

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie



Mgr. Lenka Šemberová

Stresové proteiny cytoplasmatické membrány *Bacillus subtilis*
Stress proteins in the cytoplasmic membrane fraction of *Bacillus subtilis*

Rigorózní práce

Konzultant: doc. RNDr. Jaroslava Svobodová, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 3. 2011

Tato rigorózní práce byla vypracována na Katedře genetiky a mikrobiologie PřF UK a navazuje na diplomovou práci s názvem „Adaptace cytoplasmatické membrány *Bacillus subtilis*“, kterou jsem na stejné katedře obhájila v roce 2002. Vznikala částečně v laboratoři doc. RNDr. Petra Svobody, DrSc. na Katedře fyziologie živočichů, kde jsem pracovala na vědeckém úkolu v rámci svého pracovního úvazku. Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Jaroslavě Svobodové, CSc. a doc. RNDr. Petrovi Svobodovi, DrSc. za odborné vedení a RNDr. Denise Petráčkové za spolupráci a podporu.

Stresové proteiny cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis*

Grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* žije ve svrchních vrstvách půdy, kde se často setkává s výkyvy osmolarity a pH, změnami teploty či koncentrace živin. Během evoluce byly vyvinuty mechanismy, které bakteriím pomáhají se s těmito nepříznivými vlivy vyrovnávat. Mezi ně patří i tzv. obecná stresová odpověď. Při ní dochází ke zvýšení exprese přibližně 150 genů, jejichž produkty zvané GSP (obecné stresové proteiny) minimalizují poškození buněk. Přestože je známa velikost, struktura a regulace mnoha stresových proteinů, informace o membránových stresových proteinech často chybí.

V naší studii jsme se zaměřili na membránový proteom *Bacillus subtilis* 168 *trp2*.. Buňky byly během svého růstu vystaveny dlouhodobému (20 h) působení pH 5,0; resp. přítomnosti 3% v/v etanolu 30 minut. K rostoucím buňkám byl 30 minut před ukončením kultivace přidán L-[³⁵S]-methionin. Po dosažení střední exponenciální fáze růstu byly bakterie rychle zfiltrvány a izolovány cytoplazmatické membrány. Izolované membránové frakce byly analyzovány dvojrozměrnou elektroforézou. Z jednotlivých růstových situací byly provedeny 4 paralelní gely a porovnány s membránovým proteomem bakterií rostoucích za optimálních podmínek (tj. v komplexním médiu o pH 7,0 a teplotě 40°C). K počítačovému zpracování rozdělených membránových proteinů byl použit program PDQuest, vybrané stresové proteiny byly identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF.

Při pH stresu, resp. po přidání etanolu se růstová rychlost *B. subtilis* snižuje z hodnoty $\mu = 3,5 \text{ h}^{-1}$ na $\mu = 2,4 \text{ h}^{-1}$. V cytoplazmatické membráně se vlivem stresových faktorů změnilo množství nejméně 25 proteinů. K výrazně zvýšené syntéze ale došlo pouze u 5 proteinů v obou případech. Etanolové stresové proteiny byly identifikovány jako YdaP, Ctc, YfhM, YjcH and YwaC, zatímco proteiny pH stresu jako AcoB, YkwC, SodA, YjcH and YwaC.

Některé proteiny z výše uvedených jsou považovány za obecné stresové proteiny uplatňující se v signalizaci stresu. Jiné indukované proteiny jsou stresově specifické a hrají roli v metabolismu lipidů a detoxifikaci buněk.

Stress proteins in the cytoplasmic membrane fraction of *Bacillus subtilis*

A primary habitat of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* is the upper layer of the soil. Within this ecosystem, *B. subtilis* experiences a wide variety of environmental challenges and nutrient limitations that induce several mechanisms to help the cells to survive. A process known as a general stress response belongs among them. Expression of about 150 genes is enhanced and their products called general stress proteins (GSP) minimize the cell damage. Although the size and structure, as well as the regulation, of many stress proteins have been fairly well elucidated the information about stress membrane proteins is very limited.

We characterized the membrane proteome of *Bacillus subtilis* 168 *trp2*- exposed to acidic pH and ethanol. Cells were 1) grown under optimum conditions in complex medium (pH 7.0) at 40°C with aeration; 2) grown in complex medium at pH 5.0 for 20 hours or 3) challenged with 3% v/v ethanol for 30 minutes during exponential growth. The cultures were harvested in the mid-exponential phase by rapid filtration. Isolated membrane fractions were analysed by an optimized two-dimensional gel electrophoresis. Two alternative methods of protein detection were compared: silver staining and radioactive labeling with L-[³⁵S]-methionine. In each experiment 4 parallel gels were prepared and about 400 protein spots were quantified using Molecular Imager scanner and PDQuest software. The stress induced proteins were identified by MALDI-TOF mass spectrometry.

The growth rate of *B. subtilis* grown in complex medium (pH 7.0) at 40°C is $\mu = 3.5 \text{ h}^{-1}$. Both stress factors (pH 5.0 and 3% v/v ethanol) reduced the growth rate to $\mu = 2.4 \text{ h}^{-1}$. Reproducible differences in expression as a function of ethanol shock or acid stress showed at least 25 membrane proteins. Nevertheless, only 5 proteins were significantly increased after ethanol shock or acid stress. Ethanol stress proteins were identified as YdaP, Ctc, YfhM, YjcH and YwaC. To acid stress proteins belong the following: AcoB, YkwC, SodA, YjcH and YwaC. Proteins YjcH and YwaC were increased after ethanol shock as well as acid pH treatment.

Some of stress proteins found in both proteomes were classified as general stress proteins responsible for stress signalling; the specific stress proteins are involved in lipid metabolism and in the detoxification capacity of the cell.

Obsah

CYTOPLAZMATICKÁ MEMBRÁNA.....	6
REAKCE BAKTERIÍ NA STRES	6
Přenos signálů z vnějšího prostředí do bakterie - fosforylace.....	7
Alternativní sigma faktory	10
NESPECIFICKÁ STRESOVÁ ODPOVĚĚ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	15
Chaperony	16
Proteázy.....	17
ACIDICKÝ STRES	19
Adaptace bakterií na organický acidický stres.....	19
Adaptace bakterií na anorganický acidický stres	21
ALKOHOLOVÝ STRES.....	22
Adaptace bakterií na etanol.....	22
MATERIÁL A METODY	24
DISKUZE	33
LITERATURA	37

CYTOPLAZMATICKÁ MEMBRÁNA

Cytoplazmatická membrána je strukturou nacházející se na povrchu bakteriální cytoplazmy. Tvoří semipermeabilní osmotickou bariéru, která zajišťuje stálost vnitřního prostředí buňky. Jako jediná struktura svého druhu v buňce zajišťuje veškeré membránově vázané funkce. Odděluje buňku od vnějšího prostředí a zároveň zajišťuje komunikaci s ním, dochází na ní k tvorbě protonového gradientu, syntéze fosfolipidů a z části i buněčné stěny. Na membránu je také vázáno asi 30% bakteriálních ribosomů a nachází se zde řada membránových bílkovin zajišťujících různé funkce, např. přeměnu energie, transport proteinů, syntézu buněčné stěny a buněčné dělení (ZWEERS *et al.* 2008). Cytoplazmatická membrána hraje ústřední roli v odpovědi organismu na environmentální stresy. Fluidita a permeabilita membrány jsou zásadními životními parametry pro udržení buněčné homeostáze a efektivního membránového transportu. Kvůli zamezení destabilizace membránové struktury v důsledku environmentálního stresu mění bakterie složení svých membrán (van den BOOM a CRONAN 1989).

Stavba bakteriální cytoplazmatické membrány se zásadně neliší od stavby jiných biologických membrán. Základ tvoří tekuté kontinuum dvojvrstvy fosfolipidů s periferními a integrálními proteiny. U grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* tvoří proteiny 60-70 %, RNA 23 % a lipidy 16 % celkové hmotnosti membrány (BISHOP *et al.* 1967). Struktura cytoplazmatické membrány je stabilizována pomocí vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí. Na stabilizaci se rovněž podílí kationty (např. Mg^{2+} a Ca^{2+}) v kombinaci s negativními náboji fosfolipidů. Podmínkou správného fungování je určitý stupeň její tekutosti, který je ovlivňován charakterem membránových lipidů (DOWHAN 1997).

REAKCE BAKTERIÍ NA STRES

Ve všech přirozených ekosystémech se mění teplota, pH, osmolarita; objevují se metabolické zplodiny a dochází k vyčerpání živin. Tyto podmínky bakterie vnímá jako stresové a vyvinuly se u nich účinné regulační mechanismy, které spouštějí expresi stresových proteinů umožňujících se s těmito podmínkami vyrovnat. S ohledem na vztah mezi konkrétním stresovým faktorem a odpovědí jsou stresové proteiny rozděleny na globální a specifické.

Prostředkem k udržení stálého vnitřního prostředí, které je nutné pro existenci v nepříznivých podmínkách, je inducibilní syntéza adaptivních proteinů. Kompletní

fyziologická odpověď na nové podmínky vyžaduje spolupráci celého souboru operonů (regulon), které ve své regulační oblasti (promotor – operátor) obsahují sekvenci rozpoznávanou společným regulačním proteinem (represorem nebo operátorem). Soubor regulonů, které kódují nezávislé dráhy a funkčně příbuzné procesy, je označován jako globální regulon. V odpovědi na změnu prostředí (stimulus) dochází často k indukci většího počtu operonů, které jsou rozpoznávány různými regulačními proteiny. Společným jmenovatelem této indukce je pak daný stimulus a soubor odpovídajících genů je nazýván stimulon.

Přenos signálů z vnějšího prostředí do bakterie - fosforylace

Adaptivní systém, který vznikl u prokaryot a vyskytuje se i u nižších eukaryot a rostlin, obsahuje nejméně dva vzájemně propojené signální proteiny a je nazýván dvojkomponentový systém. Tento systém je používán pro zvýšení přizpůsobivosti organismů k vnějším podmínkám díky stimulaci exprese dříve netranskribovaných genů.

V typickém případě se tento systém skládá z membránového senzoru – kinázy a regulačního proteinu, který má obvykle funkci transkripčního faktoru a ve fosforylovaném stavu aktivuje nebo inhibuje genovou expresi. Kináza reagující na podnět se autofosforyluje na histidinovém zbytku. Fosfátová skupina je poté přenesena na aspartátový zbytek regulačního proteinu.

Senzorové kinázy mají vysoce konzervovaný C-konec a variabilní N-konec modulující autokinázovou aktivitu. Doména s autofosforylovatelným histidinem (HisKA doména) a doména vážící ATP (CA doména) se nacházejí na katalytickém C-konci. Cytoplazmatická oblast senzoru se obvykle skládá z PAS (název je odvozen z iniciál prvních tří proteinů identifikovaných v této rodině proteinů: **P**ER, **A**RNT, **S**IM), GAF (c-**G**MP-specifické a stimulované fosfodiesterázy, *Anabaena* **a**denylátcyklázy a *Escherichia coli* **F**hlA), a HAMP (**h**istidinkinázy, **a**denylylcyklázy, **m**ethyl-akceptující proteiny a ostatní **p**rokaryotické signální proteiny) domény (GALPERIN *et al.* 2001, SZURMANT *et al.* 2007).

