

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

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

STUDIUM GENŮ ZODPOVĚDNÝCH ZA
OSMOADAPTACI U *BACILLUS SUBTILIS*

Jiřina Josefiová

Praha 2006

vedoucí diplomové práce :

RNDr. Irena Lichá, CSc.

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

Jiřina Josefíková

Tato práce vznikla pod vedením RNDr. Ireny Liché, CSc., které bych tímto chtěla poděkovat za trpělivé a odborné vedení, konzultace a cenné rady při interpretaci výsledků.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Martinu Pospíškovi, PhD. za zapůjčení přístrojů pro fotografování gelů a pro PCR.

Studentům mikrobiologické skupiny vděčím za vytvoření přátelského prostředí ve společné laboratoři. Ráda bych poděkovala především Mgr. Daně Ulanové za pomoc v začátcích mé laboratorní práce.

Bez zázemí a motivace, které mi poskytovala po celou dobu studia má rodina by tato práce nemohla vzniknout, závěrečné poděkování proto patří jim.

Tato diplomová práce byla v letech 2003-2004 financována z výzkumného záměru MSM 113100003 „Regulace a signalizace v živých systémech“, v roce 2005 byla financována z režijních peněz katedry genetiky a mikrobiologie a v roce 2006 z Centra Environmentální biologie LC06066

STUDY OF GENES RESPONSIBLE FOR OSMOADAPTATION IN *BACILLUS SUBTILIS*

Abstract

Bacteria are probably the most adaptable organisms. This feature is partly attributed to their development of strategies controlled by stress. In our laboratory we use *Bacillus subtilis* as a model organism; a grampositive colonizer of upper layers of soil. For this habitat are typical frequent and sudden changes in wetness. To hypertonic environment *B. subtilis* responds by accumulation of potassium ions followed by transport or synthesis of compatible solutes. In my thesis I focused on obtaining information about genes responsible for osmosensory and osmoadaptation mechanisms in *Bacillus subtilis*.

I have prepared osmosensitive mutants by unspecific insertional mutagenesis using minitransposon Tn10. Eight of these mutants were analysed genetically. For estimation of the number of insertions in individual mutants restriction analysis and hybridisation were used. In only two mutants I identified only one insertion of mini-Tn10 in chromosome responsible for osmosensitive phenotype. Transcriptional profiles of these mutants were analysed and compared with the profiles of wild strain of *B. subtilis*. Transcriptional profiles were obtained by cultivation at both normal and osmotic conditions. My results show that the insertion in mutants is presumably located in regulation protein which participates in termination of stress response. Using inverse PCR and construction of chromosome library I sought to find the exact localization of insertion of mini-Tn10 in genome of these mutants. I was not fully successful, but according to results I have got I expect that the insertion is localized near the transposase gene. In the genome of *Bacillus subtilis* I found two regions containing transposase genes. Near one of them are located genes of sigma B regulon and in proximity of the second one is probable transcriptional regulator of which transcription is activated during osmotic stress.

Keywords: *Bacillus subtilis*, osmotic shock, potassium transport, osmosensory proteins, unspecific insertional mutagenesis, bacterial mRNA isolation

Klíčová slova: *Bacillus subtilis*, osmotický šok, transport draslíku, osmosenzorické proteiny, nescifická inzerční metagenese, izolace bakteriální mRNA

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. Osmotický tlak a turgor	11
2.2. Osmoregulace	12
2.2.1. Reakce bakterií na hyperosmotický stres	12
2.2.2. Reakce bakterií na hypoosmotický stres	13
2.3. Osmosenzorické proteiny bakterií.....	14
2.3.1. Kinázy dvousložkového systému.....	15
2.3.1.1. KdpD.....	16
2.3.1.2. EnvZ.....	19
2.3.2. Osmosenzory s transportní funkcí.....	22
2.3.2.1. ProP.....	22
2.3.2.2. BetP.....	25
2.3.2.3. OpuA.....	26
2.3.3. Osmosenzorické proteiny u <i>Bacillus subtilis</i>	28
2.4. Draselné kanály u <i>Bacillus subtilis</i>.....	29
2.4.1. KtrAB a KtrCD.....	29
2.4.2. ATPáza P-typu	30
2.4.3. Systém podobný TrkA z <i>E. coli</i>	31
2.4.4. TetA(L).....	31
3. MATERIÁL A METODIKA.....	32
3.1. Materiál.....	32
3.1.1. Bakteriální kmeny	32
3.1.2. Plazmidy	32
3.1.3. Primery pro PCR.....	34
3.1.4. Enzymy a protilátky	36
3.1.5. DNA standardy	36
3.1.6. Komerční sady	36
3.1.7. Antibiotika	37
3.1.8. Chemikálie	37
3.1.9. Kultivační média.....	39
3.1.9.1. Minerální média.....	39
3.1.9.2. Komplexní média.....	40
3.1.9.3. Média pro přípravu kompetentních buněk <i>B. subtilis</i> a jejich transformaci.....	41
3.1.9.4. Média pro přípravu kompetentních buněk <i>E. coli</i> pro transformaci teplotním šokem.....	41
3.1.10. Roztoky	42
3.1.10.1. Roztok pro blue/white selekci.....	42
3.1.10.2. TE pufr.....	42
3.1.10.3. Roztoky pro izolaci chromozomální DNA	42
3.1.10.4. Roztoky pro izolaci chromozomální DNA v gelu.....	42
3.1.10.5. Roztoky pro izolaci plazmidové DNA	43
3.1.10.6. Roztok Sephadex G-50 pro gelovou filtraci.....	43
3.1.10.7. Roztoky pro horizontální agarózovou elektroforézu.....	43
3.1.10.8. Roztoky pro Southern blotting.....	44
3.1.10.9. Roztoky pro hybridizaci.....	44
3.1.10.10. Roztoky pro chromogenní a chemiluminiscenční detekci	45
3.1.10.11. Roztoky pro izolaci RNA.....	46
3.1.10.12. Pufr pro DNázu.....	46

3.1.11.	Internetové databáze a programy	46
3.1.12.	Přístroje a laboratorní zařízení	47
3.2.	Metodika	48
3.2.1.	PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ KULTUROU.....	48
3.2.1.1.	Kultivace v tekutém médiu	48
3.2.1.2.	Kultivace na pevném médiu.....	48
3.2.1.3.	Razítkování kolonií	48
3.2.1.4.	Sporulace	48
3.2.1.5.	Uchovávání bakteriálních kmenů.....	48
3.2.1.6.	Měření optické denzity bakteriální kultury	48
3.2.1.7.	Příprava kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i>	49
3.2.1.8.	Transformace kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i>	49
3.2.1.9.	Transpozice a vyředění plazmidu u <i>Bacillus subtilis</i>	50
3.2.1.10.	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	50
3.2.1.11.	Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	51
3.2.2.	PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ DNA	52
3.2.2.1.	Izolace chromozomální DNA <i>Bacillus subtilis</i>	52
3.2.2.2.	Izolace chromozomální DNA v gelu	52
3.2.2.3.	Izolace plazmidové DNA	53
3.2.2.4.	Určení čistoty a koncentrace DNA	56
3.2.2.5.	Čištění vzorku DNA pomocí DNA Extraction Kit	56
3.2.2.6.	Čištění vzorku DNA gelovou filtrací	57
3.2.2.7.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	58
3.2.2.8.	Štěpení DNA restrikčními enzymy	58
3.2.2.9.	Separace DNA v agarózovém gelu	59
3.2.2.10.	Southern blotting.....	59
3.2.2.11.	Neradioaktivní značení DNA sondy	60
3.2.2.12.	Vyhodnocení sond	61
3.2.2.13.	Hybridizace	62
3.2.2.14.	Chromogenní detekce	62
3.2.2.15.	Chemiluminiscenční detekce	63
3.2.2.16.	Defosforylace 5' konců restrikčních fragmentů DNA	63
3.2.2.17.	Ligace restrikčních fragmentů DNA	64
3.2.2.18.	Sekvenování	64
3.2.3.	PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ RNA	64
3.2.3.1.	Izolace totální RNA z <i>Bacillus subtilis</i>	65
3.2.3.2.	Odstranění DNA ze vzorku RNA	66
3.2.3.3.	Získání mRNA	66
3.2.3.4.	Separace RNA v agarózovém gelu	67
3.2.3.5.	Převedení mRNA na cDNA	68
3.2.3.6.	Amplifikace cDNA	68
4.	VÝSLEDKY	70
4.1.	Selekce mutant po transformaci a transpozici <i>B. subtilis</i> plazmidem pHV1249	70
4.2.	Restrikční analýza a hybridizace.....	74
4.2.1.	Příprava restrikčních fragmentů DNA pro hybridizaci	74
4.2.2.	Příprava neradioaktivně značené sondy	74
4.2.3.	Hybridizace a detekce	76
4.3.	Amplifikace genů <i>ktrAB</i> a <i>ktrC</i> a <i>ktrD</i> metodou PCR.....	82
4.4.	Sporulace	82
4.5.	Lokalizace mutace.....	83
4.5.1.	Příprava vektorové DNA pro účely klonování.....	83
4.5.2.	Příprava chromozomální DNA pro účely klonování.....	83
4.5.3.	Klonování.....	84

4.6.	Inverzní PCR	85
4.6.1.	Příprava ligačních směsí	85
4.6.2.	Inverzní PCR a sekvenace	86
4.7.	Transkripční profily	86
4.7.1.	Příprava restrikčních fragmentů DNA pro hybridizaci	87
4.7.2.	Příprava neradioaktivně značených sond	87
4.7.3.	Hybridizace a detekce	89
5.	DISKUZE	91
6.	ZÁVĚR	98
	SEZNAM LITERATURY	100

SEZNAM ZKRATEK

amp – antibiotikum ampicilin

Bet – betain

cam – antibiotikum chloramfenikol

CAT – chloramfenikolacetyltransferáza

cat – gen pro chloramfenikolacetyltransferázu

dNTP – deoxynukleotidtrifosfát

ery – antibiotikum erytromicin

Glu – kyselina glutamová

Chol – cholin

kan – antibiotikum kanamycin

LB – Luria Bretani kompletní médium

MM – minerální médium

MS – mechanosenzitivní

OD – optická denzita

PCR – polymerázová řetězová reakce

Pro – prolin

SSM – Schafferovo sporulační médium

TM – transmembránová doména

U – jednotka aktivity enzymu

1. ÚVOD

Bakterie jsou pravděpodobně nejvíce přizpůsobivé žijící organismy na Zemi. Obývají téměř všechna známá prostředí, včetně člověka. Toto jejich úspěšné rozšíření, a to i v nepříznivých podmínkách pro ostatní formy života, je alespoň z části přisuzováno vývoji stresem řízených strategií. Ty dovolují bakteriální buňce vnímat a odpovídat na své vnější okolí. Jedním z takových vnějších parametrů je osmolarita extracelulárního média. Poněvadž je prostředí bakterií permanentně vystaveno změnám osmolarity, byly bakterie nuceny vyvinout účinné adaptační mechanismy, aby se uměly vypořádat s podmínkami hypo- a hyperosmotického stresu.

Bakterie udržují intracelulární osmotický tlak vyšší než v okolí. Výsledkem je hydrostatický tlak (nazývaný též turgor), který je vyvíjen cytoplazmatickou membránou na buněčnou stěnu. Při změně osmolarity dochází i ke změnám turgorového tlaku, které iniciují a regulují záchranné procesy obnovující původní hodnotu turgorového tlaku nezbytnou pro růst buňky.

V naší laboratoři používáme jako modelový organismus grampozitivní bakterii *Bacillus subtilis*. Tato bakterie primárně kolonizuje horní vrstvy půdy, habitat, který je často vystavován výkyvům v dostupnosti vody. Vyrovnat se s těmito osmotickými změnami a zajistit své přežití a růst, *B. subtilis* využívá několik adaptačních mechanismů. Primární odpovědí na zvýšenou osmolaritu je akumulace draselných iontů, následováno syntézou a transportem velkého množství kompatibilních látek (WHATMORE a REED 1990).

Přestože už byly nalezeny některé transportní systémy pro draslík u *Bacillus subtilis* (kapitola 2.4.1.), je velice pravděpodobné, že tyto komplexy nejsou jedinými, které zajišťují příjem draselných iontů z prostředí. Šebestian *et al.* (2001) například biochemicky prokázal ATPázu P-typu indukovanou při nízkých koncentracích, u které však zatím nebyl nalezen žádný odpovídající gen. Mým cílem pak bylo pokusit se nalézt zodpovědné geny pro vysokoafinitní systém pro transport draslíku do *B. subtilis*.

Je také velmi málo známo, jak *Bacillus subtilis* a i ostatní bakterie jsou schopny vnímat změny v osmolaritě svého vnějšího prostředí. Bylo zatím nalezeno velmi málo osmosenzorických proteinů (kapitola 2.3.), které by tyto změny detekovaly. Dosavadní micro-array studie totiž nezaznamenávají výskyt osmosenzorických proteinů, protože mají regulační charakter a jsou transkribovány konstitutivně.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na rozšíření vědomostí o genech zodpovědných za osmosenzorické a osmo adaptační mechanismy u *Bacillus subtilis*. K tomu jsem použila metodu nespecifické inzerční mutagenese a vytvoření fenotypové knihovny a její následné genetické analýzy. Při té jsem používala následující experimentální přístupy: hybridizace specifickou sondou, hybridizace cDNA knihovnou, tvorba chromozomální knihovny, inverzní PCR.

Cíle této diplomové práce byly:

1. příprava osmosenzitivních mutant nespecifickou inzerční mutagenézí
2. charakterizace vybraných mutant
3. lokalizace mutací
4. vyhledání dostupných informací o produktu postiženého genu
5. zjištění rozdílů v transkripčním profilu u divokého kmene a vybraných mutant za normálních podmínek a za osmotického šoku.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Osmotický tlak a turgor

Polopropustná cytoplazmatická membrána je volně propustná pro molekuly vody (příp. několik málo nenabitých molekul jako např. glycerol, močovina, NH_3). Tvoří tak efektivní bariéru pro většinu rozpuštěných látek v okolním prostředí a pro metabolity v cytoplasmě. Celková koncentrace osmoticky aktivních látek rozpuštěných uvnitř buňky je vyšší než v okolním prostředí, což vede k rozdílu chemického potenciálu na obou stranách membrány (WOOD 1999, MORBACH a KRÄMER 2000).

Osmolarita a osmotický tlak jsou termodynamické vlastnosti roztoků. Osmotický tlak vodného roztoku je měřen mezi tímto roztokem a čistou vodou oddělených polopropustnou membránou. Hodnota osmotického tlaku je určena silou vyvinutou na jednotku plochy membrány nutná pro zabránění toku vody membránou do koncentrovanějšího prostředí (RECORD *et al.* 1998).

Pro osmotický tlak platí vztah $\Pi = c_s \cdot R \cdot T$

Π osmotický tlak (Pa)

c_s molární koncentrace rozpouštěné látky (mol/l)

R univerzální plynová konstanta ($\text{J mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T absolutní teplota (K)

(WOOD 1999)

V případě, kdy je roztok zředěn do té míry, že interakce mezi rozpuštěnými látkami v roztoku jsou zanedbatelné, se osmotický tlak zvyšuje úměrně s celkovou molární koncentrací rozpouštěné látky. Při vyšších koncentracích rozpuštěných látek, kdy už jejich interakce nabývají na významu, $\Pi / (R \cdot T)$ už není rovno c_s . Experimentální hodnota $\Pi / (R \cdot T)$ je definována jako osmolarita (RECORD *et al.* 1998).

Vnitřní osmotický tlak v bakteriální buňce je větší než v okolním prostředí. Turgor pak vyrovnává rozdíl osmotického tlaku mezi vnitřním (buněčným) a vnějším prostředím. Turgor je udržován po celou dobu buněčného cyklu konstantní a je považován za nezbytný faktor pro růst buňky. Přenáší se prostřednictvím cytoplazmatické membrány na buněčnou stěnu, rozevívá buněčný povrch a vytváří tak prostor pro inzerci nového materiálu při růstu bakterie. Turgor naměřený u grampozitivních bakterií dosahuje hodnot 2 až 2,5 MPa (cca 20 až 25 atm.). Velikost

turgoru u gramnegativních bakterií je mnohem nižší, asi jen 0,2 až 0,3 MPa (cca 2 až 3 atm.)(KOCH 1983, CHATER a NIKAI DOT 1999).

2.2. Osmoregulace

Jelikož prostředí, které bakterie obývají, je vystaveno neustálým změnám osmolarity, bakterie byly nuceny vyvinout účinný adaptační mechanismus, který se vypořádá s podmínkami hypo- a hyperosmotického stresu. Děje s adaptací spojené jsou souhrnně nazývány jako osmoregulace. Osmoregulace je složitý proces definovaný jako schopnost buňky udržovat turgor v mezích umožňující růst a dělení organismu (WOOD 1999, MORBACH a KRÄMER 2000).

2.2.1. Reakce bakterií na hyperosmotický stres

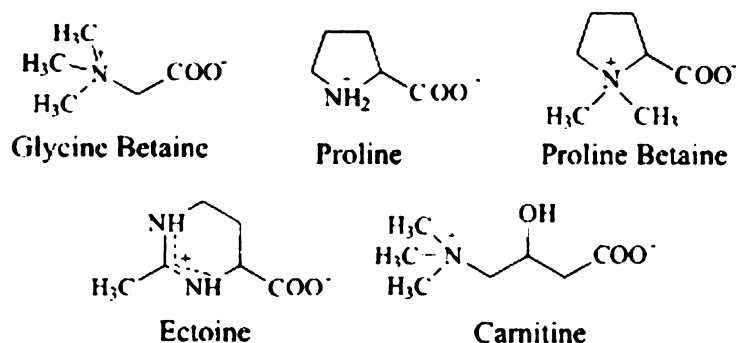
U bakterie v prostředí zvýšené osmolarity dochází k odtoku vody, což vede k její dehydrataci a k redukci či úplné eliminaci turgoru. Ztráta turgoru se dále negativně odráží na fungování základních životních pochodů bakterie. Dočasně se inhibuje replikace DNA a proteosyntéza a může dojít až k zastavení růstu. Bez adaptačních mechanismů pak může dojít u bakterie až k plazmolýze. Aby buňka obnovila tyto životně důležité procesy a mohla se adaptovat na nové podmínky, musí nejprve zvýšit intracelulární hodnotu osmotického tlaku, a tak obnovit pozitivní turgor nezbytný pro její růst (MEURY 1988).

Mikroorganismy vyvinuly dvě základní strategie pro udržení turgoru za hyperosmotických podmínek. Strategie nazývána 'sůl v cytoplazmě' („salt-in strategy“) je zastoupena u extrémně halofilních bakterií, jejichž celá fyziologie je adaptována na život v prostředí s vysokou osmolaritou. (BREMER a KRÄMER 2000). Tyto bakterie hromadí v cytoplazmě anorganické ionty, většinou K^+ a Cl^- , čímž udržují podobnou vysokou koncentraci solí uvnitř buňky jako má okolní prostředí. Díky tomu je cytoplazma vystavena vysoké iontové síle, a proto požaduje značné strukturní adaptace. Proteiny podstupují četné aminokyselinové substituce zahrnující obohacení o aspartát, glutamát a slabé hydrofóbní zbytky (LANYI 1974).

Většina mikroorganismů však využívá jinou strategii, která probíhá ve dvou fázích. V první fázi dochází k rehydrataci cytoplazmy změnou jejího složení pomocí akumulace draselných iontů do cytoplazmy. Jelikož vysoké koncentrace draslíku škodí

buněčným procesům, ve druhé fázi dochází k výměně draselných iontů za kompatibilní látky. Díky těmto změnám může bakterie opět růst (MORBACH a KRÄMER 2000).

Kompatibilní látky jsou vysoce rozpustné molekuly, které nenesou žádný náboj ve fyziologickém pH a nereagují s proteiny (RECORD *et al.* 1998). Z tohoto důvodu mohou být akumulovány nebo nově syntetizovány ve velkém množství a následně přispívat k rehydrataci cytoplazmy zvýšením vnitřní osmolarity. Dále chrání rovněž strukturu proteinů a buněčných komponent před denaturací v roztocích o vysoké iontové síle (YANCEY 1994). Spektrum kompatibilních látek zahrnuje aminokyseliny či jejich deriváty, methylaminy, analogy síry, polyalkoholy a cukry. Glycin-betain, ektoin, prolin a trehalóza jsou nejvíce známé využívané kompatibilní látky ve světě bakterií (KEMPF a BREMER 1998).



Obr.1 : Struktura vybraných kompatibilních látek (WOOD *et al.* 2001)

2.2.2. Reakce bakterií na hypoosmotický stres

Prudké zvýšení vodní aktivity (snížená osmolarita) vnějšího prostředí vede k masivnímu vtékání vody do buňky. Ta zvyšuje turgorový tlak a membránové napětí, což může vést k prasknutí membrány a následné buněčné smrti. Bakterie se vyrovnávají s hypoosmotickým stresem redukcí intracelulární hladiny osmoticky aktivních látek jejich vylučováním do média.

Adaptace se uskutečňuje pomocí mechanosenzitivních (MS) kanálů, které se otevírají pnutím membrány. Jejich prostřednictvím jsou cytoplazmatické látky vypouštěny do prostředí. Bakteriální mechanosenzitivní kanály jsou charakterizovány velkou transportní rychlostí a vodivostí (permeabilita). Kromě toho vykazují malou iontovou a látkovou specifitu. Výsledkem toho je, že MS kanály dovolují téměř okamžitou adaptaci na sníženou vnější osmolaritu (RUFFERT *et al.* 1999).

Tyto mechanosenzitivní kanály byly objeveny u všech typů buněk od bakteriální po savčí. Prokaryotní MS kanály se však strukturou a tvorbou póru liší od eukaryotních systémů, protože ty jsou asociovány s cytoskeletárními proteiny. Nejlépe zatím byly bakteriální MS kanály prostudovány v *Escherichia coli* či *Mycobacterium tuberculosis*. U *E. coli* byly identifikovány 3 různé MS kanály. Podle jejich vodivosti byly pojmenovány MscL, MscS a MscM (MS kanály s velkou „large“, malou „small“ a nejmenší „mini“ vodivostí) (BERRIER *et al.* 1996, PEROZO a REES 2003).

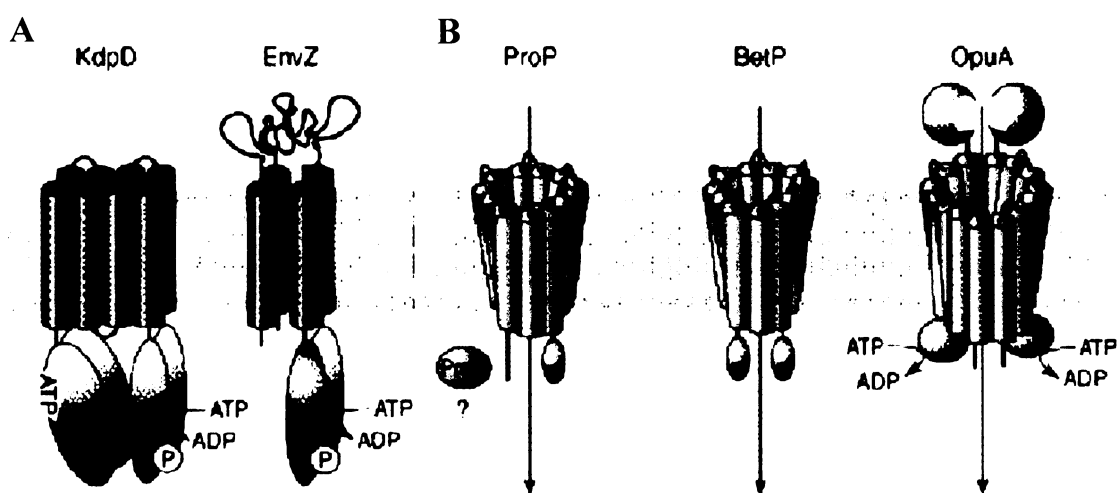
2.3. Osmosenzorické proteiny bakterií

Buněčné odpovědi na osmotický šok jsou teprve spuštěny až po zaznamenání stresové situace. V porovnání se systémem odpovídající na osmotické změny je mechanismus pro detekci osmotických výkyvů velmi špatně prostudován. V principu změny osmotických podmínek mohou být detekovány přímo, jako jsou změny v extracelulární vodní aktivitě, nebo nepřímo, jako změny ve struktuře buněčné stěny či cytoplazmatické membrány nebo ve složení cytoplazmy. Možné mechanismy detekce změn osmolarity mohou být :

1. vnější osmolarita nebo vodní aktivita – pravděpodobně je zaznamenána transmembránovými proteiny se senzorkými místy na extracelulární straně membrány
2. turgorový tlak – změny turgoru mohou být detekovány senzory tlaku v cytoplazmatické membráně
3. vnitřní hydrostatický tlak – změny hydrostatického tlaku jsou izotropické a velmi malé ($< 0,5$ mPa), přesto způsobují změny a jsou tudíž detekovatelné na úrovni protein-proteinových a protein-ligandových interakcí
4. napětí membrány – při rozpínání či stlačování cytoplazmatické membrány dochází ke změnám tlaku v lipidické dvojvrstvě, které mohou být také detekovány membránovými senzory tlaku
5. vnitřní osmolarita nebo vodní aktivita
6. zakoncentrování makromolekul jako následek změny cytoplazmatického objemu
7. koncentrace specifických rozpustných látek (např. draselných iontů).

(BREMER a KRÄMER 2000, SLEATOR a HILL 2001, MORBACH a KRÄMER 2002)

Do dnešní doby byly nalezeny a podrobně popsány tyto osmosenzorické proteiny : KdpD, EnvZ a ProP z *Escherichia coli*, BetP z *Corynebacterium glutamicum* a OpuA z *Lactococcus lactis* . Můžeme je rozdělit na dvě skupiny. První skupina osmosenzorů jsou kinázy dvousložkového systému, který přenáší signál o změně osmolarity na transkripční aparát buňky. Mezi tyto kinázy můžeme zařadit KdpD a EnvZ z *E. coli*. Druhá skupina jsou proteiny, které fungují jako osmosenzory tak i jako transportéry kompatibilních látek. Tyto transportéry pak řídí průtok kompatibilních látek na základě změny osmolarity vnějšího prostředí. Představiteli této skupiny jsou ProP z *E. coli*, BetP z *C. glutamicum* a OpuA z *L. lactis* (Obr.2).

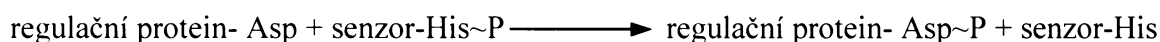
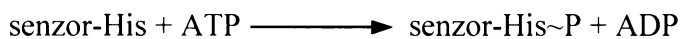


Obr.2 : Osmosenzorické proteiny (HEERMANN a JUNG 2004).

A – osmosenzory, které regulují exprese genů kódující osmoregulační proteiny
 B – osmosenzory s transportní funkcí

2.3.1. Kinázy dvousložkového systému

Navzdory velké rozmanitosti stimulů a odpovědí poměrně malý počet molekulárních strategií je využíván pro signalizaci. Jedna ze základních strategií využívá dvousložkový regulační systém. Ten se skládá ze sensorového proteinu, který detekuje signál, a regulačního proteinu, který se váže na DNA a kontroluje expresi genů. Sensorový protein je nejčastěji nalezen v cytoplazmatické membráně, kde může sledovat změny v okolním prostředí. Po detekci signálu se sensorový protein sám fosforyluje pomocí ATP ve svém aktivním místě obsahující histidinový zbytek. V další fázi je fosfát velmi rychle přenesen na aspartátovou skupinu regulačního proteinu.



Fosforylovaný regulační protein se váže do promotorové oblasti genů, které umožňují bakteriím prostřednictvím svých produktů vytvářet cílené odpovědi na změnu signálu přicházejícího z prostředí. Stejný fosforylovaný regulační protein může také působit jako represor pro některé geny a tím aktivovat jiné (CLARK 1999).

Regulace dvousložkového systému je určena úrovní fosforylace regulačního proteinu. Dvousložkový regulační systém má totiž také autofosfatázovou aktivitu, která omezuje dobu existence fosforylovaného stavu (řádově sekundy až hodiny). V některých systémech se mohou vyskytovat pomocné fosfatázy nebo proteiny, které zvyšují autofosfatázovou aktivitu a urychlují tak defosforylaci regulačního proteinu. Jak přenos fosfátu tak fosfatázová aktivita histidinkinázy může být regulována buď přímo prostřednictvím stimulů (v případě transmembránového senzoru) nebo nepřímo pomocí interakcí s pomocnými proteiny (v případě cytoplazmatických histidinkináz) (WEST a STOCK 2001).

2.3.1.1. KdpD

Schopnost transportovat draslík je nezbytná pro všechny žijící organismy, protože K^+ ionty aktivují řadu enzymů, jsou zapotřebí pro udržování buněčného pH i pro regulaci genové exprese. Zdaleka největší množství buněčného draslíku je však využito na udržení buněčného turgoru.

Bakterie mohou získávat K^+ pouze hromaděním z prostředí. Transport draselného iontu byl nejlépe prostudován u *Escherichia coli*. Ta disponuje nízkoafinitními transportními systémy jako jsou TrkG, TrkH a KupD s hodnotou K_m 0,3-3 mM, které obstarávají pro buňku draslík za normálních růstových podmínek (BOSSEMEYER *et al.* 1989, SCHLÖSSER *et al.* 1991, ALTENDORF a EPSTEIN 1994). Při nízkém turgorovém tlaku, který je způsoben buď nedostatkem draslíku v prostředí (když ho není dostatečné množství pro Trk systém) nebo hyperosmotickým stresem, indukuje *E. coli* vysokoafinitní K^+ transportní systém ($K_m=2\mu\text{M}$) označovaný jako Kdp (EPSTEIN 1992, MALLI a EPSTEIN 1998).

