

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

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Tereza Šoberová

Studium vlivu fyzikálních a chemických stresů na vznik mutátorového fenotypu u *Bacillus subtilis*

Study of the impact of physical and chemical stress to development of mutator phenotype in *Bacillus subtilis*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

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

V Praze, 7.5. 2012

Podpis

Poděkování:

Na prvním místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Ireně Liché, CSc za cenné rady, ochotu a trpělivost, kterou mi po celou dobu mé práce věnovala.

Dále děkuji celému kolektivu laboratoře 101 za ochotu vždy pomoci a poradit. Velký dík patří zvláště Mgr. Jaroslavu Nunvářovi a laborantce Lucii Jánské.

V neposlední řadě také děkuji mé rodině za všestrannou pomoc a trpělivost během celého mého studia.

## ABSTRAKT

V okolním prostředí bakterií dochází k neustálým změnám životních podmínek. Jednou z možností jak se bakterie mohou na tyto změny adaptovat by mohlo být zvýšení mutační rychlosti. Mutabilita bakterií je za normálních okolností udržována na velice nízké hladině pomocí různých kontrolních a opravných mechanismů. Jedním z nich je mismatch repair systém, který se výrazně podílí na udržení genetické stability organismů. Vyřazením funkce tohoto systému, dochází k vzniku většího počtu mutací v buňce. V případě, že se bakteriální populace nachází v nepříznivém prostředí, může být tato vlastnost výhodou v adaptaci na nové životní podmínky.

Do jaké míry se tyto mechanismy podílí na adaptačních procesech u *Bacillus subtilis* zatím není prokázáno. Na adaptivní mutagenezi proto byla zaměřena předchozí práce z naší laboratoře, která se zabývala vytvořením experimentálního systému pro kvantifikaci mutageneze. Na modelovém organismu *Bacillus subtilis* byla pomocí této metody měřena rychlost vzniku mutací v nestresovaném prostředí a v přítomnosti několika vybraných stresů. Bylo zjištěno, že limitace živinami ve stacionární fázi, hyperosmotický stres ani zvýšená kultivační teplota mutační rychlost nezvyšují. Po sestrojení modelu pro měření změn exprese proteinů mismatch repair systému, nebyly při porovnání míry exprese těchto proteinů v nestresovaném a stresovaném prostředí pozorovány žádné změny.

Tato diplomová práce navazuje na předchozí výsledky a rozšiřuje škálu použitých stresů. Pro měření mutační rychlosti pomocí vytvořené kvantifikační metody byly zvoleny jednak fyzikální (chladový stres a stres způsobený vysokou teplotou) a chemické stresy (kyselý a zásaditý stres, ethanolový stres a stres způsobený přítomností detergentu). Zvýšení mutační rychlosti nebylo zaznamenáno ani u jednoho z těchto stresů. Dále byla pomocí již vytvořeného bakteriálního kmene sledována exprese *mutSL* operonu. U všech uvedených stresů nedocházelo k významné inaktivaci ani k útlumu mismatch repair systému. Hladiny jeho proteinů korelovaly s hladinami naměřenými za optimálních podmínek. Pro podrobnější představu o reakcích na stresové podmínky byl vytvořen model pro sledování míry aktivace obecné stresové odpovědi. Po přidání všech výše popsaných stresů spolu

s hyperosmotickým byla pozorována v různé míře zvýšená transkripce genů obecné stresové odpovědi.

**Klíčová slova**

*Bacillus subtilis*, mutační rychlost (mutabilita), mutátorový kmen, mismatch repair system, obecná stresová odpověď, stresové podmínky

## ABSTRACT

In a bacterium's environment, life conditions are subject to constant changes. One of the proposed mechanisms of adaptation to these changes is the increase in mutation rate. Bacterial mutability is generally kept very low by action of various mechanisms of control and repair, one of the most important ones being the Mismatch Repair, which is the master regulator of genetic stability of organisms. When its function is impaired, larger amounts of mutations occur in cells. In adverse conditions, these might be beneficial for cells' adaptation.

The role of these repair mechanisms in adaptive processes in *Bacillus subtilis* has not yet been definitely resolved. The previous work in our lab focused on establishing an experimental system to measure the extent of mutagenesis in *B. subtilis*, and the influence of several stresses on mutation rate was assessed. No significant increase in mutability was found to be triggered by nutrient limitation in stationary growth phase, hyperosmotic stress or increased cultivation temperature. Furthermore, a system to monitor the expression of mismatch repair proteins was constructed, which has not revealed significant differences between stressed and nonstressed growth conditions.

This thesis follows the results of previous experiments, expanding the range of stresses used. Mutation rates were determined upon exposition to stressors of physical (cold, heat) and chemical (ethanol, low and high pH, detergent) nature. None of these stresses have led to significantly increased mutation rate. The expression of *mutSL* operon was monitored and shown to correlate between stressed and nonstressed conditions. Finally, the extent of activation of general stress response was determined. Differing values of stress response activation were observed.

### Keywords

*Bacillus subtilis*, mutation rate (mutability), mutator strain, mismatch repair system, general stress response, stress conditions

## OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	10
<b>1. ÚVOD</b> .....	11
<b>2. PŘEHLED LITERATURY</b> .....	13
2.1. Stresem indukovaná mutageneze.....	13
2.1.1. Mismatch repair systém (MMR).....	13
2.1.1.1. Proteiny MMR u <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.1.1.2. MMR u <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
2.1.1.3. Úloha MMR v rekombinačních procesech.....	17
2.1.1.4. Inaktivace MMR.....	17
2.1.2. SOS odpověď.....	18
2.1.3. Stresem indukované DNA polymerázy.....	20
2.1.4. $\sigma$ faktory.....	21
2.1.4.1. Obecná stresová odpověď u <i>Bacillus subtilis</i> a alternativní $\sigma^B$ faktor.....	22
2.1.4.2. Regulace alternativního $\sigma^B$ faktoru u <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
2.1.4.3. Aktivace alternativního $\sigma^B$ faktoru u <i>Bacillus subtilis</i> .....	25
2.1.4.4. Geny $\sigma^B$ regulonu <i>Bacillus subtilis</i> .....	27
2.2. Adaptace buněk na změny vnějšího prostředí.....	28
2.2.1. Adaptace buněk na změny teplot.....	28
2.2.1.1. Adaptace na vysokou teplotu (HSR).....	29
2.2.1.1.1. HSR u <i>Bacillus subtilis</i> .....	29
2.2.1.2. Adaptace na chladový stres (CSR).....	30
2.2.2. Adaptace buněk na osmotický stres.....	31
2.2.2.1. Osmoadaptace u <i>Bacillus subtilis</i> .....	33
2.2.3. Reakce <i>Bacillus subtilis</i> na poškození cytoplazmatické membrány.....	34
2.2.3.1. Adaptace buněk na ethanolový stres.....	36
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	37
3.1. Materiál.....	37
3.1.1. Bakteriální kmeny.....	37
3.1.2. Plazmidy.....	38
3.1.3. Primery pro PCR.....	41
3.1.4. Chemikálie.....	41
3.1.5. DNA standard.....	42
3.1.6. Antibiotika.....	43
3.1.7. Enzymy.....	43
3.1.8. Komerční sady.....	44
3.1.9. Kultivační média.....	44
3.1.9.1. Pevná kultivační média.....	44
3.1.9.2. Tekutá kultivační media.....	45
3.1.9.3. Média pro přípravu kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i> :.....	46
3.1.9.4. Média pro přípravu kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> na šokovou transformaci.....	47
3.1.10. Roztoky.....	47
3.1.10.1. Roztoky pro stanovení $\beta$ -galaktosidázové aktivity.....	47
3.1.10.2. Roztoky pro horizontální gelovou elektroforézu.....	48
3.1.10.3. Roztoky pro izolaci plazmidové DNA.....	49



3.1.11.	Počítačové programy a internetové databáze .....	50
3.1.12.	Přístroje a laboratorní zařízení .....	50
3.2.	Metody .....	51
3.2.1.	Práce s bakteriální kulturou .....	51
3.2.1.1.	Kultivace bakterií v tekutém médiu .....	51
3.2.1.2.	Kultivace bakterií na pevném médiu .....	51
3.2.1.3.	Uchovávání bakteriálních kultur .....	52
3.2.1.4.	Měření optické denzity bakteriální kultury .....	52
3.2.1.5.	Růstová křivka <i>Bacillus subtilis</i> .....	52
3.2.1.6.	Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidázy .....	52
3.2.1.7.	Stanovení mutační rychlosti .....	54
3.2.1.8.	Izolace mutátorových kmenů .....	55
3.2.1.9.	Výpočet korekčního faktoru přežití .....	55
3.2.1.10.	Příprava kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i> .....	56
3.2.1.11.	Transformace kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i> .....	57
3.2.1.12.	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro šokovou transformaci 57	
3.2.1.13.	Šoková transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> .....	58
3.2.2.	Práce s bakteriální DNA .....	58
3.2.2.1.	Izolace a precipitace chromozomální DNA .....	58
3.2.2.2.	Izolace plazmidové DNA .....	59
3.2.2.3.	Čištění DNA chloroformovou precipitací .....	60
3.2.2.4.	Polymerázová řetězová reakce .....	60
3.2.2.5.	Restrikční štěpení DNA .....	62
3.2.2.6.	Ligace restrikčních fragmentů .....	62
3.2.2.7.	Horizontální gelová elektroforéza .....	63
3.2.2.8.	Sekvenace DNA .....	63
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>64</b>
4.1.	Stanovení mutační rychlosti <i>Bacillus subtilis</i> 168 .....	64
4.1.1.	Růstové parametry kultury za optimálních podmínek .....	65
4.1.2.	Růstové parametry kultury v přítomnosti stresoru .....	66
4.1.3.	Stanovení korekčního faktoru přežití .....	67
4.1.4.	Měření mutační rychlosti v přítomnosti stresorů .....	68
4.2.	Izolace mutátorových kmenů <i>Bacillus subtilis</i> 168 .....	71
4.2.1.	Ověření mutátorového fenotypu .....	74
4.3.	Stanovení míry transkripce <i>mutSL</i> operonu .....	75
4.4.	Příprava rekombinantního kmene <i>Bacillus subtilis</i> 168 pro měření aktivity promotoru $\sigma^B$ - dependentního genu .....	86
4.4.1.	Příprava rekombinantního plazmidu pDG1661 .....	86
4.4.2.	Transformace <i>Bacillus subtilis</i> rekombinantním plazmidem .....	87
4.5.	Sledování míry aktivace obecné stresové odpovědi .....	88
<b>5.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>99</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosin trifosfát
CICRCE	controlling inverted repeat of chaperone expression (regulační sekvence podílející se na odpovědi na teplotní šok)
CSR	cold shock response (odpověď na chladový šok)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ds-DNA	dvouvláknová DNA
ECF	extracytoplasmatic function (extracytoplazmatická funkce)
etOH	ethanol
HSR	heat shock response (odpověď na šok způsobený vysokou teplotou)
HSP	heat shock protein (proteiny teplotního šoku)
LB	Lauria-Bertrani médium
LBG	tetkuté Lauria-Bertrani médium s glukózou
MMR	mismatch repair system
OD	optická denzita
ONPG	ortho-nitro-fenyl- $\beta$ -D-galatosid
PCR	polymerázová řetězová reakce
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
tRNA	transferová RNA
ss-DNA	jednovláknová DNA
sigB	operon obsahující gen pro alternativní transkripční faktor $\sigma^B$
TF	transkripční faktor
TLS	trans lesion polymeráza (polymeráza replikující přes poškození DNA)
WT	wild type (divoký kmen)

## 1. ÚVOD

Bakterie jsou nejjednoduššími jednobuněčnými organismy na Zemi. Patří mezi prokaryotické organismy, které jako první osídlily naši planetu a za dobu své existence se byly schopné rozšířit do všech známých prostředí. Nalézáme je dokonce i v místech, která jsou pro ostatní organismy naprosto nevhodná k životu. Tato skutečnost nám odhaluje jejich nejvýraznější vlastnost a to schopnost se přizpůsobit změnám vnějšího prostředí. Můžeme dokonce říci, že se jedná o nejpřizpůsobivější organismy na Zemi.

Bakterie *Bacillus subtilis*, která je předmětem této práce, patří mezi gram pozitivní, tyčkovité mikroorganismy žijící v půdě. Během svého života se musí vyrovnat se širokou škálou změn okolního prostředí. Kromě častého střídání teplot během dne a noci, nebo dokonce v měsících se ročních obdobích, se musí adaptovat i na měnící se pH půdy a změny osmotického tlaku. V dnešní době je přežití bakterií ohrožováno také uměle vyrobenými chemickými látkami, které člověk do prostředí vypouští.

Jednou z adaptačních strategií, využívanou u podrobněji prozkoumaného modelového organismu *Escherichia coli*, je inaktivace opravných mechanismů a zvýšení mutační rychlosti. Dochází tak k rychlejšímu vzniku mutací a tím vyšší pravděpodobnosti vzniku příznivé mutace, která povede k minimalizaci negativních důsledků způsobených vnějšími stresy. Zvýšení mutační rychlosti je dosaženo především inaktivací mismatch repair (MMR) systému, který se podílí na opravě mutací a udržení genetické stability mikroorganismů. Většina informací o adaptivní mutagenезi byla získána právě na tomto modelovém organismu.

Z jiných studií využívajících jako modelový organismus *Bacillus subtilis* je patrné, že tato bakterie s největší pravděpodobností volí strategie jiné. Velice výrazná vlastnost kterou ovládají bakterie rodu *Bacillus* je sporulace, kdy tvorbou metabolicky neaktivních extrémně odolných endospor je buňka schopná přežít extrémně nepříznivé změny okolního prostředí.

Z předešlé práce zaměřené na adaptivní mutagenезi provedené v naší laboratoři Mgr. J. Nunvářem vyplývá, že při růstu v hyperosmotickém prostředí a v prostředí s vysokou teplotou nedochází u divokého kmene *Bacillus subtilis* k zvýšení mutační rychlosti. Při sledování aktivity mismatch repair systému

v hyperosmotickém prostředí nedochází k žádným odchylkám v porovnání se změnami hladin v nestresované kultuře.

V rámci mé diplomové práce jsme navázali na předchozí výsledky Mgr. J. Nunváře a zaměřili jsme se na vliv dalších chemických a fyzikálních environmentálních stresů na mutační rychlost u *Bacillus subtilis* spolu s izolací potenciálních mutátorových kmenů, s inaktivací MMR systému. Pro podrobnější představu o změnách regulací v bakteriální buňce v rámci reakce na stres jsme také sledovali změny v aktivitě mismatch repair systému ve zvolených stresových podmínkách a míru exprese genů obecné stresové odpovědi, které jsou přepisovány za účasti alternativního transkripčního faktoru a účastní se „první linie“ obrany při reakci na vzniklý stres.

#### Cíle této diplomové práce:

*Cíl č. 1 :* Stanovení změn mutačních rychlostí *Bacillus subtilis* při růstu v různých chemických a fyzikálních stresových podmínkách.

*Cíl č. 2 :* Izolace spontánního mutátorového kmene *Bacillus subtilis* 168.

*Cíl č. 3 :* Měření úrovně transkripce *mutSL* operonu pomocí reportérového genu  $\beta$ -galaktosidázy při různých chemických a fyzikálních stresových podmínkách.

*Cíl č. 4 :* Promotorovou fúzí *ctc* genu a genu pro  $\beta$ -galaktosidázu vytvořit systém pro sledování aktivity  $\sigma^B$  regulonu.

*Cíl č. 5 :* Měření úrovně transkripce alternativního transkripčního faktoru  $\sigma^B$  u *Bacillus subtilis* při různých chemických a fyzikálních stresových podmínkách.

## 2. PŘEHLED LITERATURY

### 2.1. Stresem indukovaná mutageneze

Bakterie se musejí během svého života vyrovnat s velkým množstvím změn jejich životního prostředí. Na schopnosti přizpůsobit se změnám okolních podmínek závisí jejich přežití

V prvních studiích, které se zabývaly vlivem stresových podmínek na mutagenezi, vše nasvědčovalo tomu, že existuje propojení mezi působením selekčního agens v prostředí a mutagenními změnami v mnoha genech. Tyto poznatky byly velkým přínosem pro studium adaptivní evoluce (FITCH 1982, CAIRNS *et al.* 1988). Bylo zjištěno, že u modelového organismu *Escherichia coli* vyvolávají různé typy stresů reakce mající mutagenní důsledek a jejich působením dojde k výraznému zvýšení mutační rychlosti (FOSTER 2004).

Bakterie mají velice dobře vyvinuté systémy schopné reagovat na nepříznivé změny prostředí, eliminovat důsledky stresů a stresovým podmínkám se přizpůsobit. Hlavním regulátorem v reakci na změnu okolních podmínek je alternativní transkripční sigma faktor aktivující obecnou stresovou odpověď (**Kap. 2.1.4.1.**) nazývaný jako RpoS u *Escherichia coli* a  $\sigma^B$  u *Bacillus subtilis* (BOYLAN *et al.* 1993). Na kontrole přesnosti DNA replikace a opravě jejích poškození se podílí MMR systém (**Kap. 2.1.1.**) aktivovaný v případě nepřesného zařazení bází při replikaci DNA. (SCHOFIELD a HSIEH 2003). Při poškození DNA vzniklém působením stresů je aktivována SOS odpověď (**Kap. 2.1.2.**) spolu s geny pro TLS polymerázy, které se účastní replikace přes poškozená místa na DNA (**Kap. 2.1.3.**) (FOSTER 2007).

#### 2.1.1. Mismatch repair systém (MMR)

Mismatch repair system (MMR) je jedním z nejdůležitějších systémů pro udržení genetické stability organismů a jeho základní komponenty jsou vysoce konzervované od bakterií až po savce. MMR se podílí na opravě chyb po DNA replikaci, inhibuje rekombinaci mezi odlišnými DNA sekvencemi a podílí se také na opravách některých poškození na DNA (HARFE a JINKS-ROBERTSON 2000).

Může se jednat například o posuvné mutace, tranzice, nebo opravy chyb vzniklých působením chemických látek (CUPPLES a MILLER 1989, CUPPLES *et al.* 1990, WYRZYKOWSKI a VOLKERT 2003).

### 2.1.1.1 Proteiny MMR u *Escherichia coli*

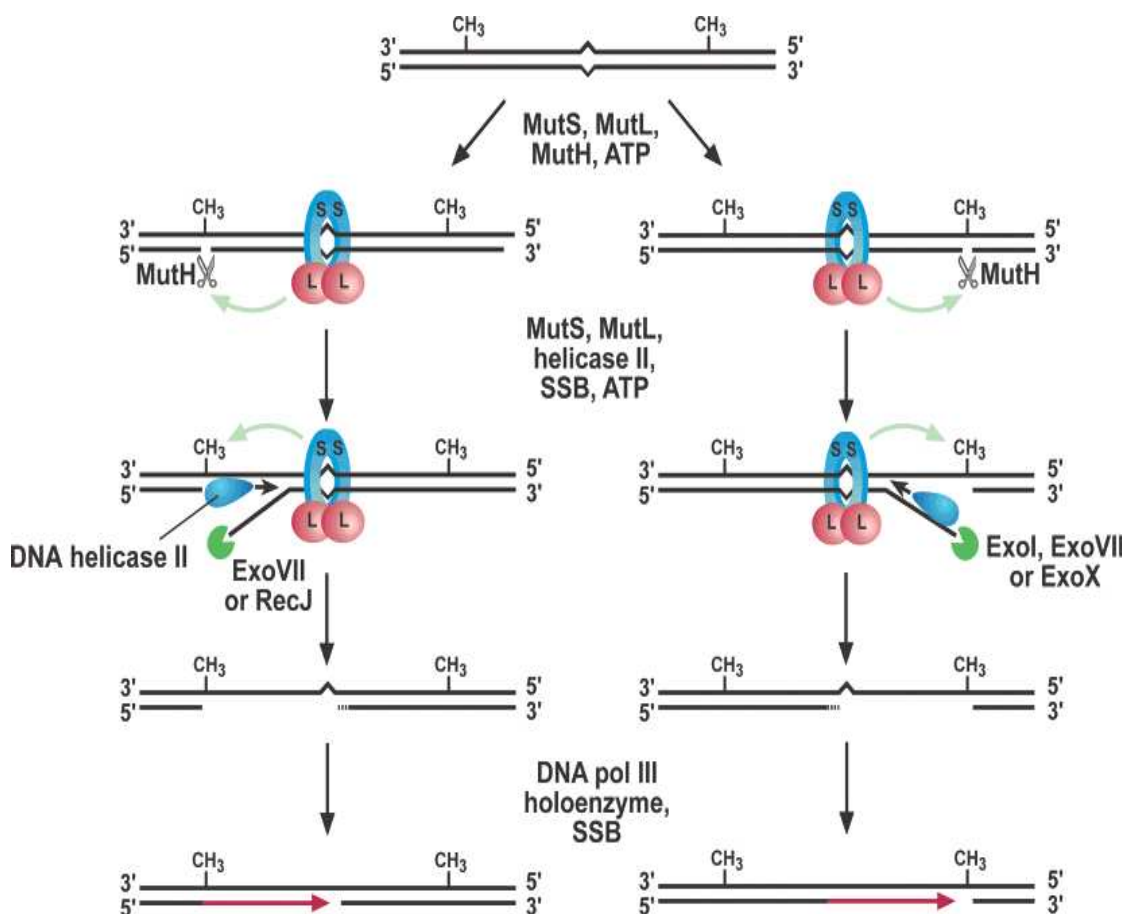
Proteiny účastníci se oprav se nazývají „Mut“ proteiny. U *Escherichia coli* známe tři specializované proteiny MutS, MutL a MutH (**Obr. 2.1.**).

MutS protein rozpoznává mutace až do délky 4 nukleotidů, ve formě homodimeru se váže na poškozenou DNA a aktivuje endo- a exonukleázy, které poškozený úsek odstraní (PARKER a MARINUS 1992, JUNOP *et al.* 2001). N-terminální konec proteinu MutS je důležitý pro vazbu na DNA a za tvorbu homodimerů je zodpovědný C-terminální konec, na kterém je také přítomno vazebné místo pro ATP (WU a MARINUS 1999). ATP je za normálních okolností hydrolyzováno a komplex MutS s DNA se rozpadá. Tento proces je nezbytný pro správnou funkci MMR, jelikož umožňuje přemísťování dimeru podél dvoušroubovice DNA (JUNOP *et al.* 2001). Mutace v MutS vazebné doméně pro ATP souvisí s chybami ve funkci MMR a projevem mutátorového fenotypu (WU a MARINUS 1994). Pokud se MutS protein naváže na poškozené místo na DNA, dochází ke změně jeho konformace. ATP není hydrolyzováno a homodimer MutS zůstává pevně navázán na DNA (NATRAJAN *et al.* 2003).

Po rozpoznání poškozeného místa na DNA navázáním MutS je aktivován další protein MMR systému a to MutL. Tento protein obsahuje vysoce konzervovanou N-terminální doménu, která obsahuje vazebné místo pro ATP a C-terminální doménu zodpovědnou za tvorbu homodimerů tohoto proteinu (BAN a YANG 1998, DROTSCHMANN *et al.* 1998). MutL interaguje s MutS a aktivuje endonukleázovou aktivitu MutH proteinu (HALL a MATSON 1999).

MutH protein specificky štěpí nemetylovanou sekvenci GATC palindromu (WELSH *et al.* 1987). Vytvoří tak místo pro nasednutí specifických exonukleáz, které odstraní část vlákna spolu s detekovanou chybou. U *Escherichia coli* jsou přítomny dvě 5'→3' exonukleázy (exonukleáza VII a RecJ exonukleáza) a dvě 3'→5' exonukleázy (exonukleáza I a X) (COOPER *et al.* 1993) Po odstranění chybných

sekvencí může být vlákno opět resyntetizováno pomocí DNA polymerázy III a spojeno DNA ligázou. (FENG *et al.* 1996).



**Obr. 2.1: Schéma MMR u *Escherichia coli***

Modrým kroužkem je označen dimer MutS proteinů a červeně dimer MutL proteinů. Zelená značka značí exonukleázy a modrá kapka DNA helikázu. Zelené šipky značí signalizaci mezi dvěma DNA místy zapojenými do reakce. Červená šipka na vlákně DNA naznačuje směr opětovné resyntézy odstraněného vlákna.

Převzato z (FENG *et al.* 1996, IYER *et al.* 2006)

### 2.1.1.2. MMR u *Bacillus subtilis*

MMR u *Bacillus subtilis* není tak podrobně prozkoumán jako u *Escherichia coli*. Podíl MMR na udržení integrity bakteriálního genomu je však u *Bacillus subtilis* i u *Escherichia coli* podobný (SMITH *et al.* 2001).

Analýza bakteriálního genomu prokázala, že MMR systém u *Bacillus subtilis* má pouze 2 geny kódující MutS a MutL proteiny. Tyto geny jsou uspořádané v samostatném *mutSL* operonu, který se nachází na 150° na genetické mapě. Jedná se o původní uspořádání *mutSL* operonu, kdy je zachována endonukleázová aktivita MutL proteinu, a MutH protein chybí. Homology MutS a MutL proteinů se stejnou funkcí se naházejí jak u kvasinek tak i v lidském genomu (GINETTI *et al.* 1996). Studium funkce těchto dvou proteinů prokázalo účast na postreplicačních opravách, na zabránění vzniku heteroduplexů a na opravách vzniklých heteroduplexů (MAJEWSKI a COHAN 1998). Stejně jako je tomu u eukaryot, využívá *Bacillus subtilis* systém pro rozpoznávání templátového vlákna jiný než pomocí metylace. Díky tomu je významným modelovým organismem, sloužícím pro pochopení principu tohoto rozpoznávacího procesu (SIMMONS *et al.* 2008). Také bylo zjištěno, že MMR systém u *Bacillus subtilis* nepředstavuje genetickou bariéru v prevenci mezidruhově rekombinace transformací. Na udržení této bariéry se podílí pouze schopností zabránit vzniku heteroduplexů při mezidruhově rekombinaci (MAJEWSKI a COHAN 1998).

Pro správnou funkci MMR systému je důležitá interakce přes C-terminální konec MutS proteinu s  $\beta$ -svorkou komplexu DNA polymerázy. Tato interakce je jednou z hlavních molekulárních interakcí, která je důležitá pro správnou funkci MMR systému a podílí se na stabilizaci MutS. Ze studie zaměřené na tuto interakci vyplývá, že  $\beta$ -svorka pomáhá zaměřit MutS protein na chyby vzniklé při replikaci. Vlastní rozpoznání těchto chyb má na starost C-terminální konec tohoto proteinu. Tato skutečnost je také podpořena experimenty, kdy se při poruše této interakce projevuje mutátorový fenotyp. (SIMMONS *et al.* 2008).

Výrazná schopnost postreplicačních oprav MMR systému byla prokázána pomocí delece *mutS* a *mutL* genu, kdy byla frekvence mutací nejméně o 2 řády vyšší, než tomu bylo u kmene s funkčním opravným mechanismem (PEDRAZA-REYES a YASBIN 2004). Tyto delece také potvrdily větší účast MMR systému na zabránění vzniku chyb tranzicí než transverzí, což platí i u *Escherichia coli*. (ROSSOLILLO a ALBERTINI 2001). U kmenů s funkčním MMR systémem byla při růstu



v komplexním médiu zvýšená exprese genů MMR systému pozorována až během pozdní exponenciální fáze růstu (GINETTI *et al.* 1996).

### **2.1.1.3. Úloha MMR v rekombinačních procesech**

Homologní rekombinací nazýváme proces, kdy dochází k výměně komplementárních částí ss-DNA mezi dvěma ds-DNA (dvouvláknová DNA) a vzniká tak heteroduplexní ds-DNA molekula. Pokud nejsou rekombinační sekvence identické, objeví se v heteroduplexu chyby v párování bází. Tyto chyby musejí být opraveny stejným procesem, který se podílí i na opravě chyb po DNA replikaci a to MMR systémem (HARFE a JINKS-ROBERTSON 2000). V případě proběhnutí chybné rekombinace MMR systém rozpoznává a opravuje chybu přímo v konkrétní sekvenci (CLAVERYS a LACKS 1986). MMR systém má ale i výrazný anti-rekombinační efekt, kdy brání rekombinaci nejen chromozomální ale i plazmidové DNA v případě rekombinace nehomologních sekvencí (WORTH *et al.* 1994). Anti-rekombinační efekt MMR systému představuje efektivní bariéru pro mezidruhový přenos DNA a je důležitý k udržení genetické izolace bakteriálních druhů (VULIC *et al.* 1997).

