V případě, že *Escherichia coli* roste na minerálním médiu/chudém prostředí a nemá možnost transportovat kompatibilní soluty, je aktivována syntéza trehalózy jako hlavního endogenního kompatibilního solutu. Akumulace trehalózy zajišťuje buňce dostatečnou ochranu při růstu na médiích s koncentrací NaCl do hodnoty 0,5M. (Strom a Kaasen 1993)

2.3.2.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis po vystavení hyperosmotickému stresu akumuluje celou řadu kompatibilních solutů, k nimž patří především prolin vylučovaný do prostředí rostlinami, dále glycin betain, ektoin, karnitin či prolin betain. Využíváno je několik transportních systémů – OpuA, OpuC, OpuD a OpuE.

Prolin je v buňkách akumulován jak pomocí transportu, tak de novo syntézou. K transportu prolinu je využíván vysoko-afinní transportér OpuE. Jedná se o jednosložkový Na⁺ symportér. Expresi genu *opuE* je řízena ze dvou promotorů. Promotor P1 je rozeznáván hlavním vegetativním sigma faktorem σ^A a promotor P2 alternativním sigma faktorem σ^B , který řídí expresi genů obecné stresové odpovědi (viz. Kap 2.4.2.1). Expresi z promotoru P2 je aktivována téměř okamžitě po osmotickém stresu, zatímco exprese z promotoru P1 je využívána při dlouhodobém zvýšení osmolality prostředí. Ke zvýšení aktivity proteinu OpuE po osmotickém stresu nedochází a reakce na hyperosmotický stres je tak dána výhradně zvýšením transkripce. (von Blohn et al. 1997; Spiegelhalter a Bremer 1998)

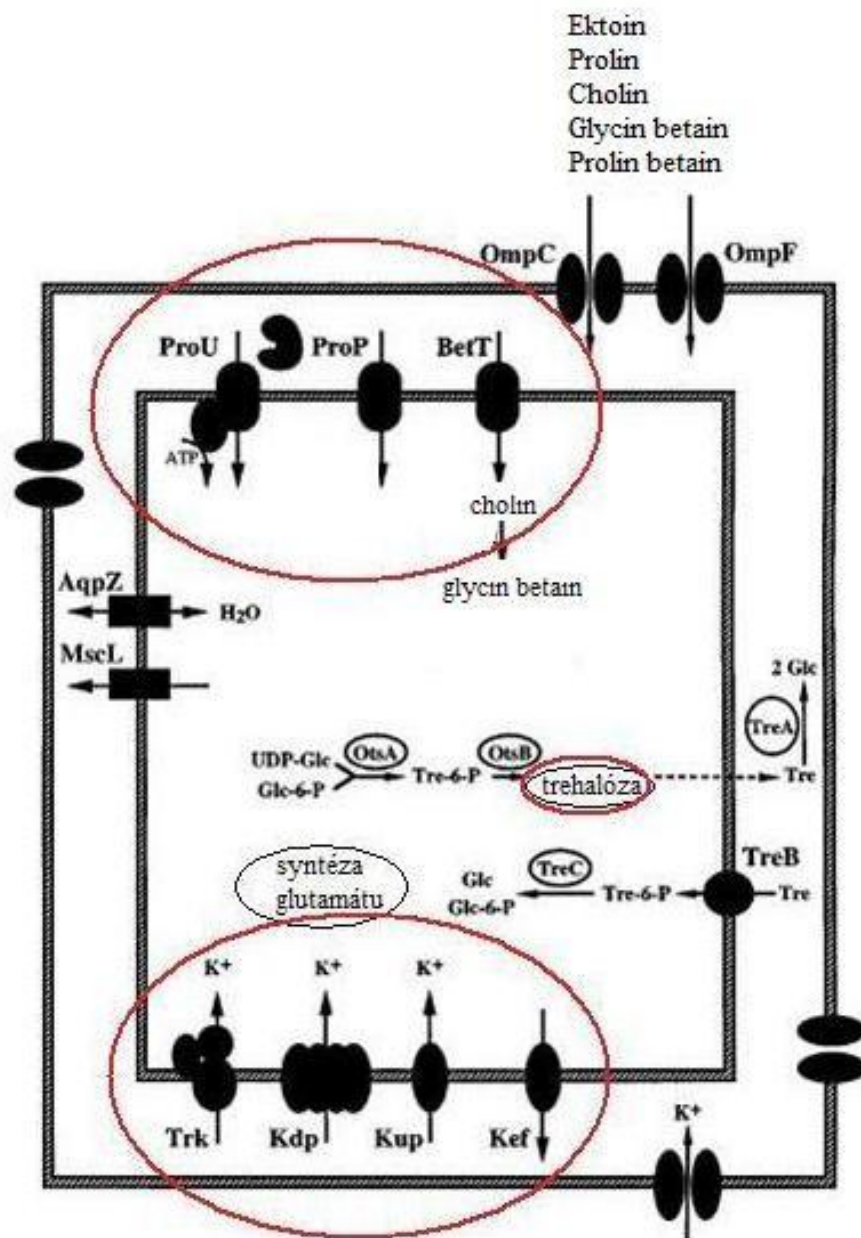
Transportní systémy OpuA a OpuC náležejí k rodině ABC transportérů a spolu se sekundárním jedno-složkový transportním systémem OpuD se podílejí na transportu glycin betainu. Všechny tyto transportní systémy jsou ovlivňovány osmolalitou prostředí a vykazují vysokou afinitu k uvedenému solutu, což umožňuje jeho efektivní transport i v případě, že je v prostředí ve velmi nízké koncentraci. To, čím se tyto systémy odlišují, je především kapacita přenosu glycin betainu.

Navíc jsou systémy OpuA, OpuC i OpuD schopny transportovat i další kompatibilní soluty, a to s různou afinitou i kapacitou, např. OpuC zajišťuje i přenos ektoinu, OpuA, C i D přenášejí analogy glycin betainu obsahující síru, 3-methylsupfopropionát aj. (Kempf a Bremer 1995; Lin a Hansen 1995; Kappes et al. 1996; Kempf et al. 1997)

Kromě transportu využívá *Bacillus subtilis* i možnost syntézy kompatibilních solutů de novo, a to především prolinu a glycin betainu. Je-li v prostředí přítomen cholin, transportují jej buňky do cytoplazmy a následně využívají jako prekurzor k syntéze glycin betainu. Cholin je

postupně oxidován na aldehyd glycin betainu a následně glycin betain produkty genů *gbsAB*, jejichž transkripce je indukována přítomností cholinu v médiu, nikoli však osmotickým stresem. Cholin může být do buněk transportován ABC transportním systémem OpuC, ale využíván je především transportér OpuB vykazující vysokou substrátovou specifitu k cholinu. (Boch et al. 1994; Kempf a Bremer 1998; Steil et al. 2003)

Schematické zobrazení transportních systémů podílejících se na osmoadaptaci *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* jsou na Obr. 3 a 4.



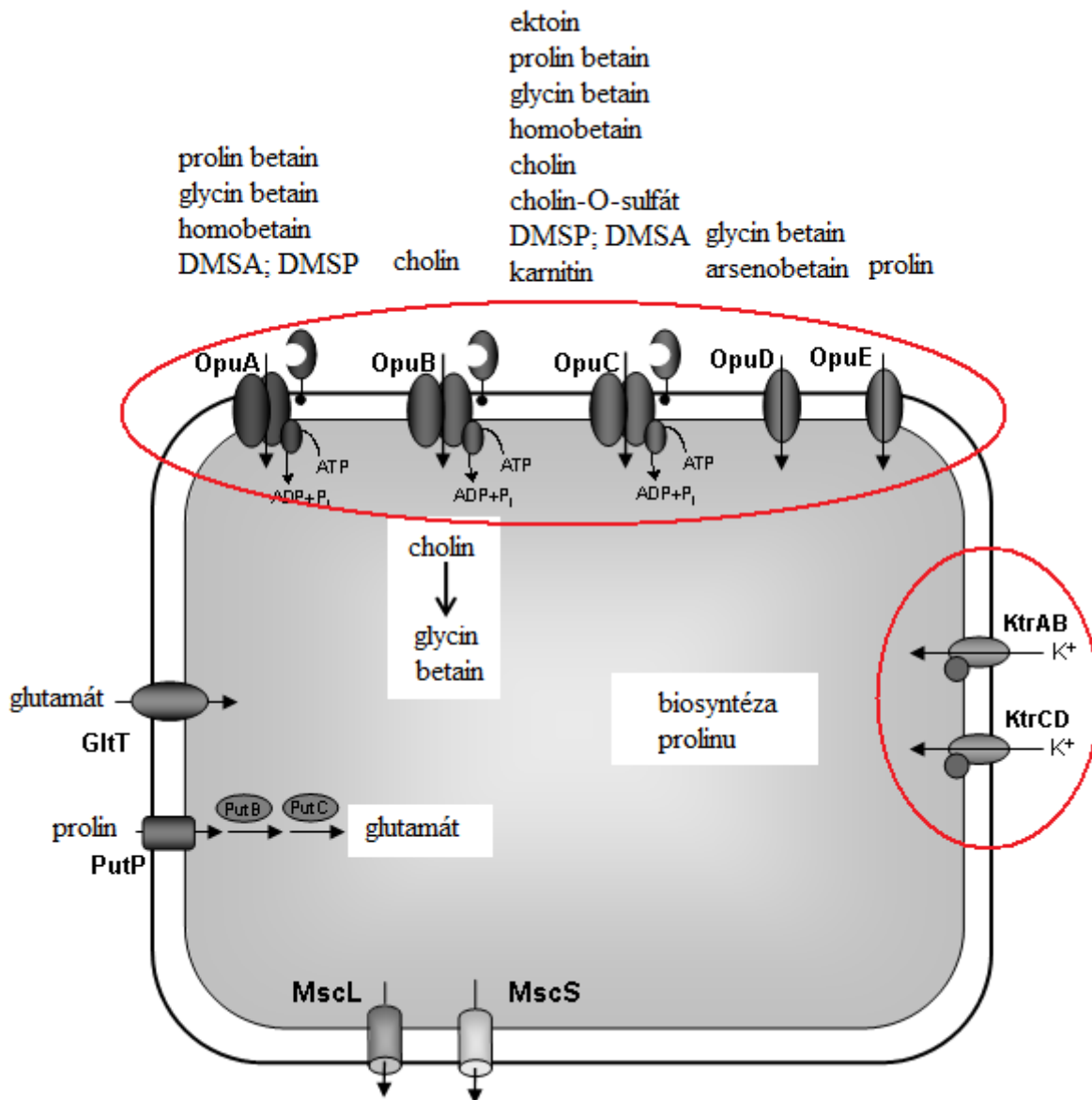
Obr. 3 Schematické znázornění mechanismů osmoadaptace *Escherichia coli*

Transport draselných iontů – Trk, Kdp, Kup (dolní část)

Transport kompatibilních solutů – OmpC, OmpF, ProP, Pro, BetT (horní část)

Syntéza trehalózy (uprostřed)

Převzato a upraveno z Kempf a Bremer 1998



Obr. 4 Schematické znázornění mechanismů osmoadaptace *Bacillus subtilis*

Transport draselných iontů – KtrAB, KtrCD (pravá část)

Transport kompatibilních solutů – OpuE, A, B, C, D (horní část)

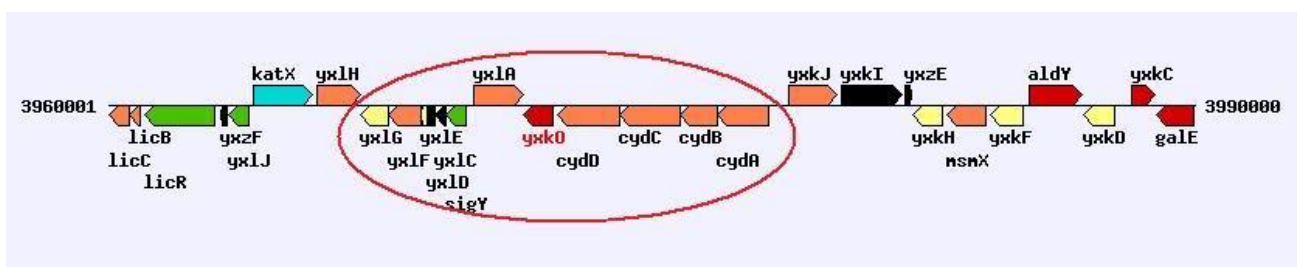
Syntéza kompatibilních solutů – prolin, glycin betain (uprostřed)

Převzato a upraveno z <http://www.uni-marburg.de/fb17/fachgebiete/mikrobio/molmibi/forschung>

2.3.3 Protein YxkO u *Bacillus subtilis*

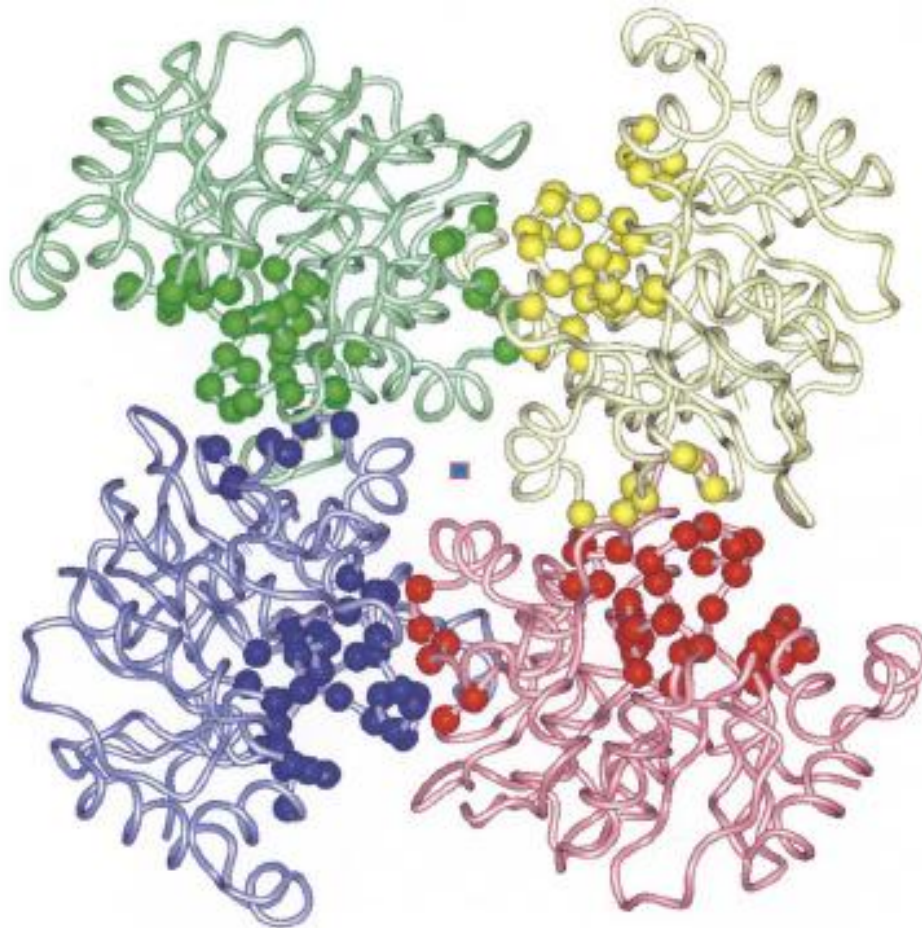
Jak z výše uvedeného vyplývá (viz. Kap. 2.3.1.2), nebyl u *Bacillus subtilis* prozatím identifikován žádný vysoko-afinní transportní systém draselných iontů, jakým je Kdp ATPáza u *Escherichia coli*. Biochemicky byla prokázána přítomnost ATPázy P-typu, která je indukovatelná draselnými ionty, a účastní se odpovědi na osmotický stres. Zároveň nebyla prokázána stimulace této ATPázy jinými monovalentními ionty. Nebyl však identifikován žádný gen či operon homologní s Kdp ATPázou *Escherichia coli*. (Šebestián et al. 2001). Snaha identifikovat gen kódující tuto ATPázu s využitím nespécifické mutagenze vedla k izolaci mutantního kmene označeného L-42. Tento kmen s inzercí transpozonu v genu *yxkO* vykazuje sníženou životaschopnost a růstovou rychlost na médiu s nízkou koncentrací draselných iontů (< 1mmol/l) v nepřítomnosti dalších osmolytů, což by mohlo naznačovat jeho zapojení v počáteční fázi osmoadaptace (Ulanova et al. 2007). Průběžné výsledky 2D-elektroforéz navíc naznačují vliv mutace v genu *yxkO* na expresi flagelinu při srovnání mutantního a divokého kmene. (Lichá, nepublikovaná data) Flagelin je majoritním proteinem vlákna bakteriálního bičíku a změny jeho exprese mohou ovlivnit celkovou motilitu buněk.

Gen *yxkO* je umístěn v *sigY* – *cydD* intergenové oblasti chromozomu *Bacillus subtilis* (Obr. 5). Jedná se o monocistronní gen kódující hypotetický protein neznámé funkce. Prozatím bylo identifikováno 69 homologních proteinů u prokaryot, archae i eukaryot, včetně člověka. Protein YxkO *Bacillus subtilis* vykazuje strukturní homologii s členy rodiny sacharidových kináz ribokinázového typu. Produktem genu je polypeptidický řetězec tvořený 276 aminokyselinami, který představuje monomerní podjednotku homotetramerního proteinového komplexu YxkO (Obr. 6). (Zhang et al. 2002)



Obr. 5 Umístění genu *yxkO* a jeho okolí v chromozomu *Bacillus subtilis*

Převzato z <http://bacillus.genome.jp/>



Obr. 6 Kvartérní struktura tetrameru YxkO

Převzato ze Zhang et al. 2002

Všechny prozatím identifikované strukturní homology proteinu YxkO jsou členy již zmiňované rodiny sacharidových kináz ribokinázového typu a funkcí těchto proteinů (byla-li zjištěna) je fosforylace substrátů obsahujících hydroxymethylovou skupinu. Tyto proteiny pro svou funkci vyžadují hořčnaté ionty a ATP (ADP). Při strukturní analýze proteinu YxkO bylo identifikováno pravděpodobné ATP-vazebné místo i kov-vazebné místo. Přestože nebyl identifikován navázaný iont Mg^{2+} je pravděpodobné, že právě tento iont interaguje s ATP, tak jak je tomu u dalších kináz této rodiny. Specifický substrát tohoto proteinu prozatím nebyl identifikován. (Zhang et al. 2002).

Objasnění funkce proteinu YxkO a jeho možné zapojení v osmoadaptaci jsou předmět studia naší laboratoře.

2.4 Osmoregulace

Aby buňka mohla adekvátně reagovat na měnící se podmínky prostředí, musí mít systémy/mechanismy umožňující jí detekovat a vyhodnotit vnější/vnitřní signály a následně spustit příslušnou buněčnou odpověď. Stejně tak tomu je i v případě sledování změn osmolality prostředí. Regulační mechanismy jsou různé u různých mikroorganismů a v této kapitole budou stručně popsány a srovnány známé signály a regulační mechanismy osmoadaptace *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*.

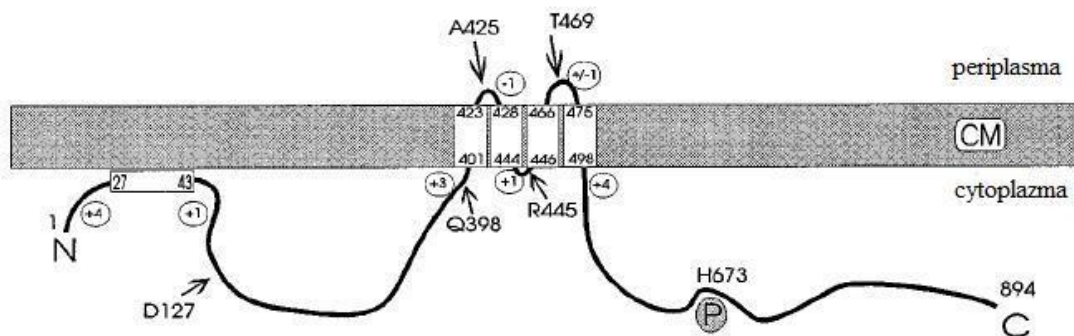
2.4.1 Regulační mechanismy osmoadaptace *Escherichia coli*

2.4.1.1 Transport draselných iontů

2.4.1.1.1 Vysoko-afinní transportní systém Kdp

Transportní systém Kdp je indukován při osmotickém stresu či poklesu koncentrace draselných iontů na hodnoty limitní pro růst buňky. Exprese operonu *kdpFABCDE* je regulována produkty dvou posledních genů operonu *kdpDE*. Produkty těchto genů jsou sensorová histidin-kináza KdpD a příslušný regulační protein KdpE. Při aktivaci kinázy dochází k autofosforylaci jejího histidového zbytku a následnému předání fosfátové skupiny na aspartátový zbytek transkripčního regulátoru KdpE. Fosforylovaný regulační protein KdpE následně aktivuje transkripci operonu *kdpFABCDE*.

C-terminální doména kinázy KdpD je nositelem kinázové a fosfotransferázové aktivity a tato část proteinu je vysoce konzervovaná. Naopak N-terminální doména, označovaná také jako vstupní doména, nesdílí homologii s žádnou dosud známou sensorovou kinázou. Tato vstupní doména je neobvykle velká a zahrnuje N-terminální konec proteinu, dále čtyři helixy procházející cytoplazmatickou membránou a následující arginin-bohatý úsek. C- i N- koncové části proteinu jsou umístěny v cytoplazmě (Obr. 7). (Walderhaug et al. 1992; Zimmann et al. 1995)



Obr. 7 Topologie senzoroové kinázy KdpD

Převzato a upraveno z Zimmann et al. 1995

Podnět aktivující kinázu KdpD zůstává doposud nejasný. Laiminis a spoluautoři navrhli hypotézu, podle které kináza detekuje jako signál zvýšení osmolality změny pnutí cytoplazmatické membrány jako důsledek poklesu turgoru. (Laiminis et al. 1981) Další práce dále poukazovaly na významné zapojení čtvrtého transmembránového segmentu kinázy a N-terminálního konce proteinu v detekci signálu. To vedlo k hypotéze, že KdpD detekuje dva či dokonce více signálů - intracelulární koncentraci draselných iontů, pokles turgoru a/či celkové iontové „poměry“ v buňce. Vznikl tak model, podle kterého se draselné ionty váží na cytoplazmatické domény KdpD a inhibují autofosforylační aktivitu proteinu. Při nedostatku draslíku v prostředí klesá i jeho intracelulární koncentrace a dochází ke zrušení inhibice kinázy. Pokles koncentrace draslíku či hyperosmotický stres navíc vedou ke ztrátě vody a následnému zvýšení iontové síly, což vede k aktivaci autofosforylace KdpD. Zároveň však bylo zjištěno, že i mutantní kmeny se ztrátou citlivosti k draselným iontům jsou schopny reagovat na hyperosmotický stres, což potvrzuje předpoklad, že kináza prozatím nezjištěným způsobem detekuje i fyzicko-chemický stav cytoplazmatické membrány. (Jung et al. 2000; Rothenbücher et al. 2006; Zimmann et al., 2007). Rozdílný vliv osmotického stresu a poklesu koncentrace draselných iontů na expresi operonu *kdp* byl sledován v práci Hamanna a spoluautorů. Bylo tak dokázáno, že při osmotickém stresu dochází ke snížení objemu buňky a zároveň nižší úrovni transkripce operonu *kdp* ve srovnání s úrovní transkripce tohoto operonu při poklesu koncentrace draselných iontů, kdy zároveň nedochází ke změnám objemu buňky. To naznačuje, že změny turgoru nepředstavují signál aktivující kinázu. Autoři předkládají hypotézu, že kináza reaguje na změny vkládání mastných kyselin, resp. fosfolipidů, do membrány jako důsledek poklesu aktivity příslušných enzymů při snížení koncentrace draselných iontů. (Hamann et al. 2008)

2.4.1.1.2 Transportní systém Trk

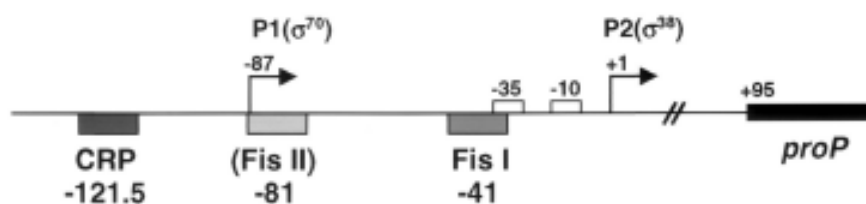
Aktivita transportního systému Trk se zvyšuje při hyperosmotickém šoku a předpokládá se regulační role intracelulární osmolality. Avšak rozlišit intracelulární osmolalitu a intracelulární koncentraci draselných iontů během pokusu lze jen těžko. Okamžitá aktivace

systemu při hyperosmotickém stresu a závislost akumulace draselných iontů na velikosti změny osmolality vedou k předpokladu, že systém je pod kontrolou turgoru, resp. jeho změn. (Poolman a Glaasker 1998)

2.4.1.2 Transport kompatibilních solutů

2.4.1.2.1 Transportní systém ProP

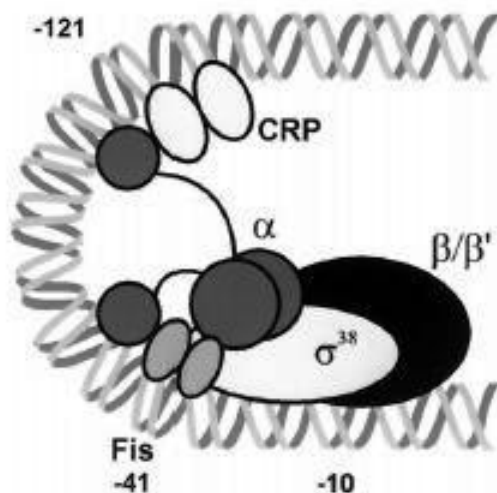
Transport zajišťovaný systémem ProP je velmi silně posílen při růstu za zvýšené osmolality. Dochází jak k zvýšení frekvence transkripce genu *proP*, tak i k aktivaci již přítomných molekul proteinu. Transkripce genu je řízena ze dvou promotorů (Obr. 8). Promotor P1 je zodpovědný za velmi nízkou bazální expresi genu během růstu za fyziologické osmolality, neboť transkripce je za těchto podmínek reprimována vazbou cAMP-CRP komplexu. K velmi významnému nárůstu iniciace transkripce z tohoto promotoru dochází přibližně 5 minut po hyperosmotickém šoku, kdy dochází k uvolnění vazby CRP-DNA. Zvýšení exprese z tohoto promotoru trvá přibližně 15 minut. Možným mechanismem vlivu zvýšené osmolality na derepresi transkripce genu *proP* je snížená schopnost interakce mezi cAMP a CRP za zvýšené osmolality. (Mellies et al. 1995; Xu a Johnson 1995; Xu a Johnson 1997; Landis et al. 1999) Transkripce z promotoru P2 je aktivována alternativním sigma faktorem σ^S při přechodu z exponenciální do stacionární fáze růstu. Zároveň s tímto „stresovým“ sigma faktorem je exprese koaktivována DNA-vazebným proteinem Fis, který interaguje s α -C-terminální doménou RNA polymerázy, a CRP proteinem, jehož vazba upstream od P2 promotoru posiluje transkripci genu *proP* z P2 promotoru. (Obr. 9) Exprese tohoto genu je tak regulována jak osmolalitou prostředí, tak růstovou fází. (Xu a Johnson 1995; McLeod et al. 2000)



Obr. 8 Schematické zobrazení regulační oblasti genu *proP*

Dvě Fis-vazebná místa jsou umístěna v oblasti -41 a -81 upstream od začátku transkripce z P2 promotoru. CRP- vazebné místo je lokalizováno v oblasti -121 upstream od začátku transkripce z P2 promotoru. Exprese z P2 promotoru je plně závislá na σ^S faktoru, zatímco transkripce z promotoru P1 je řízena vegetativní sigma faktorem σ^{70} .

Převzato z McLeod et al. 2000



Obr. 9 Model koaktivace transkripce genu *proP* z P2 promotoru

DNA je znázorněna dvoušroubovicí, CRP protein se váže v oblasti -121 upstream od P2 promotoru a interaguje s α -C-terminální doménou RNA polymerázy. Protein Fis aktivuje transkripci poté, co se naváže do vazebného místa I v -41 oblasti upstream od P2 promotoru a interaguje s druhou α -C-terminální doménou RNA polymerázy.

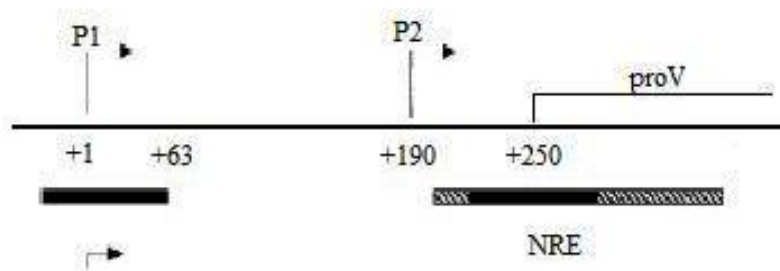
Převzato z McLeod et al. 2000

Systém ProP plní zároveň i funkci osmosenzoru. Po zvýšení osmolality prostředí dochází k stimulaci transportní funkce systému. Citlivost vůči změnám osmolality zajišťuje C-terminální doména tohoto proteinu, neboť bylo prokázáno, že její zkrácení vede k významné redukci transportní aktivity. Tato doména tvoří α -helikální coiled-coil strukturu, která umožňuje dimerizaci proteinů ProP. (Culham et al. 2000) Dále je prokázáno i zapojení periplazmatické smyčky v detekci změn osmolality (Culham et al. 2008). Aktivace transportního systému se účastní i produkt genu *proQ*, což je cytoplazmatický protein s vysoce bazickou N-terminální doménou, která interaguje s kyselými oblastmi proteinu ProP. (Kunte et al. 1999; Tsatskis et al. 2005; Wood et al. 2005) Předpokládá se, že při zvýšení osmolality dochází ke zvýšení koncentrace intracelulárních látek, což následně vede ke konformační změně proteinu ProP. To umožní jeho dimerizaci a zvýšení transportní aktivity. Dimer ProP je pak stabilizován proteinem ProQ a celý tento komplex pak představuje nejstabilnější formu transportního systému. (Poolman et al. 2004) Přesný mechanismus, jakým protein ProP detekuje změny osmolality, však stále není objasněn.

2.4.1.2.2 Transportní systém ProU

Transportní systém ProU je tvořen třemi proteiny kódovanými geny *proV*, *proW* a *proX*, jež vytvářejí operon *proU*. Exprese operonu je stimulována zvýšením osmolality prostředí a podle původní hypotézy se na aktivaci transkripce podílejí intracelulární draselné ionty a glutamát akumulující se v buňce v první fázi osmoadaptace. (Ramirez et al. 1989) Další práce však ukazují, že koncentrace těchto molekul není rozhodující, a že pozorovaná závislost exprese operonu *proU* může být pouze odrazem obecného stimulačního efektu draselných iontů, a nikoli specifickou odpovědí na osmotický stres. (Poolman a Glaasker 1998) Co tedy aktivuje transkripci operonu není prozatím zcela objasněno.

Transkripce operonu je řízena ze dvou promotorů. Transkripce z promotoru P1 je mírně zvýšena při osmotickém stresu a je zcela závislá na „stresovém“ sigma faktoru σ^S (stejně jako transkripce z P2 promotoru genu *proP*). Transkripce z promotoru P2 je řízena vegetativním σ^{70} faktorem. Dále byl identifikován DNA motiv, který plní funkci negativního regulačního elementu. Motiv je lokalizován downstream od promotoru P2. Velikost elementu je cca 500 bp a zasahuje do kódující sekvence genu *proV* (Obr. 10).



Obr. 10 Schematické zobrazení promotorové oblasti operonu *proU*

Znázorněny jsou oba promotory – P1 a P2, negativní regulační element (NRE) obsahující vazebné místo pro protein H-NS (černá část elementu) a druhé vazebné místo H-NS upstream od P2 promotoru.

Převzato a upraveno z Rajkumari a Gowrishankar 2001

Bylo prokázáno, že delece negativního regulačního elementu vede k derepresi operonu *proU* i při nízké osmolalitě prostředí. V rámci sekvence tohoto elementu bylo identifikováno H-NS-vazebné místo, ke kterému se tento protein váže s vysokou preferencí a afinitou. Druhé H-NS-vazebné místo bylo navíc identifikováno cca 200bp upstream od promotoru P2. V kmenu s mutací v genu *hns* byla prokázána částečná dereprese operonu *proU*. Bylo dokázáno, že DNA-vazebný protein H-NS zajišťuje inhibici transkripce operonu *proU* za podmínek nízké osmolality prostředí. Zvýšení osmolality vedoucí k akumulaci draselných iontů pak může vést k oslabení DNA-protein interakcí a tím následně k aktivaci transkripce operonu. (Mellies et al. 1994; Poolman a Glaasker 1998; Rajkumari a Gowrishankar 2001)

Zvýšení osmolality prostředí indukuje nejen transkripci operonu *proU*, ale také stimuluje transportní aktivitu ProU systému. Podle autorů Haardta a Bremera je za detekci zvýšení osmolality zodpovědná podjednotka systému ProW, resp. nezvykle dlouhá periplazmatická doména ProW tvořící amfifilní α -helix. Tato doména by mohla detekovat změny membránového pnutí v důsledku osmotického stresu. (Haardt a Bremer 1996) Jiná data však naznačují, že by se mohlo jednat spíše o sledování změn intracelulární osmolality v důsledku zvyšování extracelulární osmolality. (Poolman a Glaasker 1998)

2.4.2 Regulační mechanismy osmoadaptace *Bacillus subtilis*

Detekční a regulační mechanismy osmoadaptace jsou u *Bacillus subtilis* mnohem méně objasněny a popsány než je tomu v případě *Escherichia coli*. Při zhoršení podmínek mohou buňky *Bacillus subtilis* aktivovat extrémní strategii přežití, kterou je sporulace. Během sporulace dochází k formování extrémně odolných, dormantních forem označovaných jako endospory. Bylo však prokázáno, že během zvýšení osmolality prostředí je proces sporulace narušen ve své druhé fázi a k tvorbě endospor nedochází. (Ruzal et al. 1998)

Dále bylo prokázáno, že zvýšení osmolality vede k indukci σ^W regulonu. σ^W je alternativní sigma faktor patřící do tzv. ECF (extracytoplasmatic function) rodiny sigma faktorů. Přesná funkce genů, jejichž expresi tato rodina sigma faktorů řídí, není zcela objasněna. Obecně se však jedná o kontrolu příjmu a sekrece specifických molekul a iontů a dále se účastní odpovědi na různé stresy včetně stresu osmotického. (Petersohn et al. 2001; Steil et al. 2003)

Během hyperosmotického stresu byla také prokázána aktivace dvou-složkového systému DegS-DegU, v němž DegS plní funkci cytoplasmatické sensorové kinázy a DegU regulačního proteinu řídícího expresi příslušných genů. DegU patří k velmi významným centrálním regulátorům buňky a to jak ve fosforylované, tak nefosforylované formě. Reguluje produkci degradačních enzymů, indukci přirozené kompetence či motilitu. (shrnuto v review Murray et al. 2009) Jedná se o jediný prozatím identifikovaný sensorový systém indukovaný během zvýšené osmolality prostředí, což naznačuje jeho zapojení v regulaci osmoadaptace. (Ruzal et al. 1998; Steil et al. 2003)

Studie osmoregulace u *Bacillus subtilis* dále uvádějí velmi významnou roli alternativního transkripčního σ^B faktoru, což je sigma faktor řídící expresi proteinů obecné stresové odpovědi. Podle poměrně nedávno publikované studie Höpera a spoluautorů představuje indukce obecné stresové odpovědi okamžitou odpověď buňky na osmotický stres. (Höper et al. 2006) Z tohoto důvodu je také obecné stresové odpovědi věnována následující kapitola.