U *Bacillus subtilis* bylo prozatím objeveno 36 kináz a 35 regulačních proteinů. Většina kináz obsahuje nejméně jednu transmembránovou doménu, 5 proteinů je cytoplazmatických. 13 senzorů obsahuje poblíž svého N-konce extracytoplazmatickou oblast s více než 40 aminokyselinami. V této oblasti se většinou nachází extracytoplazmatická PAS-like doména, která registruje signály z prostředí (CHANG *et al.*

2010). Funkce několika systémů sensor-regulátor již byla charakterizována, jiné mají funkci zatím neznámou (FABRET *et al.* 1999).

Aktivitu regulačních proteinů negativně regulují fosfatázy. *Bacillus subtilis* má rodinu 11 genů, které kódují tyto fosfatázy. RapA, RapB a RapE fosfatázy (regulator aspartyl phosphate phosphatase) inhibují iniciaci sporulace defosforylací proteinu SpoOF a samy jsou inhibovány specifickými pentapeptidy kódovanými geny *phrA*, *phrE* a *phrC*. Bylo potvrzeno, že šest z těchto *phr* genů obsahuje sigmaH promotor a σ^H faktor tedy pod vlivem výživových faktorů řídí produkci těchto regulátorů fosfatáz (McQUADE *et al.* 2001). Systém Rap-Phr se podílí také na mezibuněčné signalizaci (BISCHOFS *et al.* 2009).

Dvojkomponentové systémy mohou být vzájemně spřaženy. Příkladem je ResD-ResE systém, jehož transkripce z promotoru *resABCDE* operonu vyžaduje vazbu PhoP~P regulačního proteinu ve fosforylovaném stavu (PhoP-PhoR systém). Tato regulační síť váže dohromady respirační funkce a produkci energie (ResD-ResE) s hladováním na fosfát PhoP-PhoR (BIRKEY *et al.* 1998, KOMMINENI *et al.* 2010). Dalším příkladem je systém DegS-DesU, který je zapojen do regulace produkce exoproteáz či stavu kompetence, tvorby kolonií a biofilmu (OGURA a TSUKAHARA 2010). Recentní studie dokazuje, že aktivita sensorové kinázy DegS může být regulována fosforylací na jejím serinovém zbytku pomocí serin/threoninových kináz eukaryotického typu (JERS *et al.* 2011).

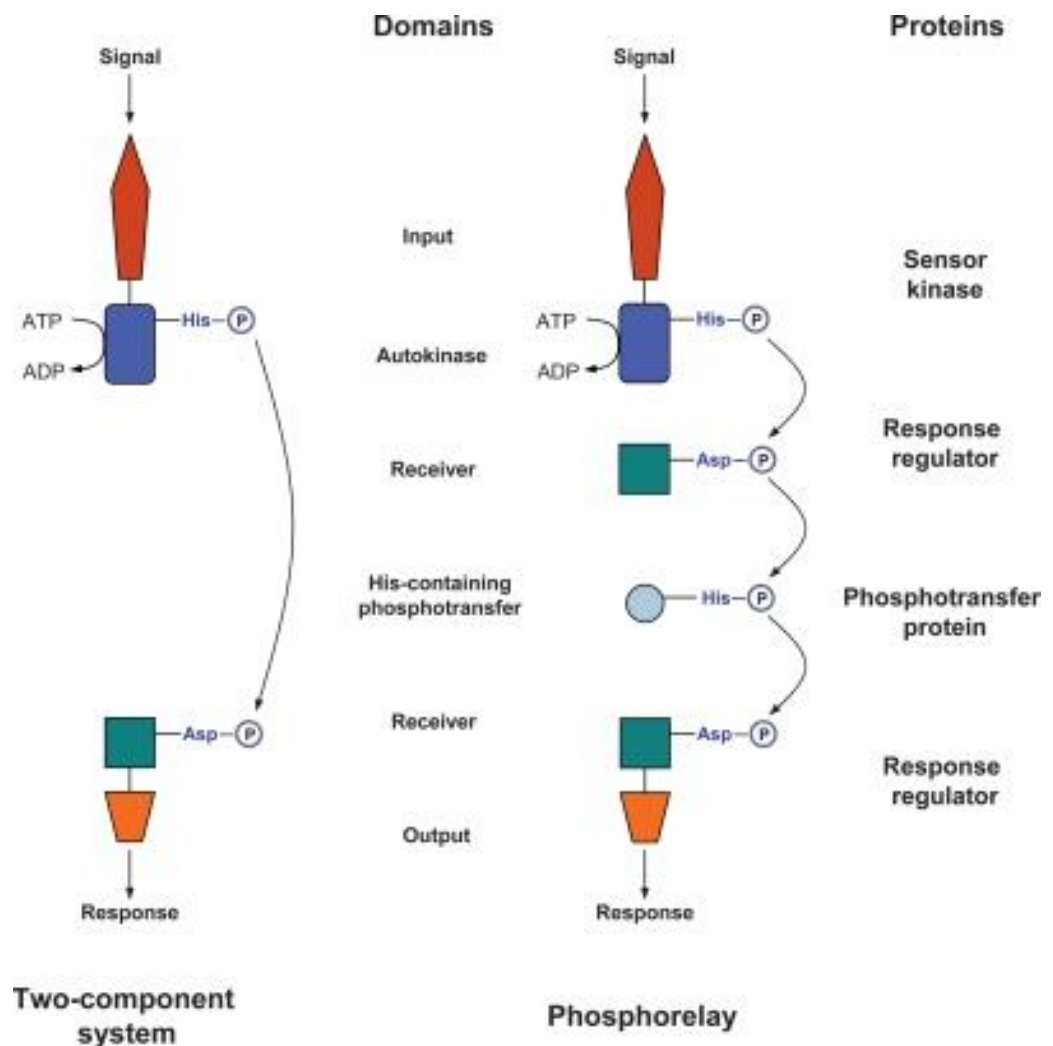
CssR-CssS systém kontroluje u grampozitivních bakterií správný „folding“ extracytoplazmatických proteinů (HYRYLÄINEN *et al.* 2001). Stimulace CssRS vede k produkci proteáz asociovaných s membránou. Tyto proteázy, HtrA a HtrB, degradují špatně sbalené proteiny v prostoru mezi cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Katalytická doména obou proteáz je lokalizována na extracytoplazmatické části membrány (KROJER *et al.* 2002).

Složitější variantou dvojkomponentového systému označovanou jako „phosphorelay“ je například systém iniciace sporulace *Bacillus subtilis* (BURBULYS *et al.* 1991). Kináza přenáší fosfoskupinu na regulační protein, který tvoří pouze aspartátová doména. Z tohoto fosforylovaného proteinu je fosfátový zbytek fosfotransferázou přenesen na regulační protein nebo transkripční faktor. Během této signalizace je fosfátová skupina přenášena postupně v pořadí His-Asp-His-Asp. První tři složky mohou být samostatné proteiny (sporulace *Bacillus subtilis*), ale mohou tvořit i multidoménový protein, jako je tomu u BvgS kinázy bakterie *Bordetella pertussis* (HOCH a VARUGHESE 2001).

Obr. 1: Schéma dvoukomponentového systému a „phosphorelay“

(převzato z MITROPHANOV A GROISMAN 2008)

Senzorová kináza dvoukomponentového systému odpovídá na signál z prostředí aktivací autokinázové domény, která autofosforyluje konzervovaný histidinový zbytek. Fosforylovaná kináza interaguje s doménou regulátoru, která katalyzuje přenos fosfátu na aspartát regulačního proteinu. Aktivovaný regulátor vykonává specifickou biochemickou funkci, např. reguluje transkripci. „Phosphorelay“ kromě senzorové kinázy a terminálního regulačního proteinu přenáší signál ještě přes další dva proteiny - regulační protein obsahující pouze aspartátovou doménu a fosfotransferázový protein.



U prokaryot se v regulaci fyziologických procesů uplatňují i další typy fosforylace. Jedním z nich je fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém (PTS), který se účastní skupinové translokace při membránovém přenosu a fosforylaci sacharidů. Dalším jsou ATP-dependentní proteinkinázy fosforylující na serin/threoninovém nebo tyrozinovém zbytku, které jsou alostericky aktivovány buněčnými metabolity. Příkladem je isocitrátdehydrogenáza kináza/fosfatáza, která fosforyluje citrátdehydrogenázu a dle typu zdroje uhlíku určuje další zpracování isocitrátu v Krebsově nebo glyoxalátovém cyklu (SAIER *et al.* 1990). Stejný typ fosforylace probíhá i při přenosu informací uvnitř buňky, příkladem je regulace aktivity alternativní podjednotky RNA polymerázy – faktoru σ^B (AKBAR *et al.* 2001). Při regulaci sporulace a tvorby biofilmu *Bacillus subtilis* se uplatňuje serin/threonin proteinkináza PrkC (MADEC *et al.* 2002). U některých bakterií byly popsány i proteinkinázy charakteristické pro eukaryota (HANKS *et al.* 1988, BAKAL a DAVIES 2000).

Podrobnější klasifikací prokaryotických proteinkináz se zabývá práce z roku 2010 (TYAGI *et al.* 2010).

Alternativní sigma faktory

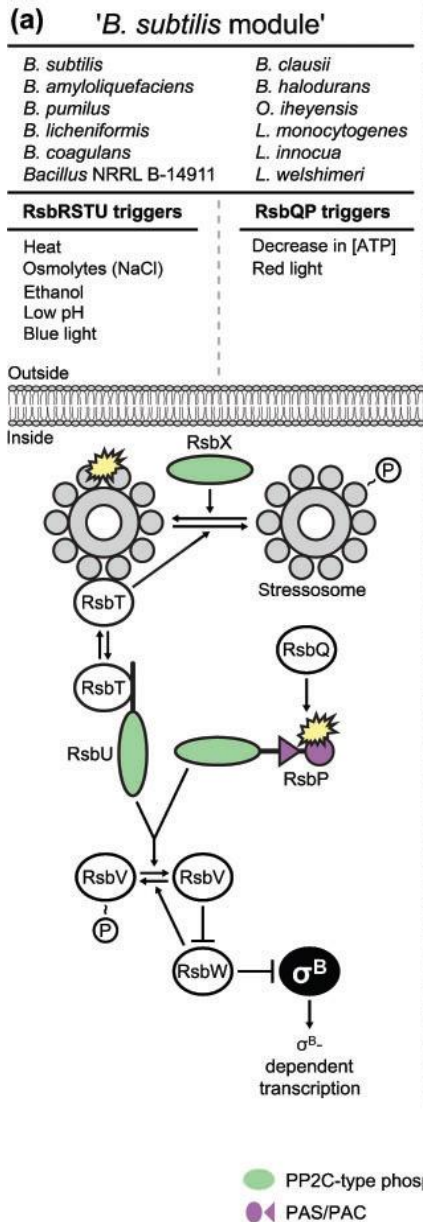
Regulace exprese u bakterií často probíhá na úrovni transkripce aktivací transkripčních faktorů a změnou specifity RNA polymerázy. Ta je variabilní v závislosti na výměně své podjednotky – σ faktoru. Dle podmínek může být tato podjednotka uvolněna z „core“ enzymu a nahrazena σ faktorem se specifitou k promotorům genů kódujících proteiny nutné pro odpověď na stresové podmínky – alternativním σ faktorem. Přestože se alternativní sigma faktory mohou podílet také na elongaci, jejich hlavní úloha spočívá v iniciaci transkripce (MOONEY *et al.* 2005). Intracelulární hladiny těchto alternativních σ faktorů se v buňce mění indukovanou nebo reprimovanou transkripcí a vazbou anti- σ faktorů, jež jsou regulovány cílenou proteolýzou nebo fosforylací. U *E. coli* je hladina σ^H ovlivňována konformační inaktivací, po zvýšení kultivační teploty je konformace σ^H stabilizována a gen pro tento alternativní faktor efektivněji transkribován (KANEMORI *et al.* 1999). Regulony některých σ faktorů se mohou vzájemně překrývat, exprese genů je pak kontrolována dvěma nebo více σ faktory. Např. geny kódující transportní systém pro prolin a glycin-betain, *opuE* a *opuD*, obsahují σ^B - i σ^A -dependentní promotory (SPIEGELHALTER a BREMER 1998).