### **2.1.1.4. Inaktivace MMR**

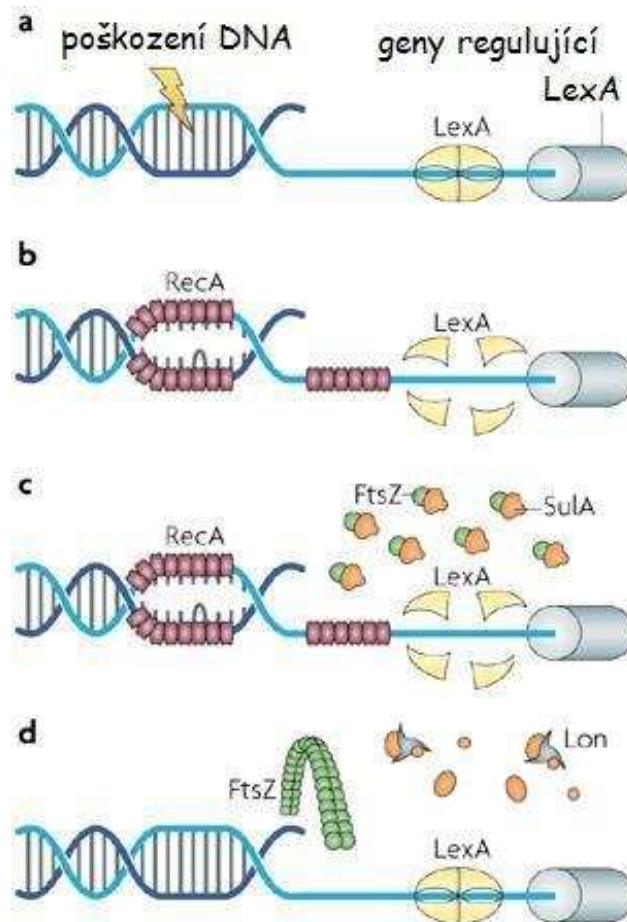
Buňky, které nemají aktivní opravný systém (MMR<sup>-</sup>) se nazývají mutátoři. V běžné laboratorní populaci divokého kmene se vyskytují s frekvencí  $10^{-5}$  a méně (FUNCHAIN *et al.* 2001). Mutátorové kmeny mají o několik řádů vyšší mutační rychlost než buňky divokého typu, vzhledem k jejich neschopnosti opravit chyby způsobené nepřesností replikace. Jejich zvýšená mutabilita přináší výrazné zvýhodnění v neustále se měnícím prostředí. Nepředvídatelné změny, kterým je potřeba se co nejrychleji přizpůsobit vytváří například imunitní systém. Z tohoto důvodu se mutátoři uplatňují hlavně u patogenních kmenů. Nepostradatelný vliv mají tyto kmeny také na adaptivní evoluci (MILLER 1996) i přesto, že bylo prokázáno, že na bakteriální diverzitu má větší vliv horizontální transfer než mutační procesy (OCHMAN *et al.* 2000). Fungující MMR má dále vliv také na snížení rekombinačních

událostí na chromozomální DNA, proto jsou u MMR<sup>-</sup> buňky mnohem efektivnější homologní rekombinace (RAYSSIGUIER *et al.* 1989).

Při růstu kultury ve stálých laboratorních podmínkách, bez selekčního tlaku, se však frekvence výskytu mutátorů výrazně snižuje. Přetrvávání mutátorového fenotypu vede k hromadění i nepříznivých mutací v různých genech, tím dochází ke ztrátě mnoha potřebných funkcí a snižuje se tak schopnost přežití mutátora. K ubývání buněk s mutátorovým fenotypem tedy dochází ve chvíli, kdy populace získala potřebné vlastnosti pro přežití a další mutace jsou již znevýhodňující. Populace se postupně stává MMR<sup>+</sup> (FUNCHAIN *et al.* 2000, SNIEGOWSKI 2001).

### 2.1.2. SOS odpověď

Bakterie mají velice výraznou a efektivní schopnost odhalit a opravit změny na DNA vzniklé působením nepříznivých podmínek. Systém schopný minimalizovat letální změny způsobené důsledkem takovéto expozice se nazývá SOS systém nebo také SOS odpověď (**Obr. 2.2**) (KELLEY 2006). Pokud dojde k poškození DNA, vznikne v buňce oblast obsahující pouze jedno vlákno DNA (ss-DNA). Vznik ss-DNA může být způsoben buď přímo, působením poškozujícího agens, nebo nepřímo zastavením DNA replikace nebo chybnou opravou DNA. U *Escherichia coli* je ss-DNA rozpoznána bakteriální rekombinázou RecA, která se na ni naváže a vytvoří nukleoproteinový komplex. Tento komplex interaguje s represorem SOS odpovědi LexA a aktivuje jeho autoproteolýzu. Destrukce LexA vede k aktivaci genů SOS odpovědi. Mnohé z těchto genů kódují enzymy podporující opravu DNA, rekombinaci a syntézu okolo poškození, které zastavilo původní DNA replikaci. U *Escherichia coli* známe přibližně 30 genů, které jsou reprimovány LexA (FERNANDEZ DE HENESTROSA *et al.* 2000, WADE *et al.* 2005). *Bacillus subtilis* má podobné množství těchto genů, ale jen 8 z nich je homologních s geny *Escherichia coli* (AU *et al.* 2005).



**Obr. 2.2: Aktivace SOS odpovědi**

a) Působením poškozujícího agens na chromozomální DNA dochází k vytvoření ss-DNA a indukci SOS odpovědi b) ss-DNA je rozpoznána a po navázání hlavní bakteriální RecA rekombinázy dojde k autolýze LexA represoru a k aktivaci mnoha genů zodpovídajících za opravu DNA a inhibici buněčného dělení. c) V rámci SOS odpovědi je tvořen inhibitor buněčného dělení SulA, který brzdí tvorbu multimerů FtsZ kruhu, vytvoření buněčné přepážky a znemožňuje dělení buněk. Buňky filamentují a proces segregace je oddálen. d) Oprava DNA je dokončena. V buňce se nenachází žádná ss-DNA, signál pro RecA je nulový, LexA není autolyzován a geny pro SOS odpověď nejsou přepisovány (SHERYL S. JUSTICE 2008). Cytoplazmatické proteázy Lon degradují SulA, dochází k tvorbě buněčné přepážky a k dělení buněk (SHERYL S. JUSTICE 2008).

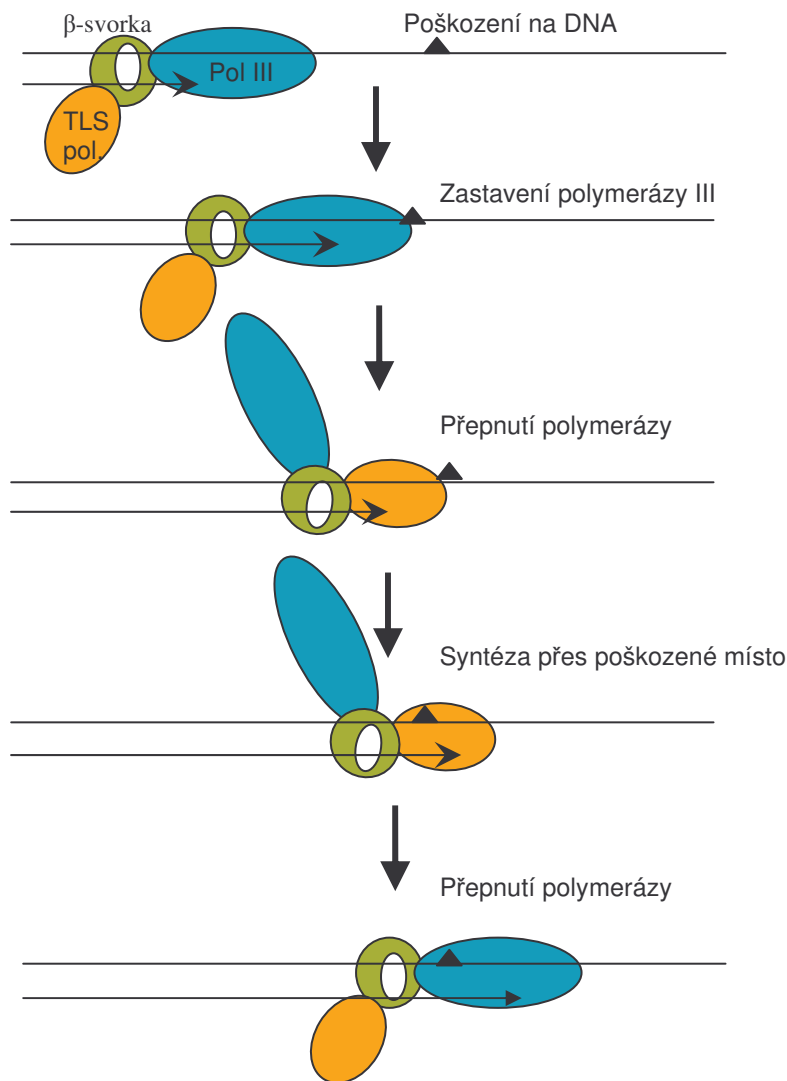
### 2.1.3. Stresem indukované DNA polymerázy

Alternativní DNA polymerázy (jinak také SOS DNA polymerázy nebo TLS polymerázy) jsou přepisovány spolu s geny SOS odpovědi. Účastní se replikace DNA v případech, kdy je na DNA přítomno poškození templátového vlákna přítomností lézí nebo působením chemických látek, kvůli kterému by byla jinak replikace probíhající za účasti hlavních DNA polymeráz přerušena.

Pokud se DNA polymeráza dostane k místu, kde je templátová DNA poškozena replikace se zastaví. V této chvíli je polymeráza III nahrazena TLS polymerázou (TransLeSion polymeráza), která nasedne na templátový řetězec a zprostředkuje tzv. „přemostění“ přes poškození. Vzhledem k nízké procesivitě TLS polymerázy je krátce po přemostění nahrazena opět DNA polymerázou III a replikace může dále probíhat opět v přítomnosti hlavní DNA polymerázy (**Obr. 2.3**) (OHMORI *et al.* 2001). Mezi hlavní DNA polymerázy u *Escherichia coli* patří DNA polymeráza III, což je hlavní DNA polymeráza účastnící se replikace a DNA polymeráza I podílející se na syntéze Okazakiho fragmentů. Při poškozeních na DNA jsou u *Escherichia coli* aktivovány tři alternativní DNA polymerázy (OHMORI *et al.* 2001, FUCHS *et al.* 2004, NOHMI 2006).

Polymeráza II, která je produktem *polB* nebo *dinA* genu patří do rodiny B DNA polymeráz (SHINAGAWA *et al.* 1991). Jako DNA polymeráza III se sdružuje s  $\beta$ -svorkou a tvoří přemostění přes poškození na DNA. Její hlavní role je obnovení zastavené replikace v replikační vidličce. Vzhledem k tomu že replikace alternativní DNA polymerázou II je velice přesná, řadí se v „hierarchii“ DNA polymeráz za DNA polymerázu III (DELMAS a MATIC 2006).

Další dvě polymerázy patří do rodiny Y DNA polymeráz a vyznačují se nižší přesností v replikaci. Jedna z těchto polymeráz je polymeráza IV, což je produkt *dinB* genu. Tato polymeráza je náchylná k chybám a její funkce je omezena pouze na některá poškození. Stejně jako polymeráza II se podílí na obnovení zastavené replikace. Polymeráza V je produkt genu *umuCD*. Je schopna replikace přes mnoho typů poškození, ale dopouští se chyb v replikaci jak poškozené, tak nepoškozené DNA (FOSTER 2007, CURTI *et al.* 2009).



**Obr. 2.3: Přepínání mezi DNA polymerázami během syntézy přes poškozená místa na DNA**

β-svorka (značena zeleně) se váže na jádro DNA polymerázy III (značena modře) a upevňuje polymerázu na DNA během bezproblémové DNA replikace. Druhá rezervní TLS polymerázy (značena oranžově) je také navázána na tzv „Tool belt“ místo β-svorky. Převzato z (STORZ a HENGGE 2011)

#### 2.1.4. σ faktory

Jedna z prvních moderních studií zaměřených na genovou regulaci se zabývala dvěma systémy. *Lac* systémem u *Escherichia coli* a lytickým a lysogenním systémem bakteriofága λ. Bylo zjištěno, že systémy cíleně reagují na změny podmínek okolního

prostředí přepisem konkrétních genů, jež jsou řízeny specifickými regulačními proteiny. (JACOB a MONOD 1961). Tyto proteiny se nazývají transkripční faktory nebo také  $\sigma$  faktory. Jsou to DNA vazebné proteiny, které obsahují DNA vazebné domény rozpoznávající specifické nukleotidové sekvence v promotorových oblastech konkrétních genů. Vazba  $\sigma$  faktoru na promotorovou oblast vede ke snížení nebo zvýšení transkripce přilehlých genů, což má za následek fenotypové změny, které umožňují lepší přizpůsobení novému prostředí (BROWNING a BUSBY 2004). Exprese  $\sigma$  faktorů je velice dynamická při stresových podmínkách kdy dochází k transkripci genů potřebných pro přežití během hladovění. Může být ale také vyvolaná například při rychlých změnách teploty, překyselení prostředí a osmotickém šoku (WEBER *et al.* 2006). Všechny  $\sigma$  faktory se váží přímo na jádro RNA polymerázy v místě kontaktu dvou největších podjednotek. Tato vazba umožní nasednutí RNA polymerázy a iniciaci transkripce. (BURGESS a ANTHONY 2001, GESZVAIN *et al.* 2004). Bakteriální  $\sigma$  faktory jsou rozděleny podle struktury na dvě odlišné skupiny. Do první skupiny patří většina  $\sigma$  faktorů spolu s primárním transkripčním faktorem  $\sigma^{70}$  *Escherichia coli* a s faktory stacionární fáze a obecné stresové odpovědi  $\sigma^S$  (RpoS) *Escherichia coli* a  $\sigma^B$  *Bacillus subtilis* (PAGET a HELMANN 2003). Menší skupinu tvoří  $\sigma$  faktory příbuzné  $\sigma^{54}$  *Escherichia coli* (WIGNESHWERARAJ *et al.* 2008).

#### 2.1.4.1. Obecná stresová odpověď u *Bacillus subtilis* a alternativní $\sigma^B$ faktor

*Bacillus subtilis* má několik způsobů jak se vyrovnat s nepříznivými životními podmínkami. Kromě sporulace je další využívanou strategií obecná stresová odpověď, která je indukována na přechodu z exponenciální do stacionární fáze, nebo při stresech způsobených vnějším prostředím jako je například vysoká a nízká teplota, kyselé pH, přítomnost antibiotik, ethanolu, osmotický stres, hladovění na uhlík, glukózu, fosfát a při nedostatku kyslíku (AVILA-PEREZ *et al.*, BENSON a HALDENWANG 1993, BOYLAN *et al.* 1993, BRIGULLA *et al.* 2003, MASCHER *et al.* 2003, HECKER *et al.* 2007).

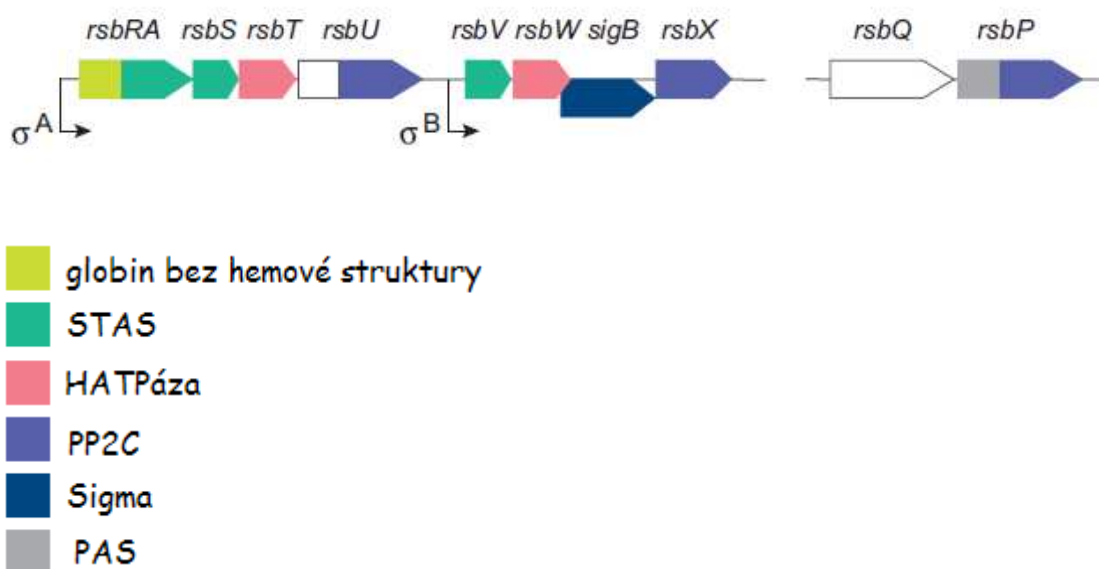
Obecná stresová odpověď nastává po aktivaci alternativního  $\sigma$  faktoru který způsobí přepis nové sady genů a tím vznik nových proteinů schopných vzdorovat vzniklým nepříznivým podmínkám. Funkcí proteinů obecné stresové odpovědi je

pouze nespecifická a preventivní odolnost vůči danému stresu. Tyto proteiny se podílejí na ochraně, opravě a degradaci neopravitelných buněčných struktur a buňka tak získá čas na obnovení všech poškozených funkcí (PETERSOHN *et al.* 2001, HECKER *et al.* 2007). Ochranné proteiny se zaměřují zejména na DNA, lipidy a proteiny. Tvoří ochranu proti oxidativnímu stresu, vysokým teplotám, přítomnosti kyselin a zásad v okolním prostředí a také proti osmotickému stresu a přítomnosti antibiotik (HECKER a VOLKER 2001). Do této skupiny patří mnoho membránových proteinů, což značí zásadní vliv této odpovědi na udržení integrity buněčné membrány a transportních mechanismů buňky. Patří sem také inhibitory buněčného dělení bránící rozdělení buněk ve stresových podmínkách a další proteiny, které se podílejí na detoxikaci buňky. U ostatních proteinů se předpokládá vliv na redoxní rovnováhu buňky (PETERSOHN *et al.* 2001). Obecná stresová odpověď je zásadní životní strategií, alternativní ke sporulaci, nepostradatelnou pro přežití buněk v nepříznivých podmínkách ve vegetativním stavu. (HECKER a VOLKER 2001, HECKER *et al.* 2007). V případě nerostoucí buňky jí proteiny obecné stresové odpovědi poskytují preventivní ochranu proti možnému budoucímu stresu. Tato obraná bariéra proti stresům v nerostoucích buňkách zajišťuje ochranu a opravu buněčným strukturám jako jsou například proteiny, DNA a buněčná membrána, u kterých by jinak mohlo vzniknout během neaktivní fáze života poškození působením různých enviromentálních stresů. Vzhledem k tomu, že po dlouhém hladovění již nemají buňky stejné obrané prostředky jako při růstu v optimálních podmínkách a neumí se s nastalými stresovými podmínkami vyrovnat jako aktivní rostoucí buňky okamžitou indukcí specifické odpovědi, je obecná stresová odpověď vhodným obranným mechanismem pro jejich přežití (BOYLAN *et al.* 1993, HECKER a VOLKER 1998, HECKER *et al.* 2007).

U *Bacillus subtilis* je alternativní transkripční faktor označován jako  $\sigma^B$ . Tento faktor byl objeven jako první alternativní  $\sigma$  faktor u *Bacillus subtilis* (HALDENWANG 1995). Je aktivován v případě přechodu do stacionární fáze růstu, nebo v přítomnosti některého z řady stresů. Má pod kontrolou více než 150 genů ležících v jednom z největších regulonů. Jeho aktivace je pod kontrolou regulačních proteinů, z nichž většina je zakódována v *rsb* genech (regulátory *sigB*).

Gen pro *sigB* je součástí *sigB* operonu, který se skládá ze dvou promotorů a osmi genů (**Obr. 2.4**). Prvním promotorem je  $P_A$ . Geny přepisové z tohoto promotoru se podílí na udržení nízké hladiny  $\sigma^B$  při růstu v exponenciální fázi a za nestresových

podmínek (WISE a PRICE 1995). Druhý promotor  $P_B$  předchází strukturnímu genu *sigB* pro  $\sigma^B$ , ležícímu v operonu spolu s dalšími třemi geny (*rsbV*, *rsbW*, *rsbX*). Produkty těchto tří genů regulují aktivaci  $\sigma^B$  a spuštění obecné stresové odpovědi (KALMAN *et al.* 1990). Alternativní transkripční faktor a jeho regulátory jsou u gram-pozitivních bakterií silně konzervovány (HECKER *et al.* 2007).



**Obr. 2.4: Schéma *sigB* operonu *Bacillus subtilis*.**

$\sigma^A$  = promotor specifický pro *sigA*,  $\sigma^B$  = promotor specifický pro *sigB*. Globin bez hemové struktury (Strukturálně podobný globinu. Neobsahuje však histidinový zbytek nezbytný pro koordinaci vazby železa v této struktuře), STAS (Sulfátové Transportéry a antagonist Anti-Sigma faktoru), HATPáza (kinázová doména dvoukomponentového systému přepínacích proteinů), PP2C ( $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  závislá doména fosfatázy 2C), Sigma (sigma faktor), PAS (Per – ARNT – Sim, signální protein podílející se na vnímání redox potenciálu, napětí a světelných signálů). Převzato z (HECKER *et al.* 2007).

#### 2.1.4.2. Regulace alternativního $\sigma^B$ faktoru u *Bacillus subtilis*

Regulace  $\sigma^B$  faktoru je pod kontrolou několika hlavních proteinů *RsbV*, *RsbW*, *RsbX*, *RsbU*, *RsbP*, *RsbT*, *RsbS* a *RsbR* (BENSON a HALDENWANG 1992, VOELKER *et al.* 1995, HECKER *et al.* 2007). Základním regulátorem je *RsbW*



kináza (anti- $\sigma$  faktor), která tvoří komplex se  $\sigma^B$  a inhibuje jeho funkci tak, že zabrání vazbě faktoru na RNA polymerázu. Tato situace je charakteristická pro exponenciální růst v nestresovaném prostředí (BENSON a HALDENWANG 1993). Vyvázání RsbW kinázy z tohoto komplexu má na starost RsbV protein, který se při nedostatku ATP defosforyluje,  $\sigma^B$  je uvolněn a je zahájena transkripce příslušných genů. Tento proces regulace je také někdy nazýván jako „Partner – switching“ (ALPER *et al.* 1994). Tato reakce je zapříčiněna vlivem stresových podmínek jako je osmotický a ethanolový stres a stacionární fáze (BOYLAN *et al.* 1992, BOYLAN *et al.* 1993). RsbV může být defosforylován pomocí dvou různých fosfatáz. V případě nedostatku živin a při přechodu do stacionární fáze fosfatázou RsbP a při reakci na stres z vnějšího prostředí fosfatázou RsbU. Při aktivaci RsbU fosfatázou vzniká velký proteinový komplex jinak nazýván také jako „stresozom“ (MARLES-WRIGHT *et al.* 2008). Naproti tomu tepelný stres aktivuje  $\sigma^B$  nezávisle na RsbV mechanismu a to buď přímou inaktivací RsbW, nebo prostřednictvím jiné signální dráhy, která nebyla doposud identifikována. RsbX je negativním regulátorem RsbU-aktivace  $\sigma^B$ . V přítomnosti RsbX je aktivace pomocí RsbU inhibována (BOYLAN *et al.* 1992, BOYLAN *et al.* 1993, VOELKER *et al.* 1995).

#### 2.1.4.3. Aktivace alternativního $\sigma^B$ faktoru u *Bacillus subtilis*

Aktivaci alternativního transkripčního  $\sigma^B$  faktoru mají na starost tři signální dráhy (**Obr. 2.5**).

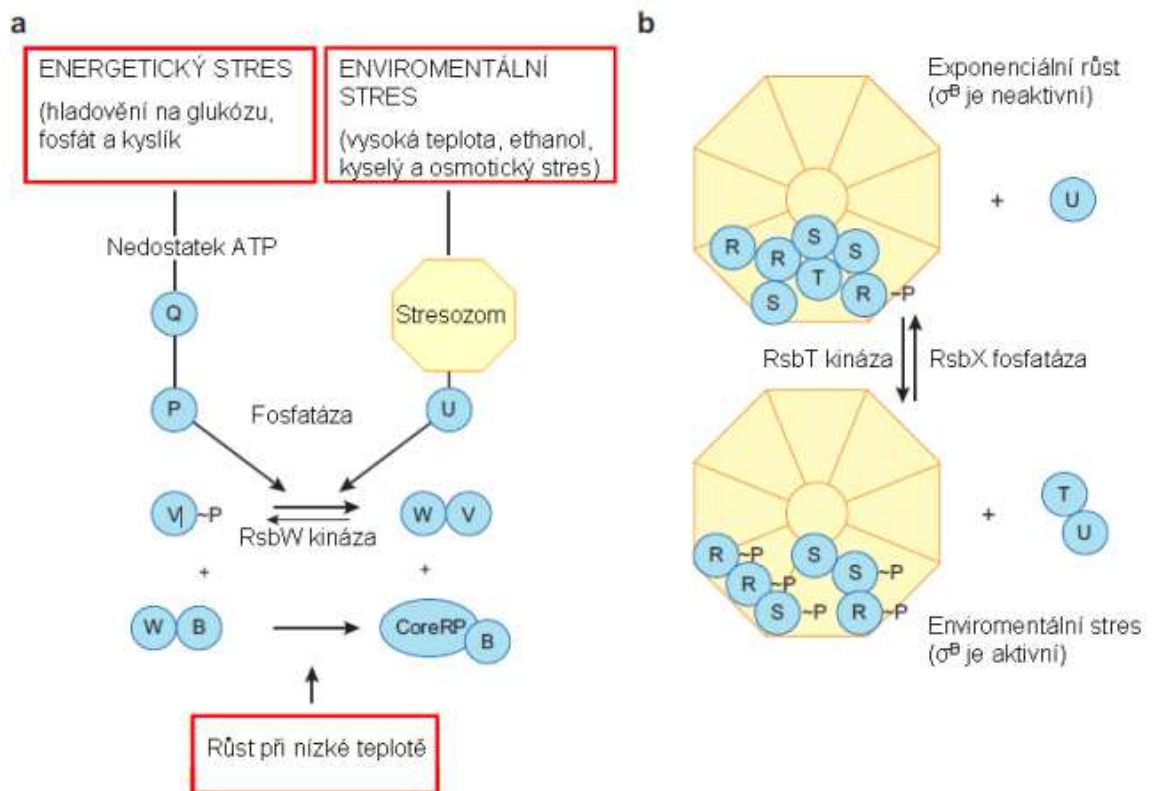
První signální dráha je aktivována v případě energetického stresu jako je například hladovění na glukózu, fosfát či kyslík. Zde je alternativní transkripční faktor aktivován buď přímo přes RsbW kinázu, nebo prostřednictvím RsbP fosfatázy. Při přímé aktivaci přes RsbW se v reakci na snižující se hladinu ATP snižuje i její enzymatická aktivita. Tato kináza je poté vyvázána pomocí nefosforylovaného RsbV proteinu z vazby se  $\sigma^B$ . (ALPER *et al.* 1996). Druhou možností je aktivace prostřednictvím RsbP fosfatázy. RsbP fosfatáza je enzym, který obsahuje kromě C-koncové katalytické domény PP2C také N-koncovou PAS doménu, která je nezbytná pro její schopnost interagovat s jinými proteiny a vnímat změny energetického stavu buňky (VIJAY *et al.* 2000). Aktivovaná RsbP fosfatáza defosforyluje RsbV~P, který tvoří vazbu s RsbW a  $\sigma^B$  je uvolněn (ALPER *et al.* 1994). Vzhledem k tomu, že

mutace v *rsbP* genu měly za následek neschopnost aktivace obecné stresové odpovědi je pravděpodobné, že tato odpověď hraje důležitější roli v aktivaci  $\sigma^B$  než přímé řízení aktivity RsbW pomocí měnících se hladin ATP (HECKER *et al.* 2007).

Informace o působení enviromentálních stresů, jako je například vysoká teplota, ethanol nebo kyselé prostředí jsou přenášeny pomocí druhé signální dráhy za účasti RsbU kinázy, která defosforyluje RsbV protein. RsbU je analog RsbP kinázy a je aktivována RsbT proteinem, který se naváže na její N-koncovou část. U rostoucích buněk je RsbU neaktivní a RsbT je součástí velkého proteinového komplexu zvaného stresozom. Celý stresozom se skládá z RsbT proteinu, jeho antagonisty RsbS a RsbS koantagonistů RsbR (RsbRA, RsbRB, RsbRC, RsbRD, YtvA). Dynamika vazby RsbT ve stresozomu je řízena reverzní fosforylací. V případě růstu ve stresových podmínkách dochází k aktivaci kinázové aktivity RsbT což vede k úplné fosforylaci RsbR a částečné fosforylaci RsbS. Vazebná funkce těchto proteinů je deaktivována a dochází k uvolnění RsbT ze stresozomu a k jeho vazbě na N-koncovou část RsbU (KIM *et al.* 2004).

Obecná stresová odpověď aktivovaná  $\sigma^B$  je vždy pouze přechodná. Trvá 10 až 40 minut a poté se vrací na hodnoty před aktivací (VOELKER *et al.* 1995). Tento pokles zajišťuje RsbX fosfatáza, která působí proti kinázové aktivitě RsbT a defosforyluje RsbS a RsbR. Strukturální gen RsbX fosfatázy leží v *sigB* operonu a je přepisován spolu se strukturálními geny pro  $\sigma^B$ . Vzhledem k tomu, že RsbX je exprimován společně se  $\sigma^B$ , je tak zajištěna autoregulace obecné stresové odpovědi. RsbT je opětovně navázán do stresozomu a RsbU inaktivována (HECKER *et al.* 2007).