2.4.2.1 Obecná stresová odpověď

Obecná stresová odpověď představuje mechanismus, kterým se buňky mohou vyrovnat se změnami podmínek méně extrémním způsobem než jakým je sporulace, a to především za

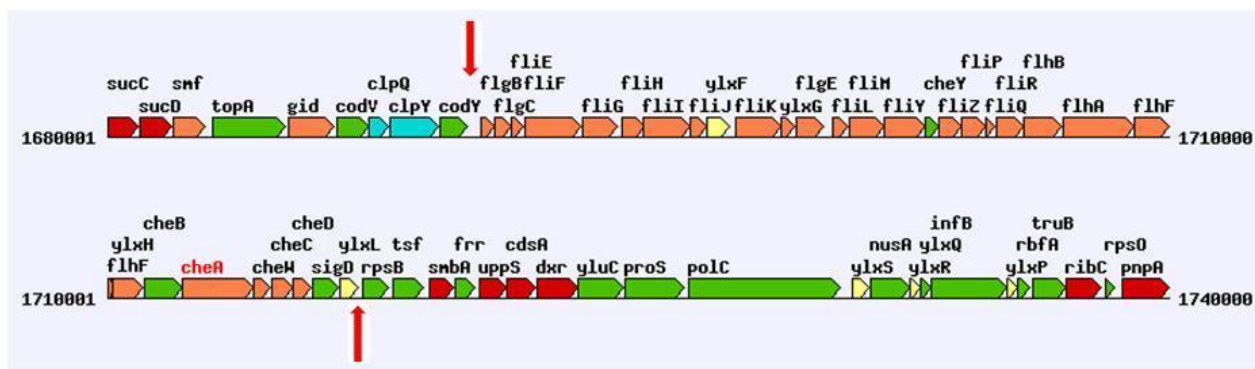
takových podmínek, které sporulaci brání. Dochází k expresi celé sady genů spadajících do tzv. σ^B regulonu, kam patří i operon *sigB* kódující mj. i σ^B transkripční faktor. Regulon je indukován při přechodu z exponenciální do stacionární fáze růstu, ale i během exponenciální fáze růstu při působení tepelného, etanolového, osmotického, oxidačního či kyselého stresu, dále po přidání některých antibiotik či při hladovění na glukózu, fosfát, kyslík či modré světlo. (Boylan et al. 1993; Benson a Haldenwang 1993; Boylan et al. 1993; Gaidenko et al. 2006)

Do σ^B regulonu spadá více jak 150 genů, ale funkce produktů většiny z nich není doposud známa. Mezi proteiny se známou funkcí, jejichž produkce je během obecné stresové odpovědi indukována, patří proteiny rezistence vůči oxidativnímu stresu KatB, KatX, Dps, OhrB a TrxA, dále proteiny účastníci se odpovědi na osmotický stres OpuD a OpuE, proteiny rezistence na teplotní šok ClpC a ClpP, či proteiny BmrU a BmrR poskytující rezistenci vůči antibiotikům. (Bernhardt et al 1997; Hecker a Völker 2001; Petersohn et al. 2001; Steil et al. 2003; Hecker et al. 2007) Obecně lze říci, že geny, jejichž transkripce je indukována jsou geny, jejichž produkty chrání DNA, proteiny a lipidy proti škodlivým účinkům různých stresů a proteiny opravných mechanismů buňky. Obecná stresová odpověď tak buňkám umožňuje vyvinout mnohonásobnou, nespecifickou a preventivní rezistenci. (Hecker et al. 2007)

Během obecné stresové odpovědi však nedochází pouze k indukci adaptačních genů, ale také k represí některých genů aktivního metabolismu. Velkou část reprimovaných genů tvoří geny, jejichž produkty se uplatňují v chemotaxi a motilitě buněk - např. gen *hag* kódující protein flagelin tvořící vlákno bakteriálního bičíku. (Steil et al. 2003; Höper et al. 2006)

2.5 Motilita a exprese genu *hag* u *Bacillus subtilis*

Aktivní pohyb bakterií je uskutečňován pomocí bakteriálního bičíku. V případě enterobakterií jsou geny nezbytné pro chemotaxi a motilitu seskupeny do tří tříd, přičemž poslední třetí třída genů vyžaduje pro svou expresi nejen příslušný sigma faktor, ale také správnou a časově přesnou expresi genů předchozích dvou tříd a správné složení HBB komplexu (háček a bazální tělísko bičíku). U *Bacillus subtilis* jsou hierarchické uspořádání genů a kontrola jejich exprese podobné. Liší se tím, že u *Bacillus subtilis* není přítomen operon odpovídající genům třídy I enterobakterií. Genům třídy II pak odpovídá operon *fla/che* (Obr. 11). Tento operon obsahuje více jak 30 genů kódujících proteiny nezbytné pro chemotaxi, proteiny HBB komplexu a v neposlední řadě protein SigD, označovaný jako σ^D , a fungující jako transkripční aktivátor genů třídy III, resp. genů σ^D -regulon. (Helmann 1991)



Obr. 11 Operon *fla/che* – okolí a umístění operonu v chromozomu *Bacillus subtilis*

Začátek a konec operonu vyznačeny šipkami (začátek – gen *flgB*, konec – gen *ylxL*)

Převzato a upraveno z <http://bacillus.genome.jp/>

Na expresi operonu *fla/che* se podílí minimálně tři promotory (Obr. 12). Upstream od operonu leží dva promotory P_{D-3} a P_A a uvnitř operonu, před genem *sigD*, byl identifikován třetí promotor P_{sigD} . Bylo prokázáno, že majoritní vliv na transkripci operonu má σ^A -závislý promotor P_A . Přesná funkce promotorů P_{D-3} a P_{sigD} není prozatím objasněna, neboť bylo prokázáno, že jejich podíl na expresi operonu či samotného genu *sigD* (v případě promotoru P_{sigD}) je velmi malý, a že i v buňkách s delecí těchto dvou promotorů dochází k normální expresi operonu a není narušena motilita buněk. Navíc byla zjištěna přítomnost proteinu σ^D i v buňkách s delecí všech tří promotorů, což naznačuje přítomnost ještě dalšího promotoru. Předpokládá se, že tento promotor je lokalizován uvnitř operonu a řídí transkripci genu *sigD* za účasti transkripčního faktoru σ^A (Estacio et al. 1998; West et al. 2000)

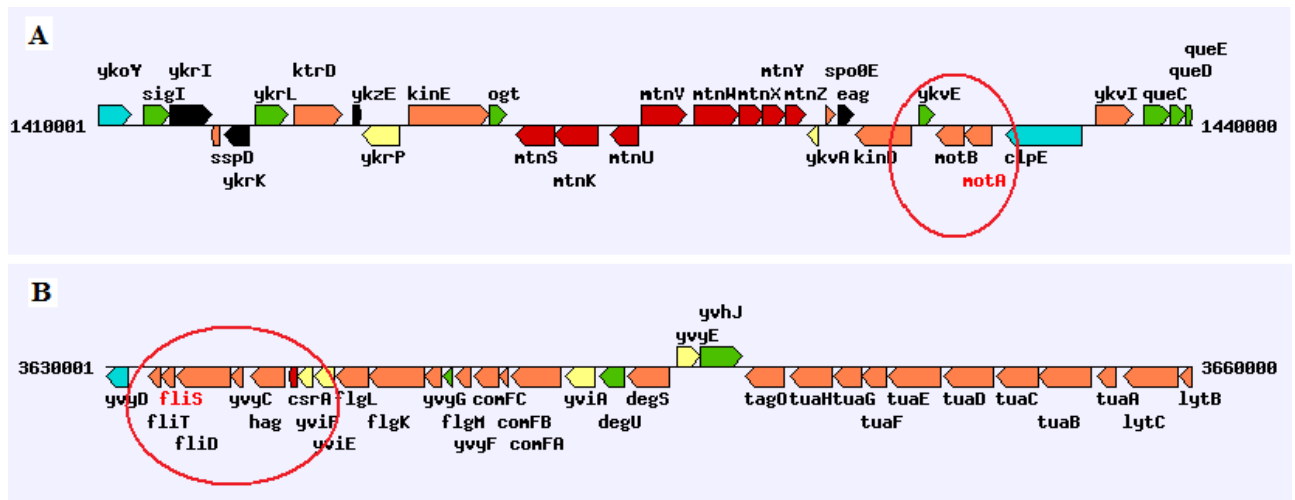


Obr. 12 Schématické znázornění operonu *fla/che*

Operon *fla/che* je znázorněn jako bílý obdélník, gen *sigD* v koncové části operonu je vyznačen černě. Vyznačeny a popsány jsou i příslušné promotory.

Převzato a upraveno z West et al. 2000

Transkripční faktor σ^D kódovaný genem *sigD* pak zodpovídá za expresi σ^D -regulonů. Tento regulon zahrnuje operon *fliDST* kódující proteiny bičičku, geny *motA* a *motB* kódující proteiny motoru bičičku a gen *hag* kódující protein flagelin tvořící až 98% vláknů bičičku (Obr. 13). Produkty dalších genů regulonu se podílejí na produkci autolyzinů. (Mirell a Chamberlin 1989; Mirel et al. 1992; Márquez et al. 1990; Helmann 1991; Chen a Helmann 1994) Pro plnou expresi regulonu je nutný produkt genu *ylxL*, což je poslední gen operonu *fla/che*. Kmeny s mutací tohoto genu vykazují zhoršenou motilitu a sníženou úroveň exprese flagelinu. Předpokládá se proto, že produkt tohoto genu funguje jako transkripční aktivátor spolupůsobící se σ^D -faktorem. (Werhane et al. 2004)



Obr. 13 σ^D -regulon - okolí a umístění příslušných genů v chromozomu *Bacillus subtilis*

A) geny *motA* a *motB*

B) operon *fli*, gen *hag*

Převzato a upraveno z <http://bacillus.genome.jp/>

2.5.1 Regulace motility

Motilita, stejně jako kterýkoli jiný fyziologický stav buňky, je přísně regulována tak, aby výhody plynoucí ze schopnosti pohybu převážily nad náklady nutnými na syntézu příslušných proteinů i samotný pohyb. Motilita buněk představuje odpověď na určité specifické podmínky prostředí, především na podmínky nutriční. Rozvíjí se ke konci exponenciální fáze růstu, kdy živin ubývá, a pro buňku je výhodné dané prostředí opustit a přemístit se do prostředí s výhodnějšími podmínkami pro přežití.

Regulace motility se odehrává jak na úrovni syntézy proteinů chemotaxe a bičičku, tak na úrovni skládání pohybového aparátu.

2.5.1.1 Regulace na transkripční úrovni

Velmi důležitými regulátory transkripce genů motility jsou pleiotropní regulátory CodY a DegU. Regulátor CodY brání předčasné expresi příslušných genů v prostředí bohatém na živiny, kdy není indukce motility nutná, zatímco regulátor DegU zajišťuje inhibici transkripce v prostředích natolik chudých na živiny, že by indukce motility byla energeticky nevýhodná. Za takovýchto podmínek DegU indukuje syntézu degradačních enzymů.

2.5.1.1.1 Nutriční represor genů stacionární fáze CodY

Protein CodY je globální transkripční represor genů pozdní exponenciální a stacionární fáze růstu, jako jsou geny sporulace, motility či kompetence. Homology tohoto proteinu byly identifikovány u mnoha gram-pozitivních bakterií s nízkým obsahem GC párů v chromozomu. Jedná se o regulátor monitorující množství GTP v buňkách jako odraz nutričního stavu buňky. (Ratnayake-Lecamwasam et al. 2001) Aktivní forma represoru CodY vzniká po interakci tohoto represoru s dalšími kofaktory, které výrazně zvyšují afinitu vazby CodY-DNA. Těmito kofaktory jsou cytoplazmatické GTP a větvené aminokyseliny (především isoleucin a valin). (Shiver a Sonnenshein 2004; Hendke et al. 2008) Takto aktivovaný represor se s vysokou afinitou váže k příslušným vazebným místům na DNA a brání předčasné transkripci příslušných genů.

Je dokázáno, že C-terminální doména proteinu zajišťuje vazbu k DNA, zatímco N-terminální doména interaguje s kofaktory. Vazba větvené aminokyseliny vede ke změnám konformace nejen N-terminální, ale i C-terminální domény, což následně vede ke změnám afinity proteinu k DNA. (Joseph et al. 2005; Levдикov et al. 2006) Přesný mechanismus interakce proteinu CodY s GTP ani to, jak tato interakce ovlivňuje afinitu vazby CodY k DNA, nejsou prozatím objasněny. Byly identifikovány tři GTP-vazebné motivy nalézané především u malých GTPáz, ale dosavadní studie zatím neprokázaly žádnou podstatnou změnu konformace proteinu po interakci s GTP. Další možností je interakce GTP s GAF doménou proteinu CodY. Výsledky práce Levdikova a spoluautorů (2009) však naznačují, že GTP neinteraguje ani s GAF doménou proteinu CodY. Objasnění přesného mechanismu interakce GTP s proteinem CodY tak vyžaduje ještě další výzkum. (Levdikov et al. 2006; Hendke et al. 2008; Levдикov et al. 2009)

Není znám ani přesný molekulární mechanismus inhibice transkripce příslušných genů regulátorem CodY, stejně jako sekvence vazebného místa. Belitsky a Sonnenshein využili pro zjištění CodY-vazebné sekvence u *Bacillus subtilis* předpokládanou CodY-vazebnou sekvenci z *Lactococcus lactis*. Na základě microarray analýzy pak určili velké množství genů, jež by mohly být regulovány tímto regulátorem. Přímé cíle regulátoru CodY představuje 67 operonů, ale pouze 25 z nich obsahuje příslušnou předpokládanou vazebnou sekvenci se záměnou pouze na třech a méně místech. (Belitsky a Sonnenshein 2008)

Je dokázáno, že roste-li buňka v prostředí bohatém na živiny a protein CodY tak může interagovat se svými kofaktory přítomnými v dostatečné koncentraci, dochází k negativní regulaci motility, a to represí operonu *fla/che* i genu *hag*. Represor CodY se váže

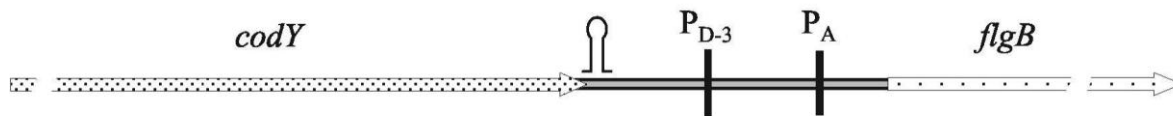
k promotorovým oblastem P_A i P_{D-3} operonu *fla/che* (viz. Kap. 1.5 – úvodní část) a překrývá oblast -10 i -35, čímž brání RNA polymeráze v „nasednutí“ k templátu. Taktéž se tento represor váže downstream od σ^D -závislého promotoru genu *hag*, čímž reprimuje transkripci i tohoto genu. (Bergara et al. 2003)

Při změně nutričních podmínek způsobené např. vyčerpáním živin ke konci exponenciální fáze růstu klesá hladina GTP v buňkách. Vazba CodY k DNA je uvolněna a může dojít k transkripci operonu *fla/che* i genu *hag*. Motilita tak představuje jednu z možných adaptačních odpovědí buňky při vyčerpání živin, jež je kontrolována regulátorem CodY.

2.5.1.1.2 Pleiotropní regulátor DegU

Regulátor DegU je součástí dvou-složkového systému DegS-DegU, kde DegS představuje cytoplazmatickou senzornou kinázu, a DegU transkripční regulátor. DegU je jedním z hlavních globálních regulátorů *Bacillus subtilis* a představuje klíčový regulátor procesů pozdní exponenciální fáze a stacionární fáze jako je syntéza degradačních enzymů, vývoj biofilmů a kolonií, indukce přirozené kompetence či motilita. Zvýšená exprese operonu *degS-degU* byla prokázána i v buňkách vystavených osmotickému stresu (Dahl et al. 1992; Ogura a Tanaka 1996; Steil et al. 2003; Kobayashi 2007; Verhamme et al. 2007). Regulační aktivita DegU není omezena pouze na jeho fosforylovanou formu. Zdá se, že různé adaptační mechanismy jsou spouštěny v závislosti na vzestupném gradientu koncentrace fosforylované formy DegU od indukce kompetence (vyžadující nefosforylovanou formu regulátoru) až po produkci exoproteáz (vyžadující fosforylovanou formu regulátoru). Spolu s mírou fosforylace regulátoru DegU se v regulaci jednotlivých procesů uplatňuje i různá afinita promotorových oblastí jednotlivých genů k regulátoru. (Kobayashi 2007; Murray et al. 2009)

Je prokázáno že missense mutace genu *degS* či *degU* (označované *degS(Hy)* nebo *degU(Hy)*) zvyšují dobu, po kterou je regulátor DegU ve fosforylované formě, a vedou k nadměrné syntéze degradačních enzymů a zároveň blokují motilitu buněk. Mutace *degU32(Hy)* vede k výrazné redukci exprese genu *sigD* a inhibuje expresi σ^D -závislého genu *cwlB*. (Tokunaga et al. 1994) Pro porozumění mechanismu jakým fosforylovaná forma DegU působí na expresi genů motility byly Amatim a spolupracovníky izolovány a charakterizovány kmeny se supresorovou mutací vůči *degU32(Hy)*. Všechny takto získané kmeny nesly deleci ($\Delta dhsA$) v oblasti mezi genem *codY* a genem *flgB*, což je první gen operonu *fla/che*. Obnovení motility u těchto kmenů je možno vysvětlit tím, že delece vede k narušení terminace transkripce za genem *codY*. Následující operon *fla/che* tak může být přepisován z promotoru předcházejícího genu (Obr. 14). Tím je obejitá regulace operonu *fla/che* zprostředkovaná fosforylovanou formou DegU. Z toho plyne, že fosforylovaná forma DegU se váže v intergenové oblasti *codY-flgB*, přičemž vazba fosforylovaného represoru DegU vede k represí transkripce ze σ^A -závislého promotoru P_A , jež má majortitní funkci na expresi operonu *fla/che* (viz. Kap. 1.5 – úvodní část). (Amati et al. 2004) Tento mechanismus regulace transkripce operonu *fla/che* fosforylovanou formou regulátoru DegU je potvrzen i transkriptomovými studiemi, jež dokazují, že nadprodukce DegU~P vede k down-regulaci operonu *fla/che*. (Mäder et al. 2002)



Obr. 14 Schematické zobrazení *codY-flgB* oblasti

Za genem *codY* vyznačen terminátor, dále zobrazeny promotory P_{D-3} a P_A downstream lokalizovaného operonu *fla/che*, jehož součástí je gen *flgB*.

Převzato z Amati et al. 2004

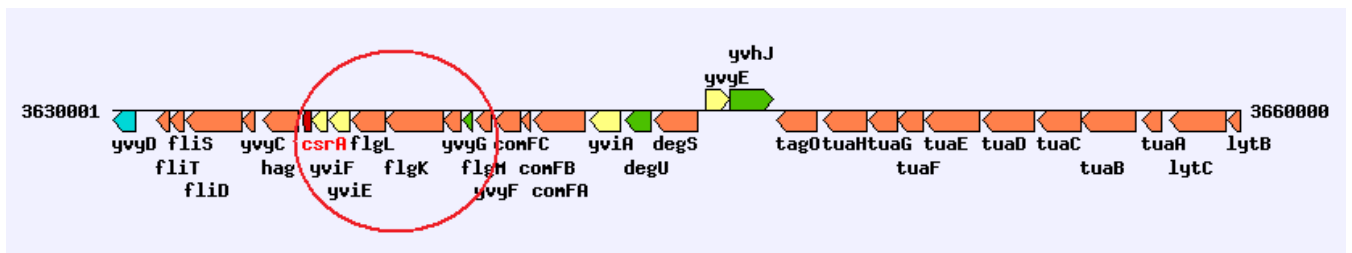
2.5.1.2 Regulace na posttranskripční úrovni

Na posttranskripční úrovni je exprese motility regulována proteinem CsrA, který inhibuje translaci *hag*-mRNA, a umožňuje tak okamžitou regulaci syntézy bičíku. Dalším regulátorem na této úrovni je protein FlgM, který zajišťuje časovou kontrolu exprese genů třídy III, neboli genů σ^D -regulonů.

2.5.1.2.1 RNA-vazebný protein CsrA

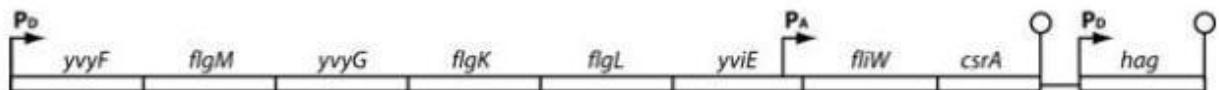
Protein CsrA je součástí Csr (carbon storage regulator) systému a funguje jako posttranskripční regulátor iniciace translace a/či stability mRNA cílového transkriptu. Systém je popsán především u gram-negativních bakterií. V případě *Escherichia coli* se tento systém podílí na regulaci mnoha buněčných procesů včetně glukoneogeneze, metabolismu glykogenu či tvorby biofilmů a zahrnuje protein CsrA a minimálně jednu sRNA s antagonistickou funkcí vůči proteinu CsrA. Vazba proteinu CsrA k příslušnému transkriptu blokuje iniciaci translace tohoto transkriptu, zatímco interakce mezi sRNA a CsrA blokuje funkci CsrA proteinu a následně umožní iniciaci translace. (Romeo 1998)

U *Bacillus subtilis* byly identifikovány homology genů *csrA* a *sRNA*. Gen *csrA* je lokalizován na konci operonu *yvyF-csrA*, jehož produkty jsou zapojeny v syntéze bičíku (např. gen *flgM* kódující anti-sigma faktor k σ^D faktoru, geny *flgK* a *flgG* kódující proteiny asociované s háčkem bičíku aj.) (Obr. 15). Transkripce tohoto operonu je řízena σ^D faktorem. Uvnitř operonu je lokalizován druhý, a to σ^A -závislý, promotor, který se podílí na transkripci dvou posledních genů tohoto operonu - genů *fliW* a *csrA* (Obr. 16). V těsné blízkosti za operonem je lokalizován další σ^D -závislý gen, a to gen *hag*.



Obr. 15 Okolí a lokalizace genu *csrA* v chromozomu *Bacillus subtilis*

Převzato a upraveno z <http://bacillus.genome.jp/>



Obr. 16 Schematické zobrazení okolí genu *csrA* a lokalizace promotorů

Zobrazen je operon kódující geny syntézy bičíku (*yvyF* - *csrA*) a umístění σ^D -závislého promotoru před tímto operonem. Dále je zobrazen σ^A -závislý promotor před dvěma posledními geny (*fliW* a *csrA*) tohoto operonu. Downstream od operonu je v těsné blízkosti lokalizován další gen motility, a to monocistronní gen *hag* transkribovaný z vlastního σ^D -závislého promotoru.

Převzato z Yakhnin et al. 2007

Je prokázáno, že leader sekvence mRNA vznikající přepisem genu *hag*, obsahuje dvě CsrA-vazebná místa, z nichž jedno zasahuje i do oblasti Shine-Delgarno sekvence. Protein CsrA reguluje syntézu flagelinu inhibicí iniciace translace *hag*-mRNA. (Yakhnin et al. 2007)

2.5.1.2.2 Anti sigma-faktor FlgM

Protein FlgM je významným regulátorem exprese σ^D -regulonů, neboť zajišťuje časovou kontrolu exprese těchto genů. Jedná se o anti-sigma faktor, který interaguje se σ^D faktorem a brání předčasné expresi genů σ^D -regulonů. Po správném složení HBB komplexu je protein FlgM sekretován z buňky ven, což vede ke snížení jeho koncentrace, a následně k indukci transkripce genů σ^D -regulonů. (Mirel et al. 1994; Caramori et al. 1996)

2.5.1.3 Regulace skládání bičíku

Regulace skládání bičíku je dána především časovou kontrolou transkripce příslušných genů motility (př. operon *fla/che*, geny *fliSTD*, gen *hag* aj.) a schopností samouspořádávání se (self-assembly) těchto proteinů.

Nejprve dochází ke složení a zabudování MS prstence („motor“ bičíku) do cytoplazmatické membrány. Následně dojde ke složení C-kruhu a sekrečního systému, který zajišťuje transport proteinů HBB komplexu a vláknů bičíku ven z buňky centrálním kanálem. Po úspěšném složení HBB komplexu dojde k sekreci anti-sigma faktoru FlgM, což následně umožní syntézu flagelinu. Ten je transportován centrálním kanálem a interakcí podjednotek proteinu flagelinu dochází postupně ke vzniku vláknů bičíku.

Srovnání aminokyselinové sekvence flagelinu a jeho homologních proteinů z dalších bakteriálních druhů odhalilo vysokou konzervovanost C- a N-koncových částí proteinu. I při poměrně rozsáhlých delecích v rámci těchto oblastí je však zachována schopnost monomerních podjednotek flagelinu spolu interagovat. Je však vyžadována vyšší koncentrace flagelinu v buňce. Je pravděpodobné, že C- a N-terminální konce flagelinu zajišťují interakci mezi podjednotkami proteinu na základě slabých vazebných interakcí a zajišťují tak stabilizaci vláknů bičíku. Byla prokázána i role proteinu YviF (FliW), neboť mutace v genu *yviF* vede k výrazné redukci motility. Protein YviF interaguje s C-koncovou částí flagelinu a působí jako pozitivní regulační faktor skládání bičíku. (Titz et al. 2006) Přesný mechanismus působení proteinu YviF na skládání vláknů bičíku však nebyl ještě objasněn.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

Kmeny získané z Bacillus Genetick Stock Center, Ohio University, USA:

Bacillus subtilis 168 (*trpC2*)

Standardní, divoký kmen.

Bacillus subtilis 1A839 (*trpC2 degU32(Hy) ΔdhsA4*)

Kmen 1A839 byl připraven Amatim a spolupracovníky (2004) při izolaci kmene se supresorovou mutací vůči mutaci *degU32(Hy)*. Mutace *degU32(Hy)* vede k prodloužení doby, po kterou se regulátor DegU nachází ve fosforylované formě, a způsobuje nadprodukcí degradačních enzymů a zároveň neschopnost aktivního pohybu pomocí bičíku. Obnovení motility u kmene 1A839 je dáno delecí v *codY-flgB* intergenové oblasti chromozomu. To vede k narušení terminace transkripce za genem *codY* a tím k „pročtení“ a transkripci operonu *fla/che* lokalizovaného downstream od genu *codY*. Delece navíc zasahuje i do části kódující sekvence genu *codY*, jehož produkt je významný represor genů stacionární fáze. Delece tak způsobuje předčasnou expresi těchto genů (viz Kap. 2.5.1.1.2).

Kompetentní buňky:

Escherichia coli DH5α (*deoR endA1 gyrA96 hsd R17(r_k⁻, m_k⁻) recA1 relA1 supE44 thi-1 (lacZYA-arg F)U169 φ80lacZ M15 F λ⁻)* – výrobce Clontech

Kmen připravený v naší laboratoři:

Bacillus subtilis MP2

Kmen popsán v kapitole 4.2 (úvodní část)

Kmen připravený v rámci mé diplomové práce:

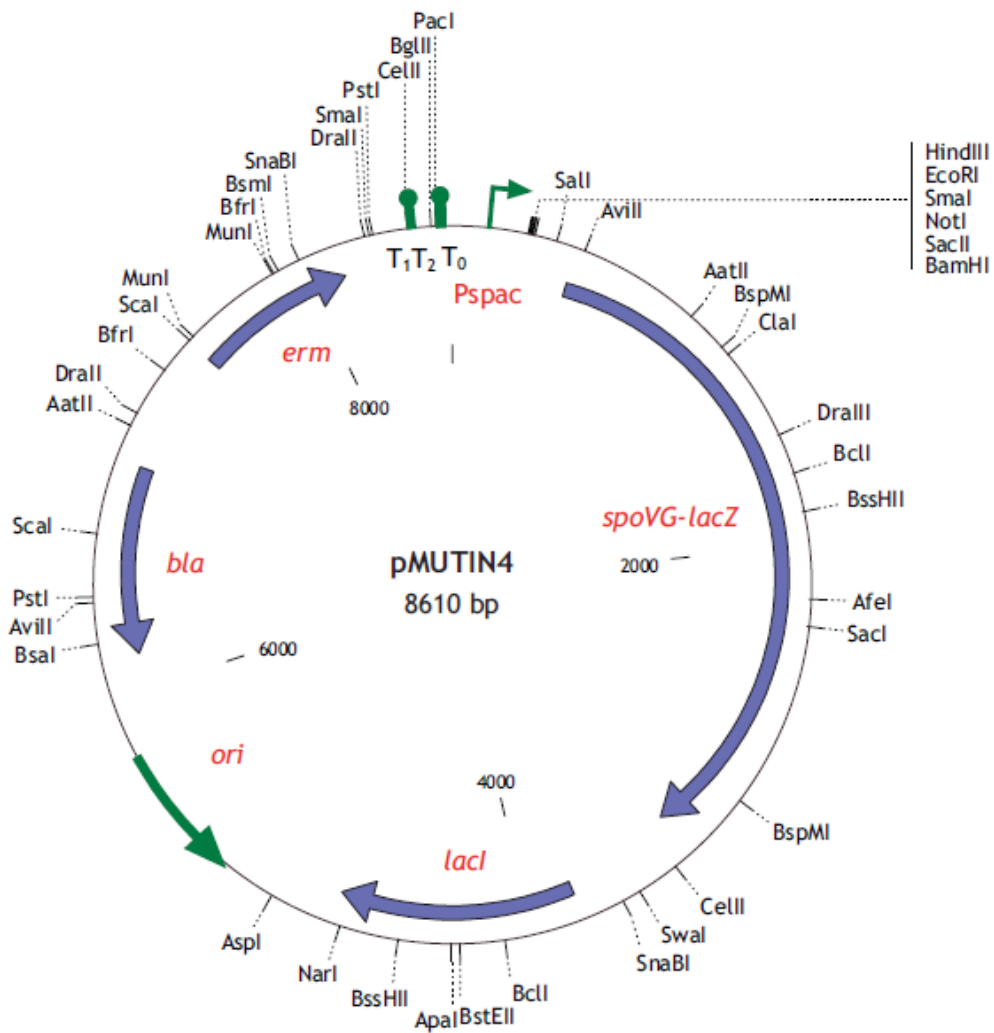
Bacillus subtilis ES091

Kmen popsán v kapitole 4.1.

3.1.2 Plasmidy

3.1.2.1 pMUTIN4

Plasmid MUTIN4 (Obr. 17) je integrační vektor využíváný pro cílenou inaktivaci genu. K integraci konstruktů odvozených od tohoto plasmidu dochází jedním crossing-overem na základě homologie klonovaného fragmentu genu *Bacillus subtilis* a tímto genem v bakteriálním chromozomu. Po integraci dochází k oddělení kódující sekvence od přirozené regulační oblasti a tato sekvence se dostává pod kontrolou indukovatelného promotoru. Za přirozený promotor je přiřazen fúzovaný gen *spoVG-lacZ* umožňující sledovat regulaci exprese z tohoto přirozeného promotoru metodou měření aktivity β -galaktozidázy (Obr. 17).



