

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

Studijní program: Biologie

Studijní obor: NMIKRO



Bc. Jan Tkadlec

**Vliv vyřazení genu *yxkO* při adaptaci na enviromentální stres u rodu
*Bacillus***

**Effect of knock out of *yxkO* gene on environmental stress adaptation in
genus *Bacillus***

Diplomová práce

Školitel:

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 26. 8. 2011

Podpis

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Ireně Liché, CSc. za čas, trpělivost a ochotu při vedení mé diplomové práce.

Děkuji kolektivu laboratoře 101 za všestrannou pomoc a rady a za přátelské prostředí.

Děkuji své rodině a přátelům za pomoc a podporu během mého studia.

Abstrakt

V předchozích letech jsme v naší laboratoři popsali mutantu *Bacillus subtilis*, který vykazoval snížený růst při vystavení osmotickému stresu za limitující koncentrace K⁺. Tento mutantní kmen nesl přerušení v genu *yxkO* kódujícím předpokládanou ribokinázu. Tento gen patří do sigma B operonu je indukován osmotickým, teplotním a etanolovým šokem. Při srovnání s divokým kmenem, má tato mutace pleiotropní vliv na fenotyp nositelského kmenu. Kromě osmosenzitivity se mutant liší tvarem buňky, schopností motility a sporulace.

Naším cílem bylo zaměřit se na projevy mutace v genu *yxkO* u dalších bakterií z rodu *Bacillus*. Připravili jsme mutanty s přerušením tohoto genu, pomocí plazmidu pMUTIN4, odvozené od kmenů lišících se okolím tohoto genu a úrovní laboratorní domestikace *Bacillus amyloliquefaciens* a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*.

Obdobně jako v předchozích studiích (u laboratorního kmenu *Bacillus subtilis* 168) jsme popsali u mutantního kmenu odvozeného od *Bacillus amyloliquefaciens* zhoršenou schopnost růstu při limitaci draslíkem a za osmotického šoku. Tento fenomén jsme studovali na úrovni dynamiky růstu bakteriální kultury. Dále jsme detekovali zvýšenou citlivost kmenu odvozeného od *Bacillus amyloliquefaciens* k tetracyklinu, změnu morfologie těchto buněk a jejich motility. Mutace v přírodním izolátu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* vyvolala výrazně nižší fenotypový projev než u kmenu laboratorního.

Novým příspěvkem k popsání komplexní role genu *yxkO* v motilitě bylo studium schopnosti swarmingu mutantních kmenů. Narušení tohoto druhu pohybu bylo prokázáno jen u mutantního kmenu odvozeného od *Bacillus amyloliquefaciens*.

Dále jsme připravili kmen s detekovatelnou expresí genu *ctc* z regulonu obecné stresové odpovědi k studiu vlivu disrupce genu *yxkO* u *Bacillus subtilis* na obecnou stresovou odpověď. Výsledky ukazují signifikantní snížení exprese genů obecné stresové odpovědi při přerušení genu *yxkO*.

Klíčová slova: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, osmoadaptace, obecná stresová odpověď, motilita, *yxkO*.

Abstract

We have previously characterized a *Bacillus subtilis* mutant defective in growth and osmoadaptation under limited K⁺ concentrations. In this mutant, the *yxkO* gene encoding a putative ribokinase is disrupted. This gene is supposed to belong to the sigma B operon and its expression is induced after osmotic, heat and ethanol shock. In comparison to the wild type, this mutation causes pleiotropic changes in host phenotype. In addition to its osmosensitivity, the mutant differs in cell shape, motility and ability to produce endospores.

Our goal was to focus on manifestations of the mutation in the *yxkO* gene in other bacteria of the genus *Bacillus*. Using plasmid pMUTIN4 we have prepared mutants with disruptions of this gene derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* strains differing in the *yxkO* surroundings and in the level of laboratory domestication.

As in the previous study (with laboratory strain *Bacillus subtilis* 168) we demonstrate impaired ability of the mutant strain derived from *Bacillus amyloliquefaciens* to grow in potassium limitation and osmotic shock.

We have studied this phenomenon at the level of the growth dynamics of the bacterial culture. We have also detected an increased sensitivity of the strain derived from *Bacillus amyloliquefaciens* to tetracycline, changes in cell morphology and motility. The same mutation natural isolate of *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* caused significantly lower phenotypic manifestation than the laboratory strain.

New contribution to describe the complex role of *yxkO* gene in motility was the study of the swarming ability of these mutant strains. It was shown that this type of movement was affected just in mutant strains derived from *Bacillus amyloliquefaciens*.

Furthermore, in order to study the impact of *yxkO* gene disruption on the general stress response of *Bacillus subtilis* 168 we have prepared a strain with detectable expression of *ctc* gene, which belongs to the general stress response. Our results show a significant reduction in expression of the general stress response genes in strains with mutation in *yxkO* gene.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, osmoadaptation, general stress response, motility, *yxkO*.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	11
1. ÚVOD	12
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
2.1 Gen <i>yxkO</i> a protein jím kódovaný u <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.2 Motilita <i>Bacillus subtilis</i>	16
2.2.1 Motilita v tekutém médiu a její regulace	17
2.2.1.1. CodY globální represor u <i>Bacillus subtilis</i>	20
2.2.1.2 DegU - pleiotropní response regulátor <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.2.1.3 RNA vazebný protein CsrA - regulátor translace	22
2.2.1.4 Regulace skládání bičíku	23
2.2.2 Motilita na povrchu tuhého média	24
2.2.2.1 Swarming u <i>Bacillus subtilis</i>	25
2.2.2.2 Regulace swarmingu u <i>Bacillus subtilis</i>	28
2.3 Osmotický šok a osmoadaptace <i>Bacillus subtilis</i>	30
2.3.1 První fáze osmoadaptace - transport draselných iontů	31
2.3.1.1 Nízkoafinitní transportní systémy KtrAB a KtrCD	32
2.3.1.2 TrkA protein homologní k nízkoafinitnímu transportéru <i>E.coli</i>	33
2.3.1.3 Tetracyklinový exfluxní transportér TetA(L)	33
2.3.1.4 Neznáma ATPáza typu P	34
2.3.2 Druhá fáze osmoadaptace - hromadění kompatibilních solutů	34
2.4 Obecná stresová odpověď	34
2.5 Vliv laboratorní domestikace na vlastnosti bakteriálních kmenů	35
3. MATERIÁL A METODY	40
3.1 Materiál	40
3.1.1 Bakteriální kmeny	40
3.1.2 Plazmidy	41
3.1.2.1 pBGSC6	41
3.1.2.2 pMUTIN4	43
3.1.2.3 pDG1661	46
3.1.3 Primery pro PCR	49

3.1.4 DNA standardy	49
3.1.5 Enzymy	50
3.1.6 Chemikálie	51
3.1.7 Komerční sady	52
3.1.8 Antibiotika	52
3.1.9 Kultivační média	53
3.1.9.1 Komplexní médium	53
3.1.9.2 Minerální média	53
3.1.9.3 Média pro přípravu kompetentních buněk <i>Bacillus subtilis</i>	55
3.1.9.4. Média pro přípravu heat shock kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	56
3.1.9.5 Tuhý krevní agar pro detekci surfaktinu	56
3.1.10 Roztoky	56
3.1.10.1 Roztoky pro stanovení aktivity β - galaktosidázy	56
3.1.10.2 Roztoky pro izolaci plazmidové DNA	57
3.1.10.3 Roztok pro horizontální agarózovou elektroforézu	58
3.1.10.4 Roztoky pro barvení bakterií dle Grama	58
3.1.10.5 Roztoky pro barvení bakteriálních bičků Leifsonovou metodou	59
3.1.11 Internetové databáze a počítačové programy	60
3.1.12 Přístroje a laboratorní zařízení	60
3.2 Metody	61
3.2.1 Práce s bakteriální kulturou	61
3.2.1.1 Kultivace na pevném médiu	61
3.2.1.2 Kultivace v tekutém médiu	61
3.2.1.3 Uchovávání bakteriálních kmenů	61
3.2.1.4 Příprava heat shock kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	61
3.2.1.5 Transformace heat shock kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	61
3.2.1.6 Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro transformaci elektroporací	62
3.2.1.7 Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> elektroporací	63
3.2.1.8 Příprava kompetentních buněk bakteriálních kmenů rodu <i>Bacillus</i>	63
3.2.1.9 Transformace kompetentních buněk bakteriálních kmenů rodu <i>Bacillus</i>	64
3.2.1.10 Měření optické denzity bakteriální kultury	64
3.2.2 Práce s bakteriální DNA	65

3.2.2.1 Izolace chromozomální DNA	65
3.2.2.2 Izolace plazmidové DNA	65
3.2.2.2.1 Mini preparace plazmidové DNA	65
3.2.2.2.2 Izolace plazmidové DNA pomocí sady Plasmid Miniprep Kit	66
3.2.2.3 Čištění vzorku DNA pomocí sady DNA Extraction Kit	67
3.2.2.4 Čištění DNA chloroformovou precipitací	67
3.2.2.5 Horizontální agarózová elektroforéza DNA	67
3.2.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	68
3.2.2.7 Štěpení DNA restrikčními enzymy	69
3.2.2.8 Ligace restrikčních fragmentů	69
3.2.2.9 Sekvence DNA	70
3.2.3 Stanovení aktivity β - galaktosidázy	70
3.2.4 Barvení podle Grama	71
3.2.5 Barvení bakteriálních bičičků Leifsonovou metodou	72
4. VÝSLEDKY	74
4.1 Příprava mutantního kmene <i>Bacillus subtilis</i> s in frame delecí genu <i>yxkO</i>	74
4.1.1 Příprava rekombinantního plazmidu pBGSC6- <i>yxkO</i>	74
4.2 Příprava kmenů rodu <i>Bacillus</i> s přerušením genu <i>yxkO</i>	77
4.2.1 Příprava rekombinantního plazmidu pMUTIN4- <i>yxkO</i>	77
4.2.2 Transformace kmenů rodu <i>Bacillus</i> rekombinantním plazmidem	78
4.2.3 Ověření integrace rekombinantního plazmidu do chromozomu recipientních kmenů	78
4.3 Studium fyziologických vlastností mutantních a divokých kmenů	80
4.3.1 Růst na pevném médiu	80
4.3.2 Citlivost k tetracyklinu	84
4.3.3 Růst v tekutém médiu s limitní koncentrací draslíku a při osmotickém šoku	85
4.3.4 Morfologie buněk při růstu v tekutém médiu - Gramovo barvení	91
4.4 Studium motility	101
4.4.1 Motilita v tekutém médiu	101
4.4.2 Motilita na povrchu tuhého média - Swarming	102
4.4.2.1 Detekce produkce surfaktinu	108
4.4.3 Barvení bičičků Leifsonovou metodou	110

4.5 Srovnání kmenů <i>Bacillus subtilis</i> 1A680, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 a <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10 ^T	111
4.6 Studium stresové odpovědi u <i>Bacillus subtilis</i> s přerušným genem <i>yxkO</i>	115
4.6.1 Příprava rekombinantního plazmidu pDG1661 - <i>pctc</i>	115
4.6.2 Transformace kmenů <i>Bacillus subtilis</i> 1A680 a MP2 rekombinantním plazmidem	117
4.6.3 Studium obecné stresové odpovědi u <i>B. subtilis</i> 1A680 a <i>B. subtilis</i> MP2 kmene s přerušným genem <i>yxkO</i>	118
4.6.3.1 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při etanolovém šoku v LB médiu	118
4.6.3.2 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v LB médiu	120
4.6.3.3 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v minerálním médiu K 10	121
4.6.3.4 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v minerálním médiu K 0	123
4.6.3.5 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při přenosu z média K 10 do média K 0	125
5. DISKUZE	127
6. ZÁVĚR	138
7. SEZNAM LITERATURY	140

SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
ECF	extracytoplasmatic function (extracytoplazmatická funkce)
GTP	guanosintrifosfát
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani médium
OD	optická denzita
ONPG	o-nitrofenyl- β -D-galakto pyranosid
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	sodiumdodecylsulfát

1. ÚVOD

Bakterie jsou nejprizpůsobivější organizmy na planetě Zemi. Jejich schopnost adaptovat se na měnící se podmínky okolního prostředí je obrovská. Prokaryota, mezi něž se bakterie řadí, dokázala před miliardami let kolonizovat nehostinnou planetu dávno před tím než se objevily jiné organizmy. A v podstatě i tyto nové eukaryotické organizmy, ať už jednobuněčné nebo mnohobuněčné, jsou dle endosymbiotické teorie Lynn Margulisové svou podstatou vysoce specializovaným symbiotickým konsorciem prokaryotních organizmů.

Rod *Bacillus*, patří mezi nejznámější a nejdůležitější bakteriální rody. Obsahuje mnohé pro člověka významné zástupce, jako například vysoce patogenního původce sněti slezinné *Bacillus anthracis*, průmyslového producenta amyláz *Bacillus amyloliquefaciens*, producenta insekticidu a donora genu jeho biosyntézy pro tzv. Bt rostliny odolné k hmyzím škůdcům *Bacillus thuringiensis* a v neposlední řadě modelový organizmus grampozitivních bakterií *Bacillus subtilis*.

Bakterie rodu *Bacillus* se jako půdní mikroorganizmy střetávají s neustále se měnícími podmínkami (teplota, osmolarita, vlhkost, pH, atd.) okolního prostředí, které jsou výzvou jejich schopnosti adaptace. Jednou z možností, jak se vypořádat s těmito změnami, je pohyblivost díky níž bakterie mohou opustit nepříznivé prostředí, respektive vyhledat lepší. Motilita je u rodu *Bacillus* manifestovaná několika způsoby, kromě pohybu v tekutém médiu poháněného bičíkem, se u něj také vyskytuje pohyb po pevném povrchu v několika variantách, z nichž nejznámější je swarming.

Pokud se bakterie nedokáže nepříznivým podmínkám vyhnout, musí se na ně adaptovat a k tomu má řadu sofistikovaných mechanismů specifických či nesespecifických. Obecná stresová odpověď bakterií rodu *Bacillus* je významným nesespecifickým adaptačním mechanismem, který je reakcí na environmentální stres, hladovění či změnu teploty.

Jedním z environmentálních stresů je stres osmotický, ten je také předmětem zájmu naší laboratoře. Ve specifické odpovědi na osmotický stres, aby vyrovnala tlak vnějšího prostředí, akumuluje bakterie nejprve draselné ionty. Následně je nahrazuje kompatibilními soluty, které přijímá z okolního prostředí, či je *de novo* syntetizuje. Paralelně s touto odpovědí se indukuje i obecná stresová odpověď.

Již dříve byl v naší laboratoři připraven pomocí nescifické inzerční mutagenese minitranspozónem Tn10 osmolabilní kmen *Bacillus subtilis* L-42. U tohoto kmene byl pozorován snížený růst na médiích s nízkou koncentrací draslíku (< 1mmol/l) a snížená schopnost osmoadaptace (Holanová 2000).

Bylo prokázáno, že místem nesoucím mutaci v kmenu L-42 je gen s dosud neznámou funkcí *yxkO*. Na tento gen se následně zaměřila pozornost naší laboratoře. Byl zjištěn vliv tohoto genu na expresi jiných proteinů za podmínek osmotického šoku, například proteinu Hag (flagelinovému proteinu vlákna bakteriálního bičíku)(Petrovova 2010), také na motilitu bakterií a růst na minerálním médiu s nedostatkem draslíku a při osmotickém šoku (Streitová 2010). Také bylo prokázáno narušení schopnosti sporulace u kmenů s mutací v tomto genu a jejich vyšší citlivost k tetracyklinu (Petrovová 2010).

Má diplomová práce měla za cíl navázat na výsledky mých předchůdkyň a rozšířit poznání významu funkce genu *yxkO* zejména ve vlivu na motilitu a obecnou stresovou odpověď.

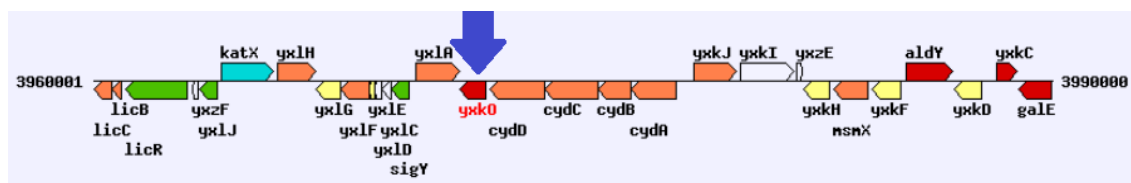
Cíle této diplomové práce byly:

1. Konstrukce kmene *Bacillus subtilis* s úplnou delecí genu *yxkO*.
2. Konstrukce kmene *Bacillus subtilis*, umožňující měřit míru obecně stresové odpovědi.
3. Srovnat fenotypickou odpověď na vyřazení genu *yxkO* u přírodních izolátů *Bacillus subtilis* a příbuzného kmene *Bacillus amyloliquefaciens*.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

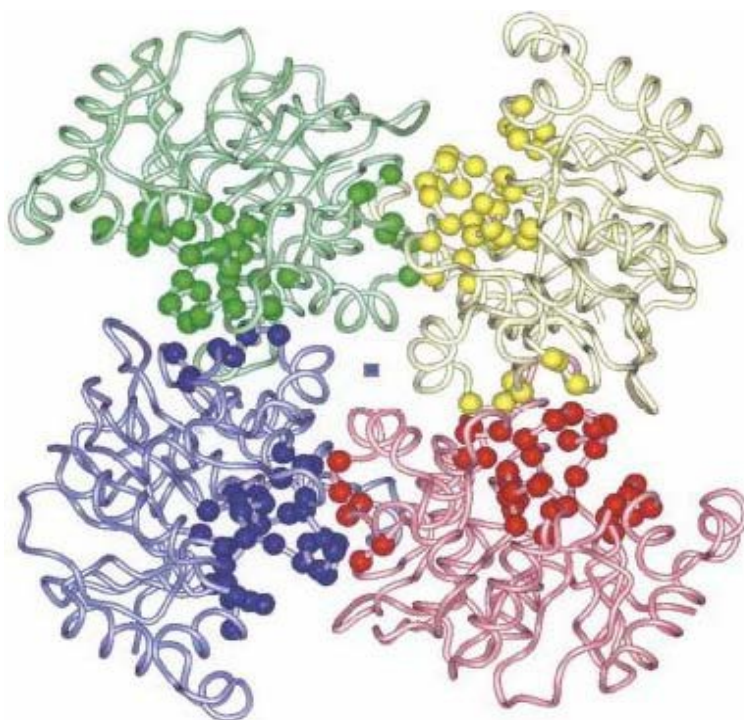
2.1 Gen *yxkO* a protein jím kódovaný u *Bacillus subtilis* 168

Monocistronní gen *yxkO* o velikosti 831 bp se nachází v intergenové oblasti *sigY-cydD* na chromozómu *Bacillus subtilis* 168. Kóduje protein o neznámé funkci.



Obr.1. Schéma polohy genu *yxkO* v genomu *Bacillus subtilis* 168.
(převzato z <http://bacillus.genome.jp/>)

Protein YxkO je velký 29.9 kDA a tvořený 276 aminokyselinami. Funkční forma je tetramerní a obsahuje vazebné místo pro ATP, Mg^{2+} a dosud neznámý substrát. Strukturně je homologní k rodině sacharidových kináz ribokinázového typu. Sekvenční homology YxkO jsou evolučně široce rozšířené. 69 známých homologů, většinou s neznámou funkcí, se vyskytuje jak u bakterií (42), tak u archaeí (14) i eukaryot včetně člověka (13). Některé jsou klasifikovány jako sacharidové kinázy (Zhang *et al* 2002).



Obr. 2. Kvarterní struktura proteinu YxkO

Kuličky vyznačují uhlíkové atomy podílející se na tvorbě ATP vazebného a substrát vazebného místa. (převzato Zhang *et al*, 2002)

V předchozích letech bylo v naší laboratoři zjištěno, že gen *yxkO* hraje roli v adaptaci na osmotický stres. Při studiu osmoadaptace byl pomocí náhodné inzerční mutagenese pomocí transpozónu miniTn10 připraven osmolabilní mutant odvozený od asporogenního kmene (kmen L-42) (Holanová 2000), u kterého byla inzerce transpozónu lokalizována do strukturní části genu *yxkO* (Ulanova *et al* 2007).