Při růstu za trvale snížené teploty nedochází k poklesu  $\sigma^B$  odpovědi a její aktivace není závislá na RsbV a jejích aktivačních fosfatázách RsbU a RsbP jako tomu bylo v předchozích dvou případech. Tato skutečnost naznačuje zcela jinou aktivační dráhu pro  $\sigma^B$ . Velký význam této reakce, která zajišťuje přežití *Bacillus subtilis* v chladném prostředí potvrzuje pozorování  $\sigma^B$  mutantních buněk, jejichž růst je v 15 °C výrazně narušen (BRIGULLA *et al.* 2003).



**Obr. 2.5:** Schéma aktivace alternativního transkripčního faktoru  $\sigma^B$ .

B ( $\sigma^B$ ), P (RsbP), Q (RsbQ), R (RsbR), S (RsbS), T (RsbT), U (RsbU), V (RsbV), W (RsbV), CoreRP (jádro enzymu RNA-polymerázy).

a) Model tří signálních drah umožňujících aktivaci alternativního transkripčního faktoru  $\sigma^B$  vlivem metabolického stresu, stresových změn v okolním prostředí nebo během růstu při nízké teplotě.

b) Detail zprostředkované aktivace  $\sigma^B$  prostřednictvím RsbT a jeho následné uvolnění ze stresozomu vlivem enviromentálního stresu

Převzato z (HECKER *et al.* 2007)

#### 2.1.4.4. Geny $\sigma^B$ regulonu *Bacillus subtilis*

Studium genů  $\sigma^B$  regulonu je založeno na fenotypové studii  $\sigma^B$  mutantů. Kompletní popis všech genů a jejich funkcí z tohoto regulonu je pouze předpokladem k úplnému pochopení jeho fyziologické role. Zatím byla popsána biochemická funkce pouze u 20 proteinů z celého regulonu. Patří mezi ně například bílkoviny účastnící se ochrany buňky proti oxidativnímu stresu a to KatB, KatX, DPS, OhrB a TrxA, dále

proteiny osmotického stresu OpuD a OpuE, které jsou potřebné pro příjem kompatibilních rozpuštěných látek, proteiny obrany proti vysoké teplotě ClpC a ClpP, proteiny antibiotikové rezistence BmrUa BmrR, Proteiny chladového šoku a proteiny zajišťující obranu buněčné membrány GtaB a GtaA, či různých částí buněčného metabolismu (PETERSOHN *et al.* 2001, HECKER *et al.* 2007).

První detailní studie byla provedena na YerD proteinu, který má vliv na osmotickou odolnost buněk. Zdá se, že tento protein má podíl na syntéze glutamátu, což je mezistupeň pro syntézu prolinu, který je kompatibilním solutem v osmoticky namáhaných buňkách (HOPER *et al.* 2005). Dalším, podrobněji prozkoumaným genem, je *mcsB*, který patří do *clpC* operonu a kóduje kinázu, která se podílí na ochraně buněk proti vysoké teplotě. (KIRSTEIN *et al.* 2005). Objasněna byla i funkce genu *ctc*, který kóduje ribozom-vazebný protein. Po vazbě na 5S rRNA by mohl mít podíl na správné translaci probíhající ve stresových podmínkách (SCHMALISCH *et al.* 2002).

## **2.2. Adaptace buněk na změny vnějšího prostředí**

Schopnost organismů reagovat na změny okolních podmínek je velice důležitý fyziologický proces, který určuje, zda bakterie budou schopny v daných podmínkách přežít a růst. Charakteristickým znakem rostoucích bakterií je tedy schopnost rychle se přizpůsobit měnícím se životním podmínkám. Vzhledem k tomu, že bakterie jsou spolu s dalšími mikroorganismy nejrozšířenějšími organismy na Zemi, mají tuto schopnost velice dobře vyvinutou.

### **2.2.1. Adaptace buněk na změny teplot**

Velké rozdíly teplot jsou jedním z největších problémů, kterým musí takovéto všudypřítomné organismy čelit. Například bakterie žijící v půdě se musí vyrovnat nejen s teplotními výkyvy během dne a noci ale i během střídajících se ročních období.

### 2.2.1.1. Adaptace na vysokou teplotu (HSR)

Základní princip HSR (Heat Shock Response) je univerzální mezi všemi organismy. Při přesunu organismu do prostředí s teplotou vyšší než jeho normální růstové rozmezí je aktivován příslušný transkripční faktor, který zvýší transkripci skupiny genů, které jsou nazývány jako „geny tepelného šoku“, což vede k nadprodukci proteinů tepelného šoku (HSP – Heat Shock Protein) (STRAUS *et al.* 1987). Po přesunu buněk do prostředí s vysokou teplotou (která ještě není letální) dochází ke vzniku zlomů na DNA, k poškození cytoplazmatické membrány, ribozomů a rRNA. Každé z těchto poškození je signálem spouštějícím HSR, která má několik fází. První je indukční fáze, kdy dochází k rapidnímu zvýšení koncentrace HSP v buňce. V druhé, adaptační fázi, se syntéza HSP snižuje a ve třetí fázi nastává ustálený stav, kdy je koncentrace HSP udržována na hladině odpovídající růstu v určité teplotě (STRAUS *et al.* 1987, STRAUS *et al.* 1989, STORZ a HENGGE 2011).

#### 2.2.1.1.1. HSR u *Bacillus subtilis*

V reakci na vysokou teplotu aktivuje *Bacillus subtilis* transkripci více než 100 různých genů. Represor HrcA má na starost regulaci I. třídy genů tepelného šoku. Váže se na regulační sekvence, které se nazývají CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) a patří mezi ně také chaperony DnaK/J a GroEL/S. Tato regulace je vysoce zakonzervována i u mnohých dalších mikroorganismů (ZUBER a SCHUMANN 1994, SCHULZ a SCHUMANN 1996, HELMANN *et al.* 2001).

Mnoho z genů tepelného šoku je součástí regulonu obecné stresové odpovědi, který je pod kontrolou alternativního transkripčního faktoru  $\sigma^B$ . Tento alternativní transkripční faktor je pozitivním regulátorem v aktivaci HSR a kontroluje expresi II třídy genů tepelného šoku (HECKER *et al.* 1996, HELMANN *et al.* 2001).

Dalším represorem podílejícím se mimo jiné na kontrole exprese Clp chaperonu a peptidázy ClpP je CtsR. CtsR je prvním genem v ctsR operonu, podílí se na regulaci genů tepelného šoku III třídy a má také na starost regulaci transkripce z promotoru pro  $\sigma^A$  nebo  $\sigma^B$ . Může být inaktivován, nebo disociován podle stávajících okolních podmínek (KRUGER a HECKER 1998).

Na aktivaci HSR se také podílí dvou komponentový systém CsrRS jehož proteiny jsou lokalizovány na membráně. CsrRS operon je autoregulován a skládá se ze dvou genů HtrA a HtrB kodujících HtrA a HtrB proteázy, které hrají klíčovou roli v odezvě buňky na teplotní stres (DARMON *et al.* 2002).

#### **2.2.1.2. Adaptace na chladový stres (CSR)**

Přesun buněk z jejich normálního teplotního rozmezí do nižší teploty se nazývá chladový stres (CSR – **C**old **S**hock **R**esponse). Snížení teploty výrazně mění všechny fyzikální a chemické parametry živé buňky. Ovlivňuje rychlost rozpouštění látek, enzymovou kinetiku, tekutost, konformaci a flexibilitu membrán a interakce makromolekul jako jsou DNA, RNA a proteiny. Ve snaze vyrovnat se s fyzikálně-chemickými účinky chladového stresu na DNA se na dvoušroubovici tvoří více negativních nadobrátek (RODRIGUES a TIEDJE 2008). Pro relaxaci DNA je nezbytná přítomnost DNA-vazebných proteinů jako HN-S a HU (LA TEANA *et al.* 1991). Velice významným ochranným mechanismem, je u prokaryot i kvasinek nadprodukce trehalózy, která chrání proteiny a stabilizuje buněčné membrány (INOUYE a PHADTARE 2004). V případě že se buňka ocitne v nových chladnějších podmínkách je zapotřebí nejen stabilizace stávajících buněčných struktur, ale i syntéza nových proteinů včetně chaperonů, helikáz a enzymů. U *Escherichia coli* se jedná o RNázu R, která přispívá k udržení stability ribozomů a podílí se na kontrole kvality rRNA, tRNA. U *Bacillus subtilis* se na tomto podílí proteiny SsrA a SmpB (CHEN a DEUTSCHER 2005, SHIN a PRICE 2007).

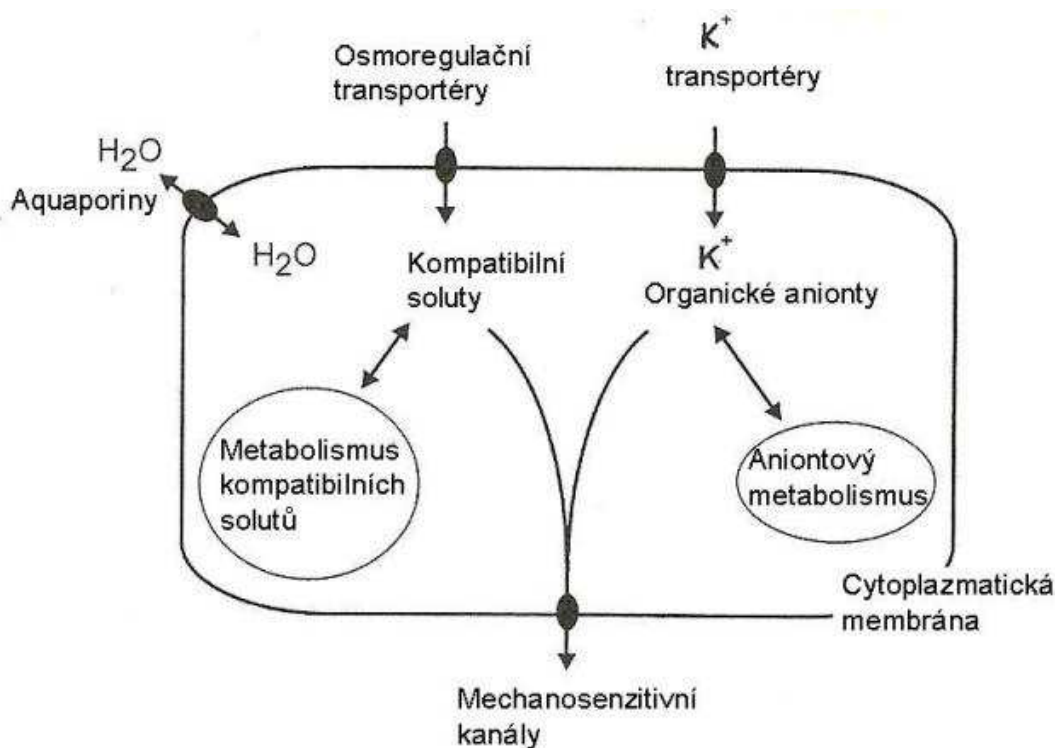
Při chladovém šoku je přepisována skupina nových Csp proteinů. Pro každý bakteriální druh je tato skupina zastoupena jiným počtem proteinů. U *Escherichia coli* se jedná o devět proteinů CspA až CspI a u *Bacillus subtilis* pouze o tři (GUALERZI *et al.* 2003). Důležitou roli v regulaci hrají i tzv. „dead“ RNA helikázy účastnící se procesů stabilizace a degradace přepisované mRNA. U *Escherichia coli* jsou kódovány geny *cdsA* a u *Bacillus subtilis* geny *cshA* a *cshB* (HUNGER *et al.* 2006, AWANO *et al.* 2007). Po translaci je důležité udržet správné prostorové uspořádání proteinů a je vyžadována přítomnost hlavně DnaK chaperonů (RODRIGUES a TIEDJE 2008).

Kromě přepisu nových proteinů dochází při CSR ke zvýšené tvorbě nenasycených a větvených mastných kyselin, které jsou potřebné k udržení správné tekutosti membrány (RUSSELL 1983). Obecně se na udržování správné struktury a funkce biologických membrán podílejí desaturázy mastných kyselin. Jedná se o enzymy nehemové struktury s obsahem železa a kyslíku, které mají schopnost zavádět dvojné vazby do alifatických řetězců mastných kyselin a jsou přítomny u všech organismů od bakterií až po savce (MEESAPYODSUK *et al.* 2000). *Bacillus subtilis* využívá vlastností těchto desaturáz, díky kterým je schopen po ochlazení okolního prostředí buněk zajistit rychlou změnu v tekutosti buněčné membrány. Při růstu za optimálních podmínek, při 37 °C je syntetizováno velké množství nasyčených mastných kyselin a pouze stopové množství nenasycených mastných kyselin. U *Bacillus subtilis* dochází v případě poklesu okolní teploty na 20 °C k zvýšené syntéze nenasycených mastných kyselin čímž je zajištěna stabilizace buněčné membrány. Změny v syntéze mastných kyselin má na starost dvou-komponentový systém, který se nazývá DesKR, který se skládá z membránově vázané kinázy DesK a transkripčního regulátoru DesR. Pomocí tohoto systému dochází k transkripci *des* genu, který kóduje  $\Delta 5$  desaturázu mastných kyselin (AGUILAR *et al.* 1998, ALTABE *et al.* 2003). Byla prokázána 10 – 15x vyšší syntéza tohoto genu po přenesení z 37 °C do 20 °C a kmeny mutantní v tomto genu vykazovaly nižší schopnost přežití za snížené teploty ve stacionární fázi (AGUILAR *et al.* 1998). Velice důležitá je také skutečnost, že u *Bacillus subtilis* nedochází narozdíl od *Escherichia coli* k inhibici růstu po přenesení buněk do prostředí s nízkou teplotou. Tento rozdíl podtrhuje fakt, že u proteinů asociujících s ribozomy se u těchto dvou modelových organismů nejedná o ortology (STORZ a HENGGE 2011).

### **2.2.2. Adaptace buněk na osmotický stres**

Osmotický stres velice ovlivňuje strukturu a fyzikálně chemické pochody v bakteriálních buňkách. Změny osmotického tlaku v prostředí jsou pasivně vyrovnávány přijímáním, nebo vypuzováním vody přes kanály zvané aquaporiny, které mohou regulovat průtok smrštěním nebo rozšířením svého průměru. V případě, že se omolarita prostředí zvýší, jsou ihned do buňky přes speciální transportéry přenášeny draselné kationty a také akumulovány párové anionty tvořené buněčným

metabolismem. Kompatibilní soluty jsou syntetizovány endogenním metabolismem a v případě, že se nacházejí ve vnějším prostředí, jsou do buňky transportovány pomocí speciálních kanálů (**Obr. 2.6**). Jedná se zejména o glutamát, trehalózu, glicinbetanin, ektonin a prolin. Funkcí těchto látek je udržet osmolaritu v buňkách na vyšší hladině než v okolním prostředí a tedy udržení správného turgoru uvnitř buňky. Pokud dojde k náhlému snížení osmolarity vnějšího prostředí dochází k uvolňování solutů přes mechanosenzitivní kanály, což zabrání lýze buňky (STORZ a HENGGE 2011). Proteiny, které zprostředkovávají transport těchto látek do buňky, nebo opačným směrem, jsou pod kontrolou systémů pro vyrovnávání osmotického stresu (CSONKA 1989, ROBERTS 2005).



**Obr. 2.6: Bakteriální osmoregulační mechanismy**

Převzato z (STORZ a HENGGE 2011)

Při zvýšení osmotického tlaku okolního prostředí (tzv. hyperosmotický stres) dochází k snižování intracelulárního obsahu vody a tedy k zakoncentrování buněčného obsahu a poklesu buněčného turgoru, což může vést k narušení replikace a



proteosyntézy, případně k úplnému vyschnutí buňky. U gram-negativních bakterií může dojít až k plazmolýze, poklesnutí buněčného turgoru na nulu a k smrti buňky. Gram-pozitivní bakterie jsou díky pevnosti buněčné stěny k zvýšení osmolarity prostředí odolnější (OREN 2008). Mikroorganismy, které se přizpůsobily životu v hyperosmotickém prostředí využívají pro vyrovnání osmotického tlaku uvnitř buňky organické látky nazývané také jako osmolity a anorganické látky, zejména sodné a draselné kationty. Bakterie žijící v prostředí o vysoké osmolariě se nazývají halotolerantní a halofilní mikroorganismy (ROBERTS 2005). Halofilové využívají dvě strategie k vyrovnávání osmotického tlaku mezi jejich cytoplazmou a okolím. První je založena na hromadění KCl v buňce. Vyžaduje přizpůsobení enzymatického aparátu buňky spolu s mechanismy pro udržení správné konformace a funkce proteinů v téměř nasyceném vnitřním prostředí buňky. Druhá strategie je založena na vypuzování soli z cytoplazmy spolu se syntézou kompatibilních solutů, které nejsou v rozporu s enzymatickým vybavením buňky. Tato strategie je využívána také u *Bacillus subtilis* (WHATMORE a REED 1990, OREN 2008)

V případě, že je osmotický tlak prostředí snížen, nasává buňka vodu z okolního prostředí a zvětšuje svůj objem. Pokud dojde k překročení hranice, kterou je buňka ještě schopna snést, dojde k tzv. plazmoptýze, čili k prasknutí buňky (CSONKA a HANSON 1991).

#### 2.2.2.1. Osmoadaptace u *Bacillus subtilis*

Základní reakcí na stresové podmínky z okolního prostředí je aktivace alternativního transkripčního faktoru  $\sigma^B$  (**Kap. 2.1.4.3.**). Tento faktor je také ihned aktivován při přenesení buněk do prostředí s vyšší osmolaritou (PETERSOHN *et al.* 2001, HOPER *et al.* 2006). Dalším alternativním faktorem podílejícím se na osmoadaptaci je  $\sigma^W$  patřící do skupiny alternativních ECF (ExtraCytoplasmatic Function) faktorů. Tento faktor se mimo jiné podílí právě na regulaci příjmu a sekrece různých iontů a molekul (PETERSOHN *et al.* 2001).

Adaptace na osmotický stres u *Bacillus subtilis* je založena na dvou pochodech.

V první fázi osmoadaptace dochází k transportu draselných kationtů do buňky pomocí speciálních přenašečů a transportních proteinů. U *Bacillus subtilis* je zatím blíže popsáno pouze několik transportních systémů.

Jedním ze systémů podílejících se na transportu draselných iontů jsou nízkoafinitní transportní systémy KtrAB a KtrCD. Tyto systémy se liší v afinitě k draselným iontům a také v uspořádání genů na chromozomu. Podjednotky KtrA a KtrC jsou vázány na cytoplazmatickou membránu a podjednotky KtrB a KtrD se podílejí na vlastním transportu draselných iontů přes cytoplazmatickou membránu. Aby transport iontů probíhal, musí být aktivní obě složky systému (NAKAMURA *et al.* 1998, HOLTSMANN *et al.* 2003).

Dále se na vyrovnání osmotického tlaku v buňce podílí tetracyklinový efluxní protein TetA (L), který zajišťuje buňce nejen rezistenci na tetracyklin ale mimo jiné i schopnost transportu monovalentních sodných či draselných kationtů a protonů (CHENG *et al.* 1996, WANG *et al.* 2000).

U *Escherichia coli* se vyskytuje transportní systém pro draselné kationty reprezentovaný proteinem TrkA. Strukturní homolog tohoto nízkoafinitního transportéru byl nalezen i u *Bacillus subtilis* (STURR *et al.* 1997). U *Escherichia coli* byl také identifikován vysokoafinní systém pro transport draselných iontů Kdp, který patří do skupiny ATPáz P-typu. U *Bacillus subtilis* zatím podobný vysokoafinní systém nalezen nebyl, ale ATPázová aktivita P typu indukovaná draselnými kationty byla prokázána (SEBESTIAN *et al.* 2001).

Druhou fází osmoadaptace rozumíme tvorbu kompatibilních osmolitů. Jedná se o rozpustné látky, které jsou kompatibilní s enzymovým vybavením buňky narozdíl od draselných iontů, a proto jsou za ionty vyměňovány. Kompatibilní soluty mohou být přímo syntetizovány buňkou nebo přijímány z okolního prostředí (HOLTSMANN a BREMER 2004).

### **2.2.3. Reakce *Bacillus subtilis* na poškození cytoplazmatické membrány.**

Buněčná membrána je první linií v obraně buněk proti různým druhům stresů působících z vnějšího prostředí. Je jednou ze základních, pro život nezbytných, struktur. Udává buňce tvar, podílí se na udržení správného osmotického tlaku uvnitř buňky a zprostředkovává komunikaci mezi vnitřním a vnějším prostředím. Udržení

intergrity této membrány a její správné funkce jsou pro buňku životně důležité (JORDAN *et al.* 2008). Na poškození buněčné membrány se kromě antibiotik také podílí ethanolový stres, pH stres, reprezentovaný jak vysokým tak nízkým pH, a stres vyvolaný přítomností detergentů (THACKRAY a MOIR 2003).

*Bacillus subtilis* reaguje na poškození cytoplazmatické membrány aktivací ECF alternativních transkripčních faktorů. U této bakterie známe sedm ECF faktorů a tři z nich jsou aktivovány při poškození cytoplazmatické membrány a podílejí se na udržení její integrity. Jedná se o  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$  a  $\sigma^M$  (HORSBURGH *et al.* 2001, HELMANN 2002).

Transkripční faktor  $\sigma^W$  je indukován v alkalickém pH a také při narušení integrity buněčné membrány přítomností detergentů (WIEGERT *et al.* 2001, CAO *et al.* 2002).  $\sigma^W$  je za optimálních podmínek vázán spolu s anti- $\sigma^W$  faktorem na cytoplazmatickou membránu. Pokud je v okolním prostředí přítomen stresor, dochází k proteolýze anti- $\sigma^W$  faktoru,  $\sigma^W$  je uvolňován z membrány a vazbou na promotory zahajuje transkripci příslušných genů (SCHOBEL *et al.* 2004). Regulon pod kontrolou tohoto transkripčního faktoru je nejvíce prostudovaný a obsahuje přibližně 60 genů (CAO *et al.* 2002).

Na podobném principu funguje i  $\sigma^M$ , který je aktivován v přítomnosti ethanolu a při nízkém pH. Bylo zjištěno, že mutanti s inaktivací  $\sigma^M$  byly neschopni růst v prostředí s pH 4,3. U alkalického stresu a v přítomnosti detergentu k aktivaci tohoto faktoru nedochází (THACKRAY a MOIR 2003).  $\sigma^M$  regulon má na starost expresi přibližně 30 operonů ve kterých se nachází 57 genů, podílejících se hlavně na biosyntéze buněčné stěny, buněčném dělení, opravách poškozené DNA, a detoxikaci (EIAMPHUNGORN a HELMANN 2008).

Alternativní transkripční ECF faktor  $\sigma^X$  je indukován v přítomnosti antibiotik působících na buněčnou stěnu. Aktivuje transkripci genů podílejících se na autolýze a modifikaci peptidoglykanu (CAO a HELMANN 2004).

Výsledky studií naznačují, že u různých stresových regulonů dochází k výraznému překryvu a signální dráhy zprostředkovávající reakce na stres jsou navzájem provázány (PIETIAINEN *et al.* 2005).

### 2.2.3.1. Adaptace buněk na ethanolový stres

Alkohol má nepříznivé účinky na růst bakterie a na celkovou životaschopnost buněk. Negativní účinky ethanolu se projevují hlavně na plazmatické membráně, kde nahrazuje molekuly vody, čímž dochází k porušení integrity membrány, která se stává více propustnou pro různé molekuly. Tolerance k ethanolu je tedy nejspíše zapříčiněna evolučními změnami ve složení cytoplazmatické membrány (INGRAM *et al.* 1980, INGRAM 1990). Při růstu *Escherichia coli* v prostředí se zvýšenou koncentrací ethanolu dochází k podstatným změnám ve složení lipidů a produkty ethanolového metabolismu způsobují změny ve složení mastných kyselin (INGRAM *et al.* 1980).

U *Bacillus subtilis* vyvolává působení ethanolu nejen aktivaci proteinů obecného stresu, ale také dochází k aktivaci dalších alternativních transkripčních faktorů ze skupiny ECF, které reagují obecně na poškození cytoplazmatické membrány různými druhy stresů (PETERSOHN *et al.* 2001, STARON *et al.* 2009).

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Materiál

##### 3.1.1. Bakteriální kmeny

###### *Bacillus subtilis*

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

*Bacillus subtilis* SG64 (BGSC No 1A680) (*xglAI*, *xglRI*)

Kmen s mutačně inaktivovanou endogenní  $\beta$ -galaktosidázou

*Bacillus subtilis* 168 (*trpC2*)

Standardní divoký kmen (WT )

Kmeny připravené v naší laboratoři

*Bacillus subtilis* BSMS1

Hypermutátorový kmen s inaktivací v MMR systému převzatý od Mgr. J. Nunváře, popis viz. (NUNVÁŘ 2009)

*Bacillus subtilis* BSPSL6

Rekombinantní kmen s fúzí promotoru pro *mutSL* operon s reportérovým genem pro  $\beta$ -galaktosidázu. Převzato od Mgr. J. Nunváře, popis viz. (NUNVÁŘ 2009)

Kmeny připravené v rámci mé diplomové práce. Popsány v příslušných kapitolách sekce „Výsledky“

*Bacillus subtilis* 1A680/Pctc2

Rekombinantní kmen s promotorem pro *ctc* gen sfúzovaný s reportérovým genem pro  $\beta$ -galaktosidázu

*Bacillus subtilis* BSM14

Potenciální mutátorový kmen s inaktivací MMR systému

*Bacillus subtilis* BSM5

Potenciální mutátorový kmen s inaktivací MMR systému

## *Escherichia coli*

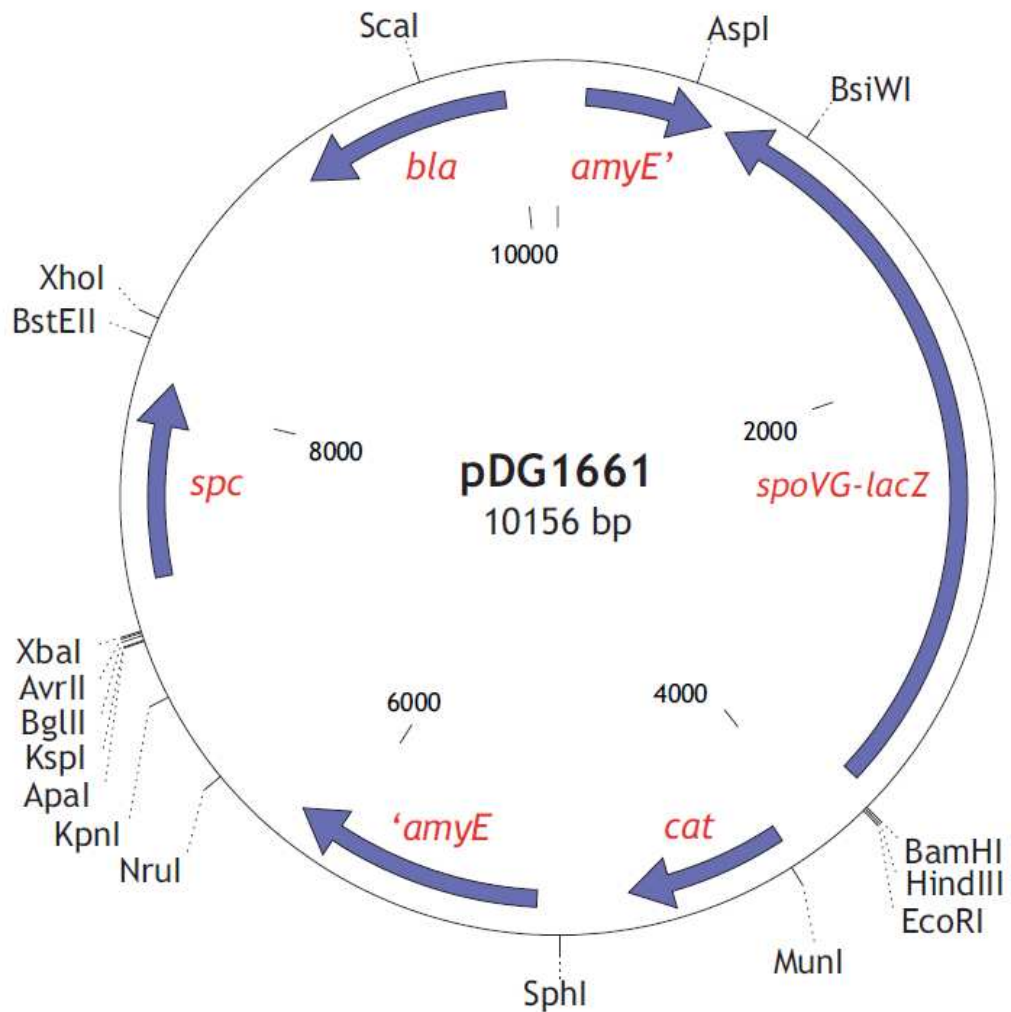
*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*deoR endA1 gyrA96 hsd R17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *recA1 relA1 supE44 thi-1* (*lac ZYA-arg F*)U169  $\phi$ 80*lacZ M15 F<sup>-</sup>  $\lambda$ <sup>-</sup>) – výrobce Clontech*

### 3.1.2. Plazmidy

#### pDG1661

Plazmid získaný z Bacillus Genetic Stock Center, Ohio University, USA. (BGSC No. ECE112)

Plazmid pDG1661 se využívá jako integrační vektor určený pro sledování aktivity promotorů genů *Bacillus subtilis* (GUEROUT-FLEURY *et al.* 1996). Sledovaný promotor je vložen do polyklonovacího místa, které se nachází před genem *lacZ* (pocházející z *E.coli*) a ribozom vazebným místem z genu *spoVG* *Bacillus subtilis*. Takto vzniklý konstrukt se integruje do chromozómu *Bacillus subtilis* dvojitým crossing-overem prostřednictvím fragmentu genů *amyE*, které jsou součástí plazmidu pDG1661, do genu *amyE* uloženém v chromozomu *Bacillus subtilis*. Na takto připraveném kmeni můžeme stanovit míru exprese  $\beta$ -galaktosidázy, která je produktem genu *lacZ*, a její hladina odráží míru exprese studovaného promotoru (tedy i daného genu), který byl do plazmidu pDG1661 klonován.