Systém Kdp patří do třídy P-ATPáz a skládá se z komplexu čtyř membránově vázaných podjednotek KdpA, KdpB, KdpC a malého peptidu KdpF. Geny kódující tyto

čtyři proteiny jsou organizovány v operonu *kdpFABC*. V sousedství *kdpC* genu je *kdpDE* operon, který kóduje regulační dvoukomponentový systém KdpDE (EPSTEIN 1992, GASSEL *et al.* 1998).

Kdp komplex má oligomerní strukturu. Největší podjednotka KdpB (72 kDa) je homologní s velkou podjednotkou jiných P-typů ATPáz. Membránou prochází celkem šestkrát a během transportu draselných iontů přijímá fosfát od ATP. Další podjednotkou Kdp systému je KdpA, která nemá homologa u jiných P-typů ATPáz. Z toho vyplývá, že u ní probíhal jiný evoluční vývoj než u eukaryotických draslíkových kanálů. Její velikost je 59 kDa a obsahuje 10 transmembránových domén. Tato podjednotka váže do dvou vazebných míst K^+ a transportuje je přes membránu. KdpC podjednotka (20 kDa) má N- a C- konec v cytoplasmě a membránou prochází pouze jedenkrát. Lze usuzovat, že tato podjednotka tvoří silné interakce s KdpA a tím stabilizuje celý Kdp komplex. KdpF je nejmenší součástí transportéru a jeho přítomnost není esenciální pro funkci Kdp komplexu *in vivo*. *In vitro* je však nezbytnou stabilizační součástí Kdp ATPázy, neboť absence KdpF vede k velkému poklesu její enzymatické aktivity (GASSEL *et al.* 1998).

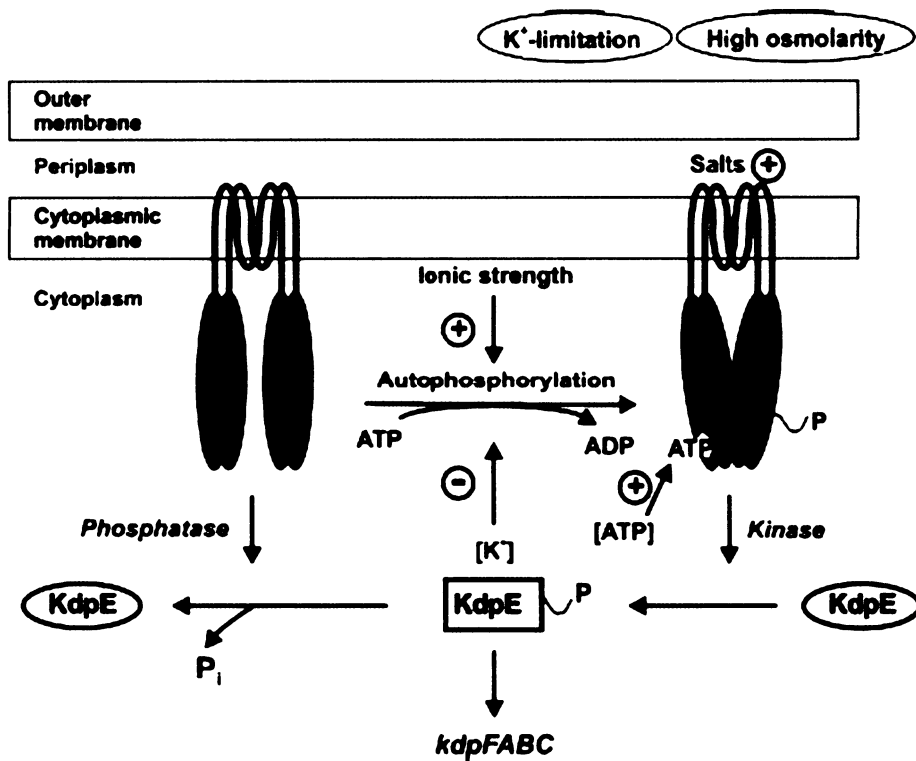
Exprese *kdpFABC* operonu je regulována proteiny KdpD a KdpE. KdpD je sensorová kináza umístěná v cytoplazmatické membráně a KdpE je regulační protein lokalizován v cytoplasmě. Funkční formou KdpD je dimer a každý jeho monomer se skládá z velké cytoplazmatické hydrofilní N-terminální domény, 4 transmembránových domén (TM1-TM4) a zvětšené cytoplazmatické C-terminální přenašečové domény, která obsahuje typické sekvenční motivy pro sensorické kinázy (HEERMAN *et al.* 1998, 2003). Zatímco pro transportní proteiny jsou transmembránové segmenty nepostradatelné, v případě KdpD nejsou tyto segmenty esenciální pro sensorovou funkci, ale jsou důležité pro správnou vzájemnou polohu N- a C-terminální domény (HEERMANN a JUNG 2004). KdpD podstupuje *trans*-fosforylaci γ -fosfátem z ATP na konzervovaném histidinovém zbytku v pozici 673, a následně rychle proběhne fosforylace regulačního proteinu KdpE na Asp52 zbytku. Fosforylovaný KdpE má zvýšenou afinitu k sekvenci 23 páru basí, jež leží proti směru transkripce v promotorové oblasti operonu *kdpFABC*, a tím spouští transkripci tohoto operonu (HEERMAN *et al.* 1998).

KdpD katalyzuje několik reakcí: vlastní autofosforylaci, přenos fosfátové skupiny na KdpE a defosforylaci KdpE~P. Fosfatázová aktivita KdpD se uplatňuje při obnovení intracelulární koncentrace K^+ . Autofosforylační aktivita KdpD je inhibována

zvýšenou koncentrací K^+ a zároveň stimulována iontovou silou z vnitřního prostředí buňky. Soli v okolním prostředí (NaCl, KCl) také stimulují kinázovou aktivitu KdpD, zatímco cukry mají jen slabý nebo žádný účinek (JUNG *et al.* 2000).

Stimul pro aktivaci Kdp systému nebyl doposud přesvědčivě stanoven. Není známo jak koncentrace K^+ iontů v médiu je detekována senzorem ani jak KdpD interaguje přímo s K^+ ionty (ROTHENBÜCHER *et al.* 2006). Jeden z návrhů předpokládá, že draselné ionty se vážou na cytoplazmatické domény KdpD a tím inhibují autofosforylační aktivitu KdpD. Při nedostatku draslíku v prostředí klesá intracelulární koncentrace K^+ pod určitou hodnotu a tím je dočasně přerušen inhibiční účinek K^+ na KdpD autofosforylační aktivitu. Dále v důsledku snížení draselných iontů v prostředí nebo následkem hyperosmotického šoku bakterie ztrácí vodu, což vede k zvýšení koncentrace všech molekul, které postupně zvyšují iontovou sílu. Těmito procesy pak dochází k autofosforylaci KdpD (JUNG *et al.* 2000).

Byly provedeny pokusy, aby se objevilo, které části proteinu KdpD jsou přesně zodpovědné za citlivost ke změnám osmolarity. Byly vytvořeny mutace uvnitř transmembránových oblastí KdpD, které způsobily ztrátu citlivosti ke K^+ iontům. Buňky obsahující tyto mutantní proteiny byly ale schopné odpovědět na hyperosmotický stres. Tyto výsledky pak naznačují, že KdpD detekuje dva signály : koncentraci K^+ iontů a fyzicko-chemický stav cytoplazmatické membrány prostřednictvím komunikace mezi N- a C-cytoplazmatickými terminálními doménami (ROTHENBÜCHER *et al.* 2006). Dále je možná regulace KdpD prostřednictvím koncentrace ATP. N-terminální doména obsahuje totiž ATP regulační místo a během osmoadaptace dochází k přechodnému zvýšení koncentrace ATP (HEERMAN a JUNG 2004).



Obr.3 : Model regulace aktivity KdpD (MORBACH a KRÄMER 2002)

2.3.1.2. EnvZ

Bakterie *Escherichia coli* patří do skupiny gramnegativních bakterií, a proto obsahuje nad tenkou buněčnou stěnou ještě vrstvu vnější membrány. Z toho důvodu potřebuje bakterie regulovat příjem a vypouštění látek už přes tuto membránu. Tuto úlohu zprostředkovává histidinkináza EnvZ, jež reguluje transkripci pórů vnější membrány OmpF a OmpC.

EnvZ leží ve vnitřní membráně bakterie a je součástí dvousložkového systému využívající strategii fosforylace svých aminokyselinových zbytků. Působí jako histidinkináza, která přenáší signál o změně osmolarity z periplazmatického prostoru do cytoplazmy a následně se pomocí regulačního proteinu OmpR začnou exprimovat buď porinové proteiny OmpF či OmpC. (CAI *et al.* 2003). Při změnách osmolarity média tato kináza EnvZ podstupuje *trans*-autofosforylaci intracelulárním ATP na konzervovaném His243 aminokyselinovém zbytku a následně je tato vysoce fosforylovaná skupina přenesena na konzervovaný Asp55 zbytek regulačního proteinu OmpR. Fosforylovaný OmpR pak funguje jako transkripční faktor pro geny hlavních vnějších membránových pórů *ompC* a *ompF*. EnvZ má také OmpR~P fosfatázovou aktivitu, která usnadňuje defosforylaci tohoto regulačního proteinu. Podíl kinázové a

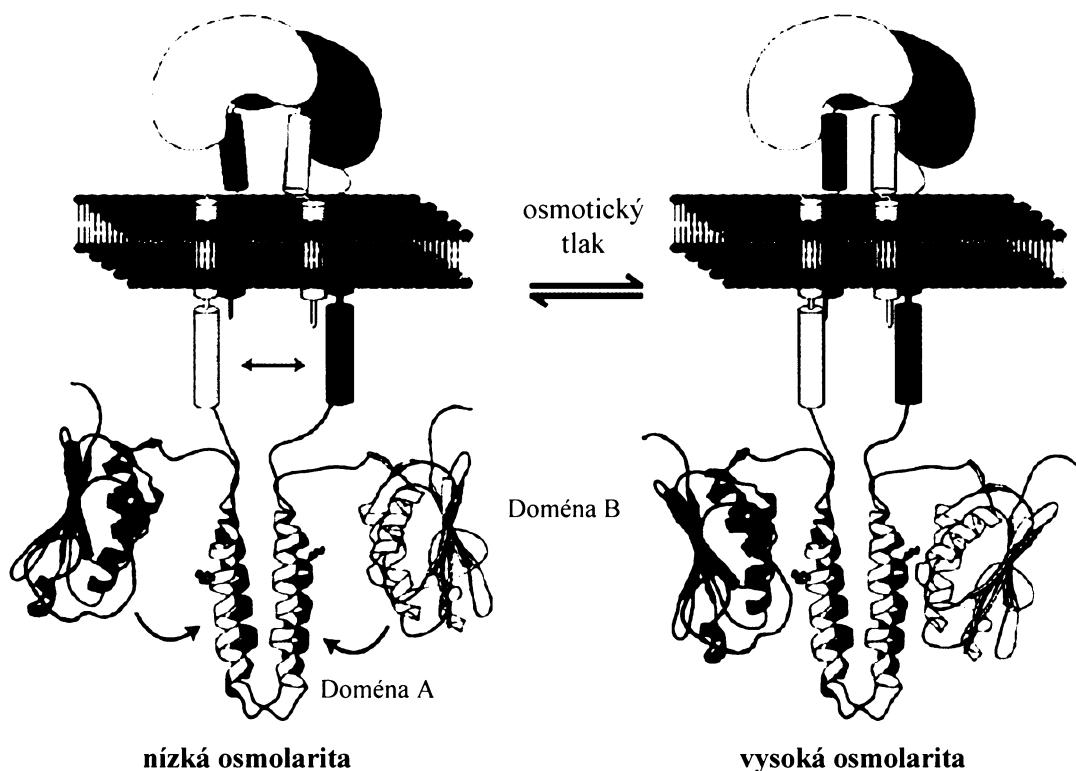
fosfatázové aktivity EnvZ, a tím i úroveň OmpR~P řídící transkripci *ompC* a *ompF*, závisí na osmolaritě média. V médiu o vysoké osmolaritě je podíl kinázové ku fosfatázové aktivitě zvýšen a v buňce se zvyšuje hladina OmpR~P. Fosforylovaný OmpR pak funguje jako transkripční aktivátor zvyšující transkripci *ompC* a zároveň jako represor bránící transkripci *ompF* svou vazbou do promotorové oblasti genů pro tyto proteiny. Při nízké osmolaritě je podíl kinázové ku fosfatázové aktivitě naopak snížen, čímž v buňce ubývá OmpR~P a může proběhnout transkripce z promotoru *ompF* (CAI a INOUE 2003).

Exprese *ompF* je také regulována na posttranskripční úrovni prostřednictvím antimediátorové MicF RNA. Tato RNA je syntetizována z nekódujícího vlákna DNA genu *ompC* a je komplementární k sekvenci místa pro iniciaci translace na mRNA *ompF*. Vazba MicF RNA zabrání translaci a hraje tak roli negativního regulátora exprese *ompF*. Hladina antisense MicF RNA se zvyšuje společně s transkripcí genu *ompC* za vysokých koncentrací proteinu OmpR~P. Podobný mechanismus posttranskripční regulace se prokázal i u genu *ompC*. Tato antimediátorová RNA byla pojmenována jako MicC RNA (PRATT *et al.* 1996, CHEN *et al.* 2004).

Osmosenzor EnvZ je homodimer složený ze 450 aminokyselin a obsahuje 4 hlavní úseky : periplazmatickou doménu, 2 transmembránové domény, spojovací oblast a cytoplazmatickou doménu označovanou jako EnvZc. Tato poslední doména vlastní jak kinázovou tak fosfatázovou aktivitu může být dále rozdělena na 2 subdomény, doménu A a B. Doména A (aminokyselinové zbytky 223-289) obsahuje autofosforylační místo (His243) a zprostředkovává dimerizaci EnvZ. Její podjednotky tvoří svazek 4 helixů. Doména B (zbytky 290-450) je monomer vázající ATP. Doména A obsahující fosforylační místo může být za přispění domény B fosforylována ATP. Na defosforylaci OmpR~P se účastní jen doména A v přítomnosti hořčičných iontů. Doména B nemá fosfatázovou aktivitu, ale může ji nepatrně stimulovat v přítomnosti navázaného ADP. Fosfatázová a kinázová aktivita je ale hlavně regulována prostorovým uspořádáním mezi doménami A a B (CAI *et al.* 2003).

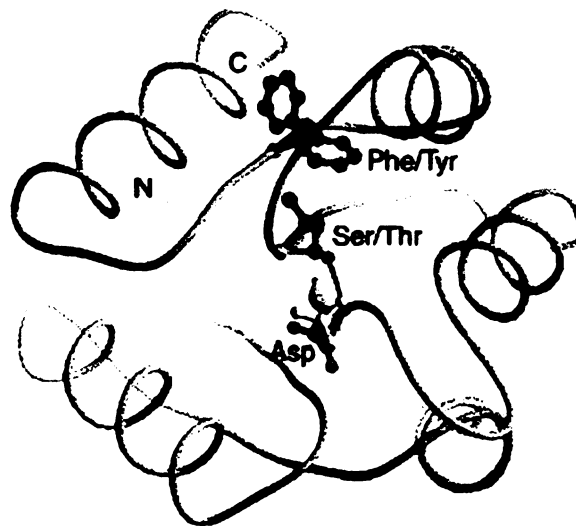
Aktivace EnvZ nebyla *in vivo* doposud objasněna, ale v proteoliposomech bylo dokázáno, že kinázová aktivita je stimulována draselnými ionty v cytoplazmě. Na rozdíl od osmosenzoru KdpD však nemají draselné ionty inhibiční vliv na jeho autokinázovou aktivitu (HEERMAN a JUNG 2004). Předpokládá se, že periplazmatická doména jako první reaguje na změnu osmolarity v okolním prostředí. Podle studie od KNORCHID *et al.* (2005) se za vysoké osmolarity N-části periplazmatické domény dimeru EnvZ sblíží,

což má za následek převedení signálu přes membránu pomocí poklesu, rotace a naklonění transmembránových helixů. Jako výsledek se doména B přiblíží k doméně A a může dojít k fosforylaci His243 (Obr.4).



Obr.4 : Model přenosu signálu z periplazmatického prostoru na cytoplazmatickou doménu (KNORCHID *et al.* 2005).

Regulační protein OmpR (27 kDa) se skládá z N-terminální fosforylační domény a C-terminální domény vázající se na DNA pomocí helix-turn-helix motivu. Fosforylační místo (Asp55) je lokalizováno na amino-konci nazývaný též jako receptorová doména. Ta také obsahuje v aktivním místě skupinu konzervovaných aminokyselinových zbytků, které jsou důležité pro fosforylaci a šíření signálu. Jsou to : aspartátový zbytek, který je místem fosforylace (D55), 2 další aspartátové zbytky koordinující hořečnatý iont (D11 a D12), lysinový zbytek interagující s fosforylovanou skupinou (K105), aromatický zbytek fungující jako rotamer (Y102) a postranní hydroxylový zbytek (T83), který také interaguje s fosforylovanou skupinou. V přítomnosti kinázy je kyselý fosfát nekovalentně vázán k hořečnatému iontu do aktivního místa OmpR a oba jsou stabilizovány interakcemi postranních konzervovaných aminokyselin a molekul vody (MATTISON *et al.* 2002).



Obr.5 : Diagram aktivního místa OmpR. Pozice 3 konzervovaných zbytků jsou zakresleny červeně před a zeleně po fosforylaci. Fosforylovaná skupina je žlutě vybarvena (MATTISON *et al.* 2002).

2.3.2. Osmosenzory s transportní funkcí

Některé bakteriální transportéry kompatibilních látek mohou být přímo zaktivovány zvýšenou osmolaritou a to i bez předchozí proteinové syntézy. Osmotický stres totiž mění vlastnosti lipidické dvojvrstvy a tím se mohou ovlivnit lipid-proteinové interakce mezi cytoplazmatickou membránou a transportérem. Zrušením nebo pozměněním těchto interakcí může pak dojít ke konformační změně transportéru a tím ke zvýšení transportní aktivity transportérů a následně k přenosu kompatibilních látek do buňky (POOLMAN *et al.* 2004).

Do dnešní doby byly nalezeny a prostudovány tyto osmosenzory s transportní funkcí : ProP z *Escherichia coli*, BetP z *Corynebacterium glutamicum* a OpuA z *Lactococcus lactis*.

2.3.2.1. ProP

Sekundární transportér ProP z *Escherichia coli* byl prvním přenašečovým proteinem, u kterého bylo prokázáno, že funguje zároveň jako osmoregulační protein tak i jako osmosenzor. Jedná se o jednosložkový H⁺-symportér přenášející široké spektrum kompatibilních látek, které jsou strukturně podobné prolinu a glycin-betainu (MacMILLAN *et al.* 1999). Aktivita transportéru se zvyšuje při vysoké osmolaritě. Vystavením bakterie, kultivované za nízké osmolarity, osmotickému šoku způsobeného sacharosou či NaCl se příjem prolinu zvýší přinejmenším 7 krát s poločasem aktivace 1 minuty (CULHAM *et al.* 2000).

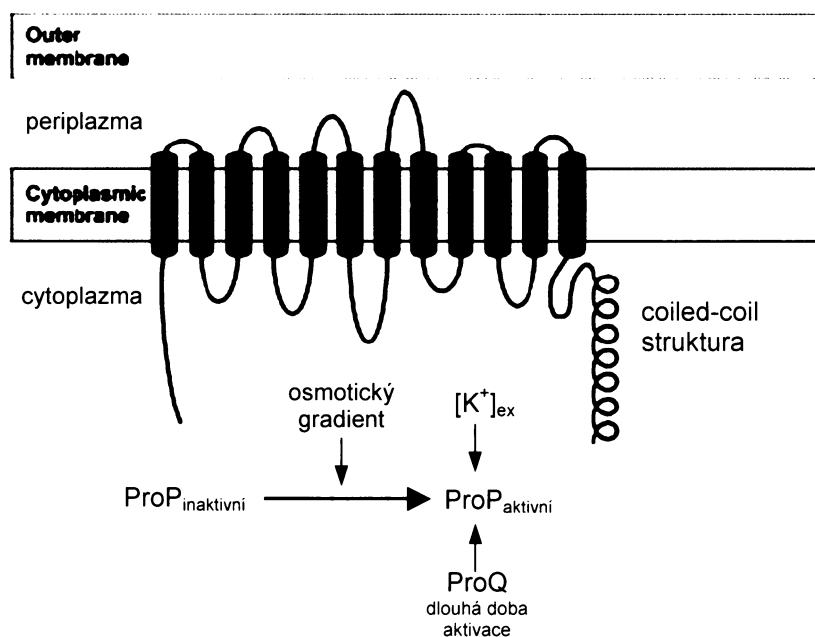
Transkripce genu *proP* je řízena dvěma promotory, P1 a P2. Aktivita *proP*-P1 je normálně potlačena cAMP-CRP komplexem, který se váže na místo přesahující oblasti (poloha -35). Aktivita *proP*-P2 je závislá na alternativním sigma faktoru RpoS a na DNA vazebném proteinu FIS. *ProP* je tak členem třídy genů závislých na RpoS, které se aktivují ve stracionární fázi a za zvýšené osmolarity (BREMER a KRÄMER 2000).

ProP se skládá z 500 aminokyselin a obsahuje 12 transmembránových segmentů s N- a C-terminálními hydrofilními doménami, které směřují do cytoplasmy. Liší se však od podobných příbuzných transportérů svou C-terminální doménou, která je esenciální pro jeho aktivitu (SEOL a SHATKIN 1993). Zkrácení C-konce má totiž za následek významnou redukci jeho transportní aktivity. Z toho jasně vyplývá, že struktura C-terminální domény určuje citlivost ProP vůči osmotickému šoku a stabilitu jeho aktivní konformace (CULHAM *et al.* 2000). Tato doména je složena ze 46 aminokyselin, které se opakují po 6 až 7 aminokyselinách v tzv. heptahedních pozicích. Doména tvoří α -helikální coiled-coil strukturu, přes kterou se ProP antiparalelně dimerizuje. Typická sekvence coiled-coil struktury obsahuje opakování 7 aminokyselin označených běžně písmeny $(abcdefg)_n$, kde aminokyselinové zbytky v pozicích *a* a *d* jsou převážně hydrofóbní, zatímco v pozicích *b*, *c*, *e*, *f* a *g* jsou obvykle nabitě či polární. Pro tvorbu antiparalelní orientace coiled-coil struktury je však nejdůležitější zbytek R488. Ten tvoří 2 interhelikální solné můstky v hydrofóbním jádře, které jsou důležité pro stabilizaci antiparalelního uspořádání a mohou tak zprostředkovat dimerizaci proteinu ProP (ZOETEWY *et al.* 2003).

Aktivaci transportéru ProP se účastní i protein ProQ. Je to bazický hydrofilní protein skládající se z 232 aminokyselin, u kterého nebyly nalezeny žádné sekvenční homology se známou funkcí. ProQ obsahuje vysoce bazickou N-terminální doménu, která může interagovat s kyselými oblastmi ProP (POOLMAN *et al.* 2004, WOOD *et al.* 2005).

Zvýšení extracelulární osmolarity vede ke strukturální změně transportéru pomocí zvyšující se koncentrace cytoplazmatických rozpustných látek. Tato změna vede k nové konformaci transportéru, která je aktivní ale nestabilní. V důsledku konformační změny však může C-terminus tvořit homodimerickou coiled-coil strukturu a ProP se může dimerizovat. Dimer je pak dále stabilizován interakcí s ProQ. Celý tento ternární komplex pak vytváří nejstabilnější aktivní formu ProP (POOLMAN *et al.* 2004).

Prozatím se však přesně neví, které signály aktivují transportér ProP. Do dnešní doby byly odhaleny jen nepřímé důkazy, že jedním z významných stimulů jsou draselné ionty. K^+ má však tak rozmanitý vliv na buněčné funkce, že neexistuje jednoznačný vzájemný vztah mezi aktivací ProP a K^+ (KOO *et al.* 1991). Dalším signálem, o kterém se předpokládalo, že aktivuje ProP, je turgorový tlak. Tento předpoklad se však ukázal jako nepravděpodobný, protože ProP v proteoliposomech postrádající buněčnou stěnu také fungoval jako osmosenzor (RACHER *et al.* 1999).



Obr.6 : Model aktivačního procesu ProP z *E.coli* při hyperosmotickém stresu. ProP je plně aktivován po osmotickém šoku membránově nepropustnými látkami způsobující osmotický gradient. Kromě toho aktivace ProP ještě závisí na dostupnosti exogenních draselných iontů (MORBACH a KRÄMER 2002).

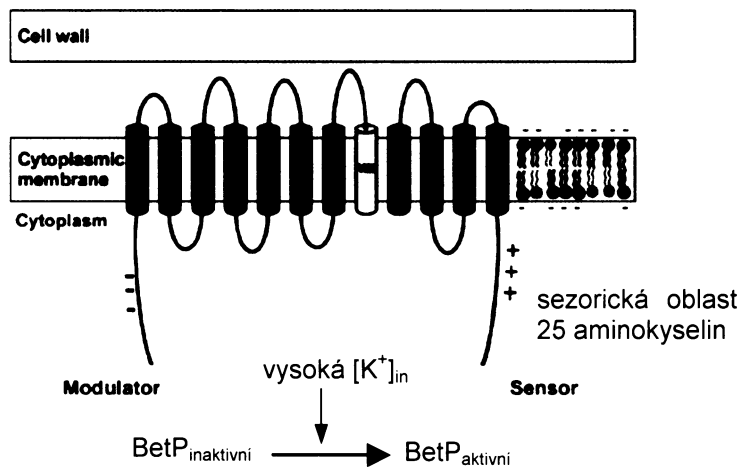
Coiled-coil struktura se zdá být specifickým znakem pro ProP z *E.coli*, protože ostatní osmosenzory tuto strukturu postrádají. Jen u dvou orthologů ProP bylo identifikováno rozšíření na C-konci proteinu: OusA z *Erwinia chrysanthemi* (80% sekvenční identita) a ProP z *Corynebacterium glutamicum* (ProPCg, 37% sekvenční identita). OusA má stejnou sekvenci na C-konci jako ProP a s velkou pravděpodobností tvoří i α -helikální coiled-coil strukturu. Naproti tomu C-konec ProPCg se významně odlišuje od ProP či OusA v tom smyslu, že neobsahuje heptahední opakování aminokyselin, které je charakteristické pro coiled-coil sekvenci. Přesto podstupuje ProPCg osmotickou aktivaci, což naznačuje, že coiled-coil doména pro tuto funkci není esenciální (CULHAM *et al.* 2000).

2.3.2.2. BetP

Corynebacterium glutamicum, grampozitivní půdní bakterie využívaná na výrobu aminokyselin, je vybavena celkem 4 transportéry přenášející kompatibilní látky. Mezi ně patří vysokoafinitní sekundární transportér BetP, který je členem rodiny BCCT (betain, karnitin, cholin, transportní rodina). BetP má specifitu pro transport glycin-betainu, který přenáší společně s 2 sodnými ionty. Dalšími sekundárními transportéry jsou ProP upřednostňující přenos ektoinu a prolinu a nízkoafinitní EctP přenášející všechny 3 zmíněné kompatibilní látky. Všechny tyto 3 systémy jsou účinně regulovány na úrovni své aktivity a BetP s ProP jsou ještě kontrolovány na úrovni genové exprese. Posledním transportérem *C. glutamicum* je PutP přenášející prolin, ale není využíván při osmoregulaci bakterie (WOOD *et al.* 2001).

BetP je složen z 595 aminokyselin a obsahuje 12 transmembránových segmentů a N- a C-terminální domény orientované do cytoplasmy. N-terminální doména se skládá přibližně z 62 hydrofilních aminokyselin, které nesou převážně záporně nabitou postranní skupiny. Naproti tomu C-terminální doména z 55 aminokyselin nese kladný náboj. Tyto 2 domény fungují jako osmosenzory a přenášejí signál o změně osmolarity na katalytické domény proteinu (RÜBENHAGEN *et al.* 2001, WOOD *et al.* 2001).

BetP má celkem tři různé funkce. První z nich je transport glycin-betainu, druhou funkcí je přizpůsobení příjmu kompatibilní látky podle míry hypertonicity a poslední funkcí je zaznamenání osmotického stresu bez pomoci dalších proteinů či kofaktorů (SCHILLER *et al.* 2006). Signálem spouštějící aktivaci BetP je s největší pravděpodobností zvýšená koncentrace draselných iontů v cytoplasmě. 25 terminálních aminokyselin na C-konci totiž interaguje s cytoplazmatickými K^+ ionty a tím přenáší signál na katalytické domény transportéru (RÜBENHAGEN *et al.* 2001). Aktivace transportéru je dále ovlivněna celkovou konformací C-terminální domény a složením okolních fosfolipidů v membráně, obzvláště náboj membránového povrchu. Bylo zjištěno, že membránový povrch *C. glutamicum* je vysoce kyselý a může tak interagovat s kladně nabitou C-terminální doménou. Při osmotickém stresu zvýšená intracelulární koncentrace draselných iontů indukuje konformační změnu C-terminální domény BetP. Výsledkem pozměněné konformace se interakce s negativně nabitou membránou destabilizují, což má pak za následek aktivaci BetP (KRÄMER a MORBACH 2004, SCHILLER *et al.* 2006).



Obr.7 : Model aktivace BetP *C. glutamicum* za hyperosmotického šoku (MORBACH a KRÄMER 2003).