V další práci zaměřené na studium fenotypových vlastností kmenů s mutací genu *yxkO* byl připraven mutant s inzercí plazmidu pMUTIN4 do strukturní části genu *yxkO* (kmen MP2) odvozený od *Bacillus subtilis* 168. Byl potvrzen osmolabilní fenotyp a byla u tohoto mutantu zjištěna vyšší citlivost k tetracyklinu oproti divokému kmenu. Na základě srovnání proteinových profilů po osmotickém stresu byla u mutantního kmenu MP2 zjištěna rozdílná hladina některých proteinů oproti kmenu divokému, například flagelinového proteinu Hag, tvořícího vlákno bičíku, glutaminsyntetázy, GroEL, fosfoglycerát kinázy a

dalších (Petrovová 2010). Se změnami hladiny flagelinového proteinu patrně také souvisí pozorování rozdílné motility mutantního kmenu MP2 oproti divokému kmenu. Při mikroskopických pozorováních byla také popsána změna morfologie u mutantního kmenu MP2 (Streitová 2010).

Další studium funkce genu *yxkO* a jemu příslušejícího proteinu je nadále předmětem zájmu naší laboratoře.

2.2 Motilita *Bacillus subtilis*

Motilita, jako reakce organismu na vystavení nepříznivým podmínkám, obzvláště jedná-li se o změnu trvalou, je pravděpodobně nejlepším druhem adaptace, samozřejmě v případě existence místa s vhodnějšími podmínkami. Pokud není stanoviště s lepšími podmínkami dostupné je organismus odkázán na adaptace, jež mu dovoluje jeho genetická výbava, která je limitující. Případné získání adaptace evoluční cestou není příliš účinné ani rychlé.

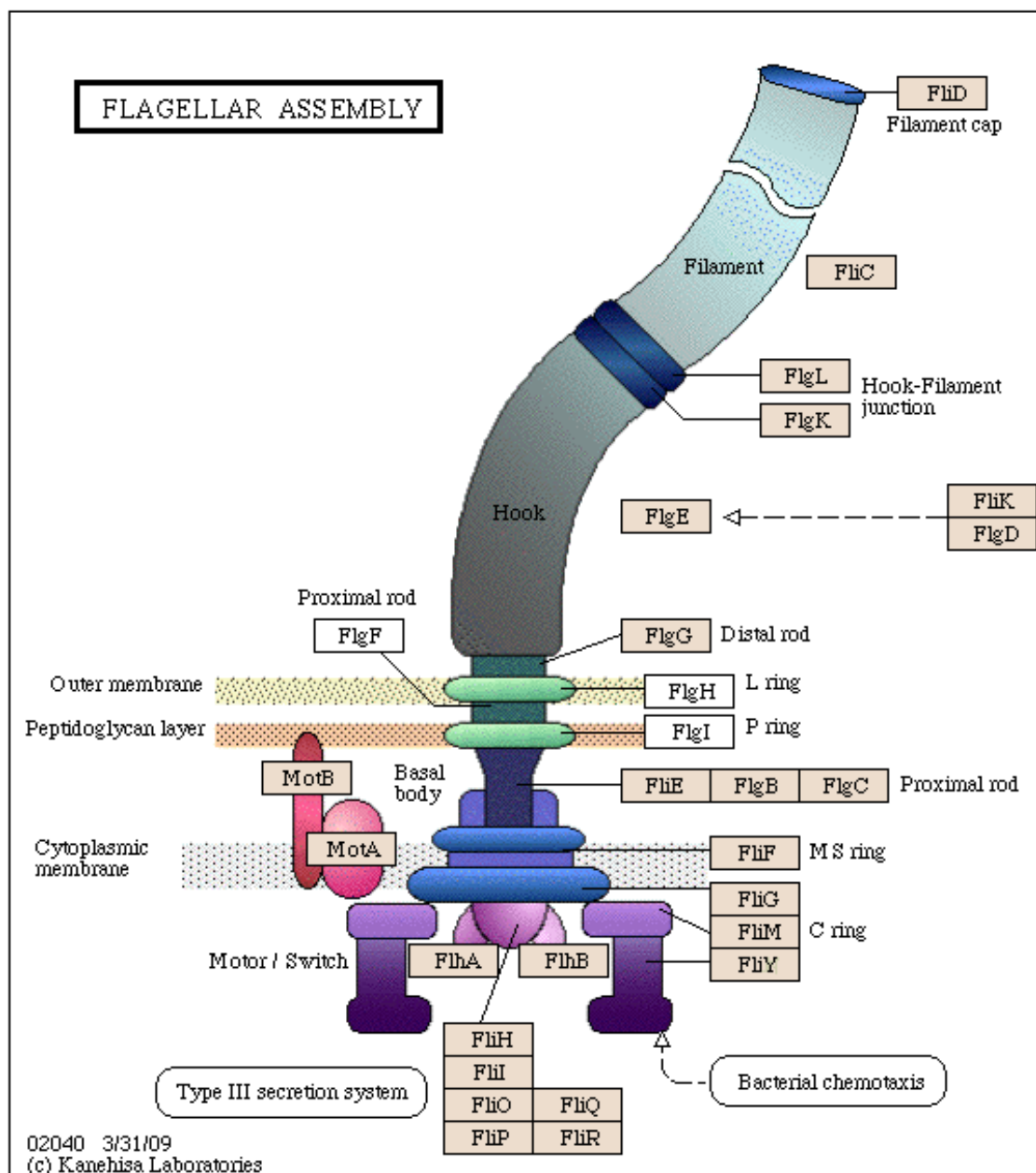
Není překvapením, že půdní bakterie jako *Bacillus subtilis* jsou vysoce pohyblivé. Motilita u nich nabývá různých forem od jednobuněčného bičíkem poháněného pohybu v tekutém médiu (swimming), po různé formy pohybu po povrchu tuhého média (swarming), realizované často na úrovni bakteriální populace.

2.2.1 Motilita v tekutém médiu a její regulace

Motilita v tekutém médiu je u bakterie *Bacillus subtilis* uskutečňována pomocí rotace bakteriálního bičíku. Rotace bičíku uděluje buňce pohyb na podobném principu jako lodní šroub. Rotace proti směru hodinových ručiček vede k pohybu vpřed, rotace po směru způsobuje tzv. tumbling (volně přeloženo jako poskakování na místě). Chemotaxe jako směřování pohybu bakterie funguje pak na bázi změny frekvencí střídání tumblingu a pohybu vpřed.

Bakteriální bičík tvoří tři části, na povrchu buňky ukotvené základní tělísko (basal body) a vnější struktury háček (hook) a vlákno (filamentum). Tyto tři komponenty se skládají z více než 20 proteinů (Obr.3.).

Geny podílející se na motilitě a chemotaxi jsou nejvíce studovány u enterobakterií a jsou u nich organizovány do tří tříd. Expze těchto tříd probíhá pomocí vzájemné regulace. Geny první třídy, které zahrnují *flhDC* operon, představují řídicí operon syntézy bičíků. Jejich expze závisí na nutričních podmínkách a růstové fázi, a je také určující pro expresi genů druhé třídy. Geny druhé třídy kódují komponenty tvořící základní tělísko a háček bičíku a také sigmafaktor potřebný spolu s funkčním sekrečním systémem, který zajistí odstranění příslušného antisigmafaktoru, k expresi genů třídy třetí (Chilcott a Hughes 2000).

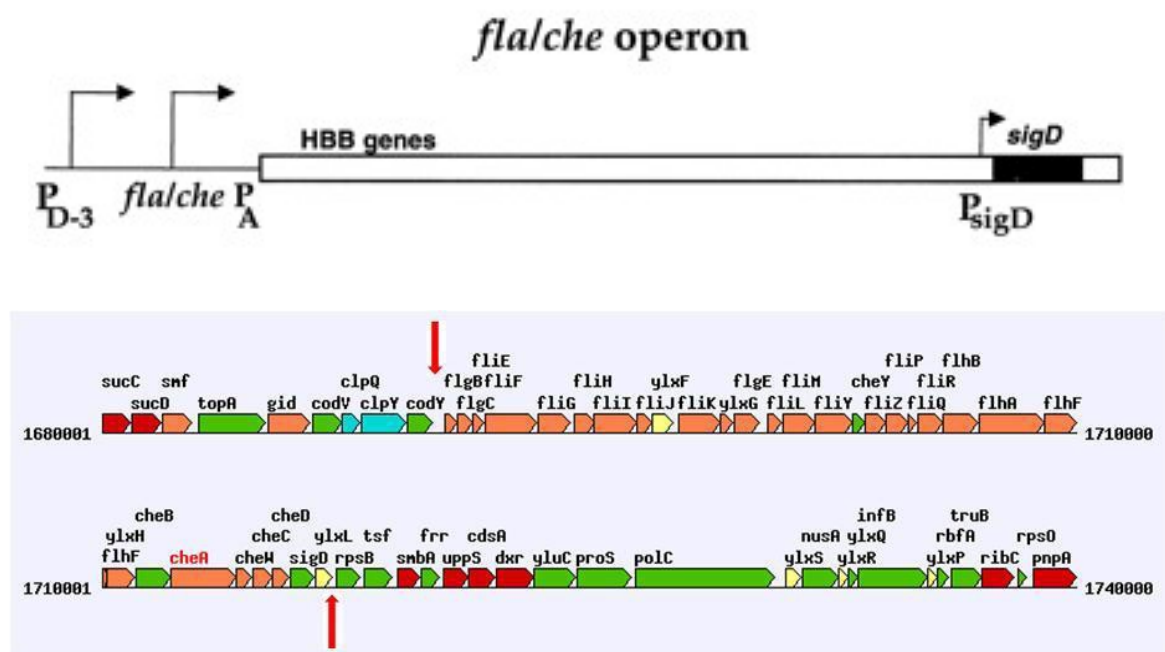


Obr. 3. Struktura bičíku gramnegativních bakterií.

Bíle jsou označeny proteiny neúčastící se na tvorbě bičíku u *Bacillus subtilis* jmenovitě FlgF, FlgH a FlgI, tj. proteiny tvořící L a P prstence ukotvené ve vnější membráně, respektive buněčné stěně. (převzato z <http://www.genome.jp/kegg/> , upraveno)

Podobná organizace genů souvisejících s motilitou a chemotaxí se nalézá také u *Bacillus subtilis* s tím rozdílem, že není přítomen řídicí operon odpovídající genům první třídy. Genům druhé třídy u *Bacillus subtilis* odpovídá *fla/che* operon. Tento operon kóduje více než třicet proteinů podílejících se na tvorbě základního tělíska, háčku a účastnících se chemotaktické kaskády. Na jeho konci je umístěn gen pro sigmafaktor σ^D , který řídí expresi poslední skupiny genů odpovídající třetí třídě u enterobakterií (Helmann 1991).

Expresi *fla/che* operonu regulují nejméně tři promotory a je předpokládána přítomnost minimálně jednoho dosud nerozpoznaného. Nejdůležitějším promotorem je P_A ležící před operonem a řízený sigmafaktorem σ^A . Ještě před ním leží druhý promotor P_{D-3} závislý na sigmafaktoru σ^D , který není tak významný. Uvnitř operonu před genem *sigD* leží poslední promotor P_{sigD} závislý rovněž na sigmafaktoru σ^A (West *et al.* 2000).



Obr. 4. *fla/che* operon.

Nahoře schématické znázornění promotorů řídicích transkripci *fla/che* operonu. Dole organizace genů operonu a jeho okolí. Šipkami vyznačen začátek a konec operonu. (převzato West *et al.* 2000 a <http://bacillus.genome.jp>)

Geny třetí třídy enterobakterií odpovídají σ^D regulonu *Bacillus subtilis* a patří mezi ně geny pro mot komplexy, pro chemotaktické receptory a proteiny bičkového vlákna flageliny. Negativní regulaci tohoto regulonu zprostředkovává antisigmafaktor FlgM (Caramori *et al.* 1996).

Regulace motility probíhá na více úrovních. První úroveň regulace motility je na úrovni transkripce genů motilního aparátu, za tuto regulaci jsou zodpovědné, kromě již zmíněného antisigmafaktoru FlgM, také pleiotropní represory CodY, který potlačuje expresi genů nezbytných pro motilitu v nutričně bohatém prostředí, a DegU, který brání expresi naopak v prostředí příliš nutričně chudém. Na úrovni translace reguluje motilitu RNA vazebný protein CsrA, který váže mRNA genu *hag* a blokuje tak jeho translaci. Na posttranslační úrovni je motilita regulována interakcí proteinů tvořící bičík (viz dále).

2.2.1.1. CodY globální represor u *Bacillus subtilis*

CodY je významný transkripční regulátor, jehož homology byly nalezeny u řady grampozitivních bakterií. Řídí expresi řady genů pozdní exponenciální fáze a fáze stacionární. Reguluje více než 100 genů účastnících se zejména adaptace na nepříznivé nutriční podmínky (Brantl a Licht 2010). Účastní se regulačních drah anabolizmu, katabolizmu, diferenciaci a patogeneze. Konkrétně se podílí na regulaci sporulace, kompetence, motility, transportu aminokyselin, peptidů a cukrů, a syntézy větvených aminokyselin (izoleucin, leucin a valin)(Brantl a Licht 2010). Z hlediska patogenních bakterií může představovat významnou determinantu míry patogenity, například u *Staphylococcus aureus* funguje jako represor exprese řady genů virulence, reprimuje produkci alfa toxinu a tím blokuje hemolytickou aktivitu. U *S. aureus* také potlačuje tvorbu biofilmu (Majerczyk *et al.* 2008).

Ve své funkční formě tvoří CodY homodimér složený ze dvou 29 kDa velkých monomérů. CodY funguje jako represor transkripce, ve své aktivní podobě se váže do regulační oblasti cílových genů a brání jejich expresi (Joseph *et al.* 2005).

Afinita CodY k DNA je regulovaná vazbou ligandu, a tím je zejména GTP (GTP nefunguje jako zdroj energie, není štěpeno), ale mohou jím být i větvené aminokyseliny. GTP mění konformaci CodY, a tím zvyšuje jeho afinitu k cílové DNA. Hladina GTP odráží nutriční stav buňky, a jen v průběhu exponenciální fáze růstu je dostatečně vysoká, aby aktivovala konstantně přítomný CodY, který má ke GTP poměrně nízkou afinitu (Handke *et al.* 2008).

Jsou také známy vzácné případy, kdy funguje CodY jako aktivátor, například u exprese sRNA BsrF, v tomto případě opět na aktivitě CodY participuje GTP nebo větvené aminokyseliny (Preis *et al.* 2009).

V rámci regulace motility u *Bacillus subtilis* funguje CodY jako represor jak *fla/che* operonu, tak genu pro flagelin *hag*. V příznivých nutričních podmínkách, v exponenciální fázi, kdy je vysoká hladina intracelulárního GTP, se CodY váže do promotorových oblastí všech tří známých promotorů *fla/che* operonu a také promotoru genu *hag* překrývá -35 i -10 oblasti a brání nasednutí RNA polymerázy. Rovněž reprimuje expresi *srfA* operonu nezbytného pro produkci surfaktinu a tím i motilitu na povrchu tuhého média (Bergara *et al.* 2003).

Regulace motility pomocí CodY ukazuje na její souvislost s nutričními podmínkami, konkrétněji nepříznivými nutričními podmínkami. Motilita je tedy adaptací na snížení množství živin v prostředí, které je zaznamenáno díky snížení hladiny GTP, jež vede k vypnutí CodY zprostředkované represe genů potřebných pro motilitu.

2.2.1.2 DegU - pleiotropní response regulátor *Bacillus subtilis*

DegU je pleiotropní regulátor transkripce v odpovědi na změnu podmínek vnějšího prostředí. Má klíčovou pozici v globální regulaci buněčných procesů zejména v pozdní exponenciální a stacionární fázi. Mezi procesy jím regulované patří syntéza extracelulárních degradačních enzymů, syntéza poly- γ -glutamové kyseliny, tvorba biofilmu, přirozená kompetence a motilita (Verhamme *et al.* 2007, Kobayashi 2007).

DegU je cytosolický protein, je to response regulátor dvousložkového systému zahrnujícího DegU a receptorovou histidin kinázu DegS. Oba dva geny jsou exprimovány ze společného operonu *degSU*, který je pod kontrolou tří promotorů na jejichž aktivaci se podílí nízká koncentrace zdrojů dusíku a vysoká hladina DegU~P (Yasumura *et al.* 2008). Během exponenciální fáze je inhibována aktivita DegS, po vstupu do stacionární fáze je inhibice uvolněna a v buňce se zvyšuje hladina DegU~P. Hladina DegU~P pak určuje, které dráhy budou aktivovány. Kompetence je například indukovaná přítomností DegU tedy nízkou koncentrací DegU~P, naopak produkce exoproteáz je aktivována zvýšením koncentrace DegU~P. Na funkci DegS-DegU signalizace se podílí také protein DegQ, který stimuluje přenos fosfátu z DegS na DegU (Kobayashi 2007).

V rámci motility se DegU podílí na regulaci jak pohybu v tekutém médiu, tak swarmingu. Je známo, že v nefosforylované formě DegU aktivuje expresi *fla/che* operonu (Kensuke a Ogura 2008). Naopak fosforylovaná forma hraje roli v inhibici exprese jak *fla/che* operonu (Amati *et al.* 2004), tak σ^D závislých genů. DegU~P se spolu se SwrA a SwrB podílí na aktivaci exprese antisigmafaktoru σ^D FlgM, který pak následně potlačuje expresi σ^D závislých genů. DegU~P se váže do promotorové oblasti *flgM* a zvyšuje jeho expresi. Určující roli v DegU regulaci FlgM hraje stav bazálního tělíska bičíku, kdy nefunkční bazální tělísko aktivuje signalizaci DegS-DegU a vede k zvýšení exprese FlgM (Hsueh *et al.* 2011). Z hlediska swarmingu má pak nízká koncentrace DegU~P pozitivní efekt, kdežto vysoká naopak inhibiční (Gupta a Rao 2009).

2.2.1.3 RNA vazebný protein CsrA - regulátor translace

CsrA je Globální regulátor reagující na změny okolního prostředí působící na post-transkripční úrovni. Procesy, které reguluje zahrnují centrální uhlíkový metabolismus (odtud i název *csr* - carbon storage regulator), tvorbu biofilmu a motilitu.

CsrA je poměrně malý protein (asi 7 kDa), jehož aktivní forma je homodimér. Funguje jako RNA vazebný represor translace, jeho vazebná místa se

nacházejí v blízkosti Shine-Dalgarno sekvencí cílových mRNA. Vazba CsrA vede jednak k inhibici translace (brání nasednutí ribozómu), jednak k degradaci vázané RNA. Na regulaci jeho aktivity se podílí malé nekódující sRNA CsrB a CsrC, které mají schopnost vázat CsrA a inhibovat jeho aktivitu (Timmermans a Van Melderen 2010).

Z hlediska motility funguje CsrA u *Bacillus subtilis* jako represor tvorby bičíku, váže se do leader sekvence mRNA pro flagelinový protein Hag, kde pro něj byla identifikovány dvě vazebná místa, překrývá jeho Shine-Dalgarno sekvenci a brání iniciaci translace. CsrA je součástí operonu biosyntézy bičíků, který obsahuje i gen *hag*. Exprese CsrA je řízena σ^A závislým promotorem a zvyšuje se po konci exponenciální fáze (Yakhnin *et al.* 2007).

2.2.1.4 Regulace skládání bičíku

Poslední úrovní regulace tvorby bičíku jsou protein-proteinové interakce při jeho skládání. Tvorba bičíku je řízena hierarchickou kaskádou exprese motilitních genů. Začíná expresí *fla/che* operonu a po něm následuje exprese σ^D závislých genů. Důležitou roli při následném skládání komponent ve funkční celek hraje schopnost samouspořádání (self-assembly) jednotlivých proteinů.

V první fázi dochází k tvorbě bazálního tělíska. Exprese první skupiny genů *fla/che* operonu resultuje v složení MS prstence a jeho inzercí do plazmatické membrány. Tvorba bazálního tělíska pokračuje skládáním C prstence a sekrečního systému typu III. Následně funkční sekreční systém odstraňuje z buňky antisigmafaktor FlgM a ruší represi transkripce σ^D závislých genů. To vede k syntéze proteinů vnějších struktur, háčku a vlákna, a jejich sekreci centrálním kanálem bičíku ven z buňky, kde polymerují (Caramori *et al.* 1996).