Genom *B. subtilis* kóduje nejméně 17 různých σ faktorů. Podrobně se jimi zabývá práce z roku 1995 (HALDENWANG 1995).

σ^A (σ^{43} , σ^{55}) je kódován genem *sigA*, *rpoD*. Z funkčního hlediska je analogem σ^D u *E. coli*, tento tzv. „housekeeping“ faktor je exprimován v nestresované buňce. Částečně se zapojuje do odpovědi na teplotní stres, syntézy degradativních enzymů během stacionární fáze a exprese genů pro iniciaci sporulace.

σ^B (σ^{37}) kódovaný genem *sigB* spouští nespecifickou stresovou odpověď a spolu s dalšími regulátory i odpověď na teplotní stres (HELMANN *et al.* 2001). Jeho indukce podléhá autoregulaci. V nestresované buňce je σ^B vázán svým anti- σ faktorem RsbW, v přítomnosti stresu dochází na serinovém zbytku k defosforylaci RsbV. Ten v defosforylované formě vyvazuje RsbW z komplexu RsbW- σ^B a tím σ^B uvolňuje. Tato regulace existuje ve dvou variantách v závislosti na tom, která PP2C fosfatáza defosforyluje RsbV~P (HECKER *et al.* 2007, PRICE 2002).

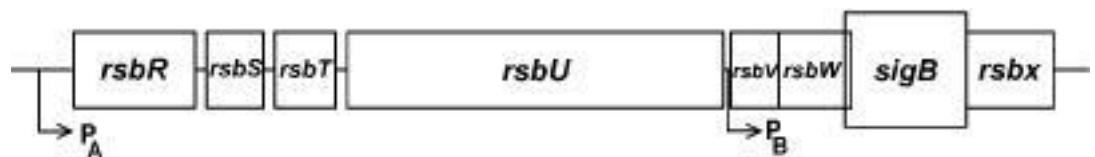
- Energetický stres (hladovění na uhlík, kyslík, fosfor, vstup do stacionární fáze). Defosforylace RsbV~P je způsobena **RsbP fosfatázou**, která je svým N-konci obsahuje senzorkou PAS doménu. Fosfatáza sama je aktivována α/β hydrolázou RsbQ. Fosforylace a aktivace σ^B je v tomto případě závislá na hladině ATP v buňce.
- Teplotní, pH, etanolový a osmotický stres. Odpověď na tyto stresové faktory je kontrolována supermolekulárním komplexem, tzv. stresosomem. V nestresované buňce je na stresosom, tvořený neznámým poměrem proteinů RsbS a RsbR, navázána RsbT kináza. Vlivem stresu dojde k fosforylaci proteinů stresosomu RsbT kinázou, následně dochází k uvolnění kinázy z komplexu. RsbT se poté přímou protein-proteinovou interakcí váže na **RsbU fosfatázu** a takto ji aktivuje. RsbU defosforyluje RsbV~P. Pro tuto alternativu je klíčová míra fosforylace stresosomu, která je kontrolována RsbT kinázou a RsbX fosfatázou. RsbX zpětnovazebně odpovídá na hladinu σ^B v buňce. Tato odpověď není závislá na hladině ATP v buňce. Schéma aktivace alternativního faktoru σ^B a odpovídající citace viz obrázek 2.



Obr. 2: Signální dráha kontroly aktivity σ^B *Bacillus subtilis*

Supermolekulární komplex *B. subtilis* zvaný stresosom (~1,8 MDa) se skládá z několika kopií proteinů RsbR a RsbS (MARLES-WRIGHT *et al.* 2008). Různé stresové faktory stimulují RsbT kinázovou aktivitu vedoucí k fosforylaci proteinů stresosomu. Fosforylaci dojde k uvolnění RsbT ze stresosomu, k aktivaci RsbU a následně také σ^B (DELUMEAU *et al.* 2004). Díky proteinu RsbX se stresosom vrací do nefosforylované formy (CHEN *et al.* 2004). Vlivem červeného světla a energetického stresu se aktivuje dráha využívající hydrolázu RsbQ a fosfatázu RsbP (ÁVILA-PÉREZ *et al.* 2010). Signalizace přes RsbQ/P byla nalezena pouze u *B. subtilis*, zatímco RsbRST dráha je konzervována u gram pozitivních bakterií s nízkým obsahem GC v DNA.

Samotný σ^B faktor je kódován sedmým genem *sigB* operonu, který obsahuje osm genů. Bazální exprese všech genů operonu je řízena ze σ^A -dependentního promotoru P_A . Za stresových podmínek dochází k několikanásobnému zvýšení transkripce čtyř distálních genů z promotoru P_B (Obr. 3).



Obr. 3: σ^B operon (převzato ze SCHUMANN 2003)

σ^C (σ^{32}) byl nalezen v rostoucích i sporulujících buňkách a ve stacionární fázi, pokud byl narušen proces sporulace. Funkce, regulace a strukturní geny jsou neznámé (HALDENWANG 1995).

σ^D (σ^{28}) je kódován genem *sigD*, *flaB*. Aktivita a exprese závisí na složení média. Regulon σ^D obsahuje geny pro syntézu bičíku, motilitu a chemotaxi. Buňky *Bacillus subtilis* se mohou vyskytovat ve dvou morfologických typech: jako jednotlivé pohyblivé buňky, nebo jako dlouhé nepohyblivé řetězky buněk v exponenciální fázi růstu. Díky aktivitě σ^D faktoru se exprimují geny kódující proteiny bičíku a geny pro autolyziny. Produkty genů umožňují přestavbu buněčné stěny, separaci jednotlivých buněk od sebe a také pohyb (CHEN *et al.* 2009). Pravděpodobným regulátorem výživové represe *hag* genů (σ^D -dependentní geny pro flagelin) je CodY protein (MIREL *et al.* 2000). Gen *degR*, který obsahuje v promotoru místo pro vazbu σ^D , kóduje regulační protein proteáz, sekrece exoenzymů a sekrece extracelulární proteázy (HALDENWANG 1995).

σ^H (σ^{30}) kódovaný genem *sigH*, *spoH* je odpovědný za expresi genů v postexponenciální fázi, syntézu enzymů TCA cyklu, iniciaci sporulace a navození stavu kompetence. Vyskytuje se při nespecifické stresové odpovědi (GAIDENKO a PRICE 1998) a účastní se kontroly fosfatáz dvojkomponentového systému (McQUADE *et al.* 2001). Během exponenciální fáze růstu je exprese *sigH* potlačena díky aktivitě AbrB proteinu. Za přímou stimulaci σ^H -dependentní transkripce sporulujících buněk je odpovědná ClpX ATPáza, která zároveň působí na výměnu „housekeeping“ σ^A v komplexu RNA polymerázy (RNAP). ClpX ATPáza působí při vzniku uzavřeného a otevřeného transkripčního iniciačního komplexu (LIU a ZUBER 2000).

σ^L je homolog σ^{54} *E. coli* kódovaný genem *sigL*. Jeho funkce spočívá v expresi genů degradace aminokyselin a levanázy (DEBARBOUILLE *et al.* 1991).

Sporulační alternativní σ faktory vyvolávají specifickou stresovou odpověď přeměnou vegetativní buňky v odolnou sporu. Sporulace je extrémním příkladem reakce na stres. Kaskáda specifických σ faktorů probíhá v definovaném čase i posloupnosti. V prespoře působí σ^F a σ^K , zatímco v buňce mateřské σ^E a σ^G . Aktivita sporulačního faktoru σ^F je regulována interakcemi mezi samotným σ^F a dalšími proteiny: SpoIIE,

SpoIIAB a SpoIIAA (IBER *et al.* 2006). Nedávno byl objeven malý protein Fin s funkcí anti- σ^F faktoru. Vlivem tohoto proteinu se spouští exprese pozdních genů v prespoře (CAMP *et al.* 2011).

Z popsaných σ faktorů patří sedm do rodiny extracytoplasmatických. ECF faktory jsou kódovány geny *sigM*, *sigV*, *sigW*, *sigX*, *sigY*, *sigZ* a *ylaC*; kromě *sigZ* jsou negativně regulovány anti- σ faktory. Ačkoliv mutanty s delecí genu pro některý z ECF faktorů mohou vykazovat sníženou rychlost růstu oproti divokému kmenu, jsou životaschopné. To je dáno zřejmě tím, že regulony jednotlivých ECF faktorů i funkce stresových proteinů se vzájemně překrývají (MASCHER *et al.* 2007). Obecně tato skupina řídí nárůst hladiny nebo sekreci molekul a iontů, odpověď na různé typy stresů a u některých bakterií se účastní i v patogenezi.

σ^W regulon se částečně překrývá se σ^X regulonem. Tyto faktory působí vzájemně antagonisticky. σ^W je regulován růstovou fází, zatímco σ^X podléhá autoregulaci (HUANG *et al.* 1998). σ^W regulon obsahuje přibližně 60 genů. Exprese ze σ^W regulonu probíhá při alkalickém stresu, kdy vysoké pH interferuje s transportní kapacitou buňky a uvolňuje σ^W z jeho inhibice vazbou anti- σ faktoru RsiW (WIEGERT *et al.* 2001). Transkripce z tohoto regulonu probíhá i v případě osmotického stresu. Řada těchto stresových proteinů obsahuje aspoň jednu transmembránovou doménu (MSH), pět z nich je připojeno k membráně jako lipoproteiny. Jejich funkce spočívá v hromadění kompatibilních osmolytů a kompenzaci tlaku působícího na membránu a buněčnou stěnu. Rovněž se podílí na detoxifikaci buněk, produkci antimikrobiálních látek a rezistenci k nim (HELMANN 2006). Prokázána byla indukce při etanolovém stresu (PETERSOHN *et al.* 2001).