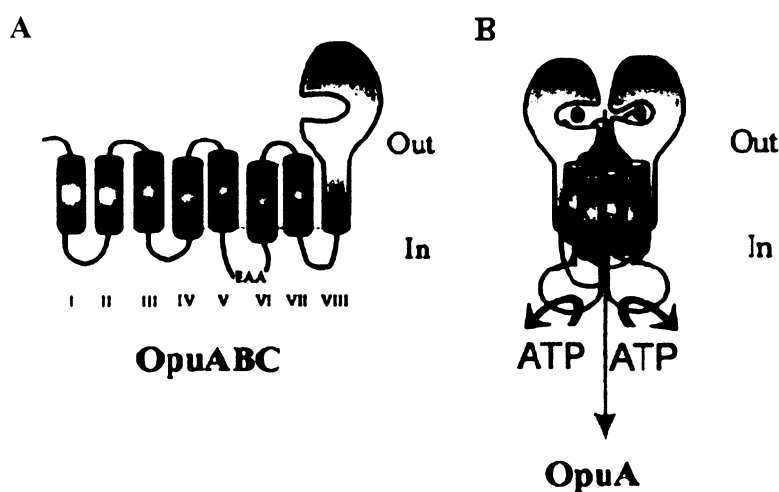
2.3.2.3. OpuA

Grampozitivní bakterie *Lactococcus lactis* vyrovnává hyperosmotický šok převážně kompatibilními látkami glycin-betainem nebo karnitinem. Poněvadž mléčné acidické bakterie mají limitovanou biosyntetickou kapacitu, organické kompatibilní látky jsou hlavně přenášeny z média pomocí transportéru OpuA (POOLMAN a GLAASKER 1998).

Glycin-betainový přenašeč OpuA patří do nadrodiny ABC transportérů (ATP-vázající rodina). ABC transportéry nalezené u všech prokaryotních a eukaryotních druhů využívají hydrolýzu ATP k přenosu substrátu přes buněčnou membránu. Prokaryotické ABC transportéry využívají k zachycení substrátu specifické substrát vázající proteiny (SBP). OpuA systém se skládá ze 2 translokačních podjednotek (OpuABC) s SBP na svých C-terminálních koncích a ze 2 ATPázových podjednotek (OpuAA) (van der HEIDE a POOLMAN 2000, BIEMANS-OLDEHINKEL a POOLMAN 2003).

Translokace začíná navázáním glycin-betainu na SBP. Po zasunutí komplexu substrát-SBP mezi transmembránové domény se stimuluje ATPázová aktivita transportéru. Následkem toho je substrát uvolněn z SBP a přenesen na vazebné místo transmembránových domén. Toto vazebné místo se přeorientuje, aby směřovalo do buňky, otevře se cytoplazmatická brána a substrát je uvolněn do buňky. Po přenosu substrátu přes membránu je SBP disociován a transportér se vrátí do počátečního stavu pomocí disociace ADP a anorganického fosfátu (BIEMANS-OLDEHINKEL a POOLMAN 2003).

Změny v prostředí jsou zaznamenány OpuA proteinem pomocí změn v intracelulární koncentraci iontových osmolytů. Aktuální osmotická aktivita nezávisí jenom na cytoplazmatické iontové síle, ale také na složení iontových lipidů v membráně. Důležité iontové interakce mezi proteinem a lipidy na cytoplazmatické straně totiž dovolují vnitřní iontové síle specificky regulovat aktivitu OpuA. Primárním signálem spouštějící přenos glycin-betainu při osmotickém stresu slouží změny v intracelulární iontové síle (van der HEIDE *et al.* 2002). Podle nejnovějších poznatků je signál o změně iontové síly zaznamenán CBS (cystathionin-beta-syntetáza) doménami, které jsou kovalentně připojené k ATPázové podjednotce. Funkční transportér je dimer, tudíž OpuA obsahuje celkově 4 CBS domény. V inaktivním stavu CBS domény interagují s lipidy v membráně mající aniontový charakter. Transportér je však aktivován, když koncentrace solí (iontová síla) překročí určitý práh a překoná tak vazebnou energii elektrostatických interakcí CBS domén s membránou. Této aktivaci napomáhá C-aniontový konec transportního proteinu, který s interakcí s draselnými ionty snižuje aktivační práh OpuA systému (BIEMANS-OLDEHINKEL *et al.* 2006, MAHMOOD *et al.* 2006).



Obr.8 : Schématické znázornění transportéru OpuA z *Lactococcus lactis* (BIEMANS-OLDEHINKEL a POOLMAN 2003).

A : Podjednotka Opu ABC s funkcí navázání a translokací substrátu.

B : Stavba celého OpuA transportéru složeného ze 2 kopií OpuABC a 2 kopií OpuAA (ATPázová podjednotka).

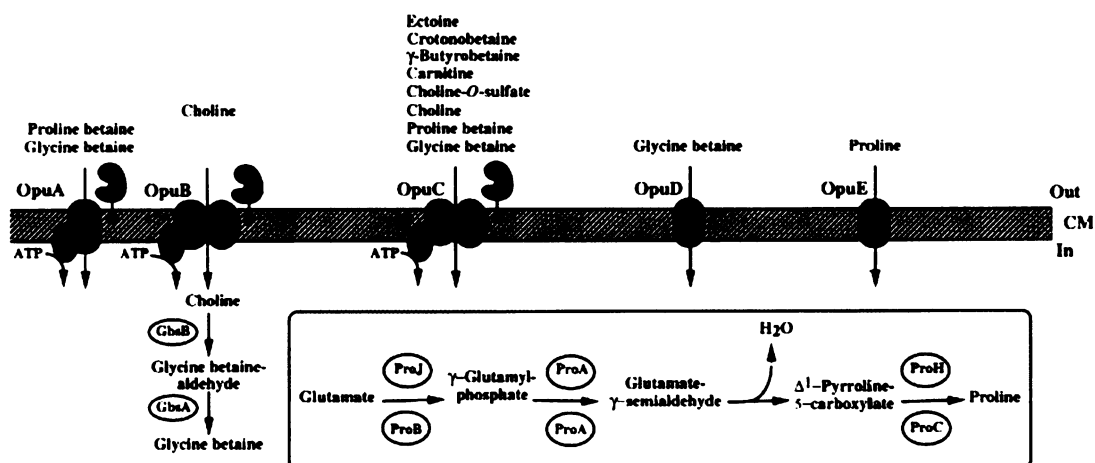
2.3.3. Osmosenzorické proteiny u *Bacillus subtilis*

B. subtilis je půdní bakterie, a proto je možná více než ostatní vystavena velkým a náhlým změnám osmotických podmínek. Děšť a sucho mohou buňku snadno ohrozit prasknutím nebo dehydratací. Proto náhlé osmotické změny spouští různé procesy chránící bakterii před vysokou a nízkou osmolaritou.

Mechanismy, kterými bakterie rozpoznává změny svého okolí, jsou však dodnes u *B. subtilis* neznámé. Je však možné, že některý z Opu systémů by mohl tuto funkci vykonávat. Jsou to transportní systémy pro kompatibilní látky (Obr.9). Například OpuA homologní k OpuA z *Lactococcus lactis* patří pravděpodobně do OTCN (osmoprotectants taurine cyanate and nitrate) rodiny, která používá CBS domény jako senzor okolního prostředí (MAHMOOD *et al.* 2006). Podle HORN *et al.* (2003) je rovnováha mezi monomerem a funkčním dimerem jednotky OpuAA z transportéru OpuA *B. subtilis* závislá na koncentraci nukleotidů a solí (iontová síla). Také transportér OpuD by mohl být možným kandidátem. Má totiž velmi podobnou strukturu jako osmosenzor a transportér BetP z *Corynebacterium glutamicum* (WOOD 1999). OpuE systém zajišťující transport prolinu pravděpodobně však nepatří mezi osmosenzorické proteiny. Tento transportní systém je nejspíše regulován jen na transkripční úrovni. Aktivita OpuE totiž není zvýšena za hyperosmotického stresu, ale bakterie na něj reaguje *de novo* syntézou tohoto transportéru prostřednictvím vazby transkripčního faktoru sigma B do jednoho ze dvou promotorů OpuE (van BLOHN *et al.* 1997).

Prozatím byl s určitostí identifikován jeden dvousložkový regulační systém DegS/DegU, který reaguje na osmotický stres. DegS funguje jako senzorová histidinkináza a DegU jako její regulační protein. Tento systém zaznamenává hyperosmotický stres a přenáší tento signál na transkripční aparát buňky. DegS však neleží v cytoplazmatické membráně, ale je to rozpustný protein lokalizován v cytoplazmě. DegS/DegU není ale jen aktivován při osmotickém stresu, ale je spíše součástí mechanismu reagující na obecný stres (STEIL *et al.* 2003).

Systém podobný KdpD/KdpE z *E. coli* nebyl u *B. subtilis* nalezen. Srovnáním sekvencí tohoto systému s ostatními druhy bakterií byl objeven jen u příbuzného *Bacillus anthracis* a *B. cereus*, ale *B. subtilis* podobné geny nevlastní (KUNST *et al.* 1997).



Obr.9 : Transportéry kompatibilních látek v *Bacillus subtilis* (WOOD *et al.* 2001).

2.4. Draselné kanály u *Bacillus subtilis*

Transport draslíku je všeobecný znak života a i u *Bacillus subtilis* má draslík důležitou a stejnou roli jako u ostatních bakterií.

Oproti *Escherichia coli*, kde je transport K^+ iontů velmi dobře charakterizován, u bakterie *Bacillus subtilis* byly zatím nalezeny zcela jiné typy transportních systémů, které nebyly zatím podrobně charakterizovány. *E. coli* disponuje dvěma nízkoafinitními systémy Trk a Kup, které zajišťují přísun draslíku za normálních růstových podmínek. Za nízkého turgorového tlaku, který vznikne při nedostatku K^+ iontů v prostředí nebo při hyperosmotického šoku, *E. coli* indukuje vysokoafinitní K^+ transportní systém Kdp (WOOD 1999).

U *Bacillus subtilis* byly nalezeny tyto K^+ transportní systémy : nízkoafinitní systémy KtrAB a KtrCD, ATPáza P-typu, systém podobný TrkA z *E. coli* a antiporter TetA(L).

2.4.1. KtrAB a KtrCD

Ktr transportní systém byl poprvé popsán v roce 1998 u bakterie *Vibrio alginolyticus*. Tento bakteriální přenašeč draselných iontů je sestaven z integrální membránové podjednotky KtrB a podjednotky KtrA, která je periferně vázána na cytoplazmatickou membránu. V roce 2003 byl podobný systém objeven i u *B. subtilis* (HOLTSMANN *et al.* 2003). Chromozóm *B. subtilis* obsahuje geny *ktrA* a *ktrC* kódující proteiny, které jsou homologní ke KtrA proteinu z *V. alginolyticus*. Geny *ktrB* a *ktrD* kódují homology k proteinu KtrB z *V. alginolyticus* (NAKAMURA *et al.* 1998).

Systémy KtrAB a KtrCD se od sebe odlišují různou afinitou pro draselné ionty. KtrAB systém má střední afinitu k draselným iontům a hodnoty K_m kolem 1 mM. KtrCD je nízkoafinitní systém s K_m kolem 10 mM. Mutace s defektem v těchto systémech vykazují velmi nízkou aktivitu v příjmu K^+ iontů, proto proteiny KtrAB a KtrCD musí hrát centrální roli v příjmu draselných iontů v *B. subtilis*. Geny *ktrA* a *ktrB* jsou transkribovány jako jeden operon, oproti tomu *ktrC* a *ktrD* se nacházejí v různých částech chromozómu *B. subtilis* a jsou přepisovány jako samostatné transkripční jednotky.

Podle předpokladů se KtrA spojuje s transmembránovým proteinem KtrB a dohromady vytvářejí funkční K^+ -translokační komplex. Bylo prokázáno, že obě komponenty systému jsou potřebné k transportu draselných iontů. Vazbou dinukleotidů KtrA reguluje transportní aktivitu KtrB změnou jeho konformace. Poškození *ktrB* a *ktrC* nebo *ktrD* genů zabraňují vzniku funkčních transportérů. Také bylo zjištěno, že KtrB vytváří komplex pouze s KtrA a KtrC jenom s KtrD (ROOSILD *et al.* 2002, HOLTSMANN *et al.* 2003).

Strukturní geny pro Ktr systémy jsou přepisovány konstitutivně, úroveň jejich transkripce se nemění v závislosti na koncentraci draslíku v mediu. Byly pozorovány kompenzační změny v úrovni přepisu jednotlivých genů v případě, kdy jeden ze systémů byl defektní. Není zatím známo, jak buňka detekuje poškození systému a jak přenáší signál k transkripčnímu aparátu (HOLTSMANN *et al.* 2003).

2.4.2. ATPáza P-typu

U *Bacillus subtilis* byla biochemicky prokázána ATPáza P-typu indukovaná draselnými ionty, která se účastní odpovědi na osmotický šok. ATPázová aktivita není stimulována žádnými jinými monovalentními kationty než draselnými. Nebyl však nalezen žádný gen sekvenčně homologní s Kdp ATPázou z *E. coli*. Hodnoty K_m a V_{max} tohoto systému jsou 12,9 μM a 25,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{g proteinu})^{-1}$ při kultivaci na mediu s koncentrací K^+ iontů menší než 400 μM . V médiích se zvýšenou osmolaritou pomocí NaCl či sacharózy dochází k indukci exprese ATPázy při koncentracích K^+ iontů vyšších než 400 μM . Fosforylovaná forma ATPázy je nestabilní v prostředí s neutrálním a alkalickým pH a v přítomnosti draselných iontů, je však stabilní za kyselého pH (ŠEBESTIAN *et al.* 2001).

2.4.3. Systém podobný TrkA z *E. coli*

STURR *et al.* (1997) pomocí mutanty *E. coli* defektní v příjmu draselných iontů izoloval gen *B. subtilis*, který kóduje systém podobný TrkA proteinu z *E. coli*. Následná sekvenční analýza DNA však odhalila, že celková sekvenční homologie těchto genů u *B. subtilis* a *E. coli* je velmi nízká. TrkA z *E. coli* je dvakrát větší než genový produkt *B. subtilis*. Nejjednodušší vysvětlení pozorované komplementarity je, že TrkA z *B. subtilis* je schopen funkčně nahradit deletovaný TrkA z *E. coli*.

2.4.4. TetA(L)

Chromozomálně kódovaný TetA(L) antiporter z *B. subtilis* katalyzuje výměnu komplexu tetracyklin-dvojmocný kov za H^+ iont (tetracyklinová rezistence). TetA(L) protein zároveň vykazuje schopnost antiportu monovalentní kationt/ H^+ . Monovalentním kationtem může být K^+ nebo Na^+ . V případě antiportu sodných iontů může TetA(L) zajišťovat rezistenci vůči vysokým koncentracím Na^+ a pH homeostázi (PADAN a KRULWICH 2000). Mutanty s defektním TetA(L) systémem mají nižší růstové parametry na médiích s nízkou koncentrací draselných iontů (WANG *et al.* 2000).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Materiál

3.1.1. Bakteriální kmeny

Kmeny získané z Bacillus Genetic Stock Center, Ohio University, U.S.A:

- ♦ *Bacillus subtilis* 168 (trpC2) – jsem používala jako standardní kmen.
- ♦ *Escherichia coli* ECE61 HB101 (pHV1249) – donor plazmidu pHV1249

Kmeny připravené v průběhu diplomové práce:

- ♦ *Bacillus subtilis* 3 - 52 - mutantní kmeny odvozené od *Bacillus subtilis* 168 vytvořené nespecifickou inzerční mutagenezí
- ♦ *Escherichia coli* 118 – *E. coli* DH5 α s plazmidem pGEM-4Z

Kmeny používané k přípravě kompetentních buněk:

- ♦ *Escherichia coli* DH5 α (deoR endA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺), recA1 relA1 supE44 thi-1 Δ (lacZYA-argFV169) ϕ 80 δ lacZ Δ M15 F⁻ λ ⁻) – výrobce CLONTECH
- ♦ *Bacillus subtilis* BD194 (recA trpC2)

3.1.2. Plazmidy

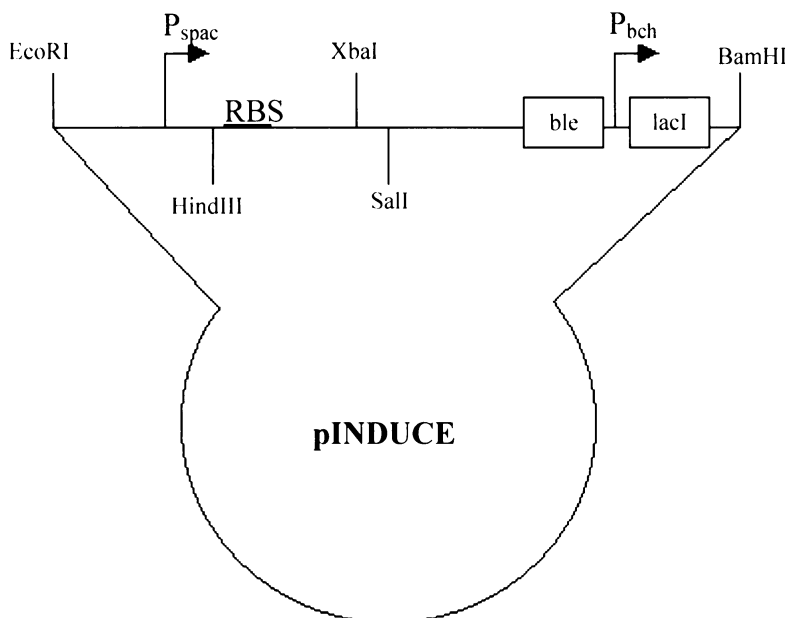
pGEM-4Z (PROMEGA)

Plazmid pGEM – 4Z o velikosti 2,7 kbp jsem použila jako jeden z vektorů při klonování. Tento plazmid nese rezistenci k ampicilinu a gen pro LacZ α -peptid, který je podjednotkou β -galaktozidázy, která štěpí umělý bezbarvý substrát Xgal za vzniku modrého produktu. Uvnitř genu *lacZ* se nachází polyklonovacího místo a tudíž po vložení inzertu do vektoru dochází k přerušení *lacZ* genu a zastavení produkce α -podjednotky β -galaktozidázy. To mi umožní vyhledat buňky, které nesou plazmid s inzertem podle barvy kolonie (blue/white selekce).

Po obou stranách polyklonovacího místa plazmidu pGEM-4Z jsou umístěny promotory SP6 a T7, které jsou používány při sekvenční analýze vložených fragmentů DNA.

pINDUCE (Ústav molekulární genetiky, Dejvice, laboratoř doc. Jonáka), (Obr.10)

Plazmid pINDUCE o velikosti 4,6 kpb je schopen se replikovat jak v *Escherichia coli* tak i v *Bacillus subtilis*. Nese v sobě genovou kazetu pro rezistenci ke kanamycinu a inducibilní P_{spac} promotor, za kterým je umístěn polylinker s RBS místem.



Obr.10 : Plazmid pINDUCE

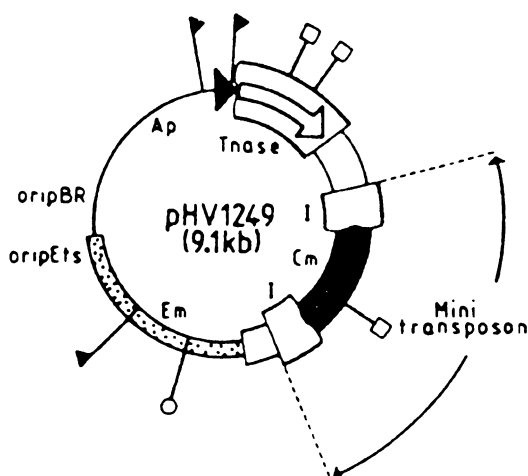
pHV1249 (Bacillus Genetic Stock Center, Ohio University, U.S.A), (Obr.11)

Plazmid pHV1249 o velikosti 9,1 kbp byl zkonstruován pro účely inzerční mutagenese u *Bacillus subtilis* a jiných grampozitivních bakterií. V *Escherichia coli* se plazmid replikuje θ mechanismem, v *Bacillus subtilis* mechanismem valivové kružnice, iniciace replikace je termosenzitivní.

Plazmid nese minitranspozón o velikosti 1.1 kbp, který byl odvozen od transpozónu Tn10. Gen pro rezistenci k tetracyklinu byl v minitranspozónu nahrazen genem pro chloramfenikolovou rezistenci (z plazmidu pC194). Rezistence k chloramfenikolu je funkční v *Bacillus subtilis*. MiniTn10 je ohraničen vnitřními konci IS10, které jsou nezbytné pro transpozici.

Gen pro transponázu není součástí mini-Tn10. Tím je zajištěna stabilita inzerčních mutantů – minitranspozón po inzerci nemůže být z chromozómu znovu vyštěpen.

MiniTn10 nemá specifické inzerční místo na chromozómu *Bacillus subtilis*. K transpozici dochází s frekvencí 10^{-6} na element a generaci (PETIT *et al.* 1990).



Obr.11 : Plazmid pHV1249 s minitranspozónem Tn10 (PETIT et al. 1990).

Legenda : — pBR322

▨ pE194ts

□ Tn10

■ pC194

ori počátek replikace

Ap gen ampicilinové rezistence

Em gen erythromycinové rezistence

Cm gen chloramfenikolové rezistence

Tnase gen kódující transpónázu

▶ promotor

I vnitřní konce transpozónu

□ restrikční místo NcoI

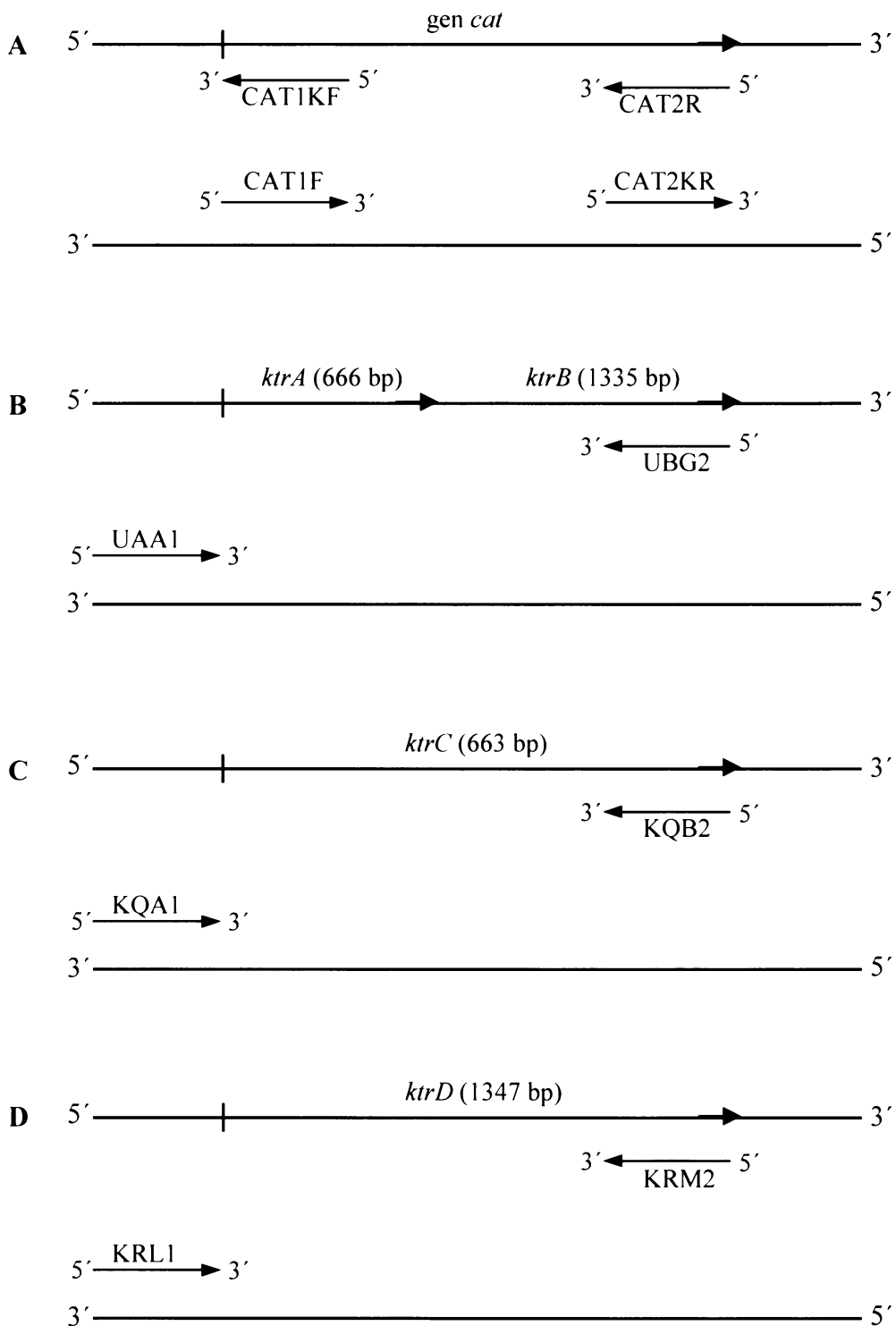
▶ restrikční místo EcoRI

○ restrikční místo SstI

3.1.3. Primery pro PCR

Použité primery byly dodány firmou VBC-GENOMICS (Videň)

Název	Sekvence	T _m
CAT1F	5'- CTT AGT GAC AAG GGT GAT AAA CTC - 3'	48,8 °C
CAT2R	5'- GCC AGT CAT TAG GCC TAT CTG - 3'	50,8 °C
CAT1KF	5'- GAG TTT ATC ACC CTT GTC ACT AAG - 3'	48,9 °C
CAT2KR	5'- CAG ATA GGC CTA ATG ACT GGC - 3'	49,2 °C
UAA1	5'- CGG TTA ACG CCG GTC TT - 3'	50,8 °C
UBG2	5'- CCC TGT AAA CAC TTC GCC - 3'	47,7 °C
KRL1	5'- TTG ACG CGG ATA TAG GTC TAT GT - 3'	52,4 °C
KRM2	5'- CGA TCA GAT ACA GGA AGG TCA AG - 3'	52,3 °C
KQA1	5'- TCG CTT CTG TTT GTA TAC GGG - 3'	52,2 °C
KQB2	5'- CGG CTT ATT TGG CTG CTA TT - 3'	51,7 °C



Obr.12 : Schématické znázornění cílových úseků PCR primerů.

A : primery pro *gen cat*B : primery pro geny *ktrAB*C : primery pro *gen ktrC*D : primery pro *gen ktrD*

3.1.4. Enzymy a protilátky

název	výrobce
Alkalická fosfatáza	FERMENTAS
Anti-DIG-AP	ROCHE
EcoRI	PROMEGA
EcoRV	Boehringer Mannheim
HindIII	PROMEGA
Klenow fragment	PROMEGA
NcoI	PROMEGA
Proteináza K	SIGMA
Reversní transkriptáza (H Minus M-MuLV)	FERMENTAS
T4 ligáza	PROMEGA
Taq DNA polymeráza (Hot Star)	FERMENTAS

3.1.5. DNA standardy

- ♦ Lambda DNA/EcoRI (PROMEGA)
- ♦ Lambda DNA/HindIII (PROMEGA)
- ♦ Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (FERMENTAS)
- ♦ Lambda DNA/Eco130I Marker, 16 (FERMENTAS)

3.1.6. Komerční sady

- ♦ DNA Extraction Kit (FERMENTAS) – přečištění PCR produktu a plazmidové DNA od zbytku reakce a izolace DNA z gelu.
- ♦ DIG – High Prime (ROCHE) – neradioaktivní značení DNA pro účely hybridizace.
- ♦ Wizard^R Plus Midipreps (PROMEGA) – izolace velkého množství plazmidové DNA.
- ♦ mRNA-ONLYTM Prokaryotic mRNA Isolation Kit (EPICENTRE) – získání mRNA z celkové RNA.

Při použití těchto sad jsem postupovala podle dodaných návodů.

3.1.7. Antibiotika

antibiotikum	zásobní roztok	selekční koncentrace
ampicilin	125 mg/ml H ₂ O	50 µg/ml (pHV1249) 100 µg/ml (pGEM – 4Z)
kanamycin	10 mg/ml H ₂ O	8 µg/ml
erythromycin	15 mg/ml EtOH	1 µg/ml
chloramfenikol	34 mg/ml EtOH	5 µg/ml

Vodný roztok ampicilinu a kanamycinu jsem sterilizovala filtrací. Erythromycin a chloramfenikol jsem rozpustila v 95% etanolu.

3.1.8. Chemikálie

název	výrobce
Agar bacteriological	Oxoid
Agar purifikovaný	Oxoid
Agaróza	Sigma, Merck
Agaróza (nízkotající)	Sigma
Ampicilin	Biotika
Bacteriological Peptone	Difco
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát p-toluidinová sůl)	Sigma
Betain	Sigma
Blokovací činidlo (blocking reagent)	Roche
BSA (Bovine Serum Albumine)	Sigma
CSPD (chemiluminiscenční substrát)	Roche
DEPC (dietyl pyrocarbonate)	Sigma
DMSO (dimetyl sulfoxid)	Merck
dNTP Mix (2mM, 10mM)	Fermentas
Etidium bromid	Sigma
Fenol	Serva
Formamid	Sigma
Glukóza	Merck
Glycerol	Sigma
HEPES (N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N´-[ethansulfonová kyselina])	Sigma

Hydroxid sodný	BDH-Aristar
chloramfenikol	lékárna
Chlorid draselný	Merck
Chlorid hořečnatý hexahydrát	BDH, AnalaR
Chlorid litný	BDH, AnalaR
Chlorid sodný	Merck
Cholin	Sigma
IPTG (izopropyl- β -thiogalakto-pyranozid)	Serva
K ₂ HPO ₄	Fluka AG, Buchs SG
Kasein (bez vitamínů)	Fluka AG, Buchs SG
KH ₂ PO ₄	Fluka AG, Buchs SG
Kyselina glutamová	Lachema
Kyselina maleinová	Reaktiv
Lab-Lemco´ Powder	Oxoid
Lysozym	Sigma
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O (p.a.; K ⁺ max 0,005%)	Merck
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O (p.a.; K ⁺ max 0,005%)	Merck
Nanášecí barvička (2x) pro RNA	Fermentas
Nanášecí barvička (6x)	Fermentas
NBT (nitroblue tetrazolium)	Sigma
N-lauroylsakoziin sodná sůl	Sigma
PMSF (fenylmetylsulfonyl fluorid)	Sigma
Prolin	Sigma
Rnasin	Promega
SDS (dodecylsulfát sodný)	Sigma
Sephadex G-50	Pharmacia
Tris-hydroxymetyl-aminometan	Fluka
Tryptofan	Lachema
Tween 20	Sigma
Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopyranozid)	Sigma
Yeast extract	Oxoid
β -merkaptóetanól	Serva

3.1.9. Kultivační média

Ke kultivaci bakteriální kultury jsem používala pevná a tekutá média. Média jsem sterilizovala v autoklávu při 120°C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa po dobu 20 minut.