Při procesu skládání bičíku hraje roli celá řada regulačních proteinů, které díky protein-proteinovým interakcím regulují skládání jednotlivých komponent bičíku. Například u YviF proteinu u *Bacillus subtilis* byla prokázána schopnost vázat C koncovou doménu proteinu Hag, a v souvislosti se snížením motility mutantů s delecí genu tohoto proteinu se předpokládá, že má roli chaperonu (Titz *et al.*

2006). Další chaperony, u kterých byla prokázána schopnost vázat flagelinový protein jsou FliS a FliT, tyto proteiny brání polymeraci flagelinu v cytoplazmě (Auvray *et al.* 2001). Jinou funkci má protein FliD, který je tzv. cap proteinem a reguluje extracelulárně polymerizaci flagelinových podjednotek na konci bičíku (Ikeda *et al.* 1996).

2.2.2 Motilita na povrchu tuhého média

Motilita v tekutém médiu není jediným aktivním pohybem, kterého jsou bakterie schopny. U bakterií existuje několik typů s pevným povrchem asociovaných pohybů. Základní rozdělení a definice těchto druhů motility vytvořil již v roce 1972 Jørgen Henrichsen (Henrichsen 1972). Mezi tyto pohyby patří swimming (“plavání” - v podstatě analogie k pohybu v tekutém médiu), sliding (“klouzání”), gliding (“létání”), twitching (“cukání”), darting (“vrhání”) a swarming (“rojení”).

Swimming je typ na bičíku závislého pohybu a bakterie se při něm pohybují jako jednotlivé buňky. Jde v podstatě o pohyb v tekutém médiu, který probíhá na agarových půdách s velmi nízkým obsahem agaru pod 0,3% (w/v), hodnota nad tuto hranici jej inhibuje. Swimmingem se bakterie šíří po povrchu rychlostí kolem 50 $\mu\text{M}/\text{min}$.

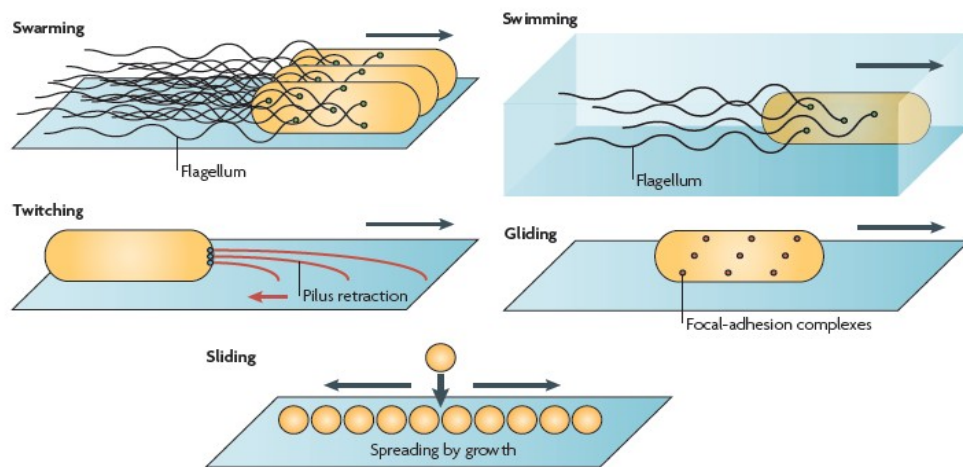
Sliding je poháněn růstem bakteriální kultury. Je umožněn produkcí látek snižujících povrchové napětí a nejedná se ve své podstatě o aktivní pohyb, nicméně při kolonizaci povrchu hraje významnou roli. Rozšiřování zón pokrytých bakteriální biomasou se děje rychlostí kolem 5-10 $\mu\text{M}/\text{min}$.

Gliding se vyskytuje u myxobakterií, cyanobakterií a rodu *Cytophaga*. V mechanismu pohybu hrají roli povrchové adhezní komplexy, přesný mechanismus není dosud objasněn. Jeho rychlost je 7 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Mignot 2007).

Twitching je poháněn kontrakcemi pili typu IV, není tudíž závislý na bičíku a jedná se o pohyb jednotlivých buněk, rychlost kolonizace povrchu je pouze 5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Vyskytuje se u řady bakterií.

Darting byl popsán u některých kmenů *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus albus*. O mechanismu tohoto pohybu není příliš známo, pravděpodobně pro něj není potřeba produkce surfaktantu. Bakterie se tímto způsobem dokáží pohybovat rychlostí 6 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Dordet-Frisoni *et al.* 2008).

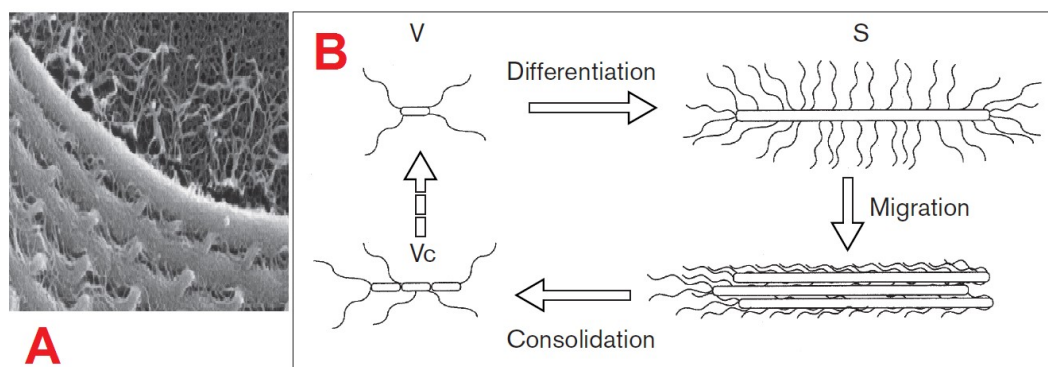
Swarming patří k těm lépe prostudovaným typům povrchové translokace. Jedná se o pohyb uskutečňovaný v rámci populace bakterií. Podílí se na něm bičíky, sekrece surfaktinu a mezibuněčné interakce bakterií. Swarming dosahuje rychlosti kolem 75 $\mu\text{M}/\text{min}$. Více o swarmingu dále.



Obr. 5. Schématické znázornění jednotlivých typů povrchové motility.
(Převzato z Kearns 2010)

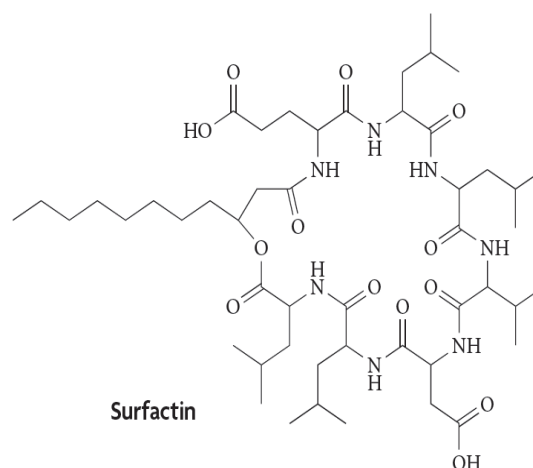
2.2.2.1 Swarming u *Bacillus subtilis*

Swarming je speciálním typem multicelulárního pohybu po povrchu tuhých médií. Je uskutečňován pomocí pohybu tzv. multicelulárních raftů tvořených spojenými prodlouženými a hustě bičíky exprimujícími bakteriemi (Kearns a Losick 2003). Přejít z planktonické formy na swarmující konsorcium buněk je doprovázeno vratnou diferenciací (Obr. 6.). Vyskytuje se jak u grampozitivních (*Bacillus*), tak gramnegativních bakterií (*Proteus*). Jeho význam spočívá nejen v rychlé kolonizaci nového prostředí, ale také se podílí na zvyšování patogenity bakterií zlepšením jejich schopnosti kolonizovat povrchy tkání, katetrů či umělých náhrad.



Obr. 6. A) Detailní mikrofotografie prodloužených buněk *Proteus mirabilis* se svazky bičků tvořící multicelulární raft při swarmingu. B) schéma diferenciacce vegetativní buňky (V) ve swarmující (S) a zpět. (Převzato Kearns 2010, Fraser a Hughes 1999)

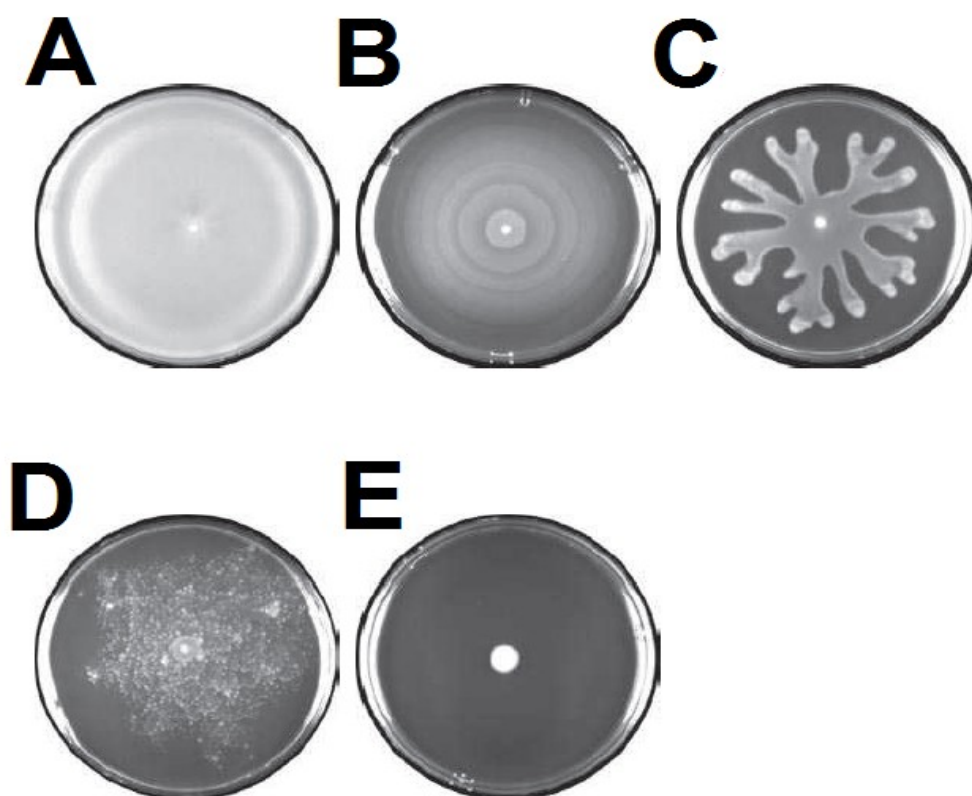
Kromě morfologických změn a agregace buněk do multicelulárních raftů je ke swarmingu potřeba ještě produkce extracelulárního surfaktantu (látky snižující povrchové napětí) surfaktinu. Surfaktin je neribozomálně syntetizovaný cyklický lipoprotein s antimikrobní a hemolytickou aktivitou, druhá ze jmenovaných vlastností se používá jako jedna z metod pro průkaz jeho produkce (Youssef *et al.* 2004). Kearns a Losick provedli elegantní pokus jednoznačně prokazující nezbytnost jak bičků, tak surfaktinu pro swarming. Připravili dva mutanty *Bacillus subtilis* neschopné swarmingu, jeden s mutací v genu pro flagelin *hag* a druhý s mutací v genu biosyntézy surfaktinu *srfAA*. Pokud tyto dva kmeny byly testovány jednotlivě, byly oba neschopné swarmingu, když byla ovšem kultivována smíšená kultura těchto kmenů schopnost swarmingu byla obnovena. Stejný efekt mělo, když se izolovaný a purifikovaný surfaktin přidal k *srfAA* mutantům (Kearns a Losick 2003).



Obr. 7. Strukturní vzorec surfaktinu. (Převzato Kearns 2010).

Pro pozorování swarmingu jsou také v laboratoři potřeba specifické podmínky, zejména ve složení médií. Proto, aby se bakterie začaly pohybovat pomocí swarmingu, je nezbytná zejména správná koncentrace agarů v pevném médiu. Optimální je 0,7% (w/v) agar. Nižší koncentrace pod 0,3% agarů dovolují bakteriím pohyb pomocí swimmingu, který tak může být se swarmingem zaměněn. Koncentrace vyšší než 1% agarů pak významně omezují swarming bakterií (Kearns 2010).

Bakterie jsou obvykle na médium naočkovány, buď jako kapka suspenze o definované optické densitě, nebo se používá sterilní párátko, kterým se inokuluje bakteriální biomasa do středu Petriho misky, způsob inokulace ovlivňuje dobu lag fáze mezi inokulací a začátkem růstu (Kearns a Losick 2003). Bakteriální biofilm poté poměrně rychle roste a přes noc je schopen přerůst povrch celé misky. Vzhled výsledného nárůstu biomasy je variabilní, závislý na druhu bakterie a na složení média.



Obr. 8. Typy swarming fenotypů.

Bakteriální biomasa je bílá, povrch média tmavý.

A - swarming u *Bacillus subtilis* 3610

B - swarming u *Proteus mirabilis* tzv. Bull's eye pattern.

C - dendritický swarming *Pseudomonas aeruginosa*

D - vortex swarming u *Paenibacillus vortex*, také známý jako fenomén wandering colonies.

E - neswarmující kmen *Bacillus subtilis* 3610.

(Převzato Kearns 2010)

2.2.2.2 Regulace swarmingu u *Bacillus subtilis*

Podstatnou roli v regulaci swarmingu hraje syntéza a sekrece surfaktinu. Surfaktin je neribozomálně syntetizovaný cyklický lipopeptid, jeho syntéza je řízená operonem *srfABCD* kódujícím 4 podjednotky multienzymového komplexu surfaktin syntetázy. Exprese z tohoto operonu je regulována pozitivně i negativně na více úrovních. Jedním z prostředků aktivace transkripce *srfA* je

quorum sensing dvousložkový systém ComPA, který odpovídá na přítomnost feromonu ComX nebo CSF v prostředí (Cosby *et al.* 1998). Na aktivaci Srf syntetázy se podílí také Sfp transferáza kódovaná genem *sfp* downstream od *srf* operonu (Nakano *et al.* 1988). Bakterie také potřebují systém na sekreci surfaktinu ten zřejmě obstarává přenašeč SwrC z rodiny AcrB transportérů (multidrug resistance pump)(Kearns *et al.* 2004).

Důležitou změnou při přechodu na swarming fenotyp jsou morfologické změny bakterií a zvýšená exprese bičíků. Na regulaci těchto procesů se u *Bacillus subtilis* podílí *swrA* operon. Tento operon je řízen ze dvou promotorů σ^D závislého a σ^A závislého, který je aktivován fosforylovanou formou response regulátoru DegU. *swrA* operon je tvořen dvěma geny SwrAA a SwrAB, a podílí se na zvyšování exprese *fla/che* operonu a tím i syntézy bičíků a tedy na přechodu na mnoha bičíkatou swarmující buňku (Calvio *et al.* 2005, Calvio *et al.* 2008).

Další geny, jejichž funkčnost je nezbytná pro plnou schopnost swarmingu u *Bacillus subtilis* jsou geny *efp*, *epr* a *cheACDY*. Gen *efp* kóduje domnělý elongační faktor P a účastní se mechanismu rezistence k surfaktinu (Kearns *et al.* 2004). Epr je sekretovaná extracelulární proteáza, jejíž exprese je kontrolována sigmafaktorem σ^D . Hraje blíže nespécifikovanou roli v multiceulárních procesech jako je swarming nebo tvorba biofilmů. Cílová struktura nebo substrát pro Epr nebyl doposud identifikován bylo ale vyloučeno, že by hrála roli v štěpení exogenních nutrií (Dixit *et al.* 2002, Bindel Connelly *et al.* 2004). *cheACDY* jsou geny pro chemotaxi, byli nalezeni mutanti v těchto genech neschopní swarmingu (Kearns a Losick, 2003), pozdější výsledky však naznačují, že nešlo o projev narušení funkce těchto genů, ale o polární efekt mutace na geny v jejich okolí (*sigD*)(Kearns *et al.* 2004).

Je známo že laboratorní (domestikované) kmeny *Bacillus subtilis* jsou obvykle neschopné swarmingu. Některé mutace, které jsou za neschopnost swarmovat zodpovědné se podařilo lokalizovat. Za neschopnost swarmingu u kmenu *Bacillus subtilis* 168 jsou například zodpovědné mutace v biosyntéze surfaktinu, gen *sfp* (Nakano *et al.* 1992) a v regulačním operonu *swrA* (Kearns *et al.* 2004).

2.3 Osmotický šok a osmoadaptace *Bacillus subtilis*

Při osmotickém šoku jsou bakterie vystaveny náhlé změně koncentrace extracelulárních iontů neboli osmolality, která souvisí s dostupností vody. Jako bakterie, žijící v svrchních vrstvách půdy, je *Bacillus subtilis* často vystaven právě změnám osmolality. Extracelulárním zvýšením osmolality (hyperosmotický šok) vede k odtoku vody z buňky a tím nebezpečí vyschnutí. Naopak při snížení osmolality (hypoosmotický šok) prostředí je voda nasávána do buňky, což může vést v extrémních případech (buněčná stěna vydrží až 10 MPa) k prasknutí buňky (Csonka a Hanson 1991).

U klesá v okolí buňky koncentrace rozpuštěných iontů a voda z okolí hnána koncentračním gradientem je nasávána dovnitř, což vede k zvyšování osmotického tlaku a membránového napětí. Pro bakterie je ochranou před působením hypoosmotického šoku především pevnost buněčné stěny. Při hypoosmotickém šoku také, aby snížily příjem vody, vylučují intracelulární osmoticky aktivní látky do okolí. Tato reakce je mezi bakteriemi běžná a u *Bacillus subtilis* se na ní podílejí transmembránové kanály MscL a YkuT (Hoffmann *et al.* 2008).

Hyperosmotický stres vystavuje buňku nebezpečí ztráty intracelulární vody, a tím i vyschnutí, vede k snížení osmotického tlaku, což má za následek narušení procesů replikace DNA a proteosyntézy. Pokud není kompenzován vede k plazmolýze a smrti buňky. Bakterie vyvinuly k překonání hyperosmotického šoku dvě základní strategie. První z nich se nazývá “salt-in strategy” a jde v podstatě o evoluční přizpůsobení životu v prostředí s vysokou salinitou. Tyto extrémně halofilní bakterie jsou adaptovány na vysokou koncentraci iontů ve své cytoplazmě, které vyrovnávají tlak prostředí (Oren 2008).

Druhá strategie se v angličtině nazývá “organic-solutes-in strategy” a je založená na hromadění organických kompatibilních solutů v cytoplazmě, které vyrovnávají osmolaritu vnějšího prostředí. Tato strategie probíhá ve dvou fázích, kdy v první je v rychlé reakci na změnu osmolarity naakumulována

potřebná koncentrace draselných iontů, které jsou v druhé fázi následně vyměněny za kompatibilní soluty. Toto je také případ osmoadaptace *Bacillus subtilis*, jež je detailněji popsán dále (Whatmore *et al.* 1990).

2.3.1 První fáze osmoadaptace - transport draselných iontů

V první fázi osmoadaptace na hyperosmotický stres dochází u *Bacillus subtilis*, jak už bylo výše popsáno, k vyrovnání osmotického tlaku prostředí pomocí importu draselných iontů. K tomu slouží různé přenašeče a transportní proteiny. U *Bacillus subtilis* nejsou zatím určeny všechny transportní systémy, které se na první fázi osmoadaptace podílí. Níže popíšu několik příkladů systémů, o nichž je známo, že se draslíkového importu účastní nebo u nichž tomu jejich vlastnosti nasvědčují.

Mnohem lépe je prozkoumán stav u *Escherichia coli*. Na transportu draselných iontů se podílí tři systémy, dva nízkoafinitní, Kup a Trk, a jeden vysokoafinitní, Kdp.

Kup (dříve TrkD) systém představuje základní konstantně přítomný systém pro transport draselných iontů (Stumpe *et al.* 1996), na významu získává pokud je bakterie vystavena zároveň s osmotickým šokem také nízkému pH prostředí (Trchounian a Kobayashi 1999).

Narozdíl od Kup systému hraje Trk důležitou roli zejména v prostředí s vyšším pH (Trchounian a Kobayashi 1999). Trk je rovněž konstitutivně exprimovaný nízkoafinitní systém. U většiny bakterií existuje pouze jediný Trk systém u *Escherichia coli* (kmen K-12) se, ale v rámci Trk systému vyskytují dva podsystémy, a to TrkH a TrkG, ty se od sebe liší v parametrech kinetiky přenosu iontů (Schlösser *et al.* 1995). Funkční transportér sestává z integrálního membránového proteinu, TrkG nebo TrkH, tvořícího komplex s periferním proteinem TrkA, u kterého byla prokázána schopnost vázat NAD(H). Pro funkčnost komplexu je také potřebný regulační protein TrkE. Pro funkci transportéru je potřeba ATP a membránový potenciál (Sleator a Hill 2001).