Obr. 17 Struktura integračního vektoru pMutin4

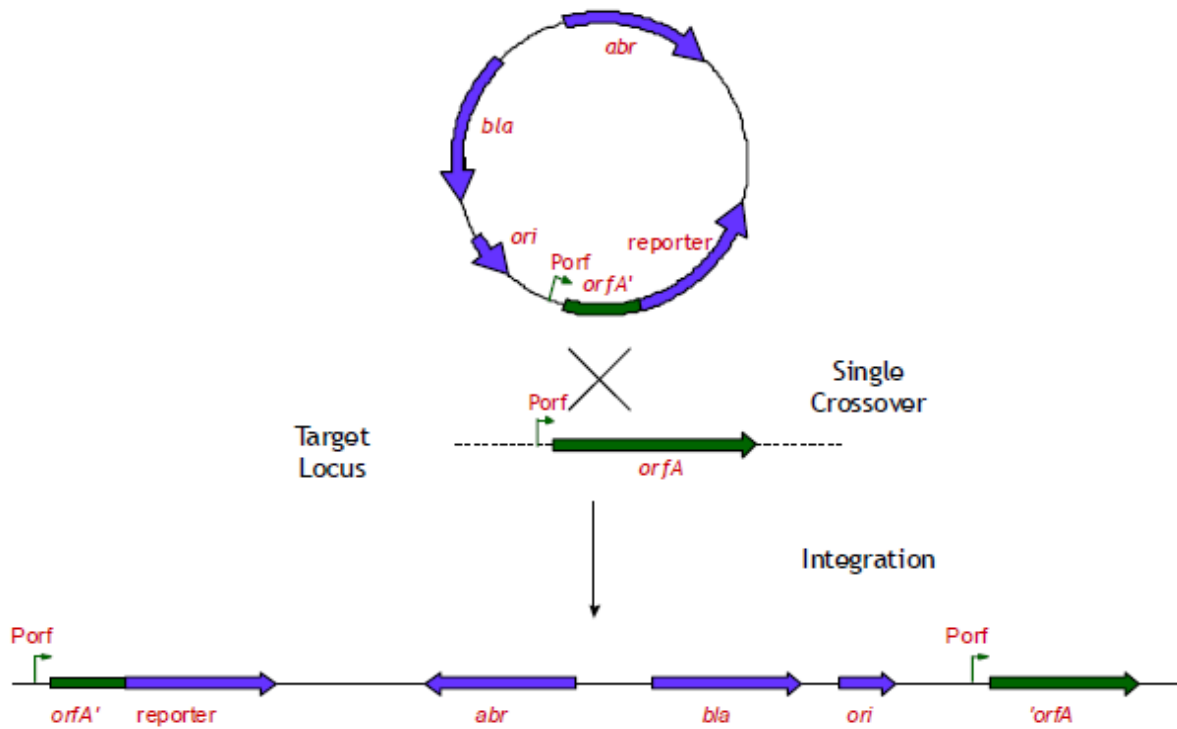
spoVG – lacZ – gen *lacZ* z *Escherichia coli* fúzovaný s vazebným miestom *spoVG* z *Bacillus subtilis*

Pspac – promotor indukovateľný IPTG

lacI – gen kódujúci lac represor s modifikovaným ribozóm-vazebným miestom pre gram-pozitívne bakterie

erm – gen kódujúci rRNA adenín N-6-metyltransferázu; selekcia v *Bacillus subtilis* (ery 0,3 µg/ml)

bla – gen kódujúci β-laktamázu; selekcia v *Escherichia coli* (amp 100 µg / ml)



Obr. 18 Schematické znázornění integrace vektoru do chromozomu

Integrace probíhá na základě homologie mezi klonovaným fragmentem daného genu a tímto genem v chromozomu *Bacillus subtilis*. K integraci dochází jedním crossing-overem.

3.1.3 Primery pro PCR

Název	Sekvence (5' → 3')	Tm (°C)
yxkOSDR1	<u>GGAGGATCC</u> CATAACAGGACAATCAGCC*	61,3
yxkOSDF	<u>CCCAAGCTT</u> AGGAAAAGAAAGCAGAGGAG*	61,5
mutinR	<u>GGTCGAAAG</u> ATCAACATTAATGTGAGCG*	58,7
mutinF	<u>GGAATGGATC</u> CTAGCTTCCAAGAAAGAT*	58,8
ydaGR	AGTTCGAGTGAGACCGGTGT	53,8
ydaGF	GTGCTTGATGTTCTAGATCACC	53
hagR1	GCAGGAGTAGCTGTGTCAAC	53,8
hagR2	CACCAGAAGCGCTTAAGTTGT	52,4
hagF	ATGACGCAGCAGGTCTTGC	53,2
yxkOF2	CGGTACATCAGAAAACGTAATCCC	55,7
yxkOF3	GTGCCC GTGAACGAATTGCA	53,8
yxkOR2	CCCCAATATCATGCCCGTCAG	56,3

*podtržená část primeru = sekvence nástavce (využito při klonování)

3.1.4 Enzymy a protilátky

Název	Výrobce
Anti-digoxigenin-AP	ROCHE
BamHI	FERMENTAS
DIG-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-trifosfát)	ROCHE
HindIII	FERMENTAS
Klenowův fragment	FERMENTAS
Lysosym	FLUKA
Proteináza K	SIGMA
PstI	FERMENTAS
Reverzní transkriptáza	FERMENTAS
Ribonukleáza A	SIGMA
RNA inhibitor	FERMENTAS
SacI	FERMENTAS
T4 DNA ligáza	FERMENTAS
Taq DNA polymeráza	FERMENTAS

3.1.5 DNA/RNA standardy

- Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (Fermentas)
- GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)
- RNA Ladder Low Range (Fermentas)

3.1.6 Komerční sady

- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) – izolace plasmidové DNA
- MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) – izolace chromozomální DNA
- PureYield™ RNA Midiprep System (Promega) – izolace celkové RNA
- Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) – izolace DNA z agarózového gelu

3.1.7 Antibiotika

Název	Zásobní roztok	Výrobce
ampicilin	100mg/ml	SERVA
erytromycin	9 mg/ml	FLUKA

3.1.8 Chemikálie

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	LACHEMA
100% etanol	PENTA
Acetát sodný	LACHEMA
Aceton	PENTA
Agar	OXOID
Agaróza	MERCK
BCIP (5-bromo-4chloro-3-indolyl fosfát <i>p</i> -toluidinová sůl)	SIGMA
CaCl_2	LACHEMA
CSPD	ROCHE
Diethyl pyrokarbonát	SIGMA
Dihydrát citrátu trisodného	PENTA
dNTP mix (směs deoxyribonukleotidtrifosfátů)	FERMENTAS
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	LACHEMA
Ethidium bromid	SIGMA
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	LACHEMA
Fikol	SIGMA
Formamid	ROTH
Glukóza	LACHEMA
Glutaraldehyd	SIGMA
Glycerol	SIGMA
Guanidin thiokyanát	SERVA
Izopropanol	LACH NER
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	LACHEMA
Kasein	FLUKA
KCl	LACHEMA
KH_2PO_4	LACHEMA
Krystal violet	LACHEMA
Kvasničný autolyzát	OXOID
Kyselina fosfowolframová	AGAR SCIENTIFIC

Kyselina maleinová	ROTH
Kyselina octová	LACHEMA
Kyselý hydrolyzát kaseinu	OXOID
LiCl	BDH
Loading buffer DNA (6x)	FERMENTAS
Loading buffer RNA (2x)	FERMENTAS
MgCl ₂	BDH
MgSO ₄ ·7H ₂ O	LACHEMA
MnCl ₂	LACHEMA
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	MERCK
NaCl	LACH NER
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	MERCK
NaOH	BDH
NBT	SIGMA
N-lauroylsarcosin	SIGMA
Polylysin	SIGMA
Polyvinylpyrrolidon	SIGMA
Random hexamer primer	FERMENTAS
Sacharóza	PENTA
Salmon sperm	SIGMA
SDS (dodecylsulfát sodný)	SIGMA
sephadex 25	PHARMACIA
Terciární butanol	RIEDEL-DE HAËN
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	FLUKA
Tryptofan	LACHEMA
Trypton	OXOID
Tween 20	SIGMA
ZnSO ₄	LACHEMA
β – merkaptoetanol	PROMEGA

3.1.9 Kultivační média

3.1.9.1 Komplexní médium

- **LB (Luria – Bertani) médium**

10 g trypton

5 g kvasničný autolyzát

10 g NaCl

rozpuštěno v destilované vodě, pH upraveno na 7,0

doplněno destilovanou vodou na objem 1 litr

sterilizováno autoklávováním

3.1.9.2 Minerální médium

- **Kapalné minerální médium I**

20 ml 5x fosfátový pufr

0,1 ml 0,5 M citronan sodný

0,1 ml 100 mM MnCl₂

0,1 ml 10 mM ZnSO₄

1% glukóza

0,01% tryptofan

10 mM KCl

doplnit destilovanou vodou do 100 ml

sterilizováno autoklávováním

- **Kapalné minerální médium II**

0,05% kyselý hydrolyzát kaseinu

20 ml 5x fosfátový pufr

0,1 ml 0,5 M citronan sodný

0,1 ml 100 mM MnCl₂

0,1 ml 10 mM ZnSO₄

1% glukóza

0,01% tryptofan

10 mM KCl

doplnit destilovanou vodou do 100 ml

sterilizováno autoklávováním

○ **Pevné minerální médium**

Složka A

20 ml 5x fosfátový pufr

0,1 ml 0,5 M citronan sodný

0,1 ml 100 mM MnCl₂

0,1 ml 10 mM ZnSO₄

KCl do požadované koncentrace

NaCl po požadované koncentrace

doplnit destilovanou vodou do 50 ml

Složka B

2 g agar

1 g glukóza

0,01 g tryptofan

doplnit destilovanou vodou do 50 ml

Obě složky autoklávovány odděleně a následně smíchány a nality do Petriho misek.

3.1.9.3 Médium pro přípravu kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

○ **Spc médium (médium A)**

10 ml 10x báze média A

9 ml 10x „Bacillus salts“

doplnit sterilní destilovanou vodou do 100 ml

10x báze média A

Složka A:

1 g kvasničný autolyzát

0,2 g kyselý hydrolyzát kaseinu

doplnit destilovanou vodou do 70 ml

Složka B:

5 g glukóza

doplnit destilovanou vodou do 30 ml

Obě složky autoklávovány samostatně a poté smíchány

10x „Bacillus salts“

2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

15,2 g K_2HPO_4

6 g KH_2PO_4

1,14 g dihydrát citrátu trisodného

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

doplnit destilovanou vodou na objem 100 ml

sterilizováno autoklávováním

○ **SpII médium (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

○ **TE pufr**

10 mM Tris*Cl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

destilovaná voda

○ **50x TAE pufr**

Tris

ledová kyselina octová

0,5 M EDTA (pH 8,0)

destilovaná voda

○ **5x fosfátový pufr**

10,23 g Na_2HPO_4

3,97 g NaH_2PO_4

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

0,1225 g MgSO_4

1,25 ml 0,1% FeSO_4

doplnit destilovanou vodou do 250 ml

○ **roztoky pro mini preparaci plasmidové DNA**

PEB roztok

0,6 g Tris

1,8 g glukóza

0,74 g Na_2EDTA

destilovaná voda do 200 ml

pH 8

ALM roztok

0,2 M NaOH

1% (w/v) SDS

destilovaná voda

připravován vždy čerstvý

3 M acetát sodný

81,6 g acetát sodný

destilovaná voda do 200 ml

pH 4,8 (úprava kyselinou octovou)

○ **roztoky pro hybridizaci**

100x Denhartův roztok

2% (w/v) fikol

2% (w/v) polyvinylpyrrolidon

destilovaná voda

sterilizován filtrací, uchováván v -20°C

prehybridizační roztok

5x SSC

5x Denhartův roztok

0,1% (w/v) N-lauroylsarcosin

0,2% (w/v) SDS

1% (w/v) kasein

destilovaná voda

hybridizační roztok

5x SSC

0,1% (w/v) N-lauroylsarcosin

0,75 µl salmon sperm (na 15 ml roztoku; vždy přidán před použitím)

destilovaná voda

nízkostringentní roztok

2x SSC

0,1% (w/v) SDS

destilovaná voda

○ **roztoky pro chromogenní a chemiluminiscenční detekci**

maleinový pufr

0,1 M kyselina maleinová

0,15 M NaCl

destilovaná voda

pH 7,5

promývací roztok

0,3% (w/v) Tween 20

maleinový pufr

blokační roztok

1% kasein

maleinový pufr

připravován vždy čerstvý

roztok protilátky

protilátka Anti-DIG naředěna blokačním roztokem v poměru 1:5 000 (150mU/ml)

detekční pufr

0,1 M Tris

0,1 M NaCl

destilovaná voda

pH 9,5

roztok s NBT/BCIP

zásobní roztoky NBT (18,75 mg/ml v 67% DMSO) a BCIP (9,4 mg/ml ve 100% DMSO)
naředěny detekčním pufrům v poměru 1:100

roztok s CSPD

1% CSPD

detekční roztok

○ **roztoky pro izolaci RNA**

DEPC-H₂O

0,1% (w/v) diethyl pyrokarbonát (DEPC)

destilovaná voda

přes noc mícháno v digestoři a následně dvakrát autoklávováno

Následující roztoky připraveny z DEPC- H₂O a dvakrát autoklávovány.

RNA denaturační roztok

4 M guanidin thiokyanát

0,5% (w/v) sarkosyl

25 mM citronan sodný

DEPC- H₂O

5 M LiCl

○ **roztoky pro Northern blotting**

denaturační roztok

50 mM NaOH

1,5 M NaCl

DEPC- H₂O

neutralizační roztok

0,5 M Tris*Cl

1,5 M NaCl

DEPC- H₂O

20x SSC

3 M NaCl

0,3 M citronan sodný

DEPC- H₂O

pH 7

○ **roztoky pro Southern blotting**

0,25 M HCl

denaturační roztok

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

destilovaná voda

neutralizační roztok

1,5 M NaCl

0,5 Tris/HCl

destilovaná voda

pH 7

20xSSC

3 M NaCl

0,3 M citronan sodný

destilovaná voda

pH 7

- **roztoky pro přípravu vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii**

PBS (zásobní roztok 0,2 M)

2,26 g NaH₂PO₄

H₂O do 100 ml

pH 6,9 – 7,1

vypírací roztok (0,1 M)

45 ml zásobní roztok PBS

5 ml glukóza (roztok z 2,52 g glukózy ve 100 ml vody)

1,1 g sacharóza

3.1.11 Internetové databáze a programy

- <http://www.bgsc.org/>
- <http://bacillus.genome.jp/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- <http://insilico.ehu.es/tm.php>
- LaserGene

3.1.12 Přístroje a laboratorní zařízení

1000 standard orbital shaker (VWR)

Centrifugy: CL3R

Mikro 20 (Hettich)

Mikro 22R (Hettich)

MiniSpin (Eppendorf)

Dry Bath Incubator

DU Series 500 Spectrophotometer (BECKMAN)

Elektroporátor (BIO-RAD)

Foemi Optimax (PROTEC Medizintechnik GmbH & Co, KG)

Fotoaparát OLYMPUS SP-565UZ

Kamera Matrox Meteor 2

Skenovací elektronový mikroskop JEOL 6380 LV

Světelný mikroskop LEICA DMR

Termostat Memert

Transiluminátor TCP-20-LM

Transmisní elektronový mikroskop JEOL 1011

Třepačka PS-3D (P-lab)

UV box ESCO Laminar Flow Cabinet

VWR Collection Thermal Cycler DOPPIO

Vzdušná třepačka NB-205 (N-Biotek)

Zdroj na elektroforézu EC 250-90

3.2 Metody

3.2.1 Práce s bakteriální kulturou

3.2.1.1 Kultivace na pevném médiu

Bakterie byly kultivovány na pevných agarových půdách v termostatu při teplotě 37°C.

3.2.1.2 Kultivace v tekutém médiu

Bakterie byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách. Objem kultury byl vždy udržován pod hodnotou 1/10 objemu kultivační baňky. Kultury byly kultivovány při teplotě 37°C a třepány s frekvencí 190 – 200 otáček za minutu.

3.2.1.3 Uchovávání bakteriálních kmenů

Krátkodobě byly bakteriální kmeny uchovávány na pevných agarových půdách při 4°C.

Dlouhodobě byly kmeny uchovávány v podobě glycerolových konzerv. K buněčné suspenzi byl přidán glycerol na konečnou koncentraci 20% (v/v) a po patnáctiminutové inkubaci na ledu byly tyto konzervy přemístěny do -70°C

3.2.1.4 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

- připravena noční kultura kmene *Escherichia coli* DH5a
- 0,5 ml noční kultury zaočkováno do 50 ml LB média a kultivováno při 37°C do hodnoty optické denzity $OD_{600} \sim 0,7 - 0,9$
- inkubace na ledu po dobu 10 – 30 min
- buňky sedimentovány centrifugací při 4000 rpm/10 min a 4°C
- buňky resuspendovány v 50 ml ledové deionizované vody a sedimentovány centrifugací
- buňky resuspendovány v 25 ml ledové deionizované vody a sedimentovány centrifugací
- buňky resuspendovány v 20 ml 10% glycerolu (vychlazený na 4°C) a sedimentovány centrifugací

- buňky resuspendovány v 10 ml 10% glycerolu a sedimentovány centrifugací
- buňky resuspendovány v 1 ml 10% glycerolu, rozpipetovány po 200 μ l do mikrozkušavek a uchovávány v -70°C

3.2.1.5 Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* elektroporací

- v elektroporační kyvetě smícháno 100 μ l na ledu rozmražené suspenze kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5 α a 10 μ l DNA (cca 100 ng)
- na elektroporátoru aplikován puls při kapacitanci 25 μ F, napětí 2,5 kV a odporu 200 Ω
- do kyvety přidán 1 ml LB média a obsah kyvety přenesen do mikrozkušavky
- kultivováno při 37°C po dobu 1 hod
- buňky sedimentovány centrifugací při 4000 rpm/10 min, resuspendovány v 200 μ l LB média a následně vysety na pevné agarové půdy s příslušným antibiotikem a inkubovány při 37°C přes noc

3.2.1.6 Příprava kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

- připravena noční kultura příslušného kmene *Bacillus subtilis*
- 1,4 ml noční kultury zaočkováno do 10 ml Spc média (Médium A) a kultura kultivována po 2 – 3 hod
- přidáno 10 ml SpII média (Médium B) a kultura kultivována 90 min
- buňky sedimentovány centrifugací při 4000 rpm/10 min a následně resuspendovány ve 2 ml supernatantu
- buňky rozpipetovány po 200 μ l do mikrozkušavek obsahujících 200 μ l glycerolu a uchovávány v -70°C

3.2.1.7 Transformace kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

- do mikrozkušavky s kompetentními buňkami *Bacillus subtilis* přidáno 20 μ l plasmidu
- inkubováno při 37°C po dobu 20 min
- obsah mikrozkušavky přenesen do 2 ml LB média
- inkubováno při 37°C po dobu 1 hod
- vyseto 100 μ l kultury na pevné agarové půdy s příslušným antibiotikem a inkubováno při 37°C přes noc

3.2.1.8 Měření optické denzity bakteriální kultury

Optická denzita bakteriální kultury byla měřena na spektrofotometru, kdy byla porovnávána absorbance vzorku bakteriální kultury oproti čistému kultivačnímu médiu (blank) při vlnové délce 600 nm či 450 nm.

3.2.2 Práce s bakteriální DNA

3.2.2.1 Izolace chromozomální DNA

K izolaci chromozomální DNA byla využita komerční sada MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit a bylo postupováno dle dodaného protokolu.

3.2.2.2 Izolace plasmidové DNA

3.2.2.2.1. Mini preparace plasmidové DNA

Vhodné pro izolaci plasmidové DNA pro restrikční analýzu a transformaci.

- připravena noční kultura inokulací 1 kolonie do 2 ml LB média s příslušným antibiotikem
- buňky sedimentovány centrifugací při 13 000 rpm/30 s
- odstraněn supernatant a buňky resuspendovány v 0,1 ml PEB roztoku
- přidána Ribonukleáza A a 0,2 ml ALM roztoku, promícháno převrácením zkumavky
- inkubováno na ledu po dobu 5 min
- přidáno 0,15 ml 3 M acetátu sodného, promícháno převrácením zkumavky
- sedimentováno centrifugací při 14 000 rpm/5 min
- odebráno 400 µl supernatantu (obsahuje plasmidovou DNA) do čisté mikrozukavky a přidáno 800 µl ledového 96% etanolu
- precipitováno při -20°C po dobu minimálně 30 min
- precipitát sedimentován centrifugací při 14 000 rpm/5 min
- supernatant odstraněn a pelet promyt 500 µl 95% etanolu
- precipitát opět sedimentován centrifugací při 14 000 rpm/2 min a následně odstraněn zbytek etanolu
- přidáno 50 µl 5 M LiCl a inkubováno na ledu 5 – 10 min
- precipitát sedimentován centrifugací při 14 000 rpm/5 min
- odebrán supernatant (obsahuje plasmidovou DNA) do čisté mikrozukavky s 250 µl ledového 96% etanolu
- precipitováno při -20°C po dobu minimálně 1 hod

- precipitát sedimentován centrifugací při 14 000 rpm/5 min
- pelet promyt 500 μ l ledového 95% etanolu
- precipitát sedimentován centrifugací při 14 000 rpm/2 min a následně odstraněn etanol
- pelet vysušen a poté rozpuštěn v 50 μ l TE pufru (pH 8,2)
- vyizolovaný plasmid skladován v -20°C

3.2.2.2.2 Izolace plasmidové DNA pomocí sady Plasmid Miniprep Kit

K izolaci plasmidové DNA ve vysoké čistotě byla využita komerční sada GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit a bylo postupováno dle dodaného protokolu.

3.2.2.3 Čištění vzorku DNA pomocí sady DNA Extraction Kit

K přečištění vzorku DNA či izolaci DNA z agarózového gelu byla použita komerční sada Silica Bead DNA Gel Extraction Kit a bylo postupováno dle dodaného protokolu.

3.2.2.4 Horizontální agarózová elektroforéza DNA

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

Na přípravu gelů i k naplnění elektroforetické nádoby byl využíván 1x koncentrovaný TAE pufr a konečná koncentrace agarózy v gelech byla 1% (w/v). Vzorky byly nanášeny v pufru obsahujícím pigmenty umožňující sledovat průběh elektroforézy. Bylo používáno stejnosměrné napětí o velikosti 5 V/cm^2 gelu.

3.2.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla prováděna v tenkostěnné mikrokumavce s následujícím složením reakční směsi:

Složka	množství
Taq pufr (s KCl)	5 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l
MgCl ₂	4 – 8 μ l
přímý primer (0,1 mM)	1 μ l
reverzní primer (0,1 mM)	1 μ l
templátová DNA	200 – 1 μ g
Taq polymeráza	2 jednotky
destilovaná voda	doplněna na konečný objem 50 μ l

Po umístění do PCR cycleru byl průběh reakce následující:

- | | | | |
|------------------------|------------------------------------|---------------|-------------------------|
| • počáteční denaturace | 94°C | 3 min | } 5 cyklů ^{C)} |
| • denaturace | 94°C | 1 min | |
| • nasedání primerů | T _m parc. ^{A)} | 0,5 min | |
| • replikace DNA | 72°C | 1 min / 1 kbp | |
| • denaturace | 94°C | 1 min | } 30 cyklů |
| • nasedání primerů | T _m ^{B)} | 0,5 min | |
| • replikace DNA | 72°C | 1 min / 1 kbp | |
| • konec prodloužení | 72°C | 5 min | |

A) teplota tání té sekvence primerů, která je komplementární k templátu DNA u primerů s „nástavcem“ využitých při klonování

B) teplota tání celých primerů (včetně „nástavce“ - viz tabulka v kapitole 2.1.3)

C) tato část programu vynechána pokud byly použity primery bez „nástavce“

3.2.2.6 Štěpení DNA restrikčními enzymy

Restrikce DNA probíhala v mikrozkušavkách 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

Směs byla inkubována 2 – 10 hodin při 37 °C a po dokončení restrikce byla restrikční endonukleáza tepelně inaktivována dle pokynů výrobce.

3.2.2.7 Ligace restrikčních fragmentů

Ligace fragmentů DNA byla prováděna v mikrozkušavkách s následujícím složením reakční směsi:

složka	množství
ligační pufr	2 μ l
vektorový plasmid	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

Inkubováno přes noc v PCR cycleru s nastaveným programem:

16°C 50 min

20°C 3 min

24°C 5 min

37°C 1 min

Po ukončení ligace byla ligáza tepelně inaktivována dle pokynů výrobce.

3.2.2.8 Neradioaktivní značení DNA sond

3.2.2.8.1. Značení sond s využitím Klenowova fragmentu

- vzorek DNA (PCR produkt, 300 – 600 ng) naředěn sterilní vodou do objemu 34 μ l
- vzorek denaturován ve vroucí vodní lázni (5 min) a následně zchlazen na ledu (5 min)
- přidáno 5 μ l pufru (Klenow buffer)
 - 4 μ l 10mM dNTPs
 - 0,7 μ l DIG-UTP
 - 1 μ l Klenowova fragmentu
- reakční směs krátce centrifugována, inkubována při 37°C po dobu 1 – 2 hod a poté při laboratorní teplotě přes noc
- probíhající reakce zastavena inkubací při 65°C po dobu 10 min
- označená sonda přečištěna gelovou filtrací (viz kapitola 2.2.2.9) a skladována v -20°C

3.2.2.8.2. Značení polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)

Značení pomocí PCR bylo prováděn v tenkostěnných mikrozkuvkách v PCR cycleru s následujícím složením reakční směsi:

Složka	Množství
Taq pufr (s KCl)	5 μ l
dNTP mix (10 mM)	0,5 μ l
MgCl ₂	4 – 8 μ l
DIG	3,5 μ l
přímý primer (0,1 mM)	1 μ l
reverzní primer (0,1 mM)	1 μ l
templátová DNA	200 μ g – 1 μ g
Taq polymeráza	2 jednotky
destilovaná voda	doplněna na konečný objem 50 μ l

Po umístění do PCR cycleru byl průběh reakce následující:

• počáteční denaturace	94°C	3 min	} 30 cyklů
• denaturace	94°C	1 min	
• nasedání primerů	T_m ^{A)}	0,5 min	
• replikace DNA	72°C	1 min / 1 kbp	
• konec prodloužení	72°C	5 min	

A) teploty tání primerů (viz tabulka v kapitole 3.1.3) sníženy o 2°C pro lepší nasedání primerů v přítomnosti značky DIG

3.2.2.9 Čistění vzorku gelovou filtrací

Gelová filtrace byla využita k přečištění DNA sond po dokončení značení. Do inzulinové injekční stříkačky (s odstraněnou jehlou) byla vložena skelná vlákna a přidáno 300 μ l sephadexu 25. Stříkačka byla umístěna do 15 ml zkumavky a centrifugována při 1000 rpm/1 min. Poté byla stříkačka vložena do nové 15 ml zkumavky a byl nanesen vzorek. Centrifugováno opět při 1000 rpm/1 min. Přečištěný vzorek (DNA sonda) byl přenesen do mikrozkušavky a skladován v -20°C.

3.2.2.10 Vyhodnocení sond chromogenní detekcí

K vyhodnocení sond byla použita metoda „dot blot“ podle protokolu „Evaluation of Probe Labeling Efficiency“ (ROCHE).

- na nylonovou membránu napipetováno 10 μ l naředěné sondy v poměru 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 a 1:100 000; fixace působením UV světla (3 min)
- membrána za mírného kývání promyta v 15 ml promývacího roztoku po dobu 15 min
- membrána inkubována za mírného kývání v 15 ml blokačního roztoku po dobu 30 min
- membrána inkubována za mírného kývání v 10 ml roztoku s protilátkou po dobu 30 min
- membrána promyta dvakrát v 15 ml promývacího roztoku po dobu 15 min
- membrána inkubována v 10 ml detekčního pufru po dobu 3 min
- membrána inkubována v 10 ml detekčního pufru s NBT a BCIP ve tmě přes noc
- reakce ukončena promytím membrány v TE pufru

3.2.2.11 Southern blot

- gel opláchnut destilovanou vodou
- gel promyt v 10 objemech 0,25 M HCl po dobu 5 min za mírného kývání na kývačce a poté opláchnut destilovanou vodou
- gel promyt v 10 objemech denaturačního roztoku po dobu 20 min za mírného kývání na kývačce a poté opláchnut destilovanou vodou
- gel promyt 2x v 10 objemech neutralizačního roztoku za mírného kývání na kývačce
- přenos cDNA na nylonovou membránu kapilární metodou:
 - na misku obsahující 20xSSC položeno sklo
 - přes sklo položen filtrační papír namočený v 20xSSC tak, aby jeho konce byly ponořeny v SSC
 - na tento velký filtrační papír položeny 3 filtrační papíry navlhčené v SSC a seříznuté podle velikost gelu
 - na filtrační papíry umístěny dva Whatman papíry navlhčené v SSC a seříznuté podle velikosti gelu
 - na Whatman papíry položen gel
 - na gel položena navlhčená a seříznutá nylonová membrána
 - na membránu položen další navlhčený a seříznutý Whatman papír a následně tři suché filtrační papíry
 - pro podpoření kapilární síly umístěna navrch 5 – 10 cm vrstva papírových ubrousků
 - na tuto vrstvu položeno sklo a zatíženo (cca 0,5 kg)
 - ponecháno při laboratorní teplotě přes noc
- DNA fixována na membráně působením UV světla v UV peci (3 min)
- membrána vysušena a skladována v -20°C

3.2.2.12 Sekvence DNA

Sekvenační analýzy byly prováděny na servisním pracovišti PřF UK. Vzorky byly připraveny dle návodu uvedeného na webových stránkách <http://web.natur.cuni.cz/~seqlab/>.

3.2.3 Práce s bakteriální RNA

3.2.3.1 Izolace totální RNA

K izolaci buněčné RNA byl použit modifikovaný protokol komerční sady PureYield™ RNA Midiprep System.

- buněčný pelet resuspendovaný v 1 ml RNA denaturačního roztoku a zmrazený s tekutým dusíkem na třecí misce znovu zalit tekutým dusíkem a rozetřen na prášek
- přidán β -merkaptoetanol (20 μ l)
- tekutina vzniklá třením přepipetována do 15 ml zkumavky, která byla umístěna na led
- objem doplněn RNA denaturačním roztokem do 2 ml

Dále postup dle protokolu, který je součástí komerční sady:

- přidány 4 ml RNA dilution buffer a vše promícháno převrácením zkumavky a zvortexováním
- přidán 1 ml RNA clearing agent (nutné před použitím zhomogenizovat), promícháno převrácením zkumavky
- inkubováno při 70°C 5 – 10 min
- zchlazeno na laboratorní teplotu a obsah zkumavky přemístěn na modrou kolonku ve 45 ml zkumavce
- centrifugováno při 2000 rpm/10 min při 22 – 25°C
- k lyzátu přidány 4 ml izopropanolu a obsah zkumavky promíchán převrácením
- obsah zkumavky přemístěn na bílou kolonku v nové 45 ml zkumavce
- centrifugováno při 2000 rpm/10 min při 22 – 25°C
- kolonka přemístěna do nové 45 ml zkumavky a promyta 20 ml RNA wash buffer
- centrifugováno při 2000 rpm/10 min při 22 – 25°C
- promyto 10 ml RNA wash buffer
- centrifugováno při 2000 rpm/10 min při 22 – 25°C
- kolonka vysušena (centrifugováno při 2000 rpm/2 min při 22 – 25°C)
- kolonka přemístěna do nové 45 ml zkumavky a přidán 1 ml RNase free water + 1 μ l inhibitoru ribonukleáz
- inkubováno při laboratorní teplotě po dobu 2 min
- centrifugováno při 2000 rpm/10 min při 22 – 25°C
- obsah zkumavky přemístěn do mikrozkušavky (1,5 ml)
- přidáno 0,5 ml 5M LiCl a inkubováno na ledu po dobu 10 min

- centrifugace při 2000 rpm/10 min při 4°C
- odebrán supernatant a přidáno 100 µl 75% etanolu
- vyizolovaná RNA skladována v -70°C

3.2.3.2 Horizontální agarózová elektroforéza RNA

Horizontální agarózová elektroforéza byla využita k dělení molekul RNA po izolaci buněčné RNA. K vizualizaci byl využíván ethidium bromid, jehož roztokem byl gel dobarvován po dokončení elektroforézy. Na přípravu gelů i k naplnění elektroforetické nádoby byl využit 1x koncentrovaný TAE pufr. Konečná koncentrace agarózy v gelech používaných pro elektroforézu RNA byla 2% (w/v). Pro přípravu TAE pufru i gelů byla použita DEPC – H₂O.

Odebraná část vyizolované RNA (50 µl) byla centrifugována při 10 000 rpm/10 min při 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen. Následně byl pelet rozpuštěn v 5µl formamidu a byl přidán ½ násobek Loading Buffer RNA. Vzorky byly poté inkubovány při 65°C po dobu 10 min a následně zchlazeny na ledu. Poté byly vzorky nanесeny na gel a bylo aplikováno stejnosměrné napětí o velikosti 4 V/cm² gelu.

3.2.3.3 Northern blot

- po dokončení elektroforézy byl gel opláchnut za mírného kývání v DEPC – H₂O
- gel promyt 3 objemy denaturačního roztoku za mírného kývání po dobu 30 min
- gel promyt 3 objemy neutralizačního roztoku po dobu 20 min za mírného kývání
- gel promyt 3 objemy 20x SSC po dobu 45 min za mírného kývání
- přenos RNA na nylonovou membránu kapilární metodou:
- na misku obsahující 20xSSC položeno sklo
 - přes sklo položen filtrační papír namočený v 20xSSC tak, aby jeho konce byly ponořeny v SSC
 - na tento velký filtrační papír položeny 3 filtrační papíry navlhčené v SSC a seříznuté podle velikost gelu
 - na filtrační papíry umístěn Whatman papír navlhčený v SSC a seříznutý podle velikosti gelu
 - na Whatman papír položen gel
 - na gel položena navlhčená a seříznutá nylonová membrána
 - na membránu položen další navlhčený a seříznutý Whatman papír a následně jeden navlhčený filtrační papír a další 2 suché filtrační papíry

- pro podpoření kapilární síly umístěna navrch 5 – 10 cm vrstva papírových ubrousků
- na tuto vrstvu položeno sklo a zatíženo (cca 0,5 kg)
- ponecháno při laboratorní teplotě přes noc
- RNA fixována na membráně působením UV po dobu 3 min
- membrána skladována v -20°C

3.2.3.4 Hybridizace

- membrána namočená do 6xSSC a poté umístěna do hybridizační trubice
- inkubována v 15 ml prehybridizačního roztoku 1 – 2 hod při hybridizační teplotě
- ke značené DNA sondě přidáno 75 μl salmon sperm a denaturováno při $90^{\circ}\text{C}/5$ min
- následně sonda naředěna 15 ml hybridizačního roztoku
- do hybridizační trubice po slití prehybridizačního roztoku přidána sonda v hybridizačním roztoku
- hybridizováno přes noc při hybridizační teplotě
- ráno sonda slita a uchovávána v mrazáku
- membrána opláchnuta dvakrát nízkostingentním roztokem (5 min) a ihned detekována protilátkou

Výpočet hybridizační teploty:

$$T_m = 16,6 \log [c\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) + 81,5$$

$$T_{\text{hyb}} = T_m - 25^{\circ}\text{C}$$

$[c\text{Na}^+]$ – molární koncentrace sodných iontů v hybridizačním roztoku

(% G + C) - procento G a C bazí v sekvenci sondy

T_{hyb} - optimální teplota hybridizace

Teplota hybridizace při práci s RNA snížena na 55°C , aby nedošlo k jejímu poškození. Z tohoto důvodu byl k hybridizačnímu roztoku přidán formamid, kdy přidání 1% formamidu umožňuje snížit teplotu o $0,6^{\circ}\text{C}$. Přidáno bylo takové množství formamidu, aby byl vyrovnán rozdíl mezi vypočtenou hybridizační teplotou (T_{hyb}) a teplotou 55°C , při níž hybridizace probíhala.