Při přípravě pevných půd jsem přidávala 2% (w/v) agar.

3.1.9.1. Minerální média

K přípravě minerálních médií s definovanou koncentrací draselných iontů jsem používala deionizovanou vodu, sodné fosfáty, chlorid draselný a glukózu vysokých čistot (K^+ max. 0,005%) od firmy Merck a purifikovaný agar od firmy Oxoid. Požadované koncentrace K^+ jsem pak docílila vhodným naředěním z roztoku KCl o definované koncentraci. Glukózu jsem sterilizovala samostatně, aby v přítomnosti solí nedošlo ke karamelizaci (v případě pevných půd jsem ji sterilizovala společně s agarem). Do minerálních médií pro kultivaci kmene *Bacillus subtilis* 168 (*trpC2*) jsem přidávala L-tryptofan do konečné koncentrace 1% (w/v). Tryptofan jsem sterilizovala autoklavováním zvlášť.

5 x fosfátový pufr (1 litr) : $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 40,93 g
 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 17,94 g
 $(NH_4)_2SO_4$ 5,28 g
 0,1% (w/v) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,5 ml
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,49 g
 deionizovaná vodadoplnit do 1l
 pH 7,0

kapalné minerální médium (1 litr) : fosfátový pufr200 ml
 0,5M citronan sodný2 ml
 100mM $MnCl_2$ a 10mM $ZnSO_4$ 1 ml
 K^+ do požadované koncentrace
 deionizovaná voda doplněna do 1l včetně glukózy
 po sterilizaci výše uvedených složek jsem přidala
 glukózu do koncentrace 1%

pevné minerální médium (1 litr) : složka A : fosfátový pufr200 ml
 0,5M citronan sodný2 ml
 100mM MnCl₂ a 10mM ZnSO₄ ...1 ml
 K⁺ do požadované koncentrace
 složka B : agar20 g
 glukóza10 g
 deionizovaná voda doplněna na 1 litr
 včetně složky A
 po sterilizaci a zchlazení na 50 °C jsem obě složky
 smíchala dohromady a agarové médium nalila do
 Petriho misek

3.1.9.2. Komplexní média

LB (Luria-Bretani) médium (1 litr) : Trypton10 g
 Yeast Extract5 g
 NaCl10 g
 destilovaná vodadoplnit do 1l
 pH 7,0

SSM médium = Schafferovo sporulační médium (1 litr) :

Lab Lemco3 g
 Bacteriological Peptone5 g
 NaCl0,5 g
 KCl0,64 g
 MgSO₄*7H₂O0,25 g
 destilovaná vodadoplnit do 1l, pH 7,0
 po sterilizaci jsem přidala 1 ml sterilního roztoku : 1M CaCl₂
 10mM MnCl₂
 1mM FeSO₄

3.1.9.3. Média pro přípravu kompetentních buněk *B. subtilis* a jejich transformaci

T-base (1 litr) : (NH₄)₂SO₄2 g
 K₂HPO₄*3H₂O18,3 g
 KH₂PO₄6 g
 citronan sodný *2H₂O ..1 g
 destilovaná H₂Odoplnit do 1l

Spc médium : připraveno vždy čerstvé

T-base20 ml
 50% (w/v) glukóza0,2 ml
 1,2% (w/v) MgSO₄*7H₂O0,3 ml
 10% (w/v) Yeast Extract0,4 ml
 1% (w/v) kasaminové kyseliny ..0,5 ml

SpII médium : připraveno vždy čerstvé

T-base200 ml
 50% (w/v) glukóza2 ml
 1,2% (w/v) MgSO₄*7H₂O14 ml
 10% (w/v) Yeast Extract2 ml
 1% (w/v) kasaminové kyseliny ..2 ml
 0,1M CaCl₂1 ml

SpII+EGTA : SpII (bez CaCl₂)200 ml

0,1M EGTA (pH 8)4 ml

3.1.9.4. Média pro přípravu kompetentních buněk *E. coli* pro transformaci teplotním šokem

médium A : 10mM MgSO₄

0,2% (w/v) glukóza

rozpuštěno v LB médiu

uchovávací médium B : 36% (w/v) glycerin

12% (w/v) polyetylen glykol 8000

12mM MgSO₄

rozpuštěno v LB médiu, pH 7, sterilizováno filtrací

3.1.10. Roztoky

3.1.10.1. Roztok pro blue/white selekci

Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopyranozid) :

Zásobní roztok jsem připravila rozpuštěním 20 mg Xgalu v 1 ml dimetyl sulfoxidu (DMSO) nebo dimetyl formamidu. Uchovávala jsem v -20°C a chránila před světlem. Pro selekci plazmidů s inzertem jsem na misku s pevnou půdou nanasla a rozetřela 40 μl ze zásobního roztoku.

IPTG (izopropyl- β -thiogalakto-pyranozid) :

Používala jsem 0,1M zásobní roztok IPTG rozpuštěný v destilované vodě, sterilizovaný filtrací a uchovávan v -20°C . Pro selekci plazmidů s inzertem jsem na misku s pevnou půdou nanasla a rozetřela 40 μl ze zásobního roztoku.

3.1.10.2. TE pufr

TE pufr : 10mM Tris*Cl, pH 8,0

1mM EDTA (chelaton III), pH 8,0

3.1.10.3. Roztoky pro izolaci chromozomální DNA

lytický pufr : 25% (w/v) sacharóza

50mM Tris/HCl, pH 8,0

1mM EDTA, pH 8,0

lysozym 1 mg/ml

proteináza K : 20mg/ml proteináza K

10mM Tris*Cl, pH 7,5 nebo TE pufr

3.1.10.4. Roztoky pro izolaci chromozomální DNA v gelu

HE pufr : 10mM HEPES

1mM EDTA

pH 8,0

HES pufr : 25mM HEPES

25mM EDTA

0,3M sacharóza

pH 8,0

proteináza K : 100mM EDTA pH 8
1% SDS
1 mg/ml proteináza K

3.1.10.5. Roztoky pro izolaci plazmidové DNA

Roztok I : 25mM Tris

50mM glukóza

10mM EDTA

destilovaná voda

pH 8 (upraveno HCl), sterilizace v autoklávu, uchovávala ve 4°C

Roztok II : připraven vždy čerstvý

0,2M NaOH

1% (w/v) SDS

destilovaná voda

Roztok III : 3M acetát sodný

destilovaná voda

pH 4,8 (upraveno ledovou kyselinou octovou), sterilizace v autoklávu,
uchovávala ve 4°C

3.1.10.6. Roztok Sephadex G-50 pro gelovou filtraci

Sephadex G-50 : 10% (w/v) Sephadex G-50 v TE pufru

Po sterilizaci v autoklávu jsem nadbytečný pufr odstranila a přidala
čerstvý sterilní TE pufr. Uchovávala ve 4°C.

3.1.10.7. Roztoky pro horizontální agarózovou elektroforézu

Separace DNA

5 x TBE pufr (1 litr) : Tris54 g
kyselina boritá27,5 g
0,5M EDTA (pH 8,0)20 ml
destilovaná vodadoplnit do 1l

Separace RNA

50 x TAE pufr (1 liter) : Tris242 g
ledová kyselina octová57,18 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)100 ml
DEPC vodadoplnit do 1l

3.1.10.8. Roztoky pro Southern blotting

0,25M HCL

denaturační roztok : 1,5M NaCl
0,5M NaOH
destilovaná voda

neutralizační roztok : 1,5M NaCl
0,5M Tris/HCl
destilovaná voda
pH 7 (upraveno HCl)

20 x SSC : 3M NaCl
0,3M citronan sodný
destilovaná voda
pH 7 (upraveno HCl)

3.1.10.9. Roztoky pro hybridizaci

100 x Denhartův roztok : 2% (w/v) fikol
2% (w/v) polyvinylpyrrolidon
destilovaná voda
sterilizovala jsem filtrací, uchovávala v -20°C

prehybridizační roztok : 5 x SSC
5 x Denhartův roztok
0,1% (w/v) N-lauroylsarcosin
0,2% (w/v) SDS
1% (w/v) kasein
destilovaná voda

hybridizační roztok : 5 x SSC

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

0,2% (w/v) SDS

1% (w/v) blokační činidlo

destilovaná voda

nízkostringentní roztok : 2 x SSC

0,1% (w/v) SDS

destilovaná voda

3.1.10.10. Roztoky pro chromogenní a chemiluminiscenční detekci

maleinový pufr : 0,1M kyselina maleinová

0,15M NaCl

destilovaná voda

pH 7,5 (upraveno NaOH)

promývací roztok : 0,3% (w/v) Tween 20

maleinový pufr

blokační roztok : připraven vždy čerstvý

1% kasein

maleinový pufr

roztok protilátky : připraven vždy čerstvý

Protilátku Anti-Dig-AP (ROCHE) jsem před použitím centrifugovala 5 minut při maximálních otáčkách. Odebrala jsem potřebné množství z horní fáze a naředila blokačním roztokem v poměru 1 : 5 000 (150 mU/ml)

detekční pufr : 0,1M Tris

0,1M NaCl

destilovaná voda

pH 9,5 (upraveno HCl)

NBT/BCIP : do 10 ml detekčního pufru jsem přidala po 0,1 ml z těchto zásobních

roztoků : NBT 18,75 mg/ml rozpuštěno v 67% DMSO

BCIP 9,4 mg/ml rozpuštěno ve 100% DMSO

CSPD : 1% CSPD

detekční pufr

3.1.10.11. Roztoky pro izolaci RNA

Všechny roztoky jsem připravovala z DEPC-vody a dvakrát autoklávovala.

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

destilovaná voda

DEPC jsem nechala ve vodě působit za míchání při laboratorní teplotě přes noc a poté jsem autoklávováním DEPC rozložila.

denaturační roztok : 4M guanidin thiokyanát

0,5% (w/v) sarkosyl

25mM citronan sodný

DEPC- voda

2M octan sodný

chloroform – isoamylalkohol : chloroform24 ml

isoamylalkohol1 ml

3.1.10.12. Pufr pro DNázu

10 x DNázový pufr : 0,33M Tris•Cl (pH = 7,8)

0,66M octan draselný

50mM MgSO₄

5mM dithiothreitol

DEPC voda

3.1.11. Internetové databáze a programy

K vyhledávání restričních míst na chromozomální nebo plazmidové DNA jsem používala programy CLONE MANAGER verze 4.01. K vyhodnocování výsledků sekvenční analýzy jsem používala program CHROMAS.

K porovnání výsledků sekvenční analýzy se sekvencí genomu *Bacillus subtilis* a k vyhledávání informací o sekvenci DNA jsem používala následující internetové databáze: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez - PubMed

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast – NCBI Blast

www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure – NCBI Structure

<http://bacillus.genome.jp> – genomová databáze *Bacillus subtilis*

3.1.12. Přístroje a laboratorní zařízení

- ♦ Kultivační zařízení : Vodní třepačka : „Elpan typ 357“
 - Rotační kultivátor : ROTO-TORQUE
 - Inkubátor : SANYO
 - Termostat : „Biological thermostat type BT 120“
- ♦ UV/VIS spektrofotometr : DU 530 (BECKMAN)
- ♦ Centrifugy : IEC Centra CL3R, výkyvný rotor, max. 3 200 x g
 - Mikro – 20 Hettich, úhlový rotor, max. 15 000 x g
 - Mikro – 22 R Hettich, úhlový rotor, max. 23 900 x g
 - Janetzki K24, úhlový rotor, max. 18 000 x g
- ♦ Vortex : „technoKartell TK3S“
- ♦ Termoblok : „Dry Bath Incubator“ (Major Science)
- ♦ Zdroj na agarózovou elektroforézu : „EC 250-90“ (E-C Apparatus Corporation)
- ♦ UV Transluminátor : Vilber Lourmat
- ♦ Focení gelů : Program 1DLE (KODAK)
- ♦ Kývačka na gely : Duomax 2030 (HEIDOLPH)
- ♦ UV pec : Techne Hybridiser HB-1D
- ♦ Elektroporátor : „BIO-RAD Gene Pulser II“
- ♦ PH metr : Radelkis Budapest
- ♦ Sterilní box Lamin Air HBB 244p (Heraeus Instruments)

3.2. Metodika

3.2.1. PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ KULTUROU

3.2.1.1. Kultivace v tekutém médiu

Bakterie jsem kultivovala v závislosti na potřebném množství napěstované biomasy buď v Erlenmayerových baňkách nebo ve zkumavkách. Pro lepší provzdušnění kultury během kultivace představoval objem média 1/10 objemu kultivační nádoby. Kultivaci v Erlenmayerových baňkách jsem nechala provzdušňovat ve vodní či horkovzdušné třepačce. Kulturu ve zkumavkách jsem pěstovala v termostatu na rotačním kultivátoru. Oba typy kultivace jsem prováděla při teplotě 37°C.

3.2.1.2. Kultivace na pevném médiu

Bakterie jsem kultivovala na agarových plotnách v Petriho miskách v termostatu při teplotě 37°C.

3.2.1.3. Razítkování kolonií

Na raznici, která má stejný rozměr jako plotna, jsem přiložila sterilní sametku a na ní jsem přitlačila plotnu s koloniemi. Na tuto sametku jsem pak přitlačila novou plotnu a tím jsem přenesla všechny kolonie ve shodném uspořádání jako na původní plotně.

3.2.1.4. Sporulace

Kulturu bakterií jsem rozetřela na sporulační plotny a kultivovala 5 dnů při 40°C. Tvorbu spor jsem pak kontrolovala mikroskopicky.

3.2.1.5. Uchovávání bakteriálních kmenů

Bakteriální kmeny jsem dlouhodobě uchovávala v glycerinových konzervách při -70°C. Napěstované buňky jsem naředila 40% roztokem sterilního glycerolu v poměru 1:1, promíchala a rychle zmrazila.

3.2.1.6. Měření optické denzity bakteriální kultury

Optickou denzitu (OD) buněčné kultury jsem zjišťovala pomocí spektrofotometru. Porovnávala jsem absorbanci vzorku kultury oproti čistému

kultivačnímu médiu (blank) při vlnové délce 600 nm či 525 nm. Při dalších výpočtech a ředěních jsem vycházela ze skutečnosti, že kultura $OD_{600} = 0,5$ obsahuje přibližně 10^8 buněk na 1 ml suspenze.

3.2.1.7. Příprava kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

Kompetentní buňky jsem připravila z divokého kmene *Bacillus subtilis* 168 podle protokolu z manuálu „Molecular biological methods for Bacillus“ (HARWOOD a CUTTING 1990).

1. Kulturu bakterií narostlou přes noc jsem zaočkovala do předehřátého Spc média na $OD_{600} = 0,05$.
2. Inkubovala jsem je za silné aerace při 37°C do doby, kdy kultura dosáhla stacionární fáze.
3. Poté jsem zaočkovala 2 ml bakterií ve stacionární fázi do 200 ml předehřátého SpII média a inkubovala za nižší aerace při 37°C .
4. Po 90 minutách kultivace jsem buňky sklídila centrifugací $3\ 200 \times g$, 10 min za laboratorní teploty.
5. Buňky jsem resuspendovala v 18 ml supernatantu, přidala k nim 2 ml sterilního 40% glycerolu a jemně promíchala.
6. Obsah jsem rozpipetovala po 0,5 ml do sterilních mikrozkušavek a buňky jsem skladovala v -70°C .

3.2.1.8. Transformace kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

1. Zmražené kompetentní buňky jsem rozeřádala v 37°C .
2. K buňkám jsem přidala stejné množství roztoku SpII + EGTA a jemně promíchala.
3. K bakteriím jsem přidala vyizolovaný plazmid pHV1249 a inkubovala 10 minut při 37°C .
4. Transformované buňky jsem zředila vhodným množstvím T-base média obsahující 0,5 % glukózu, vysela na LB plotny s chloramfenikolem a kultivovala v termostatu při 37°C .
5. Vyrostlé kolonie jsem pak přerazítkovala na LB plotny s chloramfenikolem a erythromycinem a kultivovala v termostatu při 37°C .
6. Pro další práci s bakteriemi jsem používala kolonie vyrostlé na LB Cam Ery.

3.2.1.9. Transpozice a vyředění plazmidu u *Bacillus subtilis*

1. Z kolonie vyrostlé na LB Cam Ery jsem zaočkovala do 20 ml LB média s chloramfenikolem a kultivovala do $OD_{600} = 0,5$ při 30°C.
2. Poté jsem kulturu 1000x zředila zaočkováním do 200 ml LB média s chloramfenikolem a kultivovala 14 hodin (přibližně 40 generací) při 30°C.
3. Pro vyředění plazmidu jsem buňky 1000x zředila a kultivovala ve 100 ml LB média s chloramfenikolem po dobu 3,5 hodin (asi 10 generací) při 40°C. Za tuto dobu se rezistence k erytromycinu ztratila.
4. Tyto buňky jsem pak uchovávala pro další selekci v -70°C.

3.2.1.10. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Kompetentní buňky z kmene *Escherichia coli* DH5 α jsem připravovala dvěma odlišnými způsoby v závislosti na typu transformace.

Příprava kompetentních buněk *E. coli* pro elektroporaci

1. 0,5 ml kultury *E. coli* DH5 α napěstované přes noc při 37°C jsem zaočkovala do 50 ml LB média v 500 ml baňce na $OD_{600} = 0,1$.
2. Inkubovala jsem ji na třepačce při 37°C do $OD_{600} = 0,7-0,9$.
3. Narostlé buňky jsem zchladila 20-30 minut v ledu.
4. Buňky jsem sedimentovala centrifugací při 3 200 x g, 10 min, 4°C.
5. Resuspendovala jsem je v 50 ml ledové deionizované sterilní vody a centrifugovala při 3 200 x g, 10 min, 4°C.
6. Buňky jsem resuspendovala ve 25 ml ledové deionizované sterilní vody.
7. Centrifugovala při 3 200 x g, 10 min, 4°C.
8. Buňky jsem resuspendovala ve 20 ml sterilního a vychlazeného 10% glycerolu rozpuštěného v deionizované vodě.
9. Centrifugovala při 3 200 x g, 10 min, 4°C.
10. Buňky jsem resuspendovala v 10 ml sterilního a vychlazeného 10% glycerolu.
11. Centrifugovala při 3 200 x g, 10 min, 4°C.
12. Buňky jsem resuspendovala v 0,75-1 ml sterilního a vychlazeného 10% glycerolu.
13. Obsah jsem rozpipetovala po 50 μ l do mikrozkušavek a buňky jsem skladovala při -70°C.



Příprava kompetentních buněk *E. coli* pro transformaci teplotním šokem

1. Naočkovala jsem 0,5 ml kultury *E. coli* DH5 α napěstované přes noc při 37°C do 50 ml A média.
2. Inkubovala jsem ji na třepačce při 37°C do OD₆₀₀ = 0,3-0,4.
3. Narostlé buňky jsem přelila do předchlazené centrifugační zkumavky a zchladila 20 minut v ledu.
4. Buňky jsem sedimentovala centrifugací při 3 200 x g, 10 min, 4°C.
5. Pelet jsem resuspendovala v 0,5 ml A média předchlazeného na ledu.
6. Přidala jsem 2,5 ml uchovávacího média B.
7. Obsah jsem rozdělila po 200 μ l do mikrozkuvek a uchovávala v -70°C.

3.2.1.11. Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli*

Elektroporace kompetentních buněk *E. coli*

1. K čerstvě rozmraženým kompetentním buňkám jsem přidala 2-5 μ l DNA (cca 100 ng), promíchala a nechala 1 min na ledu.
2. Směs jsem přenesla do elektroporační kyvety.
3. Na elektroporátoru jsem aplikovala puls o kapacitanci 25 μ F, napětí 2,5 kV a odpor 200 Ω .
4. Po pulsu jsem do kyvety přidala 1 ml LB média, přenesla do mikrozkuvky a inkubovala 40-60 min při 37°C.
5. Buňky jsem vysela na LB plotny s příslušným antibiotikem.
6. Kultivovala přes noc při 37°C.

Transformace kompetentních buněk *E. coli* teplotním šokem

1. Ke kompetentním buňkám jsem přidala DNA (100ng-1 μ g).
2. Buňky jsem inkubovala 20-30 min při 4°C.
3. Buňky jsem inkubovala 1,5-2 min při 42°C.
4. Buňky jsem inkubovala 5-10 min při 4°C.
5. Přidala jsem k nim 1 ml LB média a inkubovala je 40-60 min při 37°C.
6. Buňky jsem vysela na LB plotny s příslušným antibiotikem.
7. Kultivovala přes noc při 37°C.

3.2.2. PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ DNA

3.2.2.1. Izolace chromozomální DNA *Bacillus subtilis*

1. 2 ml kultury napěstované přes noc při 37°C jsem zaočkovala do 40 ml vytemperovaného média (SSM, LB) v 500 ml nádobě.
2. Inkubovala jsem ji 3 hod na třepačce při 37°C.
3. Centrifugací jsem sklídila kulturu (3 200 x g, 10 min, 4°C) a opláchla ji v 10 ml TE pufru.
4. Po stočení buněk jsem je resuspendovala v 1 ml lytického pufru. Suspenzi jsem přenesla do 15 ml mikrozkušavky a inkubovala 30 min při 37°C.
5. Po ochlazení v ledové lázni jsem přidala 50 µl roztoku proteinázy K a 400 µl 0,5M EDTA (pokud proteináza K byla rozpuštěna v TE pufru, EDTA jsem nemusela přidávat).
6. Po promíchání suspenze jsem přidala 250 µl 10% SDS.
7. Inkubovala jsem ji 20 minut v ledové lázni a 2 hodiny při 55°C.
8. Suspenzi jsem extrahovala 1/3 objemu směsí neutralizovaného fenolu a chloroformu.
9. Centrifugací 10-20 min, 3 200 x g, 4°C se rozdělila vodná a fenolová fáze a uprostřed vznikl proužek zdenaturovaných proteinů.
10. Oddělila jsem horní vodnou fázi s DNA do nové sterilní mikrozkušavky.
11. Extrahovala jsem stejným objemem chloroformu, centrifugovala a odebrala horní fázi. Tento krok jsem opakovala do odstranění zbytků fenolu.
12. Přidala jsem RNázu A (80 µg/ml) a inkubovala 1-2 hodiny při 37°C.
13. Pomocí izopropanolu (0,6-2 objemy) a 1/10 objemu soli (10M LiCl nebo NaAc) jsem srážela DNA ve sterilní kádince při 4°C.
14. Skleněnou tyčinkou jsem nabrala gelózní DNA do sterilní mikrozkušavky.
15. Opláchla jsem ji etanolem a vysušila ve vakuovém exikátoru.
16. DNA jsem rozpustila v TE pufru a uchovávala při 4°C.

3.2.2.2. Izolace chromozomální DNA v gelu

Tento postup izolace zabraňuje mechanickému poškození DNA.

1. Noční kulturu bakterií jsem přeočkovala do 50 ml LB média a pěstovala při 37°C do $OD_{600}=1$.

2. Centrifugací jsem sklídila kulturu (3 200 x g, 10 min) a opláchla ji 2x v 10 ml HE pufru.
3. Kultura jsem znovu naředila HE puftrem (přehřátý na 40°C) na OD₆₀₀=1.
4. Odebrala jsem 15 ml kultury a stočila centrifugací při 3 200 x g, 10 min. Kulturu jsem pak naředila v 200 µl HES pufru.
5. K této suspenzi jsem přidala stejný objem roztoku agarózy (1% nízkotající agaróza rozpuštěná v 0,125M EDTA pH 7,5, uchovávána při 45°C), promíchala a nalila do tvořítka (přehřátého na 37°C). Agarózu s buňkami jsem pak nechala ztuhnout v lednici.
6. Po rozebrání tvořítka jsem jednotlivé kousky gelu umístila do malé Petriho misky.
7. Přidala jsem 5 ml HES pufru s lysozymem (1 mg/ml) a inkubovala 2 hodiny při 37°C.
8. Gely jsem třikrát promyla roztokem 100mM EDTA pH 8 a 1% SDS.
9. Inkubovala jsem je pak v roztoku EDTA a SDS s proteinázou K při 50°C po dobu 18 hodin.
10. Gely jsem ochladila na 4°C a roztok s proteinázou K jsem odstranila.
11. Do Petriho misky jsem přidala 5 ml HE pufru s 1 mM PMSF a inkubovala 1 hodinu při 4°C.
12. Gely jsem třikrát promyla HE puftrem vždy po 1 hodině a inkubaci při 4°C.
13. Poté jsem vzorky v gelu štěpila patričným restriční enzymem přes noc při 37°C a separovala na elektroforéze.

3.2.2.3. Izolace plazmidové DNA

Podle potřeby množství výtěžku plazmidové DNA jsem použila různé metody její izolace.

Mini preparace

1. Zaočkovala jsem buňky do 10 ml LB media s patričným antibiotikem a kultivovala jsem je přes noc při 37°C za aerace.
2. Narostlou kulturu (2-5 ml) jsem sklídila centrifugací v mikrozkuhavce při 15 000 x g, 30 sec.
3. Kultivační medium jsem odstranila pomocí pipety.
4. Pelet jsem resuspendovala v 0,1 ml Roztoku I mírným mícháním na vortexu.

5. Přidala jsem 0,2 ml Roztoku II a mírně promíchala převrácením zkumavky.
 6. Mikrozukmavku jsem ponechala na ledu do doby než se roztok vyčeřil a stal se viskózním (asi 5 minut).
 7. Přidala jsem 0,15 ml Roztoku III a promíchala opatrným převrácením mikrozukmavky, čímž se vytvořila chomáčkovitě bílá sraženina.
 8. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací při 15 000 x g, 10 min. Pelet obsahoval chromozomální DNA a zbytky buněk, v supernatantu byla plazmidová DNA.
 9. Odebrala jsem cca 400 µl supernatantu do nové sterilní mikrozukmavky a přidala k němu 800 µl ledového 96% EtOH.
 10. Nechala jsem plazmidovou DNA srážet při -20°C minimálně 30 minut.
 11. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací při 15 000 x g, 10 min.
 12. Po odstranění supernatantu jsem pelet opláchla 0,5-1 ml ledovým 96% EtOH.
 13. Precipitát jsem sedimentovala centrifugací při 15 000 x g, 10 min a odstranila všechn alkohol.
 14. Pelet jsem vysušila 5-10 min ve vakuovém exikátoru nebo 30 min – 1 hod na vzduchu.
 15. Pelet jsem rozpustila v 0,05 ml TE pufru a skladovala při -20°C.
- Další kroky vedly k dalšímu přečištění plazmidové DNA, zejména k odstranění rRNA.
1. K roztoku plazmidové DNA jsem přidala 0,05 ml 5M LiCl a pečlivě promíchala.
 2. Inkubovala jsem 5-10 min na ledu.
 3. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací při 15 000 x g, 5 min. Pelet obsahoval RNA a zbytky buněk, kdežto plazmid zůstal v supernatantu.
 4. Odebrala jsem supernatant do nové sterilní mikrozukmavky a přidala k němu 0,2 ml ledového 96% EtOH.
 5. Nechala jsem plazmidovou DNA srážet při -20°C více jak 1 hodinu.
 6. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací při 15 000 x g, 10 min.
 7. Po odstranění supernatantu jsem pelet znovu opláchla 0,5-1 ml ledovým 96% EtOH.
 8. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací při 15 000 x g, 5 min a odstranila všechn alkohol.
 9. Sraženinu jsem vysušila 5-10 min ve vakuovém exsikátoru či 30 min – 1 hod na vzduchu.
 10. Rozpustila jsem ji v 0,05 ml TE pufru a skladovala při -20°C.

Maxi preparace

1. Buňky jsem zaočkovala do 50 ml LB media s patričným antibiotikem a kultivovala přes noc při 37°C za aerace.
2. Narostlou kulturu jsem sklídila centrifugací při 3 200 x g, 10min, 4°C.
3. Pelet jsem resuspendovala ve 2 ml Roztoku I a obsah převedla do sterilní kyvety pro vysokorychlostní centrifugaci.
4. Přidala jsem RNázu A (100 µg/ml) a ponechala 10 min při pokojové teplotě.
5. Přidala jsem 4 ml Roztoku II a inkubovala 10 min na ledu. Za tuto dobu se roztok vyčeřil a stal se viskózním.
6. Přidala jsem 3 ml Roztoku III, promíchala převrácením centrifugační kyvety a inkubovala znovu 10 min na ledu, aby se vytvořila sraženina.
7. Centrifugovala při 20 000 x g, 10 min, 4°C a supernatant pak přenesla do nové sterilní centrifugační kyvety.
8. K supernatantu jsem přidala dvojnásobný objem ledového 96% EtOH a nechala precipitovat více jak 1 hodinu při -20°C.
9. Centrifugovala při 20 000 x g, 10 min, 4°C.
10. Pelet jsem opláchla ve 2 ml ledového 96% EtOH a znovu centrifugovala.
11. Po odstranění EtOH jsem pelet vysušila 5-10 min ve vakuovém exsikátoru či 30 min – 1 hod na vzduchu.
12. Pelet jsem rozpustila ve 0,2-0,3 ml TE pufru. Skladovala při -20°C.
13. Podle potřeby jsem plazmidovou DNA přečistila ještě pomocí DNA Extraktion Kit.