**Obr. 3.1: plazmid pDG1661**

*amyE'*...*'amyE* – 5' a 3' koncové segmenty z genu *amyE* z *Bacillus subtilis* 168

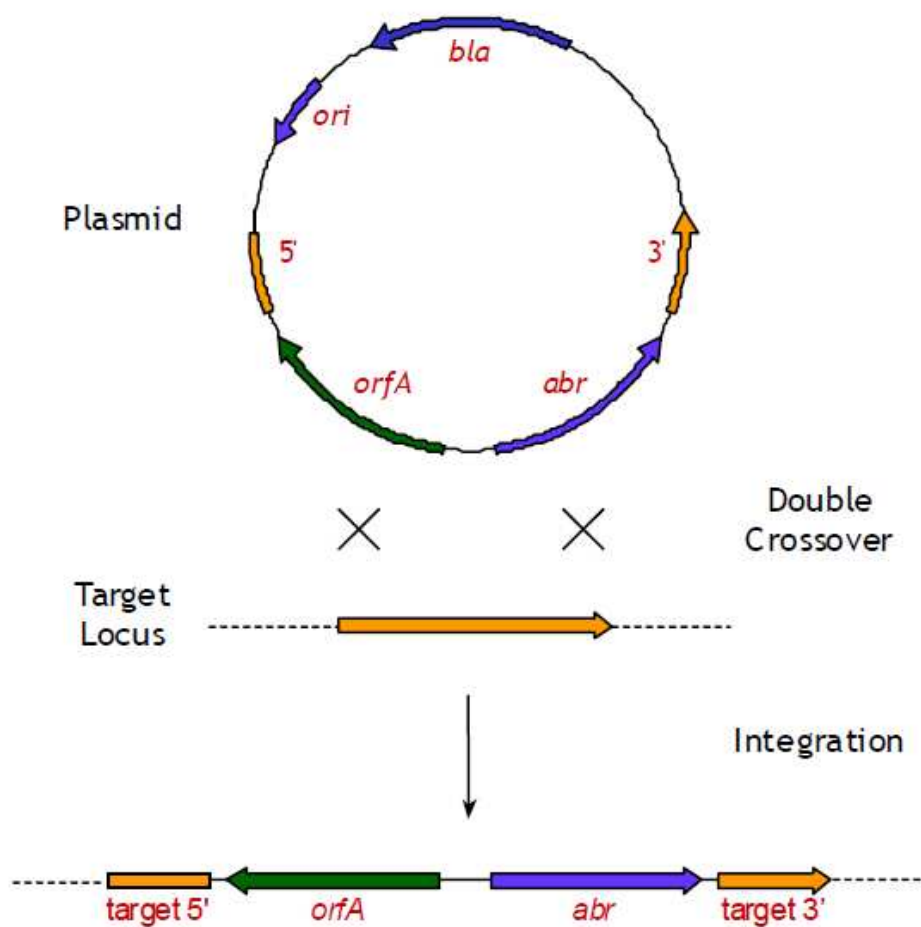
*spoVG-lacZ* – gen kódující  $\beta$ -galaktosidázu *lacZ* pocházející z *Escherichia coli*,  
sfúzovaný s ribozom vazebným místem genu *spoVG* z *Bacillus subtilis*

*cat* – gen kódující enzym cholaramfenikol-acetyltransferázu, který je selektivně  
v *Bacillus subtilis*, nebo v *Escherichia coli* (chloramfenikol 5  $\mu$ g/ml)

*spc* – gen kódující enzym spektinomycin-adenyltransferázu, který je selektivně  
v *Bacillus subtilis*, nebo v *Escherichia coli* (spektinomycin 100  $\mu$ g/ml)

*bla* – gen kódující enzym  $\beta$ -laktamázu, který je selektivně v *Escherichia coli*  
(ampicilin 50  $\mu$ g/ml)

Převzato z (GUEROUT-FLEURY *et al.* 1996)



**Obr. 3.2:** Schéma integrace plazmidu pDG1661 do chromosomu *Bacillus subtilis* (převzato z <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>)

Integrace vektoru dvojitým crossing-overem do cílového místa na chromozomu, chromozomálního genu *amyE* u *Bacillus subtilis*. Převzato z (GUEROUT-FLEURY *et al.* 1996)



### 3.1.3. Primery pro PCR

Název	Sekvence primeru (5' → 3')	restrikční místo	T <sub>mA</sub> /T <sub>mB</sub> (°C)
ctcR	TTTAGGATCCCGAGTAAAGTCCGTTCTTCTT	BamHI	60,5/51,1
ctcF	CATAGAATTCCCATTTTTTCGAGGTTTAAATCCTT	EcoRI	58,4/48,1
mutSL_F1	GGGAGATCCTGAAGAATAAAA	-	48,5
mutSL_R1	GATATTCATCAAGCTTTTGATTATA	-	48
mutSL_F2	CAAGGAACGTGCAAAGC	-	47
mutSL_R2	TACATTCATTCATCGCTTC	-	47
mutSL_F3	GCCGGCTGAAACACCA	-	48,5
mutSL_R3	TAGGAGGAGCATCAAATTGG	-	49,7
mutSL_F4	TGATGAAAAGCCTCCGGA	-	48,7
mutSL_R4	ACCGTTTCTTATAATCTGACAC	-	49,2

#### Tabulka 1: Použité primery

Podtržená část označuje restrikční místo, sekvence komplementární k templátu je označena šedě.

Teplota T<sub>mA</sub> označuje teplotu tání celého primeru. Teplota T<sub>mB</sub> označuje teplotu tání pouze části komplementární s templátem.

### 3.1.4. Chemikálie

Název	Výrobce
agar	Oxoid
agaróza	Merck
β merkaptoethanol	Serva
ethanol	Lachema
ethidium bromid	Sigma
glukóza	Merck
glycerol	Sigma
chloroform	Sigma

KCl	Lachema
KI	Lachema
kvasniční autolyzát	Oxoid
jód	Lachema
LiCl	BDH
MgCl <sub>2</sub>	BDH
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Lachema
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Lachema
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Lachema
NaCl	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Lachema
NaOH	BDH
ONPG (ortho-nitrofenyl-β-D-galaktosid)	Serva
škrob	Lachema
Triton X100	Serva
PMSF (fenylmethylsulfonyl fluorid)	Sigma
dNTP mix (směs deoxyribonukleotidfosfátů)	Fermentas
DNA Loading Dye 6x	Fermentas
Trypton	Oxoid
(NaH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lachema
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Lachema
Citrát sodný	Lachema
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Lachema
MgCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Lachema
izopropanol	Lach-ner
EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina)	Lachema
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Fluka

### 3.1.5. DNA standard

- GeneRuler<sup>Tm</sup> DNA Ladder mix, 100-10 000 bp (Fermentas)

### 3.1.6. Antibiotika

Název	Zásobní roztok	koncentrace v médiu	Výrobce
ampicilin	100mg/ml	50 µg/ml	Fluka
chloramfenikol	35 mg/ml (ethanol)	0,5 µg/ml	Roth
kyselina nalidixová	30 mg/ml (300 mM NaOH)	20 µg/ml	Sigma
rifampicin	10 mg/ml	50 µg/ml	Fluka
spektinomycin	50 mg/ml	10 µg/ml	Fluka
streptomycin	300 mg/ml	300 µg/ml	Galenica

Zásobní roztoky s antibiotikem byly sterilizovány filtrací a uchovávány při teplotě - 20°C. V případě přípravy pevných agarových půd byla antibiotika přidávána do médií zchlazených na 50°C.

### 3.1.7. Enzymy

Název	Výrobce
BamHI	Fermentas
BstEII	Fermentas
EcoRI	Fermentas
lysozym	Fluka
proteináza K	Sigma
ribonukleáza A	Sigma
SacI	Fermentas
Taq DNA polymeráza	Fermentas
T4 DNA ligáza	Fermentas

### **3.1.8. Komerční sady**

MasterPure<sup>™</sup> Gram Positive DNA Purification Kit ( Epicentre Biotechnologies)

Pro izolaci chromozomální DNA

### **3.1.9. Kultivační média**

Kultivace bakteriálních kultur byla prováděna na komplexních pevných a tekutých médiích. Tato média byla před použitím sterilizována 20 minut v autoklávu. Sterilizace probíhala při teplotě 120 °C za přetlaku vodní páry 0,15 MPa. V případě pevných médií byl před sterilizací přidán agar na 2 % (w/v).

#### **3.1.9.1. Pevná kultivační média**

##### Luria-Bertani medium (LB)

1 % (w/v) trypton

0,5 % (w/v) kvasničný autolyzát

0,17 M NaCl

Destilovaná voda

Pomocí 1 M NaOH upraveno pH na 7,0.

2 % (w/v) agar

##### LB s antibiotikem

K LB médiu bylo přidáno antibiotikum na konečnou koncentraci uvedenou v tabulce.

**(Kap. 3.1.6)**

##### LB s glukózou (LB<sub>glu</sub>)

1000 ml LB

20 ml 50 % glukózy

LB se škrobem

1000 ml LB

10 ml škrob

**3.1.9.2. Tekutá kultivační media**

Luria-Bertrani médium (LB)

10 g trypton

5 g kvasniční autolyzát

10 g NaCl

Destilovaná voda

Pomocí 1 M NaOH upraveno pH na 7,0

Objem doplněn na 1 litr

LB s glukózou (LBG)

100 ml LB médium

2 ml 50 % (w/v) glukóza

LBG s 1M NaCl

25 ml LBG

1,2 g NaCl

LBG s 3 % ethanolem

25 ml LBG

0,75 ml ethanol

LBG s 0,009 % detergentem

25 ml LBG

230 µl 1 % triton

LBG 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,0)

2,5 g trypton

1,25 g Yeast extrakt

2,5 g NaCl

1,95 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
200 ml vody  
pH upraveno NaOH nebo HCl

LBG 0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,5)

2,5 g tryptonu  
1,25 g Yeast extrakt  
2,5 g NaCl  
2,23 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
200 ml vody  
pH upraveno NaOH nebo HCl.

**3.1.9.3. Média pro přípravu kompetentních buněk *Bacillus subtilis*:**

10 x báze Média A

10 g kvasničný autolyzát  
2 g kyselý autolyzát kaseinu  
Destilovaná voda (doplnit na 900 ml)  
Po sterilizaci v autoklávu přidat 50 % glukózu na 5 % koncentraci v médiu

10 x „Bacillus salts“

20 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
183 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
60 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
10 g dihydrát citrátu trisodného  
2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
Destilovaná voda (doplnit na 1 liter)

Médium A

81 ml sterilní destilovaná voda  
10 ml 10 x báze média A  
9 ml 10 „Bacillus salts“

### Médium B

10 ml médium A

0,1 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

0,1 ml MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

### **3.1.9.4. Média pro přípravu kompetentních buněk *Escherichia coli* na šokovou transformaci**

#### Médium I

LB médium

10 mM MgSO<sub>4</sub>

0,2 % glukóza

#### Médium II (pro uchování buněk)

LB médium

36 % glycerin

12 % PEG 800

12 mM MgSO<sub>4</sub>

pH upraveno na 7,0

sterilizace filtrací

### **3.1.10. Roztoky**

#### **3.1.10.1. Roztoky pro stanovení β-galaktosidázové aktivity**

##### Z-pufr

6,3 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

0,74 g KCl

0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

10,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

1000 ml destilovaná voda

V den použití bylo ke 250 ml Z-pufru přidáno 0,875 ml merkaptoethanolu a 2,5 ml 1M MgSO<sub>4</sub>

Roztok ONPG

120 mg ONPG

30 ml Z-pufr

Roztok s lysozymem

0,2 ml PMSF (17 mg/ml v izopropanolu)

50 mg lysozym

100 ml Z-pufr

Roztok 10 % tritonu

0,1 ml 100 % triton

0,9 ml sterilní destilovaná voda

Roztok Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

27,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

250 ml destilovaná voda

**3.1.10.2. Roztoky pro horizontální gelovou elektroforézu**

50 x TAE pufr

36,3 g Tris

8,57 ml ledová kyselina octová

Destilovanou vodou doplněno na objem 135 ml

15 ml 0,5 M EDTA

1 x TAE pufr – elektrodový pufr

20 ml 50 x TAE

1000 ml destilovaná voda



### Agarózový gel

0,35 g agaróza

0,7 ml 50 x TAE pufr

Doplněno destilovanou vodou na 35 ml

Přivedeme k varu

2,5  $\mu$ l 1 % (w/v) etidium bromid

### **3.1.10.3.      Roztoky pro izolaci plazmidové DNA**

#### Roztok č. 1

0,6 g Tris

1,8 g glukóza

0,74 g Na<sub>2</sub>EDTA

180 ml destilovaná voda

pH upraveno pomocí 1 M HCl na hodnotu 8,0

doplněno destilovanou vodou na 200 ml

Sterilizace autoklávem

Roztok uchováván při 4 °C

#### Roztok č. 2

0,2 M NaOH

1 % (w/v) SDS

Připraveno v destilované vodě

Připravuje se čerstvý v den použití

#### Roztok č. 3

81,6 g acetát sodný

pH upraveno pomocí ledové kyseliny octové na 4,8

Doplněno destilovanou vodou do 200 ml

Sterilizace autoklávem

Roztok uchováván při laboratorní teplotě

### 3.1.11. Počítačové programy a internetové databáze

<http://bacillus.genome.jp> – BSORF – Databáze genomu *Bacillus subtilis*.

<http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf> - Katalog obsahující integrační vektory, které se používají pro rod *Bacillus* a metody umožňující jejich využití. Umístěn na stránkách Bacillus Genetic Stock Center.

[http://www.biophp.org/minitools/melting\\_temperature/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php) - Stránky pro určení teplot tání používaných primerů.

Chromas – Program pro vyhodnocení dat ze sekvenační analýzy.

### 3.1.12. Přístroje a laboratorní zařízení

#### Kultivační zařízení

Vzdušná třepačka NB-205 (N-BIOTEK)

Vzdušná třepačka Orbi-Safe (Gallenkamp)

Vodní třepačka C76 (New Brunswick Scientific)

Termostat (Memert)

#### Centrifugy

Minispin (Eppendorf)

Mikro 22R (Hettich)

Mikro 20 (Hettich)

centra CL3R (IEC)

#### Ostatní

Spektrofotometr DU Series 530 (Beckman)

Spektrofotometr Helios  $\gamma$  (Helios)

PCR cykler MasterCycler (Eppendorf)

Zdroj pro elektroforézu EC 250-90 (E-C Apparatus Corporation)

UV box Laminar Flow Cabinet (ESCO)

Vodní lázeň (Julabo)

Termoblok Dry Bath Incubator (Major Science)

Analytické váhy Explorer<sup>TM</sup> Pro EP214CM (Ohaus)

### **3.2. Metody**

#### **3.2.1. Práce s bakteriální kulturou**

##### **3.2.1.1. Kultivace bakterií v tekutém médiu**

Bakterie byly kultivovány v komplexních médiích v Erlenmayerových baňkách. Z důvodu zajištění potřebné aerace nesměl objem média převyšovat 1/10 objemu baňky. Rostoucí kultury byly pěstovány ve vzdušných nebo vodních třepačkách při teplotách 45 °C, 37 °C a 28 °C. Frekvence otáček byla zvolena dle použité třepačky. 200 RPM v případě vzdušné třepačky Orbi-safe a 210 RPM při kultivaci ve vodní třepačce a vzdušné třepačce NB-205.

##### **3.2.1.2. Kultivace bakterií na pevném médiu**

Bakterie byly kultivovány v Petriho miskách na agových půdách s komplexním kultivačním médiem. V případě potřeby antibiotikové selekce bylo k médiu přidáno antibiotikum (**Kap 3.1.6.**). Pro účely diagnostické byl k médiu přidán škrob (**Kap. 3.1.9.1.**). Kultivace probíhaly v termostatu při teplotě 37 °C.

V případě oživení kultur z bakteriální konzervy byly bakteriální spory masivně rozočkovány sterilní mikrobiologickou kličkou. Bakteriální suspenze byla roztírána na agarové půdy sterilní „hokejkou“. Na nové kultivační půdy byly kolonie přenášeny pomocí sterilního párátko nebo metodou „replica plating“.

### **3.2.1.3. Uchovávání bakteriálních kultur**

Pro krátkodobé uchovávání byly bakteriální kultury, na pevném kultivačním médiu v Petriho miskách udržovány při 4 °C a uzavřeny proti úniku vlhkosti. Dlouhodobě byly bakteriální buňky uchovávány ve formě suspenze smíšené s glycerolem na koncentraci 20 % (v/v) v -70 °C.

### **3.2.1.4. Měření optické denzity bakteriální kultury**

Optická denzita (OD) bakteriální kultury byla měřena v průběhu kultivace v tekutém kultivačním mediu pomocí spektrofotometru. Pro sledování růstu kultury a tvorbu růstové křivky byla zvolena vlnová délka 450 nm ( $OD_{450}$ ) v případě měření aktivity  $\beta$ -galaktosidázy byla vlnová délka 595 nm ( $OD_{595}$ ). Pro odstranění chyby vlivem barevného pozadí byla od výsledné OD odečítána OD sterilního LB média.

### **3.2.1.5. Růstová křivka *Bacillus subtilis***

- Kolonie *Bacillus subtilis* byly ze zásobní LB půdy přeneseny do tekutého kultivačního LBG média. Kultura byla kultivována přes noc, přibližně 13 hodin, při 37 °C.
- Narostlá kultura byla přeočkována do 25 ml vytemperovaného LB media tak, aby se  $OD_{450}$  rovnala 0,05.
- Kultivace probíhala za dostatečné aerace při 37 °C.
- Ve 20 minutových intervalech byla měřena  $OD_{450}$  kultury až po dosažení stacionární fáze.

### **3.2.1.6. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidázy**

Pracovní postup byl přejet z protokolu na stránkách Bacillus Genetic Stock Center <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf> a částečně upraven.

### Kultivace a odběr vzorků

- Příslušný kmen *Bacillus subtilis* byl vyset na agarové LB<sub>cat</sub> plotny a nechán růst přes noc, přibližně 18 hodin, při 37 °C.
- Bylo zaočkováno 50 ml LBG<sub>cat</sub>. Množství bakteriální biomasy bylo přibližně takové, aby se výsledná OD<sub>595</sub> = 0,1
- Bakteriální kultura byla kultivována za dostatečné aerace při 37 °C až do OD<sub>595</sub> = 0,3.
- 1 ml kultury byl přenesen do 50 ml LBG<sub>cat</sub>.
- Po dosažení OD<sub>595</sub> = 0,1 začal odběr vzorků
- 0,2 – 1 ml kultury (podle optické denzity) byly odebírány ve stanovených intervalech do mikrozkuvek.
- Buňky byly suspendovány centrifugací, podobu 10 minut při 15 000 RPM a odstraněn supernatant.
- Sedimentovaný buněčný pelet byl ihned šokově zmražen v tekutém dusíku a dále uchováván při teplotě -20 °C.

### Zpracování vzorků a stanovení enzymatické aktivity

- Buněčný pelet byl důkladně resuspendován v 1 ml Z-pufu s lysozymem a uchováván na ledu.
- 100 µl této suspenze bylo přeneseno do 0,7 ml Z-pufu s lysozymem a promícháno.
- Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 15 minut (po 5 minutách byla suspenze promíchávána).
- Bylo přidáno 8 µl 10 % tritonu, důkladně promícháno a inkubováno 5 minut na ledu.
- Suspenze byla přenesena do vodní lázně a temperována 5 minut při 30 °C.
- Detekovatelná reakce byla odstartována přidáním 0,2 ml Z-pufu s ONPG a zaznamenán čas.
- Inkubace pokračovala na vodní lázni při 30 °C do mírného zežloutnutí.
- Reakce byla zastavena přidáním 0,4 ml 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a zaznamenán čas ukončení reakce.
- Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 420 nm. Pro korekci barevného pozadí sloužil reagující roztok bez buněčné suspenze
- Buněčná koncentrace β-galaktosidázy byla vypočítána podle vztahu:

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

T – značí celkový čas enzymatické reakce od přidání Z-pufu s ONPG po přidání 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (minuty)

V – značí objem odebrané kultury (ml)

### 3.2.1.7. Stanovení mutační rychlosti

- Kmen *Bacillus subtilis* 168 byl vyset na agarovou LB plotnu a nechán růst přes noc, přibližně 13 hodin, při 37 °C.
- Většina narostlých kolonií byla přenesena do tekutého LB média a vložena do vzdušné třepačky na 30 minut (V případě přítomnosti stresoru byla kultura takto kultivována 2 hodiny).
- 10 µl této kultury bylo naředěno v 1 ml LBG média.
- Několik µl takto naředěné kultury bylo přepipetováno do 25 ml LB média tak, aby výsledný počet buněk byl na začátku kultivace přibližně 10<sup>4</sup> (v případě kultivace za stresových podmínek byl v LB médiu přítomen stresor).
- Kultivace probíhala těsně pod začátek stacionární fáze, přibližně do OD<sub>450</sub> = 1
- Narostlá kultura byla zcentrifugována a supernatant odstraněn.
- Veškeré sedimentované buňky byly přeneseny na agarovou kultivační půdu LB<sub>rif</sub>.
- Plotny byly kultivovány 48 hodin při 37 °C.
- Narostlé kolonie byly spočítány a mutační rychlost vypočítána podle vztahu:

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

$$2. \quad \mu = 2^k \div B$$

M – celkový počet mutantů v kultuře

B – celkový počet buněk v kultuře

k – hodnota vyjádřená z první rovnice (odpovídá počtu generací, po které vznikali mutanti) výpočet viz (NUNVÁŘ 2009)

$\mu$  – mutační rychlost

### 3.2.1.8. Izolace mutátorových kmenů

- Kmen *Bacillus subtilis* 168 byl vyset na agarovou LB plotnu a nechán růst přes noc, přibližně 13 hodin, při 37 °C.
- Většina narostlých kolonií byla přenesena do tekutého LB média s přítomným stresorem a vložena do vzdušné třepačky na 2 hodiny
- 10  $\mu$ l této kultury bylo naředěno 10 000 x.
- 50  $\mu$ l takto naředěné kultury bylo přepipetováno do 25 ml LB média s příslušným stresorem.
- Kultivace probíhala do dosažení  $OD_{450} = 1 - 1,5$ .
- Narostlá kultura byla zcentrifugována a supernatant odstraněn.
- Veškeré sedimentované buňky byly přeneseny na agarovou kultivační půdu  $LB_{rif}$ .
- Plotny byly kultivovány 48 hodin při 37 °C.
- 100 narostlých kolonií bylo přečárkováno na  $LB_{glu}$
- Kultivace do druhého dne při 37 °C.
- Narostlé kolonie byly přerazítkovány na  $LB_{nal}$  a  $LB_{str}$ .
- Kultivace 48 hodin při 37 °C.
- V případě nárůstu kolonií byl mutátor ověřen opětovným přečárkováním na  $LB_{glu}$  a následným přerazítkováním na  $LB_{nal}$  a  $LB_{str}$ .

### 3.2.1.9. Výpočet korekčního faktoru přežití

- Kmen *Bacillus subtilis* 168 byl vyset na agarovou LB plotnu a nechán růst přes noc, přibližně 13 hodin, při 37 °C.
- Několik narostlých kolonií bylo přeneseno do 25 ml LBG a kultivováno 30 minut za dostatečné aerace.

- 25  $\mu$ l této kultury bylo přeneseno do 25 ml LBG (v případě měření přežití za stresu je přítomen stresor).
- Po dosažení  $OD_{450} = 0,15 - 0,3$  bylo odebráno 10  $\mu$ l této kultury a přeneseno do mikrozkuhavky s 1 ml LB média (pokud potřeba, s patřičným stresorem) a důkladně promícháno.
- Z této mikrozkuhavky byl odebrán 1  $\mu$ l a přenesen do nové mikrozkuhavky s 1 ml LB média a vše důkladně promícháno.
- Z mikrozkuhavky bylo odebráno 100  $\mu$ l suspenze a rozetřeno na agarovou LB plotnu.
- Kultivace přes noc při 37 °C.
- Narostlé kolonie byly spočítány a vypočítán korekční faktor přežití podle vztahu:

$$1. \quad B = (K \times 10^5) \div OD$$

$$2. \quad KF = B \div 4 \cdot 10^4$$

B – počet buněk v 1 ml kultury o hypotetické  $OD_{450} = 1$

K – počet narostlých kolonií

OD – naměřená optická denzita kultury

KF – korekční faktor přežití

### 3.2.1.10. Příprava kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

Pracovní postup byl přejat z protokolu na stránkách Bacillus Genetic Stock Center <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf> a částečně upraven.

- Kmen *Bacillus subtilis* byl vyset na agarové LB plotny a nechán růst přes noc, přibližně 18 hodin, při 37 °C.
- Několik kolonií bylo přeneseno do 10 ml média A a kultivováno za dostatečné aerace při 37 °C. Pomocí spektrofotometru byla v průběhu růstu měřena optická denzita při 650 nm ( $OD_{650}$ ).
- Po dosažení  $OD_{650} = 0,5 - 0,6$  byla kultura kultivována ještě dalších 90 minut.



- Po 90 minutové kultivaci bylo přeneseno 0,5 ml této kultury do 4,5 ml vytemperovaného média B.
- Kultivace probíhala dalších 90 minut při 37 °C za dostatečné aerace.
- Vyrostlé buňky byly zakoncentrovány centrifugací, odstraněn supernatant a sedimentované buňky byly resuspendovány na objem 200 µl a přeneseny do mikrozkušavky s 200 µl 40 % glycerolu.
- Další uchování možné při -70 °C.

### 3.2.1.11. Transformace kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

- Ke kompetentním buňkám v mikrozkušavce (**Kap. 3.2.1.10**) byl přidán 1 µl transformující plazmidové DNA.
- Buňky byly inkubovány 30 minut při 37 °C.
- Po inkubaci byl přidán 1 ml LB média.
- Inkubace 30 minut při 37 °C.
- Obsah mikrozkušavky byl zakoncentrován centrifugací a odebráno 800 µl supernatantu. Ve zbylém objemu byly buňky resuspendovány.
- 100 µl kultury bylo vyseto na agarovou LB plotnu s chloramfenikolem (LB<sub>cat</sub>).
- Kultivace v termostatu do druhého dne při 37 °C.

### 3.2.1.12. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro šokovou transformaci

- Buňky *Escherichia coli* DH5a získané z jedné kolonie narostlé přes noc na pevném LB médiu byly přeneseny do 10 ml LB média.
- Kultivace přes noc při 37 °C za dostatečné aerace.
- 500 µl této kultury bylo přeneseno do 50 ml média I.
- Kultivace při 37 °C, za dostatečné aerace až do OD<sub>600</sub>= 0,3 – 0,4.
- Kultura byla přelita do předchlazené plastové zkumavky a zchlazena 20 minut na ledu.
- Centrifugace 1500 RCF, 10 minut, 4 °C.

- Byl odstraněn supernatant a pelet resuspendován v 500  $\mu$ l zchlazeného média I.
- Poté bylo přidáno 2,5 ml média II
- Suspenze bakterií byla rozpipetována po 200  $\mu$ l aliquotech do mikrozkušavek a uchována k dalšímu použití v  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 3.2.1.13. Šoková transformace kompetentních buněk *Escherichia coli*

- Ke kompetentním buňkám *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  bylo přidáno 100 ng – 1  $\mu$ g DNA.
- Inkubace 20 – 30 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Inkubace 1,5 – 2 minuty při  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Inkubace 5 – 10 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- K takto zchlazeným buňkám byl přidán 1 ml tekutého LB média.
- Inkubace 40 – 60 minut při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugace a částečné odstranění supernatantu pro zakoncentrování buněk.
- Buňky byly poté vysety na LB<sub>amp $i$</sub>  a kultivovány přes noc.

## 3.2.2. Práce s bakteriální DNA

### 3.2.2.1. Izolace a precipitace chromozomální DNA

Izolace a následná precipitace chromozomální DNA byla prováděna u *Bacillus subtilis* s využitím komerční sady MasterPure<sup>TM</sup> Gram Positive DNA Purification Kit. Postup práce byl dodržován dle přiloženého protokolu. Vyizolovaná DNA sloužila pro ověření správnosti integrace rekombinantního plazmidu do bakteriálního chromozomu.

### 3.2.2.2. Izolace plazmidové DNA

Protokol pro izolaci plazmidové DNA byl přejet z Genetics Analysis of Pathogenic Bacteria, a laboratory manual, S. R. Maloy. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1996.