3.2.3.5 Chemiluminiscenční detekce

- membrána za mírného kývání promyta ve 100 ml promývacího roztoku po dobu 15 min
- membrána inkubována za mírného kývání ve 100 ml blokačního roztoku po dobu 30 min
- membrána inkubována za mírného kývání v 15 ml roztoku s protilátkou po dobu 30 min
- membrána promyta dvakrát ve 100 ml promývacího roztoku po dobu 15 min
- membrána inkubována v 15 ml detekčního pufru po dobu 3 min
- membrána přenesena do uzavíratelné kazety s vloženou polyetylenovou fólií a na membránu aplikován 1 ml 1% roztoku CSPD (nutné rovnoměrně nanést)
- membrána překryta další fólií a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 min
- odstraněna přebývajících tekutina a znovu přiložena fólie
- inkubováno při 37°C po dobu 10 min
- k membráně přiložen film pro vytvoření snímků, exponován přes noc
- film vyvolán na přístroji Foemi Optimax
- navázaná DNA sonda odstraněna z membrány promytím v roztoku 0,2 M NaOH s 0,1% SDS při 37°C po dobu 15 min – opakováno 2x
- membrána promyta v 2xSSC po dobu 5 min
- membrána vysušena a skladována v -20°C

3.2.3.6 Převod RNA na cDNA

- do mikrozkušavky připravena reakční směs:

složka	množství
RNA	0,1 – 5 µg
random hexamer primer	0,2 µg
nuklease free H ₂ O	do 11 µl

- inkubováno při 70 °C po dobu 5 min
- inkubováno na ledu a přidány další reakční složky

složka	množství
pufř	4 μ l
dNTPs mix	2 μ l
RNase inhibitor	20 jednotek
nuklease free H ₂ O	do 19 μ l

- inkubováno při 25°C po dobu 5 min
- přidáno 200 jednotek reverzní transkriptázy
- inkubováno při 25°C po dobu 10 min
- inkubováno při 42°C po dobu 1 hod
- reakce ukončena inkubací při 70°C po dobu 10 min
- vzorek přečištěn gelovou filtrací

3.2.3.7 Amplifikace cDNA

- cDNA doplněna deionizovanou vodou do objemu 34 μ l
- denaturováno ve vroucí vodní lázni po dobu 5 min
- zchlazeno na ledu po dobu 5 min
- přidáno 5 μ l pufřu (Klenow buffer)
 - 5 μ l dNTPs
 - 5 μ l random hexamer primer
 - 5 jednotek Klenowova fragmentu
- krátce stočeno a inkubováno při 37°C po dobu 1 – 2 hod
- přidáno 2,5 jednotek Klenowova fragmentu
- inkubace při laboratorní teplotě přes noc
- reakce ukončena inkubací při 65°C po dobu 10 min
- vzorek přečištěn gelovou filtrací a cDNA skladována v -20°C

3.2.4 Světelná a elektronová mikroskopie

3.2.4.1 Příprava nativních preparátů pro světelnou mikroskopii

- kmeny kultivovány v tekutém minerálním mediu II do pozdní exponenciální fáze růstu a následně přeočkovány do čerstvého minerálního média II
- při optické denzitě $OD_{600} \sim 0,3$ odebrán 1 ml kultury a následně k části kultury přidán NaCl (konečná koncentrace 0,5 M)
- poté odebrány další dva vzorky 20 min a 60 min po osmotickém stresu
- z odebraných vzorků připraveny nativní preparáty nakápnutím cca 10 μ l suspenze na podložní sklo, jež bylo překryto krycím sklem
- preparáty pozorovány pod mikroskopem při 1000-násobném zvětšení

3.2.4.2 Gramovo barvení

- na podložní sklo kličkou rozetřeno v kapce vody malé množství bakteriální kultury narostlé na pevné agarové půdě
- fixováno protažením skla plamenem
- sklo ponořeno do roztoku krystal violet na dobu cca 90 sek
- barvivo následně slito a okapáno opřením hrany skla o filtrační papír
- sklo ponořeno do Lugolova roztoku na dobu cca 60 sek
- sklo opláchnuto etanolem a následně vodou
- sklo ponořeno do safraninu na dobu cca 80 sek
- sklo opláchnuto vodou a osušeno

3.2.4.3 Příprava vzorku pro skenovací elektronovou mikroskopii

- kmeny kultivovány v tekutém minerálním mediu II do pozdní exponenciální fáze růstu a následně přeočkovány do čerstvého média
- při optické denzitě $OD_{600} \sim 0,3$ odebrány 3 ml kultury a následně k části kultury přidán NaCl (konečná koncentrace 0,5 M)
- poté odebrány další dva vzorky 20 min a 60 min po osmotickém stresu
- ihned po odebrání vzorky fixovány přidáním 2,5% glutaraldehydu v PBS a buňky nechány sedimentovat v lednici přes noc

- sedimentované buňky poté promyty vypíracím roztokem a znovu nechány sedimentovat – promytí opakováno třikrát
- buňky poté resuspendovány v cca 1 ml vypíracího roztoku
- cca 200 µl suspenze následně nanese na polylysinem ošetřená krycí skla
- preparáty poté odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou – 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100% etanolem (vždy 15 min)
- 100% ethanol postupně nahrazen terciárním butanolem - vzorek přemístován mezi roztoky ethanol: butanol v poměrech 1:3, 1:1, 3:1 a nakonec přemístěn do 100% butanolu (vždy na 20 min)
- vzorky umístěny na noc do lednice, butanol poté odstraněn vakuovou sublimací
- vzorky pokoveny zlatem a pozorovány

3.2.4.4 Příprava vzorku pro transmisní elektronovou mikroskopii –negativní barvení

- kmeny kultivovány v tekutém minerálním médiu II do pozdní exponenciální fáze růstu a následně přeočkovány do čerstvého média
- při optické denzitě $OD_{600} \sim 0,3$ odebráno 100 µl kultury a následně k části kultury přidán NaCl (konečná koncentrace 0,5 M)
- poté odebrány další dva vzorky 20 min a 60 min po osmotickém stresu
- elektron-mikroskopická síťka potažená nitrocelulózovou membránou a pokovená uhlíkem položena na 50 µl kapku bakteriální suspenze
- po několika vteřinách adsorbce síťka vyjmuta a zachycená suspenze ponechána zaschnout
- následně byla síťka položena 2x na 30 sek na 50 µl kapku 2% PTA (kyselina fosfowolframová) a přebytek barviva byl poté opatrně odsát filtračním papírem
- síťka byla usušena na vzduchu
- preparát pozorován na transmisní elektronovém mikroskopu při urychlovacím napětí 80 kV

4. Výsledky

4.1 Příprava kmene s mutací v genu *yxkO* s využitím vektoru pMUTIN4

*Cíl: Připravit mutantní kmen s přerušným genem *yxkO* transformací kmene *Bacillus subtilis* 1A839 rekombinantním integračním plasmidem pMUTIN4-*yxkO*'.*

4.1.1 Příprava rekombinantního plasmidu a kmene

S využitím navržených primerů *yxkOSDF* a *yxkOSDR1* byl metodou PCR (Kap. 3.2.2.5) amplifikován úsek genu *yxkO* zahrnující i Shine-Delgarno sekvenci na templátu chromozomální DNA *Bacillus subtilis* kmene 168. Součástí těchto primerů byly nástavce s restrikčními místy, které později umožnily vložení amplifikovaného úseku do polyklonovacího místa plasmidu. Schematické znázornění cílových míst primerů je na Obr. 19.



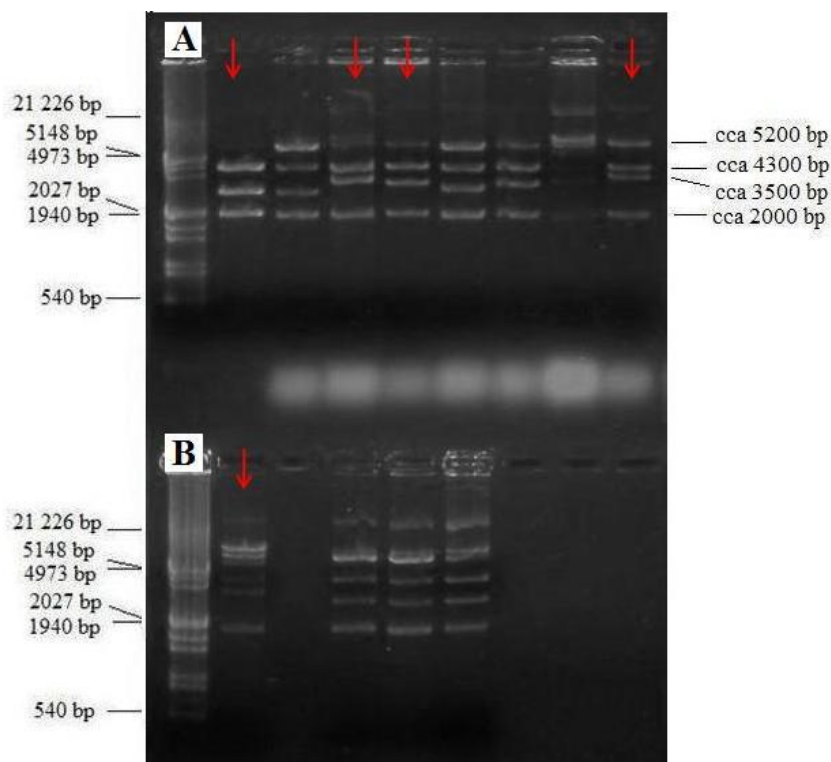
Obr. 19 Schematické zobrazení cílových míst primerů *yxkOSDF* a *yxkOR1*

Je vyznačen promotor genu *yxkO*, dále oranžově naznačena Shine-Delgarno (SD) sekvence a černou šipkou počátek translace proteinu YxkO. Schematicky jsou vyznačena cílová místa primerů *yxkOSDF* a *yxkOR1*. Primer *yxkOSDF* je komplementární k úseku DNA zahrnující Shine-Delgarno sekvenci genu *yxkO*.

Následně byly fragmenty i plazmid podrobeny štěpení restrikčními enzymy BamHI a HindIII (Kap. 3.2.2.6) a poté spojeny ligací s využitím T4 ligázy (Kap. 3.2.2.7). Elektroporací byla poté ligační směs transformována do kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5a (Kap. 3.2.1.5). Transformované buňky byly selektovány na pevných LB půdách s ampicilinem (100 µg/ml).

Z jedenácti náhodně vybraných ampicilin-rezistentních klonů byla izolována plasmidová DNA (viz. Kap. 3.2.2.2). Tato DNA byla spolu s kontrolním plasmidem MUTIN4 (bez inzertu) štěpena restrikními endonukleázami Pst1 a Sac1. Následně byla takto štěpená DNA rozdělena agarózovou elektroforézou (viz. Kap. 3.2.2.4; Obr. 20). To umožnilo identifikovat klony, jejichž plasmid pravděpodobně nesl požadovaný inzert. Ze čtyř takto identifikovaných klonů (vzorky č. 2, 3, 8 a 9) byla znovu izolována plasmidová DNA a následně sekvenována s využitím primeru mutinR. Sekvenční analýza potvrdila přítomnost inzertu a správné uspořádání konstruktu v případě plasmidu izolovaného z klonu označeného č. 2. Uspořádání rekombinantního plasmidu je na Obr. 21.

Tímto rekombinantním plasmidem označeným MUTIN-yxkO' byly následně transformovány kompetentní buňky kmene *Bacillus subtilis* 1A839 a transformanty byly selektovány na pevných LB půdách s erytromycinem (0,3 µg/ml).

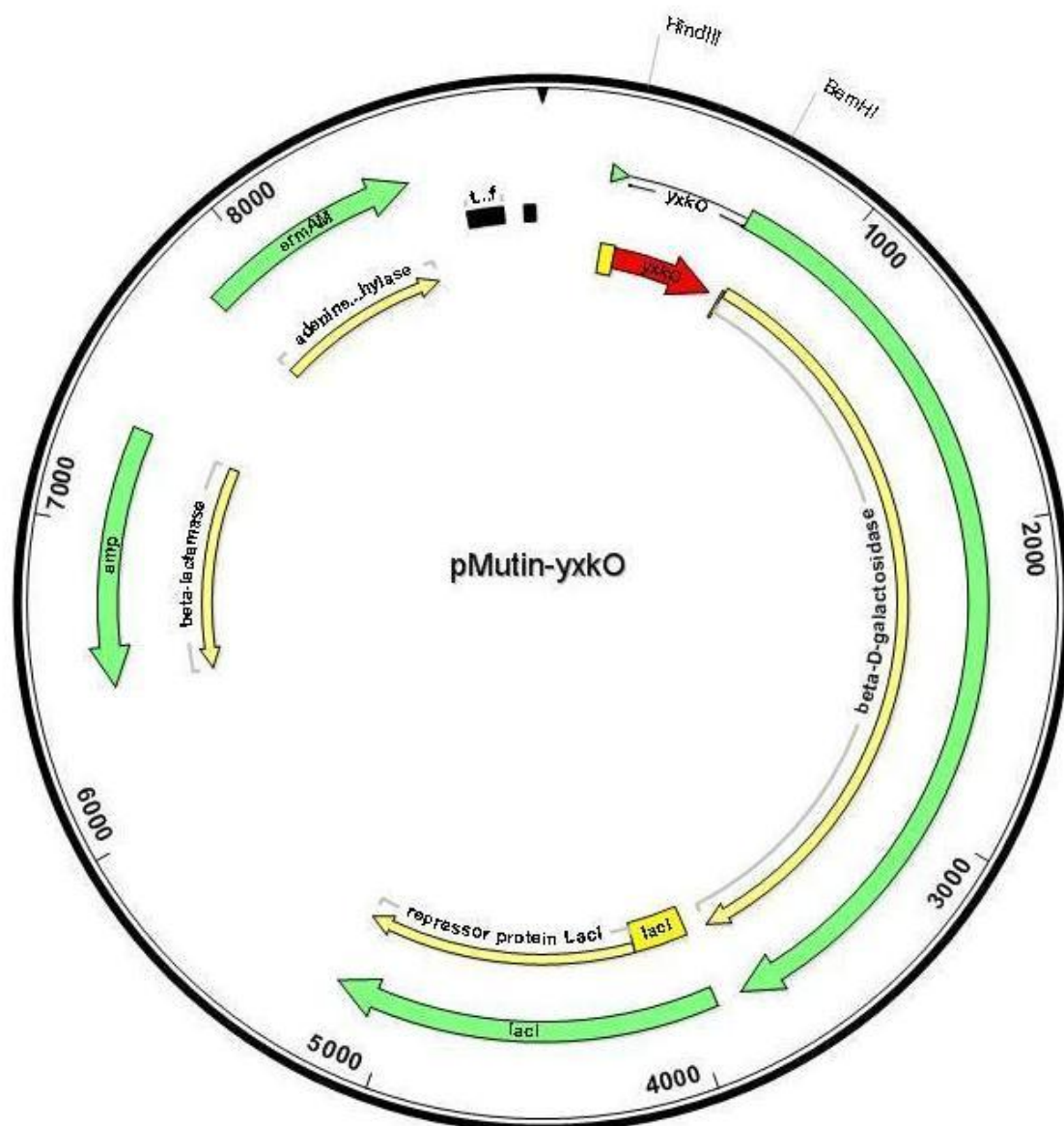


Obr. 20 Agarózový gel – plasmidová DNA po štěpení enzymy Pst1 a Sac1

A) zleva: hmotnostní standard, pMUTIN4 bez inzertu, dále vzorky izolované plasmidové DNA označené čísly 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8

B) zleva: hmotnostní standard, dále vzorek 9, -, vzorky 11, 13, 14

Prázdný plasmid MUTIN4 a vzorky 2, 3, 8 a 9 pravděpodobně nesoucí inzert vyznačeny červenou šipkou.



Obr. 21 Rekombinantní plasmid MUTIN4 nesoucí fragment genu *yxkO*'
 Červeně zobrazen fragment genu *yxkO*', který byl s využitím restrikčních enzymů HindIII a BamHI vložena za indukovatelný promotor. Po transformaci buněk *Bacillus subtilis* došlo na základě homologie tohoto fragmentu a genu *yxkO* v chromozomu buněk k integraci celého plasmidu do chromozomu. Gen kódující erytromycinovou rezistenci nesený na plasmidu pak zajistil udržení plasmidu v buněčné kultuře.

4.1.2 Ověření integrace do chromozomu

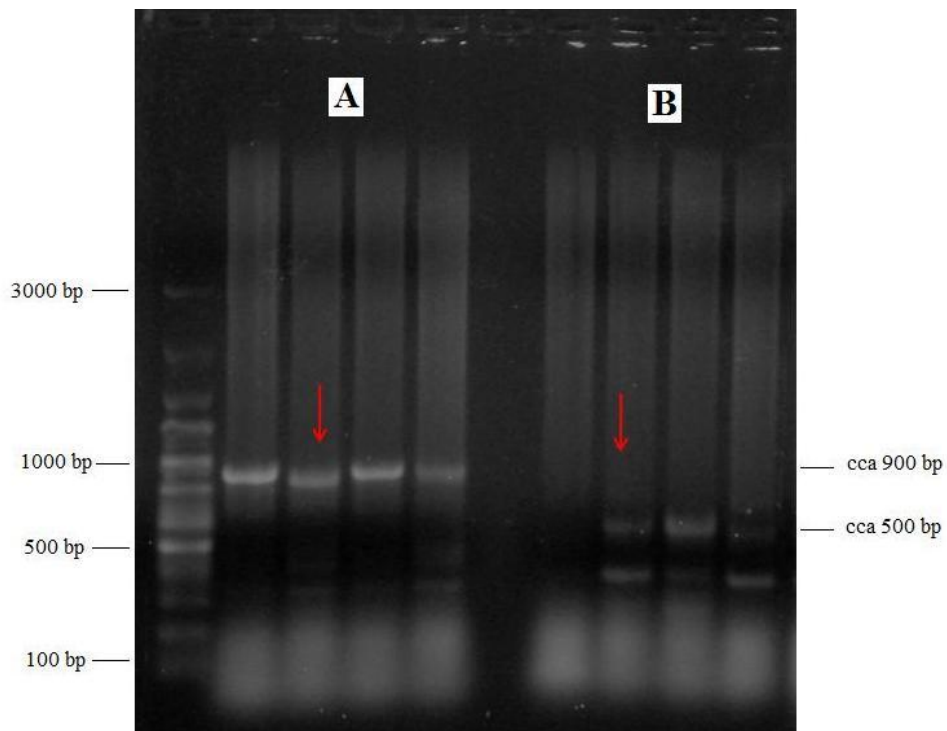
Po transformaci buněk *Bacillus subtilis* kmene 1A839 došlo k integraci rekombinantního plasmidu do chromozomu prostřednictvím jednoduchého crossing-overu mezi fragmentem genu *yxkO'* na plasmidu a tímto genem v chromozomu.

Z náhodně vybraných čtyř erytromycin-rezistentních klonů označených čísly 1, 11, 21 a 30 byla izolována chromozomální DNA (viz. Kap. 3.2.2.1), která následně sloužila jako templát pro PCR reakce ze dvou sad primerů:

A) *yxkOSDF* – *mutinR*

B) *mutin F* - *yxkOSDR1*

V případě první sady primerů došlo k amplifikaci produktu o předpokládané délce ve všech čtyřech případech. U druhé sady primerů nedošlo v případě vzorku klonu č. 30 k amplifikaci produktu předpokládané délky vůbec, a v případě klonu č. 11 jen ke slabé amplifikaci produktu (Obr. 22). Přesto byly všechny PCR produkty přečištěny pomocí komerční sady Silica Bead DNA Gel Extraction Kit a sekvenovány z primerů *mutinR* i *yxkOSDF*. Sekvenační analýza následně potvrdila správnou integraci plasmidu do chromozomu (schematicky znázorněno na Obr. 23.) v případě klonu označeného číslem 11. Takto ověřený rekombinantní kmen byl přejmenován a dále je v této práci označován ES091.

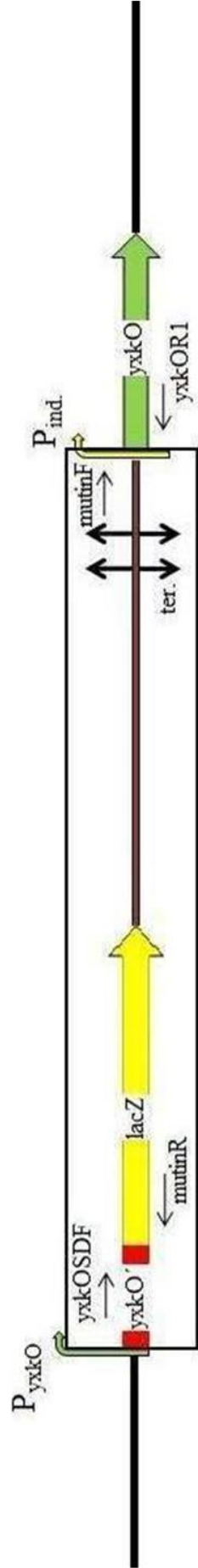


Obr 22. Ověření integrace rekombinantního plasmidu MUTIN-yxkO' do chromozomu pomocí agarózové elektroforézy

A) zleva: hmotnostní standard, PCR produkty s použitím primerů yxkOSDF a mutin R z vybraných čtyř klonů označených 1, 11, 21 a 30

B) zleva: PCR produkty s použitím primerů mutinF a yxkOSDR1 z vybraných čtyř klonů označených 1, 11, 21 a 30

Produkty amplifikované na DNA z kolonie 11 (později ES091) vyznačeny červenými šipkami



Obr. 23 Schematické znázornění oblasti genu *yxkO* po integraci plasmidu

Oblast vyznačená černým rámečkem představuje integrovaný plasmid. Za přirozenou regulační oblast genu *yxkO* je přiřazen fragment genu *yxkO'* (zahrnující Shine-Delgarno sekvenci) fúzovaný se *spoVG-lacZ*. Kódující sekvence *yxkO* je pod kontrolou indukovatelného promotoru, který je součástí plasmidu a umožňuje komplementační studie. Vyznačeny jsou i dva silné terminátory (*ter.*) nesené na plasmidu a zabírající transkripci celého plasmidu z přirozeného promotoru *yxkO*.

Pozice cílových míst prumerů využitých při ovetování integrace plasmidu do chromozomu *Bacillus subtilis* 1A839 jsou vyznačeny černými šipkami.

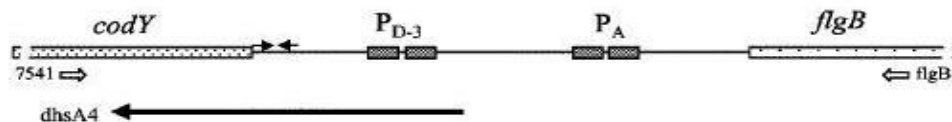
4.1.3 Ověřování růstových vlastností mutantních kmenů za různých kultivačních podmínek

Poté, co byl připraven rekombinantní kmen ES091, byla u tohoto kmene a dalších tří kmenů – 168 (wt), MP2 a 1A839 (popsány níže) – srovnána schopnost růstu na pevných minerálních půdách při dvou různých koncentracích draselných iontů bez vystavení buněk osmotickému stresu a při působení osmotického stresu (0,5 M NaCl). Koncentrace draselných iontů byly 0,05 mM a 10 mM. Koncentrace 0,05 mM je pod limitní 1 mM koncentrací KtrAB transportního systému. Srovnání růstu na pevných minerálních médiích s 0,05 mM koncentrací draselných iontů nám umožnilo sledovat možný vliv přerušení genu *yxkO* na schopnost osmoadaptace za podmínek, kdy není KtrAB systém schopen transportovat draselné ionty do buňky. Koncentrace draselných iontů o hodnotě 10 mM zajišťuje jejich dostatečné množství v prostředí a mutace v genu *yxkO* by schopnost růstu neměla nijak výrazně ovlivnit ani při působení osmotického stresu.

Schopnost růstu za výše uvedených podmínek byla srovnávána u čtyř kmenů *Bacillus subtilis*:

- kmen 168 - standardní, divoký kmen
- kmen MP2 – kmen připravený v naší laboratoři a odvozený od kmene 1A680, což je kmen genotypově shodný s kmenem 168 s tím rozdílem, že nese mutaci v genech *lacAI lacRI*. Kmen MP2 nese integrovaný rekombinantní plasmid pMUTIN-*yxkO'* (Obr. 21). Integrace vedla k oddělení kódující sekvence genu *yxkO* od přirozené regulační oblasti, přičemž se tato sekvence dostala pod kontrolu indukovatelného promotoru. Za přirozený promotor genu *yxkO* je přiřazen fragment genu *yxkO'* fúzovaný s genem *spoVG-lacZ* (Obr. 23). Toto uspořádání umožňuje sledovat regulaci promotoru metodou měření aktivity β -galaktozidázy, přičemž toto měření není zkresleno aktivitou chromozomálně kódovaného enzymu, což zajišťují právě mutace v genech *lacAI lacRI*. Tato vlastnost kmene MP2 však nebyla v experimentech provedených v této diplomové práci podstatná a z hlediska této diplomové práce lze kmen MP2 považovat za odvozený od divokého kmene 168.
- kmen 1A839 - kmen se supresorovou mutací (Δ *dhsA4*) k mutaci *degU32(Hy)*. Supresorová mutace (delece) umožňuje transkripci operonu *fla/che*, a tedy i genu *sigD* z promotoru genu *codY*. To umožňuje obejít negativní regulaci P_A promotoru operonu *fla/che* zprostředkovanou fosforylovanou formou regulátoru DegU (viz. Kap. 2.5.1.2). Delece navíc zasahuje až do kódující sekvence genu *codY*, jejímž přepisem tak vzniká nefunkční protein. (Obr. 24) Jak je uvedeno výše (viz. Kap. 2.5.1.1), zajišťují regulátory CodY a fosforylovaný DegU kontrolu exprese genu *hag* na transkripční úrovni, a tato supresorová mutace umožňuje vyloučení této regulace genu *hag*. Jelikož CodY funguje jako represor předčasné transkripce genů pozdní exponenciální a

stacionární fáze růstu, vede tato mutace k navození exprese těchto genů, a tím simulaci stacionární fáze růstu i v prostředí s dostatkem živin.



Obr. 24 Schematické zobrazení *codY-flgB* intergenové oblasti

Pozice delece $\Delta dhsA4$ u *Bacillus subtilis* 1A839 vyznačena černou šipkou. Delece zasahuje promotor P_{D-3} operonu *fla/che* a terminační oblast za genem *codY*, do jehož kódující sekvence zasahuje.


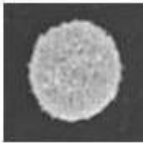
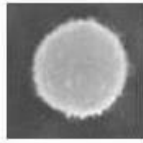
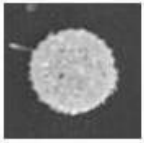


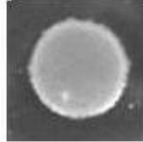
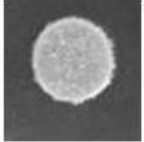

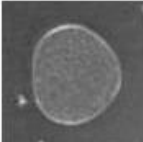
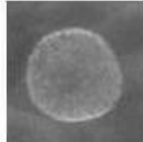



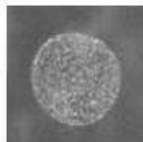
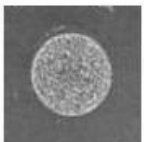
Převzato a upraveno z Amati et al. 2004

- kmen ES091 – kmen připravený integrací rekombinantního plasmidu pMUTIN-yxkO' do chromozomu buněk *Bacillus subtilis* 1A839 postupem uvedeným v Kap. 4.1. Důsledky integrace jsou stejné jako v případě výše uvedeného a popsáno kmene MP2.

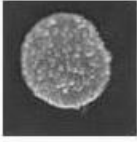
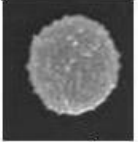
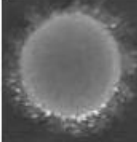
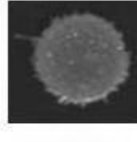
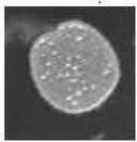

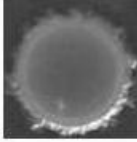
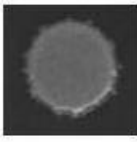
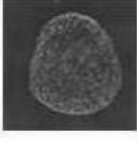
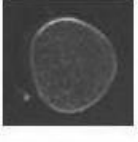
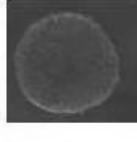


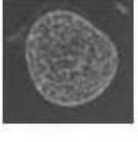
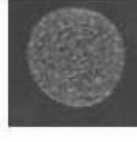

Kmeny MP2 a ES091 se liší genetickým pozadím kmenů od nichž jsou odvozeny. To umožnilo porovnávat růstové vlastnosti kmenů a expresi vybraných genů (viz. Kap. 4.2) v závislosti na růstové fázi - u kmenů 168 a MP2 v závislosti na exponenciální fázi růstu, u kmenů 1A839 a ES091 v závislosti na stacionární fázi růstu (simulace tohoto stavu způsobena mutací v genu *codY*).

U těchto čtyř kmenů byla otestována schopnost růstu na pevném minerálním médiu při různých koncentracích draselných iontů a v přítomnosti/nepřítomnosti osmotického stresu.

Jedna kolonie daného kmene byla inokulována do 1 ml tekutého LB média a kultura byla inkubována při 37°C po dobu cca 1 - 2hod dokud hodnota optické denzity nedosáhla $OD_{450} \sim 0,2$, což je hodnota odpovídající cca $1 \cdot 10^7$ buněk/ml. Poté bylo na patřičnou půdu napipetováno 10^3 buněk. Kultivace pak probíhala 48 hodin při 37°C, přičemž po 24 hodinách a po 48 hodinách byly zhotoveny fotografie dokumentující růst jednotlivých kmenů za různých podmínek (Obr. 25 a 26).

Kmen	Koncentrace KCl a NaCl v minerálním médiu			
	0,05 mM KCl	0,05 mM KCl + 0,5 M NaCl	10 mM KCl	10 mM KCl + 0,5 M NaCl
168				
MP2				
1A839				
ES091				

Obr. 25 Srovnání růstu kmenů 168, MP2, 1A839 a ES091 po 24-hodinové kultivaci

Kmen	Koncentrace KCl a NaCl v minerálním médiu			
	0,05 mM KCl	0,05 mM KCl + 0,5 M NaCl	10 mM KCl	10 mM KCl + 0,5 M NaCl
168				
MP2				
1A839				
ES091				

Obr. 26 Srovnání růstu kmenů 168, MP2, 1A839 a ES091 po 48-hodinové kultivaci

Výsledky vyplývající z těchto srovnání lze shrnout takto:

➤ kmen 168

Na fotografiích zhotovených po 48-hodinové kultivaci je dobře patrné, že na médiu s nízkou koncentrací draselných iontů (0,05 mM) roste kmen pomaleji, než je tomu v případě růstu za dostatečné koncentrace draselných iontů (10 mM). I přesto je patrné, že buňky tohoto kmene jsou schopny vyrovnat se s osmotickým stresem i na médiu s nízkou koncentrací draselných iontů.

➤ kmen MP2

V případě kultivace na médiu s 10 mM koncentrací KCl, a to i při vystavení osmotickému stresu, vykazuje kmen MP2 oproti kmenu 168 pouze mírně sníženou schopnost růstu. V případě růstu na médiích s 0,05 mM koncentrací KCl je patrné výrazné snížení růstu. Růst na médiu s touto nízkou koncentrací KCl je ještě více zpomalen při působení osmotického stresu.

➤ kmen 1A839

Kmen 1A839 vykazuje ve srovnání s kmeny 168 i MP2 podstatné snížení schopnosti růstu za všech testovaných kultivačních podmínek, přičemž na médiích obsahujících 0,05 mM koncentrací KCl je pokles schopnosti růstu ještě větší než na médiu s 10 mM koncentrací KCl.

➤ kmen ES091

Vykazuje obdobné růstové vlastnosti jako kmen 1A839, od něhož je odvozen. Jelikož kmen 1A839 nemá přerušen gen *yxkO*, jsou tyto růstové vlastnosti obou kmenů způsobeny mutacemi *ΔdhsA4* a *degU32(Hy)* a nesouvisí s přerušením genu *yxkO*.

Limitovaný růst kmenů 1A839 i ES091 na těchto pevných minerálních médiích byl potvrzen i při kultivaci kmenů v tekutém minerálním médiu I (viz. Kap. 3.1.9.2). Při všech dalších kultivacích v tekutém minerálním médiu byly proto všechny čtyři kmeny kultivovány v tekutém minerálním médiu II, jež je obohaceno 0,05% kyselým hydrolyzátem kaseinu, aby byl zajištěn růst kmenů 1A839 a ES091. Složení minerálního média II (viz. Kap. 3.1.9.2) je podobné médiu popsanému v práci Kunsta a Rapoport, na němž byly kultivovány kmeny izolované a charakterizované Amatim a spolupracovníky, a tedy i kmen 1A839. (Kunst a Rapoport 1995; Amati et al. 2004)

4.2 Sledování změn exprese vybraných genů metodou hybridizace

Cíl: Srovnat expresi vybraných genů – yxkO, hag a ydaG - v kmenech divokém a mutantních kmenech za nestresových a stresových (osmotický stres) podmínek s využitím hybridizace.

Po úspěšném dokončení přípravy rekombinantního kmene ES091 bylo naším cílem sledovat změny exprese vybraných genů – *yxkO*, *hag* a *ydaG* - za stresových (přidání NaCl k bakteriální kultuře) a nestresových podmínek.

Cílem sledování změn exprese genu *yxkO* bylo navázat na předchozí výsledky naší laboratoře a přispět k objasnění funkce, kterou by produkt tohoto genu mohl plnit v procesu osmoadaptace, resp. obecné stresové odpovědi (viz. Kap. 2.3.3).

Navíc dílčí výsledky z naší laboratoře naznačovaly možné zapojení produktu genu *yxkO* v regulaci exprese genu *hag* kódujícího protein flagelin, což je majoritní protein vlákna bakteriálního bičíku. Průběžné výsledky proteomických studií z naší laboratoře naznačovaly mj. přítomnost zkrácené izoformy flagelinu u mutantního kmene, ale nikoli u kmene divokého, po vystavení buněk osmotickému stresu. Dále je dokázáno, že vystavení buněk hyperosmotickému stresu vede k indukci obecné stresové odpovědi a zároveň inhibici exprese genů chemotaxe a motility, včetně genu *hag* (Steil et al. 2003; Höper et al. 2006). Cílem sledování změn transkripce genu *hag* bylo zjistit, zda přítomnost kratší formy flagelinu je způsobena regulací zprostředkovanou produktem genu *yxkO* na transkripční úrovni.