Maxi preparace pomocí kolonky

Tuto metodu jsem použila pro izolaci plazmidové DNA ve velkém množství a při vysokých nárocích na čistotu izolace.

- 1.-7. Stejný postup jako při Maxi preparaci.
8. K supernatantu jsem přidala 10 ml resuspendovaného resinu ze sady Wizard^R Plus Midipreps a rychlým vířením promíchala.
9. Směs DNA a resinu jsem přenesla do kolonky připevněnou k vakuové nálevce.
10. Spustila jsem vakuum a vypnula ho poté, když všechna tekutina prošla skrz kolonku.
11. Přidala jsem 15 ml Wash Solution do kolonky a znovu zapnula vakuum.

12. Opakovala jsem bod 11., ale vakuum jsem ponechala zapnuté ještě 30 sec potom, co všechna tekutina prošla kolonkou.
13. Kolonku jsem oddělila od nálevky a přenesla do 1,5 ml mikrozumavky.
14. Centrifugovala jsem kolonku při 10 000 x g, 2 min, aby jí prošla všechna zbylá tekutina.
15. Kolonku jsem přenesla do nové sterilní mikrozumavky, přidala do ní 300 μ l předeřáté (70°C) sterilní H₂O a počkala 1 min.
16. Centrifugovala jsem při 10 000 x g po dobu 20 sekund, abych vymyla DNA z kolonky.
17. Centrifugovala jsem kolonku při 10 000 x g dalších 5 min do nové mikrozumavky.
18. Supernatant obsahující plazmidovou DNA jsem pak přenesla do nové sterilní mikrozumavky. Skladovala při -20°C.

3.2.2.4. Určení čistoty a koncentrace DNA

Spektrofotometricky jsem změřila absorpci vzorku DNA při λ_{260} a λ_{280} . Pro výpočet koncentrace jsem pak vycházela ze skutečnosti, že při $A_{260} = 1$ je koncentrace dsDNA rovna 50 μ g/ml roztoku.

Čistotu DNA jsem pak stanovila z poměru A_{260}/A_{280} . V rozmezí 1,6-2,01 je DNA použitelná pro enzymatické reakce.

3.2.2.5. Čištění vzorku DNA pomocí DNA Extraction Kit

1. Ke vzorku DNA jsem přidala 3 objemy Binding solution.
2. K DNA do množství 2,5 μ g jsem přidala 5 μ l suspenze skleněných kuliček. Při množství DNA ve vzorku nad 2,5 μ g jsem pak přidala 2 μ l skleněných kuliček na každý 1 μ g DNA.
3. Inkubovala 5 min při 55°C. Průběžným vortexováním jsem udržovala skleněné kuličky stále rozvířené.
4. Skleněné kuličky s navázanou DNA jsem stočila a odstranila supernatant.
5. K peletu jsem přidala 500 μ l studeného Promývacího roztoku, zvortexovala, stočila a odstranila supernatant. Tuto proceduru jsem 2x zopakovala.
6. Po odstranění veškerého Promývacího roztoku jsem pelet nechala vysušit 10-15 min na vzduchu.

7. Pelet jsem resuspendovala ve sterilní H₂O a inkubovala 5 min při 55°C. Průběžným vortexováním jsem udržovala skleněné kuličky stále rozvířené.
8. Směs jsem stočila a supernatant s přečištěnou DNA jsem přenesla do nové sterilní mikrokumavky.
9. Skleněné kuličky jsem znovu promyla stejným množstvím sterilní H₂O a po stočení jsem supernatant přenesla do mikrokumavky.
10. Na odstranění všech zbylých skleněných kuliček z roztoku DNA jsem mikrokumavku centrifugovala 15 000 x g, 30 sec. Supernatant s přečištěnou DNA jsem přenesla do nové sterilní mikrokumavky. Skladovala při -20°C.

Pozn. – Tento Kit lze také použít pro izolaci DNA z agarózového gelu.

1. Ke gelu jsem přidala 1/2 násobek objemu TBE conversion buffer a 4,5 násobku objemu Binding solution a inkubovala 5 min při 55°C.
2. Následující postup pak pokračuje stejně jako při přečištění DNA přidáním suspenze skleněných kuliček.

3.2.2.6. Čištění vzorku DNA gelovou filtrací

Pro gelovou filtraci jsem používala sterilní 0,5 ml mikrokumavky s malým otvorem na dně a kouskem skelné vaty uvnitř.

1. Do mikrokumavky s ustřiženým víčkem jsem přidala 0,5 ml sterilního roztoku Sephadexu G-50.
2. Tuto mikrokumavku jsem vložila do další sterilní 1,5 ml mikrokumavky.
3. Centrifugovala 2 min při 5000 x g.
4. 0,5 ml mikrokumavku jsem přenesla do nové 1,5 ml mikrokumavky a na gel nanesla 25-30 µl vzorku.
5. Centrifugováním 2 min při 5 000 x g jsem promyla DNA do nové mikrokumavky.

3.2.2.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

1. Reakci jsem namíchala v 0,5 ml mikrozkušavce podle tabulky :

složka	množství
10x koncentrovaný pufr	1/10 celkového objemu reakce
dNTP mix	0,2 mM od každého nukleotidu
Primer I	0,1 – 1 μ M
Primer II	0,1 – 1 μ M
MgCl ₂	1 – 4 mM
DNA	10 pg – 1 ng
Taq DNA polymeráza	1,5 U
destilovaná voda	doplněna na 50 μ l

2. Směs jsem promíchala a krátce stočila.

3. Zkušavku jsem umístila do termocykleru a nastavila reakci podle programu :

počáteční denaturace	95°C	2 min	} 35x
denaturace	95°C	1 min	
nasedání primerů	T _m primerů	30 sec	
syntéza DNA	72°C	1 min/1 kbp	
konečné prodloužení	70°C	5 min	

4. Výsledek jsem kontrolovala na elektroforéze.

3.2.2.8. Štěpení DNA restrikčními enzymy

1. Namíchala jsem restrikční směs do 1,5 ml mikrozkušavky podle tabulky:

složka	množství
10x koncentrovaný pufr	1/10 celkového objemu reakce
100x BSA	1/100 celkového objemu reakce
DNA	0,1 – 1 μ g plazmidové DNA 4 – 5 μ g chromozomální DNA
enzym	1 – 10 U
destilovaná voda	doplněna do konečného objemu 10 – 50 μ l

2. Směs jsem důkladně promíchala a poté stočila na centrifuze.

3. Reakci jsem inkubovala při 37°C. V případě štěpení plazmidu reakce probíhala 2-3 hodiny, při štěpení chromozomální DNA jsem nechala reakci běžet přes noc.
4. Výsledek restrikce jsem kontrolovala na elektroforéze.

3.2.2.9. Separace DNA v agarózovém gelu

K separaci DNA jsem používala horizontální agarózovou elektroforézu. Gely pro kontrolu výsledků izolace DNA, restrikce a PCR jsem připravovala z agarózy ($T_m = 87^\circ\text{C}$) a pro izolaci fragmentů DNA z gelu jsem používala nízkotající agarózu ($T_m = 65^\circ\text{C}$). Konečná koncentrace agarózy v gelu byla 1%. Pro přípravu gelu a i k naplnění elektroforetické nádoby jsem pak používala TBE pufr. K vizualizaci jsem používala ethidium bromid, který jsem přidávala ze zásobního 1% roztoku do tekuté agarózy v poměru 1/20 000. Vzorky DNA jsem nanášela ve vzorkovém pufru obsahující bromfenolovou modř a xylenkyanol umožňující sledování průběhu elektroforézy.

Při separaci štěpené chromozomální DNA pro hybridizaci jsem elektroforézu pouštěla na 3-4 V/cm. Při běžné kontrole výsledků práce jsem elektroforézu pouštěla na 7-8 V/cm.

3.2.2.10. Southern blotting

1. Gel po elektroforéze jsem opláchla destilovanou vodou za mírného kývání na kývačce.
2. Depurinovala jsem DNA fragmenty 10 objemy 0,25M HCl po dobu 5 minut.
3. Opláchla v destilované vodě.
4. Denaturaci jsem provedla promytím 10 objemy denaturačního roztoku po dobu 20 minut.
5. Opláchla v destilované vodě.
6. Gel jsem 2 x promyla v 10 objemech neutralizačního roztoku po dobu 20 minut.
7. Přenos DNA na nylonovou membránu (SIGMA) jsem provedla kapilární metodou. Mezi jednotlivými vrstvami jsem pomocí pipety vždy odstranila bubliny.
 - Na misku obsahující pufr 20xSSC jsem položila sklo.
 - Na sklo jsem položila filtrační papír namočený v 20xSSC pufru, jehož konce jsem zanořila do pufru.

- Podle velikosti gelu jsem ořízla Whatman papíry, filtrační papíry a nylonovou membránu.
 - Na velký filtrační papír jsem umístila 2 Whatman papíry namočené v 20xSSC pufru.
 - Na ně jsem položila gel také namočený v 20xSSC pufru.
 - Na gel jsem položila nylonovou membránu namočenou v 5xSSC pufru. Orientaci membrány vůči gelu jsem určila ustřížením jednoho rohu membrány a označení fixem polohu jamek.
 - Na membránu jsem umístila Whatman papír namočený v 5xSSC pufru.
 - Na Whatman papír jsem pak položila 5 suchých filtračních papírů.
 - Nakonec na podpoření kapilární síly jsem položila 5-10 cm vrstvu papírových ubrousků.
 - Navrch jsem pak položila sklo a zatížila 0,5 kg závažím.
8. Nechala jsem blotovat alespoň 4 hodiny, většinou však přes noc.
 9. DNA jsem fixovala k membráně působením UV světla v UV peci.
 10. Membránu jsem opláchla ve 2xSSC pufru.
 11. Nakonec jsem ji vysušila mezi 2 filtračními papíry a skladovala na tmavém suchém místě.

3.2.2.11. Neradioaktivní značení DNA sondy

Jako templát pro přípravu sond mi sloužily jednak fragment plazmidu pHV1249 štěpený enzymem EcoRV o velikosti 1124 bp a dále cDNA vytvořené z mRNA *B. subtilis 168* a mutant 21 a 24 za normálních a osmotických (0,6M NaCl) podmínek. Fragменты DNA jsem neradioaktivně značila metodou random primed pomocí DIG-značky a Klenowova fragmentu. Ke značení jsem použila sadu DIG – High Prime (ROCHE).

1. Vzorky DNA (300-600 ng) jsem naředila sterilní vodou do objemu 34 μ l.
2. DNA jsem denaturovala 5 min ve vroucí vodní lázni.
3. DNA jsem pak rychle zchladila po dobu 5 min v ledu.
4. Přidala k ní - 5 μ l pufru
 - 4 μ l 10mM dNTPs
 - 0,7 μ l DIG-UTP
 - 1 μ l Klenowova fragmentu (5U)

5. Po stočení na centrifuze jsem směsi inkubovala 1-2 hodiny při 37°C a poté přes noc při laboratorní teplotě.
6. Reakce jsem zastavila inkubací 10 min při 65°C.
7. Ze směsi jsem odstranila nezreagované nukleotidy přečištěním gelovou filtrací.
8. SONDY jsem skladovala při -20°C.

3.2.2.12. Vyhodnocení sond

Vyhodnocení sond jsem provedla pomocí metody „dot blot“ podle protokolu „Evaluation of Probe Labeling Efficiency“ (ROCHE). Pro detekci sondy značenou DIG značkou jsem použila Anti-DIG protilátku s konjugovanou alkalickou fosfatázou (ROCHE). DNA s navázanou protilátkou jsem pak vizualizovala chromogenní reakcí, při které docházelo ke štěpení substrátu NBT/BCIP alkalickou fosfatázou za vzniku barevného produktu.

1. Na nylonovou membránu jsem napipetovala 10 µl naředěné sondy v poměru 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000.
2. SONDY jsem fixovala k membráně působením UV světla v UV peci.
3. Membránu jsem promyla v 15 ml promývacího roztoku po dobu 2 minut za mírného kývání na kývačce.
4. Po odstranění promývacího roztoku jsem inkubovala membránu v 15 ml blokačního roztoku po dobu 30 minut za mírného kývání.
5. Blokační roztok jsem vyměnila za 5 ml roztoku s protilátkou a inkubovala 30 minut.
6. Membránu jsem pak dvakrát promyla v 15 ml promývacího roztoku po dobu 15 minut.
7. Membránu jsem inkubovala v 5 ml detekčního pufru po dobu 3 minut.
8. Nakonec jsem membránu ponořila do 5 ml detekčního pufru s NBT a BCIP a inkubovala ve tmě. Pozitivní signál sondy se začal objevovat již po několika minutách inkubace. Reakci jsem však většinou ukončila po 16 hodinách promytím membrány v TE pufru.

3.2.2.13. Hybridizace

Tento protokol jsem převzala z manuálu „Techniques for Hybridization of DIG-labeled probes to a blot“ (ROCHE). Sondu jsem neradioaktivně označila DIG značkou.

1. Membránu s fixovanou DNA jsem namočila v roztoku 6xSSC a umístila do hybridizační trubice.
 2. Inkubovala jsem ji v prehybridizačním roztoku 1-2 hodiny při hybridizační teplotě.
 3. Sondu jsem naředila hybridizačním roztokem a zdenaturovala 5 min při 90°C a poté zchladila na ledu.
 4. Po slití prehybridizačního roztoku jsem do trubice s membránou přidala 15 ml hybridizačního roztoku s denaturovanou sondou.
 5. Hybridizovala jsem přes noc.
 6. Ráno jsem sondu slila do centrifugační zkumavky a uchovávala v mrazáku.
 7. Membránu jsem dvakrát opláchla nízkostingentním roztokem po dobu 5 min.
- Membránu jsem pak nenechala uschnout a ihned detekovala protilátkou.

Pozn. – Hybridizační teplotu pro fragment pHV1249 jsem vypočítala podle vzorce:

$$T_m = 16,6 \log [cNa^+] + 0,41 (\%G+C) + 81,5$$

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

$$T_m = 16,6 \log [0,75] + 0,41 \cdot 36 + 81,5 = 94,2$$

$$T_{hyb} = 94,2 - 25 = 69,2^\circ C$$

$c [Na^+]$ – molární koncentrace sodných iontů v hybridizačním roztoku

% G+C - procento G a C bazí v sekvenci **sondy**

T_{hyb} – optimální teplota hybridizace

Jako hybridizační teplotu pro cDNA vytvořené z mRNA *B. subtilis 168* a mutant 21 a 24 za normálních a osmotických podmínek jsem používala 64°C.

3.2.2.14. Chromogenní detekce

1. Membránu jsem promyla ve 100 ml promývacího roztoku po dobu 2 minut za mírného kývání na kývačce.
2. Po odstranění promývacího roztoku jsem inkubovala membránu ve 100 ml blokačního roztoku po dobu 30 minut za mírného kývání.
3. Blokační roztok jsem vyměnila za 15 ml roztoku s protilátkou a inkubovala 30 minut.

4. Membránu jsem pak dvakrát promyla ve 100 ml promývacího roztoku po dobu 15 min.
5. Membránu jsem inkubovala ve 20 ml detekčního pufru po dobu 3 minut.
6. Nakonec jsem membránu ponořila do 10 ml detekčního pufru s NBT a BCIP a inkubovala ve tmě. Barevné proužky se začaly objevovat již po několika minutách inkubace. Reakci jsem však většinou ukončila po 16 hodinách promytím membrány v TE pufru.
7. Detekovanou membránu jsem po vysušení skladovala ve tmě.

3.2.2.15. Chemiluminiscenční detekce

- 1.-5. Stejný postup jako při chromogenní detekci.
6. Do těsně uzavíratelné kazety s vloženou polyetylenovou fólií jsem pak vložila membránu. Na stranu membrány s přichycenou DNA jsem pak aplikovala 1 ml roztoku CSPD a přes fólii rovnoměrně rozetřela.
7. Membránu jsem v kazetě inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě. Poté jsem odstranila zbylou tekutinu z fólie a membránu inkubovala v kazetě 10 minut při 37°C.
8. Na membránu jsem pak položila film pro vytvoření rentgenových snímků a nechala jsem ho exponovat po dobu 5 - 9 hodin podle síly sondy.
9. Film jsem pak vyvolala v temné komoře ve vyvíjecím roztoku (5 minut) a v ustalovacím roztoku (5 minut).

3.2.2.16. Defosforylace 5'konců restrikčních fragmentů DNA

1. K restrikční směsi jsem přidala 1 U alkalické fosfatázy.
2. Směs jsem důkladně promíchala a poté stočila na centrifuze.
3. Reakci jsem inkubovala 30 min při 37°C.
4. Reakci jsem nakonec zastavila inkubací 10 min při 65°C.

3.2.2.17. Ligace restrikčních fragmentů DNA

1. Ligační reakci jsem namíchala do mikrozkušavky podle tabulky:

složka	množství
10x koncentrovaný pufr	1/10 celkového objemu reakce
vektorový plazmid	10 ng DNA/ μ l reakce
inzerční DNA	molární množství odpovídající trojnásobné molární koncentraci vektorové DNA
ligáza	3 U
destilovaná voda	doplněna do konečného objemu 10 – 30 μ l

2. Směs jsem promíchala a stočila na centrifuze.

3. Inkubovala jsem ji přes noc při 8°C.

4. Reakci jsem inaktivovala 10 min při 65°C.

Pozn. – Při elektroporaci kompetentních buněk *E. coli* jsem ligační směs přečistila přes kuličky a rozpustila ve sterilní deionizované vodě.

3.2.2.18. Sekvenování

Sekvenační analýza byl provedena na servisním pracovišti biologické sekce PĚF UK.

Vzorek DNA jsem dodala ve formě vodného roztoku v koncentraci požadované pracovištěm. Všechny další úpravy vzorků před sekvenční analýzou byly provedeny laborantkou sekvenačního pracoviště. Pro přípravu sekvenační reakce byl používán BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Potřebná sekvence byla namnožena pomocí metody PCR s použitím fluorescenčně značených nukleotidů. Fluorescenční signál byl zpracován na sekvenačním přístroji ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer. K vyhodnocování výsledků jsem pak používala program CHROMAS.

3.2.3. PRÁCE S BAKTERIÁLNÍ RNA

RNA je velmi náchylná k degradaci všudypřítomnými ribonukleázami, tudíž práce s ní je velmi náročná. Proto jsem všechny roztoky připravovala z DEPC-H₂O a dvakrát autoklávovala a skleněné nádoby sterilizovala více jak 4 hodiny při 160°C.

3.2.3.1. Izolace totální RNA z *Bacillus subtilis*

Tento protokol jsem převzala z manuálu „Single-step method of total RNA isolation by guanidine-phenol extraction“ (CHOMCZYNSKI a SACCHI 1987).

1. Kulturu bakterií narostlou přes noc jsem zaočkovala do 50-100 ml LB média na $OD_{525} = 0,07-0,1$.
 2. Inkubovala jsem je při 37°C do $OD_{525} = 0,5$.
 3. Bakterie jsem sklídila centrifugací při $3\ 200 \times g$, 10 min, 4°C .
 4. Buňky jsem zchladila a rozetřela na prášek pod tekutým dusíkem.
 5. Přidala jsem k nim 30-ti násobný objem denaturačního roztoku a 0,1 ml merkaptoetanolu.
 6. Na 1 ml denaturačního roztoku jsem přidala 0,1 ml 0,2M octanu sodného, 1 ml fenolu, 0,2 ml směsi chloroform/isoamylalkoholu.
 7. Směs jsem protřepala a nechala 15 min na ledu.
 8. Směs jsem centrifugovala při $10\ 000 \times g$, 20 min, 4°C .
 9. Odebrala jsem horní vodnou fázi do nové sterilní centrifugační kyvety a přidala k ní směs fenol/chloroform/isoamylalkoholu.
 10. Znovu centrifugovala a k vodné fázi jsem přidala stejné množství izopropanolu.
 11. Směs jsem protřepala a nechala precipitovat 30 min v -20°C .
 12. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací $10\ 000 \times g$, 20 min, 4°C .
 13. Sraženinu jsem rozpustila v 0,3-0,5 ml denaturačního roztoku a poté jsem přidala stejné množství izopropanolu.
 14. Směs jsem protřepala a nechala precipitovat 30 min v -20°C .
 15. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací $10\ 000 \times g$, 20 min, 4°C .
 16. RNA jsem resuspendovala v 75% EtOH a skladovala v -20°C .
- Další kroky vedly k dalšímu přečištění RNA, zejména k odstranění DNA.
1. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací $10\ 000 \times g$, 10 min, 4°C a odstranila všechn alkohol.
 2. Sraženinu jsem vysušila 5 min ve vakuovém exsikátoru a rozpustila v DECP- H_2O a jako ochranu proti Rnázám jsem přidala RNasin.
 3. K roztoku jsem přidala stejné množství 5M LiCl a pečlivě promíchala.
 4. Inkubovala jsem 5-10 min na ledu.
 5. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací při $10\ 000 \times g$, 10 min, 4°C .
 6. RNA jsem resuspendovala v 75% EtOH a skladovala v -20°C .

3.2.3.2. Odstranění DNA ze vzorku RNA

1. Sraženinu RNA jsem sedimentovala centrifugací 10 000 x g, 10 min, 4°C a odstranila všechnen alkohol.
2. Sraženinu jsem vysušila 5 minut ve vakuovém exikátoru.
3. Reakci jsem namíchala podle tabulky :

složka	množství
DNázový pufr	200 µl
RNasin	2 µl
DNáza	10-20 U na 100 µg DNA

4. Směs jsem důkladně promíchala a poté stočila na centrifuze.
5. Reakci jsem inkubovala při 37°C po dobu 30 minut.
6. Reakci jsem ukončila přidáním 200 µl denaturačního roztoku a RNA jsem pak vysrážela 400 µl izopropanolu v -20°C, 30 minut.
7. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací 10 000 x g, 20 min, 4°C.
8. Sraženinu jsem promyla 75% EtOH, sedimentovala centrifugací 10 000 x g, 10 min, 4°C, odstranila všechnen alkohol a vysušila 5 minut ve vakuovém exikátoru.
9. Sraženinu jsem rozpustila v DEPC-H₂O a jako ochranu proti Rnázám jsem přidala RNasin.
10. K roztoku jsem přidala stejné množství 5M LiCl a pečlivě promíchala
11. Inkubovala jsem 5-10 min na ledu.
12. Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací při 10 000 x g, 10 min, 4°C.
13. RNA jsem resuspendovala v 75% EtOH a skladovala v -20°C.

3.2.3.3. Získání mRNA

Pro izolaci prokaryotní mRNA jsem používala mRNA-ONLY Kit (EPICENTRE). Součástí tohoto kitu je TerminatorTM 5'-fosfát závislá exonukleáza, která rozštěpí RNA obsahující 5'-monofosfát. Bakteriální ribozomální RNA se transkribuje jako jediný transkript s 5'-monofosfátem a tím je vhodným substrátem pro tento enzym.

1. Sraženinu RNA jsem sedimentovala centrifugací 10 000 x g, 10 min, 4°C a odstranila všechnen alkohol.
2. RNA jsem vysušila 5 minut ve vakuovém exikátoru.

3. Reakci jsem namíchala podle tabulky do 0,5 ml mikrozkušavky :

složka	množství
10x reakční pufr	2 μ l
inhibitor RNáz	0,5 μ l
celková RNA	1 μ g
Terminator TM exonukleáza	1 μ l (1U)
voda bez RNáz	16,5 μ l

- Směs jsem důkladně promíchala a poté stočila na centrifuze.
- Reakci jsem inkubovala při 30°C po dobu 2 hodin.
- Reakci jsem ukončila naředěním DEPC-H₂O na 200 μ l a přidáním stejného množství saturovaného fenolu.
- Směs jsem protřepala a centrifugovala 10 000 x g, 10 min, 4°C.
- Odebrala jsem horní vodnou fázi s mRNA, přidala k ní 200 μ l denaturačního roztoku a mRNA jsem vysrážela 400 μ l izopropanolu v -20°C, 30 minut.
- Sraženinu jsem sedimentovala centrifugací 10 000 x g, 20 min, 4°C.
- Sraženinu jsem 2x promyla 75% EtOH, sedimentovala centrifugací 10 000 x g, 10 min, 4°C.
- mRNA jsem uchovávala v 75% EtOH a skladovala v -20°C.

3.2.3.4. Separace RNA v agarózovém gelu

Tento protokol jsem převzala z publikace „Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels“ (MAŠEK *et al.* 2004).

Pro kontrolu výsledků izolace RNA jsem používala horizontální agarózovou elektroforézu. Pro přípravu gelu jsem používala agarózu ($T_m = 87^\circ\text{C}$) v konečné koncentraci 1,2%. Pro přípravu gelu a i k naplnění elektroforetické nádoby jsem pak používala TAE pufr. Elektroforézu jsem pouštěla na 4-5 V/cm.

Příprava vzorku :

- Odebrala jsem část RNA v 75% EtOH a sraženinu jsem sedimentovala centrifugací 10 000 x g, 10 min, 4°C.
- Po odstranění alkoholu jsem RNA vysušila 5 min ve vakuovém exikátoru a rozpustila ve formamidu.

3. K roztoku jsem přidala 1/2 násobek objemu Loading buffer for RNA, vzorek zdenaturovala 10 min při 65°C, rychle zchladila na ledu a nanesla na gel.

3.2.3.5. Převedení mRNA na cDNA

1. V 0,5 ml sterilní mikrozkušavce jsem připravila :

složka	množství
mRNA	1 ng – 0,5 µg
random hexamer	0,2 µg
deionizovaná voda	doplnit do 11 µl

2. Směs jsem inkubovala 5 minut při 70°C a zchladila v ledu.

3. Ke směsi jsem přidala další složky podle tabulky :

složka	množství
5x reakční pufr	4 µl
10mM 4 dNTP mix	2 µl
ribonukleázový inhibitor	20U
deionizovaná voda	doplnit do 19 µl

4. Směs jsem inkubovala 5 minut při 25°C.

5. Ke směsi jsem přidala 200U reverzní transkriptázy (FERMENTAS) a směs jsem inkubovala 10 minut ve 25°C a 1 hodinu ve 42°C.

6. Reakci jsem ukončila inkubací 10 minut v 70°C a zchlazením v ledu.

3.2.3.6. Amplifikace cDNA

cDNA jsem naamplifikovala metodou random prime a pomocí Klenowova fragmentu.

1. Roztok cDNA jsem doplnila sterilní destilovanou vodou do objemu 34 µl.
2. cDNA jsem denaturovala 5 min ve vroucí vodní lázni.
3. cDNA jsem pak rychle zchladila po dobu 5 min v ledu.
4. Přidala jsem k ní - 5 µl pufru
 - 5 µl 10mM dNTPs
 - 5 µl random hexamer
 - 1 µl Klenowova fragmentu (5U)

5. Po stočení na centrifuze jsem směs inkubovala 1-2 hodiny při 37°C.
6. Přidala jsem 0,5 µl Klenowova fragmentu (2,5U) a nechala inkubovat přes noc při laboratorní teplotě.
7. Reakci jsem ukončila inkubací 10 minut v 65°C a zchlazením v ledu.
8. cDNA jsem skladovala v -20 °C.

4. VÝSLEDKY

4.1. Selektce mutant po transformaci a transpozici *B. subtilis* plazmidem pHV1249

Cíl : Vyselektovat osmosenzitivní mutanty s inzerty minitranspozónu Tn10 do chromozomální DNA a zjistit jejich chování za osmotického šoku v médiu v přítomnosti některých kompatibilních látek.

Do divokého kmene *Bacillus subtilis* 168 jsem natransformovala plazmid pHV1249. Součástí tohoto plazmidu je minitranspozón Tn10 s chloramfenikolovou rezistencí, který transpozičním mechanismem tvoří inzerty do chromozomální DNA. Gen pro transponázu není součástí mini-Tn10, tudíž minitranspozón se po inzerci do chromozomu nemůže znovu přemístit na jiné místo.

Aby účinněji proběhla přirozená transformace, pěstovala jsem buňky *Bacillus subtilis* 168 podle kapitoly 3.2.1.7. K takto připraveným buňkám jsem přidala vyizolovaný plazmid pHV1249, aby v nich mohla proběhnout transformace (kapitola 3.2.1.8.). V transformovaných buňkách pak mohlo dojít k transpoziční reakci a mini-Tn10 se inzertoval do genomu *B. subtilis* 168 (kapitola 3.2.1.9.). Po transpozici jsem pak získala buňky s plazmidem a s inzercí transpozónu. Před další selekcí však bylo nutné plazmid vyředit. To jsem vyřešila kultivací získaných mutant za zvýšené teploty po dobu 10 generací (kapitola 3.2.1.9.). Vyředění plazmidu jsem zkontrolovala výsevem na plotny s antibiotiky. Buňky s plazmidem pHV1249 mají rezistenci k chloramfenikolu a erytromycinu, kdežto buňky jen s inzertovaným mini-Tn10 a bez plazmidu erytromycinovou rezistencí ztratily. Tato skutečnost je dána tím, že erytromycinová rezistence je jen součástí plazmidu mimo mini-Tn10.

Po transformaci, transpozici a vyředění plazmidu jsem kulturu vysela na selektivní plotny za účelem získat osmosenzitivní mutanty. Cílem selektce bylo nalezení mutant, které by měly přerušeny gen osmosenzorického proteinu, který by zaznamenával změnu v osmolaritě svého vnějšího prostředí, nebo poruchu v první fázi osmoadaptace – transport draselných iontů do buňky (kapitoly 2.3.3 a 2.4.).