σ^M je dalším ECF *B. subtilis*. Gen *sigM*, *yhdM* podléhá pozitivní autoregulaci a negativní regulaci proteinů kódovaných s ním kotranskribovanými geny *yhdL* a *yhdK*. Tento faktor je důležitý pro růst a přežití při vysoké osmolaritě prostředí (HORSBURGH a MOIR 1999). Jako jediný ze sedmi ECF faktorů podmiňuje rezistenci k oxidativnímu stresu (CAO *et al.* 2005). Je aktivován i dalšími stresovými faktory, např. etanolem, nízkým pH, vysokou teplotou, nedostatkem fosfátu, bacitracinem, vankomycinem a kladně nabitými antimikrobiálními peptidy (THACKRAY a MOIR 2003).

Nedávno byl objeven alternativní sigma faktor *B. subtilis* protein YvrI. Je exprimován, pokud na buňku působí antibiotika ovlivňující syntézu buněčné stěny, např. vankomycin (Mac LELLAN *et al.* 2008).

NESPECIFICKÁ STRESOVÁ ODPOVĚĚ *BACILLUS SUBTILIS*

Nespecifická stresová odpověď spočívá v produkci stresových proteinů bez ohledu na podnět (stres), který aktivaci způsobil. Za vývoj nespecifické stresové rezistence jsou odpovědné globální stresové proteiny (GSPs). Globální stresové proteiny jsou produkty globálních regulonů, které se objevují v buňce za stresových podmínek v důsledku aktivace transkripce řady operonů. Produkce GSP je indukovaná tepelným šokem, nízkým pH, etanolovým a osmotickým šokem, hladověním a přechodem do stacionární fáze. Globální stresové proteiny jsou lokalizovány většinou v cytoplazmě, nejméně 25 proteinů obsahuje alespoň jednu transmembránovou doménu, šest je sekretováno a některé jsou vázány na membránu jako lipoproteiny. Velké množství proteinů asociovaných s membránou poukazuje na důležitost udržení integrity membrány a transportní kapacity během stresu (PETERSOHN *et al.* 2001).

Induktorem nespecifické stresové odpovědi je alternativní σ^B faktor, částečně i σ^H faktor (přepis genů obecné stresové odpovědi *yvyD* a *ytxHIIJ*) a ECF faktory σ^W a σ^X . Exprese může být vyvolána i ze σ^A -dependentního promotoru a) po inaktivaci CtsR represoru (propojení obecné stresové odpovědi s odpovědí na vysokou teplotu – regulace *clpP* a *clpC* operonu), b) při osmotickém stresu (exprese genů *opuE* a *opuD* pro transport prolinu a glycin-betainu) nebo c) po aktivaci globálního regulačního proteinu Spx, jak je tomu například u genů *trxA* pro thioredoxin a *sodA* pro superoxidodismutázu (HECKER *et al.* 2009).

Většina produktů těchto genů je v malé míře v buňce přítomná i v nepřítomnosti stresového faktoru, kdy konstitutivní transkripce probíhá ze σ^A -dependentního promotoru (např. produkty genů *ctc*, *gtaB* a *sigB*). Produkce těchto stresových proteinů vzrůstá při stresu z 1% až na 20% translační kapacity buňky. V roce 2001 bylo popsáno 125 σ^B -dependentních genů, přibližně pětina z nich je exprimována i v nepřítomnosti σ^B během stresově specifické indukce (PETERSOHN *et al.* 2001). V současnosti je σ^B regulonu přisuzováno přibližně 200 otevřených čtecích rámců (ORF), tj. 5% genomu. Každý z ostatních charakterizovaných alternativních sigma faktorů přitom reguluje méně než 50 ORF (HELMANN 2006). Geny nespecifické stresové odpovědi byly na základě jejich

známé či predikované funkce rozděleny do několika skupin (PRICE 2002): a) přímá ochrana (proteázy, katalázy, thioredoxin atd.), b) modulace σ^B aktivity (antisigma a anti-antisigma faktory, fosfatázy), c) transport (permeázy, proteiny symportu a antiportu), d) metabolismus (dehydrogenázy, pyruvát oxidázy, glukosidázy), e) turnover (cystein proteáza, ribonukleáza R) aj.

Do jedné z výše zmíněných skupin patří i chaperony a proteázy. Vlivem stresu dochází v buňkách k poškození funkční konformace proteinů. Vzrůstající počet molekul defektních bílkovin a enzymů snižuje aktivitu buňky a působí na buňku toxicky. V případě, kdy nedojde k opravě těchto molekul nebo jejich degradaci, nastává smrt buňky.

Chaperony

Molekulární chaperony jsou indukovány tepelným šokem u všech organismů, od bakterií až po člověka. Chaperony zamezují akumulaci neaktivních a poškozených proteinů v cytoplazmě tím, že opravují konformační změny bílkovin a enzymů, tj. poškození na úrovni slabých vazebných interakcí.

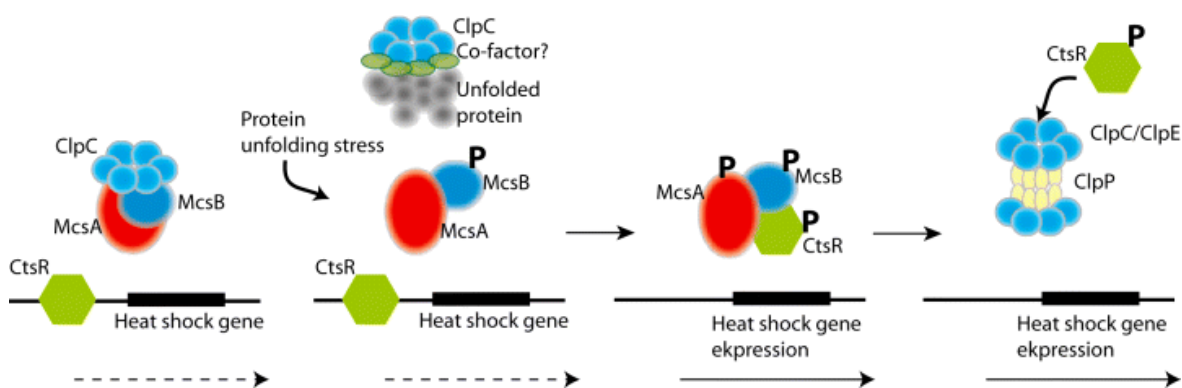
Nejznámější chaperony *Bacillus subtilis*, DnaK a GroEL, patří do skupiny HSP (**h**eat **s**hock **p**roteins). Konkrétně jsou řazeny do HSP třídy I, která se skládá pouze ze dvou operonů, *groE* a *dnaK*. Exprese genů obou operonů je řízena ze σ^A promotoru. Operony podléhají negativní regulaci HrcA proteinem, který se váže na invertované repetice, tzv. CIRCE sekvence (**c**ontrolling **i**nverted **r**epeat of **c**haperone **e**xpression). Aktivita HrcA je modulována samotným GroEL systémem. Díky němu je represor HrcA udržován v aktivní konformaci, váže se na CIRCE sekvence a transkripce obou operonů je blokována. Jakmile dojde vlivem stresu k nahromadění neaktivních proteinů v cytoplazmě, GroEL systém je jimi vyvázan, dojde ke zvýšení obsahu neaktivní formy HrcA proteinů a tím ke zvýšení transkripce *groE* a *dnaK* operonu. DnaK a GroEL chaperony jsou potřebné pro správnou funkci buněčných dějů při normální teplotě. Na indukci těchto chaperonů se podílí zvýšení teploty, etanolový šok, limitace živinami, oxidační šok, vysoké nebo nízké pH, kyselina nalidixová, UV záření, puromycin a fágová infekce (MOGK 1998).

Dalším chaperonem *B. subtilis* je produkt genu *htpG*, jehož transkripce je při tepelném šoku zvýšena 10krát. Jako jediný protein je HtpG příslušníkem HSP třídy IV (SCHUMANN 2003).

Proteázy

Na rozpoznávání a degradaci poškozených nebo nefunkčních proteinů se podílí enzymy zvané proteázy. U *Bacillus subtilis* mají hlavní funkci Clp proteázy. Vysoce konzervované ATP-dependentní ClpP proteázy se skládají ze dvou podjednotek, ATPázy a peptidázy. Centrální proteolytické jádro tvoří 14 ClpP (serin)peptidázových podjednotek. Proteolytická aktivita je podmíněna asociací ClpP multimeru s jedním nebo dvěma hexamerními prstenci Clp ATPázy. Clp ATPázy asociované s proteolytickým jádrem jsou zodpovědné za rozpoznávání, rozvolnění struktury substrátu a jeho translokaci dovnitř proteolytického komplexu (ZOLKIEWSKI 2006). Clp ATPázy jsou rozděleny do několika rodin, pouze jejich část je schopna interagovat s ClpP. Za rozpoznávání ATPáz proteinem ClpP je zodpovědný tripeptid, který obsahují ATPázy ClpC, ClpE a ClpX. ClpB a ClpL zmíněný peptid nemají (KIM *et al.* 2001). Jedna bakterie *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu obsahuje přibližně 1400 ClpX, 250 ClpC a 100 ClpE hexamerů a 1200 komplexů ClpP (GERTH *et al.* 2004).

Produkce ClpP a většiny Clp ATPáz je silně zvýšena při teplotním aj. stresu. Transkripce *clp* genů je kontrolována CtsR represorem, který se váže k sedminukleotidové repetici lokalizované v σ^A promotoru cílových genů. Geny *clpP* a *clpC* jsou rovněž pod kontrolou σ^B . Vazba CtsR na DNA je ovlivňována několika proteiny, které jsou kódovány *ctsR* operonem. Tyto proteiny, McsA, McsB a ClpC, spolu tvoří ternární komplex. Za normálních, nestresových podmínek je kinázová aktivita McsB je inhibována. Přítomné denaturované proteiny v buňce způsobí uvolnění ClpC z komplexu. Protein McsB se autofosforyluje a zvýší tak svoji afinitu k CtsR represoru. Vytváří se nový ternární komplex skládající se z fosforylovaného McsA, McsB a CtsR. Fosforylovaný CtsR se uvolní z cílového promotoru a dochází k derepresi Cts regulonu. Fosforylovaný CtsR represor je za stresových podmínek degradován komplexem ClpCP a ClpEP. CtsR protein je součástí CtsR regulonu a jeho syntéza je stimulována při odpovědi na stres. Rychlá inaktivace nově syntetizovaného CtsR fosforylací a následná degradace je podmínkou udržení dereprese CtsR regulonu za podmínek stresu (KIRSTEIN *et al.* 2005, KIRSTEIN a TURGAY 2005).



Obr. 4 V přítomnosti stresu je aktivita represoru CtsR inhibována fosforylací komplexem McsA/McsB a následnou degradací ClpCP proteázou. Přerušovaná šipka značí nízkou hladinu genové exprese, plná šipka hladinu vysokou; P značí fosforylací (převzato z FREES *et al.* 2007).