Kdp je vysokoafinitní systém indukovaný nízkou koncentrací K^+ , jedná se tedy o prostředek adaptivní odpovědi na růst v prostředí s nízkou koncentrací draselných iontů. Kdp je velmi účinný, jeho činností může být koncentrace K^+ v okolním médiu snížena až na hodnotu kolem 50 nM. Kdp je kódován operonem *kdpABCDE*, jehož exprese je aktivována při zvýšení osmolality dvousložkovým systémem tvořeným sensorovou kinázou KdpD a response regulátorem KdpE (Altendorf *et al.* 1994). Funkční Kdp transportní systém sestává ze čtyř podjednotek. Ústřední roli v něm hraje podjednotka KdpA tvořící transmembránový přenašeč odpovědný za transport iontů a KdpB tvořící katalytickou podjednotku vykazující homologii k ATPázám typu P odpovědnou za ATPázovou aktivitu komplexu. Podjednotky KdpC a KdpF plní roli strukturní a stabilizační (Laimonis *et al.* 1978, Gassel *et al.* 1998, Gassel a Altendorf 2001).

Dále uvádím příklady podílející se nebo s možným či předpokládaným podílem na importu draselných iontu v reakci na hyperosmotický stres u *Bacillus subtilis*.

2.3.1.1 Nízkoafinitní transportní systémy KtrAB a KtrCD

U *Bacillus subtilis* se nevyskytují homology transportních systémů *Escherichia coli*, s výjimkou TrkA. Systémy pro transport draselných iontu jsou evolučně zcela odlišné od *Escherichia coli* a jsou bližší transportním systémům rodu *Vibrio*.

Jedním z doposud identifikovaných systému transportu draselných iontů, který se vyskytuje i u *Bacillus subtilis* je systém Ktr. Jedná se o systém konstitutivně exprimovaných přenašečů jejichž exprese je nezávislá na koncentraci draslíku v prostředí. Význam těchto přenašečů podtrhují výsledky s kmeny mutantními v jejich genech, u nichž byla značně narušena schopnost přijímat K^+ ionty z prostředí (Holtman *et al.* 2003).

Homology systému KtrAB, který byl původně objeven u *Vibrio alginolyticus* (Nakamura *et al.* 1998), jsou u *Bacillus subtilis* zastoupeny dvěma systémy KtrAB a KtrCD. Přičemž KtrA a KtrC jsou homology původního KtrA z *V.*

alginoliticus, KtrB a KtrD pak homology KtrB. Rozdílem mezi systémy KtrAB a KtrCD u *Bacillus subtilis* je jejich afinita k draselným iontům, zatímco systém KtrCD je nízkoafinitní, systém KtrAB je spíše středněafinitní. Role mezi proteiny Ktr systému jsou rozděleny tak, že KtrB respektive KtrD jsou transmembránové přenašeče a KtrA respektive KtrC cytoplazmatické složky komplexů nutné pro jejich funkčnost (Holtman *et al.* 2003).

2.3.1.2 TrkA protein homologní k nízkoafinitnímu transportéru *E.coli*

Jak už bylo výše uvedeno Trk systém je konstitutivně exprimovaný nízkoafinitní systém pro transport draselných iontů uplatňující se zejména v alkalickém prostředí (Trchounian a Kobayashi 1999, Schlösser *et al.* 1995, Sleator a Hill 2001, detailněji viz kap 2.4.1)

U *Bacillus subtilis* byl objeven protein odpovídající proteinu TrkA z transportního systému Trk. Podobnost těchto proteinů je zejména strukturní, sekvenční homologie jejich genů není nijak velká. Nicméně gen pro tento protein z *Bacillus subtilis* izolovaný a přenesený do *Escherichia coli* dokáže komplementovat mutaci v TrkA (Sturr *et al.* 1997).

2.3.1.3 Tetracyklinový exfluxní transporter TetA(L)

Dalším kandidátem na systém účastnící se importu draselných iontu v odpovědi na hyperosmotický stres je rezistenci k tetracyklinu zprostředkovávající protein TetA(L). Tento chromozomálně kódovaný multifunkční transporter funguje nejen jako tetracyklin+dvojmocný kov/H⁺ antiportér, ale také jako antiportér monovalentních kationtů a protonů. Monovalentní ionty, které dokáže transportovat mohou být sodné či draselné ionty. Bylo zjištěno, že mutanti s delecí tohoto genu, jsou nejen citlivější k tetracyklinu, ale také pokud jsou kultivováni za podmínek limitující koncentrace draslíku rostou velmi pomalu (Wang *et al.* 2000).

2.3.1.4 Neznáma ATPáza typu P

Pomocí biochemických postupů byla u *Bacillus subtilis* také identifikována ATPázová aktivita typu P indukovaná draselnými ionty účastnící se odpovědi na osmotický šok, dosud ovšem nebyla přiřazena k žádnému proteinu (Šebestián *et al.* 2001).

2.3.2 Druhá fáze osmoadaptace - hromadění kompatibilních solutů

Jelikož vysoká koncentrace draselných iontů mění iontové poměry v buňce, což negativně ovlivňuje buněčné procesy, je po první fázi osmoadaptace potřeba vyměnit K^+ za jiné intaktní látky poskytující stejnou ochranu před vysokou osmolalitou prostředí. Takovéto látky se nazývají kompatibilní soluty, jsou to vysoce rozpustné látky, které samy mohou být v buňce přítomny ve vysokých koncentracích, nenesou žádný náboj (za fyziologického pH), nejsou metabolizovány a nijak neinteragují s buněčnými procesy. Význam těchto látek zvyšuje i fakt, že kromě ochrany před osmotickým stresem mohou chránit organismus i před negativním působením vysoké teploty (Holtman a Bremer 2004). Majoritním kompatibilním solutem syntetizovaným u *Bacillus subtilis* je prolin (Whatmore *et al.* 1990), jeho funkci mohou zastávat, ale i jiné syntetizované nebo z prostředí získané kompatibilní soluty.

Druhá fáze osmoadaptace nebyla předmětem diplomové práce a proto nebude podrobněji pojednávána.

2.4 Obecná stresová odpověď

Obecná stresová odpověď, je globální regulační systém, který v reakci na různé nepříznivé změny vnějších podmínek spouští expresi genů vedoucích k zvýšení odolnosti a adaptace bakterií. Pokud použijeme jako výchozí stav bakteriální buňku v exponenciální fázi je obecná stresová odpověď jedním z druhů adaptace buňky v reakci na nepříznivé změny prostředí. Alternativami k ní jsou například sporulace nebo motilita. Všechny tyto procesy jsou obvykle charakterizovány jako související s pozdní exponenciální či stacionární fází. To

jakého typu změny prostředí jsou určuje typ odpovědi.

Obecná stresová odpověď je spouštěna celou řadou stimulů mezi něž patří jak nutriční podmínky, hladovění na glukózu, fosfát či kyslík, tak fyzikální a chemické stresy, jako je stres teplotní, etanolový, osmotický, oxidační, kyselý či po přidání některých antibiotik (Boylan *et al.* 1993, Benson a Haldenwang 1993).

Geny řízené obecnou stresovou odpovědí dosahují počtu více než 150 a jsou součástí σ^B regulonu. Mezi tyto geny patří také v naší laboratoři zkoumaný gen *yxkO* (Petersohn *et al.* 2001). U většiny z nich není dosud známa jejich funkce a lépe popsanych je pouze asi 20 z nich. Ze známých dat zatím vyplývá, že se jedná především o proteiny jednak zprostředkovávající ochranu před poškozením DNA a proteinů, jednak aktivující opravné mechanismy. Získaná rezistence buněk je nespecifická a preventivní (Hecker *et al.* 2007).

2.5 Vliv laboratorní domestikace na vlastnosti bakteriálních kmenů

Významná část vědeckého bádání se provádí na modelových organizmech jako je například *Bacillus subtilis* 168. Dnešní mikrobiologické přístupy z velké části spoléhají na tvorbu mutantů. Principem je, že máme dva jedince, případně dvě populace, daného organismu, které se ovšem liší definovaným zásahem do genetického materiálu jednoho z nich. Tento přístup zahrnuje rozličné metody manipulací od selekce žádaných mutantů přes nejrůznější typy kultivací po úpravy modelových organismů pro zjednodušení jejich studia. Dlouho byl opomíjen zřejmý fakt, že takové laboratorní manipulace se studovanými organismy, jejich dlouhodobé používání a úpravy vedou ke změně jejich vlastností. V zásadě jde o to, že biologické modely, které věda studuje se částečně vzdálily přirozenému stavu v přírodě a při jejich zkoumání vyvstává nebezpečí ztráty relevantnosti takto získaných dat. Při dnešních možnostech je nemožné provádět studium genetiky, fyziologie či biochemie mikroorganismů v jejich přirozeném prostředí, tudíž je laboratorní domestikace problém, kterému se vyhnout není možné, ale akceptovat jeho přítomnost je jistě vhodné.

Domestikace laboratorních kmenů je výsledkem dlouhodobé selekce prostředím. Jde o ukázkou evoluce v praxi, nicméně je to stav nezamýšlený a neplánovaný. Oproti tomu ALE (Adaptive Laboratory Evolution) studie zamýšlené jsou, a i když nejsou primárně cílené na problematiku domestikace modelových mikroorganismů, jejich výsledky vrhají světlo na evoluční procesy, které k domestikaci vedou. Předmětem zájmu těchto studií je zejména *Escherichia coli*. Nejdelší studie mají rozsah až 40 000 generací (Barrick *et al.* 2009), během nichž jsou bakterie kultivovány za definovaných podmínek, v pravidelných intervalech odebírány vzorky k sekvenaci kompletního genomu a výsledky jsou poté porovnány. Obvykle jsou bakterie při těchto pokusech pěstovány některým typem běžné laboratorní kultivace, nejčastěji v tekutém minerálním médiu s glukózou.

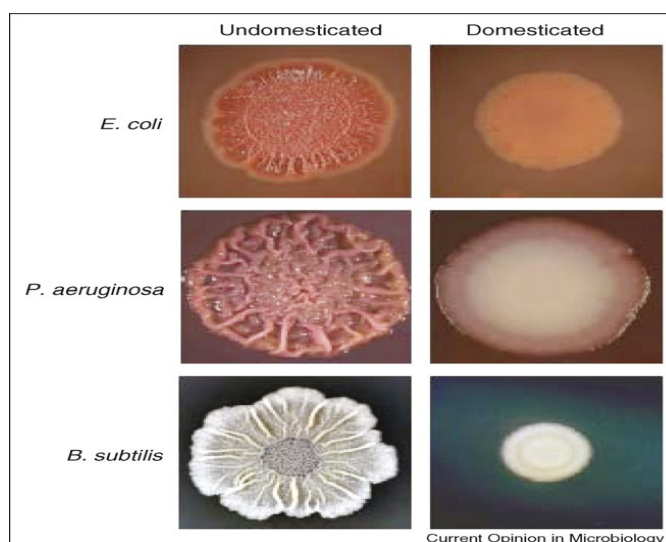
Mutace, ke kterým během takovéto dlouhodobé kultivace dochází, jsou v největší míře záměny nukleotidů, velká část také připadá na delece, nejméně časté mutace potom představují inserce a přeskoky inzerčních sekvencí (Conrad *et al.* 2011). Mutace vytvářejí variabilitu v rámci populace, což je základní podmínkou přírodního výběrů. Konečné výsledky těchto mutací mohou být různé a záleží samozřejmě na selektivitě prostředí, jaké mutace udělí svým nositelům výhodu.

Estelle Crozat se svými kolegy provedla pokus, při kterém ve 12 paralelních populacích kultivovali po 20 000 generaci na minerálním médiu s glukózou *Escherichia coli*. Tato studie byla zaměřena na topologii DNA a jejím výsledkem bylo skutečně zjištění změny topologie DNA, konkrétně zvyšování jejich negativních nadobrátek, u většiny z kmenů. U studovaných kmenů byly zjištěny mutace v genech *topA* a *fis*, jež hrají roli v kontrole počtu nadobrátek DNA. Změna topologie DNA, která hraje roli například v reakci na změny nutričních podmínek, je tedy zjevně jednou z adaptací na dlouhodobou selekci (Crozat *et al.* 2005). Další adaptivní změny mohou zasahovat různé regulační dráhy, jako například regulaci porinu OmpF pomocí Fis (Crozat *et al.* 2011), regulaci velikosti buňky a syntézu peptidoglykanu a komponent buněčné stěny (Stanek *et al.* 2009). Kromě syntézy peptidoglykanu mohou být ovlivněny také penicilin vazebné proteiny PBP (Philippe *et al.* 2008). Většina adaptací se při těchto

dlouhodobých experimentech (20 000 generací a víc) objevuje v nejvyšší míře během prvních 2 000 generací. Tyto adaptace se vztahují k příslušným kultivačním podmínkám a jak pro tyto podmínky mohou být výhodné, tak v jiných mohou vést k ztrátě životaschopnosti. Tento princip se v evoluční biologii nazývá trade-off, uplatňuje se při něm jak přímý vliv adaptačních mutací, kdy například přizpůsobení se jedněm podmínkám je spojeno s neschopností růst v jiných (př. teplotní optima enzymů), tak nepřímý vliv ztrátových mutací, které neovlivní životaschopnost v jednom prostředí, v jiném naopak způsobí její značný pokles. Příkladem takového trade-off mohou být pokusy s teplotní adaptací, kdy adaptace k růstu při 20°C vedla k snížené životaschopnosti růstu při 40°C (Bennett a Lenski 2007). Laboratorní domestikace je příkladem takové dlouhodobé adaptace, kdy se bakterie postupně přizpůsobují kultivačním podmínkám a zároveň ztrácí vlastnosti, které v nich nejsou potřebné.

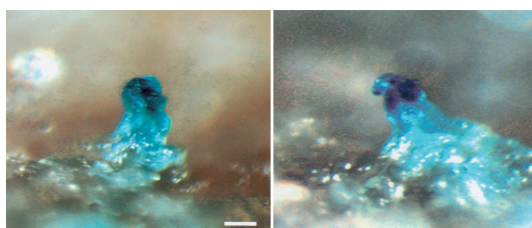
Při studiu *Bacillus subtilis*, ale i jiných druhů, se staly časem zjevné rozdíly mezi standardními laboratorními kmeny a čerstvými přírodními izoláty. Přírodní izoláty vykazují řadu na první pohled patrných fenotypových vlastností, které nejsou u laboratorních kmenů patrné nebo jsou daleko méně vyvinuté. Mezi takové vlastnosti patří komplexní architektura rostoucích kolonií, schopnost pohybovat se pomocí swarmingu a tvořit biofilm. Stojí za poznámku, že všechny tyto příklady jsou ukázkou sociálních interakcí bakterií, kdy se bakterie nechovají jako jedinci, ale jako populace (Aguilar *et al.* 2007).

Při porovnání domestikovaných kmenů s kmeny divokými je při růstu na pevném médiu vidět značný rozdíl v komplexnosti stavby kolonií (Obr. 9). Kolonie divokých kmenů vytvářejí mnohem složitější strukturu s komplexním prostorovým uspořádáním.



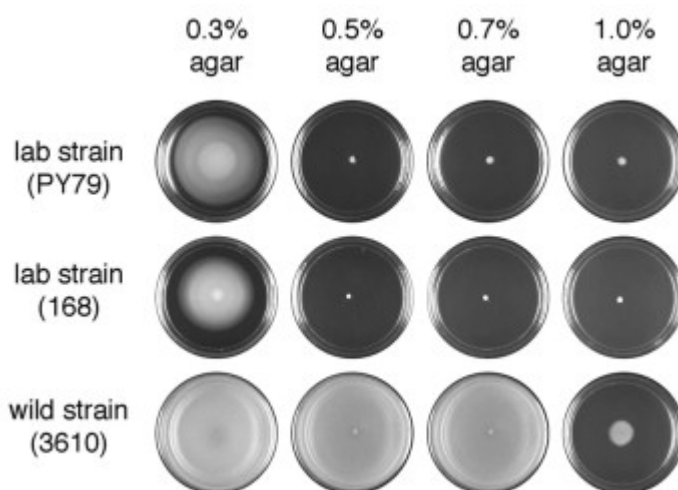
Obr. 9. Srovnání morfologie kolonií divokých a domestikovaných kmenů *E.coli*, *P. aeruginosa* a *B. subtilis*. (převzato z Aguilar *et al.* 2007)

Na povrchu takovýchto kolonií u *Bacillus subtilis* vznikají tzv. anténové struktury (aerial structures) někdy také pojmenované jako plodnice (fruiting bodies) v souvislosti se zjištěnou místní lokalizací preferenční tvorby spór v rámci kolonie (Branda *et al.* 2001, Veening *et al.* 2006). Důležitou roli pro tvorbu těchto komplexních kolonií hrají ven z buňky produkované látky tvořící extracelulární matrix, zejména exopolysacharidy a lipoprotein surfaktin, který se také účastní swarmingu. Mutace, které souvisí se ztrátou tohoto fenotypu u laboratorních kmenů byly lokalizovány do genů syntézy surfaktinu *sfp* a *srfAA*, ale také do dalších genů regulujících buněčné interakce při tvorbě biofilmů *yveQ*, *yveR* a *spo0H* (Branda *et al.* 2001) (obrázek 10).



Obr. 10. Lokalizace sporulujících buněk do “aerial structures”. Bakterie obsahují fúzi genu *lacZ* s genem *sspE* exprimovaným během sporulace. Díky růstu na chromogenním substrátu (X-Gal) jsou sporulující buňky zbarveny modře. (převzato Branda *et al.* 2001)

V rámci swarmingu byly schopnosti tohoto pohybu studovány u domestikovaných a nedomestikovaných kmenů. Bylo zjištěno, že běžné laboratorní kmeny jako je *Bacillus subtilis* kmen 168 nejsou z větší části schopny swarmingu, a to zejména také kvůli defektům v syntéze surfaktinu (Kearns a Losick 2003).



Obr. 11. Srovnání schopnosti swarmingu divokého kmenu a laboratorních kmenů *Bacillus subtilis*

Swarming je obvykle studován na médiích s obsahem 0,7% agaru, při koncentraci pod 0,3% se bakterie začínají pohybovat jako jednotlivé buňky analogicky k pohybu v tekutém médiu, koncentrace nad 1% agaru naopak swarming inhibuje. (Převzato Kearns a Losick 2003).

Velkou roli v domestikaci a tím ve ztrátě řady zejména na úrovni populace se projevujících vlastností hraje dlouhodobé opakované vystavování bakterií kultivaci v tekutém médiu v čistých kulturách. Bakteriím neuděluje v tomto prostředí schopnost swarmingu či tvorba komplexně strukturovaných kolonií žádnou výhodu a tudíž není selektována jejich funkčnost a bakterie mohou akumulovat mutace, které vedou k jejich ztrátě.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis 168 (*trpC2*)

standardní divoký kmen, kmen z naší laboratoře

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

Bacillus subtilis SG64 (*trpC2 xglA1 xglR1*) (1A680)

Kmen odvozený od *Bacillus subtilis* 168 s mutací v genu kódujícím β - galaktosidázu (Errington a Vogt, 1990).

Bacillus amyloliquefaciens FZB42 (10A6)

standardní divoký kmen, enviromentální izolát.

Bacillus subtilis subs. *spizizenii* TU-B-10^T (2A11)

standardní divoký kmen, enviromentální izolát.

Kmeny připravené v naší laboratoři:

Bacillus subtilis MP2 (*trp*, pMUTIN4::*yxkO*) kmen převzaný od M. Petrovové popis viz Petrovová 2010.

Kmeny připravené v rámci mé diplomové práce:

Bacillus amyloliquefaciens JTAM (pMUTIN4::*yxkO*) popis viz Výsledky kap. 4.2.

Bacillus subtilis subs. *spizizenii* JTSP (pMUTIN4::*yxkO*) popis viz Výsledky kap. 4.2.

Bacillus subtilis 1A680/Pctc (*amy*::*pctc-lacZ,cat*) popis viz Výsledky kap. 4.6.

Bacillus subtilis MP2/Pctc (*amy*::*pctc-lacZ,cat*) popis viz Výsledky kap. 4.6.