Abych potlačila selekci auxotrofních mutant, vysela jsem bakterie na minimální médium (MM) s přísadkou zajišťující různé osmotické podmínky. Chloramfenikol na miskách pak zajistil stálost mutant s inzertem mini-Tn10. Použila jsem však nižší koncentraci chloramfenikolu (0,5 µg/ml média), protože bakterie obsahují méně

chloramfenikolacetyltransferázy, než když je gen *cat* součástí plazmidu. V první fázi selekce jsem mutanty vysela v ředění 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} na plotny s minimálním médiem o koncentraci draselných iontů 120 mM a chloramfenikolem. Misky jsem kultivovala přes noc při 30°C. Z těchto ploten jsem pak získala 340 kolonií, které jsem dále podrobila selekci na další osmotické podmínky :

(*) MM (K120) + cam

MM (K120) + 0,5M NaCl + cam

MM (K0) + 0,5M NaCl + cam

Po této selekci jsem získala 44 osmosenzitivních kolonií, které jsem dále testovala na médiu s kompatibilními látkami či jejich prekurzory. Některé osmosenzory vykonávají také i transportní funkci pro přenos kompatibilních látek a svou činnost zahájí až při zvýšené koncentraci draslíku uvnitř buňky (kapitola 2.3.2.).

MM (K0) + 0,5M NaCl + prolin + cam

MM (K0) + 0,5M NaCl + betain + cam

MM (K0) + 0,5M NaCl + kys. glutamová + cam

MM (K0) + 0,5M NaCl + cholin + cam

(*) : MM – minimální médium

K(120) – koncentrace draselných iontů v MM byla 120mM

K(0) – MM neobsahovalo žádné draselné ionty

cam – chloramfenikol (0,5μg/ml média)

betain, kys. glutamová, cholin, prolin – 1 mM koncentrace

Z těchto 44 kolonií jich bylo 11 za přítomnosti draselných iontů osmolabilních. Na médiu bez draselných iontů a zároveň za osmotického šoku 23 kolonií nevyrostlo vůbec a zbylých 21 kolonií mělo jen nárůst velice slabý. V přítomnosti aspoň některé kompatibilní látky či jejího prekurzoru se mutanty ve většině případů vyrovnaly s osmotickým šokem. Až na 7 kolonií se nejlépe mutanty vyrovnaly osmotickému šoku v přítomnosti prolinu. Růst mutant na médiích s různým složením je znázorněn v tabulce č.1.

Z těchto 44 kolonií jsem si vybrala 8 mutant, jejichž kolonie nevyrostly za osmotického šoku na médiu bez draselných iontů a v přítomnosti různých kompatibilních látek či jejich prekurzoru měly velice slabý nebo žádný nárůst. Mohlo u nich tedy dojít k přerušení genu pro vysokoafinitní systém pro transport draslíku do

buňky a následně k zabránění aktivace transportérů pomocí intracelulárních K^+ iontů. V tabulce č.1 jsou tyto kolonie označeny žlutě.

12 – Tento mutant se nevyrovnal s osmotickým šokem na médiu s kyselinou glutamovou. Výskyt K^+ iontů, betainu či cholinu v médiu za osmotického šoku dovolil na plotně vyrůst jen velmi malým koloniím. Jen přidavek prolinu dovolil mutantu za zvýšené osmolarity střední nárůst kolonií.

13 – Tento mutant projevoval nejmenší schopnost vyrovnat se osmotickému šoku. Kolonie za osmotického šoku vůbec nevyrostly na plotně s betainem a kyselinou glutamovou v nepřítomnosti K^+ iontů a jen velmi málo v přítomnosti K^+ , prolinu a cholinu.

19 – U tohoto mutantu za osmotického šoku kolonie nevyrostly na médiu s kys. glutamovou, na médiu s cholinem měly nárůst jen velmi malý a s prolinem, betainem či K^+ jen střední nárůst.

21 – Kolonie u tohoto mutantu nevyrostly za zvýšené osmolarity na médiu s kys. glutamovou, měly velmi malý nárůst s betainem a cholinem, slabší nárůst v přítomnosti K^+ a normální nárůst na médiu s prolinem.

24 – Tento mutant má velmi podobný růstový fenotyp jako mutant č. 21. Jediný rozdíl se týká kolonií na médiu s betainem, které měly za osmotického šoku střední nárůst kolonií.

37 – Tento mutant vyrostl aspoň slabě na všech typech použitých médií, kde byla nějaká další látka v nepřítomnosti draselných iontů. Kolonie na médiu s K^+ , betainem a kys. glutamovou měly jen velmi malý nárůst a na médiu s prolinem a cholinem se nárůst o trochu zlepšil.

47 – Kolonie tohoto mutantu nevyrostly za osmotického šoku na médiu s kys. glutamovou, měly velmi slabý nárůst na médiu s K^+ , prolinem a cholinem a slabší nárůst na médiu s betainem.

49 – Tento mutant má velmi podobný růstový fenotyp jako mutant č. 37. Rozdílný nárůst kolonií má jen za osmotického šoku na médiu s cholinem, kdy tento mutant vytvořil velice slabý nárůst kolonie.

	K(120)	K(120)+NaCl	K(0)+NaCl	K(0)+NaCl +Pro	K(0)+NaCl +Bet	K(0)+NaCl +Glu	K(0)+NaCl +Chol
3	+++	++	0	++	+	+	+
4	+++	++	0	+++	+	+	+
5	+++	+	0	+	+	0	+
6	+++	+++	+	+++	++	+	++
7	+++	+++	+	+++	++	+	++
8	+++	+	0	+	+	+	+
9	+++	+	+	+	+	+	+
10	+++	+	0	+	+	+	++
11	+++	+	+	++	+	+	++
12	+++	+	0	++	+	0	+
13	+++	+	0	+	0	0	+
15	+++	++	+	+++	++	++	++
16	+++	++	+	+++	++	+	++
17	+++	++	0	+++	+	+	++
18	+++	++	0	+++	+	+	++
19	+++	++	0	++	++	0	+
20	+++	++	0	+++	++	++	+
21	+++	++	0	+++	+	0	+
22	+++	++	+	+++	++	+	++
23	+++	++	0	+++	+	++	++
24	+++	++	0	+++	++	0	+
25	+++	++	+	+++	++	0	++
26	+++	++	+	+++	++	+	++
27	+++	++	+	+++	++	+	++
28	+++	++	+	+++	++	++	++
29	+++	++	+	+++	+	++	++
30	+++	++	+	+++	+	++	++
31	+++	+++	+	+++	++	++	++
32	+++	++	+	+++	++	+	++
35	+++	++	+	++	+	++	++
36	+++	++	0	++	++	+	+
37	+++	+	0	++	+	+	++
38	+++	++	+	++	+	++	++
39	+++	++	+	+++	++	++	++
40	+++	++	0	+++	++	++	++
43	+++	+	0	++	+	+	+
44	+++	++	+	+++	++	+	++
45	+++	++	0	+++	++	+	+
46	+++	++	0	++	+	+	+
47	+++	+	0	+	++	0	+
48	+++	+	0	+	+	+	+
49	+++	+	0	++	+	+	+
50	+++	++	+	+++	++	+	+
52	+++	++	+	+++	+	+	++

Tab.1 : Růst mutant na minerálním médiu za různých podmínek během osmotického šoku. Zkratky : K(120) – koncentrace K^+ je 120 mM, K(0) – žádné K^+ ionty, NaCl – 0,5M koncentrace, Pro – 1 mM prolin, Bet – 1 mM betain, Glu – 1 mM kys. glutamová, Chol – 1mM cholin. Označení nárůstu : normální (+++), slabší (++), velice slabý (+), žádný (0).

4.2. Restrikční analýza a hybridizace

Cíl : Prokázat přítomnost transpozónu v bakteriálním genomu a zjistit počet inzerčních míst.

Jedním ze způsobů jak detekovat přítomnost transpozónu a zjistit počet jeho inzercí do chromozomu připravených mutant *Bacillus subtilis*, je restrikční analýza a hybridizace. Tímto způsobem lze také vyhledat vhodný restrikční enzym k vytvoření chromozomální knihovny. Pro co nejúspěšnější klonování do vektorového plazmidu by fragment s vloženým mini-Tn10 měl mít velikost do 7 kbp.

Pro restrikční analýzu jsem použila enzymy, které nemají restrikční místo v min-Tn10 (EcoRI a HindIII) a s jedním zásahovým místem uprostřed mini-Tn10 (NcoI).

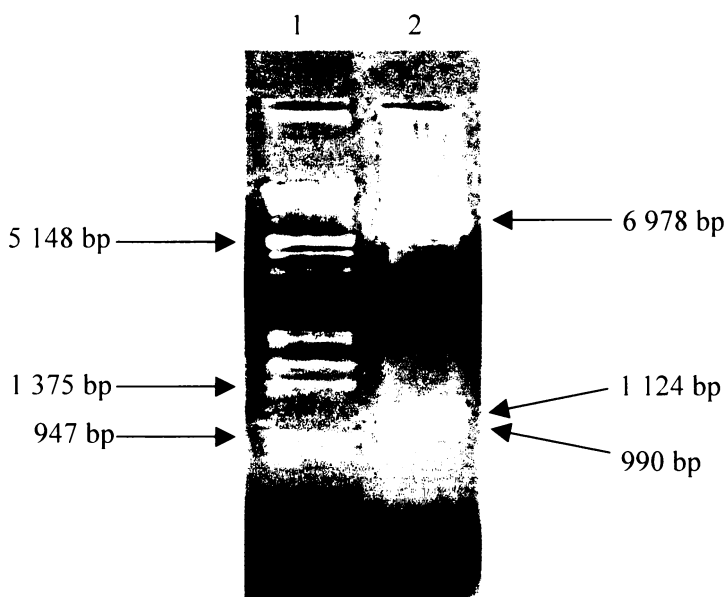
4.2.1. Příprava restrikčních fragmentů DNA pro hybridizaci

U vybraných mutant *Bacillus subtilis* č. 12, 13, 19, 21, 24, 37, 47 a 49 jsem vyizolovala chromozomální DNA (kapitola 3.2.2.1.). Elektroforeticky jsem pak ověřila zda během izolace nedošlo k její degradaci. Koncentraci a čistotu DNA jsem stanovila spektrofotometricky změřením absorpce při λ_{260} a λ_{280} . Tyto DNA jsem štěpila restrikčními enzymy EcoRI, HindIII a NcoI po dobu 16-18 hodin. Restrikční směsi jsem pak rozdělila v 1% agarózovém gelu za podmínek elektroforézy 3-4 V/cm. Rozdělenou DNA jsem pak přenesla metodou Southern blotting (kapitola 3.2.2.10.) na kladně nabitou nylonovou membránu (SIGMA). Po zafixování DNA k membránám působením UV světla jsem membrány hybridizovala s neradioaktivně značenou sondou.

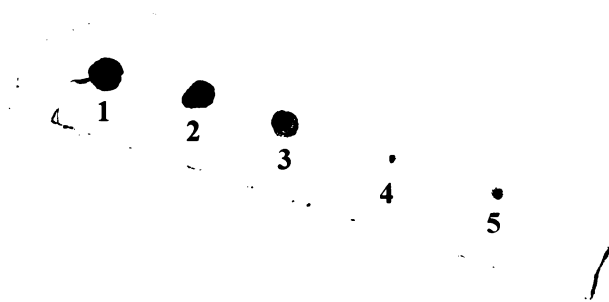
4.2.2. Příprava neradioaktivně značené sondy

Jako sondu jsem použila úsek DNA plazmidu pHV1249 nesoucí část mini-Tn10. Tento plazmid jsem vyizolovala z kmene *Escherichia coli* ECE61 HB101 maxi preparací pomocí kolonky. Plazmid jsem pak štěpila restrikčním enzymem EcoRV na tři fragmenty o velikostech 6 978 bp, 1 124 bp a 990 bp (obr.13). Jako templát pro přípravu značené sondy jsem použila fragment plazmidu o velikosti 1 124 bp, který nese v sobě část mini-Tn10. Restrikční směs jsem elektroforeticky rozdělila v gelu s 1% nízkotající agarózou a požadovaný fragment jsem vyizolovala z gelu pomocí sady DNA Extraction Kit (FERMENTAS).

K vytvoření dostatečně silné sondy jsem použila 500 ~ 600 ng DNA a označila jsem ji neradioaktivní značkou DIG pomocí Klenowova fragmentu a sady DIG-High Prime (ROCHE). Po označení jsem sondu přečistila gelovou filtrací. Vhodné ředění označené DNA sondy jsem stanovila pomocí metody „dot blot“ (kapitola 3.2.2.12.) (obr.14). Sondu jsem naředila hybridizačním roztokem v poměru 1:650. Mezi jednotlivými hybridizacemi jsem sondu uchovávala při -20°C .



Obr.13 : 1% agarózový gel s plazmidem pHV1249 štěpený restrikcí enzymem EcoRV. K přípravě sondy jsem použila fragment o velikosti 1 124 bp.
 1. standard λ EcoRI/HindIII
 2. pHV1249/EcoRV



Obr.14 : Testování sondy metodou „dot blot“.
 Ředění : 1. – 1 : 10
 2. – 1 : 100
 3. – 1 : 1 000
 4. – 1 : 10 000
 5. – 1 : 100 000

4.2.3. Hybridizace a detekce

Membrány s uchycenými a zafixovanými fragmenty DNA jsem hybridizovala se sondou označenou DIG-značkou. Hybridizace probíhala přes noc při teplotě 69°C (kapitola 3.2.2.13.). Po promytí membrán jsem navázanou sondu detekovala pomocí protilátky Anti-DIG s konjugovanou alkalickou fosfatázou (ROCHE). Proužky DNA s navázanou protilátkou jsem pak vizualizovala chromogenní reakcí, při které docházelo ke štěpení substrátu NBT/BCIP alkalickou fosfatázou za vzniku barevného produktu (kapitola 3.2.2.14.).

Po hybridizaci a detekci se ukázalo, že z 8 analyzovaných mutant mají některé stejný či podobný hybridizační profil. Stejný profil má trojice mutant č. 13, 19 a 47, dvojice mutant č. 21 a 24 a podobný profil trojice mutant č. 12, 37 a 49.

U mutant č. 21 a 24 jsem detekovala jen jeden fragment nesoucí mini-Tn10 za restrikce enzymem neštěpící uvnitř sekvence transpozónu. Při dvojnásobné restrikci enzymy EcoRI/NcoI jsem pak detekovala dva fragmenty (Obr.15B, Obr.16B).

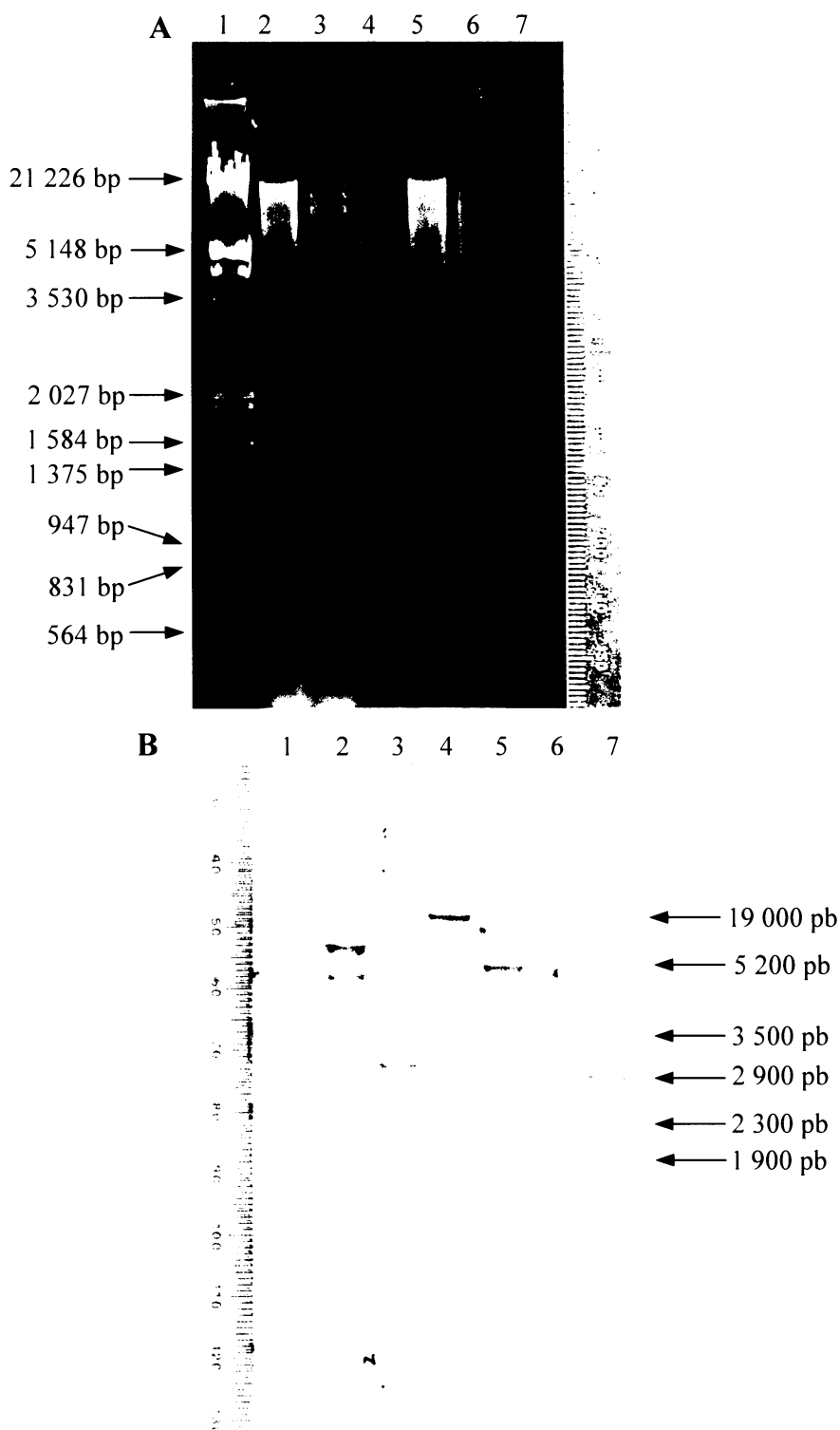
EcoRI	~ 5,2 kbp
EcoRI/NcoI	~ 3,5 kbp
	~ 2,3 kbp
HindIII	~ 2,9 kbp

U mutant č. 13, 19 a 47 jsem zaznamenala dva pozitivní signály při restrikci enzymem EcoRI, čtyři pozitivní signály při dvojnásobné restrikci enzymy EcoRI/NcoI a dva pozitivní signály při restrikci enzymem HindIII (Obr.15B, Obr.16B, Obr.17B). Podle výsledků štěpení restrikčním enzymem EcoRI předpokládám, že transpozón se inzertoval pravděpodobně do dvou míst chromozomu.

EcoRI	~ 6,2 kbp
	~ 5,3 kbp
EcoRI/NcoI	~ 3,0 kbp
	~ 2,6 kbp
	~ 2,0 kbp
	~ 1,9 kbp
HindIII	~ 22 kbp
	~ 19 kbp

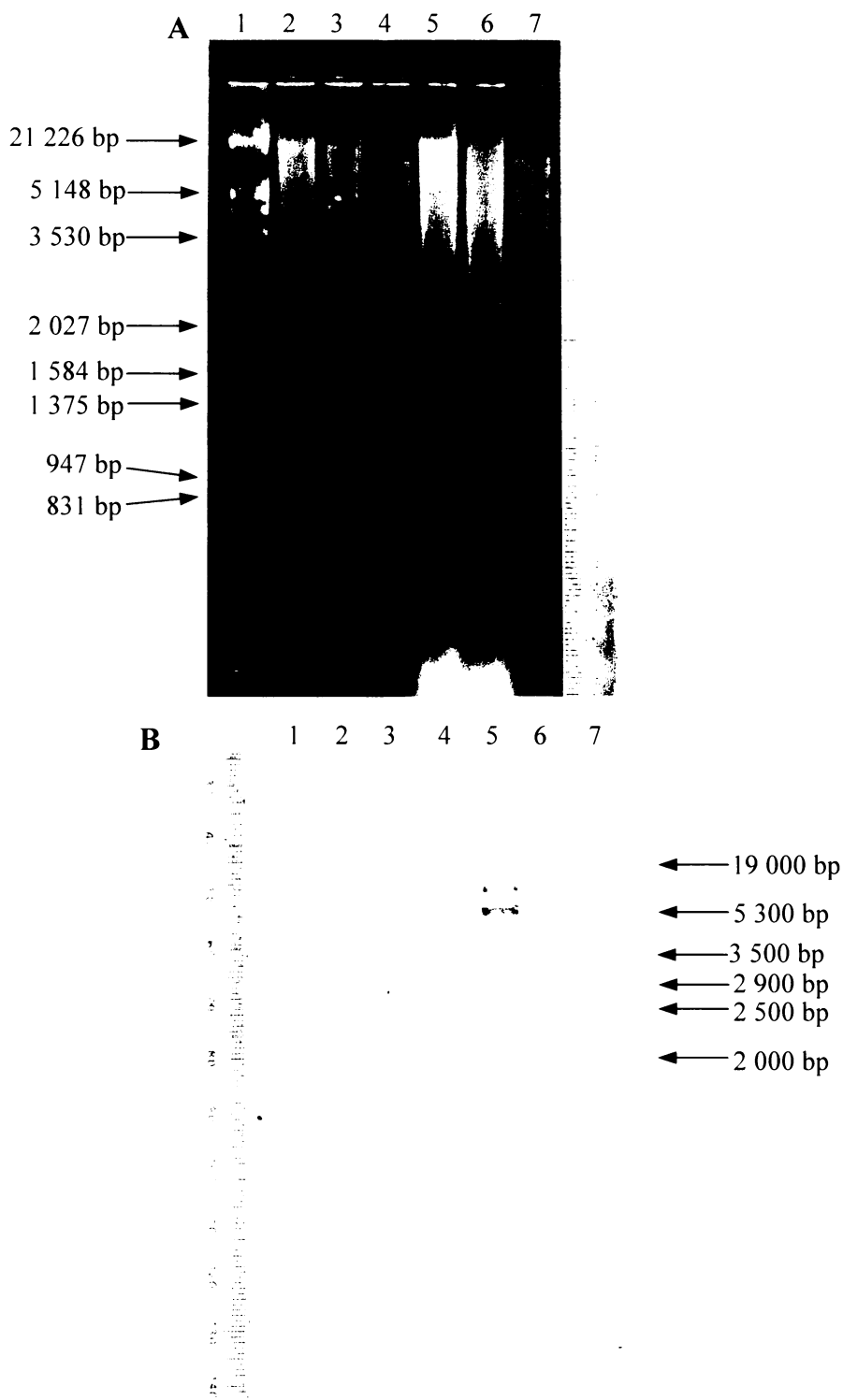
Mutanty č. 12, 37 a 49 mají transpozón inzertován asi do čtyř míst chromozómu. U mutant č. 37 a 49 jsem detekovala čtyři fragmenty při štěpení restriční enzymem EcoRI, sedm fragmentů při dvojnásobném štěpení enzymy EcoRI/NcoI a dva velké fragmenty při štěpení enzymem HindIII. (Obr.17B, Obr.18B). U mutanty č. 37 chybí dva horní fragmenty u štěpení enzymy EcoRI/NcoI. Mutant č. 12 má pak zcela odlišný hybridizační profil.

Při dalších analýzách jsem dále pracovala jen s mutanty č. 21 a 24.



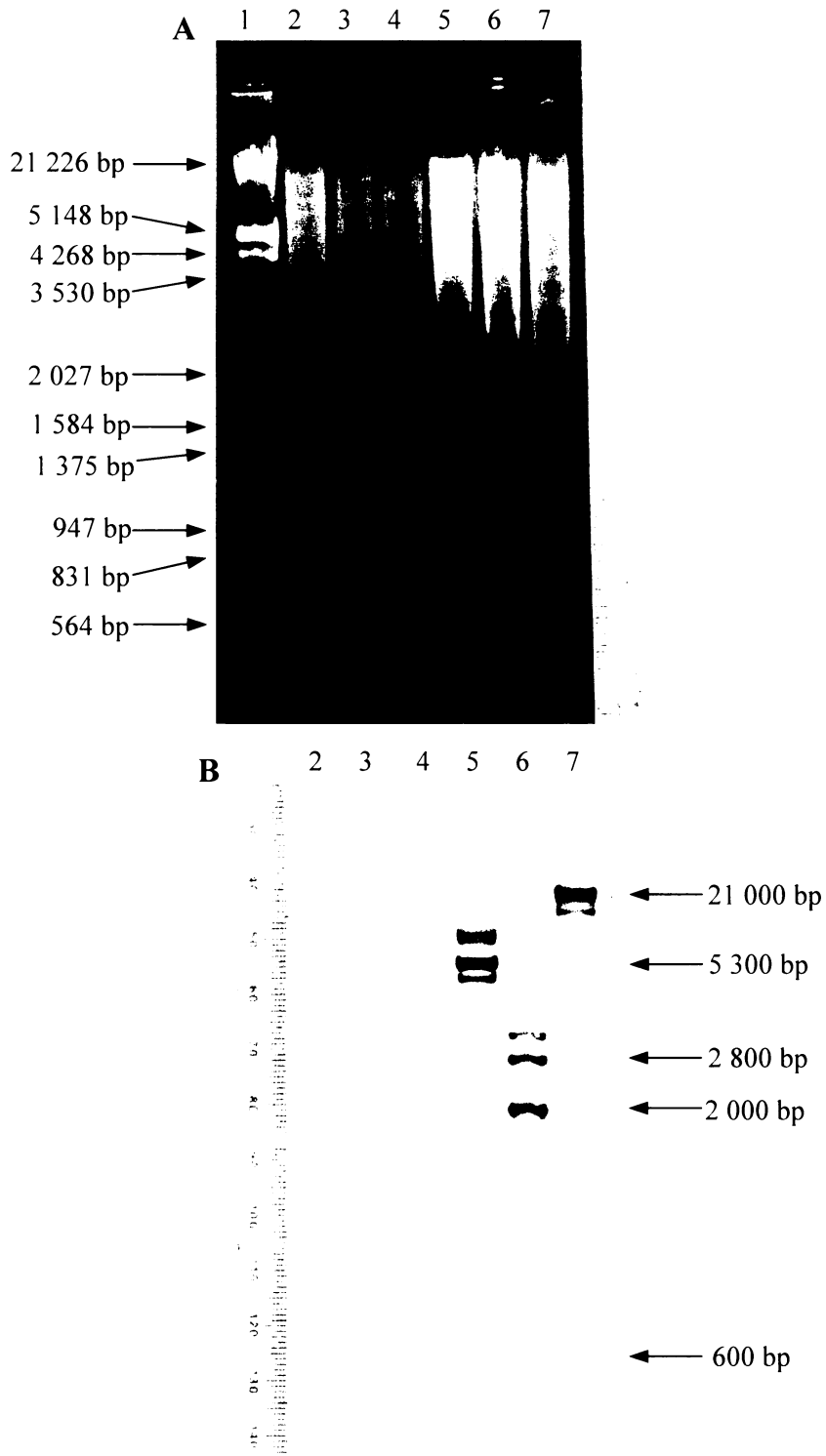
Obr.15 Štěpená chromozomální DNA mutant 19 a 24 a její hybridizace s DIG-značenou sondou. **A** - 1% agarózový gel, **B** – nylonová membrána po hybridizaci

1. standard λ EcoRI/HindIII
2. mutanta č. 19/EcoRI
3. mutanta č. 19/EcoRI/NcoI
4. mutanta č. 19/HindIII
5. mutanta č. 24/EcoRI
6. mutanta č. 24/EcoRI/NcoI
7. mutanta č. 24/HindIII



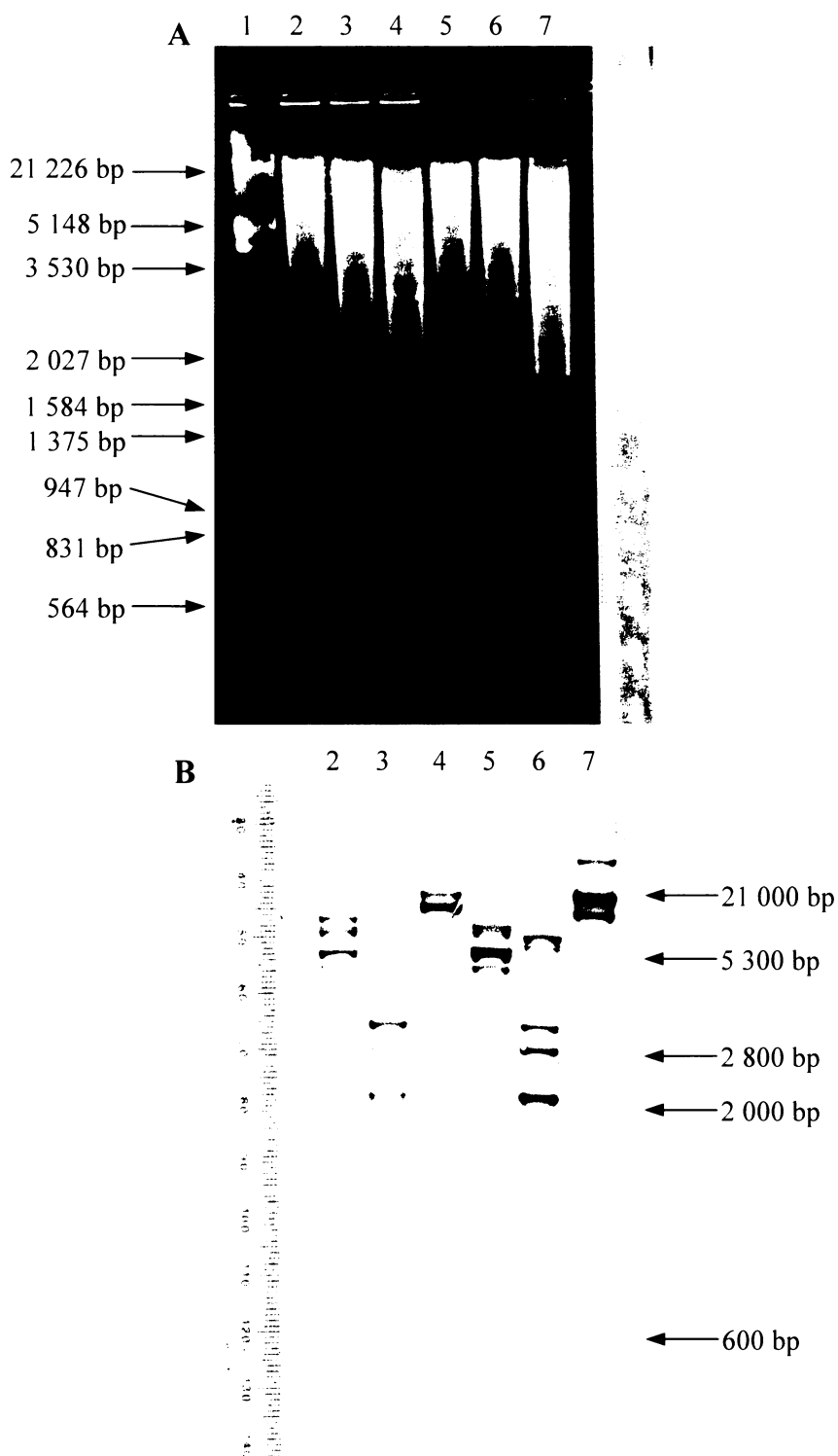
Obr.16 Štěpená chromozomální DNA mutant 21 a 47 a její hybridizace s DIG-značenou sondou. **A** - 1% agarózový gel, **B** – nylonová membrána po hybridizaci

1. standard λ EcoRI/HindIII
2. mutanta č. 21/EcoRI
3. mutanta č. 21/EcoRI/NcoI
4. mutanta č. 21/HindIII
5. mutanta č. 47/EcoRI
6. mutanta č. 47/EcoRI/NcoI
7. mutanta č. 47/HindIII



Obr.17 Štěpená chromozomální DNA mutant 13 a 37 a její hybridizace s DIG-značenou sondou. **A** - 1% agarózový gel, **B** – nylonová membrána po hybridizaci

1. standard λ EcoRI/HindIII
2. mutanta č. 13/EcoRI
3. mutanta č. 13/EcoRI/NcoI
4. mutanta č. 13/HindIII
5. mutanta č. 37/EcoRI
6. mutanta č. 37/EcoRI/NcoI
7. mutanta č. 37/HindIII



Obr.18 Štěpená chromozomální DNA mutant 12 a 49 a její hybridizace s DIG-značenou sondou. **A** - 1% agarózový gel, **B** – nylonová membrána po hybridizaci

1. standard λ EcoRI/HindIII
2. mutanta č. 12/EcoRI
3. mutanta č. 12/EcoRI/NcoI
4. mutanta č. 12/HindIII
5. mutanta č. 49/EcoRI
6. mutanta č. 49/EcoRI/NcoI
7. mutanta č. 49/HindIII

4.3. Amplifikace genů *ktrAB* a *ktrC* a *ktrD* metodou PCR

Cíl : Zjistit zda se u mutant č. 21 a 24 inzeroval minitranspozón Tn10 do známých transportních systémů pro draselné ionty Bacillus subtilis : ktrAB, ktrC a ktrD.