ClpC *Bacillus subtilis* odpovídá za degradaci nefunkčních proteinů i v nestresované buňce, ClpE kontroluje kvalitu proteinů během teplotního šoku, ClpL a ClpB zřejmě fungují podobně jako chaperony. Obecně se ClpP proteázy nepodílejí jen na eliminaci proteinů s nesprávnou konformací, ale proteolýzou kontrolují také aktivitu klíčových regulačních proteinů. Kromě modulace aktivity CtsR represoru je ovlivněna např. odpověď bakterií na alkalický stres. Prvním krokem adaptace na alkalický stres je lýze RsiW antisigma faktoru proteázami ClpXP a ClpEP. Tím dojde k rozpadu komplexu σ^W -RsiW a spuštění transkripce genů σ^W regulonu (ZELLMEIER *et al.* 2006). ClpXP proteolýzou reguluje intracelulární hladinu globálního transkripčního regulátoru Spx a přímo tak ovlivňuje stav kompetence a adaptaci k limitaci kyslíkem (NAKANO *et al.* 2003). Aktivitou Clp proteáz je výrazně ovlivněna i sporulace (ClpX aktivuje alternativní sporulační faktor σ^H , LIU a ZUBER 2000) a biosyntéza peptidoglykanu (KOCK *et al.* 2004). Lze uzavřít, že Clp proteiny jsou nutné pro buněčné dělení, motilitu, syntézu degradativních enzymů, sporulaci, adaptaci na stresové podmínky a genetickou kompetenci.

Bacillus subtilis kóduje dva homology ATP-dependentní Lon proteázy *E. coli*, *lonA* a *lonB*. LonA zabraňuje transkripci σ^G -dependentních genů během vegetativního růstu (zřejmě degradací σ^G faktoru), exprese *lonB* genu je kontrolována v prespoře faktorem σ^F . Na rozdíl od *E. coli* delece jednoho, či obou genů zároveň nemá na fenotyp *B. subtilis* viditelný vliv (SCHMIDT *et al.* 1994).

Thioredoxin se podílí na správném skládání proteinů a na degradaci jejich chybných forem při odpovědi buňky na stres. U divokého kmene *B. subtilis* výrazně stoupá hladina

trxA mRNA po tepelném (30 x) a etanolovém šoku, oxidativním či osmotickým šoku (8-20 x). Transkripce *trxA* genu je iniciována ze dvou promotorů, σ^A - a σ^B -dependentního (SCHARF *et al.* 1998). TrxA protein je donorem elektronů pro membránovou CcdA reduktázu, a tím ovlivňuje tvorbu endospory a cytochromu c (MÖLLER a HEDERSTEDT 2008).

ACIDICKÝ STRES

Acidický stres lze dle povahy působícího agens rozdělit na organický a anorganický. Organický acidický stres je vyvolán slabými organickými kyselinami a nízkým pH. Anorganický acidický stres je vyvolán pouze snížením vnějšího pH, které způsobují anorganické kyseliny, např. HCl (FOSTER 1999).

Jev adaptace na nízké pH byl popsán u řady gramnegativních a grampozitivních mikroorganismů (HALL *et al.* 1995). Růst *B. subtilis* v mírně kyselém prostředí spouští syntézu proteinů, které chrání buňku před extrémními kyselými podmínkami, dochází k tzv. preadaptaci (WILKS *et al.* 2009). Do odpovědi na organický a anorganický acidický stres jsou zapojeny odlišné opravné mechanismy, které jsou dále závislé na růstové fázi a použitém kultivačním médiu (BEARSON *et al.* 1998, KWON a RICKE 1998).

Pro některé proteiny acidického stresu je indukujícím signálem hodnota intracelulárního pH (pH_i), zatímco jiné odpovídají na vnější (extracelulární) pH. Indukce acidické tolerance poskytuje nejen ochranu před pH stresem, ale i před vysokou teplotou, oxidativním poškozením, H_2O_2 , polymyxinem B či vysokou osmolaritou. Tato ochrana je nazývána zkříženou rezistencí, tzv. „cross protection“ (LEYER a JOHNSON 1993).

Adaptace bakterií na organický acidický stres

Organickým acidickým stresem je chápán kombinovaný účinek nízkého pH a slabých (organických) kyselin na mikroorganismus. Slabé kyseliny zahrnují těkavé mastné kyseliny (VFA = volatile fatty acids), např. máselnou, propionovou, octovou, které vznikají při fermentaci. Tyto slabé kyseliny mají na buňku velký vliv, protože mohou v nenabitě (protonizované) formě prostupovat cytoplazmatickou membránou. Uvnitř buňky dochází k jejich disociaci, což vede ke snížení intracelulárního pH. Čím nižší pH je vně buňky, tím více kyselin zůstává nedisociovaných a tím více ovlivňují pH buňky po

prostupu membránou. Předpokládá se, že škodlivý vliv má nejenom snižování vnitřního pH, ale i akumulace aniontů slabých organických kyselin v buňce.

Mechanismus rezistence k acidifikaci cytoplazmy způsobené permeabilními slabými organickými kyselinami pravděpodobně spočívá mimo jiné v indukci genových produktů, jež přispívají k udržení pH homeostáze. Neutrofilní bakterie *Bacillus subtilis* udržuje pH homeostázi katabolizmem kyselin, tj. produkcí CO₂ a alkalických aminů (SLONCZEWSKI *et al.* 2009). Při růstu bakterií a) v přítomnosti benzoátu v médiu o pH 7 a b) v médiu o pH 6 dochází ke snížení cytoplazmatického (intracelulárního) pH. Předpokládá se tedy, že odpověď bakterií na přítomnost kyseliny benzoové a na snížení extracelulárního pH se alespoň částečně překrývá. Skutečně, 42% genů indukovaných působením benzoové kyseliny bylo zároveň aktivováno pH stresem (KITKO *et al.* 2009). Mezi tyto společně indukované geny patří geny podílející se na katabolizmu, transportu peptidů, rezistenci vůči různým endogenním i exogenním látkám (indukce různých transportních systémů) a adaptaci k oxidativnímu stresu. Mezi specificky indukované geny vlivem benzoátu lze zahrnout dekarboxylázu fenolové kyseliny, acetylkoenzym A syntetázu a ureázu (KITKO *et al.* 2009).

Přítomnost kyseliny sorbové v médiu neindukuje u bakterie *B. subtilis* obecnou stresovou odpověď. Zajímavé je, že byla zvýšena exprese šesti z 29 genů σ^H regulonu. Ten je indukován při vstupu bakterií do stacionární fáze růstu. Zároveň dochází k aktivaci CodY proteinu a genů, které jsou kontrolovány represorem AbrB. Předpokládá se tedy, že bakterie vystavené působení sorbové kyseliny se chovají podobně jako za podmínek limitace živin. Je snížena exprese genů, jejichž produkty se účastní translace a syntézy proteinů, purinů a pyrimidinů. Při vyčerpání živin v médiu se obecně u *B. subtilis* navozuje stav kompetence a iniciuje sporulace. Ani jeden z těchto dějů však nebyl organickou kyselinou indukován. Vlivem sorbátu nedochází k výrazné indukci ATPáz ani komponent respiračního řetězce. Byla zvýšena transkripce genů pro chaperony GroES a GroEL (heat shock proteiny první třídy) a ureázu. Bakterie zřejmě produkcí ureázy reagují na acidifikaci cytosolu. Ureáza totiž katalyzuje reakci, při níž vzniká bazický amoniak. Dále byly aktivovány geny metabolismu alternativních zdrojů uhlíku a dusíku (SigL-dependentní geny), geny TCA cyklu a Fur regulonu. Ke zvýšení exprese Fur regulonu dochází za anaerobních podmínek a při nedostatku železa. Kyselina sorbová ovlivňuje i expresi SigW- a SigX-dependentních genů, které se za podmínek stresu podílejí na udržování integrity buněčného povrchu. Velmi silná indukce byla zaznamenána u genů metabolismu lipidů, konkrétně *fab* genů a *bkd* operonu. Vlivem sorbátu se proto nejspíše

v membráně zvyšuje podíl větvených mastných kyselin a mastných kyselin s dlouhým řetězcem (TER BEEK *et al.* 2008).

Adaptace bakterií na anorganický acidický stres

Mírně kyselé pH aktivuje u *B. subtilis* alternativní transkripční faktor σ^B (dochází tedy k vývoji nespecifické stresové odpovědi) a ECF faktor σ^M (KOVÁCS *et al.* 1998, THACKRAY a MOIR 2003). Nízké pH blokuje sporulaci (COSBY a ZUBER 1997) a stimuluje SigX regulon, který reaguje na extracytoplazmatický stres a způsobuje rezistenci k pozitivně nabitým antimikrobiálním peptidům (CAO a HELMANN 2004).

Růst při pH 6,0 stimuluje acetoin produkující metabolickou dráhu, která minimalizuje produkci kyselin fermentací (geny *alsDS*). Dochází ke zvýšení NAD(P)-dependentních dehydrogenáz: alkoholdehydrogenázy (*adhA*), alanindehydrogenázy (*ald*), sukcinát-semialdehyd dehydrogenázy (*gabD*) a několika formátdehydrogenáz (*fdhD*, *yjgC*, *yrhE* a *yrhG*). Činností těchto enzymů vzniká NAD(P)H, který předává elektrony do elektronového transportního řetězce. Vznikající energie se využívá na pumpování protonů ven z buňky, touto aktivitou se zvýší intracelulární pH. Kyselé pH dále zvyšuje expresi genů *psd* (kóduje fosfatidylserindekarboxylázu), *speA* (gen pro arginindekarboxylázu), *cysK* (cysteinsyntáza A) a *sodA* (superoxiddismutáza) (WILKS *et al.* 2009). Vlivem nízkého pH dochází k indukci oxalátdekarboxylázy OxdC, jejíž gen je pod kontrolou YvrI alternativního sigma faktoru (Mac LELLAN *et al.* 2009).

Odpověď na kyselé pH se částečně překrývá s odpovědí na oxidativní stres. Oba typy stresů zvyšují expresi *katA* (gen pro katalázu) a genu pro NADPH dehydrogenázu *namA* (WILKS *et al.* 2009).

Okyselení vnějšího prostředí zvyšuje solubilitu kovů, tím způsobuje zvýšený transport do cytoplazmy a akumulaci kovů v cytoplazmě až na toxické hladiny. Vysoká hladina kovů v buňce může inhibovat transport a narušit integritu buněčné membrány. Bakterie reagují na toxicitu kovů jejich transportem ven z buněk. *B. subtilis* zvyšuje hladiny dvou transportních systémů, *cadA* a *czcDO*. Czc přenáší ven z buňky ionty kovů za současného přenosu K^+ do buňky (tzv. antiport), zatímco CadA funguje jako ATPáza (na přenos kovů z buňky je spotřebováno ATP) (WILKS *et al.* 2009).

ALKOHOLOVÝ STRES

Alkoholy představují pro buňky chemickou formu stresu. Ovlivňují funkční a strukturální vlastnosti biologických membrán, interagují přednostně s hydrofobní částí membrány a mění její membránovou fluiditu. Alkoholy s delším alifatickým řetězcem C₅ - C₁₀ nebo s cyklickou strukturou (např. benzylalkohol) se přednostně inkorporují do fosfolipidové vrstvy a zvyšují tak fluiditu membrány. Molekuly alkoholů s krátkým alifatickým řetězcem C₁ – C₄ působí na vnitřní i vnější oblasti cytoplazmatické membrány a ovlivňují slabé chemické interakce.