- 1 kolonie bakterií byla přenesena do 2 ml LB média s příslušným antibiotikem.
- Kultivováno při 37 °C, za dostatečné aerace až do saturace kultury.
- Zakoncentrování buněk centrifugací v mikrozkuhavce, 13 000 RPM po dobu 30 s.
- Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 0,1 ml roztoku č. 1 **(Kap. 3.1.10.3)**
- Bylo přidáno 0,2 ml roztoku č. 2 s ribonukleázou A, mírně promícháno převrácením zkumavky a 5 minut inkubováno na ledu.
- Bylo přidáno 0,15 ml roztoku č. 3 a opět promícháno stejným způsobem.
- Centrifugace pro sedimentaci vzniklé sraženiny, 14 000 RPM, 5 minut.
- 0,4 ml supernatantu obsahujícího plazmidovou DNA bylo přeneseno do čisté mikrozkuhavky.
- K plazmidové DNA bylo přidáno 0,8 ml ledového 96 % etanolu.
- Precipitace 30 minut při -20 °C.
- Centrifugace 14 000 RPM, 10 minut při 4 °C.
- Supernatant byl odstraněn a sedimentovaný pelet propláchnut přidáním 0,5 – 1 ml 70 % etanolu, následnou centrifugací a odstraněním etanolu.
- Pelet byl 30 minut sušen na vzduchu a rozpouštěn 1 hodinu v 50 µl TE pufru.
- Promícháno s 50 µl 5 M LiCl.
- Inkubace 10 minut na ledu.
- Sedimentace precipitátu centrifugací 14 000 RPM, 5 minut při 4 °C.
- 100 µl supernatantu bylo odebráno do čisté mikrozkuhavky a přidáno 0,2 ml ledového 96 % ethanolu.
- Precipitace probíhala minimálně 60 minut při - 20 °C.
- Vzniklý precipitát byl sedimentován centrifugací 10 minut, 14 000 RPM při 4 °C.
- Supernatant byl odstraněn a pelet propláchnut přidáním 1 ml 70 % ethanolu, následnou centrifugací a odstraněním ethanolu.

- Pelet byl sušen 30 minut na vzduchu.
- Následně rozpouštěn 1 hodinu v 0,05 ml TE pufru a uchováván při -20 °C.

### 3.2.2.3. Čištění DNA chloroformovou precipitací

Chloroformová precipitace se provádí pro odstranění pufru po PCR reakci. Dále také pro odstranění buněčných membrán, bílkovin a inaktivaci DNáz, Precipitace umožní další efektivnější manipulaci s čistou bakteriální DNA.

- Vzorek DNA byl naředěn 160  $\mu$ l deionizované vody a 200  $\mu$ l chloroformu.
- Vše bylo protřepáno a centrifugováno.
- Poté byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující DNA a přenesena do čisté mikrozkušavky.
- Byla přidána 1/10 objemu 5 M LiCl a dvojnásobek objemu 96 % ethanolu.
- Vlastní precipitace probíhala 20 – 30 minut při teplotě -20 °C.
- Centrifugace 10 minut při 4 °C a 14 000 RPM.
- Supernatant byl důkladně odstraněn a pelet propláchnut přidáním 1 ml 70 % ethanolu, následnou centrifugací a odstraněním ethanolu.
- Vzorek v mikrozkušavce byl vysušen v exsikátoru a resuspendován ve 25  $\mu$ l deionizované vody.

### 3.2.2.4. Polymerázová řetězová reakce

PCR byla prováděna v PCR cykleru VWR Collectio Thermal Cycler DOPPIO v PCR v tenkostěnné PCR mikrozkušavce.

#### Složení reakční směsi

složka	množství
10 x Taq pufr pro DNA polymerázu	5 $\mu$ l
dNTP mix (10 mM)	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 $\mu$ l

přímý primer (0,1 mM)	1,2 µl
reverzní primer (0,1 mM)	1,2 µl
templátová DNA	200 ng – 1 µg
Taq DNA polymeráza	2 jednotky
deionizovaná voda	doplněno na konečný objem 50 µl

Všechny složky reakční směsi byly smíchány v tenkostěnné mikrokumavce. Pro odstranění vzniklých bublinek byla směs zcentrifugována.

Po vložení mikrokumavky do PCR cykleru byl průběh reakce následující:

○ Počáteční denaturace	94 °C	3 minuty	
○ Denaturace	94 °C	1 minuta	5 cyklů
○ Nasedání primerů	$T_{m_A}$	0,5 minuty	
○ Syntéza DNA	72 °C	1 minuta / 1 kbp	
○ Denaturace	94 °C	1 minuta	30 cyklů
○ Nasedání primerů	$T_{m_B}$	0,5 minuty	
○ Syntéza DNA	72 °C	1 minuta / 1 kbp	
○ konečné prodloužení	72 °C	5 minut	

Teplota  $T_{m_A}$  označuje teplotu tání pouze části komplementární s templátem. Teplota  $T_{m_B}$  označuje teplotu tání celého primeru.

Po ukončení programu byla reakční směs zchlazena na 4 °C. V případě odlišné teploty tání přímého a reverzního primeru byla použita nižší z dvojice teplot (**Tab. 1**). Výsledek PCR reakce byl ověřen horizontální gelovou elektroforézou na agarózovém gelu.

### 3.2.2.5. Restrikční štěpení DNA

DNA byla štěpena pomocí restrikčních endonukleáz. Restrikční štěpení probíhalo v mikrozkuhavce.

#### Složení reakční směsi

<b>složka</b>	<b>množství</b>
pufr pro restrikční enzym	2 $\mu$ l
Substrátová DNA	0,1 – 1 $\mu$ g
restrikční endonukleáza	5 jednotek
deionizovaná voda	doplněno na konečný objem 20 $\mu$ l

Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 – 2 hodiny. Poté byla restrikční endonukleáza inaktivována dle pokynů výrobce a výsledek restrikční reakce byl ověřen horizontální gelovou elektroforézou na agarózovém gelu.

### 3.2.2.6. Ligace restrikčních fragmentů

Ligace restrikčních DNA fragmentů probíhala v tenkostěnných mikrozkuhavkách .

#### Složení reakční směsi

<b>složka</b>	<b>množství</b>
pufr po T4 DNA ligázu	2 $\mu$ l
vektorový plazmid	0,1 – 0,5 $\mu$ g
inzerční DNA	dvojnásobek množství molární koncentrace vektorové DNA
T4 DNA ligáza	2 jednotky
deionizovaná voda	doplněno na konečný objem 20 $\mu$ l

Všechny složky reakční směsi byly smíchány v tenkostěnné mikrozkuhavce. Pro odstranění vzniklých bublinek byla směs zcentrifugována.

Po vložení mikrozkušavky do PCR cyklu byl průběh reakce následující:

- 16 °C            50 minut
- 20 °C            3 minuty
- 24 °C            5 minut
- 37 °C            1 minuta

Po skončení reakce byla ligáza inaktivována dle pokynů výrobce. Ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* DH5a (**kap 3.2.1.13**).

### **3.2.2.7.            Horizontální gelová elektroforéza**

Horizontální gelová elektroforéza byla používána k ověření přítomnosti chromozomální DNA a jejího množství ve vzorku, nebo ke kontrole výsledků po restrikci DNA a PCR.

Byla prováděna na agarózovém gelu o koncentraci agarózy 1 % (w/v). Agaróza byla rozpuštěna v 1 x koncentrovaném TAE pufru. K vizualizaci rozdělených DNA fragmentů byl použit 1 % (w/v) roztok ethidium bromidu, který byl přidáván do roztoku rozpuštěné agarózy v poměru 1/20 000.

Vzorky DNA byly smíchány s barvicím pufrům DNA Loading Dye 6 x a naneseny do předem vytvořených jamek v agarózovém gelu spolu s identifikačním markerem. Gel byl ponořený do 1 x koncentrovaného TAE pufru. Při elektroforéze bylo využíváno stejnosměrného napětí o velikosti 5 V/cm<sup>2</sup> gelu.

### **3.2.2.8.            Sekvence DNA**

DNA byla sekvenována v laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Vzorky pro sekvenaci byly připraveny podle protokolu zveřejněného na stránkách laboratoře (<http://web.natur.cuni.cz/~seqlab/>) a výsledky této sekvenace byly vyhodnoceny programem Chromas.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Stanovení mutační rychlosti *Bacillus subtilis* 168

*Cíl: Stanovení změn mutačních rychlostí Bacillus subtilis při růstu v různých chemických a fyzikálních stresových podmínkách.*

Spontánní mutace jsou mutace, které vznikají bez přítomnosti exogenního poškozujícího agens. Patří mezi ně mutace vyvolané endogenními látkami, chybami DNA polymerázy, delece, duplikace a inserce. Většina spontánních mutací vznikajících v průběhu růstu je spojena s chybami replikace DNA. Vzhledem k tomu, že bakterie rostou exponenciálně a vznik mutací je náhodný, závisí metody pro odhad mutačních rychlostí na teoretických modelech. Pro stanovení mutační rychlosti se nejčastěji využívá jedna ze dvou metod a to mutační frekvence, nebo fluktuační analýza.

Pro určení mutační frekvence je pouze vydělen počet mutantních buněk počtem všech buněk nacházejících se v kultuře. Tato metoda je sice velice jednoduchá, ale zvyšující se mutační frekvence není aplikovatelná na výpočet mutační rychlosti, která je během růstu bakteriální populace stále stejná. Tato metoda je také vzhledem k potřebě velkého množství buněk experimentálně náročná.

Další metodou pro měření mutační rychlosti je fluktuační analýza. Tato metoda je založena na přítomnosti či absenci mutantů v kultuře. Zaměřuje se na rozložení mutantů v mnoha paralelních kultivacích vzhledem k celkovému množství buněk v dané kultuře. Na počátku kultivace se nachází v kultuře jen malé množství buněk mezi kterými se nenachází ani jeden mutant. Tato naředěná kultura se nechá růst. Na konci růstu je stanoven počet všech buněk v kultuře a všechny buňky přeneseny na selektivní médium. Mutační rychlost je stanovena dle rozložení mutantů v jednotlivých kultivacích podle Poissonova rozdělení pravděpodobnosti. Měření mutační rychlosti je zde založeno na předpokladu, že buňka bude udržovat vzniklou mutaci během celého svého růstového cyklu (ROSCHE a FOSTER 2000).

V této práci je použita metoda založená na jednoduchém principu spočívajícím v akumulaci mutantů v bakteriální kultuře, která byla vyvinuta a ověřena v předchozí diplomové práci Mgr. J. Nunváře. Tato metoda je založena na teoretickém modelu



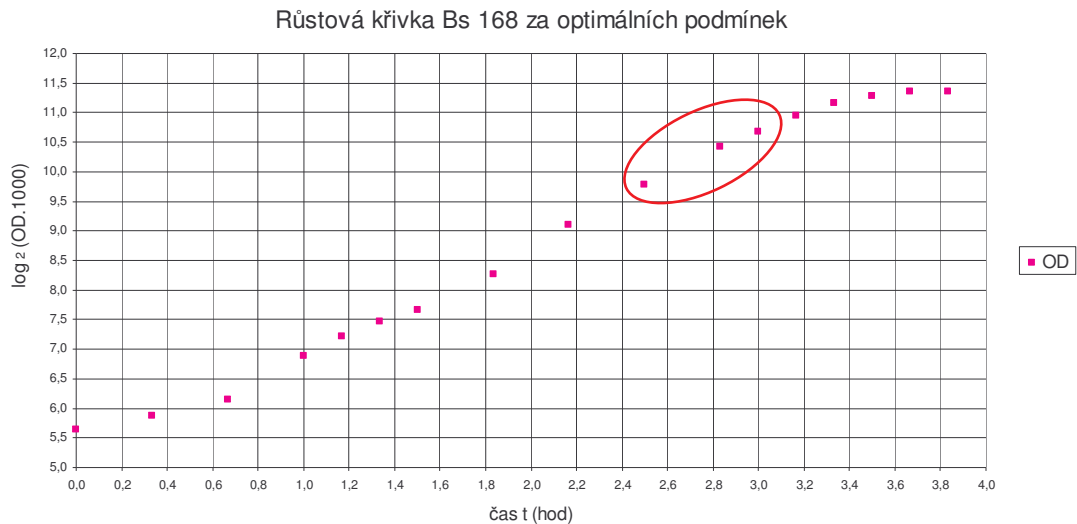
akumulace mutantů v rostoucí bakteriální kultuře, za předpokladu, že se na začátku kultivace nenachází ani jeden mutant. Poté co kultura dosáhne takového počtu buněk, které odpovídá frekvenci vzniku mutací, dochází k objevení mutantní buňky v populaci. Další mutantní buňky přibývají v populaci lineárně. Vznikají nově, nebo množением již vzniklých mutantů (NUNVÁŘ 2009).

K tomu aby tato metoda byla aplikovatelná i pro kultivace za stresových podmínek, je důležité, aby měla kultivace stejné růstové parametry jako při růstu za optimálních podmínek (**Kap. 4.1.2.**).

#### **4.1.1. Růstové parametry kultury za optimálních podmínek**

Pro určení ideální OD pro ukončení kultivace byla proměřena růstová křivka *Bacillus subtilis* 168. Důležitým faktorem bylo dosažení co největší koncentrace bakterií, ale kultura se ještě nesměla nacházet ve stacionární fázi. Buněčné procesy probíhající v této fázi by mohly interferovat s procesy probíhajícími pouze z důvodu stresování bakteriální kultury a naměřené výsledky by byly nerelevantní.

Růstová křivka byla měřena v LBG médiu při 37 °C (**Kap. 3.2.1.5**). Tyto podmínky kultivace byly zvoleny jako optimální. Vzorky pro měření OD byly odebírány pravidelně v intervalu po 20 minutách. Odběry byly zahájeny ihned po přenesení kultury z noční kultivace na pevném LB médiu do tekutého kultivačního LBG média pro zachycení doby po kterou se buňky nacházejí v lag fázi. Kultivace a odběr vzorků byly ukončeny ve stacionární fázi růstu bakteriální kultury. Z obrázku 4.1 vyplývá, že optimální rozmezí OD pro odběr vzorků je 0,9 – 1,5 kdy se kultura nachází těsně před přechodem z exponenciální do stacionární fáze růstu.



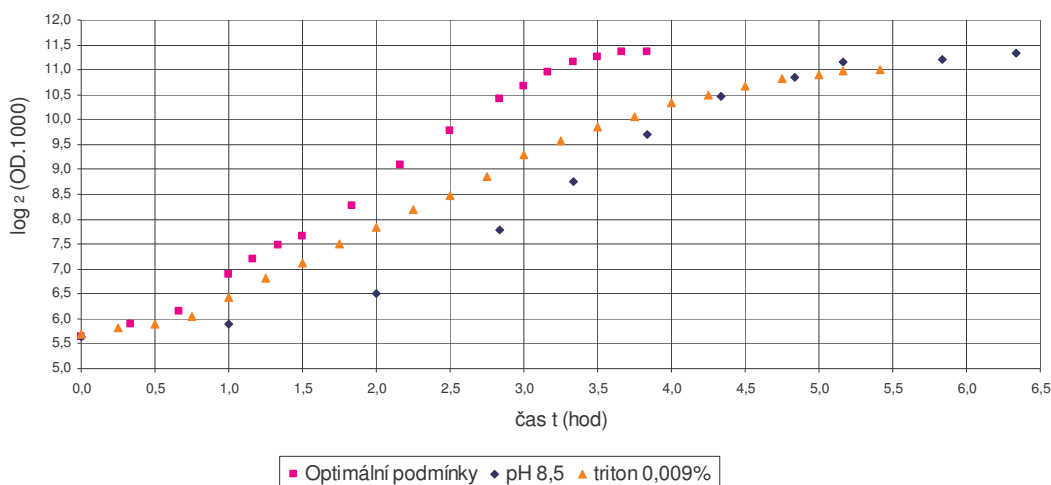
**Obr. 4.1: Růstová křivka *Bacillus subtilis* 168 za optimálních podmínek.**

Označeno je rozmezí OD<sub>450</sub> ideální pro měření mutační rychlosti.

#### 4.1.2. Růstové parametry kultury v přítomnosti stresoru

Stejným postupem jako u nestresované kultivace byly proměřeny růstové křivky i za stresových podmínek. Na obrázku 4.2 je velice dobře patrné, že tvar růstové křivky vlivem stresových podmínek pozměněn není. Buňky se nacházejí u konkrétní OD ve stejné fázi růstu jak v přítomnosti stresoru, tak za optimálních podmínek. Odběry tedy mohou být prováděny v rozmezí stejných OD ve všech kultivacích. Výrazná změna je pozorována pouze v růstové rychlosti. Doba zdvojení buněk je oproti optimálním podmínkám výrazně prodloužena, ale pro každý stres je přesto mírně odlišná. Růstové křivky byly proměřeny u všech používaných stresů. V grafu jsou uvedeny pro přehlednost pouze křivky naměřené při kultivaci v médiu s pH 8,5 a v přítomnosti 0,009 % tritonu.

Růstová křivka *Bacillus subtilis* 168 za optimálních podmínek, při pH 8,5 a v přítomnosti detergentu



**Obr. 4.2: Porovnání rychlosti růstu za stresových podmínek**

Průběh růstu u vybraných stresových podmínek v porovnání s růstem v optimálních podmínkách. Odběry pro měření průběhu růstové křivky jsou zahájeny v  $OD_{450} = 0,05$ . Kultura se nachází v lag fázi růstu.

Exponenciální doba zdvojení (T):

- $T_{opti} = 25$  min
- $T_{pH\ 8,5} = 34$  min
- $T_{triton} = 45$  min

#### 4.1.3. Stanovení korekčního faktoru přežití

OD bakteriální kultury, měřená v tekutém kultivačním médiu, určuje koncentraci všech buněk nacházejících se v této kultuře. Tato metoda měření počtu buněk však nerozlišuje mezi živými a odumřelými buňkami. Tento fakt by mohl v následujícím měření výrazně zkreslit získané výsledky. Pro odstranění této interference byla využita jednoduchá metoda pro určení množství živých buněk v populaci ve vztahu k naměřené OD (**Kap. 3.2.1.9.**).

Bakteriální buňky byly kultivovány za optimálních a příslušných stresových podmínek. Po dosažení OD v rozmezí 0,15 – 0,3, kdy se již kultura nachází v exponenciální fázi růstu, byla část kultury naředěna v mikrozkuhavce vytemperovaným stresovým médiem a alikvóty přeneseny na LB plotnu. Po nárůstu

byly kolonie sečteny. Vzhledem k tomu že jedna kolonie reprezentuje jednu živou buňku z předchozí kultivace, můžeme podle naměřené OD kultury a počtu kolonií vypočítat korekční faktor živých buněk (**Tab. 2**). Tento korekční faktor upravuje původní propočty, které byly zahrnuty do vzorce pro výpočet mutační rychlosti v práci Mgr. J Nunváře (NUNVÁŘ 2009)

podmínky kultivace	OD kultury	počet buněk v jednom ml kultury při $OD_{(450)} = 1$	korekční faktor
optimální	0,310	$1,290 \times 10^7$	<b>3,10</b>
45 °C	0,237	$1,013 \times 10^7$	<b>3,95</b>
28 °C	0,143	$2,028 \times 10^7$	<b>1,97</b>
ethanol 3 %	0,380	$1,053 \times 10^7$	<b>3,80</b>
triton 0,009 %	0,279	$1,004 \times 10^7$	<b>3,99</b>
pH 5,0	0,228	$1,404 \times 10^7$	<b>2,85</b>
pH 8,5	0,205	$1,415 \times 10^7$	<b>2,83</b>

**Tab. 2: Korekční faktor**

V tabulce jsou uvedeny hodnoty získané při výsevu živých buněk. Výsevy na pevné LB médium probíhaly vždy v triplikátech. V tabulce je uvedena již hodnota střední, vycházející ze všech tří stanovení. Pro přehlednost jsou do tabulky zahrnuty jen základní hodnoty, potřebné pro výpočet korekčního faktoru.

#### 4.1.4. Měření mutační rychlosti v přítomnosti stresorů

Pro měření mutační rychlosti (**Kap. 3.2.1.7.**) bylo zvoleno kromě optimálního prostředí i několik chemických a fyzikálních stresových podmínek.

Fyzikální stresy byly reprezentovány vysokou (45 °C) a nízkou (28 °C) teplotou v průběhu růstu bakterií. Kultivace probíhala v LBG kultivačním mediu. Jako stres způsobený chemickou změnou kultivačního média byl vybrán ethanolový stres s ethanolem v 3 % koncentraci v kultivačním mediu, stres v přítomnosti

detergentu s přidavkem tritonu na konečnou koncentraci 0,009 % v kultivačním médiu a stresy způsobené změnou pH kultivačního média na pH 5,0 (kyselé stres) a pH 8,5 (zásaditý stres). Kultury byly při těchto stresech kultivovány při 37 °C.

Kultivace bakteriálních buněk probíhaly v těchto stresových médiích vždy v triplicátech pro kontrolu zjištěných výsledků. Pro porovnání byla stejným způsobem provedena i kultivace za optimálních podmínek (LBG, 37 °C).

Kolonie vyrostlé na LB<sub>rif</sub> na konci pokusu vznikly z buněk u kterých se v průběhu předchozí kultivace vytvořila rezistence na rifampicin (**Obr. 4.3**). Tyto kolonie byly spočítány a po dosažení do vzorce (**Kap. 3.2.1.7.**) vypočítána mutační rychlost (**Tab. 3**). Na výsledné mutační rychlosti byla provedena korekce faktorem přežití (tzv. korekční faktor) (**Kap. 3.2.1.9.**). Hodnoty mutačních rychlostí v určitých stresových podmínkách byly vynásobeny příslušným korekčním faktorem.



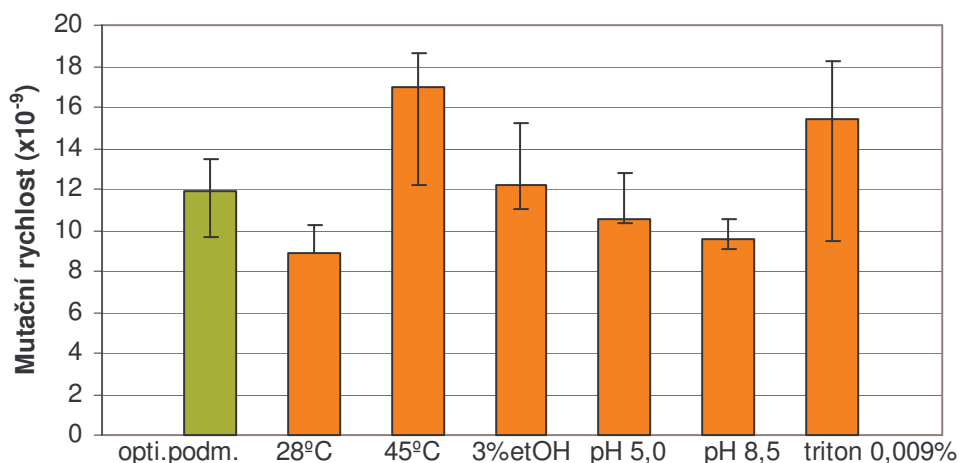
**Obr. 4.3:** Kolonie *Bacillus subtilis* 168 na LB<sub>rif</sub> (3 dny kultivace)

Ilustrační příklad nárůstu kolonií po výsevu buněk z tekutého kultivačního média. Každá kolonie reprezentuje jednu buňku, která díky mutaci získala rezistenci na selekční antibiotikum rifampicin přítomné v kultivační půdě.

podmínky	OD korigovaná	počet rifampicin rezistentních buněk	mutační rychlost	mutační rychlost po korekci KF
normální	0,932	10	$3,85 \times 10^{-9}$	$11,94 \times 10^{-9}$
normální	0,926	12	$4,35 \times 10^{-9}$	$13,49 \times 10^{-9}$
normální	0,707	7	$4,00 \times 10^{-9}$	$12,40 \times 10^{-9}$
normální	0,765	6	$3,12 \times 10^{-9}$	$9,67 \times 10^{-9}$
28°C	1,106	16	$4,55 \times 10^{-9}$	$8,96 \times 10^{-9}$
28°C	1,070	16	$4,55 \times 10^{-9}$	$8,96 \times 10^{-9}$
28°C	1,118	17	$4,34 \times 10^{-9}$	$8,55 \times 10^{-9}$
45°C	1,330	20	$4,30 \times 10^{-9}$	$16,99 \times 10^{-9}$
45°C	1,310	12	$3,10 \times 10^{-9}$	$12,25 \times 10^{-9}$
45°C	1,500	25	$4,70 \times 10^{-9}$	$18,57 \times 10^{-9}$
ethanol 3 %	0,890	7	$3,20 \times 10^{-9}$	$12,16 \times 10^{-9}$
ethanol 3 %	0,911	6	$2,90 \times 10^{-9}$	$11,02 \times 10^{-9}$
ethanol 3 %	1,380	20	$4,00 \times 10^{-9}$	$15,20 \times 10^{-9}$
pH 8,5	0,834	7	$3,40 \times 10^{-9}$	$9,62 \times 10^{-9}$
pH 8,5	0,888	9	$3,70 \times 10^{-9}$	$10,47 \times 10^{-9}$
pH 8,5	0,878	7	$3,20 \times 10^{-9}$	$9,05 \times 10^{-9}$
pH 5,0	1,098	16	$4,50 \times 10^{-9}$	$12,83 \times 10^{-9}$
pH 5,0	0,967	10	$3,70 \times 10^{-9}$	$10,55 \times 10^{-9}$
pH 5,0	1,116	12	$3,60 \times 10^{-9}$	$10,26 \times 10^{-9}$
triton 0,009 %	0,968	5	$2,38 \times 10^{-9}$	$9,50 \times 10^{-9}$
triton 0,009 %	1,027	12	$3,85 \times 10^{-9}$	$15,36 \times 10^{-9}$
triton 0,009 %	1,021	15	$4,55 \times 10^{-9}$	$18,15 \times 10^{-9}$

**Tab. 3: Výsledky měření mutačních rychlostí za optimálních podmínek a různých chemických a fyzikálních stresových podmínek.**

### Mutační rychlosti *Bacillus subtilis* 168



**Obr. 4.4:** Porovnání změn mutačních rychlostí za optimálních podmínek a v přítomnosti stresorů po korekci korekčním faktorem přežití.

Měření probíhala vždy v triplikátech. Do grafu je zanesena hodnota střední. Chybové úsečky znázorňují rozptyl všech naměřených hodnot. Zeleně jsou zvýrazněny hodnoty naměřené za optimálních podmínek, červeně v přítomnosti stresoru.

Na obrázku 4.4 je patrné, že v porovnání s optimálními podmínkami růstu bakteriální kultury nedochází v růstu za stresových podmínek k výrazným (tj. v řádu desítek a vyšším) změnám mutační rychlosti.

#### 4.2. Izolace mutátorových kmenů *Bacillus subtilis* 168

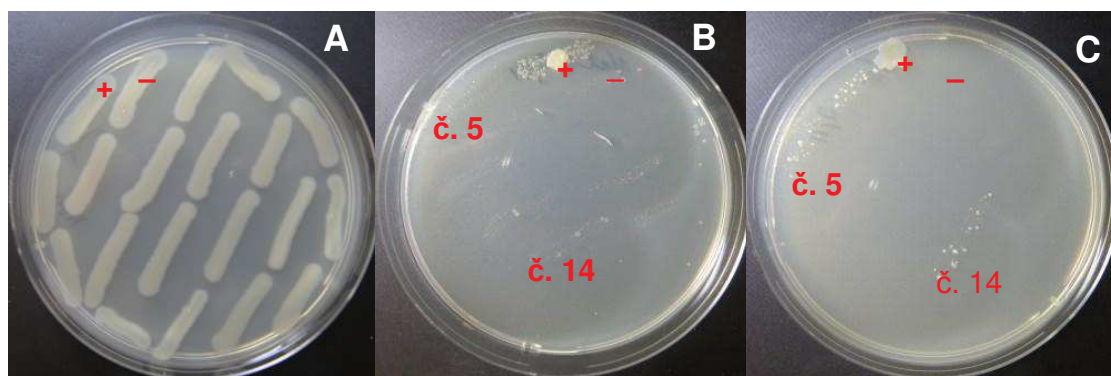
*Cíl: Izolace spontánního mutátorového kmene Bacillus subtilis 168*

Při stanovení mutační rychlosti (**Kap. 4.1.**) jsme získali mnoho kmenů rezistentních k rifampicinu. Vzhledem k tomu že frekvence vzniku mutátorového fenotypu je velice nízká, přibližně  $10^{-6}$  (FUNCHAIN *et al.* 2001), je velice malá pravděpodobnost, že se mezi mutantními kmeny bude vyskytovat mutátor.

Nejefektivnější mutátoři jsou kmeny s mutací v MMR systému, která ho inaktivuje a zvyšuje tím mutační rychlost a tedy schopnost se rychleji přizpůsobit různým stresovým podmínkám. Na průkaz mutátorových kmenů jsme použili jednoduchý pokus založený na razantně zvýšené frekvenci vzniku ATB-rezistentních buněk v jeho potomstvu (průvodní znak generalizovaně zvýšené mutační rychlosti) (**Kap. 3.2.1.8**).

Z misek  $LB_{rif}$  jsme přečárkovali na  $LB_{glu}$  100 kolonií reprezentujících každý stres a 100 kolonií získaných z kultivace za optimálních podmínek. Po nárůstu byly tyto přečárkované kolonie přerazítkovány na  $LB_{str}$  a  $LB_{nal}$ . Pokud se jednalo o mutátorový kmen došlo k nárůstu ATB-rezistentních kolonií na obou plotnách se selekčním antibiotikem. Na každé misce byla přítomna pozitivní kontrola reprezentovaná mutátorovým kmenem *Bacillus subtilis* BSMS1 s disrupcí v *mutSL* operonu (NUNVÁŘ 2009) a negativní kontrola divokého kmene *Bacillus subtilis* 168. Tomuto pokusu byly podrobeny kolonie získané z kultivací za stresových i za optimálních podmínek.