Třetím vybraným genem, jehož exprese byla sledována, byl gen *ydaG*. Protein YdaG je považován za protein obecné stresové odpovědi a byl využíván jako pozitivní kontrola.

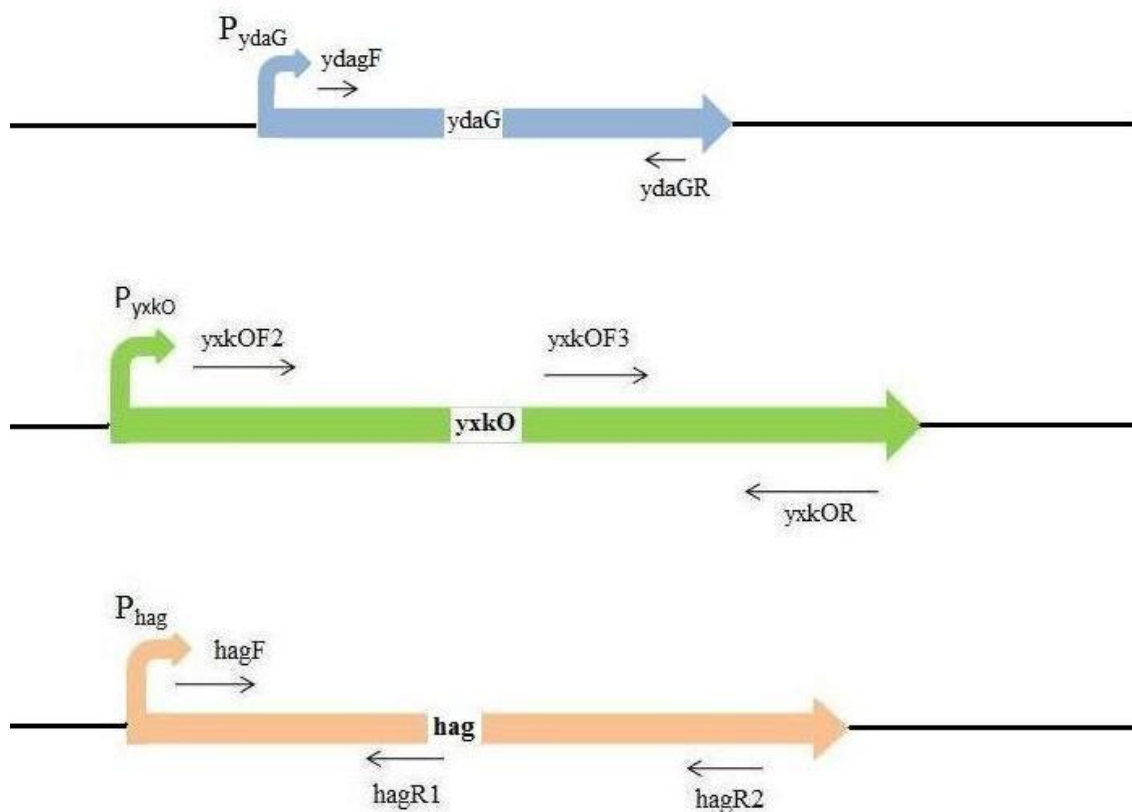
4.2.1 Příprava neradioaktivně značených DNA sond pro hybridizaci

Pro přípravu DNA sond byla využita jako templát chromozomální DNA *Bacillus subtilis* 168, na níž byly s využitím sad primerů (viz. Kap. 3.1.3) amplifikovány příslušné úseky genů *yxkO*, *hag* a *ydaG*.

V případě genů *yxkO* a *hag* byly připravovány vždy dvě sondy ze dvou sad primerů:

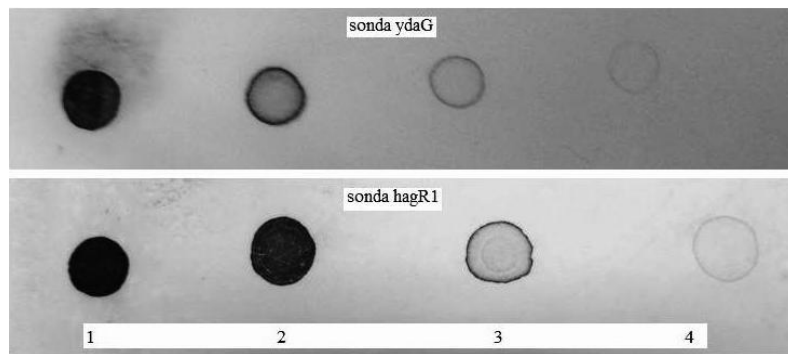
- A) hagF – hagR1
- B) hagF – hagR2
- C) yxkOF2 –yxkOR2
- D) yxkOF3 – yxkOR2

Schematické zobrazení cílových úseků primerů je na Obr. 27.



Obr. 27 Znárodnění cílových úseků primerů využitých při přípravě DNA sond

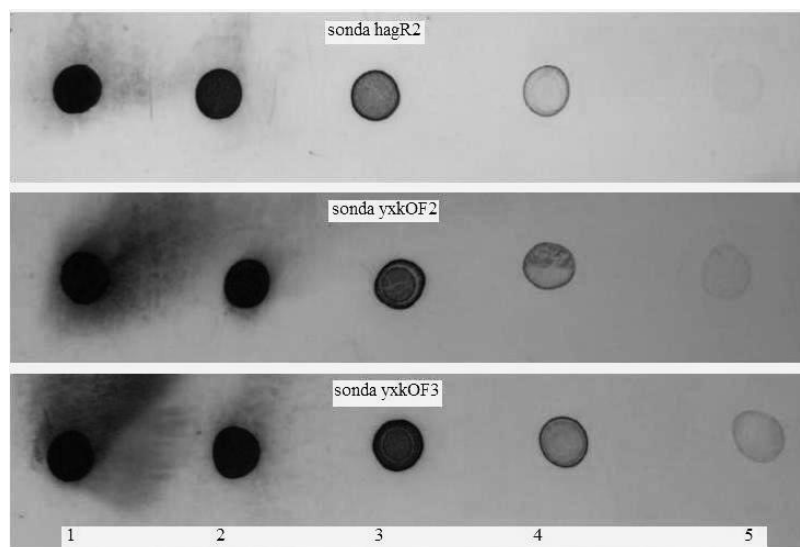
Sondy ydaG (cca 400 bp) a hagR1 (cca 300 bp) byly připraveny amplifikací příslušného úseku vymezeného primery metodou PCR (viz. Kap. 3.2.2.5) na templátu chromozomální DNA divokého kmene. Produkty reakcí byly přečištěny s využitím sady Silica Bead DNA Gel Extraction Kit a následně označeny neradioaktivní značkou DIG za využití Klenowova fragmentu (viz. Kap. 3.2.2.8.1). Sondy byly poté přečištěny gelovou filtrací (viz. Kap. 3.2.2.9) a vhodné ředění bylo stanoveno pomocí metody „dot blot“ – Obr. 28 (viz. Kap. 3.2.2.10) .



Obr 28. Testování sond ydaG a hagR1 metodou „dot blot“

Ředění: 1. 1:10 2. 1:100 3. 1:1000 4. 1:10 000

Pro získání lépe značených sond byla v dalším postupu využita metoda značení neradioaktivní značkou přímo během PCR reakce. Do příslušné PCR reakční směsi byla přidána značka DIG a v průběhu amplifikace genu byl produkt reakce označen přímo (viz. Kap. 3.2.2.8.2). Takto připravené sondy hagR2 (cca 640 bp), yxkoF2 (cca 500 bp) a yxkOF3 (cca 300 bp) byly opět přečištěny gelovou filtrací (viz. Kap. 3.2.2.9) a vhodné ředění stanoveno metodou „dot blot“ – Obr. 29 (viz. Kap. 3.2.2.10)



Obr 29. Testování sond hagR2, yxkOF2 a yxkOF3 metodou „dot blot“

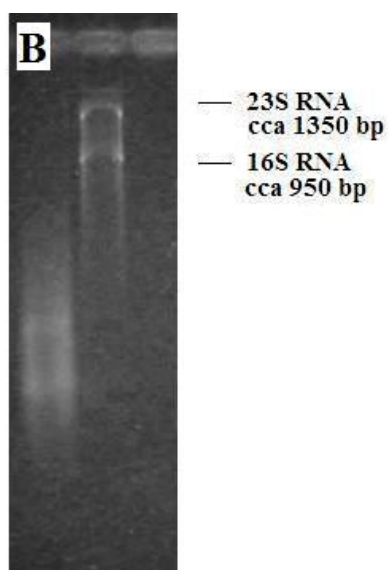
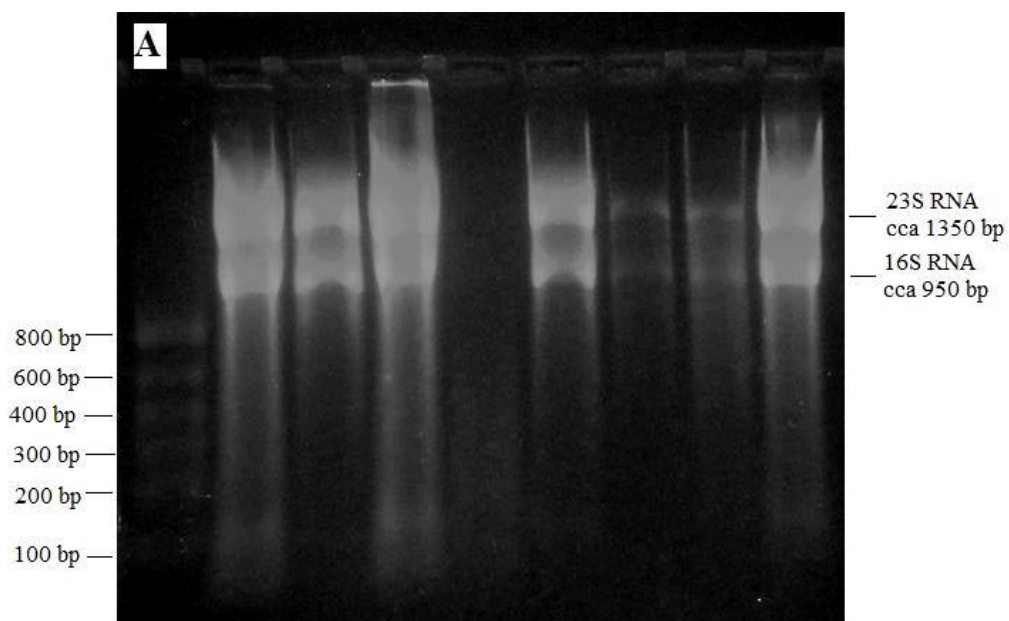
Ředění: 1. 1:10 2. 1:100 3. 1:1000 4. 1:10 000 5. 1:100 000

4.2.2 Hybridizace metodou Northern blot a detekce

Kmeny 168, MP2, 1A839 a ES091 byly kultivovány v tekutém minerálním médiu II. Médium, na němž byly kultivovány rekombinantní kmeny MP2 a ES091, obsahovalo erytromycin (0,3 µg/ml) zajišťující selekční tlak k udržení plasmidu v kultuře.

Noční kultury příslušných kmenů byly přeočkovány do čerstvého minerálního média II a kultivovány při 37°C na vzdušné třepačce. Průběžně byla měřena optická denzita kultury. Při dosažení pozdní exponenciální fáze růstu byly kultury znovu přeočkovány do čerstvého média II. Po další kultivaci a měření optické denzity, když její hodnota dosáhla $OD_{600} \sim 0,3$, byla část kultury vystavena osmotickému stresu, který byl způsoben přidáním NaCl do kultivačního média v konečné koncentraci 0,5 M. Kultivace probíhala dalších 20 min. Poté byly stresované i nestresované kultury stočeny a buněčný pelet resuspendován v RNA denaturačním roztoku a ihned zmrazen v tekutém dusíku.

Následně byla izolována RNA (viz. Kap. 3.2.3.1) a integrita vyizolované RNA byla ověřena agarózovou elektroforézou (viz. Kap. 3.2.3.2; Obr. 30A). Z elektroforézy RNA však nelze odhadnout množství vyizolované RNA. To je dáno způsobem přípravy vzorku na elektroforézu, kdy mikrozkušavka obsahující RNA byla jen krátce zvortexována a následně z ní byla část objemu odebrána a dále zpracována podle postupu uvedeného v Kap. 3.2.3.2. Přesto je patrné, že v případě vzorku MP2S došlo k degradaci RNA. Z tohoto důvodu byl kmen MP2 kultivován znovu a izolace RNA byla zopakována (Obr. 30B).



Obr. 30 Integrita RNA

A) zleva: hmotnostní standard, vzorky v pořadí 168N, 168S, MP2N, MP2S, 1A839N, 1A839S, ES091N, ES091S

B) zleva: hmotnostní standard, vzorek MP2S

N – nestresovaná kultura S – stresovaná kultura (NaCl)

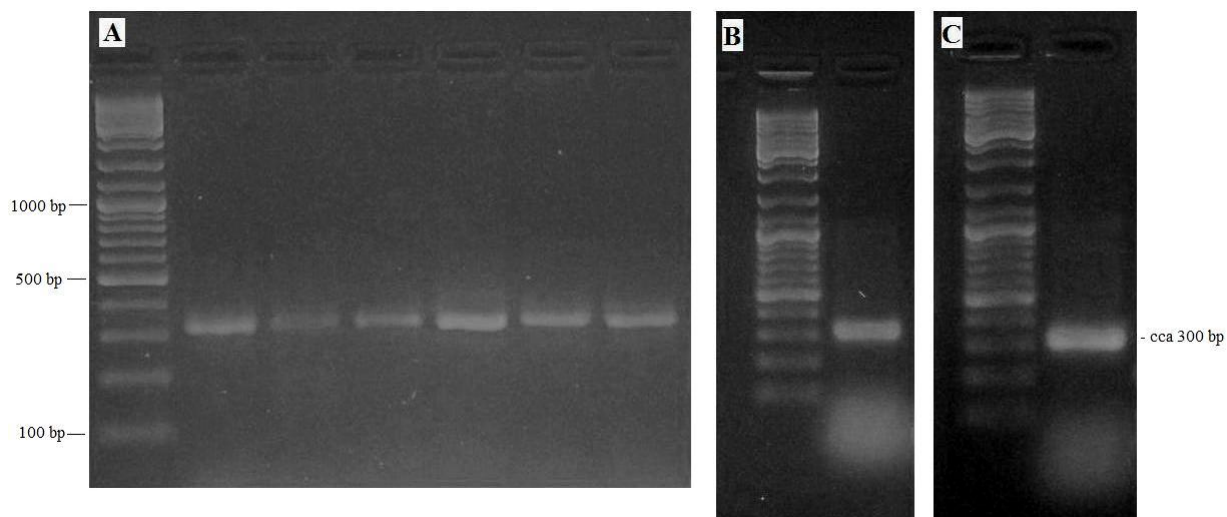
Vyizolovaná RNA ze všech vzorků byla poté metodou Northern blot přenesena na nylonovou membránu a fixována působením UV záření (viz. Kap. 3.2.3.3). Následně byla membrána hybridizována s označenou DNA sondou hagR1. Hybridizace probíhala přes noc při teplotě 55°C (viz. Kap. 3.2.3.4). Po dokončení hybridizace byla navázaná sonda detekována pomocí protilátky Anti-DIG s konjugovanou alkalickou fosfatázou. K vizualizaci navázané protilátky byla použita metoda chemiluminiscenční detekce s využitím CSPD jako substrátu pro alkalickou fosfatázu (viz. Kap. 3.2.3.5).

Přestože byla hybridizace opakována dvakrát, nepodařilo se získat žádné průkazné výsledky. Možným důvodem byla příliš nízká koncentrace RNA ve vzorku naneseném na agrózový gel a následně přeneseném na membránu. Proto byly všechny kmeny kultivovány znovu a opět byla izolována RNA. Veškerá vyizolovaná RNA pak byla použita pro přípravu nové membrány. Hybridizace a detekce proběhla stejným, výše uvedeným způsobem. Ani tentokrát se však nepodařilo získat tímto postupem žádné výsledky.

4.2.3 Příprava cDNA a amplifikace transkriptů metodou PCR

Jelikož hybridizace DNA sondy s RNA fixovanou na membráně se opakovaně nezdařila, bylo rozhodnuto izolovat RNA ještě jednou a následně ji převést na cDNA, s níž bylo dále pracováno.

Znovu byly nakultivovány všechny čtyři kmeny a vyizolována RNA. Získaná RNA pak byla převedena enzymatickou reakcí RNA dependentní DNA polymerázy na cDNA (viz. Kap. 3.2.3.6), jež byla dále amplifikována s využitím Klenowova fragmentu (viz. Kap. 3.2.3.7). Takto získaná cDNA pak sloužila jako templát pro PCR reakce. S využitím sad primerů, které sloužily pro přípravu DNA sond, byla zjišťována přítomnost příslušného transkriptu v jednotlivých vzorcích. U rekombinantních kmenů MP2 a ES091 byla navíc zjišťována přítomnost transkriptu z primerů yxkOSDF a mutinR. Výsledky těchto reakcí jsou na Obr. 31 – 36 a jsou shrnuty v Tabulce 1.



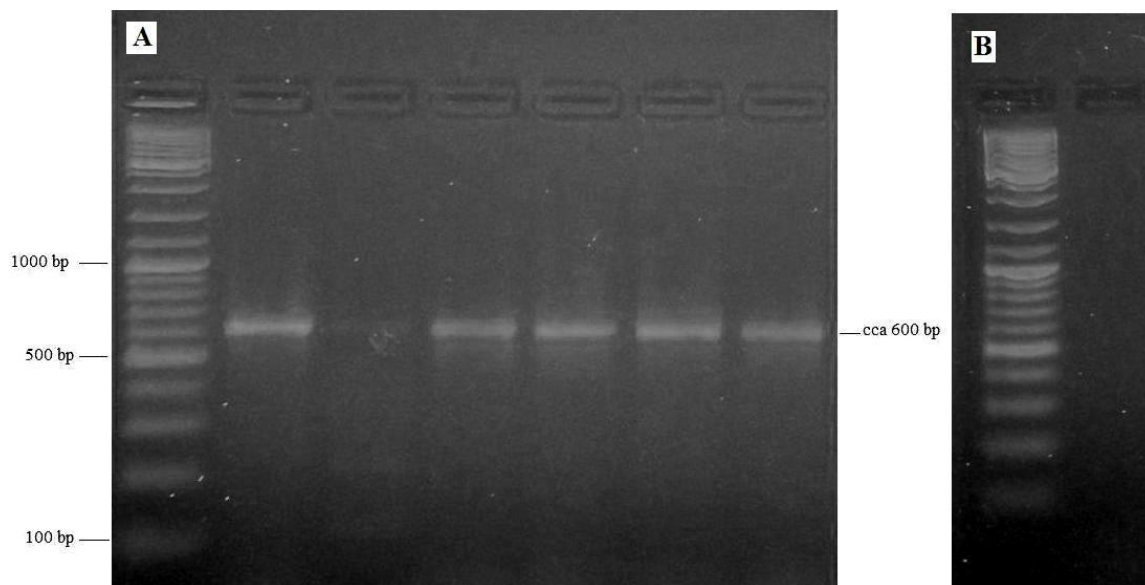
Obr. 31 Výsledky PCR reakcí z primerů hagF-hagR1

A) zleva: hmotnostní standar, vzorky 168N, 168S, MP2N, 1A839N, 1A839S, ES091N

B) zleva: hmotností standard, vzorek MP2S

C) zleva: hmotností standard, vzorek ES091S

N – nestresovaná kultuta S- stresovaná kultura (NaCl)

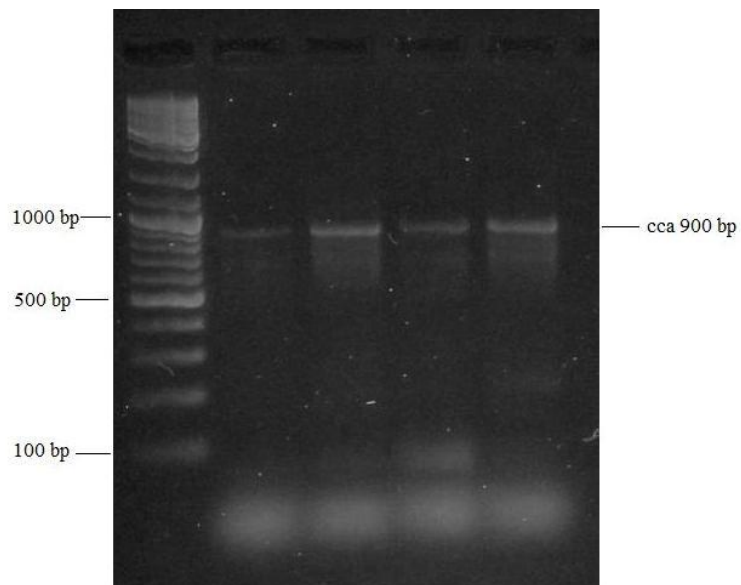


Obr. 32 Výsledky PCR reakcí z primerů hagF2-hagR1

A) zleva: hmotností standard, vzorky 168N, 168S, MP2N, 1A839N, 1A839S, ES091

B) zleva: hmotností standard, vzorky MP2S, ES091S

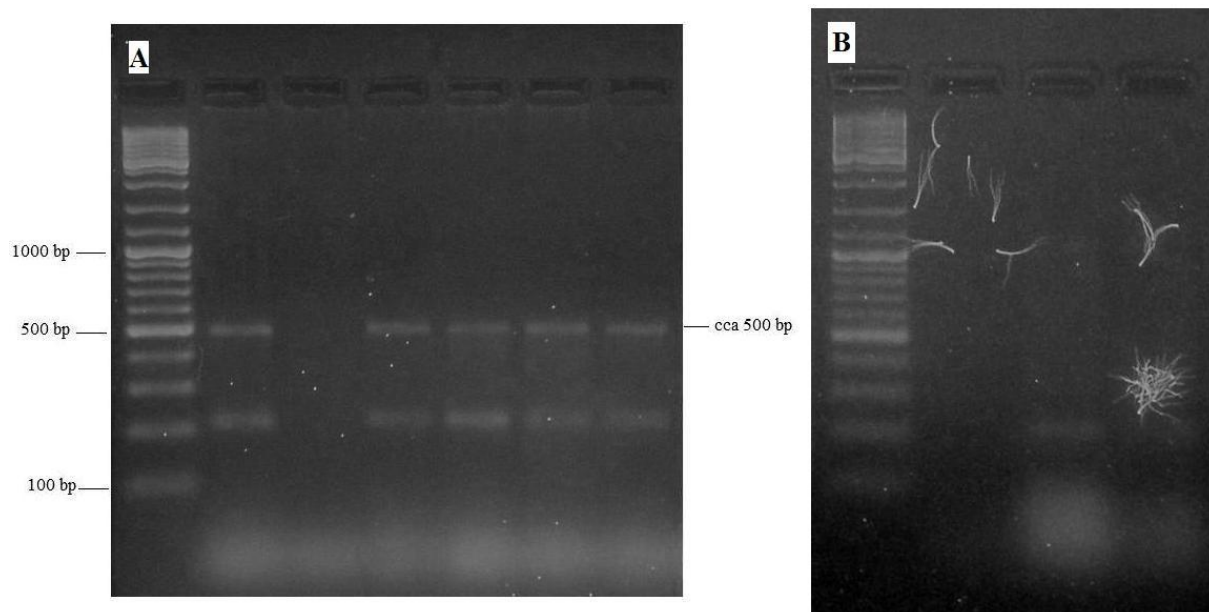
N - nestresovaná kultuta S- stresovaná kultura (NaCl)



Obr. 33 Výsledky PCR reakcí z primerů yxkoSDF-mutinR

Zleva: hmotnostní standard, vzorky MP2N, MP2S, ES091N, ES091S

N – nestresovaná kultura S- stresovaná kultura (NaCl)

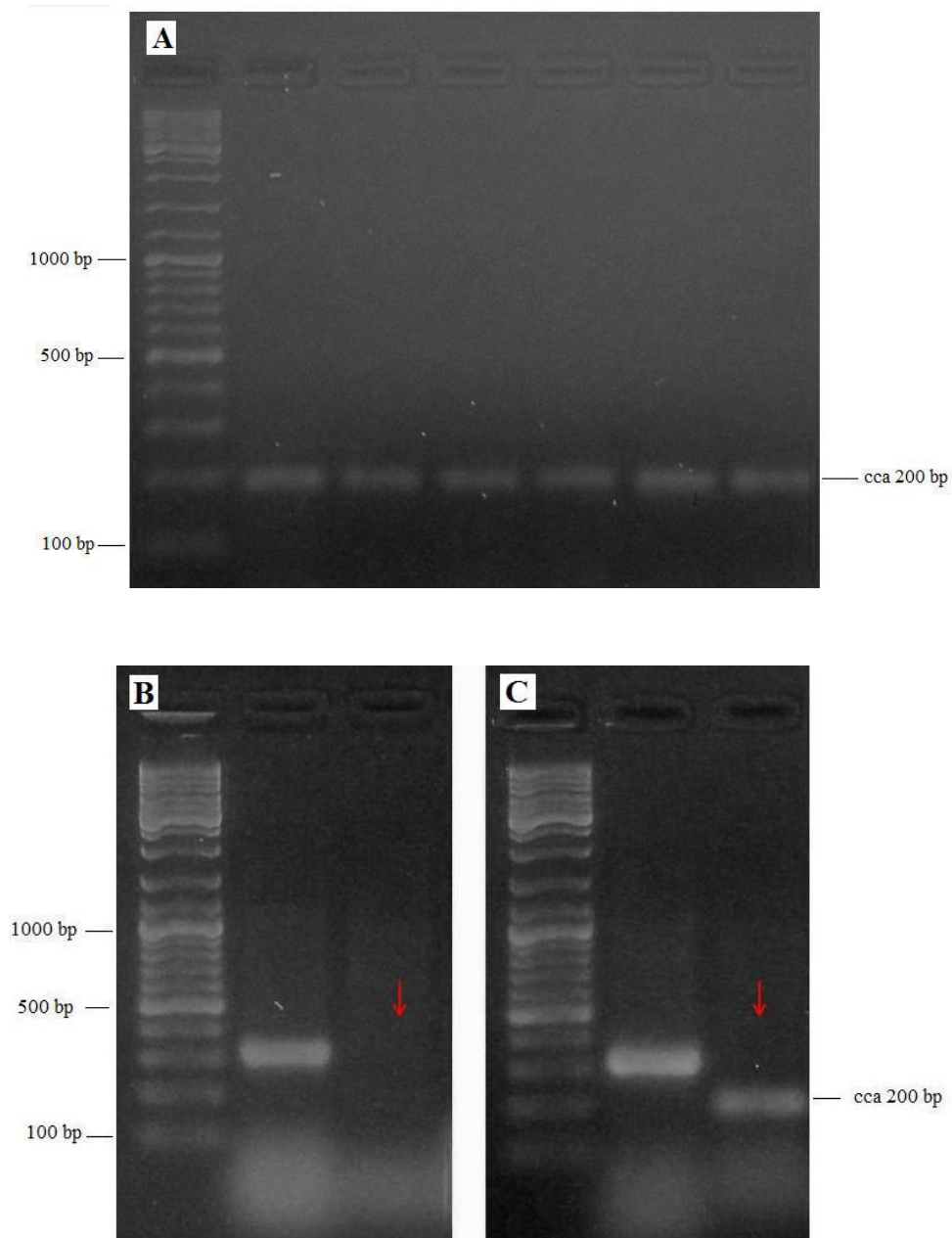


Obr. 34 Výsledky PCR reakcí z primerů yxkOF2-yxkOR

A) zleva: hmotnostní standard, vzorky 168N, 168S, MP2N, MP2S, 1A839N, 1A839S, ES091

B) zleva: hmotnostní standard, vzorky 168S, MP2S, ES091S

N – nestresovaná kultura S- stresovaná kultura



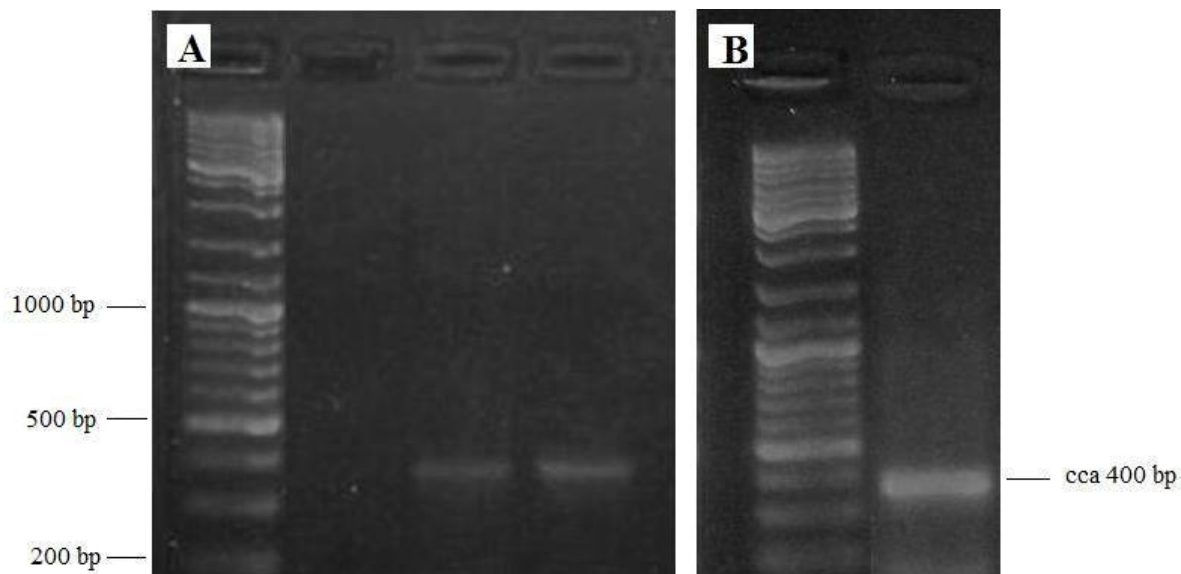
Obr. 35 Výsledky PCR reakcí z primerů yxkOF3-yxkOR – u B) a C) vyznačeny červenou šipkou

A) zleva: hmotnostní standard, vzorky 168N, 168S, MP2N, 1A839N, 1A839S, ES091N

B) vzorek MP2S; zleva: hmotnostní standard, (PCR produkt z primerů hagF-hagR1), PCR produkt z primerů yxkOF3-yxkOR - vyznačeno **červenou šipkou!**

C) vzorek ES091; zleva: hmotnostní standard, (PCR produkt z primerů hagF-hagR1), PCR produkt z primerů yxkOF3-yxkOR - vyznačeno **červenou šipkou!**

N – nestresovaná kultura S- stresovaná kultura (NaCl)



Obr. 36 Výsledky PCR reakcí z primerů ydaGF-ydaGR

A) zleva hmotnostní standard, vzorky MP2S, 1A839S, ES091S

B) zleva: hmotnostní standard, vzorek 168S oříznout

N – nestresovaná kultura S- stresovaná kultura

vzorek	hagF	hagF	yxkOF2	yxkOF3	ydaGF	yxkOSDF
	hagR1	hagR2	yxkOR	yxkOR	ydagR	mutinR
168N	+	+	+	+	N	N
168S	+	-	-	+	+	N
MP2N	+	+	+	+	N	+
MP2S	+	-	-	-	-	+
1A839N	+	+	+	+	N	N
1A839S	+	+	+	+	+	N
ES091N	+	+	+	+	N	+
ES091S	+	-	-	+	+	+

Tabulka 1 Souhrnná tabulka výsledků PCR reakcí na templátu cDNA

+ značí přítomnost produktu předpokládané délky

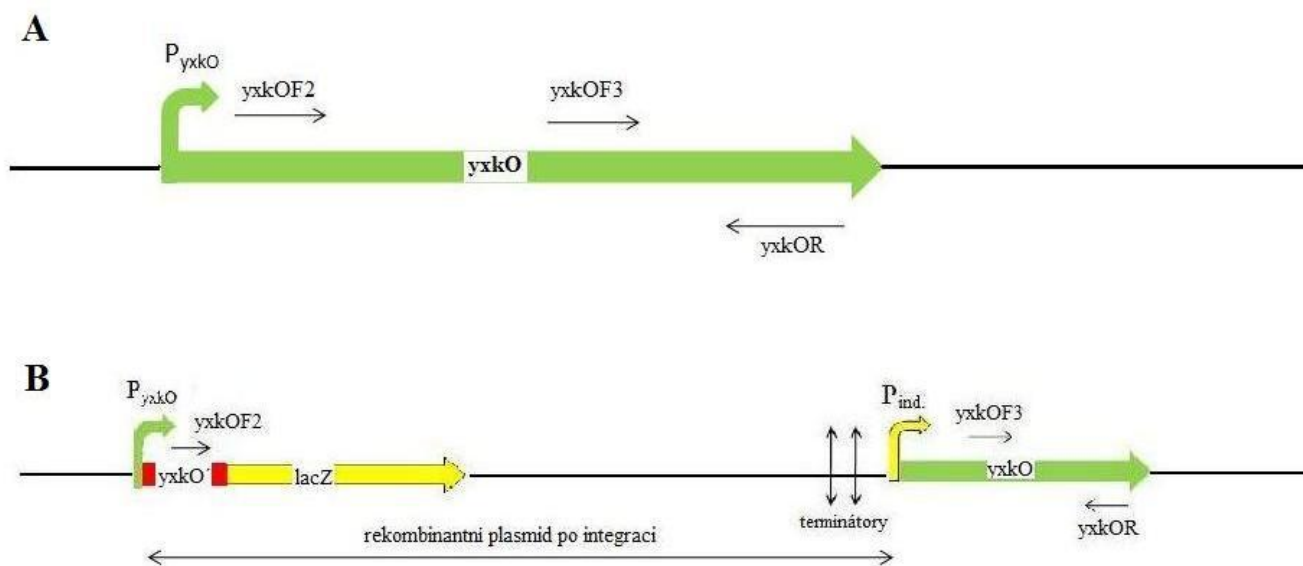
- značí nepřítomnost produktu předpokládané délky

N - neurčováno

Přítomnost produktu PCR reakce z primerů *yxkOSDF* a *mutinR* (lokalizace cílových míst primerů viz. Kap. 4.1, Obr. 23) u rekombinantních kmenů MP2 a ES09 naznačuje, že k expresi z přirozeného promotoru genu *yxkO* dochází jak za nestresových, tak stresových podmínek.

