

## Abstrakt

*Bacillus subtilis*, modelová Gram-pozitivní bakterie, uplatňuje při adaptaci své membrány k nízkým teplotám dva odlišné mechanismy: 1) Při dlouhodobé adaptaci k nižším teplotám dochází ke zvýšení poměru anteiso/iso-větvených mastných kyselin v membránových lipidech. 2) Po náhlém poklesu teploty je indukována syntéza desaturázy (Des), proteinu, který v aerobních podmínkách desaturuje řetězce mastných kyselin v lipidech cytoplazmatické membrány. Transkripce genu *des*, kódujícího desaturázu mastných kyselin, je indukována zvýšením uspořádanosti membrány. Pro indukci transkripce genu *des* je nezbytná účast dvoukomponentového systému DesK-DesR.

V této práci jsem sledovala, jak kultivační podmínky ovlivňují mechanismus adaptace membrány *B. subtilis* k nízkým teplotám. Použity byly metody fluorescenční spektroskopie, analýza mastných kyselin, diferenciální skenovací kalorimetrie a metody molekulární biologie.

V první části práce jsem se zabývala vlivem složení kultivačního media na chemické složení a biofyzikální parametry cytoplazmatické membrány *B. subtilis* během růstu v optimální (40 °C) a suboptimální (20 °C) teplotě. Srovnávala jsem komplexní médium s glukózou bohaté na živiny a dvě média minerální obsahující buď glukózu nebo glycerol jako zdroj uhlíku. Získaná data jasně ukazují zásadní vliv složení kultivačního media na chladovou adaptaci membrány. Zaznamenané rozdíly ve složení mastných kyselin byly velmi pravděpodobně indukované různou hladinou prekurzorů pro syntézu mastných kyselin s větveným řetězcem, které jsou důsledkem zapojení rozdílných metabolických drah při růstu buněk v různých mediích. Při růstu blízko teplotního optima (40 °C) byla nejvyšší membránová fluidita a nejvyšší teplota fázového přechodu ( $T_f$ ) zjištěna u buněk rostoucích na nejchudším substrátu, tj. minerálním mediu s glycerolem. Oproti tomu při v nízké teplotě (20 °C) vykazovaly nejvyšší membránovou fluiditu buňky kultivované na komplexním mediu. Rozsah adaptace, vyjádřený jako rozdíl hodnot  $T_f$  naměřených pro optimální a suboptimální teplotu, byl největší v případě komplexního media. Složení kultivačního media ale nemělo vliv na indukci desaturázy po chladovém šoku.

V druhé části práce jsem se zaměřila na chladovou adaptaci membrány *B. subtilis* v anaerobních podmínkách, které by podle předpokladů měly inhibovat aktivitu desaturázy. Zjistila jsem, že při růstu bakterie bez přístupu kyslíku dochází po přenosu z 37 °C do 25 °C k indukci syntézy desaturázy, která ale později není mechanismem zpětné vazby zastavena tak, jak je tomu v aerobních podmínkách. Tato regulace byla však obnovena krátce po dodání kyslíku k původně anaerobní kultuře. Jak při kultivaci aerobní, tak při kultivaci anaerobní byla indukce transkripce genu *des* podstatně snížena přidáním fluidizující kyseliny olejové. Tento jev byl závislý na přítomnosti intaktního dvoukomponentového systému DesK-DesR. Analýza mastných kyselin potvrdila, že v anaerobních podmínkách nedošlo k syntéze nových nenasycených mastných kyselin, přestože technikou immunoblotu byla detekována vysoká hladina proteinu Des v buňkách anaerobní kultury. Adaptace membrány *B. subtilis* k nízké teplotě je tedy v anaerobních podmínkách realizována výhradně zvýšením poměru anteiso/iso-větvených mastných kyselin v membránových lipidech a nikoli přechodným zvýšením hladiny nenasycených mastných kyselin typickým pro aerobní podmínky. Rozsah snížení membránové fluidity, měřené jako pokles anizotropie fluorescence 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrienu, byl pro aerobní a anaerobní podmínky srovnatelný.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, cytoplazmatická membrána, chladová adaptace, anaerobióza, membránová fluidita