Z 800 kolonií reprezentujících všechny zkoumané růstové podmínky došlo k nárůstu potenciálních mutátorů na obou plotnách se selekčním antibiotikem pouze u kmenů získaných z kultivace za optimálních podmínek. Ze sady šesti kultivačních misek narostly dva potenciální mutátoři pouze na jedné z nich (**Obr. 4.5**).



**Obr. 4.5: Nárůst kmenů rezistentních na rifampicin.** (18 hodin kultivace)

**A:** Pomnožovací plotna  $LB_{glu}$  se vzorky rifampicin rezistentních klonů, které byly číselně označeny pro další rozlišení. (18 hodin kultivace)

**B:** Pevné kultivační médium obsahující kyselinu nalidixovou ( $LB_{nal}$ ) (3 dny kultivace)

**C:** Pevné kultivační médium obsahující streptomycin ( $LB_{str}$ )

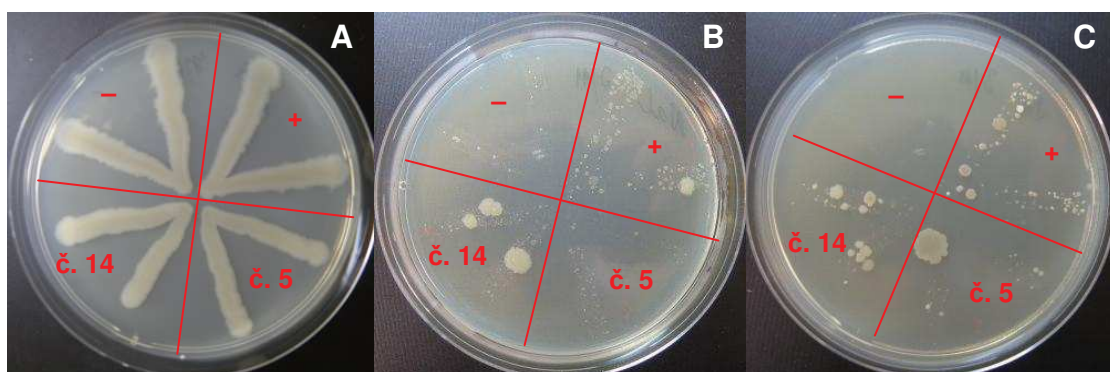


(3 dny kultivace)

V horní části kultivačních ploten je označena pozitivní (+) a negativní (–) kontrola. Čísly jsou označeny vzorky potenciálních mutátorových kmenů.

Při optimálních podmínkách růstu, se mutantní a mutátorový kmen neliší. Přítomnost mutátorového kmene byla podmíněna nárůstem na obou selekčních plotnách. Tato podmínka byla splněna pouze u vzorku č. 5 a vzorku č. 14.

Pro kontrolu výsledků byl vzorek č. 5 a č. 14 masivně přeočkován z pomnožovací plotny LB<sub>glu</sub> na novou pomnožovací plotnu LB<sub>glu</sub>. Po nárůstu byly kolonie přečárkovány do kříže na novou plotnu LB<sub>glu</sub> spolu se stejnou negativní a pozitivní kontrolou jako v předchozích krocích. Z této plotny byly narostlé kolonie přeraztkovány na selekční plotny s antibiotiky LB<sub>nal</sub> a LB<sub>str</sub> (**Obr. 4.6**).



**Obr. 4.6: Do kříže přečárkované potenciální mutátorové kmeny**

**A:** Pomnožovací plotna LB<sub>glu</sub> (18 hodin kultivace).

**B:** Pevné kultivační médium obsahující kyselinu nalidixovou (LB<sub>nal</sub>)

(3 dny kultivace)

**C:** Pevné kultivační médium obsahující streptomycin (LB<sub>str</sub>)

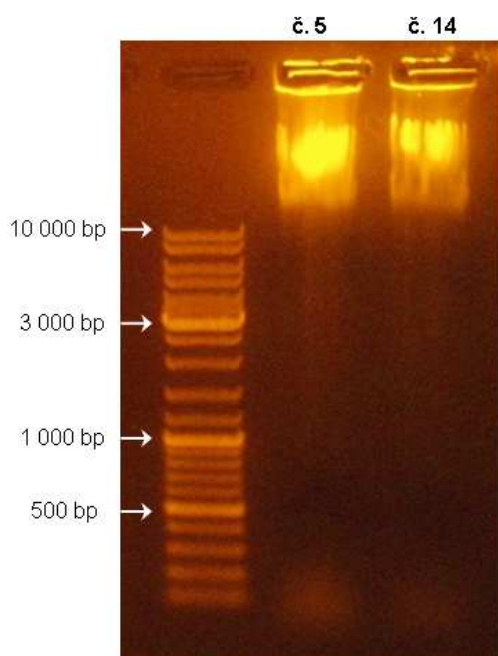
(3 dny kultivace)

Znaménkem + jsou označeny pozitivní kontroly, znaménkem – jsou označeny negativní kontroly. Čísly jsou označeny vzorky potenciálních mutátorů.

Z obou potenciálních mutátorů byly vytvořeny glycerolové konzervy (20 % glycerol) a uchovány v – 70 °C. Tyto kmeny byly nazvány jako BSM5 a BSM14.

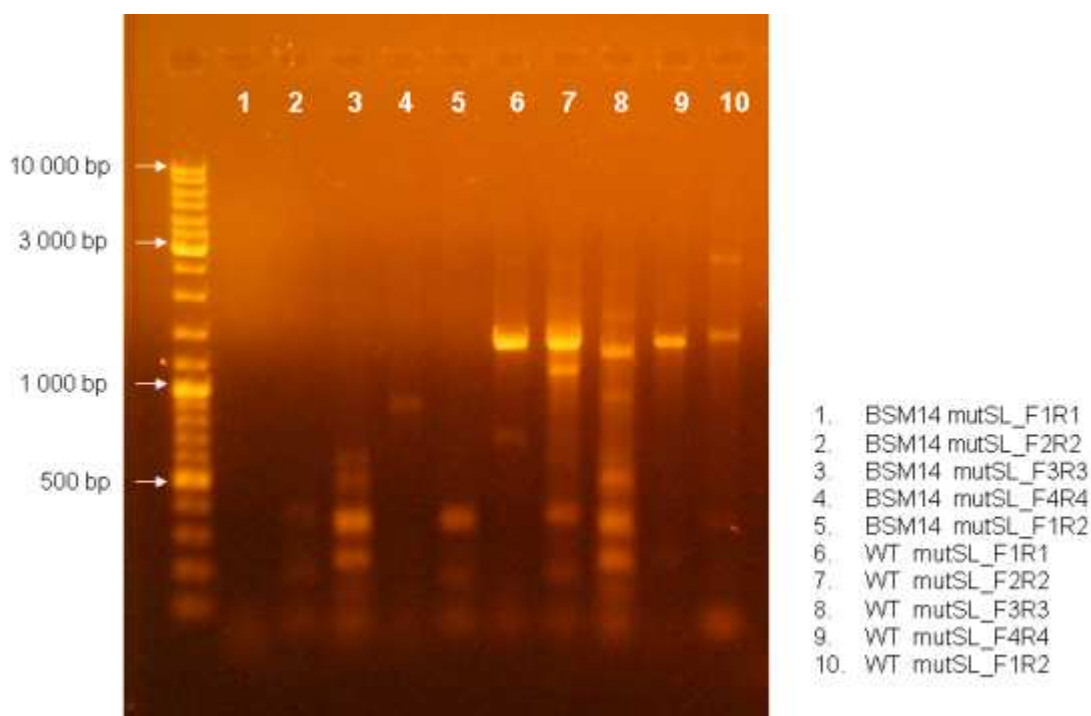
#### 4.2.1. Ověření mutátorového fenotypu

Z potenciálních mutátorových kmenů BSM5 a BSM14 byla izolována chromozomální DNA (**Obr. 4.7**) (**Kap. 3.2.2.1.**) a s použitím kombinace primerů mutSL\_1F/1R, mutSL\_2F/2R, mutSL\_3F/3R, mutSL\_4F/4R pro amplifikaci *mutSL* operonu byla u vybraného kmene BSM14 provedena PCR reakce. Výsledek, po vizualizaci elektroforézou, byl patrný pouze u kontrolního divokého typu *Bacillus subtilis*. U potenciálních mutátorů byla PCR reakce negativní (**Obr. 4.8**). Stejného výsledku bylo dosaženo i při použití všech kombinací primerů (mutSL\_F1/R1, mutSL\_F1/R2, mutSL\_F1/R3, mutSL\_F1/R4, mutSL\_F2/R1, mutSL\_F2/R2, mutSL\_F2/R3, mutSL\_F2/R4, mutSL\_F3/R1, mutSL\_F3/R2, mutSL\_F3/R3, mutSL\_F3/R4, mutSL\_F4/R1, mutSL\_F4/R2, mutSL\_F4/R3, mutSL\_F4/R4). Po zvýšení koncentrace Mg a pufru a snížení Tm došlo k amplifikaci nesespecifických bandů jiné než předpokládané velikosti. Vzhledem k neúspěchům v amplifikaci PCR reakcí byla podrobena sekvenaci 16S rRNA, která potvrdila bakteriální druh *Bacillus subtilis*. Zde byly použity universální primery pAf a pHr, převzaté z (EDWARDS *et al.* 1989).



**Obr. 4.7: Kontrola kvality chromozomální DNA**

Zleva: Hmotnostní marker, vzorky potenciálních mutátorů. Číslem 5 je označen BSM5 a číslem 14 BSM14.



**Obr. 4.8:** Výsledek PCR reakce z primerů 1F/1R, 2F/2R, 3F/3R, 4F/4R.

Z leva: Hmotnostní marker, vzorky

### 4.3. Stanovení míry transkripce *mutSL* operonu

*Cíl: Měření úrovně transkripce mutSL operonu pomocí reportérového genu  $\beta$ -galaktosidázy při různých chemických a fyzikálních stresových podmínkách.*

Na základě předchozích výsledků bylo rozhodnuto sledovat blíže změny probíhající v buňce nacházející se ve stresovém prostředí. Vzhledem k tomu, že nedocházelo ke změnám mutačních rychlostí v případě stresovaných kultivací, zaměřili jsme se na sledování aktivity MMR systému, který zodpovídá za genetickou stabilitu a brání mutačním změnám v bakteriálním genomu (**Kap. 2.1.1.**).

Pomocí rekombinantního kmene *Bacillus subtilis* BSPSL6, který byl vytvořen fúzí reportérového genu  $\beta$ -galaktosidázy a promotoru pro *mutSL* operon (NUNVÁŘ 2009) jsme mohli stanovit míru transkripce tohoto operonu při růstu v různých stresových podmínkách.

Kultivace za stresových podmínek byly zvoleny stejné jako při měření mutačních rychlostí tedy v tekutém LBG médiu s příslušným stresorem. Současně s každou kultivací za stresových podmínek probíhala paralelně i kultivace za optimálních podmínek, která sloužila jako kontrolní, se stejnými výchozími podmínkami. Odběry vzorků pro měření  $\beta$ -galaktosidázy (**Kap. 3.2.1.6**) probíhaly u obou paralelních kultivací vždy v triplikátech. Rozptyl naměřených hodnot je vyneseno do grafu pomocí chybových úseček.

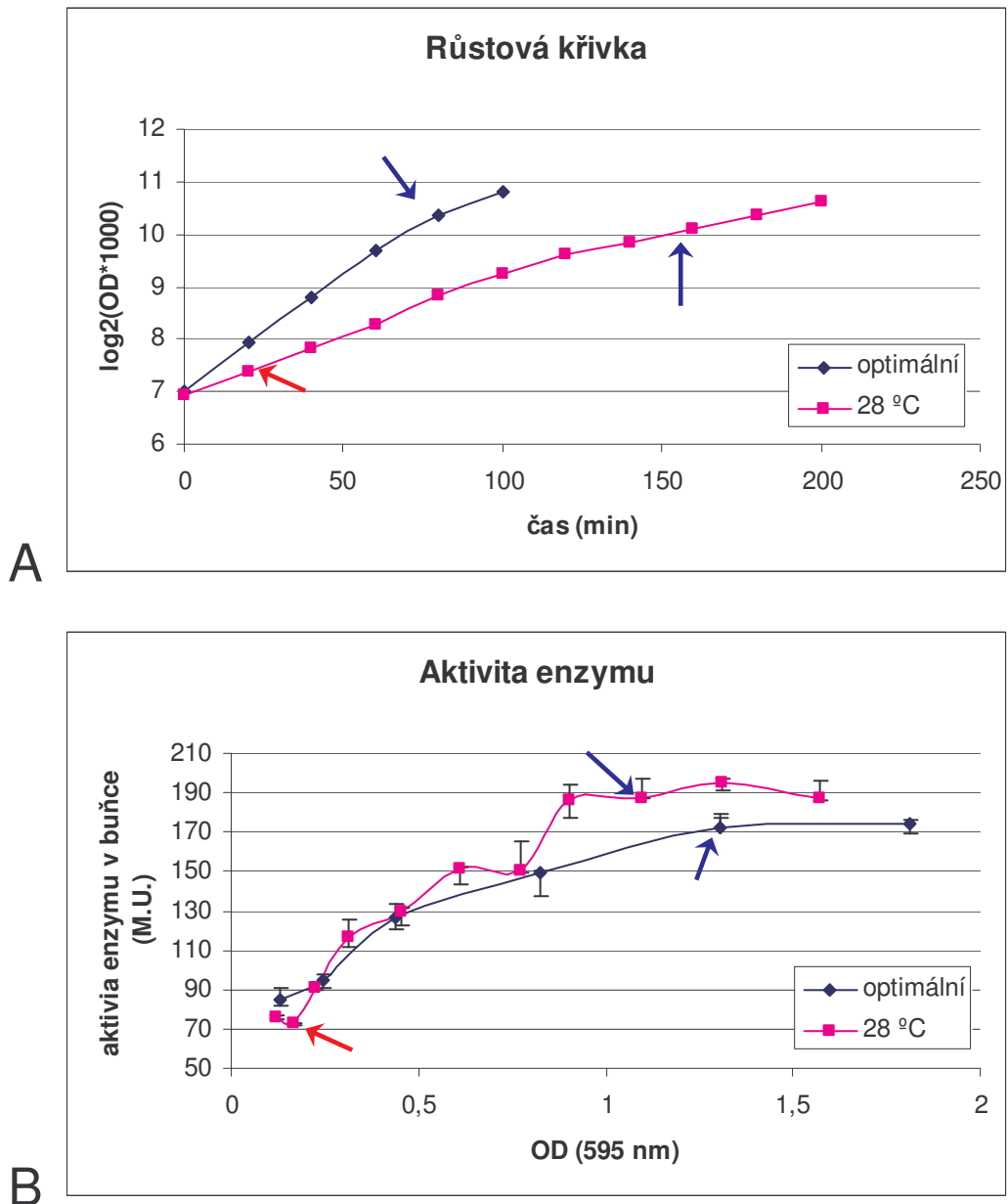
První odebrané vzorky z obou baněk na počátku kultivace byly vždy z média bez přítomnosti stresoru. Ihned po odběru byl k jedné z bakteriálních kultur stresor přidán, nebo byla banka přenesena do kultivátoru vytemperovaného na příslušnou teplotu. Kultivace kontrolní nestresované kultury probíhala dále beze změny. Pouze u stresů způsobených změnou pH byly po prvním odběru vzorku buňky z obou paralelních kultivací nejprve zcentrifugovány a po odstranění starého kultivačního média přeneseny do příslušného nového kultivačního média, tedy do média se změněným pH a do média s optimálními podmínkami. Odběry dále probíhaly ze všech baněk (stresované pH a kontrolní nestresované) ve stejných časových intervalech.

Po vytvoření stresových podmínek můžeme vidět na všech růstových křivkách výrazné snížení růstové rychlosti bakterií, nebo dokonce u některých stresů nástup lag fáze. Při obnovení exponenciálního růstu je doba zdvojení buněk stále vyšší oproti kultuře nestresované. Při přechodu kultury do stacionární fáze byly odběry ukončeny vzhledem k tomu, že ve stacionární fázi dochází k deprivaci kultury nedostatkem živin, nahromaděním toxických zplodin metabolismu, změnami pH kultivačního média vlivem neplně oxidovaných uhlíkatých sloučenin a ke změnám fyziologických vlastností buněk. Tyto podmínky již nejsou předmětem této práce.

Na grafu znázorňujícím hladinu  $\beta$ -galaktosidázy byla porovnávána vždy kultura stresovaná s kulturou rostoucí za optimálních podmínek nacházející se ve stejné hodnotě  $OD_{595}$ . U stresované i nestresované kultury dochází úměrně se stoupajícím počtem buněk i k zvyšující se expresi  $\beta$ -galaktosidázy. Po přechodu kultury do stacionární fáze se hodnota enzymu mění jen minimálně. Aktivita enzymu v buňce je uvedena v arbitrárních jednotkách (M. U.).

I přes rozdíly rychlostí růstu za optimálních a stresových podmínek se buněčná koncentrace  $\beta$ -galaktosidázy mezi obdobnými hodnotami optické denzity výrazně neliší.

## Kultivace za chladového stresu



**Obr. 4.9: Změny růstové rychlosti a aktivity enzymu v buňce při chladovém stresu.**

**A)** Průběh růstu bakterií. V grafu jsou hodnoty v semilogaritmickém vynesení.

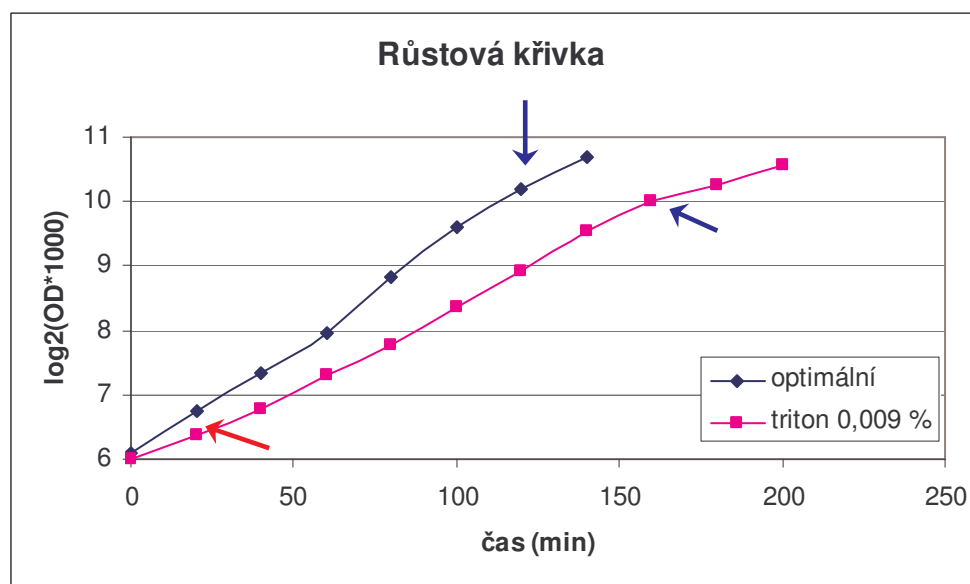
Červenou šipkou je označen první odběr po umístění kultivace do kultivátoru o teplotě 28 °C. Přechod do stacionární fáze je jak u nestresované, tak stresované kultivace označen modrou šipkou.

**B)** Aktivita enzymu v buňce při konkrétní koncentraci bakterií v kultivačním médiu.

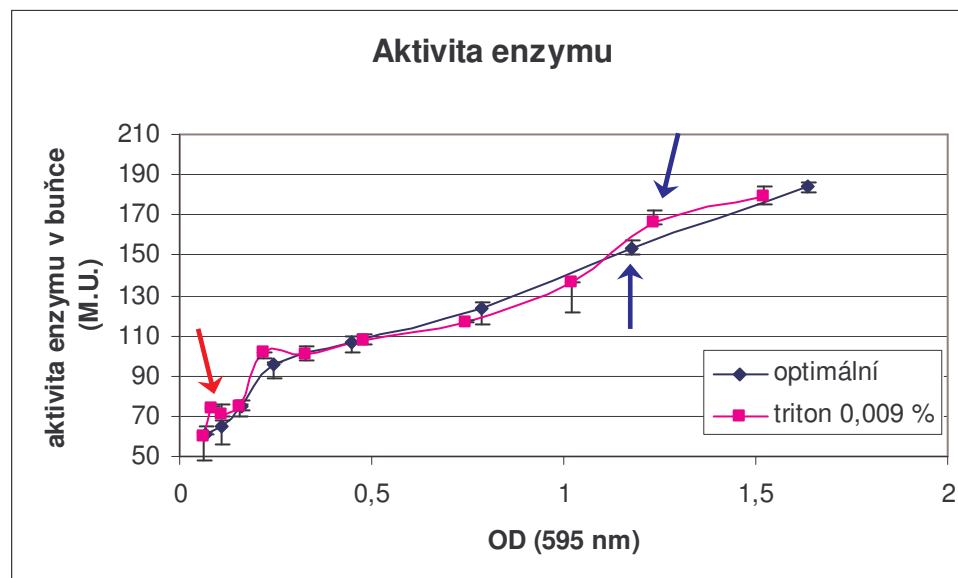
Červenou šipkou je označena první hodnota naměřená po přenesení kultury do stresového prostředí, modré šipky značí přechod do stacionární fáze.

Kultura byla přenesena do stresového prostředí (28 °C) ihned po prvním odběru vzorku. Po přenesení kultury do chladnějšího prostředí došlo k výraznému zpomalení růstu bakteriální kultury a je viditelné mírné snížení aktivity enzymu v buňce. Tento mírný pokles je však ihned vyrovnán na hladiny shodné s nestresovanou kontrolní kultivací.

## Kultivace za stresu způsobeného přítomností detergentu



A



B

**Obr. 4.10: Změny růstové rychlosti a aktivity enzymu v buňce v přítomnosti detergentu.**

A) Průběh růstu bakterií. V grafu jsou hodnoty v semilogaritmickém vynesení.

Červená šipka označuje první hodnotu naměřenou již po přidání detergentu k rostoucí kultuře. Přechod do stacionární fáze je jak u nestresované, tak stresované kultivace označen modrou šipkou.

B) Aktivita enzymu v buňce při konkrétní koncentraci bakterií v kultivačním médiu.

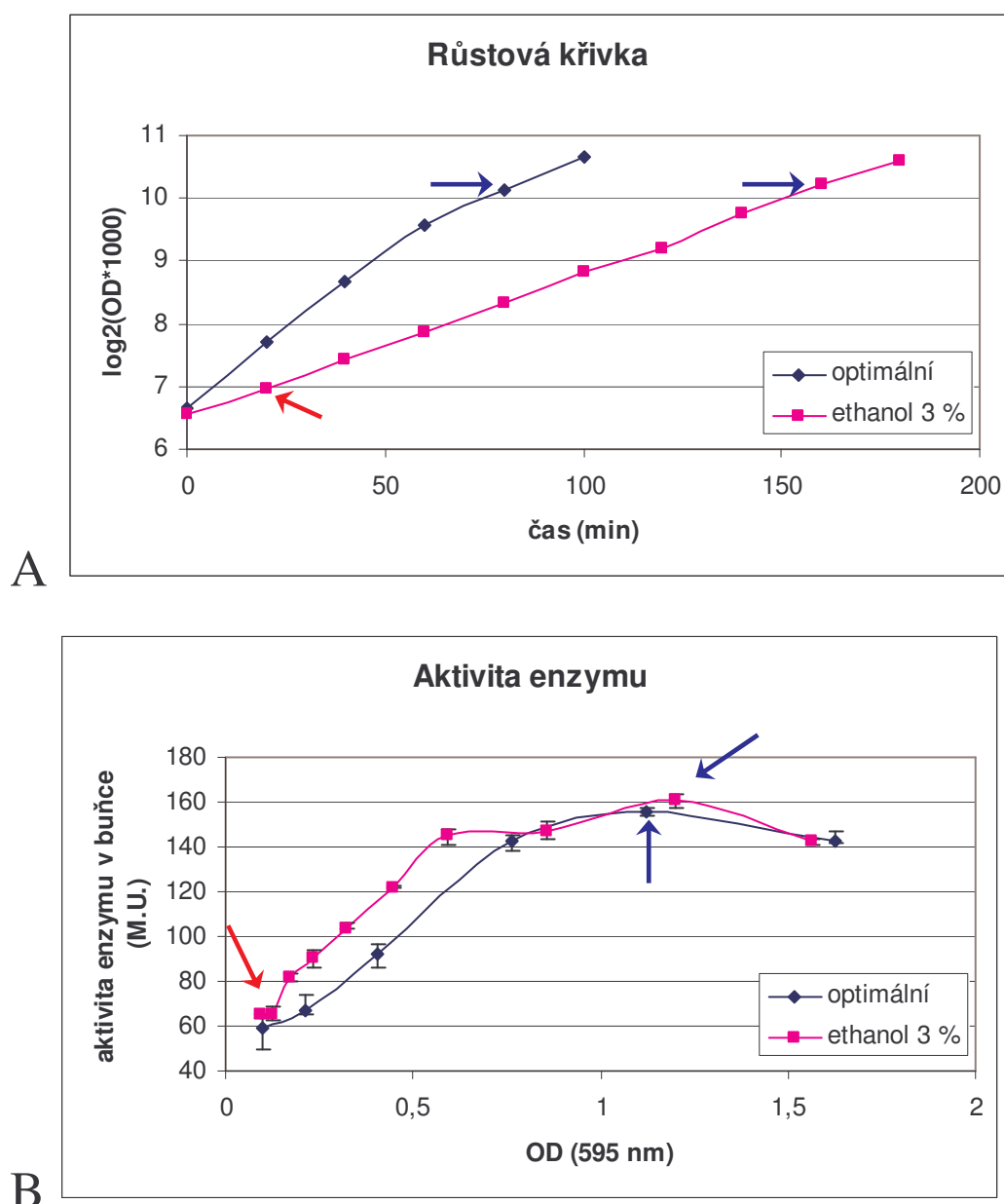
Červenou šipkou je označena první hodnota naměřená po přidání stresoru, modré šipky značí přechod do stacionární fáze.

Stejně jako u chladového stresu došlo po přidání tritonu na konečnou koncentraci 0,009 % v médiu k zpomalení růstové rychlosti.

Aktivita enzymu během růstu kultury je stejná u obou kultivací v totožných optických denzitách. Exprese *mutSL* operonu se tedy v přítomnosti detergentu od optimálních podmínek neliší.



## Kultivace za stresu způsobeného přidáním ethanolu



**Obr. 4.11: Změny růstové rychlosti a aktivity enzymu v buňce v přítomnosti ethanolu.**

**A)** Průběh růstu bakterií. V grafu jsou hodnoty v semilogaritmickém vynesení.

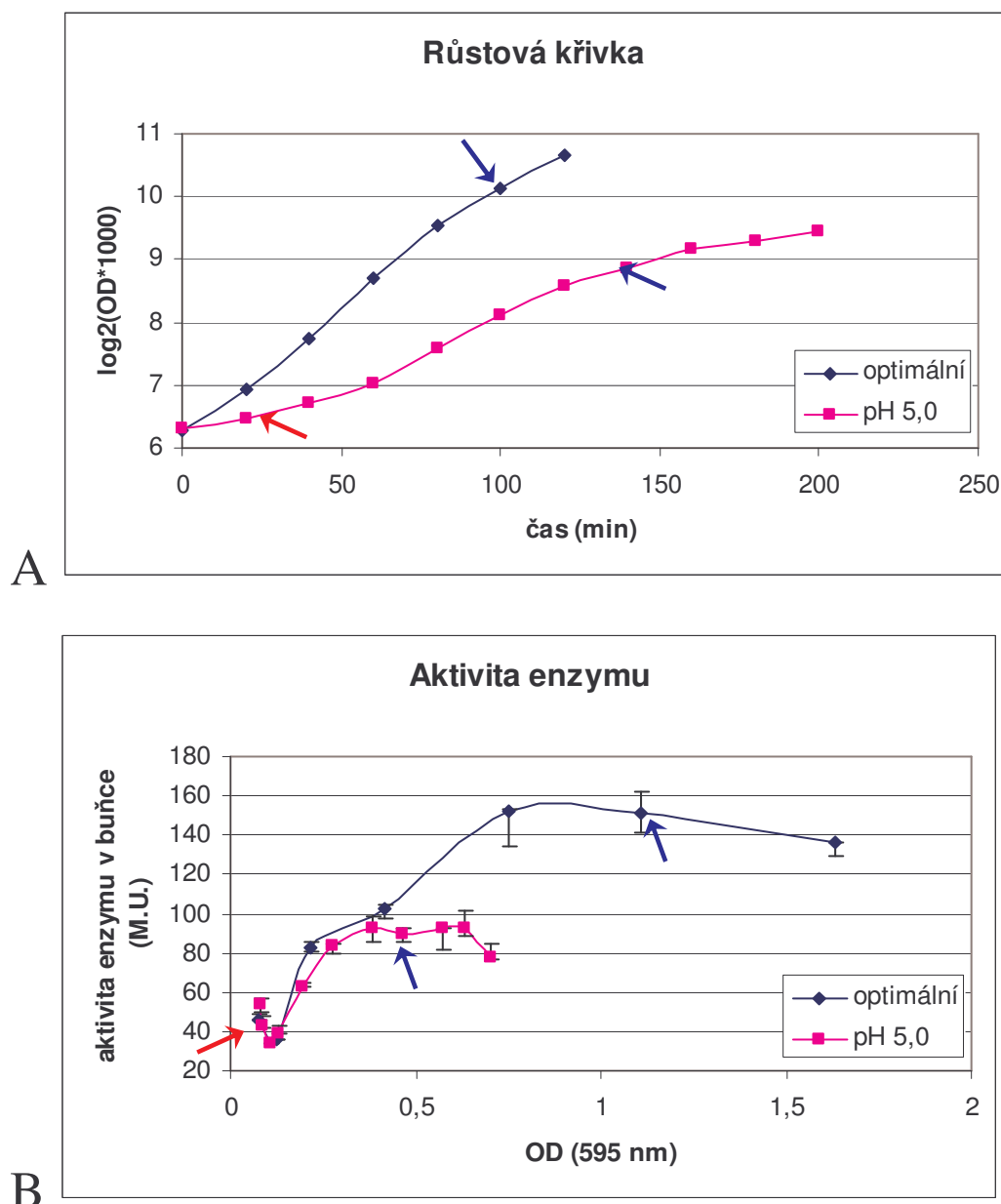
Červená šipka značí první hodnotu naměřenou po přidání ethanolu do kultivačního média na konečnou koncentraci 3 %. Přechod do stacionární fáze je označen modrými šipkami.