K produkci transkriptu odpovídajícího oblasti vymezené primery *yxkOF3* a *yxkOR* z přirozeného promotoru genu *yxkO* by u rekombinantních kmenů MP2 a ES091 nemělo docházet z důvodu integrace plasmidu, jehož sekvence zahrnuje i dva silné terminátory transkripce (Obr. 37). Přítomnost tohoto produktu u mutantních kmenů MP2 a ES091 naznačuje, že by mohlo docházet k transkripci této oblasti z promotoru lokalizovaného za genem *yxkO* a docházelo by tak k produkci antisense RNA, prozatím neznámé velikosti a funkce, jejíž sekvence zahrnuje i oblast vymezenou primery *yxkOF3* a *yxkOR*.

Stejně tak by u rekombinantních kmenů MP2 a ES091 neměl být přítomen ani produkt PCR reakce z primerů *yxkOF2* a *yxkOR* (Obr 37). Přesto došlo ke slabé amplifikaci produktu u těchto kmenů (vzorky nestresovaných kultur). To lze vysvětlit pouze tím, že u malé části buněk došlo během kultivace k vyštěpení plasmidu z chromozomu. Z důvodu perzistence proteinu poskytujícího rezistenci k erytromycinu však byly tyto buňky schopny nadále růst na médiu s tímto antibiotikem i po vyštěpení plasmidu z chromozomu.



Obr. 37 Schematické zobrazení oblasti genu *yxkO* u jednotlivých kmenů

A) kmeny 168 a 1A839

B) kmeny MP2 a ES091 s integrovaným plasmidem

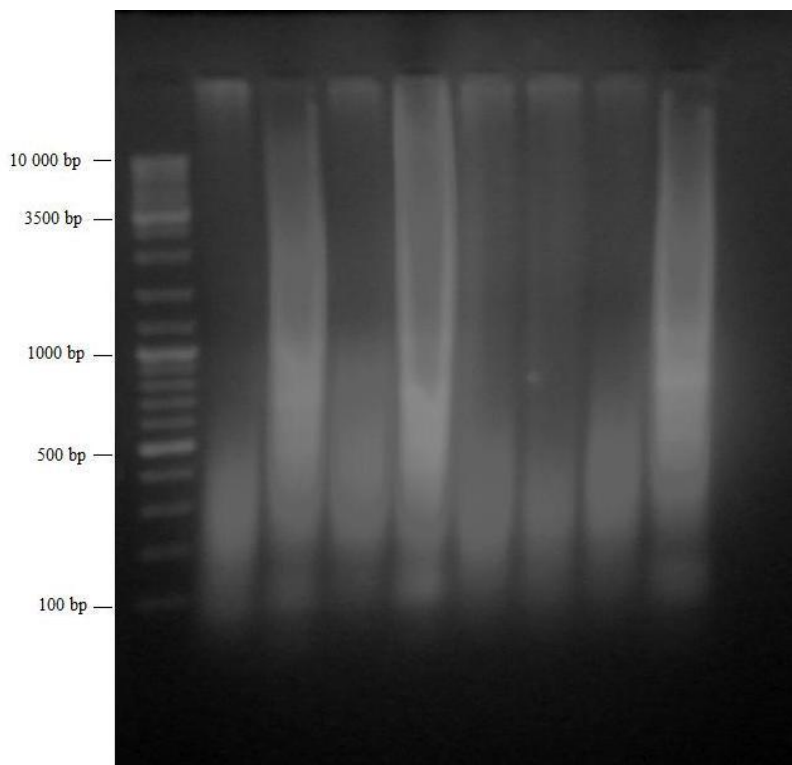
Výsledky PCR reakcí ze sady primerů *ydaGF* a *ydaGR* naznačují, že syntéza proteinu obecné stresové odpovědi *YdaG* je ovlivněna přerušením genu *yxkO*, neboť u mutantního kmene MP2 v případě stresované kultury k jeho syntéze nedochází. Přítomnost produktu reakce u stresovaného vzorku druhého mutantního kmene ES091 by mohl naznačovat, že mutace způsobená přerušením genu *yxkO* se neprojeví v důsledku genetického pozadí kmene, od něhož je mutantní kmen odvozen, a že na regulaci produkce *YdaG* se podílejí regulátory genů stacionární fáze *CodY* a *DegU*.

V případě sady primerů *hagF-hagR1* byl PCR produkt přítomen u všech vzorků stresovaných i nestresovaných kultur. PCR produkt z primerů *hagF-hagR2* byl přítomen u všech vzorků nestresovaných kultur, zatímco v případě vzorků stresovaných kultur byl přítomen jen u kmene 1A838, ale u kmenů 168, MP2 a ES091 nikoli (lokalizace cílových míst primerů – Kap. 4.2.1, Obr. 27). Výsledky těchto PCR reakcí naznačují, že přerušení genu *yxkO* nemá vliv na transkripci genu *hag* při vystavení buněk osmotickému stresu. Zdá se, že osmotický stres vede spíše k destabilizaci *hag*-mRNA, přičemž možným mechanismem je degradace mRNA od C-konce (produkt z primerů *hagF-hagR1*, který odpovídá N-konci proteinu flagelinum je přítomen u všech vzorků).

4.2.4 Hybridizace metodou Southern blot a detekce

Po dokončení PCR reakcí a ověření, že pomocí této metody lze detekovat přítomnost jednotlivých transkriptů v jednotlivých vzorcích nestresovaných a stresovaných kultur, byla cDNA využita pro tvorbu membrány.

Část cDNA byla odebrána (20 μ l; pouze u vzorků 168S, MP2S a ES091S 30 μ l) a rozdělena horizontální agarózovou elektroforézou (Obr. 38) a následně převedena na nylonovou membránu metodou Southern blot (viz. Kap. 3.2.2.11).



Obr. 38 Agarózový gel – rozdělení cDNA před přenosem na nylonovou membránu

Zleva: hmotnostní standard, vzorky: 168N, 168S, MP2N,MP2S, 1A839N, 1A839S, ES091N a ES091S

N – nestresovaná kultura S – stresovaná kultura (NaCl)

Membrána s navázanou cDNA byla hybridizována přes noc s DNA sondou při dané hybridizační teplotě (viz. Kap. 3.2.3.4). Navázaná sonda byla detekována chemiluminiscenční metodou (viz. Kap. 3.2.3.5). I přesto, že byla hybridizace provedena se třemi různými sondami – yxkOF3, hagR1 i ydaG – ani jednou se nepodařilo získat žádné výsledky.

Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto vyzkoušet pouze chemiluminiscenční detekci sondy („dot blot“) a zjistit, zda je metoda detekce spolehlivá. Sonda ydaG byla naředěna v poměrech 1:10,

1:100, 1:1000, 1:10 000 a 1:100 000 a vždy 10 μ l z příslušného ředění bylo napipetováno na nylonovou membránu. Po fixaci UV zářením byla membrána promyta v jednotlivých pufrech jako při chromogenní detekci (viz. Kap.3.2.2.10) pouze s tím rozdílem, že v závěrečné fázi bylo k detekci využito CSPD (viz. Kap. 3.2.3.5.). Po vyvolání filmu bylo jasně prokázáno, že chemiluminiscenční metoda detekce je spolehlivá, a že sonda ydaG je i v nízkých ředěních stále detekovatelná. Tím jsme vyloučili možnost selhání detekční metody.

4.3 Studium motility a morfologie

Cíl: Srovnat zda, a případně jak, se liší motilita a morfologie jednotlivých kmenů s využitím světelné a elektronové mikroskopie.

4.3.1 Studium motility s využitím světelného mikroskopu

Při studiu motility buněk jednotlivých kmenů bylo využito pozorování živých buněk pod světelným mikroskopem. Kmeny byly kultivovány v tekutém minerálním médiu II (viz. Kap. 3.1.9.2). Médium, na němž byly kultivovány mutantní kmeny MP2 a ES091, obsahovalo navíc erytromycin (0,3 μ l / ml).

Noční kultury byly přeočkovány do čerstvého média II a za průběžného proměřování optické denzity kultivovány do pozdní exponenciální fáze. Poté byly opět přeočkovány do čerstvého média a následně při optické denzitě $OD_{600} \sim 0,3$ byl odebrán vzorek č.1. Poté byla část kultury vystavena osmotickému stresu (NaCl v konečné koncentraci 0,5 M). Další vzorky č. 2 a č. 3 byly odebrány po přidání NaCl. Vzorek č. 2 byl odebrán 20 min po vystavení buněk osmotickému stresu (v tomto čase zpracovávána i kultura na izolaci RNA) a vzorek č. 3 byl odebrán 60 min po vystavení buněk osmotickému stresu (viz. Kap. 3.2.4.1).

Z odebraných vzorků byly připraveny nativní preparáty, jež byly pozorovány pod mikroskopem při 1000-násobném zvětšení. S využitím kamery připojené k mikroskopu byla zhotovena krátká videa, která dokumentují pohyblivost jednotlivých kmenů za nestresových a stresových podmínek (viz. CD příloha).

Výsledky pozorování lze stručně shrnout takto:

➤ kmen 168

před aplikací osmotického stresu buňky pohyblivé

20 min po stresu rychlost pohybu lehce snížena v porovnání s nestresovanou kulturou

60 min po stresu buňky nepohyblivé

➤ kmen MP2

před aplikací osmotického stresu buňky pohyblivé

20 min po stresu pohyblivé

60 min po stresu pohyblivé

➤ kmen 1A839

před aplikací osmotického stresu buňky pohyblivé

20 min po stresu pohyblivé

60 min po stresu pohyblivé

➤ kmen ES091

před aplikací osmotického stresu buňky pohyblivé

20 min po stresu pohyblivé

60 min po stresu pohyblivé

V případě kmenů 1A839 a ES091 byl tento výsledek očekáván, neboť jak již bylo uvedeno výše (viz. Kap. 2.5.1.1.2 a 4.1.3), tyto kmeny nesou supresorovou mutaci vedoucí ke konstitutivní expresi operonu *fla-che*. Srovnání kmenů 168 a MP2 však jasně dokazuje, že přerušení genu *yxkO* ovlivňuje motilitu bakterií, neboť buňky kmene MP2 vykazovaly stejnou míru pohyblivosti před i po osmotickém stresu, zatímco divoký kmen 168 schopnost pohybu po působení osmotického stresu ztratil.

4.3.2 Studium změn motility pomocí elektronové mikroskopie

Po zjištění, že přerušení genu *yxkO* u kmene MP2 vede k zachování schopnosti motility i po osmotickém stresu, zatímco divoký kmen 168 schopnost pohybu ztrácí, bylo dalším krokem pokusit se zjistit, zda dochází u kmene 168 ke ztrátě bičíku, nebo zda je bičík přítomen a neschopnost pohybu je dána prozatím neznámým regulačním mechanismem zastavujícím jeho pohyb. K tomuto účelu jsme se rozhodli využít elektronovou mikroskopii.

4.3.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro studium motility buněk před osmotickým a po osmotickém stresu, resp. při snaze zjistit zda buňky kmene 168 ztrácí po vystavení osmotickému stresu bičík či nikoli, byla nejprve využita skenovací elektronová mikroskopie.

Standardní postup přípravy preparátu pro skenovací elektronovou mikroskopii je následující:

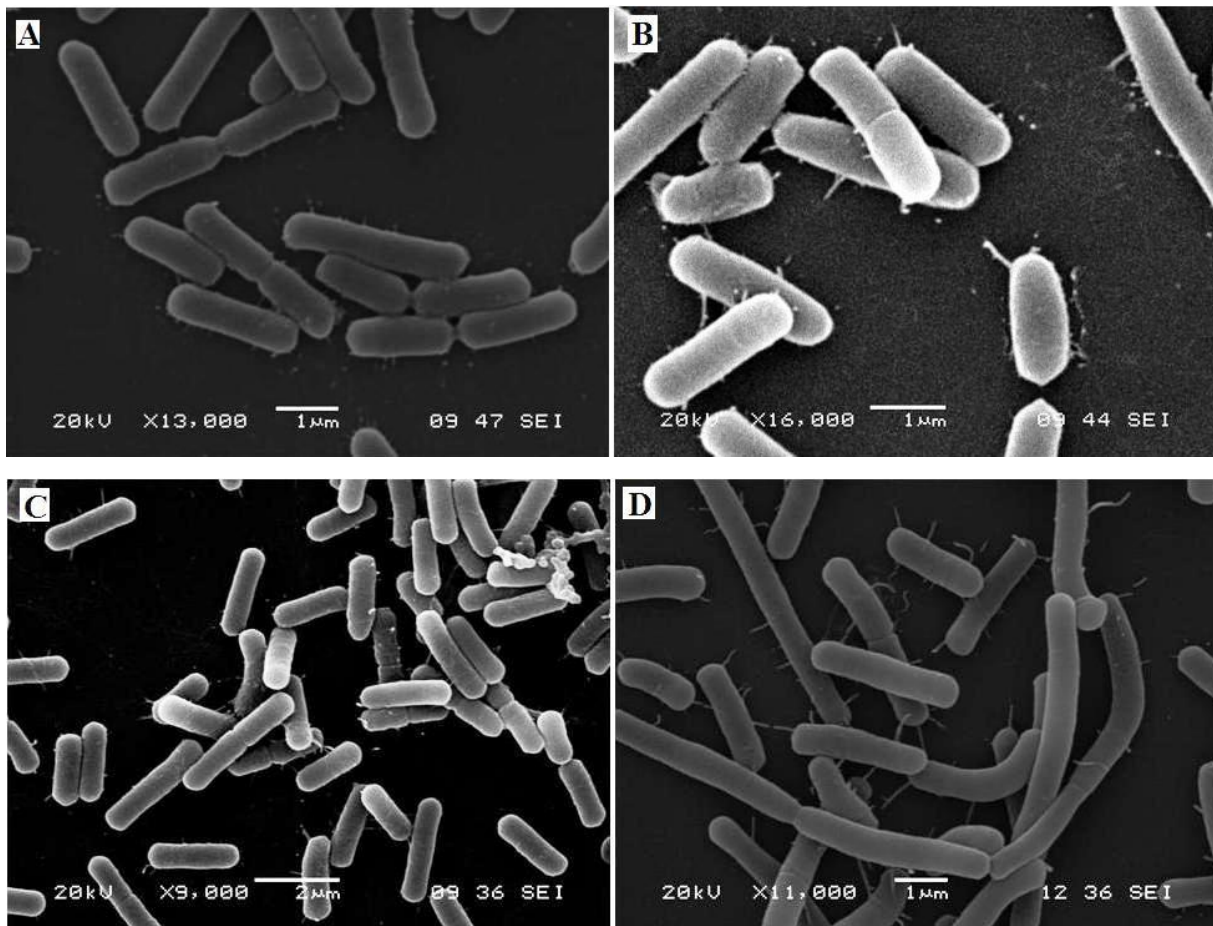
- fixace vzorku 2,5 % glutaraldehydem a následně 4% oxidem osmičelým
- odvodnění preparátu vzestupnou alkoholovou řadou
- postupné nahrazení 100% etanolu acetonem
- vysušení metodou kritického bodu
- pokovení

Tento standardní postup se nám však neosvědčil a z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno několik jeho modifikací:

- 1) fixace pouze 2,5% glutaraldehydem, pak postup stejný

- 2) počátek přípravy preparátu stejný jako u standardního postupu (fixace 2,5% glutaraldehydem i 4% oxidem osmičelým), liší se až konečná fáze přípravy preparátu - po odvodnění byl 100% etanol postupně nahrazen terciárním butanolem, preparát byl pak umístěn do lednice, kde došlo ke ztuhnutí butanolu, a ten byl následně odstraněn vakuovou sublimací
- 3) fixace pouze 2,5% glutaraldehydem + náhrada 100% etanolu terciárním butanolem

Při testování jednotlivých postupů byl využíván pouze kmen 168. Kultivace probíhala v minerálním médiu II (viz. Kap. 3.1.9.2). Noční kultura byla přeočkována do čerstvého media II a kultivována do pozdní exponenciální fáze. Následně byla opět přeočkována do čerstvého media II a kultivována do dosažení hodnoty optické denzity $OD_{600} \sim 0,3$, kdy byly odebrány vzorky. Část odebrané kultury (cca 10 μ l) byla napipetována na polylysinem ošetřená krycí skla a preparáty byly zpracovány podle jednotlivých modifikovaných postupů. Po pokovení byly preparáty pozorovány a byly zhotoveny fotografie (Obr. 39).



Obr. 39 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu – kmen 168, nestresovaná kultura

A) preparát připravený standardním postupem - GA; OsO₄; metoda kritického bodu

B) modifikovaný postup 1) – fixace pouze v GA; metoda kritického bodu

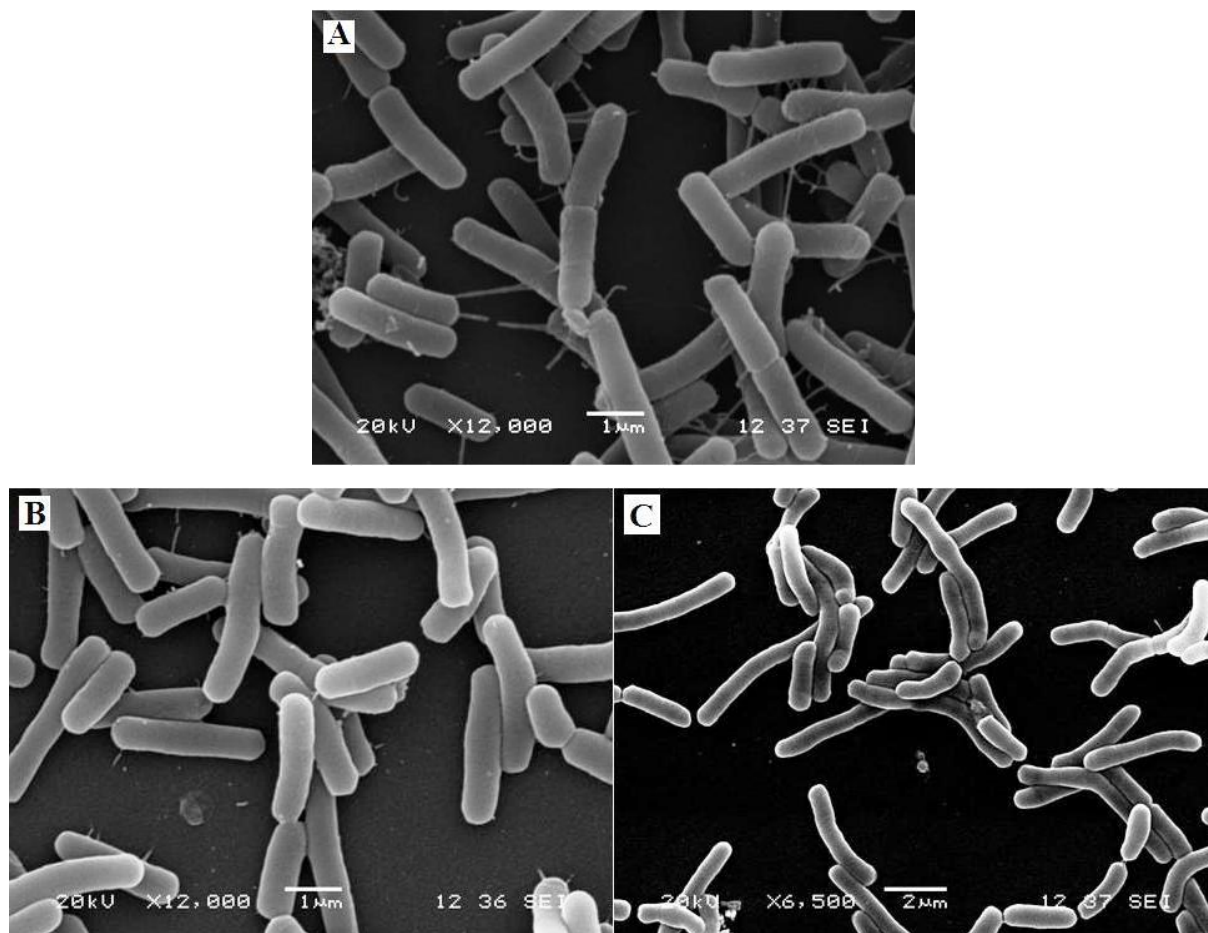
C) modifikovaný postup 2) – GA; OsO₄; sublimace

D) modifikovaný postup 3) - GA; sublimace

Z fotografií je patrné, že bičíky byly při zpracování preparátů všemi testovanými postupy poškozeny a ulámány. I přesto byl modifikovaný postup 3) vybrán jako nejvhodnější a byl dále upraven tak, aby pravděpodobnost ulámaní bičíků byla co nejvíce minimalizována. Z tohoto důvodu probíhala fixace ve zkumavkách s odebranými vzorky. Po přidání glutaraldehydu byly zkumavky umístěny na noc do lednice a buňky nechány sedimentovat. Při nanášení vzorků na krycí sklo nebyly vzorky pipetovány, ale část usazené bakteriální suspence byla opatrně přelita přes krycí sklo. Po cca 1 min byla přebytečná tekutina opatrně odsáta filtračním papírem. (viz. Kap. 3.2.4.3).

Preparáty byly připraveny pouze z kultury kmene 168, aby bylo zjištěno, zda je tento postup a metoda dostačující pro srovnání přítomnosti/nepřítomnosti bičíku. Kultivace probíhala

stejným způsobem jako kultivace pro zhotovení nativních preparátů a je blíže popsána v Kap. 3.2.4.3. V průběhu kultivace byly odebrány tři vzorky – před osmotickým stresem, 20 min a 60 min po vystavení kultury osmotickému stresu. Preparáty byly následně vyfotografovány (Obr. 40).



Obr. 40 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu – kmen 168

A) nestresovaná kultura

B) 20 min po vystavení kultury osmotickému stresu

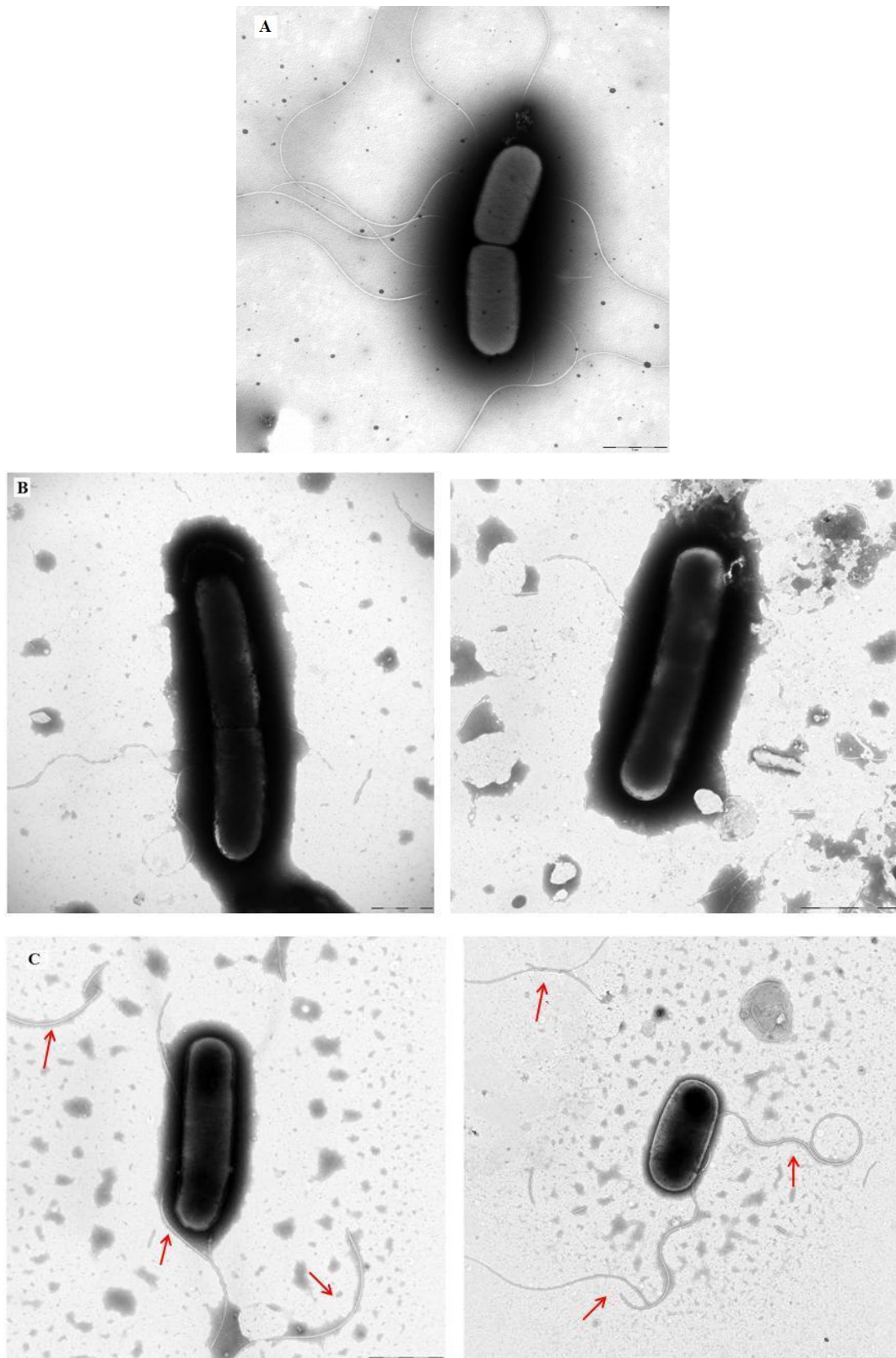
C) 60 min po vystavení kultury osmotickému stresu

Přestože při srovnání jednotlivých vzorků před a po osmotickém stresu se zdá, že buňky na preparátu ze vzorku odebraného 60 min po vystavení osmotickému stresu postrádají bičíky, nejsou tyto fotografie dostatečně průkazné, neboť během zpracování vzorků dochází k příliš velkému poškození bičíků.

4.3.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie

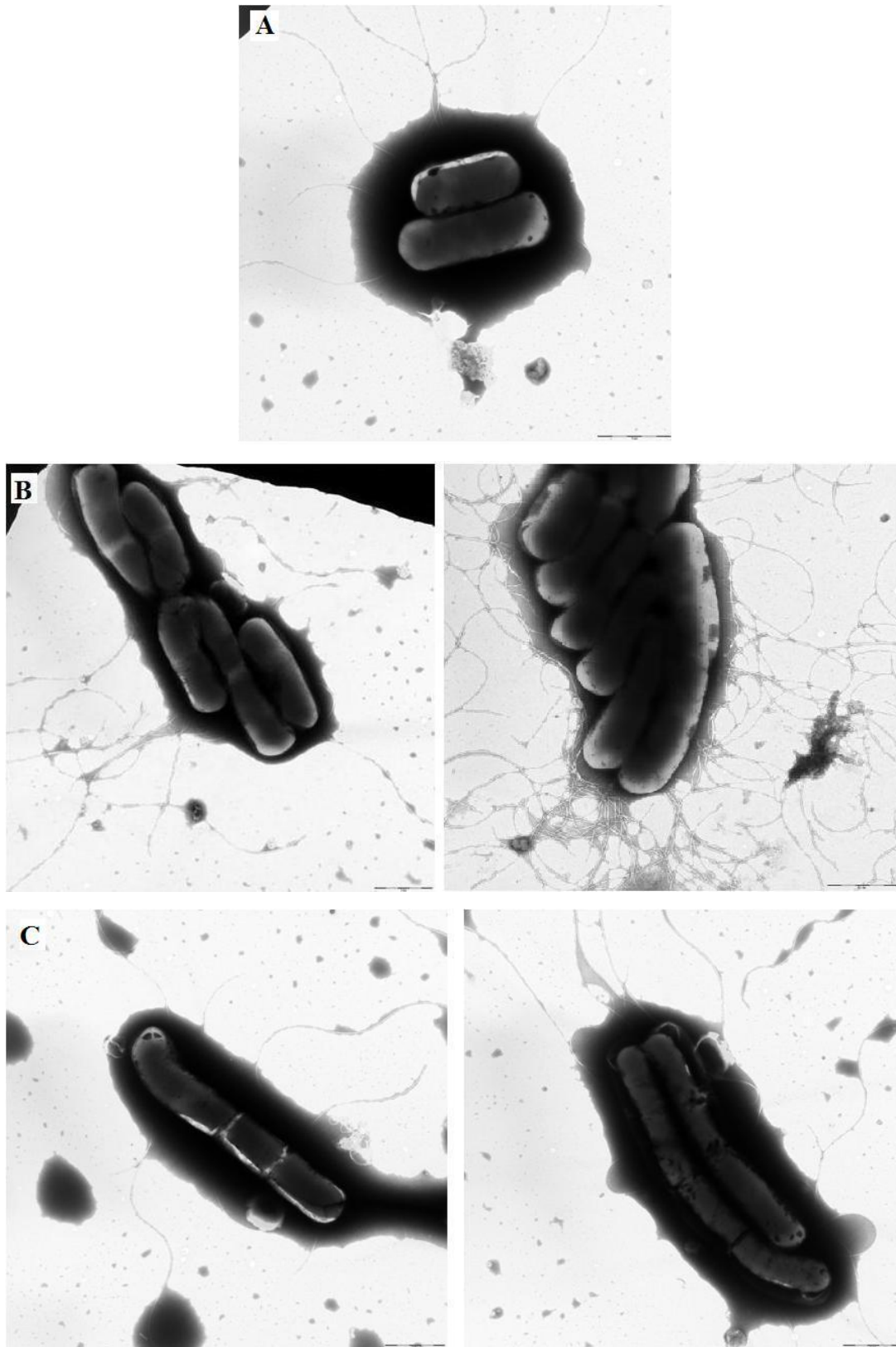
Protože se nepodařilo najít takový postup přípravy preparátu pro skenovací elektronovou mikroskopii, aby nedocházelo k poškození bičíků, nebylo možné tímto způsobem sledovat, zda buňky mají či nemají bičík v závislosti na tom, zda byly vystaveny působení osmotického stresu či nikoli. Byl proto zvolen jiný postup, využívající metodu negativního barvení a preparáty byly pozorovány transmisní elektronovou mikroskopii. Metoda spočívá v “obarvení” vzorku elektrondenzní látkou, např. kyselinou fosfowolframovou. Tato látka obklopí částice přítomné ve vzorku a vytvoří kolem nich temné pozadí, zatímco pozorované částice jsou světlé. Metoda je využívána především ve virologii, v mikrobiologii není její využití běžné. Je však vhodná právě pro vizualizaci bakteriálních bičíků.