Escherichia coli

Kmeny na přípravu plazmidových konstruktů

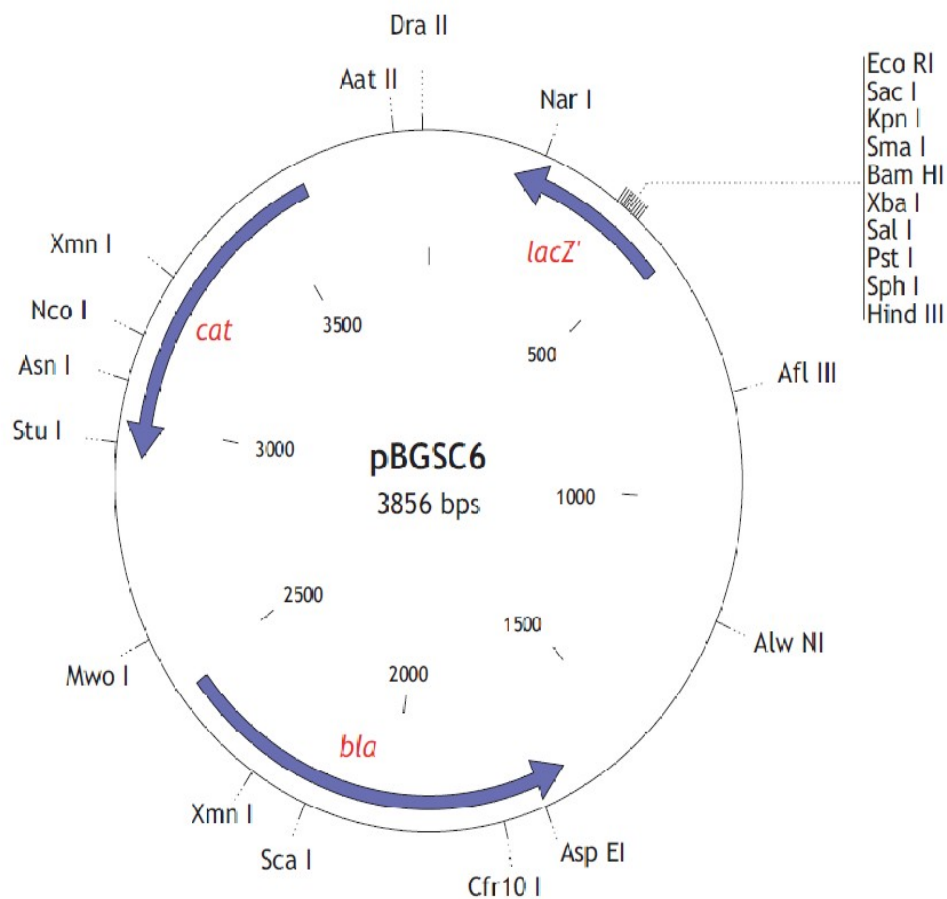
Escherichia coli DH5 α

(*deoR endA1 gyrA96 hsd R17(rk , mk⁺) recA1 relA1 supE44 thi-1 (lacZYA-arg F) U169 Φ 80lacZ M15 F - λ -*) - výrobce Clontech

3.1.2 Plazmidy

3.1.2.1 pBGSC6

Plazmid získaný z Bacillus Genetic Stock Center, Ohio University, USA. pBGSC6 je jednoduchý integrační vektor pro grampozitivní bakterie. Inzert se klonuje do multiklonovacího místa v genu lacZ (β - galaktosidáza). Přítomnost inzertu lze detekovat podle zbarvení kolonií transformovaných bakterií na Petriho miskách s X - Galem nebo McConkey agarem. Plazmid s naklonovaným inzertem lze transformovat do cílového organismu a selektovat transformanty na médiu s chloramfenikolem. Plazmid se integruje homologní rekombinací mezi cílovým místem v chromozómu a sekvencí inzertu. pBGSC6 je primárně určený pro *Bacillus subtilis*, ale je transformovatelný i do jiných grampozitivních recipientů, kteří dokáží exprimovat jím nesený gen *cat* (chloramfenikol acetyltransferáza).



Obr. 12. Schéma plazmidu pBGSC6 (převzato z <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>)

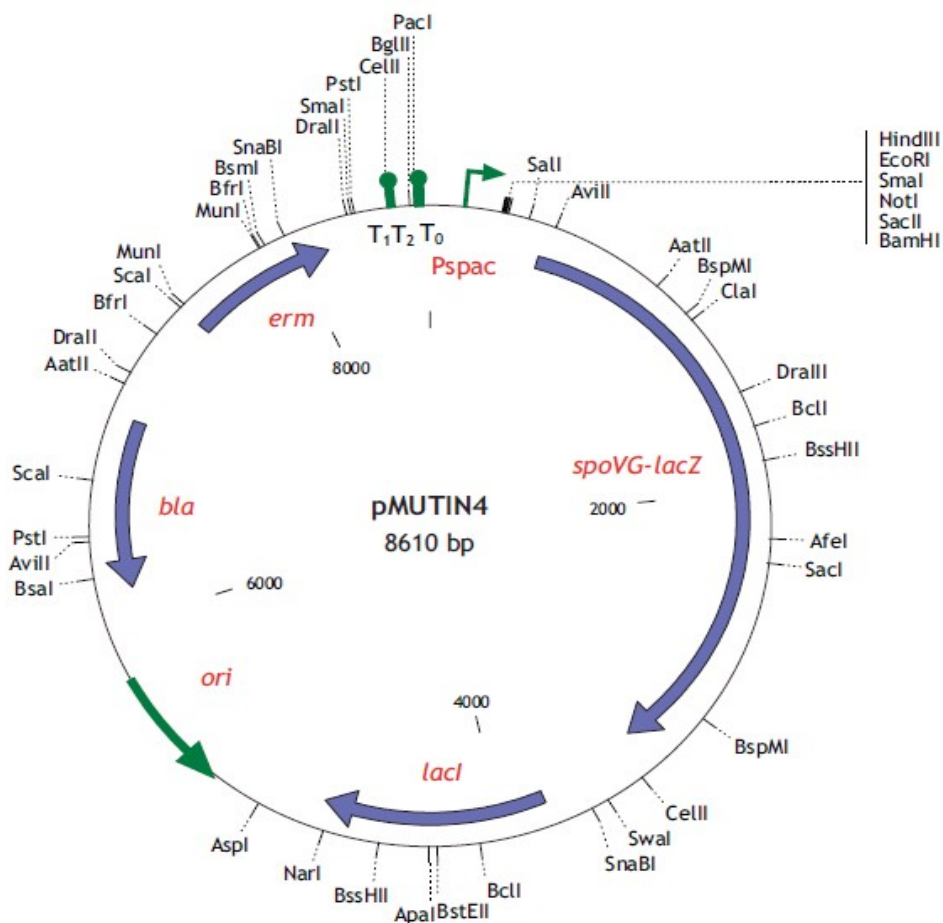
bla - gen kódující β - laktamázu, selektovatelnou v *Escherichia coli* (ampicilin 100 μ g/ ml)

cat - gen kódující chloramfenikol acetyltransferázu, selektovatelnou jak v *Escherichia coli*, tak v *Bacillus subtilis* (chloramfenikol 5 μ g/ ml)

lacZ' - gen kódující α podjednotku β - galaktosidázy

3.1.2.2 pMUTIN4

Plazmid získaný z Bacillus Genetic Stock Center, Ohio University, USA. Tento integrační plazmid je určený pro cílené umlčování genů. Obsahuje multiklonovací místo pro vložení inzertu. Díky homologii vloženého inzertu se integruje jednoduchým crossingoverem do studovaného genu mezi jeho regulační a strukturní část, čímž přeruší jeho funkci. Tento plazmid nese indukovatelný promotor Pspac, který je po integraci vložen před strukturní část studovaného genu. Přidáním induktoru lze mutaci komplementovat. Navíc pMUTIN4 také dovoluje studium exprese mutovaného genu. Po integraci je přirozený promotor studovaného genu fúzován s genem *lacZ* z *Escherichia coli* (β - galaktosidáza) s vloženým ribozóm vazebným místem genu *spoVG* z *Bacillus subtilis*, což umožní pomocí stanovení aktivity β - galaktosidázy určit úroveň transkripce z tohoto promotoru. Dále také tento plazmid nese geny pro antibiotickou rezistenci k ampicilinu (selekce přítomnosti plazmidu v *Escherichia coli*) a k erytromycinu (selekce přítomnosti integrovaného plazmidu v *Bacillus*). Plazmid pMUTIN4 je určený primárně pro *Bacillus subtilis*, ale lze ho použít i pro další grampozitivní bakterie schopné přirozené transformace.



Obr. 13. Schéma plazmidu pMUTIN4 (převzato z <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>)

spoVG - lacZ - gen kódující β - galaktosidázu *lacZ* z *Escherichia coli* s ribozóm vazebným místem genu *spoVG* z *Bacillus subtilis*.

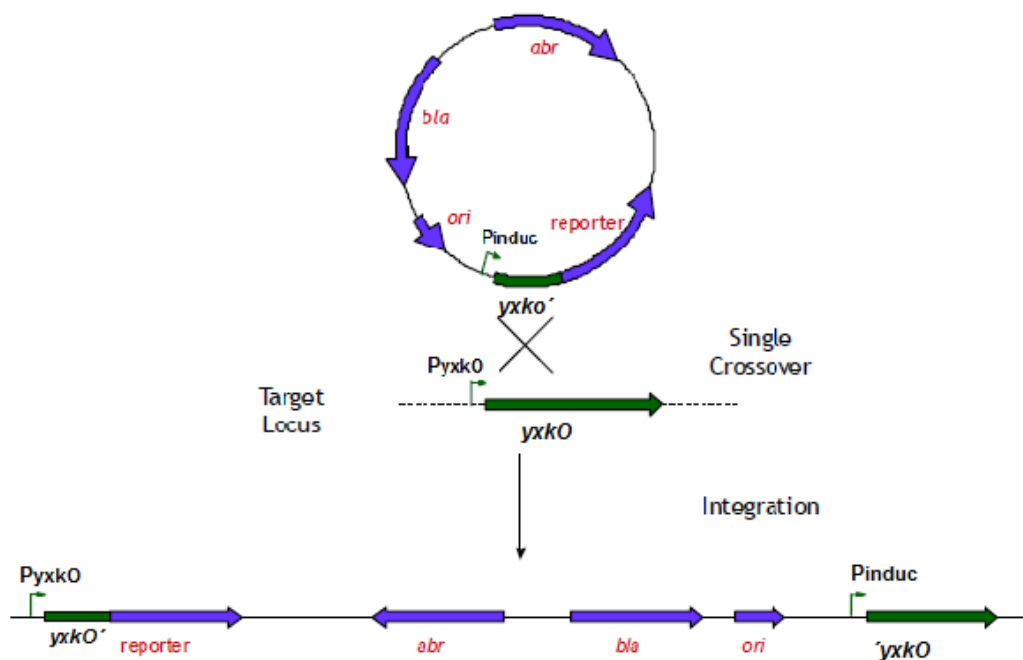
lacI - gen pro *lac* represor s pozměněným ribozóm vazebným místem pro grampozitivní bakterie.

ori - počátek replikace v *Escherichia coli*.

bla - gen kódující β - laktamázu, selektivně v *Escherichia coli* (ampicilin 100 $\mu\text{g/ml}$)

erm - gen kódující rRNA adenin N-6-metyltransferázu, selektivně v *Bacillus subtilis* (erytromycin 0,3 $\mu\text{g/ml}$)

Pspac - promotor indukovatelný pomocí IPTG

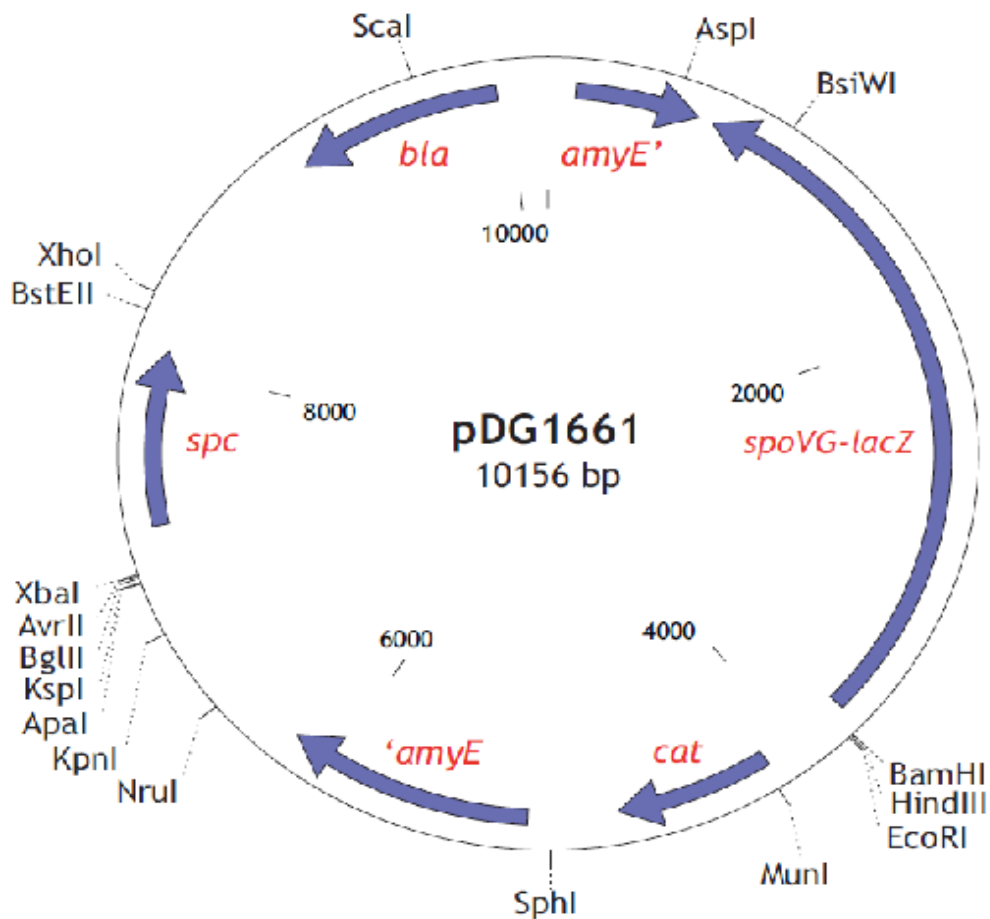


Obr. 14. Schéma integrace plazmidu pMUTIN4 do chromozomu *Bacillus subtilis* (převzato z <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>)

K integraci dochází jedním crossingoverem na základě homologie sekvence vloženého inzertu a cílovým místem v chromozomu.

3.1.2.3 pDG1661

Plazmid získaný z Bacillus Genetic Stock Center, Ohio University, USA. pDG1661 je integrační vektor, který byl zkonstruován pro účely studování aktivity promotorů *Bacillus subtilis*. Studovaný promotor je vložen do polyklonovacího místa před genem *lacZ* (původem z *E.coli*) a ribozómovým vazebným místem genu *spoVG* *Bacillus subtilis*. Připravený konstrukt se integruje do chromozómu *Bacillus subtilis* pomocí dvojitého crossingoveru mezi fragmenty genu *amyE*, které obsahuje plazmid pDG16601, a chromozómalním genem *amyE* v *Bacillus subtilis*. U takto připraveného kmenu pak lze stanovit míru exprese studovaného promotoru měřením enzymové aktivity β -galaktosidázy, tj. produktu genu *lacZ*.



Obr. 15. Schéma plazmidu pDG1661 (převzato z <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>)

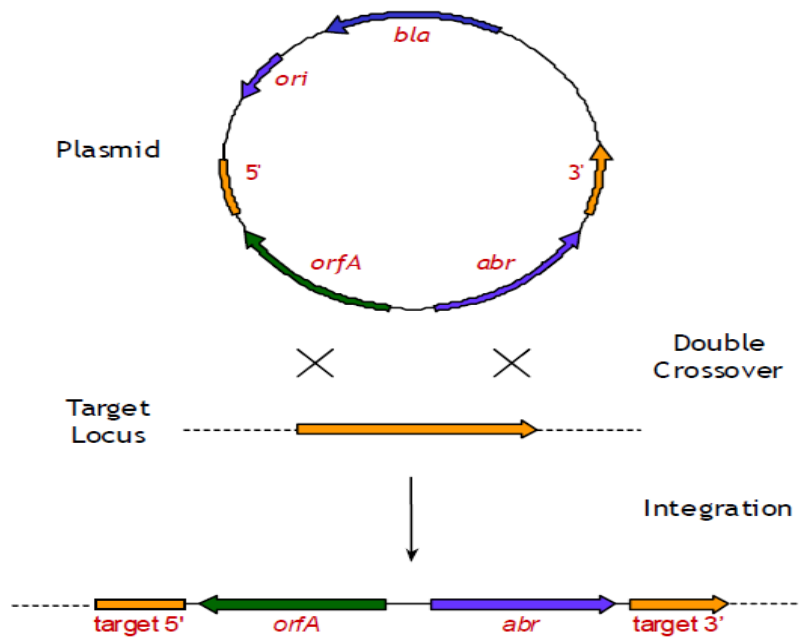
spoVG-lacZ - gen kódující β - galaktosidázu *lacZ* z *Escherichia coli* zfúzovanou s ribozóm vazebným místem genu *spoVG* z *Bacillus subtilis*.

bla - gen kódující β - laktamázu, selektovatelný v *Escherichia coli* (ampicilin 50 $\mu\text{g/ml}$).

cat - gen kódující chloramfenikol acetyltransferázu, selektovatelnou jak v *Escherichia coli*, tak v *Bacillus subtilis* (chloramfenikol 5 $\mu\text{g/ml}$).

spc - gen kódující spectinomycin adenyltransferázu, selektovatelnou jak v *Bacillus subtilis*, tak i v *Escherichia coli* (spectinomycin 100 $\mu\text{g/ml}$).

amyE'...*'amyE* - 5' a 3' koncový segment z genu *amyE* v *Bacillus subtilis* 168.



Obr. 16. Schéma integrace plazmidu pDG1661 do chromozomu *Bacillus subtilis* (převzato z <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>)

Plazmid se integruje dvojitým crossingoverem do chromozomálního genu *amyE*.

3.1.3 Primery pro PCR

Název	Sekvence primeru	Restrikční místo	T _{m1} /T _{m2} (°C)
yxkO-D1F	GCGGAATTCCAAGCTGCATGACTACATTGA	EcoRI	61,6/50,5
yxkO-D1R	CCCATCCACTAAACTTAAACA TTTTCCTGTCCCT TTTCTTTTTCAAAC	-	65,4/53,7
yxkO-D2F	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTGACGGGCATG ATATTGGGG	-	68,4/56,3
yxkO-D2R	TGAGGATCCCTATGTATTAATGAAACCGCGTCT GAA	BamHI	63,3/55,2
mutinR	GGTCGAAAGATCAACATTAAATGTGAGCG	-	58,7/45,6
mutinF	GGAATGGATCCTAGCTTCCAAGAAAGAT	BamHI	58,5/46,8
yxkOSDF	CCCAAGCTTAGGAAAAGAAAGCAGAGGAG	HindIII	61,5/50,5
yxkOR2	CCCCAATATCATGCCCGTCAG	-	56,3
ctc_prom_R	TTTAGGATCCCGAGTAAAGTCCGTTCTTTCTT	BamHI	60,5/51,1
ctc_prom_F	CATAGAATTCCCATTTTTTCGAGGTTTAAATCCTT	EcoRI	58,4/48,1
ymye2R	CGTACTGCCTGAACGAGAAGCTA	-	57,1

Tabulka 1: Sekvence primerů.

Podtržená část odpovídá restrikčním místu primeru, šedá část sekvenci komplementární k templátu.

T_{m1} - teplota tání celého primeru

T_{m2} - teplota tání komplementárního úseku.