**B)** Aktivita enzymu v buňce při konkrétní koncentraci bakterií v kultivačním médiu.

Červenou šipkou je označena první hodnota naměřená po přidání stresoru, modré šipky značí přechod do stacionární fáze.

Stejně jako u předchozích dvou stresů došlo po přidání ethanolu na konečnou 3 % koncentraci v kultivačním médiu k viditelnému zpomalení růstové rychlosti. Ve 40 minutě po přidání stresoru je viditelné mírné zvýšení aktivity enzymu, které trvá až do stacionární fáze.

## Kultivace v kyselém prostředí



**Obr. 4.12: Změny růstové rychlosti a aktivity enzymu v buňce za kyselého stresu**

**A)** Průběh růstu bakterií. V grafu jsou hodnoty v semilogaritmickém vynesení.

Červenou šipkou je označena první hodnota naměřená po přenesení buněk do kyselého kultivačního média s pH 5,0. Přechod do stacionární fáze je označen modrými šipkami.

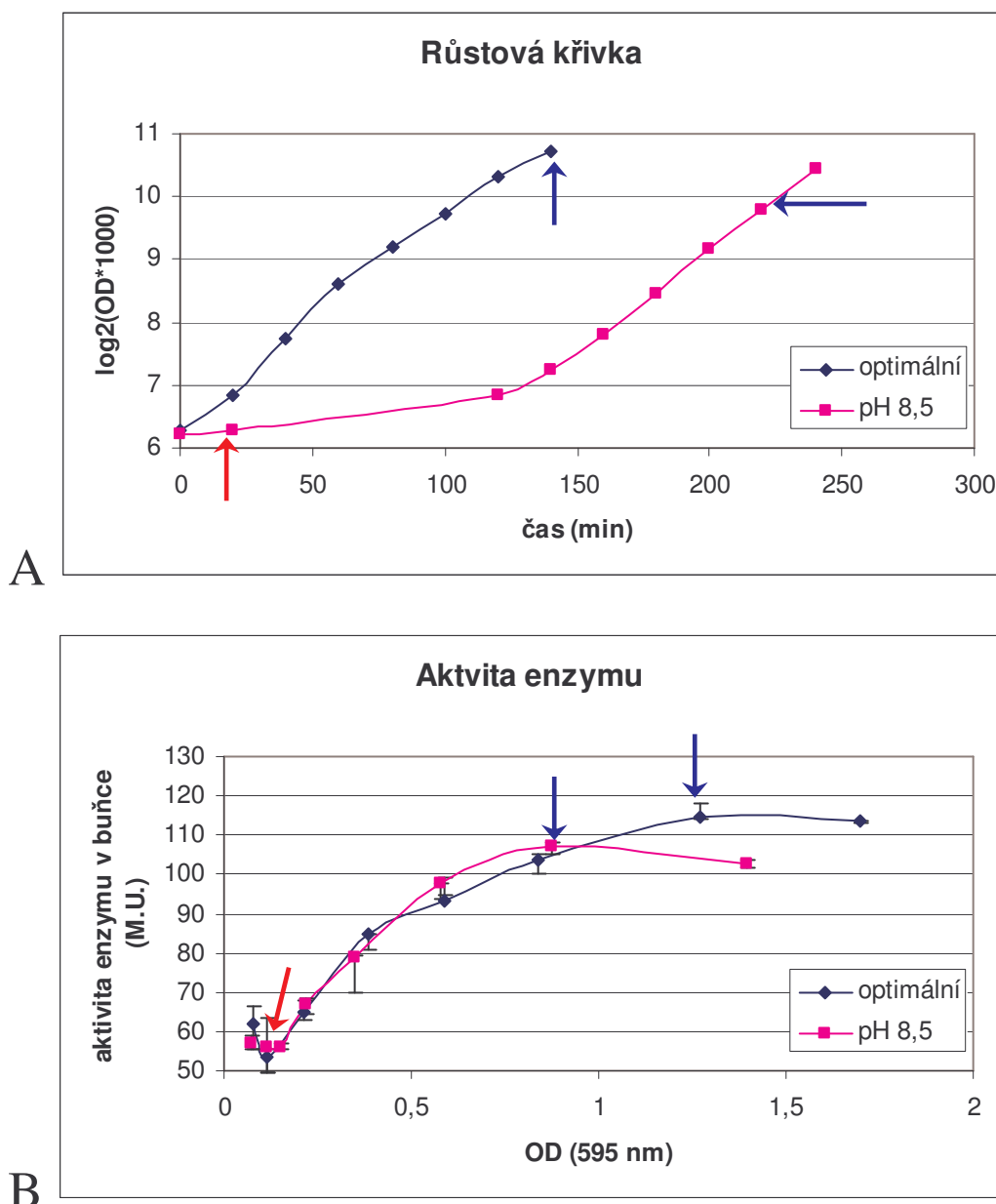
**B)** Aktivita enzymu v buňce při konkrétní koncentraci bakterií v kultivačním médiu.

Červenou šipkou je označena první hodnota naměřená po přenesení buněk do kyselého kultivačního média, modré šipky značí přechod do stacionární fáze.

Po přenesení buněk do kyselého kultivačního média s pH 5,0 (červená šipka) je patrný mírný nástup lag fáze. Po přechodu do exponenciální fáze je růst mnohem pomalejší než za optimálních podmínek. Kultura v kyselém médiu dříve vstupuje do stacionární fáze.

Změny hladiny enzymu v buňce se po přenesení do kyselého stresu nemění. Na křivce je však mnohem více patrný časný nástup stacionární fáze u stresované kultury.

## Kultivace v zásaditém prostředí



**Obr. 4.13: Změny růstové rychlosti a hladiny enzymu v buňce za zásaditého stresu**

**A)** Průběh růstu bakterií. Do grafu jsou zaneseny hodnoty v semilogaritmickém vynesení. Červenou šipkou je označena první hodnota naměřená po přenesení buněk do zásaditého kultivačního média s pH 8,5. Přechod do stacionární fáze je označen modrými šipkami.

**B)** Aktivita enzymu v buňce při konkrétní koncentraci bakterií v kultivačním médiu. Červenou šipkou je označena první hodnota naměřená po přenesení buněk do zásaditého kultivačního média, modré šipky značí přechod do stacionární fáze.

Po přenesení buněk do zásaditého kultivačního média dochází k nástupu velice dlouhé lag fáze. Po adaptaci buněk na zásadité pH růstová rychlost rapidně stoupá, ale stále se nerovná růstové rychlosti v optimálních podmínkách.

Hladina enzymu po přenesení buněk do zásaditého stresu je totožná s optimálními podmínkami. K útlumu v expresi *mutSL* operonu tedy nedochází ani při tomto stresu.

#### **4.4. Příprava rekombinantního kmene *Bacillus subtilis* 168 pro měření aktivity promotoru $\sigma^B$ - dependentního genu.**

*Cíl: : Promotorovou fúzí ctc genu a genu pro  $\beta$ -galaktosidázu vytvořit systém pro sledování aktivity  $\sigma^B$  regulonu.*

K adaptaci bakterií na měnící se růstové podmínky přispívá velkou měrou i obecná stresová odpověď reprezentovaná aktivací  $\sigma^B$  regulonu (**Kap. 2.1.4.1**). Vzhledem ke komplexní regulaci této obecné stresové odpovědi je stanovení míry transkripce genu *sigB* obtížné. Gen *sigB* je sám autoregulován a je součástí  $\sigma^B$  regulonu, kde dochází k překryvu genů (BOYLAN *et al.* 1992, NANNAPANENI *et al.* 2012). Pro stanovení měření aktivity obecné stresové odpovědi jsme proto využili gen *ctc*, který patří do  $\sigma^B$  regulonu. Fúzí promotoru *ctc* genu s promotorem pro  $\beta$ -galaktosidázu (LacZ) můžeme získat systém vhodný pro sledování aktivity  $\sigma^B$  regulonu, který byl pro tyto účely již dříve využit (RAY *et al.* 1985, VOELKER *et al.* 1995).

##### **4.4.1. Příprava rekombinantního plazmidu pDG1661**

Před integrací promotorové oblasti *ctc* genu do rekombinantního plazmidu byl příslušný 150 bp dlouhý úsek chromozomální DNA *Bacillus subtilis* amplifikován PCR reakcí (**Kap. 3.2.2.4**) s využitím dvou primerů *ctcR* a *ctcF*.

Tento amplifikovaný fragment byl vyizolován precipitací (**Kap. 3.2.2.3**) a štěpen pomocí restričních enzymů EcoRI a BamHI, Jejich restriční místa byly součástí použitých primerů. (**Kap. 3.2.2.5**). Tento fragment byl přes restriční místa

vložen do plazmidu pDG1661 (**Kap. 3.2.2.6.**), který byl před tím linearizován za použití stejných restrikčních enzymů.

Ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (**Kap. 3.2.1.13.**) ve kterých je tento plazmid replikativní. Po transformaci byly tyto buňky kultivovány přes noc na LB<sub>amp</sub> agaru. Pomocí selekčního antibiotika jsme docílili nárůstu pouze těch buněk, které obsahovaly funkční konstrukt.

Z vybraných tří bakteriálních klonů byly vyizolovány plazmidy (**Kap. 3.2.2.2.**) a podrobeny restrikčnímu štěpení (**Kap. 3.2.2.5.**). K tomuto účelu byl použit restrikční enzym SacI. Začlenění inzertu bylo následně ověřeno agarovou elektroforézou (**Kap. 3.2.2.7.**) spolu s prázdným plazmidem naštěpeným stejným restrikčním enzymem. Přítomnost inzertu byla potvrzena i PCR reakcí s primery ctcF a ctcR. Izolované plazmidy byly podrobeny také sekvenaci, která potvrdila přítomnost inzertu i jeho správnou pozici na plazmidu (**Kap. 3.2.2.8.**).

#### 4.4.2. Transformace *Bacillus subtilis* rekombinantním plazmidem

Ověřený rekombinantní plazmid byl opět vyizolován z příslušného bakteriálního klonu *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (**Kap. 3.2.2.2.**) a linearizován restrikčním enzymem BstEII (**Kap. 3.2.2.5.**). Linearizovaný plazmid byl transformován do kompetentních buněk *Bacillus subtilis* SG64 (**Kap. 3.2.1.11.**) a žádané transformanty byly selektovány na LB<sub>cat</sub>.

Po ověření úspěšné rekombinace bylo 10 vybraných kolonií přečárkováno na selekční plotny LB<sub>cat</sub> a LB<sub>spc</sub> a na diferenciální médium LB<sub>škrob</sub>. Kultivace probíhala opět do viditelného nárůstu kolonií.

Při správné integraci plazmidu do *amy* lokusu v chromozomu je přenesena pouze rezistence na chloramfenikol, část plazmidu nesoucí rezistenci na spektinomycin integrována není. Při přečárkování tedy dojde k nárůstu kolonií pouze na LB<sub>cat</sub> a LB<sub>škrob</sub>. Při integraci plazmidu také dochází k porušení cílového místa na bakteriálním chromozomu (genu *amyE*), čímž dojde ke ztrátě schopnosti bakterie využít škrob. Z tohoto důvodu, po přelití LB<sub>škrob</sub> lugolovým roztokem a zmodráním diferenciální plotny, nedochází k vytvoření bezbarvé zóny okolo narostlých kolonií.

Z vybraných bakteriálních klonů byla vyizolována chromozomální DNA (**Kap. 3.2.2.1.**) a pomocí PCR (**Kap. 3.2.2.4.**) s primerem ymyE2R, který nasedá

uvnitř *amyE* genu a primerem *ctcR*, byla ověřena integrace rekombinantního plazmidu s fúzí promotorů *ctc* genu. Po ověření správné integrace byl vybrán jeden mutantní kmen, který byl označen jako *Bacillus subtilis* 1A680/Pctc2.

S využitím tohoto mutantního kmene mohla být dále měřena změna regulace obecné stresové odpovědi prostřednictvím aktivity  $\beta$ -galaktosidázy, díky fúzi promotorů pro *ctc* gen a gen *lacZ*.

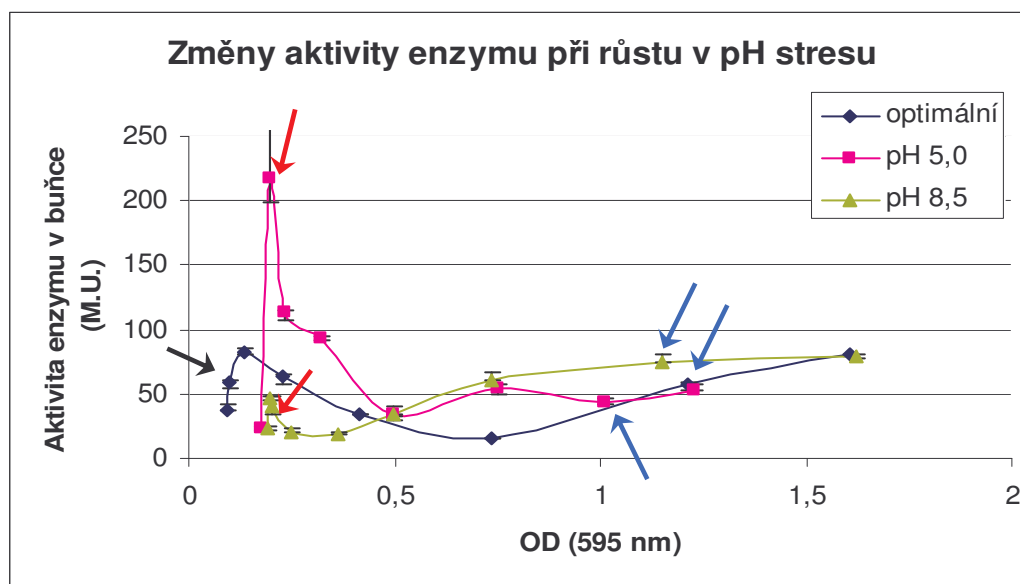
#### 4.5. Sledování míry aktivace obecné stresové odpovědi

*Cíl: Měření úrovně transkripce alternativního transkripčního faktoru  $\sigma^B$  u Bacillus subtilis při různých chemických a fyzikálních stresových podmínkách.*

Pomocí vytvořeného mutantního kmene *Bacillus subtilis* 1A680/Pctc2 (**Kap. 4.4.**) s fúzí promotorů pro gen *ctc* a gen *lacZ* (pro  $\beta$ -galaktosidázu), můžeme měřit změny úrovně aktivace obecné stresové odpovědi. Míra transkripce genu *ctc* koreluje s hladinou měřeného enzymu,  $\beta$ -galaktosidázou.

Podmínky kultivace za přítomnosti stresoru byly zvoleny stejné jako v případě měření úrovně *mutSL* operonu (**Kap. 4.3.**). První odběr vzorku pro měření změny hladiny  $\beta$ -galaktosidázy (**Kap. 3.1.1.6.**) za stresových podmínek byl proveden z exponenciálně rostoucí nestresované kultury. Ihned po tomto odběru byl přidán stresor a následovaly dva odběry po 10 minutách, aby mohl být podrobněji zaznamenán nástup aktivace obecné stresové odpovědi. Další vzorky byly dále odebírány po 20 minutových intervalech. Odběry na stanovení hladiny enzymu v buňce probíhaly vždy v triplikátech (do grafu zaneseno pomocí chybových úseček). Pro porovnání změn hladin enzymu ve stresových podmínkách bylo stejné měření provedeno i při růstu za optimálních podmínek. Odběry byly ukončeny poté, co bakteriální kultura začala přecházet z exponenciální do stacionární fáze růstu. Optická denzita kultury byla jak za optimálních tak za stresových podmínek měřena při 595 nm.

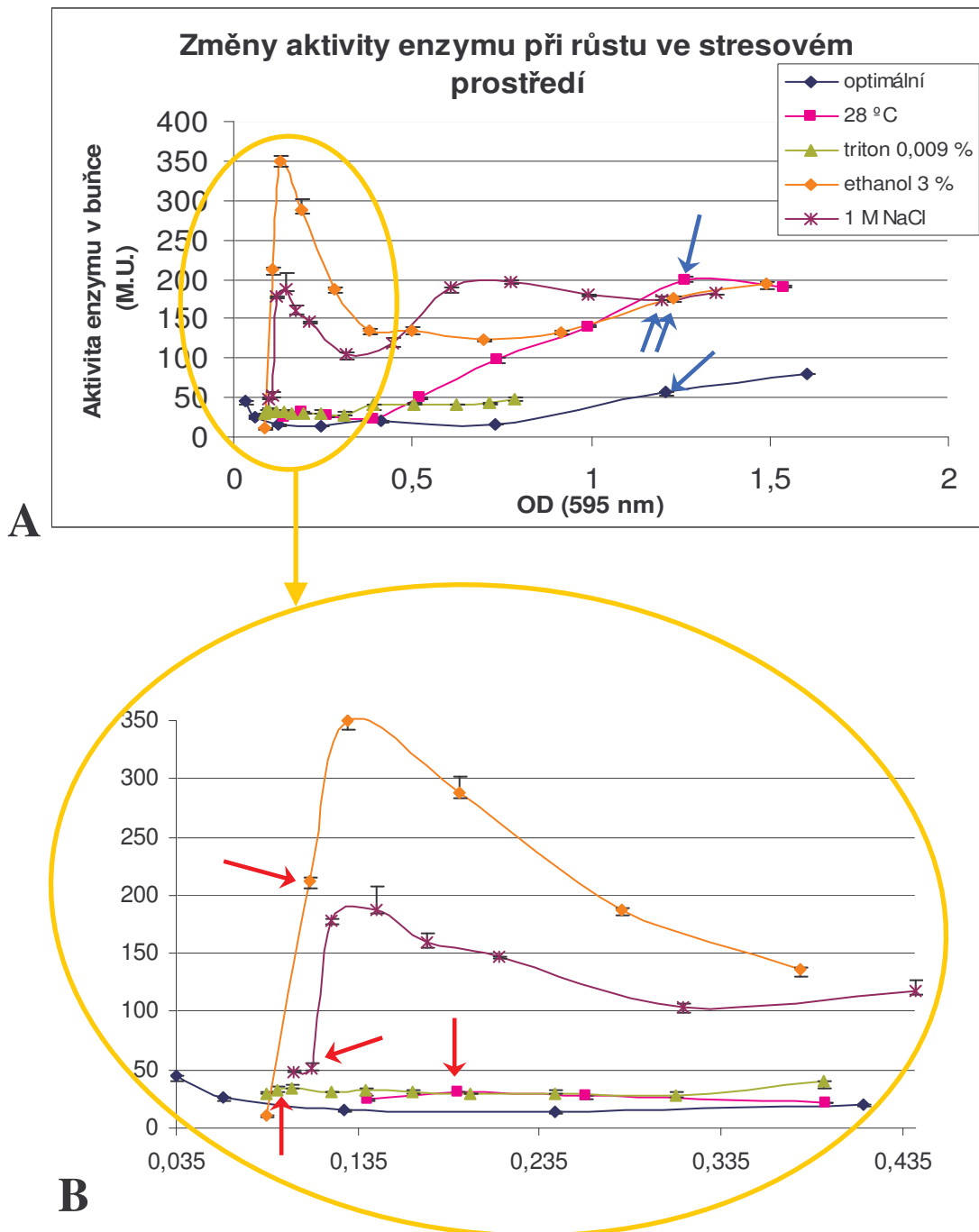




**Obr. 4.14: Změny aktivity enzymu v buňce při růstu v zásaditém a kyselém prostředí**

Aktivita enzymu v buňce při konkrétní koncentraci bakterií v kultivačním médiu. Červenými šipkami je označena první hodnota naměřená po přenesení buněk do kultivačního média, ve kterém je přítomen stresor, modré šipky značí přechod kultury do stacionární fáze. Černá šipka ukazuje první hodnotu naměřenou po centrifugaci u nestresované kontroly.

Zvýšení koncentrace enzymu v buňce je po zahájení stresování kultury, v porovnání s nestresovanou kulturou, patrné pouze u kyselého stresu. Po expozici stresorem, dosahuje enzym maximální aktivity v 10 minutě. K zvýšení enzymové aktivity u zásaditého stresu a nestresované kultury dochází pravděpodobně vlivem centrifugace, která je nezbytná pro přenesení buněk z optimálního prostředí do stresového kultivačního média. Po stresové aktivaci (způsobené vlivem změny pH i centrifugací) aktivita enzymu klesá k minimálním hodnotám a k opětovnému zvýšení dochází u pH stresů v pozdní exponenciální fázi. U nestresované kultivace až po nástupu stacionární fáze růstu. Zvýšení aktivity vlivem nástupu stacionární fáze u pH stresů koreluje s hodnotami kontrolními, naměřenými v nestresovaném prostředí.



**Obr 4.15: Změny aktivity enzymu v buňce při chladovém, ethanolovém, osmotickém a detergentovém stresu.**

Aktivita enzymu v buňce při konkrétní koncentraci bakterií v kultivačním médiu.

**A) Celkový graf zahrnující nástup stacionární fáze.** Modré šipky značí přechod kultury do stacionární fáze

**B) Detail vyznačený na grafu A bezprostředně po aplikaci stresoru.** Červenými šipkami je označena první hodnota naměřená po přenesení kultivace do prostředí o teplotě 28 °C, nebo po přidání stresoru do kultivačního média.

K výraznému zvýšení aktivity po přidání stresoru do kultivačního média dochází při ethanolovém a osmotickém stresu. Hodnoty naměřené u ethanolového stresu dvojnásobně převyšují aktivitu enzymu při osmotickém stresu. Maxima dosahuje aktivita enzymu v obou případech ve 20 minutě po přidání stresoru a poté pozvolna klesá. K opětovnému zvyšování aktivity enzymu dochází stejně jako u předchozích pH stresů před nástupem stacionární fáze. Všechny naměřené hodnoty u stresů jsou stále na vyšších hladinách, než je tomu u kontrolní nestresované kultivace.

U detergentového a chladového stresu není patrné výrazné zvýšení aktivity enzymu po zahájení stresování rostoucí kultury. Hodnoty naměřené u obou stresů vzájemně korelují. Aktivita enzymu se na začátku stresované kultivace udržuje mírně nad hladinami naměřenými během kultivace v nestresovaném prostředí. U chladového stresu dochází v průběhu exponenciální fáze k výraznému zvyšování aktivity enzymu, která se po přechodu do stacionární fáze rovná hodnotám stacionární fáze ethanolového a osmotického stresu. Odběry vzorků u stresu způsobeného přítomností detergentu byly kvůli časově náročné kultivaci ukončeny ještě před nástupem stacionární fáze.

## 5. DISKUZE

Bakterie jsou bezkonkurenčně nejrozšířenějšími organismy na Zemi a obývají všechna známá prostředí. Můžeme je nalézt v půdě, vodě, jako symbionty uvnitř i na povrchu mnohobuněčných organismů a obývají i tak nehostinná místa, jako jsou horké prameny, radioaktivní odpad nebo ledové vody světových oceánů. Aby tomu tak mohlo být, museli si své prvenství náležitě zasloužit a vyvinout řadu účinných adaptivních mechanismů, které jim umožnily přizpůsobit se tak rozmanitým životním podmínkám.

Schopnost přizpůsobit se měnícím životním podmínkám má na starost mechanismus nazývaný se adaptivní mutagenese. Předpokládá se, že základním principem je schopnost mikroorganismů cíleně ovlivňovat svou mutační schopnost a díky zvýšenému množství mutací zvýšit pravděpodobnost vzniku výhodné mutace, která umožní přežití a další množení tohoto organismu (FOSTER 2004). Vzhledem k tomu, že mutace jsou za nestresových podmínek nepříznivým jevem, musí dojít v buňkách nejprve k deaktivaci systémů, které vzniku mutací brání. Jedním z takových systémů je mismatch repair systém (MMR), který vyhledává a opravuje chyby vzniklé chybným zařazením nukleotidů při replikaci DNA. Tato strategie je využívána a nejvíce prozkoumána u modelového organismu *Escherichia coli*, jejímž přirozeným životním prostředím je trávicí trakt teplokrevných živočichů včetně člověka (FENG *et al.* 1996, FOSTER 2007). Mnohem menší pozornost je v tomto směru věnována gram-pozitivní bakterii *Bacillus subtilis*. Jejím životním prostředím je půda, kde dochází k častým změnám teplot, pH, vlhkosti a osmotického tlaku, ale také k výskytu různých chemických látek, které jsou do prostředí vypouštěny. Se všemi změnami okolního prostředí se musí tato bakterie vyrovnat, aby přežila a byla schopna se dále množit.

*Bacillus subtilis* a *Escherichia coli* se od sebe liší nejen svým přirozeným životním prostředím, ale také skladbou buněčné stěny a životními strategiemi. Například sporulace u *Bacillus subtilis* je jednou z výrazných adaptivních strategií, kterou *Escherichia coli* postrádá. Vzhledem k těmto skutečnostem je pravděpodobný i výskyt odlišných mechanismů adaptivní mutagenese u těchto dvou modelových organismů. Cílem mé práce je navázání na předchozí výsledky studia adaptivní mutagenese v naší laboratoři, které tuto myšlenku podporují.

Předchozí práce z naší laboratoře byla zaměřena na studium funkce MMR systému u *Bacillus subtilis* 168 při působení vybraných druhů stresorů. Z výsledků bylo patrné že narozdíl od *Escherichia coli* k cílenému útlumu ani deaktivaci MMR systému vlivem stresových podmínek nedochází a mutační rychlost zůstává v porovnání s nestresovanou kulturou nezměněna (NUNVÁŘ 2009).

Prvním naším úkolem bylo změření mutační rychlosti u širší škály stresů jednoduchou metodou založenou na akumulaci rifampicin – rezistentních mutantů v rostoucí kultuře v tekutém kultivačním médiu, která byla vyvinuta a její přesnost ověřena v předchozí práci, na jejíž výsledky navazujeme (NUNVÁŘ 2009). Pro měření změn mutačních rychlostí byla škála působících stresů rozšířena o další fyzikální a chemické typy stresů. Bakterie byly kultivovány za snížené (28 °C) a zvýšené (42 °C) kultivační teploty, v kyselém (pH 5,0) a zásaditém (pH 8,5) prostředí, v přítomnosti detergentu (0,009 % triton) a ethanolu (3 %). Kultivace začínaly vždy z malého počtu bakterií. Aby byla vyloučena přítomnost mutanta na počátku kultivace, bylo počáteční množství buněk v kultuře přibližně  $10^4$ . Kultivace byla ukončena na přelomu exponenciální a stacionární fáze růstu. Tato růstová fáze se zdá být nejvhodnější vzhledem k dostatečnému počtu buněk, ale nepřítomnosti interferencí změn probíhajících ve stacionární fázi růstu vlivem nedostatku živin a nahromadění toxických metabolitů. Vhodné rozmezí optické denzity pro ukončení kultivace v této růstové fázi bylo stanoveno po změření průběhu růstu za optimálních podmínek a vynesení těchto hodnot do grafu jako  $OD_{(450)}$  0,9 – 1,5. Toto rozmezí je aplikovatelné i na stresové kultivace, což bylo ověřeno stanovením růstových křivek u všech typů stresových kultivací. Průběh růstu byl u všech stresů stejný jako za optimálních podmínek. Lišila se pouze růstová rychlost. U stresovaných kultivací byla doba zdvojení přibližně 1,5 x až 2 x delší (než u nestresované kultivace), ale pro každý stres mírně odlišná.

Pro všechny typy stresů byl také změřen korekční faktor přežití, který upravuje poměr mezi živými buňkami v kultuře a naměřenou optickou denzitou. Tento faktor byl následně zahrnut do výpočtů mutační rychlosti. Hodnoty tohoto faktoru se od sebe u jednotlivých stresů výrazně neliší. Pouze u kultivace za snížené teploty je hodnota v porovnání s ostatními znatelně nižší, což si vysvětlujeme tím, že při těchto stresových podmínkách dochází k zmenšení objemu buněk. I přes to nedochází u žádného z použitých stresů k výrazné odchylce v rychlosti vzniku mutací v porovnání s kontrolní nestresovanou kulturou. Tyto výsledky se shodují s jinými publikovanými

daty a předchozími výsledky získanými v naší laboratoři (PEDRAZA-REYES a YASBIN 2004, SIMMONS *et al.* 2008, NUNVÁŘ 2009).