Primární alkoholy s řetězcí obsahujícími více než 10 uhlíkových atomů teplotu fázového přechodu (T_f) zvyšují, ačkoli alkoholy s kratším řetězcem ji podle obecného principu snižují (SUEZAKY *et al.* 1985). U alkoholů s řetězcí obsahujícími 10 – 12 uhlíkových atomů může docházet k oběma účinkům, v závislosti na koncentraci alkoholu. Podobnou bifázickou odpověď membrány způsobuje účinek alkoholů s velmi krátkým řetězcem, např. etanol (ROWE 1983).

Obecným trendem alkoholové tolerance mikroorganismů na úrovni membrán je prodloužení průměrné délky uhlovodíkových řetězců a zvýšení proporce nenasycených mastných kyselin membránových lipidů. Zdá se, že první z uvedených mechanismů je významnější. Prodloužené uhlovodíkové řetězce membránových lipidů zvyšují počet -CH₂- skupin, které zvýrazňují hydrofobní charakter membránové matrix, snižují rozpustnost polárních molekul a zvyšují účinnost cytoplazmatické membrány jako bariéry. Dochází tak ke kompenzaci rušivého účinku alkoholu na stav uspořádanosti membrány (INGRAM 1986).

Z klinického hlediska je zajímavé, že inkubací *Acinetobacter baumannii* s etanolem dochází ke zvýšení virulence této bakterie; zřejmě díky zvýšené metabolické kapacitě a produkci fosfolipázy C (CAMARENA *et al.* 2010).

Adaptace bakterií na etanol

Přidání subinhibičních koncentrací etanolu k exponenciálně rostoucím buňkám redukuje rychlost růstu, ale nesnižuje růstový výtěžek (BOHIN *et al.* 1976). Růst v přítomnosti etanolu v koncentraci, která nemá vliv na vegetativní růst, však dramaticky snižuje schopnost *B. subtilis* tvořit spory (více než 100krát). Schopnost diferenciac je snížena působením alkoholu na expresi genů *sinR* a *rapA* (GOTTIG *et al.* 2005). RapA

kontroluje aktivitu „phosphorelay“ a tím úroveň fosforylace Spo0A, SinR blokuje transkripci genů časně fáze sporulace (*spo0A*, *spoIIA*, *spoIIG* a *spoIIE*).

Stresová odpověď na etanolový šok zahrnuje aktivaci genů nespecifické stresové odpovědi. 4% etanol způsobuje u *B. subtilis* zvýšenou defosforylaci RsbV, tím se uvolňuje σ^B z komplexu RsbW- σ^B (VÖELKER *et al.* 1996). Bylo zjištěno, že po přidání etanolu stoupá aktivita σ^B promotoru 5x (KIM *et al.* 2004). Jsou exprimovány σ^H -dependentní geny *ureAB* (kódují ureázu). Rovněž některé σ^W -dependentní geny jsou indukovány etanolem, i když v menší míře (PETERSOHN *et al.* 2001). Ke genům indukovaným alkoholem a teplotním stresem patří i geny HrcA regulonu, jejichž exprese je zřetelněji pozorovatelná v *sigB* mutantách. Etanol zvyšuje expresi ECF sigma faktoru σ^M (THACKRAY a MOIR 2003).

V přítomnosti 2,5% a 5% etanolu se zvyšuje rychlost DNA syntézy 1,5 až 2,5krát. Etanolem je stimulována aktivita DNA polymerázy při syntéze DNA *in vitro* (BASU a PODDAR 1994).

Působením molekul etanolu na cytoplazmatickou membránu se zvyšuje její prostupnost pro ionty, dochází k akumulaci Na^+ v cytoplazmě a ke snížení hladiny K^+ v buňce. Vysoká buněčná hladina Na^+ má cytotoxický efekt. Etanolem je indukována produkce proteinů NatAB, které formují v membráně ABC transportní systém. Ten katalyzuje transport Na^+ ven z buňky za spotřeby energie v podobě molekul ATP (CHENG *et al.* 1997).

Etanol baktericidně působí i na odolné spory. Etanol a silně acidické prostředí uvolňuje dipikolinovou kyselinu a kortex (SETLOW *et al.* 2002). Vysoká koncentrace alkoholu v médiu ovlivňuje složení cytoplazmatické membrány. Různé alkoholy se ale svým působením liší. Přidání benzyl alkoholu, který zvyšuje hydrataci membrány, ke kultuře *B. subtilis* má při kultivaci za nízkých teplot fluidizační efekt. Takto simuluje syntézu nenasycených mastných kyselin. Etanol naopak adaptivní syntéze nenasycených mastných kyselin brání (KONOPÁSEK *et al.* 2000). Alkoholy (metanol, etanol, propanol a butanol) snižují sekreci a aktivitu extracelulárních enzymů, např. α -amylázy a serin proteázy (BAYKOUSHEVA 1988).

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: kmen *Bacillus subtilis* 168 trp₂.

Kultivace bakterií, etanolový šok a pH stres.

Radioaktivní značení in vivo ³⁵S-L-methioninem.

Izolace membránové frakce.

2D elektroforéza.

Vyhodnocení dvojrozměrných gelů.

MALDI-TOF.

DISKUZE

Bakterie *B. subtilis* 168 *trp*₂ je modelovým organismem žijícím ve svrchní vrstvě půdy, která představuje prostředí extrémně náročné, s rychle se měnící teplotou, osmolaritou, pH i koncentrací živin.

Při stresu se v bakteriální buňce indukuje specifická stresová odpověď cílená proti vyvolávajícím agens, ale současně je aktivována i tzv. obecná stresová odpověď. Při ní dochází ke zvýšené expresi asi 120 - 190 genů, jejichž produkty minimalizují poškození buněk a pomáhají přežít v nepříznivých podmínkách (HELMANN *et al.* 2001, PETERSOHN *et al.* 2001, PRICE *et al.* 2001). Exprese těchto genů je kontrolována u *B. subtilis* zejména alternativním sigma faktorem σ^B . Odpověď je spouštěna např. teplotním, etanolovým, osmotickým a alkalickým stresem nebo vstupem buněk do stacionární fáze růstu (VÖLKER *et al.* 1999; MENDEZ *et al.* 2004). Přestože struktura a regulace σ^B faktoru byla již dobře popsána (PRICE 2002, ÁVILA-PÉREZ *et al.* 2010), funkce mnoha genů regulovaných tímto faktorem zůstává neznámá. Více než 100 genů bylo přiřazeno k obecnému stresovému regulonu pouze na základě transkripčního mapování. Etanolový a pH stres u *B. subtilis* vyvolává i specifickou odpověď - aktivaci transkripce alternativního σ^M faktoru (THACKRAY a MOIR 2003). Nízké pH navíc aktivuje SigX regulon.

Pro udržování homeostáze hrají zásadní roli membránové proteiny. Čítají obecně 30% všech otevřených čtecích rámců genomu prokaryot i eukaryot (WALLIN a HEIJNE 1998) a jejich úlohy v životě buňky jsou velmi rozmanité. Zahrnují vitální procesy jako např. přeměnu energie, biosyntézu fosfolipidů, buněčné dělení, tvorbu buněčné stěny, translokaci proteinů a kontrolu buněčného tvaru (ZWEERS *et al.* 2008). Membránové proteiny jsou částečně vystaveny okolnímu prostředí a jsou tak cílem různých chemických agens. Esenciální membránové proteiny nepostradatelné pro buněčné dělení představují primární cíl chemoterapie.

Výzkum v oblasti membránových proteinů je však poměrně komplikovaný. To je dáno zejména hydrofobicitou membránových proteinů, která ztěžuje produkci, purifikaci a krystalizaci proteinů (KEYES *et al.* 2008). V důsledku toho jsou výtěžky produkce membránových proteinů v bakteriích nízké (ZWEERS *et al.* 2009). Akumulace proteinů v biologických membránách navíc ovlivňuje stabilitu dvojvrstvy, což může být pro produkující buňku toxické. Nadprodukované proteiny mají tendenci tvořit agregáty nebo zaujímat nesprávnou konformaci v důsledku saturace membrány. Díky své vysoce

hydrofóbní povaze a často extrémním hodnotám izoelektrických bodů membránové proteiny komplikují proteomové analýzy.

Metoda dvojrozměrné elektroforézy bílkovin (2D elektroforéza) musela být pro dělení membránových proteinů a následnou charakterizaci změn v membránovém proteomu *B. subtilis* upravena. Proteiny s větším počtem transmembránových domén ani proteiny charakterizované pI v alkalické oblasti, mezi něž značná část membránových proteinů náleží (BÜTTNER *et al.* 2001), nelze běžnými 2D proteomovými technikami zachytit (BUNAI a YAMANE 2005). Proto byl použit vhodný solubilizační roztok s vysokou koncentrací močoviny a thiomčoviny a byla prodloužena celková doba solubilizace. K separaci proteinů v prvním rozměru, izoelektrické fokusaci, byly použity komerčně dostupné IPG (i**mmobilized p**H **g**radient) stripy s nelineárním gradientem pH o rozmezí 3-10. Vizualizace dělených proteinů byla provedena barvením stříbrem nebo značením proteinů *in vivo* radioaktivním prekurzorem [³⁵S]-methioninem. Inkorporace radioaktivního prekurzoru do bílkovin dovoluje přesně registrovat biosyntézu konkrétních proteinů indukovaných stresovými podmínkami *de novo*. Metodou lze odlišit rychle se tvořící nebo rychle obměňované malé frakce makromolekulárních buněčných sloučenin od stabilních makromolekul přítomných v buňkách v podstatně větším množství.

Stresový membránový proteom byl porovnán s vegetativním proteomem *B. subtilis*. Celkem bylo identifikováno deset stresových proteinů, u nichž byly pozorovány zřetelné změny v expresi po etanolovém a pH stresu v porovnání s kontrolou; 5 stresových proteinů indukovaných etanolem a 5 proteinů indukovaných nízkým pH. Barvení proteinů stříbrem i radioaktivní značení potvrdilo zvýšení všech zmíněných proteinů mimo SodA. Ten nebyl detekován pomocí radioaktivního prekurzoru, protože neobsahuje methionin (GERNER *et al.* 2002).

Po etanolovém stresu byly oproti kontrole zvýšeny proteiny YdaP a YfhM 10x, Ctc a YwaC 7x, a protein YjcH 3x.

YjcH je proteinem s neznámou funkcí tvořený 240 aminokyselinami. Enzym s hydrolázovou aktivitou YfhM katalyzuje produkci glykolu z molekuly vody a epoxidu. Na úrovni transkripce je regulován σ^B faktorem (ANTELMANN *et al.* 2000).

YdaP, pyruvát oxidáza, katalyzuje reakci, při které z pyruvátu a fosfátu vzniká acetylfosfát. Exprese genu *ydaP* je kontrolována σ^B faktorem (PETERSOHN *et al.* 1999).