3.1.4 DNA standardy

- GeneRuler[™] DNA Ladder mix, 100 - 10 000 bp (Fermentas)
- Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (Fermentas)

3.1.5 Enzymy

Název	Výrobce
<i>Restrikční enzymy:</i>	
BamHI	Fermentas
HindIII	Fermentas
EcoRI	Fermentas
Sall	Fermentas
BstEII	Fermentas
PstI	Fermentas
SacI	Fermentas
<i>DNA polymerázy:</i>	
<i>Taq</i> DNA polymeráza	Fermentas
<i>Pfu</i> DNA polymeráza	Fermentas
<i>Ostatní:</i>	
T4 DNA ligáza	Fermentas
Lysozym	Fluka
Ribonukleáza A	Sigma
Proteináza K	Sigma

3.1.6 Chemikálie

Název	Výrobce
Aceát sodný	LACHEMA
Agar	OXOID
Agaróza	MERCK
β - merkaptoetanol	SERVA
CaCl ₂	LACHEMA
dNTP mix (směs deoxyribonukleotidtrifosfátů)	FERMENTAS
DNA Loading Dye 6X	FERMENTAS
dodecyl sulfát sodný (SDS)	SIGMA
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	LACHEMA
Etanol	PENTA
Etidium bromid	SIGMA
Glukóza	LACHEMA
Glycerol	SIGMA
HCl	LACHEMA
Chloroform	LACHEMA
Izopropanol	LACH NER
KCl	LACHEMA
Krystalová violet'	LACHEMA
Kvasničný autolyzát	OXOID
LiCl	BDH
Metanol	PENTA
MgCl ₂	BDH
NaCl	LACH NER
NaOH	BDH
ONPG (o-nitrofenyl- β -D-galakto pyranozid)	SERVA
Tris (tris(hydroxymetyl)aminometan)	FLUKA
Tryptofan	LACHEMA
Triton X100	SERVA

3.1.7 Komerční sady

- **GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit** (Fermentas) - izolace plazmidové DNA
- **GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit** (Sigma - Aldrich™) - izolace plazmidové DNA
- **MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit** (Epicentre Biotechnologies) - izolace chromozómalní DNA
- **Silica Bead DNA Gel Extraction Kit** (Fermentas) - izolace DNA z agarózového gelu

3.1.8 Antibiotika

Název	Zásobní roztok	Výrobce
Ampicilin	100 mg/ml	SERVA
Erytromycin	9 mg/ml	FLUKA
Chloramfenikol	34 mg/ml	ROTH
Spectinomycin	100 mg/ml	FLUKA
Tetracyklin*	-	Oxoid

*použit ve formě antibiotikem napuštěného disku pro určení minimální inhibiční zóny.

3.1.9 Kultivační média

Bakteriální kultury byly kultivovány v tekutých minerálních a komplexních médiích a také na médiích pevných. Média byla sterilizována v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120°C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa.

Při přípravě pevných médií byl přidán 2% (w/v) agar, respektive 0,7% (w/v) agar (u médií pro studium swarmingu).

3.1.9.1 Komplexní médium

LB (Luria - Bertani) médium:

- 1 % (w/v) trypton
- 0,5 % (w/v) kvasničný autolyzát
- 0,17 M NaCl
- destilovaná voda

pH upraveno na 7,0 pomocí 1 M NaOH a médium sterilizováno autoklávováním.

Pro přípravu pevné půdy po úpravě pH přidáno 2 % (w/v) respektive 0,7 % agaru a sterilizováno autoklávováním.

•

3.1.9.2 Minerální média

Pro přípravu 1 litru tekutého minerálního média bylo smícháno:

- 200 ml zásobního fosfátového pufru
- 2 ml 0,5 M sterilního roztoku citronanu sodného
- 1 ml roztoku $\text{MnCl}_2 + \text{ZnSO}_4$
- variabilní množství sterilního zásobního roztoku 1 M KCl podle požadované konečné koncentrace K^+ iontů.
- 10 ml 1 % (w/v) sterilního roztoku tryptofanu
- glukóza na konečnou koncentraci 1 % (w/v) ze zásobního roztoku sterilní 50% (w/v) glukózy

- doplněno na objem 1 litru sterilní destilovanou vodou

Zásobní fosfátový pufr, pH 7:

- 0,26 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0,04 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 2,5 ml 0,1 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- Destilovaná voda doplněna do objemu 1 litru a sterilizováno autoklávováním

Roztok $\text{MnCl}_2 + \text{ZnSO}_4$

- 100 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 10 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- destilovanou vodou doplněno na objem 20 ml. Sterilizováno filtrací.

Pro přípravu 1 litru pevného minerálního média bylo použito:

- Složka A: 200 ml zásobního fosfátového pufru
2 ml 0,5 M sterilního roztoku citronanu sodného
1 ml roztoku $\text{MnCl}_2 + \text{ZnSO}_4$
variabilní množství sterilního zásobního roztoku 1 M KCl podle požadované konečné koncentrace K^+ iontů
variabilní množství NaCl ze zásobního roztoku 5 M NaCl podle požadované finální koncentrace
- Složka B: 2 % nebo 0,7 % (w/v) agar
1 % (w/v) glycerol
10 ml 1% (w/v) roztoku tryptofanu
destilovanou vodou doplněno do 1 litru včetně složky A

Obě složky byly autoklávovány odděleně a po částečném vychladnutí smíchány.

Pevné médium bylo rozlito do Petriho misek

3.1.9.3 Média pro přípravu kompetentních buněk *Bacillus subtilis*

Médium A

- 81 ml destilované vody
- 10 ml 10x Medium A base
- 9 ml 10x Bacillus salts

Médium B

- 10 ml médium A
- 0,1 ml 50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 250 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

10x Medium A base

- 10 g kvasničný autolyzát
- 2 g kyselý hydrolyzát kaseinu
- doplněno destilovanou vodou do 900 ml a sterilizováno autoklávováním
- 100 ml 50% glukóza steriizovaná filtrací

10x Bacillus salts

- 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 183 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
- 60 g KH_2PO_4
- 10 g dihydrát citrátu trisodného
- 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- doplněno destilovanou vodou na objem 1000 ml
- sterilizováno autoklávováním

3.1.9.4. Média pro přípravu heat shock kompetentních buněk *Escherichia coli*

Médium A

LB médium
10 mM MgSO₄
0,2 % glukóza

Médium B (uchovávací médium)

LB médium
36 % glycerin
12 % PEG 8000
12 mM MgSO₄
pH upraveno na 7, sterilizováno filtrací

3.1.9.5 Tuhý krevní agar pro detekci surfaktinu

Ke komplexnímu médiu (kap. 3.1.9.1) s přidaným agarem přidáno 5 - 10 % (v/v) králičí krve.

3.1.10 Roztoky

3.1.10.1 Roztoky pro stanovení aktivity β - galaktosidázy

Z pufr:

- 60 mM Na₂HPO₄ . 7 H₂O
- 40 mM NaH₂PO₄
- 10 mM KCl
- 1 mM MgSO₄ . 7 H₂O
- 50 mM β - merkaptóetanol (přidán v den použití)

Lysozym 2,5 mg/ml

- rozpuštěn v pufru Z

ONPG 4,0 mg/ml

- rozpuštěno v pufru Z

10 % roztok Tritonu X100

- rozpuštěn v sterilní vodě

1 M Na₂CO₃

3.1.10.2 Roztoky pro izolaci plazmidové DNA

Roztok I (PEB roztok)

0,6 g Tris

1,8 g glukózy

0,74 g Na₂EDTA

180 ml destilované vody

pH upraveno pomocí 1 M HCl na 8,0 a doplněno na 200 ml

Sterilizováno autoklávováním a uchováváno při 4°C

Roztok II (ALM roztok)

0,2 M NaOH

1% (w/v) SDS

připraveno v destilované vodě

připravuje se čerstvý před preparací

Roztok III (3 M acetát sodný)

81,6 g acetátu sodného

destilovaná voda do 200 ml

pH upraveno na 4,8 pomocí ledové kyseliny octové

sterilizováno autoklávováním a uchováváno při laboratorní teplotě

3.1.10.3 Roztok pro horizontální agarózovou elektroforézu

50x TAE pufr:

- 36,3 g Tris
- 8,57 ml ledové kyseliny octové
- doplněno destilovanou vodou na objem 135 ml
- přidáno 15 ml 0,5 M EDTA

Roztok nanášecího barevného pufru 6X DNA Loading Dye (výrobce Fermentas)

1 % (w/v) roztok Etidium bromidu

Příprava gelu (50ml):

- 1 ml 50x TAE pufru
- 49 ml destilované vody
- variabilní množství agarózy podle požadované hustoty gelu
- smícháno a přivedeno k varu
- přidáno 2,5 μ l 1 % (w/v) Etidium bromidu

3.1.10.4 Roztoky pro barvení bakterií dle Grama

Krystalová violet:

- Roztok A:

krystalová violet	2 g
etanol	20 ml
- Roztok B:

oxalát amonný	0,8 g
destilovaná voda	80 ml

Smíchat oba roztoky.

Lugolův roztok:

- jod 1 g
- jodid draselný 2 g

- destilovaná voda 300 ml

Safranin:

- safranin O 0,25 g
- etanol 10 ml
- po rozpuštění přidat destilovanou vodu 100 ml

3.1.10.5 Roztoky pro barvení bakteriálních bičíků Leifsonovou metodou

Roztok A:

- NaCl 1,5 g
- destilovaná voda 100 ml

Roztok B:

- tannic acid 3 g
- destilovaná voda 100 ml

Roztok C:

- basický fuchsin (na barvení bičíků) 1,2 g
- etanol, 95% 100 ml

Roztoky byly ve stejných objemech smíchány a barvicí roztok byl skladován při 4°C.

3.1.11 Internetové databáze a počítačové programy

- <http://www.bgsc.org/> - stránky *Bacillus* Genetic Stock Center obsahující katalogy bakteriálních kmenů rodu *Bacillus* a vektorů používaných pro rod *Bacillus*
- <http://bacillus.genome.jp> - genomová databáze pro *Bacillus subtilis* BSORF
- Chromas - program pro analýzu sekvenačních dat
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - stránky National Center for Biotechnology Information obsahující řadu molekulárně biologických databází
- <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi> - DOE Joint Genome Institute nástroje pro srovnání genomů

3.1.12 Přístroje a laboratorní zařízení

Centrifugy:

- CL3R (IEC)
- Mikro 20 (Hettich)
- Mikro 22 (Hettich)
- MiniSpin (Eppendorf)

DU Series 500 Spectrophotometer (Beckman)

Fotoaparát OLYMPUS SP-565UZ

Termostat Memert

Transiluminátor TCP- 20- LM

VWR Collection Thermal Cycler DOPPIO

Vzdušná třepačka NB-205 (N-Biotek)

Zdroj pro elektroforézu EC 250-90

Světelný mikroskop JENAMED 2

3.2 Metody

3.2.1 Práce s bakteriální kulturou

3.2.1.1 Kultivace na pevném médiu

Bakterie byly inokulovány pomocí špičky sterilního páratka či vypálenou kličkou, nebo ve formě buněčné suspenze vysety a rozetřeny "hokejkou" na agarové půdy v Petriho miskách s minerálním nebo komplexním médiem. Kultivováno v termostatu při 37°C nebo 28°C.

3.2.1.2 Kultivace v tekutém médiu

Bakteriální kmeny byli kultivovány v komplexním nebo minerálním médiu v Erlenmayerových baňkách. Objem média závisel na potřebném množství kultury, kvůli zajištění dostatečné aerace ovšem nepřekračoval 1/10 objemu baňky. Kultury byly pěstovány při 37°C nebo 30°C ve vzdušné třepačce s frekvencí 200 - 210 otáček za minutu.

3.2.1.3 Uchovávání bakteriálních kmenů

Krátkodobě byly bakteriální kmeny uchovávány na Petriho miskách při 4°C. Pro dlouhodobé uchování se bakterie ve formě suspenze smísili se sterilním 40% glycerolem (v/v) do konečné koncentrace glycerolu 20% (v/v) a byly uchovávány při teplotě -70°C.

3.2.1.4 Příprava heat shock kompetentních buněk *Escherichia coli*

- Buňky *Escherichia coli* DH5α z jedné kolonie narostlé na pevném LB médiu byly inokulovány do 10 ml LB média, za aerace při 37°C kultivovány přes noc
- 0,5 ml noční kultury naočkováno do 50 ml média A
- Kultivováno při třepání a teplotě 37°C do OD₆₀₀ = 0,3 - 0,4

- Buňky byly přelity do předchlazené 50 ml plastové centrifugační zkumavky a zchlazeny na ledu 20 minut
- Peletovány při 1500 RCF při 4 °C 10 minut
- Resuspendovány v 0,5 ml média A (předchlazeného na ledu)
- Následně přidáno 2,5 ml média B
- Rozděleno po aliquotech 200 µl do mikrozkuvek a uchovááno při -70°C

3.2.1.5 Transformace heat shock kompetentních buněk *Escherichia coli*

- Ke kompetentním buňkám (viz 3.2.1.4) přidáno 100 ng - 1 µg DNA
- Buňky inkubovány 20 - 30 minut při 4°C
- Inkubovány 1,5 - 2 minuty při 42°C
- Inkubovány 5 - 10 minut při 4°C
- Přidán 1 ml LB média
- Buňky inkubovány 40 - 60 minut při 37°C (regenerace buněk)
- Zakoncentrovány centrifugací
- Vysety na Petriho misky s LB médiem a příslušným antibiotikem
- Kultivovány při 37°C přes noc

3.2.1.6 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro transformaci elektroporací

1. Buňky *Escherichia coli* DH5α byly inokulovány do tekutého LB média a kultivovány přes noc.
2. Z přes noc narostlé kultury bylo naočkováno vytemperované LB médium o objemu 50 ml na přibližnou optickou denzitu $OD_{450} = 0,1$.
3. Za aerace a teploty 37°C byla kultura pěstována do $OD_{450} = 0,7 - 0,9$.
4. Poté byla kultura zchlazena 20 minut na ledu.
5. Buňky byly sedimentovány centrifugací při 4000 rpm po dobu 10 minut a při chlazení na 4°C.
6. Pelet byl resuspendován v 50 ml ledové deionizované vody.
7. Znovu centrifugováno při 4000 rpm 10 minut při 4°C

8. Pelet resuspendován v 25 ml ledové deionizované vody.
9. Znovu centrifugováno při 4000 rpm 10 minut při 4°C.
10. Pelet resuspendován v 20 ml 10% (v/v) ledového glycerolu.
11. Centrifugováno při 4000 rpm 10 minut při 4°C.
12. Pelet resuspendován v 10 ml 10% (v/v) ledového glycerolu.
13. Centrifugováno při 4000 rpm 10 minut při 4°C.
14. Pelet resuspendován v 1 ml 10% (v/v) ledového glycerolu.
15. Kultura rozdělena po 200 µl do mikrozkuvek a uchovávána při -70°C.

3.2.1.7 Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* elektroporací

1. V elektroporační kyvetě smícháno 100 µl na ledu rozmražené suspenze kompetentních buněk a 10 µl (cca 100 ng) DNA.
2. Na elektroporátoru aplikován pulz o napětí 2,5 kV, odporu 200 Ω, při kapacitanci 25 µF.
3. Do kyvety přidán 1 ml LB média a obsah kyvety přenesen do mikrozkuvky.
4. Kultivováno při 37°C 1 hodinu.
5. Buňky sedimentovány při 13 000 rpm po dobu 10 minut a resuspendovány v 200 µl LB média.
6. Suspenze vyseta na Petriho misku s LB médiem a selekčním antibiotikem, kultivováno přes noc v termostatu při 37°C

3.2.1.8 Příprava kompetentních buněk bakteriálních kmenů rodu *Bacillus*

Použitý postup z protokolu na stránkách <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>

(upraveno):

1. Kmeny byly vysety na agarové LB půdy a kultivovány přes noc (18 hodin) při 37°C.
2. Bakterie byly naočkovány do 10 ml média A a kultivovány za aerace při 37°C. Průběžně měřeno OD₆₅₀
3. Po dosažení OD₆₅₀ = 0,5 - 0,6 byly bakterie kultivovány dalších 90 minut.
4. Poté bylo 0,05 ml jednotlivých kultur přeočkováno do 0,45 ml vytemperovaného média B

5. Kultivováno 90 minut za aerace při 37°C.
6. Následně byly buňky zcentrifugovány, supernatant odstraněn, buňky resuspendovány na objem 200 μ l a přeneseny do mikroskopické kumavky s 200 μ l 40% glycerolu
7. Uchovávány při -70°C

3.2.1.9 Transformace kompetentních buněk bakteriálních kmenů rodu *Bacillus*

- Ke kompetentním buňkám v mikroskopické kumavce přidán přibližně 1 μ g plazmidové DNA.
- Inkubovány 30 minut při 37°C
- Přidán 1 ml LB média
- Inkubace 1 hodinu při 37°C
- Vyseto 100 μ l kultury na agarovou LB půdu s příslušným antibiotikem
- Kultivováno přes noc při 37°C v termostatu

3.2.1.10 Měření optické denzity bakteriální kultury

Optická denzita kultury byla při kultivaci v tekutém médiu měřena pomocí spektrofotometru. Při vlnové délce 450 nm (OD_{450}) byla měřena optická denzita pro růstové křivky a jiné kultivační pokusy, při vlnové délce 595 nm (OD_{595}) byla měřena optická denzita pro stanovení aktivity β - galaktosidázy.

3.2.2 Práce s bakteriální DNA

3.2.2.1 Izolace chromozomální DNA

Chromozomální DNA byla izolována ze zástupců bakteriálního rodu *Bacillus*, jmenovitě z *B. subtilis* 1A680, *B. amyloliquefaciens* FZB42 a *B. subtilis* spizizenii TU-B-10^T pomocí komerční sady MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit. Postupováno dle přiloženého protokolu. Takto izolovaná DNA sloužila jako templát pro PCR reakce k tvorbě rekombinantní DNA pro přípravu mutantů nebo pro ověření správnosti integrace rekombinantního plazmidu do chromozomu recipientního kmenu.

3.2.2.2 Izolace plazmidové DNA

3.2.2.2.1 Mini preparace plazmidové DNA

Pro účely analytické, například po transformaci kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5 α rekombinantním plazmidem za účelem jeho pomnožení, byla plazmidová DNA izolována dle protokolu převzatého z Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria, a laboratory manual; S. R. Maloy. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1996.

Takto izolovaná plazmidová DNA byla použita především pro restriční analýzu.

Protokol:

1. Do 2 ml LB média s příslušným antibiotikem inokulována 1 kolonie.
2. Kultivováno za aerace při 37°C do saturace kultury (8 hodin až přes noc)
3. Kultura sklizena centrifugací v mikrozkušavce při 13 000 rpm/30 s.
4. Pečlivě odstaněn supernatant a buňky resuspendovány v 0,1 ml roztoku č. I.
5. Přidáno 0,2 ml roztoku č. II s Ribonukleázou A mírně promícháno převrácením zkumavky. Inkubováno na ledu cca 5 minut.
6. Přidáno 0,15 ml roztoku č. III, promícháno opatrným převrácením zkumavky.
7. Vzniklá sraženina sedimentována centrifugací (14 000 rpm/ 5 minut).

8. Odebráno 400 μ l supernatantu (obsahující plazmidovou DNA) do čisté zkumavky a přidáno 800 μ l ledového 96% etanolu.
9. Precipitováno při - 20°C minimálně 30 minut.
10. Precipitát sedimentován centrifugací 14 000 rpm/ 5 minut.
11. Supernatant odstraněn a pelet opláchnut 0,5 - 1 ml 70 % etanolu.
12. Precipitát opět sedimentován při 14 000 rpm/ 2 minuty a odstraněn zbytek etanolu.
13. Pelet sušen na vzduchu 30 minut. Rozpouštěn v 50 μ l TE pufru zhruba 1 hodinu.
14. Přidáno 50 μ l 5 M LiCl a promícháno.
15. Inkubováno 10 minut na ledu.
16. Precipitát sedimentován ventrifugací 14 000 rpm/ 5 minut.
17. Do čisté mikrozkuavky odebrán supernatant o objemu 100 μ l, přidáno 0,2 ml ledového 96% etanolu.
18. Precipitováno minimálně 60 minut při - 20 °C.
19. Precipitát sedimentován centrifugací 14 000 rpm/ 5 minut.
20. Supernatant odstraněn a pelet opláchnut 0,5 - 1 ml 70 % etanolu.
21. Precipitát opět sedimentován při 14 000 rpm/ 2 minuty a odstraněn zbytek etanolu.
22. Pelet sušen na vzduchu 30 minut. Rozpouštěn v 0,05 TE pufru zhruba 1 hodinu. Uchováván při - 20°C

3.2.2.2 Izolace plazmidové DNA pomocí sady Plasmid Miniprep Kit

Plazmidová DNA ve vysoké čistotě pro další úpravy a manipulace byla izolována pomocí komerční sady GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Postupováno podle přiloženého protokolu.