Bakteriální kultury byly kultivovány v tekutém minerálním médiu II (viz. Kap. 3.1.9.2), které v případě kultivace rekombinantních kmenů MP2 a ES091 obsahovalo erytromycin (0,3 µg/ml). Noční kultury jednotlivých kmenů byly přeočkovány do čerstvého média II a kultivovány do pozdní exponenciální fáze. Následně byly kultury opět přeočkovány do čerstvého média II a kultivovány do dosažení hodnoty optické denzity $OD_{600} \sim 0,3$, kdy byl odebrán vzorek č. 1 a následně byla část kultury vystavena osmotickému stresu (0,5 M NaCl). Další dva vzorky (č. 2 a 3) byly odebrány 20 min a 60 min po vystavení osmotickému stresu. Na 50 µl kapku vzorku byla položena elektron-mikroskopická síťka. Po několika-vteřinové adsorpci byla síťka vyjmuta a preparát nechán zaschnout. Následně byl preparát obarven kyselinou fosfowolframovou a poté opět nechán zaschnout (viz. Kap. 3.2.4.4). Připravené preparáty byly pak pozorovány na transmisním elektronovém mikroskopu a zhotovené fotografie jsou na Obr. 41 - 44



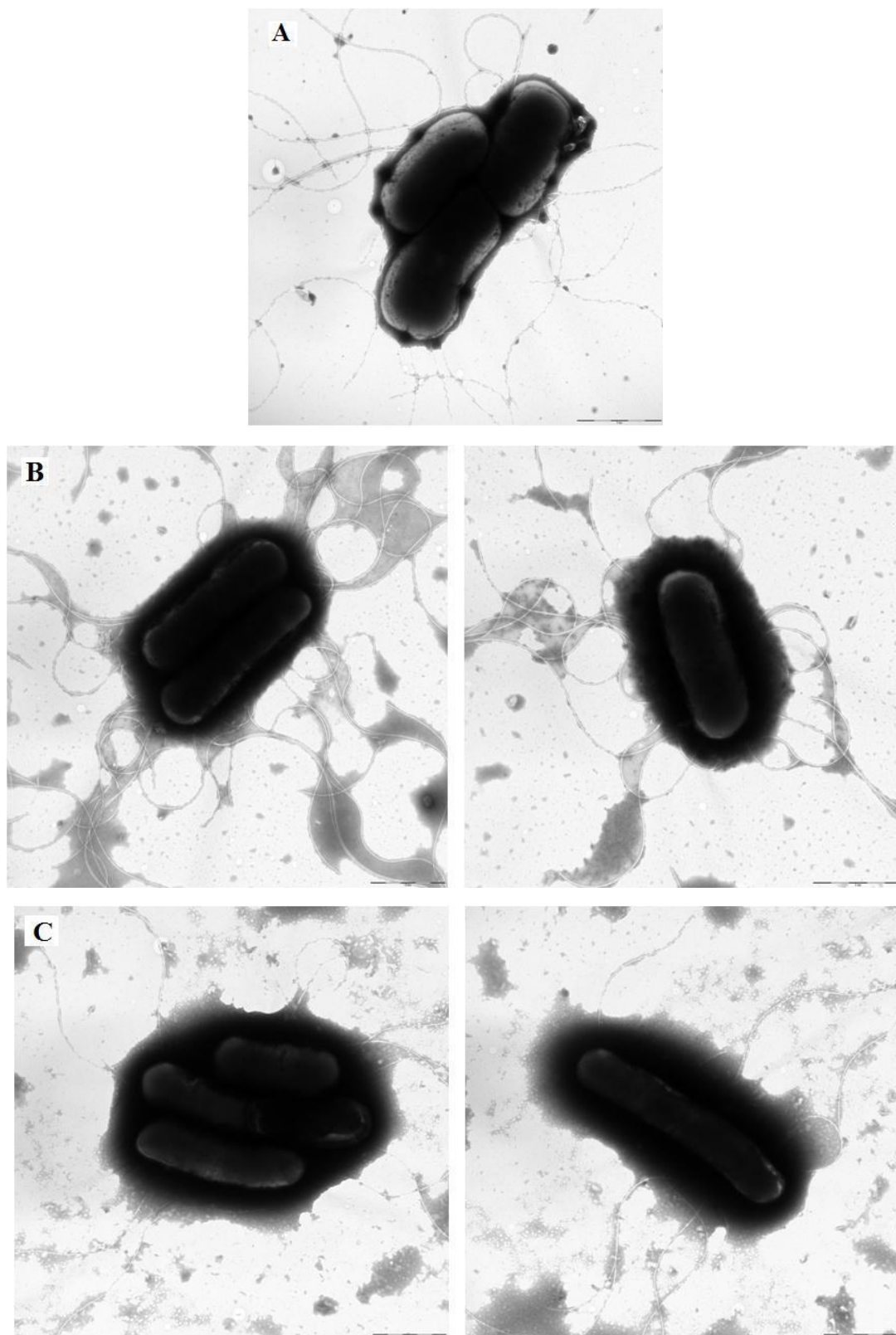
Obr. 41 Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – kmen 168

A) před vystavením osmotickému stresu; B) 20 min po vystavení osmotickému stresu; C) 60 min po vystavení osmotickému stresu (fragmenty bičičků vyznačeny červenými šipkami)



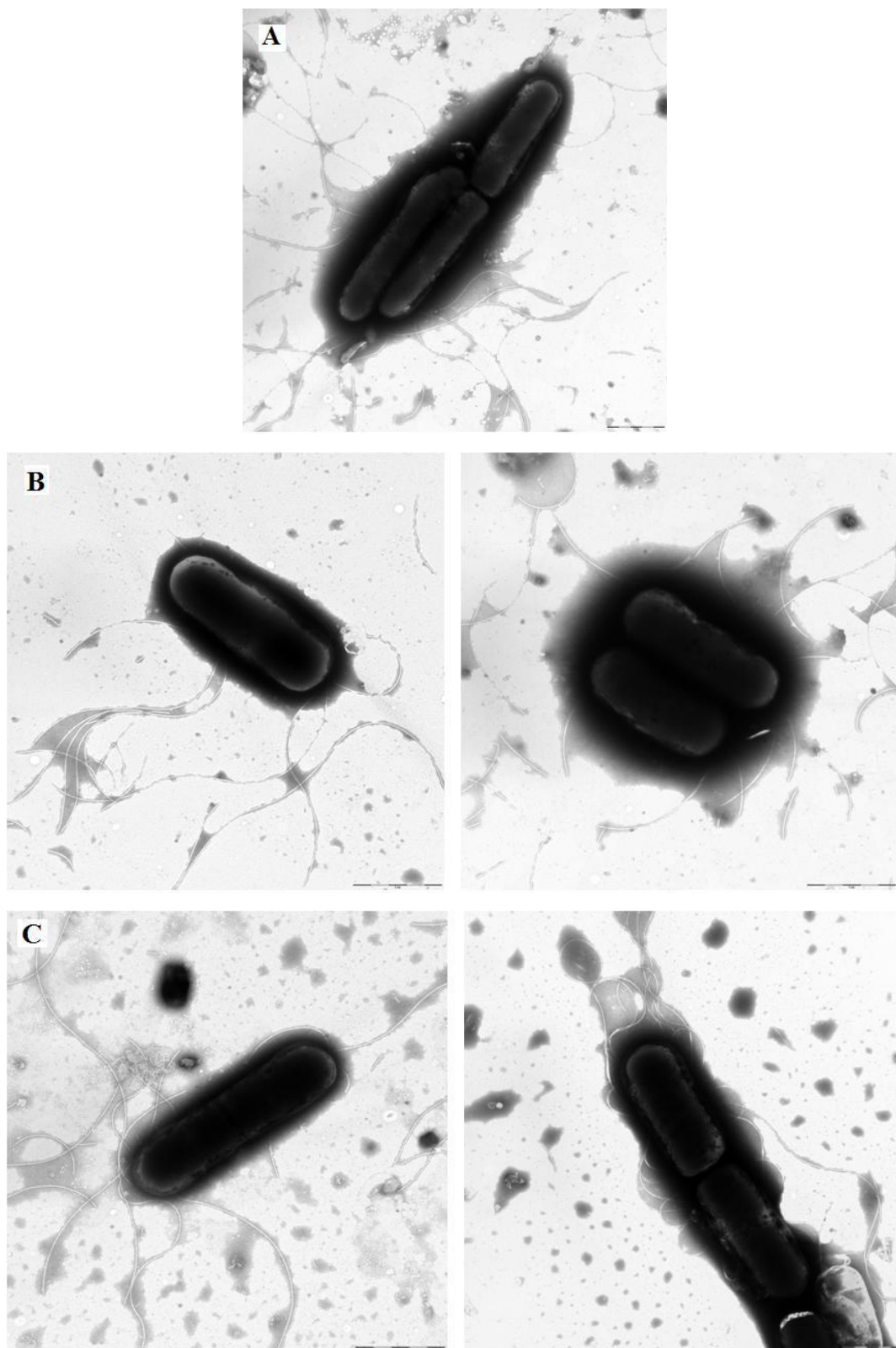
Obr. 42 Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – kmen MP2

A) nestresovaná kultura; B) 20 min po vystavení osmotickému stresu; C) 60 min po vystavení osmotickému stresu



Obr. 43 Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – kmen 1A839

A) nestresovaná kultura; B) 20 min po vystavení osmotickému stresu; C) 60 min po vystavení osmotickému stresu



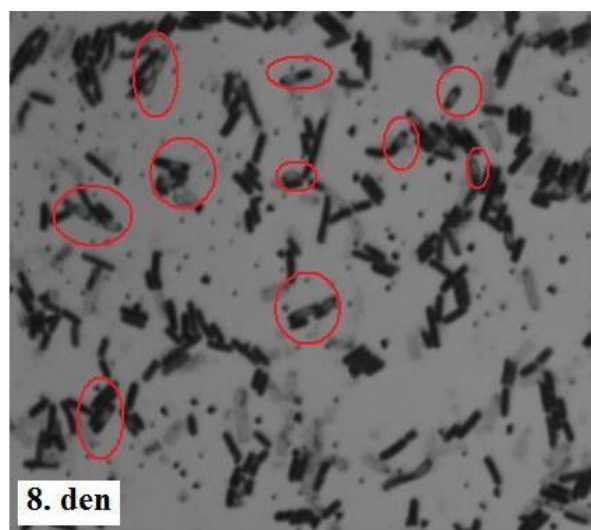
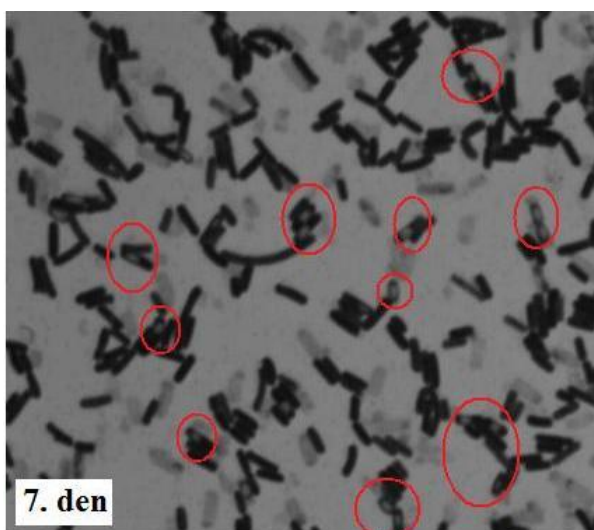
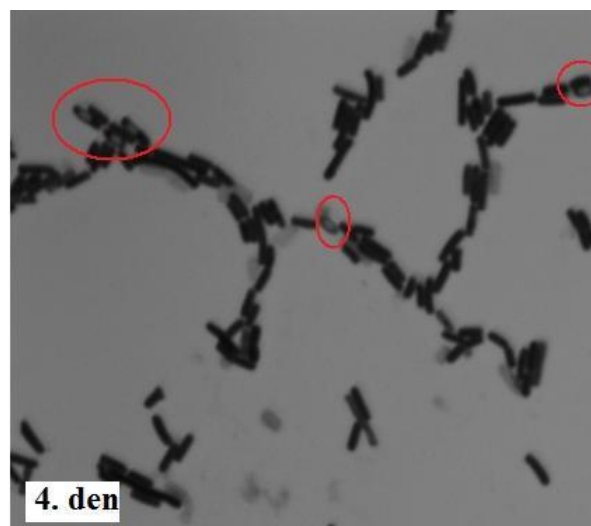
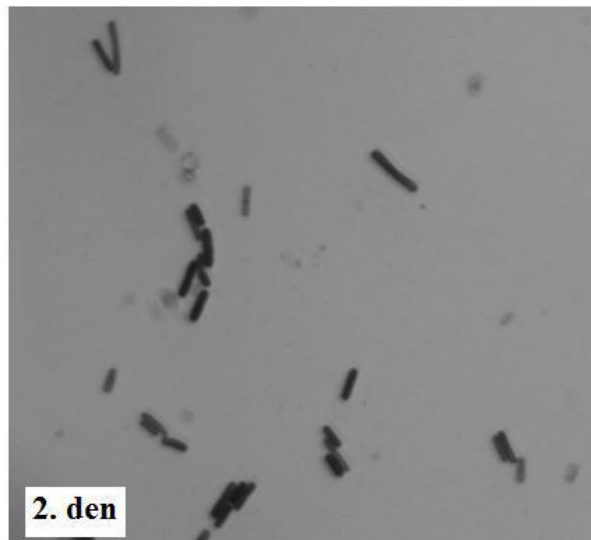
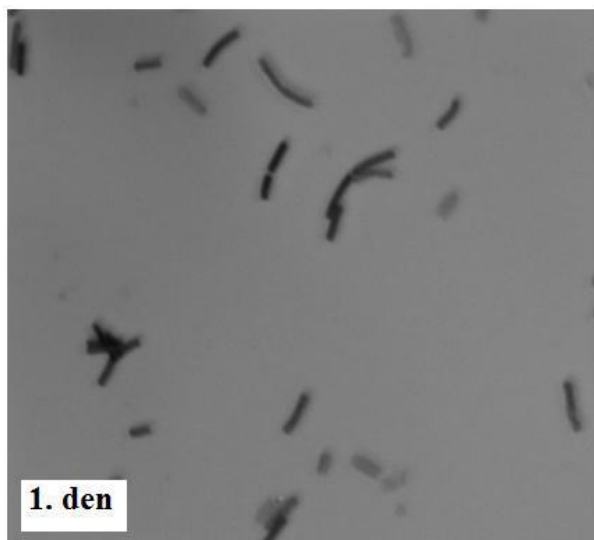
Obr. 44 Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – kmen ES091

A) nestresovaná kultura; B) 20 min po vystavení osmotickému stresu; C) 60 min po vystavení osmotickému stresu

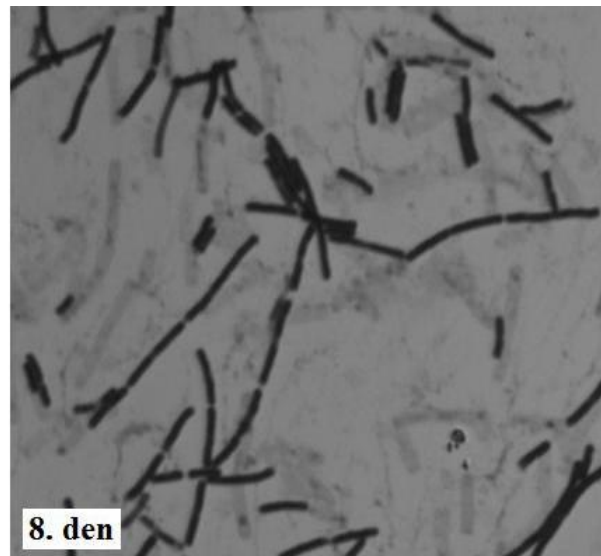
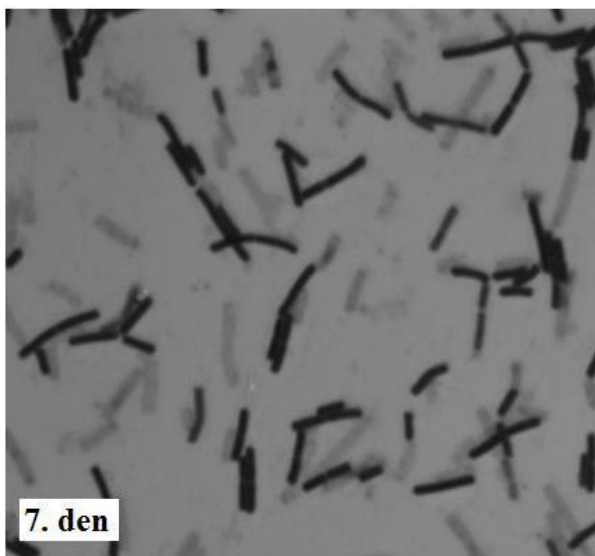
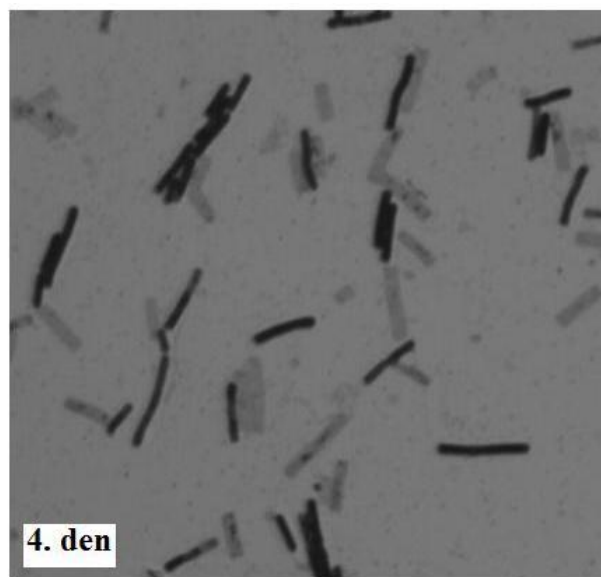
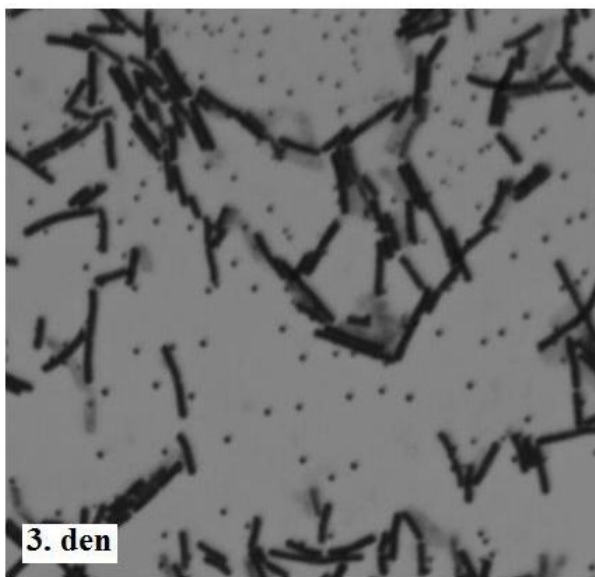
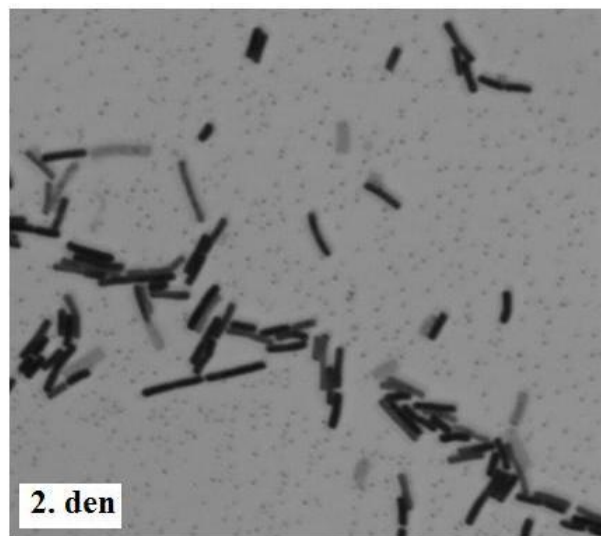
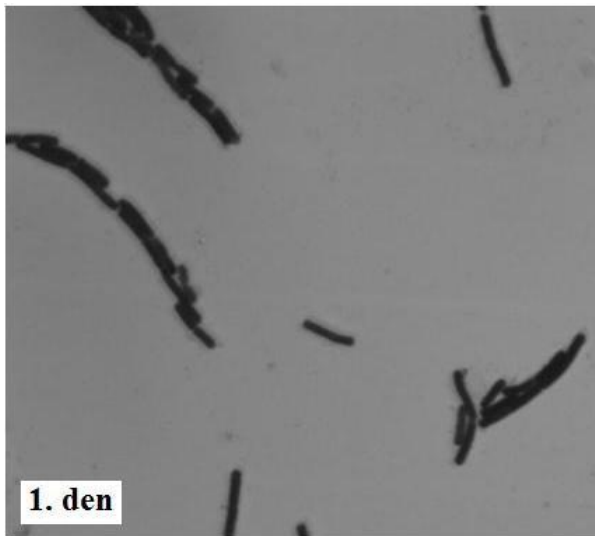
4.3.3 Prokázání narušení schopnosti sporulace s využitím Gramova barvení

Během krátkodobého uchovávání kmenů na pevných agarových půdách při 4°C se ukázalo, že dochází k problémům s “oživením” rekombinantních kmenů MP2 a ES091 na čerstvých pevných půdách i v tekutém médiu, byly-li uchovávány tímto způsobem déle než cca 1 měsíc. To naznačovalo možnost narušení buněčného cyklu, resp. schopnosti sporulovat. Z tohoto důvodu byly připraveny preparáty obarvené Gramovým barvením a v průběhu několika dní sledována schopnost sporulace jednotlivých kmenů.

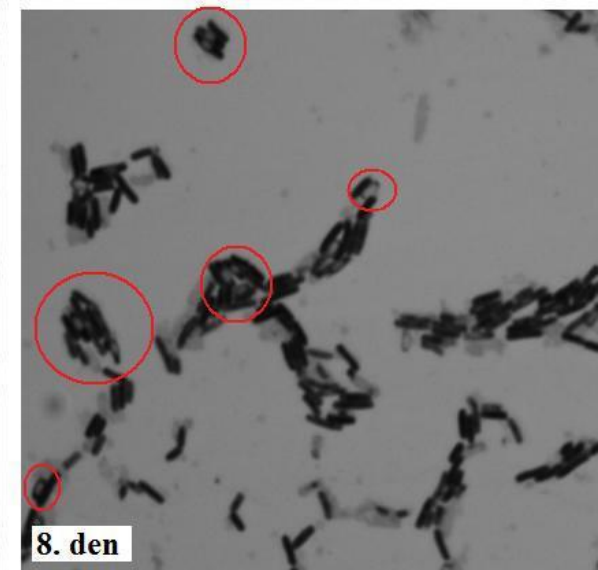
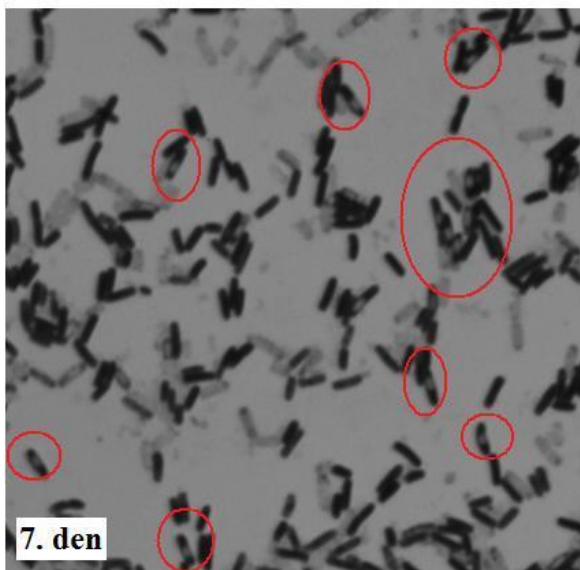
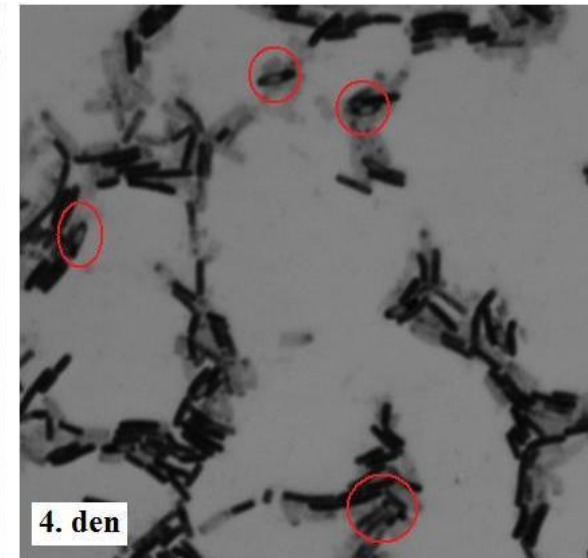
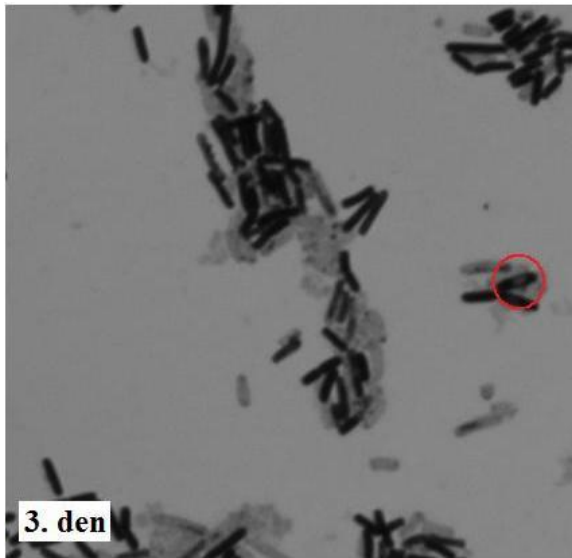
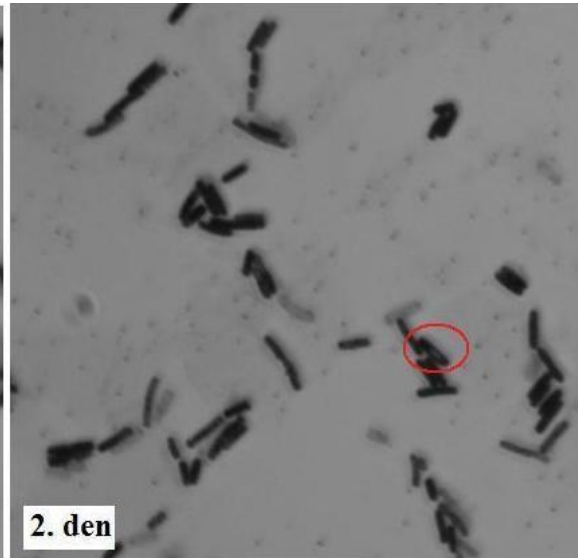
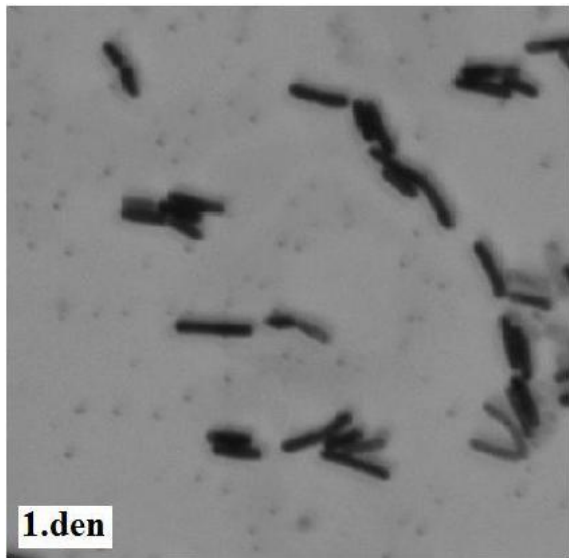
Kmeny byly přeočkovány na nové pevné LB půdy (v případě rekombinantních kmenů s erytromycinem) a kultivovány při 37°C. První preparát byl zhotoven po 24-hodinové kultivaci a další preparáty pak v průběhu následujících dní – 2., 3., 4., 7, a 8. den. Preparáty byly připraveny standardním postupem používaným při Gramově barvení (viz. Kap. 3.2.4.4). Při sledování sporulace touto metodou je využito toho, že spory nelze obarvit a sporulující buňky je tak možné velmi snadno rozeznat. Preparáty byly pozorovány pod světelným mikroskopem při 1000-násobném zvětšení a byly zhotoveny fotografie. Ty dokumentují, že mutantní kmeny MP2 a ES091 ztratily schopnost sporulovat (Obr. 45 - 48). Zároveň je patrné, že buňky mutantních kmenů jsou v porovnání s buňkami kmenů 168 a 1A839 prodloužené a mnohem více tvoří tzv. “řetízky” – po buněčném dělení nejsou zcela odděleny, což by mohlo indikovat vliv přerušení genu *yxkO* na septaci buněk.



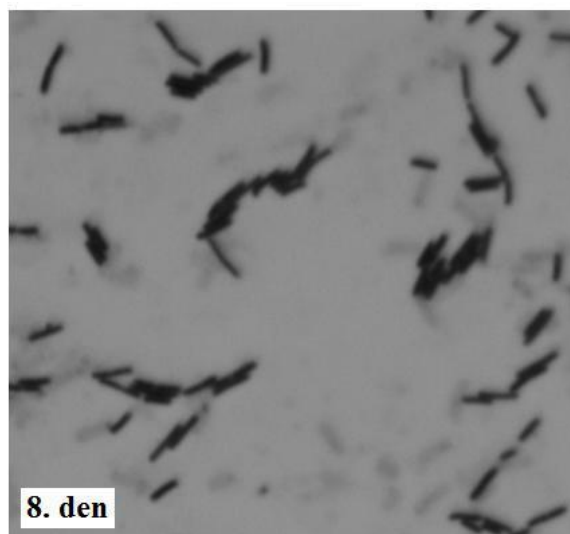
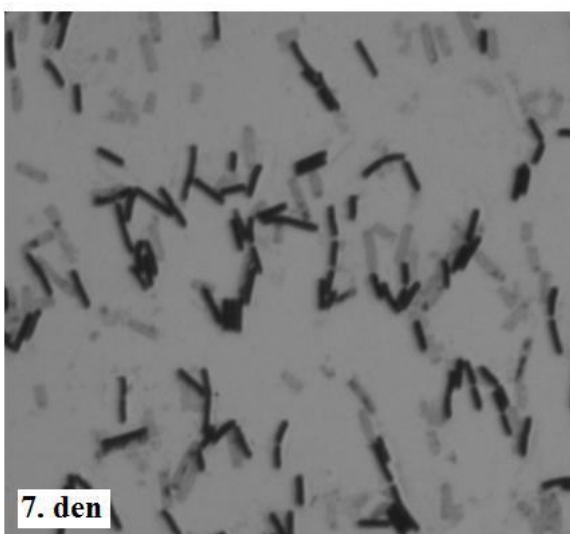
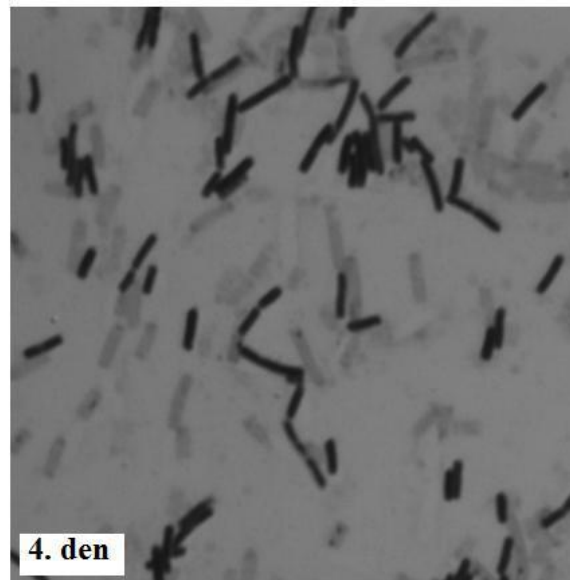
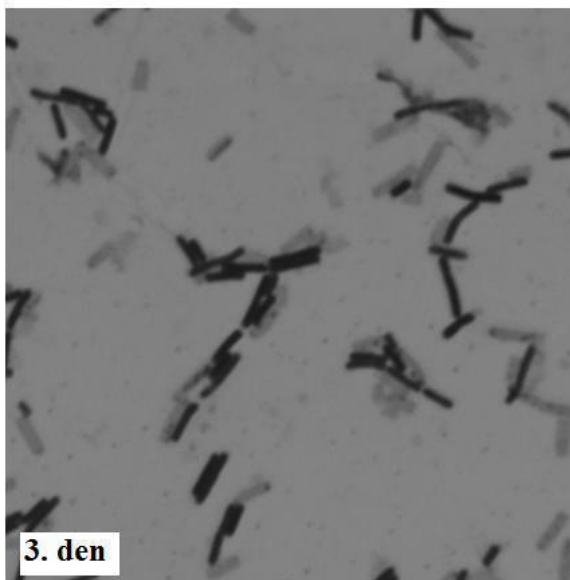
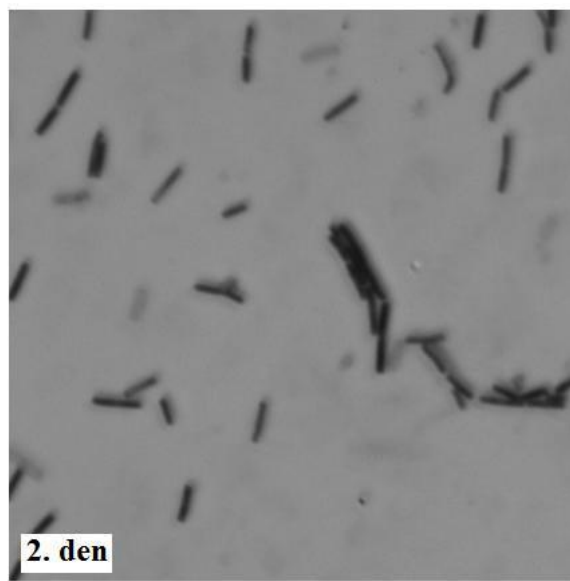
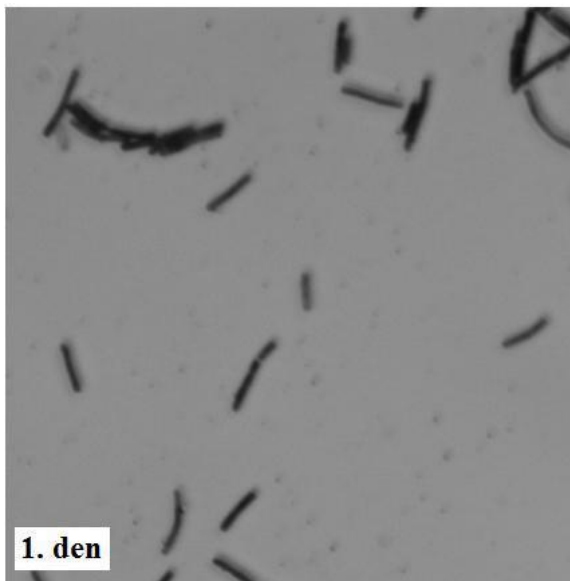
Obr. 45 Sporulující kmen 168



Obr. 46 Nesporulující kmen MP2



Obr. 47 Sporulující kmen 1A839



Obr. 48 Nesporulující kmen ES091

5. Diskuze

Bakterie obývají téměř všechna známá prostředí a jsou neustále vystaveny chemickým a fyzikálním změnám těchto prostředí. Z tohoto důvodu si vyvinuly řadu regulačních a adaptačních mechanismů umožňujících jim indukovat adekvátní odpověď na různé environmentální stresy. Odpověď na osmotický stres probíhá ve dvou fázích. Primární odpovědí je rychlá indukce transportu draselných iontů do buňky. Ty jsou v následující, druhé fázi osmoadaptace nahrazeny kompatibilními osmoticky aktivními látkami, které na rozdíl od draselných iontů ani ve vysokých koncentracích neinterferují s buněčným metabolismem.

V předcházejících letech byl v naší laboratoři nespécifickou mutagenezí s využitím minitranspozonu *Tn10* připraven a následně charakterizován mutantní kmen *Bacillus subtilis* L-42 odvozený od nesporulujícího kmene 1S19. Tento kmen vykazoval osmolabilitu při kultivaci na minerálních médiích s nízkou koncentrací draselných iontů (< 1 mM). K vložení minitranspozonu došlo v oblasti kódující sekvence monocistronního genu *yxkO*. Produktem genu je hypotetický protein neznámé funkce s aminokyselinovou homologií k sacharidovým kinázám ribokinázového typu. (Holanová 2000; Zhang et al. 2002; Ulanova et al. 2007) Dále byla prokázána změna proteinových profilů kmenů L-42 a 1S19 po vystavení buněk osmotickému stresu, přičemž jedním z proteinů vykazujících změny exprese byl flagelin – majoritní protein vláknů bakteriálního bičíku. (Lichá, nepublikovaná data) Zároveň je prokázáno, že během osmotického stresu dochází k down-regulaci genu *hag*. (Steil et al. 2003)

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv produktu genu *yxkO* na motilitu buněk, resp. regulaci transkripce genu *hag*.

V první části této diplomové práce by připraven rekombinantní kmen se specificky zavedenou mutací v genu *yxkO* s využitím integračního vektoru pMUTIN4.

Nejprve bylo nutné připravit rekombinantní plasmid nesoucí fragment *yxkO*. PCR reakcí byl na chromozomální DNA divokého kmene amplifikován cca 500 bp úsek vymezený primery *yxkOSDF* a *yxkOR1* zahrnující začátek kódující sekvence *yxkO* spolu s přiléhající upstream oblastí zahrnující Shine-Delgarno sekvenci. Fragment byl vložen do vektoru pMUTIN4 s využitím restričních endonukleáz HindIII a BamHI a elektroporací byla ligační směs transformována do kompetentních buněk *Escherichia coli*. PCR reakce z primerů *yxkOSDF* a *mutinR* na templátu plasmidové DNA následně potvrdila amplifikaci produktu předpokládané délky, což potvrdila i sekvenční analýza.