U *Bacillus subtilis* byly do této doby objeveny dva nízkoafinitní systémy pro transport draselných iontů KtrAB a KtrCD. KtrAB je kódován geny *ktrA* a *ktrB*, které tvoří jeden operon o velikosti 2001 bp. Systém KtrCD je kódován geny *ktrC* (663 bp) a *ktrD* (1347 bp), které se nacházejí na různých místech chromozomu (kapitola 2.4.1.). Inzerce minitranspozónu Tn10 (1653 bp) do těchto genů by se pak projevilo zvětšením fragmentu DNA naamplifikovaného metodou PCR v porovnání s velikostí genu bez inzerce.

K namnožení genů *ktrA* a *ktrB* jsem použila primery UAA1 a UBG2, pro gen *ktrC* primery KQB1 a KQA2 a pro gen *ktrD* primery KRL1 a KRM2 (kapitola 3.1.3.). Jako kontrolu jsem použila chromozomální DNA divokého kmene *B. subtilis* 168. Po ověření výsledku PCR jsem zjistila, že namnožené fragmenty mutant č. 21 a 24 mají stejnou velikost jako PCR fragment divokého kmene. Mini-Tn10 se tedy do těchto genů nevlozil.

4.4. Sporulace

Cíl : Zjistit u vybraných mutant, zda nedošlo mutací k poškození sporulačního procesu.

U *Bacillus subtilis* je za nepříznivých podmínek sporulace poslední šancí bakterie na přežití. Sporulace a osmorezistence jsou regulovány stejnou regulační drahou obecného stresu. Tyto procesy totiž sdílejí společné či zastupitelné komponenty svých regulačních drah : například DegU-P může nahradit SpoOA-P při spouštění sporulace (RUZAL a SANCHEZ-RIVAS 1998).

U mutant č. 21 a 24 jsem pak zjišťovala, zda vložením mini-Tn10 do chromozomu nedošlo k přerušení genu účastního se sporulačního procesu. Jako pozitivní kontrolu jsem použila *Bacillus subtilis* 168. Kultury bakterií narostlých přes noc jsem rozetřela na sporulační plotny a kultivovala 5 dní při teplotě 40°C. Pod mikroskopem jsem pak zjišťovala tvorbu spor.

Jak divoký kmen *Bacillus subtilis* 168 tak i mutanty tvořily spory.

4.5. Lokalizace mutace

Cíl : Zjistit lokalizaci mutace inzercí mini-Tn10 do bakteriálního genomu mutant č. 21 a 24.

K lokalizaci genu, který byl vložením transpozónu přerušen, jsem zvolila metodu náhodného klonování DNA studovaných mutant a vytvoření chromozomální knihovny. Z ní jsem pak seletovala klon obsahující mini-Tn10. K selekci jsem využila skutečnost, že do mini-Tn10 je vložena rezistence k chloramfenikolu.

Na základě výsledků restrikční analýzy a hybridizace jsem se rozhodla použít ke konstrukci bakteriální knihovny restrikční enzym HindIII (obr.15B, 16B). Tento enzym u mutant č. 21 a 24 dával vznik fragmentu chromozomální DNA s inzercí mini-Tn10 o velikosti 2,9 kbp. Takto veliký inzert dává s ohledem k velikosti plazmidu předpoklady ke vzniku snadno transformovatelného konstruktů.

4.5.1. Příprava vektorové DNA pro účely klonování

Jako vektorovou DNA jsem ve svých pokusech použila plazmidy pGEM-4Z a plazmid pINDUCE. Plazmid pGEM-4Z umožňuje selekce v *Escherichia coli* a plazmid pINDUCE v *Bacillus subtilis*.

Plazmid pGEM-4Z jsem nejdříve vyizolovala z buněk *E. coli DH5a* a plazmid pINDUCE z buněk *B. subtilis BD194* (kapitola 3.2.2.3.). Tuto plazmidovou DNA jsem štěpila stejným enzymem jako byla štěpená chromozomální DNA mutant č. 21 a 24, tedy restrikčním enzymem HindIII, abych získala kompatibilní přesahující konce nutné k ligaci. Aby během ligace nedocházelo ke spojení konců plazmidů, fosfátový zbytek z 5' konce vektorové DNA jsem odstranila působením alkalické fosfatázy (kapitola 3.2.2.16.). Takto upravený plazmid jsem před ligací ještě přečistila od zbytků předchozích reakcí pomocí DNA Extraction Kit (FERMENTAS).

4.5.2. Příprava chromozomální DNA pro účely klonování

Chromozomální DNA mutantních kmenů *Bacillus subtilis* č. 21 a 24 jsem izolovala z bakteriální kultury (kapitola 3.2.2.1.) a štěpila po dobu 16 hodin restrikčním enzymem HindIII.

4.5.3. Klonování

Do ligační směsi jsem použila 300 ng vektorové DNA a 150 ng inzertové DNA. Ligace probíhala 18 hodin při teplotě 10°C. Další den jsem ligační směsi s plazmidem pGEM-4Z transformovala do kompetentních buněk *E. coli DH5α* (kapitola 3.2.1.11.) a ligační směsi s plazmidem pINDUCE do kompetentních buněk *B. subtilis BD194* (kapitola 3.2.1.8.).

Transformační směsi obsahující plazmid pGEM-4Z jsem vysela na misky s LB agarovým médiem s přidavkem ampicilinu, Xgal a IPTG a kultivovala přes noc při 37°C. Tento typ selekce umožňuje odlišit klony nesoucí plazmidy s inzertem od klonů s prázdnými plazmidy. Narostlé transformanty jsem podle množství buď přečárkovala nebo přerazítkovala na agarové LB plotny s ampicilinem a chloramfenikolem a kultivovala přes noc při 37°C. Po dvojnásobné selekci se mi podařilo získat několik kolonií nesoucí rezistenci jak k ampicilinu tak ke chloramfenikolu. Narostlé kolonie jsem přečárkovala na čerstvé LB plotny s ampicilinem a chloramfenikolem a zároveň zaočkovala do tekutého LB média se stejnými antibiotiky a kultivovala přes noc při 37°C. Docházelo však k tomu, že v tekutém médiu bakterie nevyrostly vůbec a na agarové plotně se vytvořily malé kolonie až za velmi dlouhou dobu. Po pokusu vyizolovat plazmidovou DNA z těchto kolonií jsem zjistila, že žádný plazmid neobsahují. Z toho usuzuji, že se plazmid se zaklonovaným fragmentem inzertoval do chromozomální DNA.

Z tohoto důvodu jsem zkusila získat žádaný fragment selekcí v *B. subtilis*. K tomu jsem použila plazmid pINDUCE a jeho ligační směs jsem transformovala do buněk *B. subtilis BD194* (recA trpC2). Transformaci jsem nejdříve zkusila pomocí přirozené transformace (kapitola 3.2.1.8.). Dávala však malý počet transformantů, a proto jsem zkusila buňky transformovat elektroporací. Při elektroporaci jsem aplikovala různé pulsy na transformační směs, abych získala co nejlepšího výsledku transformace (tabulka č. 2). Tyto transformační směsi jsem pak vysela na LB plotny s přidavkem kanamycinu a kultivovala přes noc při 37°C. Podařilo se mi získat pouze však malý počet transformantů, které jsem přečárkovala na LB plotny s kanamycinem a chloramfenikolem a kultivovala přes noc při 37°C. Po této selekci se mi i přes několik pokusů však nepodařilo získat žádnou kolonii nesoucí rezistenci ke kanamycinu tak i k chloramfenikolu.

puls	počet kolonií (LB+kan)
1000V, 25 μ F, 200 Ω	20 kolonií
1000V, 50 μ F, 200 Ω	0 kolonií
1500V, 10 μ F, 200 Ω	3 kolonie
1800V, 25 μ F, 200 Ω	0 kolonií
2000V, 10 μ F, 200 Ω	15 kolonií
2500V, 25 μ F, 200 Ω	0 kolonií
přirozená transformace	10 kolonií

Tab.2 : Počet kolonií při různé velikosti pulsu za elektroporace a při přirozené transformaci ligační směsi vytvořenou z plazmidu pINDUCE do buněk *B. subtilis* BD194.

4.6. Inverzní PCR

Cíl : Zjistit místo inserce mini-Tn10 do genomu mutant č. 21 a 24.

Jako z dalších možností jak získat sekvenci mutantního genu, který byl přerušen mini-Tn10, je metoda inverzní PCR. Principem tohoto postupu je pomocí PCR a inverzních primerů amplifikovat neznámé okolí známé sekvence. Mini-Tn10 obsahuje gen *cat*, z něhož pak byly vytvořeny inverzní primery. Podmínkou tohoto postupu je ligace fragmentů chromozomální DNA do jednotlivých kroužků.

4.6.1. Příprava ligačních směsí

Chromozomální DNA mutantních kmenů *Bacillus subtilis* č. 21 a 24 jsem izolovala z bakteriální kultury mutant (kapitola 3.2.2.1.) a štěpila po dobu 16 hodin restrikcí enzymem HindIII.

Rozštěpenou chromozomální DNA jsem cirkularizovala ligací. Připravila jsem několik ligačních směsí s rozdílnou koncentrací DNA a s různou reakční teplotou a dobou reakce, abych našla vhodné podmínky, u kterých by se DNA cirkularizovala (tabulka č.3). Koncentrace DNA musela být v reakci menší než při přípravě normální ligační směsi, aby byla zajištěna cirkularizace jednotlivých fragmentů a ne jejich vzájemné spojování. Při přípravě poslední ligační směsi v tabulce č.3 jsem nechala reakci proběhnout jen po dobu 1 hodiny při 22 °C. Při zvýšené teplotě byla totiž nutná kratší doba reakce, aby nedocházelo ke vzniku nežádoucích produktů.

objem reakce	množství DNA	reakční teplota	doba reakce
200 μ l	25 ng	8 °C	16-18 hod
100 μ l	25 ng	8 °C	16-18 hod
50 μ l	50 ng	8 °C	16-18 hod
50 μ l	25 ng	8 °C	16-18 hod
50 μ l	25 ng	22 °C	1 hod

Tab.3 : Připravené různé ligační směsi pro inverzní PCR.

4.6.2. Inverzní PCR a sekvenace

Ligační směs jsem před PCR přechistila pomocí DNA Extraction Kit. K namnožení mé neznámé sekvence jsem použila inverzní primery CAT1KF a CAT2KR. Jako kontrolu jsem pak použila primery CAT1F a CAT2R, abych zjistila, zda ligační směs obsahuje fragment s genem *cat*, jež je součástí minitranspozónu Tn10. Abych snížila nespecifické nasedání primerů, použila jsem při PCR Hot Star *Taq* polymerázu (FERMENTAS) (kapitola 3.2.2.7.). Výsledky PCR jsem pak zkontrolovala na elektroforéze. Gen *cat* se naamplifikoval, ale při použití inverzních primerů jsem po ověření dostala směs o podobné velikosti, která nešla separovat. Přesto jsem tuto směs vyřízla z gelu a nechala sekvenovat.

Sekvenční analýza byla provedena servisním pracovištěm (kapitola 3.2.2.18.). Bylo sekvenováno z obou inverzních primerů CAT2KF a CAT2KR a výsledky sekvenční analýzy jsem pak vyhodnocovala pomocí programu CHROMAS. Získala jsem však velmi špatně čitelné sekvence, ze kterých nešlo nalézt, který gen byl přerušen mini-Tn10.

4.7. Transkripční profily

Cíl : Zjistit rozdíly v transkripčních profilech mezi divokým kmenem Bacillus subtilis 168 a mutanty 21 a 24 za normálních podmínek a osmotického šoku.

Mini-Tn10 mohl přerušit gen, ze kterého se exprimuje jeden konečný protein, nebo regulační gen, který řídí expresi dalších proteinů. Jedním ze způsobů, jak zjistit tuto vlastnost mutanta, je metodou hybridizace cDNA sondou. Pro přípravu sond jsem použila mRNA vyizolovanou z divokého kmene *Bacillus subtilis 168* a mutant 21 a 24 transkribovanou za normálních a osmotických podmínek. Pokud by bylo více rozdílů

ve spektru detekovaných signálů mezi divokým kmenem a mými mutanty, pak by mini-Tn10 pravděpodobně přerušil regulační gen.

4.7.1. Příprava restrikčních fragmentů DNA pro hybridizaci

U divokého kmene *Bacillus subtilis* 168 jsem vyizolovala chromozomální DNA. Abych dostala co nejčistější a co nejméně degradovanou DNA, pokusila jsem se chromozomální DNA vyizolovat přímo v gelu (kapitola 3.2.2.2.). Bohužel tuto DNA se mi pak nepodařilo štěpit restrikčním enzymem, a proto jsem se vrátila ke klasické izolaci chromozomální DNA (kapitola 3.2.2.1.).

Vyizolovanou chromozomální DNA jsem štěpila restrikčním enzymem EcoRI po dobu 16 – 18 hodin. Restrikční směs jsem pak rozdělila v 1% agarózovém gelu za podmínek elektroforézy 3-4 V/cm. Rozdělenou DNA jsem pak přenesla metodou Southern blotting (kapitola 3.2.2.10.) na kladně nabitou nylonovou membránu (SIGMA). Po zafixování DNA k membránám působením UV světla jsem membrány hybridizovala s neradioaktivně značenými sondami.

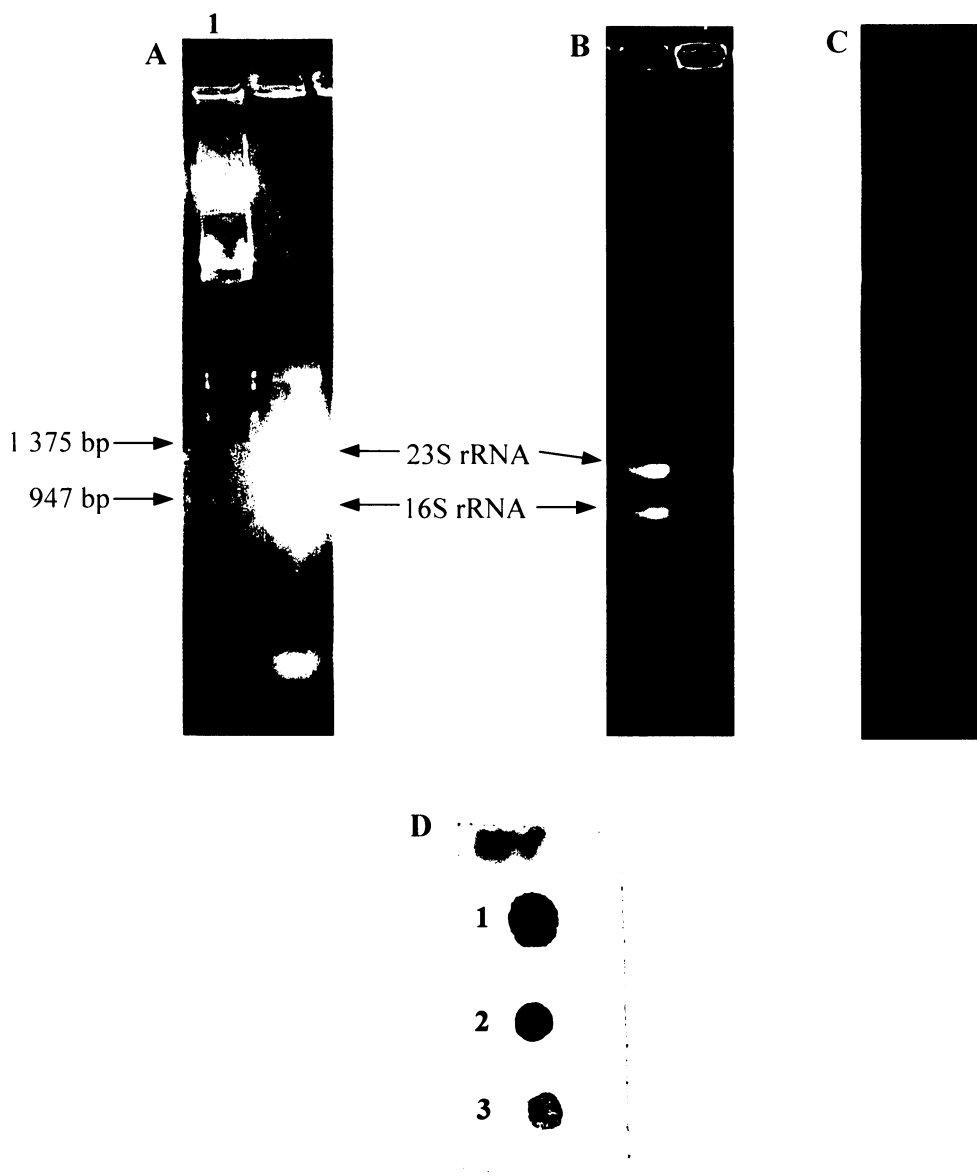
4.7.2. Příprava neradioaktivně značených sond

Jako sondy jsem použila cDNA vytvořené z mRNA *Bacillus subtilis* 168 a mutant 21 a 24 za osmotických a normálních podmínek. Osmotický šok jsem provedla, když kultura buněk narostla do $OD_{525} = 0,3$ přidáním NaCl do konečné koncentrace 0,6M. Buňky jsem pak sklídila centrifugací, když dorostly do $OD_{525} = 0,5$. Poté jsem vyizolovala celkovou RNA z buněk podle kapitoly 3.2.3.1.

Abych se zbavila všech případných zbytků DNA ve vzorku ošetřila jsem tyto RNA DNázou (kapitola 3.2.3.2.). Poté jsem z těchto vzorků s celkovou RNA vyizolovala pouze mRNA pomocí sady mRNA-ONLY Kit (EPICENTRE) (kapitola 3.2.3.3.). Tato sada dokáže jednoduchou ale efektivní metodou získat z celkové vyizolované prokaryotní RNA pouze mRNA. Základní složkou tohoto Kitu je TerminatorTM 5'-fosfát závislá exonukleáza, která štěpí RNA obsahující 5'-monofosfát ve své molekule. Naopak tento enzym neštěpí RNA obsahující 5'-trifosfát, 5'-cap nebo 5'-hydroxylovou skupinu. Bakteriální rRNA obsahuje ve své molekule 5'-monofosfát a tudíž je substrátem pro Terminátor exonukleázu.

Získané mRNA jsem pak převedla na cDNA pomocí reverzní transkriptázy (kapitola 3.2.3.5.). cDNA jsem pak ještě naamplifikovala pomocí Klenowova fragmentu

(kapitola 3.2.3.6.) a označila neradioaktivní značkou DIG (kapitola 3.2.2.11.). Vzhledem k tomu, že jsem v předchozích krocích získala pouze mRNA, mohla jsem použít jako primery náhodné hexamery (Random prime hexamer – FERMENTAS). Po označení jsem sondy přečistila gelovou filtrací a míru označení jsem zkontrolovala pomocí metody „dot blot“ (kapitola 3.2.2.12.).



Obr.19 : Postup práce při tvorbě sond.

A – celková prokaryotní RNA (1 – standard λ /EcoRI/HindIII)

B – prokaryotní RNA ošetřená DNázou

C – prokaryotní mRNA

D – jedna ze sond (dot blot : 1 – ředění 1:10, 2 – ředění 1:100, 3 – ředění 1:1000)

4.7.3. Hybridizace a detekce

Membránu s uchycenými a zafixovanými fragmenty DNA jsem hybridizovala vždy s jednou ze sond označenou DIG-značkou. Hybridizace probíhala přes noc při teplotě 64°C (kapitola 3.2.2.13.). Po promytí membrány jsem navázanou sondu detekovala pomocí protilátky Anti-DIG s konjugovanou fosfatázou (ROCHE). Proužky DNA s navázanou protilátkou jsem pak detekovala chemiluminiscenční reakcí pomocí sloučeniny CSPD (kapitola 3.2.2.15.). CSPD je chemiluminiscenční substrát pro alkalickou fosfatázu, který umožňuje vysoce citlivou a rychlou detekci biomolekul produkcí viditelného světla, které může být zachyceno na rentgenový film.

Po hybridizaci a detekci byly patrné některé rozdíly v transkripčních profilech mezi divokým kmenem *Bacillus subtilis 168* a mutanty 21 a 24 kultivovaných za normálních a osmotických podmínek (kapitola 4.7.2.). Tyto profily jsem porovnávala podle membrány hybridizovanou sondou z mRNA *B. subtilis 168* kultivovaného za nestresových podmínek (obr.20). Stresovaný divoký kmen a obě mutanty za normálních i osmotických podmínek postrádaly signál č. 4 (modré šipky). Mutanty kultivované za normálních podmínek měly pak i jinou intenzitu signálu č. 3 (žluté šipky). U mutanta 24 jsem našla ještě další rozdíly. Tento mutant postrádal další dva slabé signály č. 1 a 2 (zelené šipky).

Je zřejmé, že mutanty 21 a 24 se liší ve svých transkripčních profilech oproti divokému kmeni a to jak při normálních podmínkách kultivace tak i při stresu. Navíc se od sebe liší i samotné mutanty.



Obr.20 : Štěpená chromozomální DNA *Bacillus subtilis* 168 restrikčním enzymem EcoRI a její hybridizace s DIG-značenými sondami vytvořené z různých kmenů kultivovaných za normálních a osmotických podmínek. Červené šipky ukazují, to co je společné s divokým kmenem kultivovaným za normálních podmínek, modré a zelené šipky ukazují, to v čem se liší a žluté šipky ukazují rozdíly v intenzitě.

5. Diskuze

Kolísání vnější osmolarity je jeden z nejběžnějších typů environmentálních faktorů pro všechny druhy buněk, jak prokaryotického tak i eukaryotického původu. Jelikož se mikroorganismy snaží udržet svůj objem a turgorový tlak konstantní, musely si vyvinout účinné mechanismy reagující na změny v osmolaritě okolního prostředí. Primární odpovědí na zvýšenou osmolaritu je akumulace draselných iontů, které jsou následně nahrazeny kompatibilními osmoticky aktivními látkami a to jak transportem z vnějšího prostředí tak i syntézou *de novo*.

Transport draslíku uplatňující se v primární odpovědi na hypertonický šok je u *Bacillus subtilis* předmětem výzkumu několika pracovišť už řadu let. Nicméně se zatím nepodařilo prokázat u nalezených transportních draslíkových systémů osmosenzorické vlastnosti. Nebyl doposud také nalezen žádný funkční analog vysokoafinitního systému Kdp *Escherichia coli*, jež by měl zároveň osmosenzorické vlastnosti. Přítomnost ATPasové aktivity indukované limitními koncentracemi K⁺ iontů byla však u *B. subtilis* prokázána (ŠEBESTIAN *et al* 2001).

Existuje však ještě mnoho dalších nevyřešených otázek, jak *Bacillus subtilis* vnímá osmotický šok. U *B. subtilis* nebyly doposud prokázány žádné osmosenzorické vlastnosti u nalezených transportních systémů kompatibilních látek.

Cílem této diplomové práce pak bylo přispět k identifikaci a charakterizaci transportních systémů pro draselné ionty u *Bacillus subtilis*, popř. i systémů s osmosenzorickou funkcí.

Při výzkumu dějů probíhajících v živé buňce byla řada významných faktů odhalena na základě studia kmenů nesoucích ve svém genomu mutaci s určitým vztahem ke zkoumanému procesu. Ve své diplomové práci jsem pak zvolila postup nespecifické inzerční mutagenese pomocí minitranspozónu Tn10. Principem této metody je náhodná inaktivace genů na základě inserce minitranspozónu vneseného do buňky plazmidem a následná selekce mutant na žádaný fenotyp.

Použitý plazmid pHV1249 s transpozónem byl zkonstruován pro účely inzerční mutagenese v *Bacillus subtilis* a i v jiných grampozitivních mikroorganismů. Petit *et al.* (1990) uvádějí, že mini-Tn10 nemá žádné preferované inzerční místo na chromozomu *B. subtilis*. Frekvence transpozice by měla být 10⁻⁶ na element a generaci a ke vzniku auxotrofních a sporulačních mutant by mělo docházet méně jak z 1%. Další předností je

možnost selekce buněk s inzertem na základě získané rezistence k určitému antibiotiku. Umístěním transponázového genu mimo mini-Tn10 také zajišťuje relativní stabilní inzerci tohoto transpozónu do chromozomu.

Po přirozené transformaci plazmidu pHV1249 nesoucí mini-Tn10 a po navození podmínek pro transpozici bylo nutné z buněk, u kterých nedošlo k inzerci mini-Tn10 do chromozomu, příp. u kterých k transpozici došlo, ale obsahovaly ještě další kopii plazmidu, vyředit volný plazmid. To se dalo lehce provést zvýšením kultivační teploty, jelikož plazmid obsahuje termosenzitivní replikační počátek. Takto vytvořené mutanty jsem pak podrobila různým selekčním podmínkám a vytvořila fenotypovou knihovnu mutant osmosenzitivních při nízkých koncentracích draslíku.

V první fázi selekce jsem použila minimální médium s 0,5M NaCl na navození osmotického šoku a s dostatečnou a limitní koncentrací draselných iontů. U mutant, které měly slabší nárůst kolonií na médiu MM(K120) + NaCl, ale normálně rostly bez osmotického šoku, mohlo dojít k poškození některého z transportních systémů pro draselné ionty uplatňující se v osmoadaptaci. Na médiu s NaCl a bez K⁺ iontů mutanty nevyrostly vůbec, což může naznačovat, že by mohl být poškozen vysokoafinitní transportní systém pro K⁺ ionty. Spojením těchto dvou selekčních podmínek jsem pak dostala 44 osmosenzitivních mutant s možným přerušným genem pro transport draselných iontů nebo mohlo dojít k přerušení genu pro osmosenzorický protein typu histidinkinázy.

Po této selekci jsem těchto 44 osmosenzitivních mutant dále testovala, na schopnost vyrovnat se s osmotickým šokem v přítomnosti kompatibilních látek. Jako zástupce kompatibilních látek jsem do minimálního média přidala 1mM koncentraci prolinu, betainu, kyseliny glutamové a cholinu (prekurzor kompatibilní látky). Chtěla jsem vyloučit, zda jiný osmoadaptční mechanismus nepomáhá buňce přežít osmotický stres bez ohledu na nepřítomnost draselných iontů. K tomu docházelo u většiny mutant v přítomnosti prolinu, který je přenášen transportérem OpuE. U něho je známo, že je regulován na transkripční úrovni a je řízen stresovým transkripčním faktorem sigma B (van BLOHN *et al.* 1997). Ostatní kompatibilní látky (betain, kys. glutamová a cholin) přenášeny jinými Opu systémy napomáhají buňkám jen částečně se vyrovnat s osmotickým šokem na médiu bez K⁺ iontů, což mělo za následek dlouhý lag u sledovaných mutant a následně i malý nárůst kolonií. Tyto transportní systémy se tedy bez přítomnosti K⁺ iontů nezaktivují a netransportují tyto kompatibilní látky do buňky. To ukazuje na dřívější pozorování, že některé transportní proteiny pro přenos

kompatibilních látek popsané u jiných mikroorganismů zahájí svou činnost až při zvýšené intracelulární koncentraci draslíku.