3.2.2.3 Čištění vzorku DNA pomocí sady DNA Extraction Kit

Fragmenty DNA pro klonování do plazmidů byly kvůli odstranění kontaminujících primerů po PCR reakci anebo odštěpených konců po působení restrikčních enzymů elektroforeticky separovány a následně izolovány pomocí komerční sady Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) z agarozového gelu. Postupováno dle přiloženého protokolu.

3.2.2.4 Čištění DNA chloroformovou precipitací

Zjednodušení metody fenol - chloroformové precipitace DNA pro odstranění pufru po restrikční reakci nebo po PCR reakci pro následnou manipulaci.

1. Vzorek DNA naředěn na 200 μ l.
2. Přidáno 200 μ l chloroformu.
3. Vzorek protřepán a odebrána svrchní vodná fáze obsahující DNA.
4. Přidána 1/10 objemu LiCl a dvojnásobek objemu 96% etanolu
5. Precipitováno minimálně 1 hodinu při - 20°C.
6. Centrifugováno 14 000 rpm 10 minut při 4°C.
7. Odstraněn supernatant.
8. Vzorek vysušen a resuspendován v potřebném objemu deionizované vody.

3.2.2.5 Horizontální agarózová elektroforéza DNA

Horizontální agarózová elektroforéza byla užívána ke kontrole výsledků po izolaci plazmidové nebo chromozomální DNA, restrikci DNA a PCR. Také k separaci fragmentů DNA pro určení jejich velikosti, koncentrace a odhadu koncentrace DNA ve vzorku. Koncentrace agarózy byla obvykle 1% (w/v) v případech kdy byly žádané fragmenty DNA ve vzorku menší než 200 bp byla použita agaróza 2% (w/v). Agaróza byla rozpuštěna v 1x koncentrovaném TAE pufru. Vizualizaci DNA byl použit roztok 1% (w/v) etidium bromidu, přidáván 2,5 μ l na 50 ml agarózového gelu.

Vzorky obsahující DNA byly smíchány s barvicím pufrům a nanášeny do jamek v gelu. Při elektroforéze bylo užíváno stejnosměrné napětí o hodnotě zhruba 5

V/cm² gelu.

3.2.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR reakce byly prováděny v tenkostěných mikrozkuvkách určených pro PCR v PCR cykleru VWR Collection Thermal Cycler DOPPIO.

Složení reakční směsi:

Komponenta	Množství
Deionizovaná voda	doplnění do objemu 50 μ l
10X pufr pro DNA polymerázu	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
přímý primer (0,1 mM)	1 μ l
reverzní primer (0,1 mM)	1 μ l
DNA polymeráza	2 jednotky
templátová DNA	200 ng - 1 μ g

Směs byla promíchána a stočena v centrifuze k odstranění bublinek vzduchu. Mikrozkuvka byla umístěna do PCR cykleru.

PCR reakce probíhala podle programu:

1. počáteční denaturace 94°C 3 minuty
2. 5 cyklů :
 - denaturace 94°C 1 minuta
 - nasedání primerů T_{m2} 0,5 minuty
 - syntéza DNA 72°C 1 minuta/1 kbp
3. 30 cyklů:
 - denaturace 94°C 1 minuta
 - nasedání primerů T_{m1} 0,5 minuty
 - syntéza DNA 72°C 1 minuta/ 1 kbp
4. konečné prodloužení 72°C 5 minut

Po skončení programu byla reakční směs zchlazena na 4°C. V případě odlišných teplot tání dvojice primerů pro PCR reakci byla užitá nižší z dvojice teplot. Výsledky PCR reakcí byly ověřovány pomocí horizontální agarózové elektroforézy.

3.2.2.7 Štěpení DNA restrikčními enzymy

Restrikce probíhala v mikrozkušavce obsahující restrikční směs o složení:

Komponenta	Množství
Deionizovaná voda	doplnění do 20 µl
Pufr pro příslušný restrikční enzym	2 µl
Restrikční endonukleáza	1 - 5 jednotek
Substrátová DNA	0,1 - 1 µg

Restrikční směs byla inkubována při 37°C v termobločku 1 - 2 hodiny. Po proběhnutí reakce byla restrikční endonukleáza inaktivována dle pokynů výrobce. Výsledky restrikčních reakcí byly ověřeny horizontální agarózovou elektroforezou.

3.2.2.8 Ligace restrikčních fragmentů

Ligace byly prováděny v tenkostěných mikrozkušavkách.

Složení ligační směsi:

Komponenta	Množství
Deionizovaná voda	doplněná do objemu 20 µl
Pufr pro T4 DNA ligázu	2 µl
Štěpený plazmid	0,1 - 0,5 µg
Inzert s kohezními konci	v dvojnásobném množství oproti počtu molekul plazmidu
T4 DNA ligáza	2 jednotky

Ligace probíhala přes noc v PCR cyklieru podle programu:

1. 16°C 50 minut
2. 20°C 3 minuty
3. 24°C 5 minut
4. 37°C 1 minuta

Po skončení ligace byla ligáza inaktivována dle pokynů výrobce.

Ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli DH5α*.

3.2.2.9 Sekvence DNA

DNA byla sekvenována v Laboratoři sekvence DNA (servisní pracoviště PŘF UK). Vzorky k osekvenování byly připraveny dle protokolu na stránkách laboratoře: <http://web.natur.cuni.cz/~seqlab/> .

Výsledky sekvence DNA byly analyzovány pomocí programu Chromas.

3.2.3 Stanovení aktivity β - galaktosidázy

K stanovení aktivity β - galaktosidázy byl použit upravený protokol vycházející z protokolu v katalogu Bacillus Genetic Stock Center (<http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>)

Kultivace a odběr vzorků:

1. Z tekuté kultury byly do mikrozkmavek odebrány vzorky o objemu 1 - 2 ml. Při odběrech byla zaznamenána optická denzita kultury OD₅₉₅ .
2. Vzorky byly centrifugovány rychlostí 15000 rpm po dobu 10 minut.
3. Po důkladném odstranění supernatantu byly vzorky neprodleně zamrazeny v tekutém dusíku a do provedení stanovení aktivity β - galaktosidázy uchovávány při - 20°C.

Stanovení aktivity β - galaktosidázy

1. Vzorky peletů byly resuspendovány v 0,64 ml Z pufu.
2. Poté byl přidán roztok lysozymu (2,5 mg/ml Z pufu) o objemu 0,16 ml a vzorky byly zvortexovány.

3. Následně byly vzorky inkubovány 20 minut v termobloku při 37°C a občas promíchány
4. Dále bylo k vzorkům přidáno 8 µl 10% Tritonu X100 a vzorky inkubovány na ledě 5 minut.
5. Debris z lyzovaných buněk byl peletován centrifugací 15 000 rpm 15 minut.
6. Supernatant přenesen do zkumavek ve vodní lázni. Temperován při teplotě 30°C po dobu 5 minut.
7. Přidáno 0,2 ml roztoku ONPG (4,0 mg/ml Z pufru). Inkubováno při 30°C a měřen čas reakce.
8. Po jemném zežloutnutí vzorků byla reakce zastavena přidáním 0,4 ml 1 M Na₂CO₃
9. Změřena absorbance A₄₂₀. Jako blank bylo smícháno 0,8 ml pufru Z, 0,4 ml 1 M Na₂CO₃ a 0,2 roztoku ONPG.
10. K výpočtu buněčné koncentrace β - galaktosidázy (v arbitrárních jednotkách) byl použit vzorec:

$$\begin{aligned} & \text{aktivita v Millerových jednotkách} \\ & = (1000 \times A_{420}) / (T(\text{doba reakce v minutách}) \times OD_{595}) \end{aligned}$$

3.2.4 Barvení podle Grama

1. na podložním skle bylo v malé kapce vody resuspendováno nepatrné množství bakteriální kultury
2. preparát fixován protažením skla plamenem
3. barveno krystalovou violetí přibližně 90 sekund
4. barvivo slito a okapáno opřením hrany skla o filtrační papír
5. sklo ponořeno do Lugolova roztoku na 60 sekund
6. oplachnuto a osušeno filtračním papírem
7. oplachnuto etanolem, 95%
8. dobarveno safraninem 80 sekund
9. opláchnuto vodou a osušeno

Preparáty prohlédnuty světelným mikroskopem při zvětšení 1000 krát s imerzí.

3.2.5 Barvení bakteriálních bičků Leifsonovou metodou

Metoda převzata z článku Staining, Shape and Arrangement of Bacterial Flagella (Leifson 1951).

Bakterie, které mají být barveny, mohou být kultivovány jak v tekutém, tak na pevném médiu.

U kultury z pevné půdy je nutné se vyvarovat přenesení zbytků agaru. Barví se buď přímo bakterie z pevné kultury resuspendované v destilované vodě, nebo po promytí, které se provádí stejně jako u kultury z tekutého média. U patogenních bakterií se přidává 5 - 10% formalín.

Příprava z tekutého média

1. ke kultuře se přidá 5- 10% formalin (patogenní bakterie), a naředí se destilovanou vodou
2. suspenze se zvortexuje a zcentrifuguje, slije se supernatant a zkumavka vypláchne od jeho zbytků destilovanou vodou
3. přidá se 1 - 2 ml destilované vody a bakterie se resuspendují
4. suspenze se zvortexuje a zcentrifuguje, slije se supernatant a zkumavka vyplachne od jeho zbytků destilovanou vodou
5. resuspendovat v 1 - 2 ml vody, a zředit na řídkou suspenzi, koonečná suspenze by měla být sotva ztelně zkalená
6. k neutralizaci kyselého formalinu je dobré přidat hydroxid sodný

Příprava podložních skel:

Čistá a odmaštěná podložní sklíčka jsou pro dobré barvení esenciální. Dá se použít koncentrovaná kyselina sírová saturovaná dichromanem draselným.

Připraví se koncentrovaný roztok dichromanu a ten se rozředí kyselinou. Při pokojové teplotě může čištění sklíček trvat několik dní až týden, při 70-80°C stačí nechat přes noc. Vyčištěná sklíčka je nutné důkladně omýt nejprve vodou z kohoutku a pak destilovanou (odstranění kyseliny). Pak se sklíčka suší na čistém povrchu.

Před samotným použitím se sklíčko protáhne plamenem a nechá vychladnout. A poté je na něj nanesena suspenze bakteriální kultury, která se nechá zaschnout.

Barvení preparátu:

Sklička jsou umístěná na rovnou podložku a je na ně nanášeno po 1 ml barvicího roztoku na každý preparát. Barvivo se nechá působit 5 - 15 minut, kratší dobu při čerstvém barvicím roztoku, teplém roztoku, vysoké okolní teplotě, při průvanu nebo tenké vrstvě barviva. Poté se sklička neprodleně opláchne vodou.

4. VÝSLEDKY

4.1 Příprava mutantního kmenu *Bacillus subtilis* s *in frame* delecí genu *yxkO*

Cíl: Připravit mutantní kmen s kompletní in frame delecí genu yxkO pomocí rekombinantního plazmidu pBGSC6-yxkO.

K doplnění a potvrzení předchozích výsledků získaných studiem mutantních kmenů s přerušným genem *yxkO* pomocí integračního plazmidu pMUTIN4, *Bacillus subtilis* MP2 (viz Petrovová 2010) a *Bacillus subtilis* ES091 (viz Streitová 2010), bylo se rozhodnuto vytvořit mutanta s delecí genu *yxkO* odvozenou od kmenu *Bacillus subtilis* 168. Účel tvorby tohoto mutanta bylo získání kmenu se zcela odstraněným genem *yxkO*, u kterého by bylo možno vyloučit jakoukoliv potenciální reziduální funkci přerušného genu. Použití metody přesných *in frame* delecí (bez posunu čtecího rámce) by také vylučovalo případný polární efekt inzerční mutace na okolní geny (Link *et al.*, 1997).

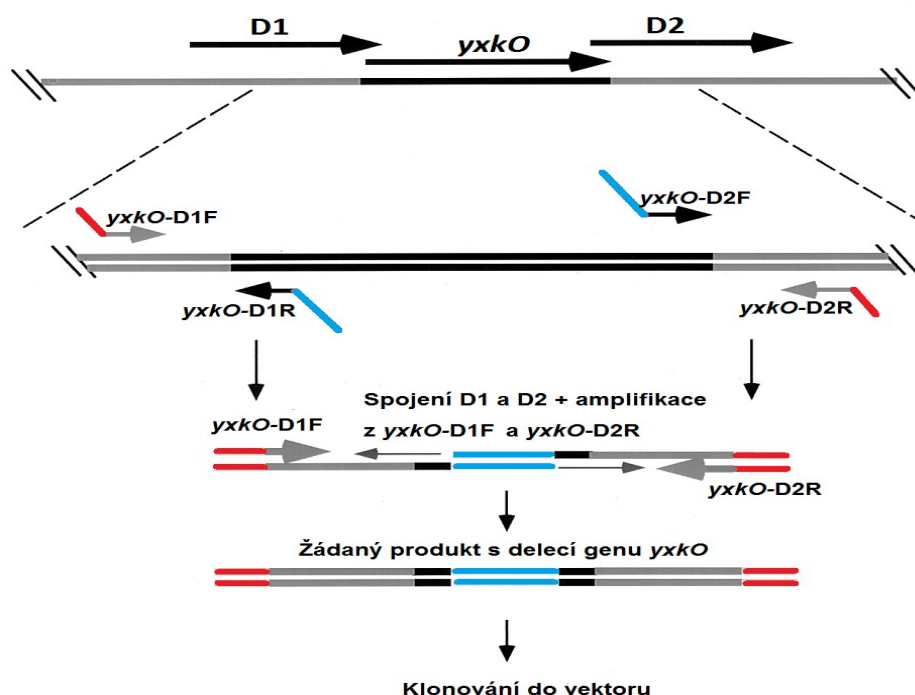
4.1.1 Příprava rekombinantního plazmidu pBGSC6-yxkO

V první fázi přípravy rekombinantního plazmidu byly pomocí PCR reakce (kap. 3.2.2.6) vytvořeny dva krátké DNA fragmenty D1 a D2 odpovídající sekvenčně oblastem ohraničujícím gen *yxkO* v genomu *Bacillus subtilis* 168. Ze spojení těchto fragmentů následně vznikl fragment obsahující delecí genu *yxkO*.

Fragment D1 byl vytvořen s pomocí dvojice primerů *yxkO*-D1F a *yxkO*-D1R, fragment D2 s použitím primerů *yxkO*-D2F a *yxkO*-D2R. Primery *yxkO*-D1R a *yxkO*-D2F obsahovaly na 3' respektive 5' konci vzájemně komplementární přesahy, sloužící k následnému spojení vzniklých PCR fragmentů. Primery *yxkO*-D1F a *yxkO*-D2R obsahovaly nástavce s restričními místy pro vložení výsledného fragmentu do klonovacího vektoru. Pro PCR reakci byla použita *Pfu* DNA polymeráza, která na rozdíl od *Taq* DNA polymerázy nepřidává na 3' konci adenin navíc, což by v tomto případě interferovalo s tvorbou přesné

delece bez posunu čtecího rámce. Další výhodou *Pfu* DNA polymerázy je také nižší frekvence chybovosti díky její 3'-5' exonukleázové aktivitě.

Po elektroforetické separaci a izolaci fragmentů D1 a D2 z agarózového gelu (kap. 3.2.2.3) bylo provedeno druhé PCR, probíhající ve dvou stupních. V prvním kroku byly smíchány fragmenty D1 a D2, které se po denaturaci díky komplementárním přesahům spolu spojily a v následující reakci byly takto vzniklé molekuly doplněny na dvojlátkovou DNA a vznikl cílový fragment nazvaný *yxkO-DEL*. V druhé fázi PCR reakce byly přidány vnější primery *yxkO-D1F* a *yxkO-D2R*, z nichž došlo k amplifikaci fragmentu *yxkO-DEL*.



Obr. 17. Schéma přípravy fragmentu *yxkO-DEL*.

Červeně označeny nástavce primeru s restrikčními místy.

Modře označeny komplementární sekvence primeru pro spojení fragmentů D1 a D2.

Fragment *yxkO-DEL* byl následně elektroforeticky separován a podroben restrikcím enzymy BamHI a EcoRI (kap. 3.2.2.7), mezi nimiž byl přečištěn chloroformovou precipitací (kap. 3.2.2.4). Tím vznikly kohezní konce pro klonování do plazmidu, který byl štepen stejnou dvojicí restriktaáz. Poté byl

rozštěpený plazmid s fragmentem *yxkO-DEL* ligován působením T4 DNA ligázy (kap. 3.2.2.8). Ligační směsí byly následně pomocí elektroporace transformovány buňky *Escherichia coli* DH5 α (kap. 3.2.1.7), které byly poté vysety na LB Petriho misku s ampicilinem (100 μ g/ ml).

Petriho misky byly inkubovány při 37°C přes noc. Bohužel na miskách nevyrostla ani jedna kolonie transformovaných bakterií. Transformace elektroporací byla několikrát zopakována. Byla ověřena viabilita používaných buněk i jejich schopnost přijmout cizí DNA (prázdný plazmid pBGSC6), v obou případech s kladným výsledkem. Ovšem transformace ligační směsí byla nadále neúspěšná. Proto bylo rozhodnuto použít transformaci teplotním šokem (Heat shock)(kap. 3.2.1.5). Bohužel rovněž tato metoda nepřinesla pozitivní výsledek. Podařilo se získat několik transformantů, u nichž ovšem nebyl po izolaci plazmidové DNA (kap. 3.2.2.2.1) nalezen hledaný rekombinantní plazmid.

4.2 Příprava kmenů rodu *Bacillus* s přerušením genu *yxkO*

Cíl: Pomocí rekombinantního plazmidu pMUTIN4-yxkO připravit sadu mutantních kmenů rodu Bacillus s přerušením genu yxkO lišících se genetickým okolím tohoto genu a také úrovní laboratorní "domestikace".

Po neúspěšné přípravě delečního mutantu v genu *yxkO*, byl zvolen alternativní postup. Místo testování projevu kompletní delece genu *yxkO* v mutantním kmenu odvozeném od kmenu *Bacillus subtilis* 168 bylo rozhodnuto připravit mutantní kmeny s disrupcí genu *yxkO* plazmidem pMUTIN4 u dalších druhů rodu *Bacillus*. Byl vybrán kmen lišící se bezprostředním okolím genu *yxkO* *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (10A6) a kmen blízce příbuzný původnímu studovanému kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 lišící se od něj mírou takzvané "laboratorní domestikace" kmen *Bacillus subtilis* subs. *spizizenii* TU-B-10^T (2A11) představující čerstvý environmentální izolát ze Saharské pouště (srovnání kmenů viz kap. 4. 5.). Tento výběr dovolil porovnat projev disrupce *yxkO* v závislosti na relativní domestikaci kmenu a na rozdílném genetickém pozadí.

4.2.1 Příprava rekombinantního plazmidu pMUTIN4-yxkO

Konstrukt pMUTIN4 - *yxkO* byl převzat z předchozí práce Elišky Streitové (detailní popis viz Streitová 2010).

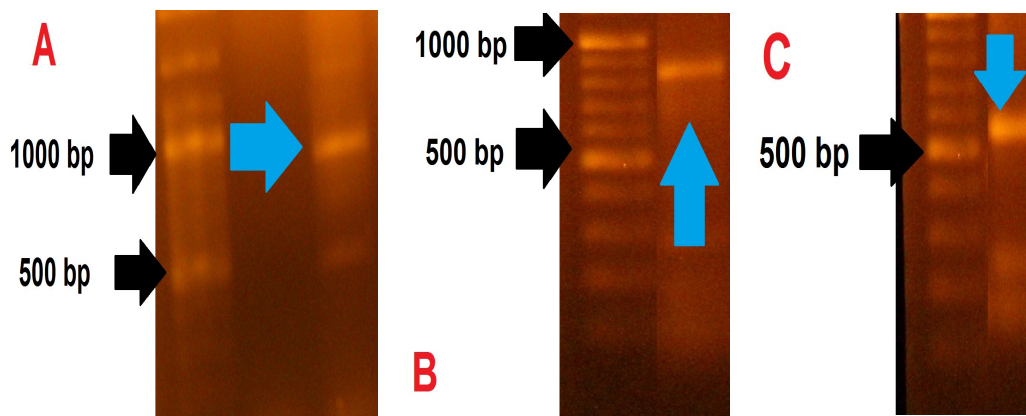
Převzatý konstrukt byl namnožen transformováním do kompetentních buněk *Escherichia coli* (kap. 3.2.1.5). Z vybraných přes noc narostlých kolonií, které byly zároveň označeny a přečárkovány na novou Petriho misku, byla nejprve izolována metodou minipreparace plazmidová DNA (kap. 3.2.2.2.1) a porovnána s prázdným plazmidem pMUTIN4 pomocí restrikční analýzy enzymy PstI a SacI (kap. 3.2.2.7) . Následně po ověření, že se jedná o žádaný konstrukt byl z vybraných přečárkovaných kolonií, po namnožení bakterií v tekuté kultuře, izolován tento plazmid pomocí komerční sady GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) (kap. 3.2.2.2.2).