Ctc je obecným stresovým proteinem, rovněž známým jako ribozomální protein L25, který specificky váže 5S ribozomální RNA (KOREPANOV *et al.* 2004). Gen pro Ctc protein obsahuje sigmaB-dependentní promotor. Produkce Ctc je u bakterie *B. subtilis*

silně indukována různými stresy (VÖLKER *et al.* 1994), tato bílkovina se účastní sporulace (SCHMALISCH *et al.* 2002).

YwaC je součástí σ^W regulonu (CAO *et al.* 2002) a hraje úlohu při stringentní odpovědi. Katalyzuje reakci, při které dochází k syntéze (p)ppGpp, tzv. alarmonu. YwaC patří mezi tzv. SAS proteiny (small alarmone synthetases). Promotor genu *ywaC* může být kontrolován více ECF sigma faktory, např. také σ^M (NANAMIYA *et al.* 2008).

Při kultivaci bakterií v médiu o pH 5,0 dochází v membránové frakci ke zvýšení množství proteinu AcoB 9x; YkwC, SodA, YjcH 6x a YwaC 2x. Posledně dva zmíněné proteiny byly indukovány i etanolovým šokem. Jejich funkce jsou popsány v textu výše. YkwC je 3-hydroxyizobutyryldehydrogenáza, role tohoto enzymu v odpovědi na stres zůstává nejasná.

AcoB je beta podjednotka thiamindifosfát–dependentní E1 komponenty acetoin dehydrogenázy (AodH E1). Enzym vstupuje do mnoha metabolických drah, např. glykolýzy, glukoneogeneze, biosyntézy valinu, lecinu a izoleucinu a metabolismu pyruvátu (GRUNDY *et al.* 1993, HUANG *et al.* 1999). Acetoin je hlavním katabolickým produktem *B. subtilis*. Při degradaci glukózy bakterie produkují neutrální acetoin, a proto nedochází k acidifikaci růstového média během exponenciální fáze růstu. Navíc může být acetoin po vyčerpání zdrojů uhlíku během stacionární fáze růstu importován zpět do buňky a využit jako alternativní zdroj energie. Geny pro E1 α , E1 β , E2 a E3 podjednotky acetoin dehydrogenázy jsou kódovány *acoABCL* operonem. Jeho exprese je stimulována acetoinem a potlačována glukózou. V regulaci transkripce operonu se uplatňuje pozitivní regulační protein AcoR a alternativní sigma faktor σ^L (ALI *et al.* 2001). Zvýšení produkce AcoR a AcoA proteinů byla prokázána za podmínek organického acidického stresu (TER BEEK *et al.* 2008).

SodA, Mn²⁺-dependentní superoxiddismutáza, je tvořena během vegetativního růstu a sporulace (INAOKA *et al.* 1999). Tato oxidoreduktáza ničí toxické volné radikály, které jsou produkovány buňkou. Je indukována teplotním šokem, osmotickým a oxidativním stresem, při limitaci glukózou a kyslíkem (INAOKA *et al.* 1998, PERIAGO *et al.* 2002). Přítomnost tohoto cytoplazmatického proteinu byla zjištěna i ve vzorcích izolovaných extracelulárních proteinů (HIROSE *et al.* 2000).

Funkce některých výše zmíněných stresových proteinů zatím není známa, jiné se podílejí na obecné stresové odpovědi nebo jsou součástí různých metabolických drah, které pomáhají detoxifikovat buňku. U bakterií dochází často k překryvu jednotlivých stresových odpovědí, nicméně nejdůležitější úlohu v adaptaci na stres hraje obecná

stresová odpověď, která bakterii zajišťuje mnohonásobnou a nespecifickou ochranu před neustálými změnami okolního prostředí.

LITERATURA

- Ali, N. O., Bignon, J., Rapoport, G., Debarbouille, M. (2001): Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 183: 2497-2504.
- Akbar, S., Gaidenko, T. A., Kang, Ch. M., O'Reilly, M., Devine, K. M., and Price, Ch. W. (2001): New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor σ^B of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 183: 1329-1338.
- Antelmann, H., Scharf, C., Hecker, M. (2000): Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. J. Bacteriol. 182: 4478-4490.
- Ávila-Pérez, M., van der Steen, J. B., Kort, R., Hellingwerf, K. J. (2010): Red light activates the sigmaB-mediated general stress response of *Bacillus subtilis* via the energy branch of the upstream signaling cascade. J. Bacteriol. 192: 755-762.
- Bakal, C. J., Davies, J. E. (2000): No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. Trends Cell Biol. 10: 32-38.
- Baykousheva, S. (1988): Secretion of proteins by *Bacillus subtilis* 168 grown in the presence of membrane active agents (alcohols). J. Chromatogr. 440: 379 – 383.
- Basu, T., Poddar, R. K. (1994): Effect of ethanol on *Escherichia coli* cells. Enhancement of DNA synthesis due to ethanol treatment. Folia Microbiol. 39: 3-6.
- Bearson, B. L., Wilson, L., Foster, J. W. (1998): A low pH-inducible, PhoPQ dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. J. Bacteriol. 180: 2409-2417.
- Birkey, S. M., Liu, W., Zhang, X., Duggan, M. F., Hulett, F. M. (1998): Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. Mol. Microbiol. 30: 943-953.
- Bischofs, I., Hug, J., Liu, A., Wolf, D., Arkin, A. (2009): Complexity in bacterial cell-cell communication: Quorum signal integration and subpopulation signaling in the *Bacillus subtilis* phosphorelay. Proc. Nat. Akad. Sci. 106: 6459-6464.
- Bishop, D. G., Rutberg, L., Samuelson, B. (1967): The chemical composition of cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 2: 448-453.
- Bohin, J. P., Rigomier, D., Schaeffer, P. (1976): Ethanol sensitivity of sporulation in *Bacillus subtilis*: a new tool for the analysis of the sporulation process. J. Bacteriol. 127: 934-940.
- Bunai, K., Yamane, K. (2005): Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. J. Chromatogr. B. 815: 227-236.
- Burbulys, D., Trach, K. A., Hoch, J. A. (1991): Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. Cell. 64: 545-552.
- Büttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C., Schmid, R., Mäder, U., Eymann, C., Antelmann, H., Völker, A., Völker, U., Hecker, M. (2001): A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. Electrophoresis. 22: 2908-2935.
- Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S., Snyder, M. (2010): Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. PLoS Pathog. 6: e1000834.

- Camp, A. H., Wang, A. F., Losick, R. J. (2011): A small protein required for the switch from sigma F to sigma G during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 193: 116-124.
- Cao, M., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Wu, M. F., Pardon, C., Hermann, J. D. (2002): Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/ macroarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J. Mol. Biol.* 316:443-457.
- Cao, M., Helmann, J. D. (2004): The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigmaX factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 186:1136-1146.
- Cao, M., Moore, C. M., Helmann, J. D. (2005): *Bacillus subtilis* paraquat resistance is directed by sigmaM, an extracytoplasmic function sigma factor, and is conferred by YqjL and BcrC. *J. Bacteriol.* 187: 2948-2956.
- Cosby, W. M., Zuber, P. (1997): Regulation of *Bacillus subtilis* sigmaH (spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. *J. Bacteriol.* 179: 6778-6787.
- Debarbouille, M., Martin-Verstraete, I., Kunst, F., and Rapoport, G. (1991): The *Bacillus subtilis* sigL gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. *Proc. Nat. Akad. Sci.* 88: 9092-9096.
- Delumeau, O., Dutta, S., Brigulla, M., Kuhnke, G., Hardwick, S. W., Völker, U., Yudkin, M. D., Lewis, R. J. (2004): Functional and structural characterization of RsbU, a stress signaling protein phosphatase 2C. *J. Biol. Chem.* 279: 40927-40937.
- Dowhan, W. (1997): Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66: 199 – 232.
- Fabret, C., Feher, V. A., Hoch, J. A. (1999): Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world. *J. Bacteriol.* 181: 1975-1983.
- Foster, J. W. (1999): When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:170-174.
- Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H. (2007): Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 63: 1285-1295.
- Gaidenko, T. A., and Price, Ch. W. (1998): General stress transcription factor σ^B and sporulation transcription factor σ^H each contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions. *J. Bacteriol.* 180: 3730-3733.
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N., Koonin, E. V. (2001): Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett.* 203: 11-21.
- Gerner, C., Vejda, S., Gekbmann, D., Bayer, E., Gotzmann, J., Schulte-Hermann, R., Mikulits, W. (2002): Concomitant determination of absolute values of cellular protein amounts, synthesis rates, and turnover rates by quantitative proteome profiling. *Mol. Cell Proteomics* 1: 528-537.
- Gerth, U., Kirstein, J., Mostertz, J., Waldminghaus, T., Miethke, M., Kock, H., Hecker, M. (2004): Fine-tuning in regulation of Clp protein content in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186: 179-191.
- Gottig, N., Pedrido, M. E., Méndez, M., Lombardía, E., Rovetto, A., Philippe, V., Orsaria, L., Grau, R. (2005): The *Bacillus subtilis* SinR and RapA developmental regulators are responsible for inhibition of spore development by alcohol. *J. Bacteriol.* 187: 2662-2672.
- Grundy, F. J., Waters, D. A., Takova, T. Y., Henkin, T. M. (1993): Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 10: 259-271.

- Haldenwang, W. G. (1995): The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 59: 1-30.
- Hall, H. K., Karem, K., Foster, J. W. (1995): Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 229-272.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, R. (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.
- Hecker, M., Pané-Farré, J., Völker, U. (2007): SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev. Microbiol.* 61: 215-236.
- Hecker, M., Reder, A., Fuchs, S., Pagels, M., Engelmann, S. (2009): Physiological proteomics and stress/starvation responses in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Res. Microbiol.* 160: 245-258.
- Helmann, J. D., Wu, M. F. W., Kobel, P. A., Gamo, F., Wilson, M., Morshedi, M. M., Navre, M., and Paddon, Ch. (2001): Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J. Bacteriol.* 183:7318-7328.
- Helmann, J. D. (2006) Deciphering a complex genetic regulatory network: the *Bacillus subtilis* sigmaW protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. *Sci Prog.* 89: 243-266.
- Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K., Yamane, K. (2000): Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology.* 146: 65-75.
- Hoch, J. A., Varughese, K. I. (2001): Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J. Bacteriol.* 183: 4941-4949.
- Horsburgh, M. J., and Moir, A. (1999): σ^M , an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol. Microbiol.* 32: 41-50.
- Huang, X., Frederick, K. L., and Helmann, J. D. (1998): Promoter recognition by *Bacillus subtilis* σ^W : Autoregulation and partial overlap with the σ^X regulon. *J. Bacteriol.* 180: 3765-3770.
- Huang, M., Oppermann-Sanio, F. B., Steinbüchel, A. (1999): Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *J. Bacteriol.* 181: 3837-3841.
- Hyyryläinen, H. L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., Sarvas, M., Prágai, Z., Bron, S., van Dijl, J. M., Kontinen, V. P. (2001): A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Mol. Microbiol.* 41: 1159-1172.
- Chang, Ch., Tesar, Ch., Gu, M., Babnigg, G., Joachimiak, A., Pokkuluri, P. R., Szurmant, H., Schiffer, M. (2010): Extracytoplasmic PAS-like domains are common in signal transduction proteins. *J. Bacteriol.* 192: 1156–1159.
- Chen, C. C., Yudkin, M. D., Delumeau, O. (2004): Phosphorylation and RsbX-dependent dephosphorylation of RsbR in the RsbR-RsbS complex of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186: 6830-6836.
- Chen, R., Guttenplan, S. B., Blair, K. M., Kearns, D. B. (2009): Role of the sigmaD-dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. *J. Bacteriol.* 191: 5775-5784.
- Cheng, J., Guffanti, A. A., Krulwich, T. A. (1997): A two-gene ABC-type transport system that extrudes Na⁺ in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore. *Mol. Microbiology* 2: 1107 – 1120.
- Iber, D., Clarkson, J., Yudkin, M. D., Campbell, I. D. (2006): The mechanism of cell differentiation in *Bacillus subtilis*. *Nature.* 441: 371-374.