Připraveným rekombinantním plasmidem označeným MUTIN4-*yxkO*' (schema konstruktů na Obr. 21) byly transformovány kompetentní buňky kmene *Bacillus subtilis* 1A839. Tento kmen nese supresorovou mutaci - delecii (Δ *dhxA4*) – v oblasti genů *codY* a *flgB*. Delece způsobuje konstitutivní transkripci operonu *fla/che* a následně i genu *hag*. Je deletována i 3'-koncová oblast genu *codY*, což vede k produkci nefunkčního proteinu. Protože je protein CodY významným nutričním represorem genů pozdní exponenciální a stacionární fáze, vede

tato mutace k předčasné expresi těchto genů a simulaci stacionární fáze i za podmínek, kdy je prostředí dostatečně bohaté na živiny.

Plasmid byl na základě homologie integrován do chromozomu jedním crossing-overem. Integrace vedla k oddělení kódující sekvence *yxkO* od přirozené regulační oblasti a přiřazení této sekvence za indukovatelný promotor. Za přirozenou regulační oblast genu *yxkO* je přiřazen fragment genu *yxkO'* fúzovaný se *spoVG-lacZ*, což umožňuje sledovat transkripci z přirozeného promotoru měřením aktivity β -galaktozidázy (schema konstruktů po integraci do chromozomu na Obr. 23).

Integrace plasmidu do chromozomu byla ověřena PCR reakcemi ze dvou sad primerů *yxkOSDF-mutinR* a *mutinF-yxkOR1* (Obr. 22) a následnou sekvenční analýzou amplifikovaných produktů těchto reakcí. Získaný a ověřený kmen s takto specificky zavedenou mutací v genu *yxkO* byl označen ES091.

Po úspěšném připravení mutantního kmene byly v dalším kroku ověřovány růstové vlastnosti kmene na médiích s různou koncentrací draselných iontů a při působení osmotického stresu. Při sledování vlivu přerušení genu *yxkO* na růstové vlastnosti bakteriálního kmene i následném sledování vlivu této mutace na motilitu bylo pracováno nejen s kmeny 1A839 a ES091, ale také standardním kmenem 168 (wt) a kmenem MP2, který byl připraven mou kolegyní v laboratoři zavedením výše uvedeného konstruktů do divokého kmene.

Jak je uvedeno výše, vykazoval mutantní kmen L-42 připravený v naší laboratoři v předešlých letech při kultivaci na minerálním médiu osmlabilitu za nízké koncentrace draselných iontů. (Holanová 2002; Ulanova et al. 2007). Z tohoto důvodu byly sledovány růstové vlastnosti všech čtyř kmenů při kultivaci na médiích s různou koncentrací draselných iontů bez působení osmotického stresu a za zvýšené osmolality, kdy médium obsahovalo 0,5 M NaCl (viz. Kap. 4.1.3).

Tyto kultivace ukázaly, že mutantní kmen MP2 vykazuje vůči kmenu 168 sníženou růstovou rychlost na pevném minerálním médiu při nízké (0,05 mM) koncentraci draselných iontů. Zároveň má sníženou schopnost osmoadaptace při této nízké koncentraci draslíku. Tím bylo potvrzeno, že přerušení genu *yxkO* ovlivňuje adaptaci *Bacillus subtilis* na osmotický stres za podmínek limitace draslíku. Z kultivací je dále zřejmé, že kmeny 1A839 a od něho odvozený ES091 vykazují ve srovnání s kmeny MP2 a 168 na pevném minerálním médiu daného složení (viz. Kap. 3.1.9.2) velmi podstatné snížení schopnosti růstu, které je důsledkem mutací *degU32(Hy)* a $\Delta dhsA4$. Proto byly kmeny nadále kultivovány na minerálním médiu II obohaceném kyselým hydrolyzátem kaseinu.

V druhé části této práce byly sledovány změny transkripce vybraných genů - *yxkO*, *hag* a *ydaG* (byl využit jako pozitivní kontrola) v závislosti na růstové fázi a vystavení buněk osmotickému stresu.

Změny transkripce těchto genů jsme chtěli sledovat hybridizací metodou Northern blot, jež umožňuje kvantifikaci RNA a určení velikosti transkriptu.

Kmeny byly kultivovány v tekutém minerálním médiu II a část kultury byla vystavena osmotickému stresu. Následně byla ze získaných vzorků nestresovaných a stresovaných kultur izolována RNA a přenesena na membránu. DNA sondy byly připraveny z amplifikovaných úseků genů *yxkO*, *hag* a genu *ydaG* (Obr. 27), jež byly označeny neradioaktivní značkou DIG. Detekce následně probíhala chemiluminiscenční metodou s využitím protilátky Anti-DIG s navázanou alkalickou fosfatázou a CSPD jako substrátem tohoto enzymu. I přesto, že byla hybridizace opakována, nepodařilo se získat žádné průkazné výsledky. Stejně tak tomu bylo i v případě druhé izolace RNA a vytvoření druhé membrány.

Protože se metodou Northern blot stále nedařilo získat výsledky, bylo rozhodnuto pokusit se sledovat změny transkripce vybraných genů metodou Southern blot. Výhodou je snadnější manipulace se vzorky, neboť DNA (resp. cDNA) je méně náchylná k degradaci ve srovnání s RNA. Nevýhodou této metody je, že neumožňuje kvantifikaci.

Izolace RNA byla zopakována ještě jednou a ihned poté byla převedena na cDNA. Získaná cDNA byla využita nejen pro hybridizaci, ale také jako templát v PCR reakcích. Ty umožnily zjistit, zda jsou transkripty genů *yxkO*, *hag* a *ydaG* vymezené příslušnými sadami primerů v jednotlivých vzorcích přítomny či nikoli (shrnutí v Tabulce 1 na str. 93).

Poté, co byla PCR reakcemi potvrzena přítomnost/nepřítomnost jednotlivých transkriptů, byla cDNA převedena na nylonovou membránu. Znovu byla zopakována hybridizace a detekce navázané sondy chemiluminiscenční metodou. Přestože byla membrána hybridizována se třemi různými sondami – *ydaG*, *hagR1* a *yxkOF3* - nepodařilo se ani jednou získat žádné průkazné výsledky.

Jelikož se ani několikrát opakovanou hybridizací (RNA-DNA sonda; cDNA-DNA sonda) nepodařilo získat výsledky umožňující detekovat změny transkripce příslušných genů, rozhodli jsme se detekovat chemiluminiscenční metodou pouze samotnou sondu fixovanou k membráně, abychom zjistili, zda příčinou neúspěchu není selhání detekční metody. Detekce probíhala obdobně jako při vyhodnocení sond metodou „dot blotu“, pouze s tím rozdílem, že v závěrečné fázi byla sonda detekována s využitím CSPD. Po vyvolání filmu bylo zřejmé, že metoda je spolehlivá a umožňuje detekci sondy i při nejnižším ředění (1:100 000). Bylo tak vyloučeno, že by důvodem neúspěšných hybridizačních pokusů bylo selhání detekční metody.

Výsledky získané hybridizacemi měly doplnit data z PCR reakcí probídaných na templátu cDNA. Bez výsledků hybridizačních pokusů je velmi složité výsledky PCR reakcí interpretovat. Navíc není možná kvantifikace ani určení délky transkriptů.

I přesto lze pouze z výsledků amplifikací příslušných úseků cDNA metodou PCR určitě informace vyvodit. Amplifikace produktů ze sad primerů *yxkOSDF* a *mutinR* u kmenů MP2 a ES091 u nestresovaných i stresovaných vzorků naznačuje, že transkripce z promotoru genu *yxkO* není indukována osmotickým stresem. Zároveň přítomnost produktu vymezeného primery *yxkOF3* a *mutinR* u vzorků kultur MP2 a ES091 naznačuje možnou přítomnost promotoru řídicího transkripce anti-sense RNA komplementární k 3-koncové oblasti genu *yxkO*. K produkci transkriptu zahrnujícího úsek vymezený těmito primery (*yxkOF3* a *mutinR*)

z přirozeného promotoru genu *yxkO* totiž nemůže docházet z důvodu integrace plasmidu do chromozomu a přítomnosti silných terminačních struktur před inducibilním promotorem P_{lac} (viz. Obr. 23). Výsledky vyplývající ze srovnání přítomnosti/nepřítomnosti produktů vymezených primery *yxkOF2-yxkOR* a *yxkOF3-yxkOR1* vzorků nestresovaných a stresovaných kultur všech čtyř kmenů by se daly vysvětlit tím, že během působení osmotického stresu dochází k indukci transkripce anti-sense RNA neznámé funkce a velikosti. Jedná se však pouze o hypotézu založenou jen na výsledcích amplifikace příslušných úseků na cDNA metodou PCR a její prokázání vyžaduje provedení dalších experimentů, především zopakování hybridizačních pokusů.

Protein YdaG je obecný stresový protein a změny jeho transkripce byly sledovány proto, že byl využit jako pozitivní kontrola. Předpokládali jsme, že transkripce genu *ydaG* nebude přerušena genem *yxkO* nijak vlivněna. Výsledky PCR reakcí však naznačují, že přerušeni genu *yxkO* ovlivňuje transkripci genu *ydaG*. V případě kmene MP2 totiž u stresované kultury nedochází k jeho expresi. U kmene ES091, u něhož mutace v *codY* vede k simulaci stacionární fáze růstu i za dostatku živin je produkt PCR reakce přítomen. Zdá se tedy, že produkce proteinu YdaG je ovlivňována produktem genu *yxkO* a růstovou fází.

Při navrhování primerů na analýzu transkriptů genu *hag* jsme vycházely z našich dílčích výsledků naší laboratoře, kdy byly při 2D analýzách proteomu *Bacillus subtilis* při osmotickém šoku zaznamenány tři isoformy flagelinu, z nichž jeden vykazoval nižší molekulovou hmotnost a závislost úrovně transkripce na osmotickém šoku a přítomnosti mutace v *yxkO*. Tyto výsledky naznačovaly zkrácení proteinu na C-konci. Byly proto navrženy dvě sady primerů, jedna na N-koncovou část transkriptu (*hagF-hagR1*) a druhá pokrývající celý gen (*hagF2-hagR*). Dále je prokázáno, že osmotický stres způsobuje down-regulaci genů motility a chemotaxe, včetně genu *hag*. (Steil et al., 2003) Účelem sledování změn transkripce genu *hag* tedy bylo zjistit, zda přítomnost kratší formy flagelinu je způsobena produkcí kratší formy transkriptu genu *hag*, a objasnit případný vliv přerušeni genu *yxkO* na tuto transkripci.

V případě sady primerů *hagF-hagR1* byl PCR produkt přítomen u všech vzorků. Produkt z primerů *hagF-hagR2* u stresovaných vzorků byl přítomen pouze u kmene 1A839, zatímco u kmenů 168, MP2 a ES091 nikoli. Výsledky PCR reakcí naznačují, že přerušeni genu *yxkO* nemá vliv na transkripci genu *hag* při vystavení buněk osmotickému stresu. Zdá se, že by osmotický stres mohl způsobovat spíše destabilizaci *hag*-mRNA. Možným mechanismem této destabilizace je postupná degradace mRNA od konce odpovídajícího C-konci proteinu. Rozdíly proteinových profilů flagelinu u divokého a mutantního kmene tak pravděpodobně souvisejí s regulací exprese flagelinu na postranlační úrovni.

V třetí části této diplomové práce byla srovnávána motilita kmenů v závislosti na vystavení buněk osmotickému stresu.

Kmeny byly kultivovány v tekutém minerálním médiu II a část kultury byla vystavena osmotickému stresu. Byly odebrány jednotlivé vzorky před a po osmotické stresu a

připraveny nativní preparáty, které byly pozorovány ve světelném mikroskopu. Z výsledků pozorování zcela jasně vyplývá, že zatímco kmen 168 ztrácí po osmotické šoku schopnost aktivního pohybu, kmen MP2 má tuto schopnost zachovánu. Mutace v genu *yxkO* vede k udržení motility i po indukci obecné stresové odpovědi. To potvrzuje, že přerušení genu *yxkO* ovlivňuje motilitu buněk. Kmeny 1A839 a ES091 měly schopnost motility taktéž zachovánu, což souvisí s mutací $\Delta dhsA4$ (Amati et al. 2004).

V další fázi sledování změn motility bylo naším cílem objasnit s využitím skenovací elektronové mikroskopie, zda při ztrátě motility buněk kmene 168 po vystavení osmotickému stresu dochází ke ztrátě bičíku, či je bičík zachován a ztráta motility je dána prozatím neznámým regulačním mechanismem zastavujícím jeho pohyb. Byla provedena další kultivace kmenů a odběry vzorků, z nichž byly připraveny preparáty pro skenovací elektronovou mikroskopii. I přes snahu modifikovat postup přípravy preparátu pro tento typ elektronové mikroskopie se nepodařilo získat preparáty, u nichž by nebyly bičíky poškozeny, resp. částečně ulámané. Přestože pozorování naznačovala, že kmen 168 po vystavení osmotickému stresu ztrácí bičíky, nebyly výsledky těchto pozorování dostatečně průkazné (Obr. 40).

Z tohoto důvodu byla vyzkoušena příprava preparátu metodou negativního barvení, která je využívána především ve virologii, a preparáty jsou pozorovány s využitím transmisního elektronového mikroskopu. Tato metoda přípravy preparátu se osvědčila, neboť nedocházelo k poškození bičíků. Další výhodou byla i její časová nenáročnost v porovnání s postupem přípravy preparátu pro skenovací mikroskopii.

Výsledky pozorování v transmisním elektronovém mikroskopu naznačují, že skutečně dochází ke ztrátě, resp. degradaci bičíků po vystavení buněk divokého kmene 168 osmotickému stresu. Na fotografiích preparátů zhotovených ze vzorku odebraného 60 minut po osmotické stresu je patrné, že buňky nemají ve srovnání z preparáty připravenými ze vzorků odebraných před osmotickým stresem a 20 minut po něm bičíky. Navíc je u těchto preparátů patrná přítomnost úlomků a fragmentů bičíků kolem buněk. Přestože jsou fragmenty přítomny i u vzorků dalších kmenů, které měly schopnost motility zachovánu, rozhodně nebyly tyto fragmenty přítomny v takovém množství (Obr. 41 – 44).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv přerušení genu *yxkO* na motilitu buněk a tento vliv byl jasně prokázán. Během osmotického stresu dochází ke ztrátě motility u divokého kmene a nikoli u kmene mutantního, a jak snímky z transmisního elektronového mikroskopu dokumentují, není tato ztráta motility způsobena regulací pohybu bičíku, ale jeho postupnou degradací. Ta by mohla být pravděpodobně způsobena přerušením přísunu monomerního proteinu flagelinu z buňky. Tento proces je velice komplexní a regulován několika mechanismy. Naše dosavadní výsledky naznačují, že role genu *yxkO* v tomto procesu není na transkripční úrovni, ale v ovlivnění posttranslační modifikace, která protein destabilizuje nebo zastavuje export proteinu ven z buňky.

Navíc bylo zjištěno, že po krátkodobém skladování kmenů na pevných agarových půdách při 4°C po dobu delší než cca 1 měsíc a následném přeočkování kmenů na nové půdy, vykazují

mutantní kmeny MP2 a ES091 sníženou schopnost růstu a „oživení“. To naznačovalo možnost narušení buněčného cyklu, resp. ztrátu schopnosti sporulace. Z tohoto důvodu byla zjišťována schopnost sporulace těchto kmeňů.

Kmeny byly preočkovány na čerstvé pevné LB půdy a kultivovány při 37°C po dobu osmi dnů. Postupně byly připravovány preparáty obarvené metodou Gramova barvení. Po dokončení kultivace byly preparáty pozorovány a ze zhotovených fotografií (Obr. 44 – 48) vyplývá, že mutantní kmeny skutečně ztratily schopnost sporulace. Ze snímků je navíc patrné prodloužení buněk mutantních kmenů, a to bez ohledu zda byly vystaveny působení osmotického stresu či nikoli. Na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu jsou patrná septa u těchto „prodloužených“ buněk. Tato pozorování naznačují pravděpodobný vliv mutace genu *yxkO* na schopnost buněk dělit se.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo objasnit vliv přerušení genu *yxkO* na motilitu a regulaci genu *hag* na transkripční úrovni. Během této diplomové práce bylo dosaženo následujících výsledků:

1. podařilo se připravit konstrukt a vytvořit mutantní kmen v genu *yxkO*
2. bylo potvrzeno, že přerušení genu *yxkO* ovlivňuje adaptaci *Bacillus subtilis* na osmotický stres za podmínek limitace draslíku
3. byl dokumentován vliv této mutace v genu *yxkO* na motilitu u *Bacillus subtilis* při osmotickém stresu
 - I. videa zhotovená s využitím kamery připojené ke světelném mikroskopu dokumentují ztrátu motility po osmotickém šoku u divokého kmene, nikoli však u kmene mutantního
 - II. vizualizace buněk negativním barvením a transmisní elektronovou mikroskopií dokumentuje, že ztráta motility u *Bacillus subtilis* po vystavení buněk osmotickému stresu je způsobena ztrátou bičíku, pravděpodobně jeho postupnou degradací
4. dále bylo zjištěno, že mutace v genu *yxkO* ovlivňuje schopnost sporulace a prozatím neznámým mechanismem ovlivňuje i proces septace buněk při růstu
5. produkt genu *yxkO* pravděpodobně neovlivňuje regulaci genu *hag* na transkripční úrovni, ale je možný jeho vliv na úrovni posttranslační (stabilizace/destabilizace proteinu)
6. byly získány první indicie naznačující, že produkt genu *yxkO* není regulován osmotickým šokem, a že po osmotickém šoku by mohlo docházet k iniciaci přepisu transkriptu z opačného vlákna

7. Seznam literatury

Altendorf K., Epstein W. (1996): The Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. In: A.G. Lee (ed.) Biomembranes (ATPases) Vol. 5, pp 403 – 420. JAI Press Inc, Greenwich, London. Citováno podle Altendorf K., Gassel M., Puppe W., Möllenkamp T., Zeeck A., Boddien C., Fendler K., Bamberg E., Dröse S. (1998): Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum 643: 137 – 146

Altendorf K., Gassel M., Puppe W., Möllenkamp T., Zeeck A., Boddien C., Fendler K., Bamberg E., Dröse S. (1998): Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum 643: 137 – 146

Amati G., Bisicchia P., Galizzi A. (2004): DegU-P represses expression of the motility *fla-che* operon in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 186 (18): 6003 – 6014

Arakawa T., Timasheff S. N. (1985): The stabilization of proteins by osmolytes. Biophysical Journal 47 (3): 411 – 414

Belitsky B. R., Sonnenshein A. L. (2008): Genetic and biochemical analysis of CodY-binding sites in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 190 (4): 1224 – 1236

Benson A. K., Haldenwang W. G. (1993): The σ^B -dependent promoter of the *Bacillus subtilis sigB* operon is induced by heat shock. Journal of Bacteriology 175 (7): 1929 – 1935

Bergara F., Ibara C., Iwamasa J., Patarroyo J. C., Aguilera R., Márquez-Magaña L. M. (2003): CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 185 (10): 3118 – 3126

Bernhardt J., Völker U., Völker A., Antelmann H., Schmid R., Mach H., Hecker M. (1997): Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* – a two-dimensional protein electrophoresis study. Microbiology 143 (3): 999 - 1017

Boch J., Kempf B., Bremer E. (1994): Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of Bacteriology* 176 (17): 5364 – 5371

Boylan S. A., Redfield A. R., Brody M. S., Price Ch. W. (1993): Stress-induced activation of the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 175 (24): 7931 – 7937

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

Brown A. D. (1976): Microbial water stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 40 (4): 803 – 846

Caramori T., Barilla D., Nessi C., Sacchi L., Galizzi A. (1996): Role of FlgM in σ^D -dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 178 (11): 3113 – 3118

Csonka L. N., Hanson A. D. (1991): Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* 45: 569 – 606

Culham D. E., Tripet B., Racher K. I., Voegelé R. T., Hodges R. S., Wood J. M. (2000): The role of the carboxyl terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Recognition* 13 (5): 309 – 322

Culham D. E., Vernikovska Y., Tschowri N., Keates R. A. B., Wood J. M., Boggs J. M. (2008): Periplasmic loops of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli* are sensitive to osmolality. *Biochemistry* 47: 13584 – 13593

Dahl M. K., Msadek T., Kunst F., Rapoport G. (1992): The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 14509 – 14514

Estacio W., Santa Anna-Arriola S., Adedipe M., Márquez-Magaña L. M. (1998): Dual promoters are responsible for transcription initiation of the *fla/che* operon in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 180 (14): 3548 – 3555

Gaidenko T. A., Kim T. J., Weigel A. L., Brody M. S., Price S. W. (2006): The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 188 (17): 6387 – 6395

Galinski E. A., Trupper H. G. (1994): Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. Citováno podle Kempf B., Bremer E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* 170 (5): 319 – 330

Gassel M., Siebers A., Epstein W., Altendorf K. (1998): Assembly of the Kdp complex, the multi-subunit K⁺-transport ATPase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1415 (1): 77 - 84

Guffanti A. A., Cheng J., Krulwich T. A. (1998): Electrogenic antiport activities of the gram-positive Tet proteins include a Na⁺ (K⁺)/K⁺ mode that mediates net K⁺ uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26447 - 26454

Guffanti A. A., Krulwich T. A. (1995): Tetracycline/H⁺ antiport and Na⁺/H⁺ antiport catalyzed by the *Bacillus subtilis* TetA(L) transporter expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177 (15): 4557 – 4561

Haardt M., Bremer E. (1996): Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178 (18): 5370 – 5381

Hamann K., Zimmann P., Altendorf K. (2008): Reduction of turgor is not the stimulus for the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190 (7): 2360 - 2367

Handke L. D., Shivers R. P., Sonnenshein A. L. (2008): Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *Journal of Bacteriology* 190 (3): 798 – 806

Hecker M., Pané-Farré J., Völker U. (2007): SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61: 215 – 236

Hecker M., Völker U. (2001): General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 44: 35 – 91

Helmamm J. D. (1991): Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Molecular Microbiology* 5 (12): 2875 – 2882

Holanová V. (2000): Izolace i fyziologická charakterizace mutant *Bacillus subtilis* defektních v transportu draselných iontů. Diplomová práce.

Holtmann G., Bakker E. P., Uozumi N., Bremer E. (2003): KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *Journal of Bacteriology* 185 (4): 1289 - 1298

Höper D., Bernhardt J., Hecker M. (2006): Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics* 6 (5): 1550 – 1562

Chen L., Helmann J. D. (1994): The *Bacillus subtilis* σ^D -dependent operon encoding the flagellar proteins FliD, FliS and FliT. *Journal of Bacteriology* 176 (11): 3093 – 3101

Cheng J., Guffanti A. A., Wang W., Krulwich T. A., Bechhofer D. H. (1996): Chromosomal *tetA(L)* gene of *Bacillus subtilis*: regulation of expression and physiology of a *tetA(L)* deletion strain. *Journal of Bacteriology* 178 (10): 2853 – 2860

Jin J., Guffanti A. A., Bechhofer D. H., Krulwich T. A. (2002): Tet(L) and Tet(K) tetracycline metal/H⁺ antiporters: characterization of multiple catalytic modes and a mutagenesis approach to differences in their efflux substrate and coupling ion preference. *Journal of Bacteriology* 184 (17): 4722 – 4732

Joseph P., Ratnayake-Lecamwasam M., Sonenshein A. L. (2005): A region of *Bacillus subtilis* CodY protein required for interaction with DNA. *Journal of Bacteriology* 187 (12): 4127 - 4139

Jung K., Tjaden B., Altendorf K. (1997): Purification, reconstitution and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (16): 10847 – 10852

Jung K., Veen M., Altendorf K. (2000): K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (51): 40142 – 40147

Kappes R. M., Kempf B., Bremer E. (1996): Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *Journal of Bacteriology* 178 (17): 5071 – 5079

Kempf B., Bremer E. (1995): OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (28): 16701 – 16713

Kempf B., Bremer E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* 170 (5): 319 – 330

Kempf B., Gade J., Bremer E. (1997): Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *Journal of Bacteriology* 179 (20): 6213 – 6220

Kobayashi K. (2007): Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 66 (2): 395 - 409

Krulwich T. A., Jin J., Guffanti A. A., Bechhofer D. H. (2001): Functions of tetracycline efflux proteins that do not involve tetracycline. *Journal of Structural Biology* 3 (2): 237 – 246

Kunst F., Rapoport G. (1995): Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 177 (9): 2403 - 2407

Kunte H. J., Crane R. A., Culham D. E., Richmond D., Wood J. M. (1999): Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K12. *Journal of Bacteriology* 181 (5): 1537 – 1543

Laiminis L. A., Rhoads D. B., Epstein W. (1981): Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (1): 464 – 468

Landis L., Xu J., Johnson R. C. (1999): The cAMP receptor protein CRP can function as an osmoregulator of transcription in *Escherichia coli*. *Genes & Development* 13 (23): 3081 – 3091

Levdikov V. M., Blagova E., Joseph P., Sonnenshein A. L., Wilkinson A. (2006): The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (16): 11366 – 11373

Levdikov V. M., Blagova E., Colledge V. L., Lebedev A. A., Williamson D. C., Sonnenshein A. L., Wilkinson A. J. (2009): Structural rearrangement accompanying ligand binding in the GAF domain of CodY from *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 390 (5): 1007 - 1018

Lichá I.: Nепublikovaná data

Lin Y., Hansen J. N. (1995): Characterization of a chimeric *proU* operon in a subtilin-producing mutant of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology* 177 (23): 6874 – 6880

Lodato P. B., Rogers E. J., Lovett P. S. (2006): A variation of the translation attenuation model can explain the inducible regulation of the pBC16 tetracycline resistance gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 188 (13): 4749 - 4758

Mäder U., Antelmann H., Buder T., Dahl M. K., Hecker M., Homuth G. (2002): *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Molecular Genetics and genomics* 268 (4): 455 – 467

Márquez L. M., Helmann J. D., Ferrari E., Parker H. M., Ordal G. W., Chamberlin M. J. (1990): Studies of σ^D -dependent functions in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 172 (6): 3435 – 3443

McLeod S. M., Xu J., Johnson R. C. (2000): Coactivation of the RpoS-dependent *proP* P2 promoter by Fis and cyclic AMP receptor protein. *Journal of Bacteriology* 182 (15): 4180 - 4187

Mellies J., Brems R., Villarejo M. (1994): The *Escherichia coli proU* promoter element and its contribution to osmotically signaled transcription activation. *Journal of bacteriology* 176 (12): 3638 – 3645

Mellies J., Wise A., Villarejo M. (1995): Two different *Escherichia coli proP* promoters respond to osmotic and growth phase signals. *Journal of Bacteriology* 177 (1): 144 – 151

Mirel D. B., Chamberlin M. J. (1989): The *Bacillus subtilis* flagellin gene (*hag*) is transcribed by the σ^{28} form of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology* 171 (6): 3095 – 3101

Mirel D. B., Lauer P., Chamberlin M. J. (1994): Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a σ^D -dependent operon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 176 (15): 4492 – 4500

Mirel D. B., Lustre V. M., Chamberlin M. J. (1992): An operon of *Bacillus subtilis* motility genes transcribed by the σ^D form of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology* 174 (13): 4197 – 4204

Murray E. J., Kiley T. B., Stanley-Wall N. R. (2009): A pivotal role for the response regulator DegU on controlling multicellular behaviour. *Microbiology* 155 (1): 1 – 8

Nakamura T., Yuda R., Unemoto T., Bakker E. (1998): KtrAB, a new type of bacterial K^+ -uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Bacteriology* 180 (13): 3491 - 3494

Ogura M., Tanaka T. (1996): *Bacillus subtilis* DegU acts as a positive regulator for comK expression. *FEBS Letters* 397 (2): 173 – 176

Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J. D., Völker U., Hecker M. (2001): Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 183 (19): 5617 – 5631

Poolman B., Glaasker E. (1998): Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology* 29 (2): 397 – 407

Poolman B., Spitzer J. J., Wood J. M. (2004): Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666: 88 – 104

Racher K. I., Voegelé R. T., Marshall E. V., Culham D. E., Wood J. M. (1999): Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry* 38 (6): 1676 – 1684

Rajkamuri K., Gowrishankar J. (2001): In vivo expression from the RpoS-dependent P1 promoter of the osmotically regulated *proU* operon in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium: activation by *rho* and *hns* mutations and by cold stress. *Journal of Bacteriology* 183 (22): 6543 – 6550

Ramirez R. M., Prince W. S., Bremer E., Villarejo M. (1989): In vitro reconstitution of osmoregulated expression of *proU* of *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 1153 – 1157

Ratnayake-Lecamwasam M., Serró P., Wong K.-W., Sonnenshein A. L. (2001): *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development* 15 (9): 1093 – 1103

Record Jr. M. T., Courtenay E. S., Cayley D. S., Guttman H. J. (1998): Response of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Feature* 23: 143 – 149

Roeßler M., Müller V. (2001): Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology* 3 (12): 743 – 754

Romeo T. (1998): Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology* 29 (6): 1321 – 1330

Rothenbücher M. C., Facey S. J., Kiefer D., Kossmann M., Kuhn A. (2006): The cytoplasmatic C-terminal domain of the *Escherichia coli* KdpD protein functions as K⁺ sensor. *Journal of Bacteriology* 188 (5): 1950 – 1958

Ruzal S. M., Lopez C., Rivas E., Sanchez-Rivas C. (1998): Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology* 36 (2): 75 – 79

Ruzal S. M., Sanchez-Rivas C. (1998): In *Bacillus subtilis* DegU-P is a positive regulator of the osmotic response. *Current Microbiology* 37 (6): 368 – 372

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

Schlösser A., Meldorf M., Stumpe S., Bakker E. P., Epstein W. (1995): TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177 (7): 1908 – 1910

Spiegelhalter F., Bremer E. (1998): Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Molecular Microbiology* 29 (1): 285 – 296

Stasinopoulos S. J., Farr G. A., Bechhofer D. H. (1998): *Bacillus subtilis tetA(L)* gene expression: evidence for regulation by translational reinitiation. *Molecular Microbiology* 30 (5): 923 – 932

Steil L., Hoffmann T., Budde I., Völker U., Bremer E. (2003): Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Journal of Bacteriology* 185 (21): 6358 – 6370

Strom A. R., Kaasen I. (2003): Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular Microbiology* 8 (2): 205 - 210

Stumpe S., Schlösser A., Schleyer M., Bakker E.P. (1996): K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺-uptake systems. Citováno podle Kempf B., Bremer E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* 170 (5): 319 – 330

Šebestián J., Petrmichlová Z., Šebestiánová Š., Náprstek J., Svobodová J. (2001): Osmoregulation in *Bacillus subtilis* under potassium limitation: a new inducible K^+ -stimulated, VO_4^{3-} -inhibited ATPase. Canadian Journal of Microbiology 47: 1116 – 1125

Titz B., Rajagopala S. V., Ester C., Houser R., Uetz P. (2006): Novel conserved assembly factor of the bacterial flagellum. Journal of Bacteriology 188 (21): 7700 - 7706

Tokunaga T., Rashid M. H., Kuroda A., Sekiguchi J. (1994): Effect of *degS-degU* mutation on the expression of *sigD*, encoding an alternative sigma factor, and autolysin operon of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 176 (16): 5177 – 5180

Tsatskis Y., Khambati J., Dobson M., Bogdanov M., Downhan W., Wood J. M. (2005): The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. The Journal of Biological Chemistry 280 (50): 41387 – 41394

Ulanova D., Holanová V., Přenosilová L., Náprstek J., Lichá I. (2007): Mutation of a gene encoding a putative ribokinase leads to reduced salt tolerance under potassium limitation in *Bacillus subtilis*. Folia Microbiologica 52 (3): 203 – 208

Verhamme D. T., Kiley T. B., Stanley-Wall R. (2007): DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 65 (2): 554 - 568

von Blohn C., Kempf B., Kappes R. M., Bremer E. (1997): Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. Molecular Microbiology 25 (1): 175 – 187

Walderhaug M. O., Polarek J. W., Voelkner P., Daniel J. M., Hesse J. E., Altendorf K., Epstein W. (1992): KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. Journal of Bacteriology 174 (7): 2152 – 2159

Werhane H., Lopez P., Mendel M., Zimmer M., Ordal G. W., Márquez-Magaña L. M. (2004): The last gene of the *fla/che* operon in *Bacillus subtilis*, *ylxL*, is required for maximal σ^D function. Journal of Bacteriology 186 (12): 4025 – 4029

West J. T., Estacio W., Márquez-Magaña L. M. (2000): Relative roles of the *fla/che* P_A, P_{D-3} and P_{sigD} promoters in regulating motility and *sigD* expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 182 (17): 4841 – 4848

Whatmore A. M., Reed R. H. (1990): Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *Journal of General Microbiology* 136 (12): 2521 – 2526

Wood J. M. (1999): Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (1): 230 – 262

Wood J. M., Culham D. E., Hillar A., Vernikovska Y. I., Liu F., Boggs J., Keates R. A. B. (2005): A structural model for the osmosensor, transporter and osmoregulator ProP of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 44: 5634 – 5646

Xu J., Johnson R. C. (1995): Fis activates RpoS-dependent stationary-phase expression of *proP* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177 (18): 5222 – 5231

Xu J., Johnson R. C. (1997): Cyclic AMP receptor protein functions as a repressor of the osmotically inducible promoter *proP* P1 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179 (7): 2410 – 2417

Yakhnin H., Pandit P., Petty T. J., Baker C. S., Romeo T., Babitzke P. (2007): CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (*hag*) by blocking ribosome binding. *Molecular Microbiology* 64 (6): 1605 – 1620

Zhang R-g., Grembecka J., Vinokour E., Collart F., Dementieva I., Minor W., Joachimiak A. (2002): Structure of *Bacillus subtilis* YxkO – a member of the UPF0031 family and putative kinase. *Journal of Structural Biology* 139 (3): 161 – 170

Zimmann P., Puppe W., Altendorf K. (1995): Membrane topology analysis of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (47): 28282 - 28288

Zimmann P., Steinbrügge A., Schiederberend M., Jung K., Altendorf K. (2007): The extension of the fourth transmembrane helix of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* is involved in sensing. *Journal of Bacteriology* 189 (20): 7326 – 7334