Mutantní rifampicin-rezistentní kolonie získané stejným postupem jako v předchozích kultivacích na měření mutační rychlosti byly podrobeny jednoduchému testu, který nám umožnil odlišení případného mutátora, od ostatních mutantních buněk. Princip testu byl zaměřen na hlavní mutátorovou vlastnost a to zvýšenou mutační rychlost a schopnost se rychleji přizpůsobit změně stresových podmínek. V našem případě přítomnosti jiného selekčního antibiotika než rifampicinu, na které ostatní rifampicin-rezistentní buňky vytvářejí rezistenci s mnohem nižší frekvencí. I přesto, že frekvence výskytu mutátorů je v běžné laboratorní populaci divokého kmene velice malá, přibližně  $10^{-5}$  (FUNCHAIN *et al.* 2001), identifikovali jsme dva klony s mutátorovým fenotypem z celkového počtu 800 vyšetřovaných kolonií rezistentních na rifampicin. Tyto bakteriální klony byly nazvány BSM5 a BSM14.

Po izolaci chromozomální DNA u kmene BSM14 vykazujícího silnější mutátorový fenotyp, byla provedena PCR reakce, která měla s použitím příslušných primerů amplifikovat celý úsek *mutSL* operonu. Sekvence příslušných úseků by umožnila zjistit případné mutace v operonu. Tato amplifikace ani po několika pokusech s různými kombinacemi primerů a ani v podmínkách snižujících specifitu nevedla k produktům předpokládané velikosti. Požadované amplifikace jsme dosáhli pouze u kontrolního divokého kmene. Je tedy velice pravděpodobné, že u potenciálních mutátorových kmenů došlo v oblasti *mutSL* operonu k rozsáhlé delecii, kterou není možno našimi primery pokrýt. Tuto naši hypotézu podporuje přítomnost stejných nespecifických produktů u příslušných kombinací primerů v jednotlivých reakcích u divokého kmene i mutátora BSM14. Pro konečné potvrzení úplné delecce *mutSL* operonu by byla potřeba rozsáhlejší analýza jeho okolí.

Vzhledem k tomu, že oba potenciální mutátory byly získány pouze z kultivace za optimálních podmínek, můžeme usuzovat, že stresové podmínky růstu nemají vliv na vyšší frekvenci vzniku mutátorového fenotypu.

Z předchozích výsledků tedy vyplývá, že vlivem stresových podmínek k zvýšení mutační rychlosti a tedy k útlumu MMR systému u *Bacillus subtilis* nedochází. Získaná data nám však nevyovídají nic o dynamice MMR systému během růstu bakteriální kultury ať v optimálních tak ve stresových podmínkách. Z tohoto důvodu byl použit již zkonstruovaný kmen s fúzí reportérového genu pro  $\beta$ -galaktosidázu a promotoru pro *mutSL* operon (NUNVÁŘ 2009). Tento kmen

umožňuje sledovat změny v expresi *mutSL* operonu při růstu bakteriální kultury prostřednictvím změn transkripce  $\beta$ -galaktosidázy. S využitím tohoto reportérového systému byly měřeny změny transkripce tohoto enzymu ve všech stresových podmínkách jaké byly navozeny v případě měření mutačních rychlostí. Byl vynechán pouze stres způsobený vysokou teplotou vzhledem k senzitivitě  $\beta$ -galaktosidázy, která je v těchto podmínkách neaktivní.

V případě kyselého, zásaditého a detergentového stresu je transkripce enzymu shodná s mírou transkripce enzymu v nestresované kultuře což značí nulový vliv těchto stresů na aktivitu MMR systému. U ethanolového stresu nedochází k žádnému poklesu transkripce enzymu po přidání stresoru, naopak ve 40 minutě je viditelné mírné zvýšení transkripce, což vypovídá o zvýšení „protimutační“ ochrany i přesto, že ethanol negativně působí hlavně na plasmatickou membránu buňky (INGRAM 1990). Chladový stres jako jediný vykazuje mírné snížení transkripce  $\beta$ -galaktosidázy. Toto snížení je však pouze minimální (cca 10 M. U.) a z výsledků měření mutační rychlosti vyplývá, že nemá žádný vliv na míru mutagenese.

Pro bližší představu o adaptaci *Bacillus subtilis* 168 na vzniklé stresové podmínky jsme se rozhodli sledovat míru exprese genů obecné stresové odpovědi patřící do  $\sigma^B$  regulonu. Sledovat přímo aktivitu promotoru pro gen *sigB*, který kóduje alternativní transkripční faktor  $\sigma^B$ , by bylo velice složité, vzhledem k tomu, že je součástí komplexního regulonu s překryvem genů a regulace jeho exprese podléhá složitým autoregulacím. Z tohoto důvodu jsme využili alternativní možnost sledování míry aktivace obecné stresové odpovědi a to zprostředkovaně přes gen *ctc*, který patří do *sigB* regulonu, jeho míra transkripce koreluje s transkripcí genu *sigB*, jež byl pro tyto účely dříve využit a je pro toto stanovení standardně používán (RAY *et al.* 1985, VOELKER *et al.* 1995).

Nejprve bylo potřeba vytvořit rekombinantní plazmid s fúzí promotorové oblasti genu *ctc* s reportérovým genem pro  $\beta$ -galaktosidázu. Takto připravený plazmid byl pomocí dvojitého crossing-overu transformován do *amy* lokusu kmene *Bacillus subtilis* SG64. Pomocí takto vytvořeného systému byly sledovány prostřednictvím změn transkripce enzymu  $\beta$  – galaktosidázy změny v aktivaci obecné stresové odpovědi během růstu ve stresových podmínkách, které byly zvoleny stejné, jako tomu bylo v případě stanovení změn v aktivaci MMR systému.

K nejvýraznější aktivaci obecné stresové odpovědi dochází při ethanolovém stresu. Po přidání stresoru k rostoucí bakteriální kultuře se transkripce enzymu (a tedy

transkripce alternativního transkripčního faktoru  $\sigma^B$ ) prudce zvyšuje. Ihned po dosažení maximální transkripční aktivity enzymu, ve 20. minutě po přidání stresoru, ale transkripce klesá a nadále je stabilně udržována výrazně nad hodnotami naměřenými při kontrolní nestresované kultivaci. K opětovnému zvýšení transkripce enzymu dochází až vlivem stacionární fáze růstu.

K výrazné indukci obecné stresové odpovědi také dochází u osmotického stresu. Nejvíce je enzym transkribován po přidání stresoru k rostoucí kultuře ve 20 minutě a stejně jako u ethanolového stresu poté klesá. K opětovnému zvyšování transkripce ale dochází mnohem dříve, ještě před nástupem stacionární fáze. Ve stacionární fázi je míra transkripce enzymu při obou stresech stejná.

U chladového a detergentového stresu k zvýšení transkripce enzymu po přidání stresoru nedochází. Obecná stresová odpověď tedy není aktivována vlivem těchto stresových podmínek bezprostředně po aplikaci stresoru. U chladového stresu dochází ke zvyšování transkripce enzymu až před nástupem stacionární fáze. Poté míra transkripce enzymu dosahuje stejných hladin, jako tomu bylo u předchozích dvou stresů (ethanolového a osmotického). Vzhledem k tomu, že u chladového stresu, při 15 °C, k indukci obecné stresové odpovědi dochází (BRIGULLA *et al.* 2003), je pravděpodobné, že námi navozený stres (28 °C) je pouze mírný a buňka se s ním umí vyrovnat jinými specifickými adaptačními mechanismy, například produkcí desaturázy (AGUILAR *et al.* 1998).

U pH stresů mírně ovlivňuje naměřené hodnoty při stanovení centrifugace, která je potřebná pro přenesení buněk do nového kultivačního média s příslušným pH. Tato interference je velice dobře patrná na nestresované kontrole, která byla zpracována stejným postupem jako pH stresované kultury. Bezprostředně po centrifugaci dochází ke zvyšování transkripce enzymu. Ta dosahuje maxima v 10 minutě po centrifugaci a poté se opět vrací na původní hladiny odpovídající nestresované kultivaci. Aktivací obecné stresové odpovědi se tedy *Bacillus subtilis* brání pouze v případě kyselého stresu (pH 5,0). Nejvyšší míry transkripce po stresové aktivaci dosahuje enzym již v 10 minutě a opět jako u všech předchozích stresů v zápětí klesá. U zásaditého stresu je po přenesení buněk do kultivačního média s pH 8,5 patrné jen mírné zvýšení transkripce enzymu, které je s největší pravděpodobností způsobeno předchozí centrifugací. U obou pH stresů dochází ke zvyšování transkripce enzymu opět až před nástupem stacionární fáze. Po přechodu do stacionární fáze je



transkripce enzymu při pH stresech shodná s mírou transkripce u nestresované kultury.

Naše výsledky jsou v dobré korelaci s výsledky měření aktivace obecné stresové odpovědi v dalších pracech, ve kterých byla zjištěna aktivace obecné stresové odpovědi po různých stresech. (AVILA-PEREZ *et al.*, BOYLAN *et al.* 1993, MASCHER *et al.* 2003)

Z našich výsledků vyplývá, že *Bacillus subtilis* nevyužívá adaptivní mutagenezi jako prostředek obrany proti vzniklým stresovým podmínkám. Nepříznivé okolní podmínky nemají vliv na zvýšení mutační rychlosti řízeným útlumem MMR systému ani na zvýšený vznik hypermutátorových kmenů. Je zjevné, že *Bacillus subtilis* tedy disponuje jinými účinnějšími mechanismy, které jej dokáží proti změnám okolního prostředí dostatečně ochránit. Jednou z možností je aktivace obecné stresové odpovědi, která na rozdíl od *Escherichia coli* neovlivňuje funkci MMR systému (TSUI *et al.* 1997, SAINT-RUF a MATIC 2006). I v případě aktivace obecné stresové odpovědi je intenzita přepisu příslušných genů u jednotlivých stresů velice rozdílná což může jednak záviset na specifických schopnostech buňky vyrovnávat se s jednotlivými stresy a jednak mírou stresu. Příkladem je mírný chladový stres, kdy u *Bacillus subtilis* dochází k rychlé a účinné adaptaci a zmírnění účinku stresu aktivací desaturázy (AGUILAR *et al.* 1998).

Další z možností, která umožňuje *Bacillus subtilis* takové privilegium jako je udržení genetické stability i za nepříznivých růstových podmínek je sporulace, díky které je schopen přežít případné život ohrožující změny okolního prostředí a v případě nastalých příznivých podmínek opět aktivovat růst s původním genomem (PIGGOT a HILBERT 2004).

## 6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit míru vlivu stresů na mutabilitu u *Bacillus subtilis* v korelaci s mírou obecné stresové odpovědi při působení těchto stresů na rostoucí bakteriální kulturu.

Během této diplomové práce bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Pomocí metody umožňující kvantifikaci mutagenese byla měřena mutační rychlost u *Bacillus subtilis* v přítomnosti šesti různých stresů (stres způsobený přítomností detergentu, vysokou a nízkou teplotou, kyselý, zásaditý a ethanolový stres). Bylo zjištěno, že k zvýšení mutační rychlosti oproti růstu v optimálních podmínkách nedochází ani u jednoho z těchto stresů.
2. Z takto vzniklých rifampicin rezistentních mutantních kmenů byly vyizolovány dva potenciální mutátorové kmeny BSM5 a BSM14, které vznikly při kultivaci za optimálních podmínek.
3. Byla měřena míra exprese *mutSL* operonu zprostředkovaně přes transkripční aktivitu promotoru fúzovaného s reportérovým genem  $\beta$ -galaktosidázy. Ani v jednom případě nedocházelo k útlumu transkripce proteinů MMR systému vlivem přidaných šesti výše popsaných stresů.
4. Byl sestrojen kmen *Bacillus subtilis* umožňující měření míry transkripce genů obecné stresové odpovědi pomocí fúze promotoru pro obecně stresový protein Ctc a reportérového genu  $\beta$ -galaktosidázy.
5. Byla měřena míra exprese obecné stresové odpovědi při sledovaných stresech, kdy nejvyšších hodnot dosahovala při ethanolovém, hyperosmotickém a kyselém stresu. Nižší indukce byla pozorována u zásaditého stresu a stresu způsobeného přítomností detergentu. Minimální zvýšení bylo naměřeno u chladového stresu.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr., De Mendoza, D. (1998): A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* 180: 2194-2200.
2. Alper, S., Duncan, L., Losick, R. (1994): An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* 77: 195-205.
3. Alper, S., Dufour, A., Garsin, D.A., Duncan, L., Losick, R. (1996): Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 260: 165-177.
4. Altabe, S.G., Aguilar, P., Caballero, G.M., De Mendoza, D. (2003): The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *J Bacteriol* 185: 3228-3231.
5. Au, N., Kuester-Schoeck, E., Mandava, V., Bothwell, L.E., Canny, S.P., Chachu, K., Colavito, S.A., Fuller, S.N., Groban, E.S., Hensley, L.A., O'brien, T.C., Shah, A., Tierney, J.T., Tomm, L.L., O'gara, T.M., Goranov, A.I., Grossman, A.D., Lovett, C.M. (2005): Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol* 187: 7655-7666.
6. Avila-Perez, M., Van Der Steen, J.B., Kort, R., Hellingwerf, K.J. 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.
7. Awano, N., Xu, C., Ke, H., Inoue, K., Inouye, M., Phadtare, S. (2007): Complementation analysis of the cold-sensitive phenotype of the *Escherichia coli* *csdA* deletion strain. *J Bacteriol* 189: 5808-5815.
8. Ban, C., Yang, W. (1998): Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* 95: 541-552.
9. Benson, A.K., Haldenwang, W.G. (1992): Characterization of a regulatory network that controls sigma B expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174: 749-757.
10. Benson, A.K., Haldenwang, W.G. (1993): *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2330-2334.
11. Benson, A.K., Haldenwang, W.G. (1993): The sigma B-dependent promoter of the *Bacillus subtilis* *sigB* operon is induced by heat shock. *J Bacteriol* 175: 1929-1935.
12. Boylan, S.A., Rutherford, A., Thomas, S.M., Price, C.W. (1992): Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma B by a regulatory pathway responsive to stationary-phase signals. *J Bacteriol* 174: 3695-3706.

13. Boylan, S.A., Redfield, A.R., Brody, M.S., Price, C.W. (1993): Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175: 7931-7937.
14. Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Volker, A., Bremer, E., Volker, U. (2003): Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol* 185: 4305-4314.
15. Browning, D.F., Busby, S.J. (2004): The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* 2: 57-65.
16. Burgess, R.R., Anthony, L. (2001): How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Curr Opin Microbiol* 4: 126-131.
17. Cairns, J., Overbaugh, J., Miller, S. (1988): The origin of mutants. *Nature* 335: 142-145.
18. Cao, M., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Wu, M.F., Paddon, C., Helmann, J.D. (2002): Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J Mol Biol* 316: 443-457.
19. Cao, M., Wang, T., Ye, R., Helmann, J.D. (2002): Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons. *Mol Microbiol* 45: 1267-1276.
20. 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.
21. Claverys, J.P., Lacks, S.A. (1986): Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol Rev* 50: 133-165.
22. Cooper, D.L., Lahue, R.S., Modrich, P. (1993): Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J Biol Chem* 268: 11823-11829.
23. Csonka, L.N. (1989): Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* 53: 121-147.
24. Csonka, L.N., Hanson, A.D. (1991): Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* 45: 569-606.
25. Cupples, C.G., Miller, J.H. (1989): A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5345-5349.
26. Cupples, C.G., Cabrera, M., Cruz, C., Miller, J.H. (1990): A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of specific frameshift mutations. *Genetics* 125: 275-280.

27. Curti, E., McDonald, J.P., Mead, S., Woodgate, R. (2009): DNA polymerase switching: effects on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 71: 315-331.
28. Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O.P., Devine, K.M., Van Dijl, J.M. (2002): A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184: 5661-5671.
29. Delmas, S., Matic, I. (2006): Interplay between replication and recombination in *Escherichia coli*: impact of the alternative DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4564-4569.
30. Drotschmann, K., Aronshtam, A., Fritz, H.J., Marinus, M.G. (1998): The *Escherichia coli* MutL protein stimulates binding of Vsr and MutS to heteroduplex DNA. *Nucleic Acids Res* 26: 948-953.
31. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C. (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17: 7843-7853.
32. Eiamphungporn, W., Helmann, J.D. (2008): The *Bacillus subtilis* sigma(M) regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol Microbiol* 67: 830-848.
33. Feng, G., Tsui, H.C., Winkler, M.E. (1996): Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells. *J Bacteriol* 178: 2388-2396.
34. Fernandez De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., Woodgate, R. (2000): Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35: 1560-1572.
35. Fitch, W.M. (1982): The Challenges to Darwinism Since the Last Centennial and the Impact of Molecular Studies. *Evolution* Vol. 36: 1133-1143 .
36. Foster, P.L. (2004): Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 4846-4852.
37. Foster, P.L. (2007): Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 373-397.
38. Fuchs, R.P., Fujii, S., Wagner, J. (2004): Properties and functions of *Escherichia coli*: Pol IV and Pol V. *Adv Protein Chem* 69: 229-264.
39. Funchain, P., Yeung, A., Stewart, J.L., Lin, R., Slupska, M.M., Miller, J.H. (2000): The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness. *Genetics* 154: 959-970.

40. Funchain, P., Yeung, A., Stewart, J., Clendenin, W.M., Miller, J.H. (2001): Amplification of mutator cells in a population as a result of horizontal transfer. *J Bacteriol* 183: 3737-3741.
41. Geszvain, K., Gruber, T.M., Mooney, R.A., Gross, C.A., Landick, R. (2004): A hydrophobic patch on the flap-tip helix of E.coli RNA polymerase mediates sigma(70) region 4 function. *J Mol Biol* 343: 569-587.
42. Ginetti, F., Perego, M., Albertini, A.M., Galizzi, A. (1996): *Bacillus subtilis mutS mutL* operon: identification, nucleotide sequence and mutagenesis. *Microbiology* 142 ( Pt 8): 2021-2029.
43. Gualerzi, C.O., Giuliadori, A.M., Pon, C.L. (2003): Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J Mol Biol* 331: 527-539.
44. Guerout-Fleury, A.M., Frandsen, N., Stragier, P. (1996): Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180: 57-61.
45. Haldenwang, W.G. (1995): The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 59: 1-30.
46. Hall, M.C., Matson, S.W. (1999): The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. *J Biol Chem* 274: 1306-1312.
47. Harfe, B.D., Jinks-Robertson, S. (2000): DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* 34: 359-399.
48. Hecker, M., Schumann, W., Volker, U. (1996): Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19: 417-428.
49. Hecker, M., Volker, U. (1998): Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol* 29: 1129-1136.
50. Hecker, M., Volker, U. (2001): General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* 44: 35-91.
51. Hecker, M., Pane-Farre, J., Volker, U. (2007): SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61: 215-236.
52. Helmann, J.D., Wu, M.F., Kobel, P.A., Gamo, F.J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M., Paddon, C. (2001): Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* 183: 7318-7328.
53. Helmann, J.D. (2002): The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* 46: 47-110.

54. Holtmann, G., Bakker, E.P., Uozumi, N., Bremer, E. (2003): KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol* 185: 1289-1298.
55. Holtmann, G., Bremer, E. (2004): Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* 186: 1683-1693.
56. Hoper, D., Volker, U., Hecker, M. (2005): Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 187: 2810-2826.
57. Hoper, D., Bernhardt, J., Hecker, M. (2006): Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics* 6: 1550-1562.
58. Horsburgh, M.J., Thackray, P.D., Moir, A. (2001): Transcriptional responses during outgrowth of *Bacillus subtilis* endospores. *Microbiology* 147: 2933-2941.
59. Hunger, K., Beckering, C.L., Wiegeshoff, F., Graumann, P.L., Marahiel, M.A. (2006): Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 240-248.
60. Chen, C., Deutscher, M.P. (2005): Elevation of RNase R in response to multiple stress conditions. *J Biol Chem* 280: 34393-34396.
61. 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. *J Bacteriol* 178: 2853-2860.
62. Ingram, L.O., Dickens, B.F., Buttke, T.M. (1980): Reversible effects of ethanol on *E. coli*. *Adv Exp Med Biol* 126: 299-337.
63. Ingram, L.O. (1990): Ethanol tolerance in bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 9: 305-319.
64. Inouye, M., Phadtare, S. (2004): Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. *Sci STKE* 2004: pe26.
65. Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., Modrich, P.L. (2006): DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 106: 302-323.
66. Jacob, F., Monod, J. (1961): Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3: 318-356.
67. Jordan, S., Hutchings, M.I., Mascher, T. (2008): Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32: 107-146.

68. Junop, M.S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P., Yang, W. (2001): Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol Cell* 7: 1-12.
69. Kalman, S., Duncan, M.L., Thomas, S.M., Price, C.W. (1990): Similar organization of the sigB and spoIIA operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J Bacteriol* 172: 5575-5585.
70. Kelley, W.L. (2006): Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Mol Microbiol* 62: 1228-1238.
71. Kim, T.J., Gaidenko, T.A., Price, C.W. (2004): In vivo phosphorylation of partner switching regulators correlates with stress transmission in the environmental signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186: 6124-6132.
72. Kirstein, J., Zuhlke, 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.
73. Kruger, E., Hecker, M. (1998): The first gene of the *Bacillus subtilis* clpC operon, ctsR, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J Bacteriol* 180: 6681-6688.
74. La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C.L., Gualerzi, C.O. (1991): Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10907-10911.
75. Majewski, J., Cohan, F.M. (1998): The effect of mismatch repair and heteroduplex formation on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics* 148: 13-18.
76. 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.
77. Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W., Helmann, J.D. (2003): Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol* 50: 1591-1604.
78. Meesapyodsuk, D., Reed, D.W., Savile, C.K., Buist, P.H., Ambrose, S.J., Covello, P.S. (2000): Characterization of the regiochemistry and cryptoregiochemistry of a *Caenorhabditis elegans* fatty acid desaturase (FAT-1) expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 39: 11948-11954.
79. Miller, J.H. (1996): Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* 50: 625-643.
80. Nakamura, T., Yuda, R., Unemoto, T., Bakker, E.P. (1998): KtrAB, a new type of bacterial K(+)-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* 180: 3491-3494.



81. Nannapaneni, P., Hertwig, F., Depke, M., Hecker, M., Mader, U., Volker, U., Steil, L., Van Hijum, S.A. (2012): Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology* 158: 696-707.
82. Natrajan, G., Lamers, M.H., Enzlin, J.H., Winterwerp, H.H., Perrakis, A., Sixma, T.K. (2003): Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res* 31: 4814-4821.
83. Nohmi, T. (2006): Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annu Rev Microbiol* 60: 231-253.
84. Nunvář, J. (2009): Vliv enviromentálních stresů na mutabilitu u *Bacillus subtilis* - Role mismatch repair systému. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy.
85. Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C., Wang, Z., Woodgate, R. (2001): The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* 8: 7-8.
86. Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A. (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
87. Oren, A. (2008): Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2.
88. Paget, M.S., Helmann, J.D. (2003): The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* 4: 203.
89. Parker, B.O., Marinus, M.G. (1992): Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1730-1734.
90. Pedraza-Reyes, M., Yasbin, R.E. (2004): Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary-phase-induced mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186: 6485-6491.
91. Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Volker, U., Hecker, M. (2001): Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 5617-5631.
92. Pietiainen, M., Gardemeister, M., Mecklin, M., Leskela, S., Sarvas, M., Kontinen, V.P. (2005): Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* 151: 1577-1592.
93. Piggot, P.J., Hilbert, D.W. (2004): Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 7: 579-586.

94. Ray, C., Hay, R.E., Carter, H.L., Moran, C.P., Jr. (1985): Mutations that affect utilization of a promoter in stationary-phase *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 163: 610-614.
95. Rayssiguier, C., Thaler, D.S., Radman, M. (1989): The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342: 396-401.
96. Roberts, M.F. (2005): Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1: 5.
97. Rodrigues, D.F., Tiedje, J.M. (2008): Coping with our cold planet. *Appl Environ Microbiol* 74: 1677-1686.
98. Rosche, W.A., Foster, P.L. (2000): Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 20: 4-17.
99. Rossolillo, P., Albertini, A.M. (2001): Functional analysis of the *Bacillus subtilis* *yshD* gene, a *mutS* paralogue. *Mol Gen Genet* 264: 809-818.
100. Russell, N.J. (1983): Adaptation to temperature in bacterial membranes. *Biochem Soc Trans* 11: 333-335.
101. Saint-Ruf, C., Matic, I. (2006): Environmental tuning of mutation rates. *Environ Microbiol* 8: 193-199.
102. Sebestian, J., Petrmichlova, Z., Sebestianova, S., Naprstek, J., Svobodova, J. (2001): Osmoregulation in *Bacillus subtilis* under potassium limitation: a new inducible K<sup>+</sup>-stimulated, VO<sub>4</sub>(3<sup>-</sup>)-inhibited ATPase. *Can J Microbiol* 47: 1116-1125.
103. Sheryl S. Justice, D.A.H., Lynette Cegelski & Scott J. Hultgren (2008): Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology* 6: 162-168.
104. Shin, J.H., Price, C.W. (2007): The SsrA-SmpB ribosome rescue system is important for growth of *Bacillus subtilis* at low and high temperatures. *J Bacteriol* 189: 3729-3737.
105. Shinagawa, H., Iwasaki, H., Ishino, Y., Nakata, A. (1991): SOS-inducible DNA polymerase II of *E coli* is homologous to replicative DNA polymerase of eukaryotes. *Biochimie* 73: 433-435.
106. 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.
107. Schobel, S., Zellmeier, S., Schumann, W., Wiegert, T. (2004): The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol Microbiol* 52: 1091-1105.

108. Schofield, M.J., Hsieh, P. (2003): DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* 57: 579-608.
109. Schulz, A., Schumann, W. (1996): *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis* *dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J Bacteriol* 178: 1088-1093.
110. Simmons, L.A., Davies, B.W., Grossman, A.D., Walker, G.C. (2008): Beta clamp directs localization of mismatch repair in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell* 29: 291-301.
111. Smith, B.T., Grossman, A.D., Walker, G.C. (2001): Visualization of mismatch repair in bacterial cells. *Mol Cell* 8: 1197-1206.
112. Sniegowski, P. (2001): Evolution: constantly avoiding mutation. *Curr Biol* 11: R929-931.
113. Staron, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., Mascher, T. (2009): The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol Microbiol* 74: 557-581.
114. Storz, G., Hengge, R. (2011): *Bacterial Stress Responses*, 2nd edition. ASM Press, Washington, DC p.137-215.
115. Straus, D.B., Walter, W.A., Gross, C.A. (1987): The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature* 329: 348-351.
116. Straus, D.B., Walter, W.A., Gross, C.A. (1989): The activity of sigma 32 is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 3: 2003-2010.
117. Sturr, M.G., Ablooglu, A.J., Krulwich, T.A. (1997): A *Bacillus subtilis* locus encoding several gene products affecting transport of cations. *Gene* 188: 91-94.
118. 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.
119. Tsui, H.C., Feng, G., Winkler, M.E. (1997): Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 179: 7476-7487.
120. Vijay, K., Brody, M.S., Fredlund, E., Price, C.W. (2000): A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 35: 180-188.
121. Voelker, U., Dufour, A., Haldenwang, W.G. (1995): The *Bacillus subtilis* *rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of sigma B. *J Bacteriol* 177: 114-122.

122. Voelker, U., Voelker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., Haldenwang, W.G. (1995): Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol* 177: 3771-3780.
123. Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F., Radman, M. (1997): Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9763-9767.
124. Wade, J.T., Reppas, N.B., Church, G.M., Struhl, K. (2005): Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev* 19: 2619-2630.
125. Wang, W., Guffanti, A.A., Wei, Y., Ito, M., Krulwich, T.A. (2000): Two types of *Bacillus subtilis* tetA(L) deletion strains reveal the physiological importance of TetA(L) in K(+) acquisition as well as in Na(+), alkali, and tetracycline resistance. *J Bacteriol* 182: 2088-2095.
126. Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., Hengge, R. (2006): Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62: 1014-1034.
127. Welsh, K.M., Lu, A.L., Clark, S., Modrich, P. (1987): Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutH gene product. *J Biol Chem* 262: 15624-15629.
128. Whatmore, A.M., Reed, R.H. (1990): Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J Gen Microbiol* 136: 2521-2526.
129. Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S., Schumann, W. (2001): Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon. *Mol Microbiol* 41: 59-71.
130. Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P.C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K., Buck, M. (2008): Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor. *Mol Microbiol* 68: 538-546.
131. Wise, A.A., Price, C.W. (1995): Four additional genes in the sigB operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor sigma B in response to environmental signals. *J Bacteriol* 177: 123-133.
132. Worth, L., Jr., Clark, S., Radman, M., Modrich, P. (1994): Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3238-3241.
133. Wu, T.H., Marinus, M.G. (1994): Dominant negative mutator mutations in the mutS gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176: 5393-5400.
134. Wu, T.H., Marinus, M.G. (1999): Deletion mutation analysis of the mutS gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274: 5948-5952.

135. Wyrzykowski, J., Volkert, M.R. (2003): The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. J Bacteriol 185: 1701-1704.

136. Zuber, U., Schumann, W. (1994): CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 176: 1359-1363.