- Inaoka, T., Matsumura, Y., Tsuchido, T. (1998): Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 3697-3703.
- Inaoka, T., Matsumura, Y., Tsuchido, T. (1999): SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 1939-1943.
- Ingram, L. O. (1986): Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends in Biotechnol.* 4:40-44.
- Jers, C., Kobir, A., Søndergaard, E. O., Jensen, P. R., Mijakovic, I. (2011): *Bacillus subtilis* two-component system sensory kinase DegS is regulated by serine phosphorylation in its input domain. *PLoS One.* 6:e14653.
- Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (1999): Marked instability of the σ^{32} heat shock transcription factor at high temperature. *J. Biol. Chem.* 274: 22002-22007.
- Keyes, M. H., Gray, D. N., Kreh, K. E., Sanders, C. R. (2008): Solubilizing detergents for membrane proteins, p. 15-38 in S. Iwata (ed.) *Methods and results in crystallization of membrane proteins*. International University Line, La Jolla, CA.
- Kim, Y. I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R. V., Sauer, R. T., Baker, T. A. (2001): Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat. Struct. Biol.* 8: 230-233.
- Kim, T. J., Gaidenko, T. A., Price, C. W. (2004): A multicomponent protein complex mediates environmental stress signaling in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 341: 135-150.
- Kirstein, J., Zühlke, D., Gerth, U., Turgay, K., Hecker, M. (2005): A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO J.* 24: 3435-3445.
- Kirstein, J., Turgay, K. (2005): A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9: 182-188.
- Kitko, R. D., Cleeton, R. L., Armentrout, E. I., Lee, G. E., Noguchi, K., Berkmen, M. B., Jones, B. D., Slonczewski, J. L. (2009): Cytoplasmic acidification and the benzoate transcriptome in *Bacillus subtilis*. *PLoS One.* 4: e8255.
- Kock, H., Gerth, U., Hecker, M. (2004): MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 51: 1087-1102.
- Kommineni, S., Yukl, E., Hayashi, T., Delepine, J., Geng, H., Moënné-Loccoz, P., Nakano, M. M. (2010): Nitric oxide-sensitive and -insensitive interaction of *Bacillus subtilis* NsrR with a ResDE-controlled promoter. *Mol. Microbiol.* 78: 1280-1293.
- Konopásek, I., Strzalka, K., Svobodova, J. (2000): Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1464: 18-26.
- Korepanov, A. P., Gongadze, G. M., Garber, M. B. (2004): General stress protein CTC from *Bacillus subtilis* specifically binds to ribosomal 5S RNA. *Biochemistry (Mosc).* 69: 607-611.
- Kovács, T., Hargitai, A., Kovács, K. L., Mécs, I. (1998): pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 65: 323-328.
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Hermann, M., Clausen, T. (2002): Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416: 455-459.

- Kwon, Y. M., Ricke, S. C. (1998): Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3458-3463.
- Leyer, G. J., Johnson, E. A. (1993): Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol.* 59: 1842-1847.
- Liu, J., and Zuber, P. (2000): The CplX protein of *Bacillus subtilis* indirectly influences RNA polymerase holoenzyme composition and directly stimulates σ^H -dependent transcription. *Mol. Microbiol.* 37: 885-897.
- MacLellan, S. R., Hermann, J. D., Antelmann, H. (2009): The YvrI alternative sigma factor is essential for acid stress induction of oxalate decarboxylase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191: 931-939.
- MacLellan, S. R., Wecke, T., Helmann, J. D. (2008): A previously unidentified sigma factor and two accessory proteins regulate oxalate decarboxylase expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 69: 954-967.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., Seror, S. (2002): Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol. Microbiol* 46: 571–586.
- Marles-Wright, J., Grant, T., Delumeau, O., van Duinen, G., Firbank, S. J., Lewis, P. J., Murray, J. W., Newman, J. A., Quin, M. B., Race, P. R., Rohou, A., Tichelaar, W., van Heel, M., Lewis, R. J. (2008): Molecular architecture of the „stressosome“, a signal integration and transduction hub. *Science* 322: 92-96.
- Mascher, T., Hachmann, A. B., Helmann, J. D. (2007): Regulatory overlap and functional redundancy among *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factors. *J. Bacteriol.* 189: 6919-27
- McQuade, R. S., Comella, N., Grossman, A. D. (2001): Control of a family of phosphatase regulatory genes (*phr*) by the alternate sigma factor sigma-H of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183: 4905-4909.
- Méndez, M. B., Orsaria, L. M., Philippe, V., Pedrido, M. E., Grau, R. R. (2004): Novel roles of the master transcription factors Spo0A and sigmaB for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. *J. Bacteriol.* 186: 989-1000.
- Mirel, D. B., Estacio, W. F., Mathieu, M., Olmsted, E., Ramirez, J., and Márquez-Magaña, L. M. (2000): Environmental regulation of *Bacillus subtilis* σ^C -dependent gene expression. *J. Bacteriol.* 182: 3055-3062.
- Mitrophanov, A. Y., Groisman, E. A. (2008): Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* 22: 2601-11.
- Mogk, A., Volker, A., Engelmann, S., Hecker, M., Schumann, W., Volker, U. (1998): Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J. Bacteriol.* 180: 2895-900.
- Möller, M. C., Hederstedt, L. (2008): Extracytoplasmic processes impaired by inactivation of *trxA* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190: 4660-4665.
- Mooney, R. A., Darst, S. A., Landick, R. (2005): Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell.* 20: 335-45.
- Nakano, S., Küster-Schöck, E., Grossman, A. D., Zuber, P. (2003): Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 100:13603-13608.
- Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C. S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., Tozawa, Y. (2008): Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 67: 291-304.

- Ogura, M., Tsukahara, K. (2010): Autoregulation of the *Bacillus subtilis* response regulator gene degU is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP. *Mol. Microbiol.* 75: 1244-1259
- Periago, P. M., van Schaik, W., Abee, T., Wouters, J. A. (2002): Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3486-3495.
- Petersohn, A., Bernhardt, J., Gerth, U., Hoper, D., Koburger, T., Volker, U., Hecker, M. (1999): Identification of sigma(B)-dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *J. Bacteriol.* 181: 5718-5724.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., and Hecker, M. (2001): Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183: 5617-5631.
- Price, C. W., Fawcett, P., C  r  monie, H., Su, N., Murphy, C. K., Youngman, P. (2001): Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 41: 757-774.
- Price, C. W. (2002): General stress response. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From Genes to Cells, ed Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R. American Society for Microbiology, Washington DC, 369-384.
- Rowe, E. S. (1983): Lipid chain length and temperature dependence of ethanol - phosphatidylcholine interactions. *Biochemistry* 22: 2299 – 3305.
- Saier, M. H., Jr., Wu, L. F., and Reizer, J. (1990): Regulation of bacterial physiological processes by the three types of protein phosphorylating systems. *Trends in Bio. Sci.* 15: 391-395.
- Setlow, B., Loshon, C. A., Genest, P. C., Cowan, A. E., Setlow, C., Setlow, P. (2002): Mechanism of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *J. Appl. Microbiol.* 92: 362-375.
- Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Völker, U., Hecker, M. (1998): Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 1869-1877.
- Schmalisch, M., Langbein, I., Stulke, J. (2002): The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 495-501.
- Schmidt, R., Decatur, A. L., Rather, P. N., Moran, C. P. Jr., Losick, R. (1994): *Bacillus subtilis* lon protease prevents inappropriate transcription of genes under the control of the sporulation transcription factor sigma G. *J. Bacteriol.* 176: 6528-6537.
- Schumann, W. (2003): The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon . *Cell stress & Chaperones* 8: 207-217.
- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T. A. (2009): Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv. Microb. Physiol.* 55: 1-79.
- 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. *Mol. Microbiol.* 29: 285-296.
- Suezaki, Y., Kamaya, H., Ueda, I. (1985): Molecular origin of biphasic response of main phase-transition temperature of phospholipid membranes to long-chain alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 818: 31 – 37.
- Szurmant, H., White R. A., Hoch, J. A. (2007): Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 706–715.
- Ter Beek, A., Keijsers, B. J., Boorsma, A., Zakrzewska, A., Orij, R., Smits, G. J., Brul, S. (2008): Transcriptome analysis of sorbic acid-stressed *Bacillus subtilis* reveals a nutrient limitation response and indicates plasma membrane remodeling. *J. Bacteriol.* 190: 1751-1761.

- Tyagi, N., Anamika, K., Srinivasan, N. (2010): A Framework for Classification of Prokaryotic Protein Kinases. *PLoS One* 5: e10608
- Thackray, P. D., Moir, A. (2003): SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J. Bacteriol.* 185: 3491-3498.
- Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmidt, R., Mach, H., Hecker, M. (1994): Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 140: 741-52.
- Völker, U., Völker, A., Haldenwang, W. G. (1996): Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti- σ^B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *J. Bacteriol* 178: 5456 – 5463.
- Völker, U., Maul, B., Hecker, M. (1999): Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 3942-3948.
- van den Boom, T., Cronan, J. E. Jr. (1989): Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 317 – 343.
- Wallin, E., von Heijne, G. (1998): Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7: 1029-1038.
- Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S., and Schumann, W. (2001): Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ^W regulon. *Mol. Microbiol.* 41: 59-71.
- Wilks, J. C., Kitko, R. D., Cleeton, S. H., Lee, G. E., Ugwu, C. S., Jones, B. D., BonDurant, S. S., Slonczewski, J. L. (2009): Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 981-990.
- Zellmeier, S., Schumann, W., Wiegert, T. (2006): Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* sigma W stress response. *Mol. Microbiol.* 61: 1569-1582.
- Zolkiewski M. (2006): A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol. Microbiol.* 61: 1094-1100.
- Zweers, J. C., Barak, I., Becher, D., Driessen, A. JM., Hecker, M., Kontinen, V. P., Saller, M. J., Vavrova, L., van Dijl, J. M. (2008): Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microb. Cell Fact.* 7: 10-30.
- Zweers, J. C., Wiegert, T., van Dijl, J. M. (2009): Stress-responsive systems set specific limits to the overproduction of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7356-7364.