K další charakterizaci jsem si vybrala osm mutant (č. 12, 13, 19, 21, 24, 37, 47 a 49), které by podle výsledků selekce mohly mít přerušeny výše zmíněné geny. Kolonie těchto mutant nevyrostly za osmotického šoku na médiu bez draselných iontů, což by mohlo naznačovat přerušeni vysokoafinitního systému pro transport draslíku. V přítomnosti různých kompatibilních látek či jejich prekurzoru mají za osmotického šoku na médiu bez K^+ iontů kolonie těchto mutant velice slabý nebo žádný nárůst. Mohlo u nich tedy dojít k zabránění aktivace transportérů pomocí draselných iontů.

Z dalších cílů mé diplomové práce bylo prokázat přítomnost minitranspozónu *Tn10* a zjistit počet jeho inzercí do bakteriálního genomu těchto mutant. Jedním ze způsobů, jak tohoto cíle dosáhnout je restrikční analýza a hybridizace (kapitola 4.2.). Chromozomální DNA mutantních kmenů jsem štěpila několika restrikčními enzymy, rozdělila v agarózovém gelu a přenesla na nylonovou membránu. Pro restrikční analýzu jsem použila enzymy, které nemají restrikční místo v *min-Tn10* (*EcoRI* a *HindIII*) a s jedním zásahovým místem uprostřed *mini-Tn10* (*NcoI*). Membrány s uchycenými fragmenty DNA jsem hybridizovala sondou obsahující sekvenci *mini-Tn10* a označenou neradioaktivní značkou DIG. Jako templát pro přípravu sondy jsem použila úsek plazmidu pHV1249 s genem *cat* jež je právě součástí *mini-Tn10*.

Po výsledcích restrikce a hybridizace se ukázalo, že z 8 analyzovaných mutant mají některé stejný či podobný hybridizační profil. Stejný profil má trojice mutant 13, 19 a 47, dvojice mutant 21 a 24 a velmi podobný profil mutanty 37 a 49. Mutant 12 je odlišný od všech ostatních. U mutant 21 a 24 jsem zjistila jen jedno místo inzerce *mini-Tn10*, u mutant 13, 19 a 47 dvě místa inzerce a u mutant 12, 37 a 49 se transpozón inzertoval asi do čtyř míst chromozomu. Chromozomální DNA, která byla štěpena enzymy *EcoRI* a *NcoI* současně, byl vždy dvojnásobný počet detekovaných signálů než jen při štěpení samotným enzymem *EcoRI*. Výjimkou jsou mutanty 12 a 49, u kterých jsem při použití enzymů *EcoRI* a *NcoI* detekovala pouze 7 signálů místo předpokládaných 8. To mohlo být způsobeno tím, že poslední signál byl tak malý a slabý, že už nešel zviditelnit pomocí substrátu NBT/BCIP. Mutant 37 měl pak menší počet detekovatelných signálů při štěpení tandemem restrikčních enzymů oproti mutantu 49. U něho jsem totiž našla pouze 5 signálů. Tento výsledek ukazuje na to, že nejde o jeden klon stejného typu mutantu.

Při dalších analýzách jsem pak dále pracovala jen s mutanty 21 a 24, které mají přítomnou jen jednu kopii mini-Tn10 v genomu *Bacillus subtilis*. Osmosenzitivní fenotyp těchto mutantních kmenů byl vyvolán inzerčním poškozením pouze jednoho genu nebo operonu. U ostatních mutantů by bylo velmi komplikované zjistit všechna místa inzerce, tudíž jsem je dál nezkoumala.

U mutantů 21 a 24 jsem pak zjišťovala, zda se transpozón neinzertoval do známých transportních systémů pro draslík (kapitola 4.3.). Pomocí metody PCR jsem vyloučila inzerce v genech *ktrAB*, *ktrC* a *ktrD*, jež kódují tyto známé systémy u *Bacillus subtilis* KtrAB a KtrCD. Po ověření výsledku PCR jsem zjistila, že namnožené fragmenty mutantů 21 a 24 mají stejnou velikost jako PCR fragment divokého kmene. Mini-Tn10 se tedy do těchto genů nevložit.

Dále jsem u těchto mutantů zjišťovala, zda nedošlo vložením mini-Tn10 k poškození sporulačního procesu (kapitola 4.4.). Sporulace a osmoresistence jsou regulovány stejnou regulační drahou obecného stresu. Tyto procesy totiž sdílejí společné či zastupitelné komponenty svých regulačních drah. Mikroskopickým pozorováním jsem pak zjistila, že jak divoký kmen *Bacillus subtilis* 168 tak i mutanty 21 a 24 tvořily bez problémů spory.

Třetím úkolem mé diplomové práce bylo určení genu poškozeného vložením transpozónu u mutantů 21 a 24. K lokalizaci genu jsem zvolila metodu náhodného klonování DNA studovaných mutantů a vytvoření chromozomální knihovny. Z ní jsem pak selektovala klon obsahující mini-Tn10. K selekci jsem využila skutečnost, že do mini-Tn10 je vložena rezistence k chloramfenikolu. Na základě výsledků restriční analýzy a hybridizace jsem se rozhodla použít ke konstrukci bakteriální knihovny restriční enzym HindIII. Tento enzym u mutantů 21 a 24 dával vznik fragmentu chromozomální DNA s inzerací mini-Tn10 o velikosti 2,9 kbp. Takto veliký inzert dává s ohledem k velikosti plazmidu předpoklady ke vzniku snadno transformovatelného konstruktů.

Jako první vektor jsem použila plazmid pGEM-4Z a selekci jsem provedla v *Escherichia coli* DH5a. Kolonie, které vyrostly na komplexních agarových médiích s přídatkem ampicilinu a chloramfenikolu, neobsahovaly však žádný plazmid. Z toho usuzuji, že se plazmid se vloženým fragmentem inzerce do chromozomální DNA *E. coli*. Vzhledem k tomu, že použitý mini-Tn10 obsahuje inverzní repetice Tn10 z *E. coli*, je možné, že došlo k aktivaci transpozónu. Z tohoto důvodu jsem zkusila získat žádaný fragment selekcí v *B. subtilis*. K tomu jsem použila jako vektor plazmid pINDUCE a

jeho ligační směs jsem transformovala do buněk *B. subtilis* BD194. Grampozitivní bakterie *B. subtilis* se však těžko transformuje elektroporací. Vzhledem k tomu, že šlo o transformaci plazmidové bakteriální knihovny se mi ani přirozenou transformací nepovedlo získat dostatečný počet transformantů, aby při dvojnásobné selekci měl aspoň jeden z nich rezistenci ke kanamycinu tak i k chloramfenikolu.

Jako z dalších možností, jak získat sekvenci mutantního genu, který byl přerušen mini-Tn10, jsem použila metodu inverzního PCR. Principem tohoto postupu je pomocí inverzních primerů amplifikovat neznámé okolí známé sekvence. Minitranspozón Tn10 obsahuje gen *cat*, z něhož pak byly vytvořeny inverzní primery. Podmínkou tohoto postupu je cirkularizace jednotlivých fragmentů chromozomální DNA pomocí ligace. Abych dosáhla tohoto předpokladu prováděla jsem ligaci za různých reakčních podmínek : koncentrace DNA, reakční teplota a objem reakční směsi. Z rozštěpené a zacirkularizované chromozomální DNA mutantů jsem se snažila pomocí inverzních primerů odvozených z genu *cat* naamplifikovat sekvenci přerušenu mini-Tn10. Ani v jednom případě jsem nezískala jednoznačný specifický produkt. Pouze ve dvou případech jsem získala směs DNA o podobné velikosti, která nešla separovat. Přesto jsem tuto směs vyřízla z gelu a nechala sekvenovat. Výsledek sekvenací však poskytl velmi špatně čitelné sekvence, ze kterých nešlo nalézt geny přerušené mini-Tn10. Důvodem, proč se mi nepodařilo naamplifikovat tuto sekvenci, mohla být vzájemná ligace fragmentů do lineární DNA místo její požadované cirkularizace.

Vysvětlení skutečnosti, že při zachování chloramfenikolové rezistence klony neobsahovaly plazmid s inzertem, si vysvětluji tím, že minitranspozón Tn10 se inzertoval v mutantech 21 a 24 do blízkosti transponázového genu přítomného v genomu *Bacillus subtilis*. Při selekci bakteriální knihovny pak mohlo dojít k přenosu mini-Tn10 z plazmidu do chromozomu *Escherichia coli*. Vyhledala jsem tedy všechny transponázové geny v genomu *Bacillus subtilis* a snažila jsem se v jejich okolí nalézt gen, který by mohl mít souvislost s osmoadaptací mechanismy (BSORF : <http://bacillus.genome.jp>). Našla jsem v jeho genomu dvě místa obsahující transponázové geny. První oblastí je fágový klastr, který obsahuje řadu transponázových proteinů (*ydcP*, *ydcQ*, *ydcR*, *yddb*, *yddE* a *yddG*) a je lokalizován na chromozomu *B. subtilis* v regionu D v rozmezí 532-543 kbp. Tento klastr je v blízkosti sigma B regulonu, čímž by vložení mini-Tn10 do kteréhokoli z jeho genů mohlo způsobit osmolabilitu mutantů. Druhou oblastí, kde se nachází gen kódující transponáze příbuzný protein (*yocA*), je region O v rozmezí 2084-2085 kbp. Tato transponáza je

bakteriálního původu, a proto by mohla přenést mini-Tn10 z plazmidu pGEM-4Z s požadovaným inzertem do chromozomu. V těsné blízkosti této transponázy se nachází neznámý gen *yoza*, který pravděpodobně plní funkci transkripčního regulátoru. V databázi BSORF jsem našla, že transkripce tohoto genu se zvyšuje při osmotickém šoku, což naznačuje jeho zapojení do osmoadaptativního mechanismu.

Posledním úkolem bylo zjistit rozdíly v transkripčních profilech mezi divokým kmenem *Bacillus subtilis* 168 a mutanty 21 a 24 kultivovaných za normálních a osmotických podmínek (kapitola 4.7.). Minitranspozón Tn10 mohl přerušit gen, ze kterého se exprimuje jeden konečný protein, nebo regulační gen, který řídí expresi dalších proteinů. Jedním ze způsobů, jak zjistit tuto vlastnost mutanta, je metoda hybridizace cDNA sondou. Pokud by bylo více rozdílů ve spektru detekovaných signálů mezi divokým kmenem a mými mutanty, pak by mini-Tn10 pravděpodobně přerušil regulační gen.

Chromozomální DNA jsem vyizolovala z divokého kmene *Bacillus subtilis* 168.. Pokoušela jsem se tuto DNA nejdříve vyizolovat přímo v agarózovém gelu, abych zajistila její největší čistotu a zároveň co nejmenší degradaci. Takto vyizolovanou DNA se mi však nepodařilo štěpit restrikcí enzymem, takže jsem nakonec použila klasickou izolaci chromozomální DNA, kterou jsem dále štěpila restrikcí enzymem EcoRI, rozdělila v agarózovém gelu a fragmenty DNA přenesla na nylonovou membránu. Ty jsem pak hybridizovala cDNA sondami označené neradioaktivní značkou DIG. Jako templáty pro přípravu sond jsem použila mRNA vyizolovanou z divokého kmene *Bacillus subtilis* 168 a mutant 21 a 24 transkribovanou za normálních a osmotických podmínek.

Výsledky hybridizace ukázaly více rozdílů ve spektrech detekovaných signálů u divokého kmene a mutant (obr.20). Nejdříve však upozorním na rozdíly mezi membránami hybridizovanými sondami z divokého kmene za normálních a stresových podmínek, které se změny v transkripčním profilu mutant. Prvním rozdílem je detekovaný signál č.4, který vymizel při osmotických podmínkách. Mohl by jít o protein, který buňce brání zahajovat stresovou odpověď za normálních růstových podmínek. Druhá změna ve spektru je pak ve zvýšení intenzity signálu č.3 za osmotických podmínek, mohl by to tedy být protein, který je potřeba za stresové situace ve větším množství. U mutant 21 a 24 se detekovaný signál č.4 neobjevil ani při normálních ani při osmotických podmínkách kultivace a intenzita signálu č.3 se za obou podmínek nemění. Tato pozorování mě pak vede k dedukci, že minitranspozón Tn10

přerušil regulační protein, který se podílí na ukončení stresové odpovědi. Mutantní buňky jsou tedy v pohotovostním režimu reagující na zvýšenou osmolaritu prostředí, i když ve skutečnosti bakterie rostou za nestresových podmínek. Další rozdíly jsem zaznamenala u signálů č. 1 a 2. U mutanta 24 se tyto dva signály vůbec nevyskytují, což by mohlo naznačovat, že přerušovaný regulační protein je součástí operonu. U mutanta 21 by mohla být mini-Tn10 přerušena kódující oblast tohoto proteinu, kdežto u mutanta 24 se mohl mini-Tn10 inzerovat do jeho promotorové oblasti. Tento předpoklad podporuje i skutečnost, že mutanty 21 a 24 mají stejný hybridizační profil. Inzerční místa mini-Tn10 je u nich velmi blízko sebe v genomu *Bacillus subtilis* 168.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce byla izolace osmosenzitivních mutant *Bacillus subtilis* se zaměřením mutací ve vysokoafinitním transportu draselných iontů. Výsledky práce mohou být rozděleny do tří částí. První část je zaměřena na přípravu osmosenzitivních mutant nespecifickou inzerční mutagenézí transpozónem mini-Tn10.

1. Získala jsem 44 osmosenzitivních mutant, které měly omezený růst při osmotickém šoku na médiu s koncentrací K^+ iontů 120mM. Při limitní koncentraci draslíku pak tyto mutanty nerostly vůbec.
2. Na médiu s prolinem jako kompatibilní látkou dokázaly tyto mutanty většinou odolávat osmotickému šoku i bez přítomnosti K^+ iontů. Ostatní testované kompatibilní látky neměly za těchto podmínek ochranný vliv.
3. Z těchto 44 osmosenzitivních mutant jsem si vybrala k další charakterizaci 8 mutant. Všechny nevykazovaly růst za osmotického stresu na médiích s limitní koncentrací draslíku, ale měly rozdílný fenotyp při pěstování na médiích s kompatibilními látkami.

Druhou část této práce jsem věnovala podrobné genetické analýze těchto osmi osmosenzitivních mutant.

1. Restrikční analýzou a hybridizací jsem zjistila, že některé mutanty mají stejný hybridizační profil a stejný počet inzercí mini-Tn10 do chromozomu *Bacillus subtilis*. Mutanty 21 a 24 mají jen jedno místo inzerce, mutanty 13, 19 a 47 dvě místa inzerce a mutanty 12, 37 a 49 čtyři místa inzerce.
2. Pro další analýzu jsem použila pouze mutanty 21 a 24, neboť jejich osmosenzitivní fenotyp je způsoben přerušením jen jednoho genu.
3. Pomocí metody PCR jsem vyloučila u mutant 21 a 24 poškození v genech *ktrAB*, *ktrC* a *ktrD* kódující známé transportní systémy pro draslík u *Bacillus subtilis*.
4. Ověřila jsem, že mutacemi nedošlo k porušení sporulačního procesu.
5. Analýza transkripčních profilů mutant 21 a 24 a rodičovského kmene *B. subtilis* 168 při normálních růstových podmínkách a osmotickém stresu ukázala několik rozdílů. Ty mě vedly k dedukci, že mini-Tn10 mohl přerušit gen pro regulační protein podílející se na ukončení stresové odpovědi.

Třetí část předkládané práce byla věnována lokalizaci míst vložení mini-Tn10 do chromozomu mutantních kmenů 21 a 24 *Bacillus subtilis*, které měly za následek osmosenzitivní fenotyp.

1. Při selekci chromozomální knihovny mutant v *Escherichia coli* se mi sice podařilo získat klony, které měly rezistenci na obě požadovaná antibiotika, ale neobsahovaly plazmid s požadovaným inzertem.
2. Při selekci v *Bacillus subtilis* se mi nepodařilo získat potřebný počet transformantů, který obsahoval plazmid s požadovaným inzertem.
3. Při použití inverzní PCR se mi nepodařilo získat jeden specifický úsek DNA bez kontaminace nespecifickými. Při sekvenaci proto nebylo možné získat čitelnou sekvenci.
4. Minitranspozón Tn10 se mohl inzertovat do blízkosti transponázového genu přítomného v genomu *B. subtilis*.
5. Databázovou analýzou jsem našla v genomu 2 místa obsahující transponázové geny. V blízkosti jednoho se vyskytují geny sigma B regulonu, v blízkosti druhého transkripční regulátor, jehož transkripce je aktivována při osmotickém šoku.

Seznam literatury

1. Altenford, K., Epstein, W. (1994): Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. Cell. Physiol. Biochem. 4: 160-168.
2. Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A., Ghazi, A. (1996): Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different threshold of applied pressure. J. Membr. Biol. 151: 175-187.
3. Biemans-Oldehinkel, E., Mahmood, N.A., Poolman, B. (2006): A sensor for intracellular ionic strength. Proceedings Of The National Academy Of Science Of The United States of America. 103(28): 10624-10629.
4. Biemans-Oldehinkel, E., Poolman, B (2003): On the role of the two extracytoplasmic substrate-binding domains in the ABC transporter OpuA. The EMBO Journal 22(22): 5983-5993.
5. Bossemeyer, D., Schlösser, A., Bakker, E.P. (1989): Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake systém. J. Bacteriol. 171: 2219-2221.
6. Bremer, E., Krämer, R. (2000): Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (eds.): Bacterial Stress Responses. ASM Press, Washington, D.C., 79-97.
7. Cai, S.J., Inouye, M. (2003): Spontaneous subunit exchange and biochemical evidence for trans-autophosphorylation in a dimer of *Escherichia coli* histidine kinase (EnvZ). J. Mol. Biol. 329(3): 495-503.
8. Cai, S.J., Khorchid, A., Ikura, M., Inouye, M. (2003): Probing catalytically essential domain orientation in histidine kinase EnvZ by targeted disulfide crosslinking. J. Mol. Biol. 328(2): 409-418.
9. Clark, D.P. (1999): přednášky na Southern Illinois University : Biochemistry and physiology of microorganisms – Osmoregulation.
www.science.siu.edu/microbiology/micr425/
10. Culham, D.E., Henderson, J., Crane, R.A., Wood, J.M. (2003): Osmosensor ProP of *Escherichia coli* responds to the concentration, chemistry, and molecular size of osmolytes in the proteoliposome lumen. Biochemistry 42: 410-420.
11. Culham, D.E., Tripet, B., Racher, K.I., Voegelé, R.T., Hodges, R.S., Wood, J.M. (2000): The role of the carboxyl terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. Journal Of Molecular Recognition: 13(5): 309-322.
12. Durell, S.R., Hao, Y., Nakamura, T., Bakker, E.P., Guy, H.R. (1999): Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters. Biophysical. Journal 77: 775-788.

13. Epstein, W. (1992): Kdp, a bacterial P-type ATPase whose expression and activity are regulated by turgor pressure. *Acta. Physiol. Scand.* 146: 193-199.
14. Epstein, W. (2003). The roles and regulation of potassium in bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 75: 293-320.
15. Gassel, M., Siebers, A., Epstein, W., Altendorf K. (1998): Assembly of the Kdp complex, the multi-subunit K⁺-transport ATPase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1415: 77-84.
16. Gutierrez, C., Abee, T., Booth, I.R. (1995): Physiology of the osmotic stress response in microorganism. *Int. J. Food Microbiology* 28: 233-244.
17. Heermann, R., Altendorf, K., Jung, K. (1998): The turgor sensor KdpD of *Escherichia coli* is a homodimer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1415(1): 114-124.
18. Heermann, R., Fohrmann, A., Altendorf, K., Jung, K. (2003): The transmembrane domains of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* are not essential for sensing K⁺ limitation. *Molecular Microbiology* 47(3): 839-848.
19. Heermann, R., Jung, K. (2004): Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(2): 168-174.
20. Hillar, A., Culham, D.E., Vernikovska, Y. I., Wood, J. M., Boggs, J. M.(2005): Formation of antiparallel, intermolecular coiled coil is associated with in vivo dimerization of osmosensor and osmoprotectant transpoter ProP in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 44: 10170-10180.
21. Holtmann, G., Bakker, E.P., Uozumi, N., Bremer, E. (2003): KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* 185(4): 1289-1298.
22. Horn, C., Bremer, E., Schmitt, L. (2003): Nucleotide dependent monomer/dimer equilibrium of OpuAA, the nucleotide-binding protein of the osmotically regulated ABC transporter OpuA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 334: 403-419.
23. Chater, K.F., Nikadot, H. (1999): Maintaining integrity and efficiency in microbial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 121-125.
24. Chen, S., Zhang, A., Blyn, L.B., Storz, G. (2004): MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186(20): 6689-6697.
25. Cheng, J., Guffanti, 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(10): 2853-2860.
26. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of total RNA isolation by guanidine-phenol extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

27. Jung, K., Veen, M., Altendorf, K. (2000): K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275: 40142-40147.
28. Kempf, B., Bremer, E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbiological stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170: 319-330.
29. Kenney, L.J. (1997): Kinase activity of EnvZ, an osmoregulatory signal transducing protein of *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346(2): 303-311.
30. Knorchid, A., Inouye, M., Ikura, M. (2005): Structural characterization of *Escherichia coli* sensor histidine kinase EnvZ : the periplasmic C-terminal core domain is critical for homodimerization. *J. Biochem.* 385: 255-264.
31. Koch, A.L. (1983): The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv. Microb. Physiol.* 24: 301-336.
32. Koo, S.P., Higgins, C.F., Booth, I.R. (1991): Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium* : evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2617-2625.
33. Krämer, R., Morbach, S. (2004): BetP of *Corynebacterium glutamicum*, a transporter with three different functions: betaine transport, osmosensing, and osmoregulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1658: 31-36.
34. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., V. Azevedo, Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerrblanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto,

- K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., and Danchin, A. (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature (Lond.)* 390: 249–256.
35. Lanyi, J.K. (1974): Salt- dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38: 272-290.
36. MacMillan, S.V., Alexander, C.F., Cullham, D.E., Kunte, H.J., Marshall, E.V., Rochon, D., Wood, J.M. (1999): The ion coupling and organic substrate of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1420: 30-44.
37. Mahmood, N.A.B., Biemans-Oldehinkel, E., Patzleff, J.S., Schuurman-Wolters, G.K., Poolman, B. (2006): Ion specificity and ionic strength dependence of the osmoregulatory ABC transporter OpuA. *J. Biol. Chem.*: published online ahead of print.
38. Malli, R., Epstein, W. (1998): Expression of the Kdp ATPase is consistent with regulation by turgor pressure. *J. Bacteriol.* 180: 5102-5108.
39. Mašek, T., Vopálenský, V., Suchomelová, P., Pospíšek, M. (2005): Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem.* 336: 46-50.
40. Mattison, K., Oropeza, R., Byers, N., Kenney, L.J. (2002): A phosphorylation site mutant of OmpR reveals different binding conformations at ompF and ompC. *J. Mol. Biol.* 315(4): 497-511.
41. Meurry, J. (1998): Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 149: 232-239
42. Morbach, S., Krämer, R. (2002): Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochem: a European Journal Of Chemical Biology* 3(5): 384-397.
43. Nakamura, T., Yuda, R., Unemoto, T., and Bakker, E.P. (1998): KtrAB, a new type of bacterial K⁺-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 180: 3491-3494.
44. Nakashima, K., Sugiura, A., Mizuno, T. (1993): Signal transduction between the two regulatory components involved in the regulation of the kdpABC operon in *Escherichia coli*: phosphorylation-dependent functioning of the positive regulator, KdpE. *Molecular Microbiology* 7: 109-116.
45. Ohashi, K., Yamashino, T., Mizuno, T. (2004): Molecular basis for promoter selectivity of the transcriptional activator OmpR of *Escherichia coli* : isolation of mutants that can activate the non-cognate *kdpABC* promoter. *J. Biochem.* 137: 51-59.
46. Padan, E., Krulwich, T.A. (2000): Sodium stress. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (eds.): *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, D.C., 117-130.

47. Patzleff, J.S., van der Heide, T., Poolman, B. (2003): The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J. Biol. Chem.* 278(32): 29546-29551.
48. Perozo, E., Rees, D. C. (2003): Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. *Current Opinion in Structural Biology* 13(4): 432-442.
49. Peter, H., Burkovski, A., Kramer, R. (1998): Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 273(5): 2567-2574.
50. Petit, M.A., Bruand, C., Janniere, L., Ehrlich, D.S. (1990): Tn10-derived transposons active in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172(12): 6736-6740.
51. Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H.A., Friesen, R.H.E., Moe, P.C., van der Heide, T. (2002): How do membrane proteins sense water stress? *Molecular Microbiology* 44(4): 889-902.
52. Poolman, B., Glaasker, E. (1998): Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology* 29(2): 397-407.
53. Poolman, B., Spitzer, J.J., Wood, J.M. (2004): Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666: 88-104.
54. Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., Silhavy, T.J. (1996): From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 20: 911-917.
55. Racher, K.I., Voegelé, R.T., Marshall, E.V., Culham D.E., Wood, J.M., Jung, H., Bacon, M., Cairns, M.T., Ferguson, S.M., Liang, W.J., Henderson, P.J., White, G., Hallett, F.R. (1999): Purification and reconstitution of an osmosensor : transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry* 38: 1676-1684.
56. Record, Jr, M.T., Courtenay, E.S., Cayley, D.S., Guttman, H. J. (1998): Response of *E. coli* to osmotic stress : large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Feature* 23: 143-149.
57. Roosild, T.P., Miller, S., Booth, I.R., Choe, S. (2002): A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. *Cell* 109(6): 781-791.
58. Rothenbücher, M.C., Facey, S.J., Kiefer, D., Kossmann, M., Kuhn, A. (2006): The cytoplasmic C-terminal domain of the *Escherichia coli* KdpD protein functions as K⁺ sensor. *J. Bacteriol.* 188(5): 1950-1958.

59. Rübenhagen, R., Morbach, S., Krämer, R. (2001): The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *The EMBO Journal* 20(19): 5412-5420.
60. Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R., Morbach, S. (2000): Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 275(2): 735-741.
61. Ruffet, S., Berrier, C., Krämer, R., Ghazi, A. (1999): Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 181: 1673-1676.
62. Ruzal, S.M., Sanchez-Rivas, C. (1998): In *Bacillus subtilis* DegU-P is a positive regulator of the osmotic response. *Curr. Opin. Microbiol.* 37: 368-372.
63. Seol, W.G., Shatkin, A.J. (1993): Membrane topology model of *Escherichia coli* α -ketoglutarate permease by PhoA fusion analysis. *J. Bacteriol.* 175: 565-567.
64. Schiller, D., Ott, V., Krämer, R., Morbach, S. (2006): Influence of membrane composition on osmosensing by the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 281(12): 7737-7746.
65. Schlösser, A., Kluttig, S., Hamann, A., Bakker, E.P. (1991): Subcloning, nucleotide sequence, and expression of *trkG*, a gene that encodes an integral membrane protein involved in potassium uptake via the Trk system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 3170-3176.
66. Sleator, R.D., Hill, C. (2001): Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews* 26(1): 49-71.
67. Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Volker, U., Bremer, E. (2003): Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J. Bacteriol.* 185: 6358-6370.
68. Sturr, M.G., Ablooglu, A.J., Krulwich, T.A. (1997): A *Bacillus subtilis* locus encoding several gene products affecting transport of cations. *Gene* 188(1): 91-94.
69. Šebestian J., Petrmichlová, Z., Šebestianová, Š., Náprstek, J., Svobodová, J. (2001): Osmoregulation in *Bacillus subtilis* under potassium limitation: a new inducible K⁺-stimulated, VO₄³⁻-inhibited ATPase. *Can. J. Microbiol.* 47: 1116–1125.
70. Tsatskis, Y., Khambyti, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W. (2005): The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *J. Biol. Chem.* 280(50): 41387-41394.
71. van der Heide, T., Poolman, B. (2000): Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 97(13): 7102-7106.

72. van der Heide, T., Stuart, M.C.A., Poolman, B. (2002): On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *The EMBO Journal* 20(24): 7022-7032.
73. von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R.M., Bremer, E. (1997): Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Molecular Microbiology* 25: 175-187.
74. Walderhaug, M., Polarek, J.W., Voelkner, P., Daniel, J.M., Hesse, J.E., Altendorf, K., Epstein, W. (1992): KdpD and KdpE, proteins that control expression of the kdpABC operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J. Bacteriol.* 174(7): 2152-2159.
75. 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(8): 2088-2095.
76. West, A.H., Stock, A.M. (2001): Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences* 26(6): 369-376.
77. Whatmoore, A.M., Reed, R.H. (1990): Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis* : a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2521-2526.
78. Wood, J.M. (1999): Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 230-262.
79. Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kramer, R., Poolman, B., van der Heide, T., Smith, L.T. (2001): Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130(3): 437-460.
80. Wood, J.M., Culham D.E., Hillar, A., Vernikovska, Y.I., Liu, F., Boggs, J., Keates, R.A.B. (2005): A structural model for the osmosensor, transporter and osmoregulator ProP of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 44: 5634-5646.
81. Yancey, P.H. (1994): Compatible and counteracting solutes. In: Strange, K. (ads.): *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Boca Raton, USA: CRC Press, Inc., 81-109.
82. Yaku, H., Mizuno T. (1997): The membrane-located osmosensory kinase, EnvZ, that contains a leucine zipper-like motif functions as a dimer in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 417(3): 409-413.

83. Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T., Inouye, M. (2000): Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 97: 7808-7813.
84. Zoetewey, D.L., Tripet, B.P., Kutateladze, T.G., Overduin, M.J., Wood, J.M., Hodges, R.S. (2003): Solution Structure of the C-terminal Antiparallel Coiled-coil Domain from *Escherichia coli* Osmosensor ProP. *J. Mol. Biol.* 334(5): 1063-1076.