4.2.2 Transformace kmenů rodu *Bacillus* rekombinantním plazmidem

Vyizolovaným rekombinantním plazmidem byly transformovány připravené kompetentní buňky (kap. 3.2.1.8 a 3.2.1.9) kmenů *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (10A6) a *Bacillus subtilis* subs. *spizizenii* TU-B-10^T (2A11). Transformované buňky byly vysety na Petriho misky s LB médiem a erytromycinem (0,3 µg/ml) a kultivovány přes noc při 37°C.

4.2.3 Ověření integrace rekombinantního plazmidu do chromozomu recipientních kmenů

Z narostlých kolonií bylo několik vybráno, označeno a rozčárkováno na nové agarové půdy s erytromycinem (0,3 µg/ml). Z vybraných kolonií byly naočkovány tekuté noční kultury a z nich pomocí komerční sady MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit následně izolovány vzorky chromozomálních DNA (kap. 3.2.2.1). Vyizolovaná chromozomální DNA byla použita jako templát pro PCR reakci (kap. 3.2.2.6) k ověření integrace rekombinantního plazmidu do chromozómu transformovaných kmenů. Byly použity dvojice primerů *mutinR/yxkOSDF* a *mutinF/yxkOR2*. Mutantní kmen odvozený od kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (10A6) byl pojmenován JTAM a mutantní kmen odvozený od kmenu *Bacillus subtilis* subs. *spizizenii* TU-B-10^T (2A11) byl pojmenován JTSP. K transformovaným kmenům byl přibrán i kmen MP2 odvozený od *Bacillus subtilis* 1A680, připravený již dříve Mirkou Petrovovou nesoucí také přerušení genu *yxkO* plazmidem pMUTIN4 (Petrovova 2010). I z kmenu MP2 byla izolována chromozomální DNA a ověřena přítomnost integrovaného plazmidu pMUTIN4 v genu *yxkO*.



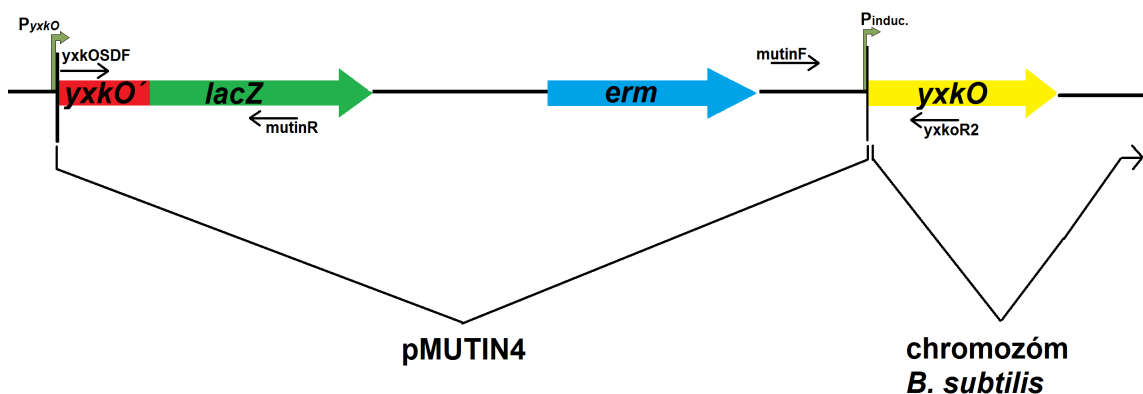
Obr. 18. Ověření integrace pMUTIN4 do chromozómů kmenů JTSP, MP2 a JTAM

A - JTSP: ověření PCR reakcí z primerů *mutinR* a *yxkOSDF*, žádaný produkt o délce 850 bp označen modrou šipkou.

B - MP2: ověření PCR reakcí z primerů *mutinR* a *yxkOSDF*, žádaný produkt o délce 850 bp označen modrou šipkou.

C - JTAM: ověření PCR reakcí z primerů *mutinF* a *yxkOR2*, žádaný produkt o délce přibližně 600 bp označen modrou šipkou.

Správnost integrace byla ještě ověřena sekvenací (kap. 3.2.2.9).



Obr. 19. Schéma integrace plazmidu pMUTIN4 do genu *yxkO* v chromozómu *Bacillus subtilis*.

Za přirozenou regulační oblastí genu *yxkO* obsahující promotor P_{yxO} je přiřazen gen pro β - galaktosidázu (*lacZ*), který umožňuje studium aktivity tohoto promotoru. Strukturní část genu *yxkO* je pak pod kontrolou indukovatelného promotoru $P_{induc.}$. Černými šipkami jsou znázorněny nasedací místa primerů použitých pro ověření integrace do chromozómu.

4.3 Studium fyziologických vlastností mutantních a divokých kmenů

*Cíl: Porovnat fyziologické a morfologické vlastnosti mutantních kmenů s přerušením genu *yxkO* B. subtilis subtilis 1A680, B. subtilis subsp. spizizenii 2A11 a B. amyloliquefaciens 10A6 a kmenů od nichž byly odvozeny.*

4.3.1 Růst na pevném médiu

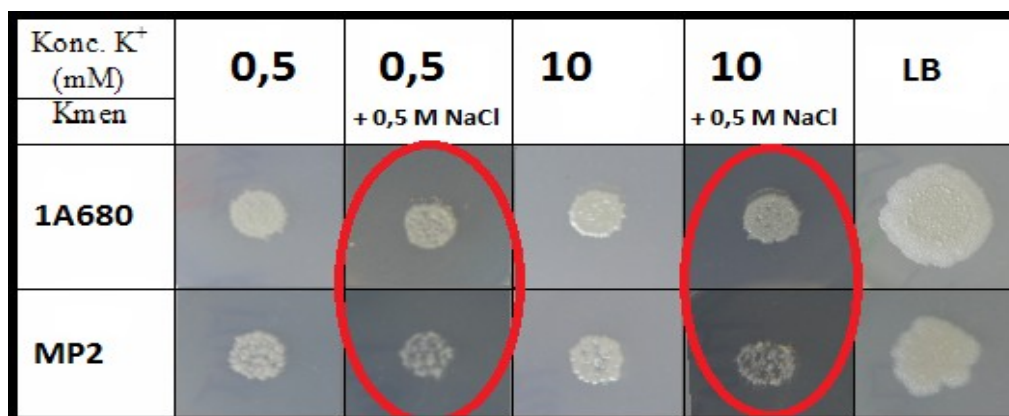
V předchozích pracích provedených v naší laboratoři byl při kultivaci na pevných médiích pozorován rozdíl růstových vlastností mezi divokými kmeny a od nich odvozenými kmeny s mutací v genu *yxkO*. Rozdíl byl znatelný zejména na minerálním médiu v hyperosmotických podmínkách a za limitní koncentrace draselných iontů, kdy mutantní kmen oproti divokému vykazoval pomalejší růst (Ulanova 2007, Streitová 2010, Petrovová 2010).

Pro srovnání růstových vlastností kolonií mutantních kmenů *B. subtilis subtilis MP2*, *B. subtilis subsp. spizizenii JTSP* a *B. amyloliquefaciens JTAM* s kmeny divokými *B. subtilis subtilis 1A680*, *B. subtilis subsp. spizizenii 2A11* a *B. amyloliquefaciens 10A6* bylo použito pět druhů pevných médií:

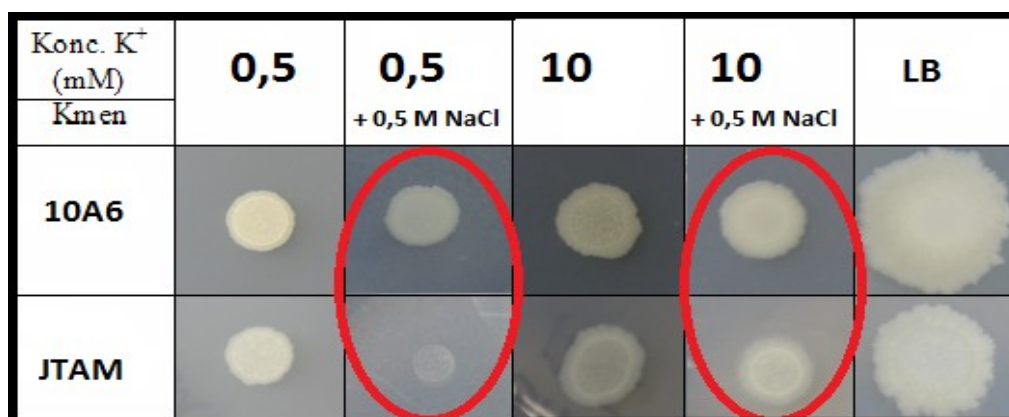
- komplexní médium LB
- minerální médium K 0,5 obsahující 0,5 mM koncentraci draselných iontů
- minerální médium K 0,5 obsahující 0,5 mM koncentraci draselných iontů, s přídavkem 0,5 M NaCl
- minerální médium K 10 obsahující 10 mM koncentraci draselných iontů
- minerální médium K 10 obsahující 10 mM koncentraci draselných iontů, s přídavkem 0,5 M NaCl

Bakteriální kmeny byly kultivovány v LB médiu při 37°C do optické denzity $OD_{450}=0,2$. Následně byly bakteriální kultury naředěny 100x destilovanou vodou. Naředěné kultury byly nakapány po 10 μ l v triplikátech na Petriho misky s pevnými médii a inkubovány při 37°C v termostatu.

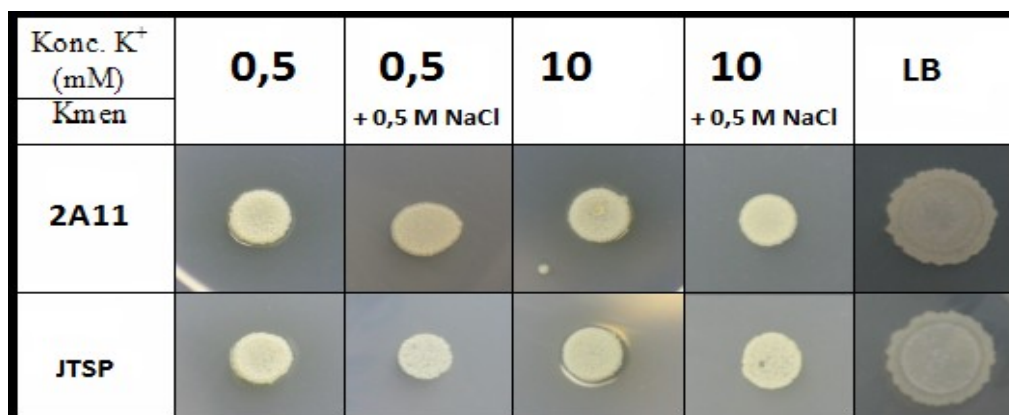
Po 24 hodinách byly narostlé kolonie porovnány a fotograficky zdokumentovány.



Obr. 20. Srovnání růstu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis* 1A680 na pevném médiu po 24 hodinách.



Obr. 21. Srovnání růstu mutantního a divokého kmenu *B. amyloliquefaciens* 10A6 na pevném médiu po 24 hodinách.



Obr. 22. Srovnání růstu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 na pevném médiu po 24 hodinách.

U mutantního kmenu MP2 byl oproti divokému kmenu 1A680 pozorován celkově snížený růst nejvíce znatelný za podmínek limitující koncentrace draslíku spojené s osmotickým šokem a rovněž za podmínek nelimitující koncentrace draslíku spojené s osmotickým šokem.

Mutantní kmen JTAM se projevoval obdobně jako kmen MP2 sníženým růstem, který byl nejpatrnější rovněž za podmínek osmotického šoku na médiích jak s limitující, tak nelimitující koncentrací draselných iontů.

Naopak u mutantního kmenu JTSP odvozeného od čerstvého přírodního izolátu *B. subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 nebyly pozorovány žádné větší rozdíly v růstu oproti kmenu divokému od něžž byl odvozen.

Bakterie byly dále inkubovány v termostatu při 37°C a znovu fotograficky zdokumentovány po 72 hodinách od naočkování na Petriho misky.

Konc. K ⁺ (mM)	0,5	0,5	10	10	LB
Kmen		+ 0,5 M NaCl		+ 0,5 M NaCl	
1A680					
MP2					

Obr.23. Srovnání růstu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis* 1A680 na pevném médiu po 72 hodinách.

Konc. K ⁺ (mM)	0,5	0,5	10	10	LB
Kmen		+ 0,5 M NaCl		+ 0,5 M NaCl	
10A6					
JTAM					

Obr. 24. Srovnání růstu mutantního a divokého kmenu *B. amyloliquefaciens* 10A6 na pevném médiu po 72 hodinách.

Konc. K ⁺ (mM)	0,5	0,5	10	10	LB
Kmen		+ 0,5 M NaCl		+ 0,5 M NaCl	
2A11					
JTSP					

Obr. 25. Srovnání růstu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 na pevném médiu po 72 hodinách.

Po 72 hodinách nebyl pozorován mezi koloniemi mutantního kmenu MP2 a divokého kmenu 1A680 znatelný rozdíl. Původní rozdíl velikosti a buněčné hustoty kolonií znatelný po 24 hodinách nebyl patrný.

U kolonií kmenů JTAM a 10A6 byl výsledek obdobný s tím rozdílem, že na médiu s limitujícím draslíkem a osmotickým šokem si mutantní kmen JTAM udržel poněkud subtilnější fenotyp.

Kmeny 2A11 a JTSP pak již nevykazovaly žádný viditelný rozdíl. U těchto kmenů došlo také k rozvinutí komplexní architektury kolonií typické pro prostředí čerstvě izolované kmeny rodu *Bacillus*. Přesná funkce struktur na povrchu takovýchto kolonií není známá předpokládá se, že jde o preferenční místa tvorby spór.

4.3.2 Citlivost k tetracyklinu

Cíl: Porovnat citlivost k tetracyklinu divokých kmenů rodu Bacillus a od nich odvozených mutantních kmenů s přerušením genu yxkO.

Schopnost antiporteru TetA(L) transportovat draselné ionty a jeho role v životaschopnosti bakterií za limitující koncentrace draselných iontů (Wang *et al.*, 2000) byla motivací otestovat resistenci k tetracyklinu u mutantních kmenů s přerušením genu *yxkO*.

Již v dřívější práci Mirky Petrovové byla zjištěna nižší hodnota minimální inhibiční koncentrace tetracyklinu na minerálním médiu K 0,5 u mutantního kmenu MP2 s přerušením genu *yxkO* oproti kmenu divokému (Petrovová 2010). Proto bylo rozhodnuto studovat u připravených mutantních kmenů míru resistance k tetracyklinu metodou měření šířky inhibičních zón.

Bakteriální kmeny byly kultivovány v tekutém LB médiu do optické denzity $OD_{450} = 0,4$, poté byly suspenze kultur naočkovány a rovnoměrně rozetřeny na agarové půdy. Doprostřed každé z Petriho misek byl neprodleně umístěn disk napuštěný tetracyklinem. Po 24 hodinové kultivaci byly změřeny šířky inhibičních zón (Tabulka 2).

	1A680	MP2	10A6	JTAM	2A11	JTSP
LB	2,4	2,5	3,2	3,6	4,2	4,5
K 10	2,4	2,5	4	4,5	4,2	4,5
K 10 + NaCl	2,4	2,9	4,5	4,8	4,5	4,2
K 0,5	2,2	2,8	4	4,5	4,5	4
K 0,5 + NaCl	2,2	3,2	4,5	4,5	4,5	4,2

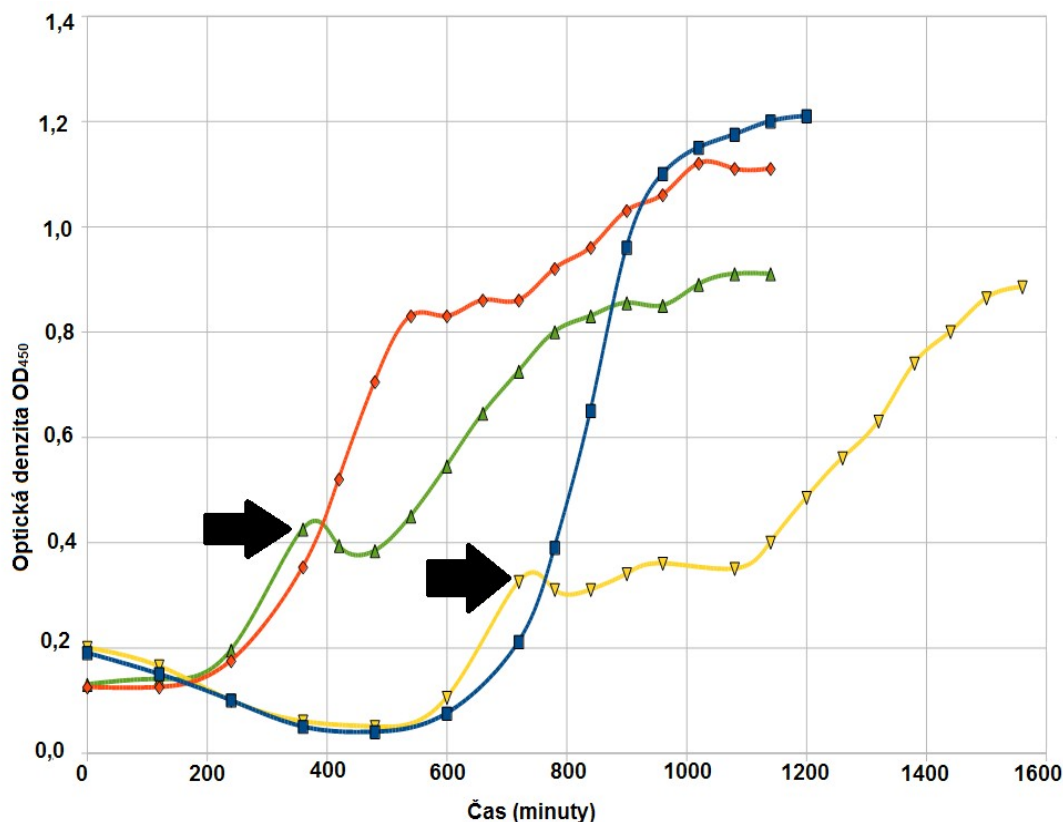
Tabulka 2. Šířka inhibičních zón citlivosti k tetracyklinu.

Šířka inhibičních zón v cm.

4.3.3 Růst v tekutém médiu s limitní koncentrací draslíku a při osmotickém šoku

Při růstu na pevném médiu byl pozorován rozdíl v růstových vlastnostech mutantních kmenů oproti kmenům divokým, a to zejména na minerální médiu s limitující koncentrací draselných iontů a za osmotického šoku (viz kap. 4. 3. 1.). Studium růstu v tekutém médiu mělo za úkol komplexněji popsat tento rozdíl.

Bakteriální kmeny byly vyočkovány na Petriho misky s LB médiem a při 37°C kultivovány v termostatu přes noc. Z pevného média byly kmeny inokulovány do vytemperovaného tekutého LB média a inkubovány za aerace při 37°C do optické denzity $OD_{450}=0,4 - 0,6$. Po té byly kultury přeočkovány na optickou denzitu $OD_{450}=0,1- 0,2$ do vytemperovaného minerálního média K 0,5 s koncentrací draselných iontů rovnou 0,5 mM a kultivovány při 37°C. Po dosažení optické denzity $OD_{450}=0,4 - 0,6$ byl každý kmen přeočkován do dvou Erlenmayerových baněk s vytemperovaným minerálním médiem K 0,5. Kmeny byly paralelně kultivovány do optické denzity $OD_{450}=0,4$, kdy byla jedna ze dvou kultivací vystavena osmotickému šoku přidáním NaCl na koncentraci 0,5 mol/l. V pravidelných intervalech byla měřena optická denzita kultur a z provedených měření sestavena růstová křivka. Média pro mutantní kmeny navíc obsahovala erytromycin (0,3 µg/ml).



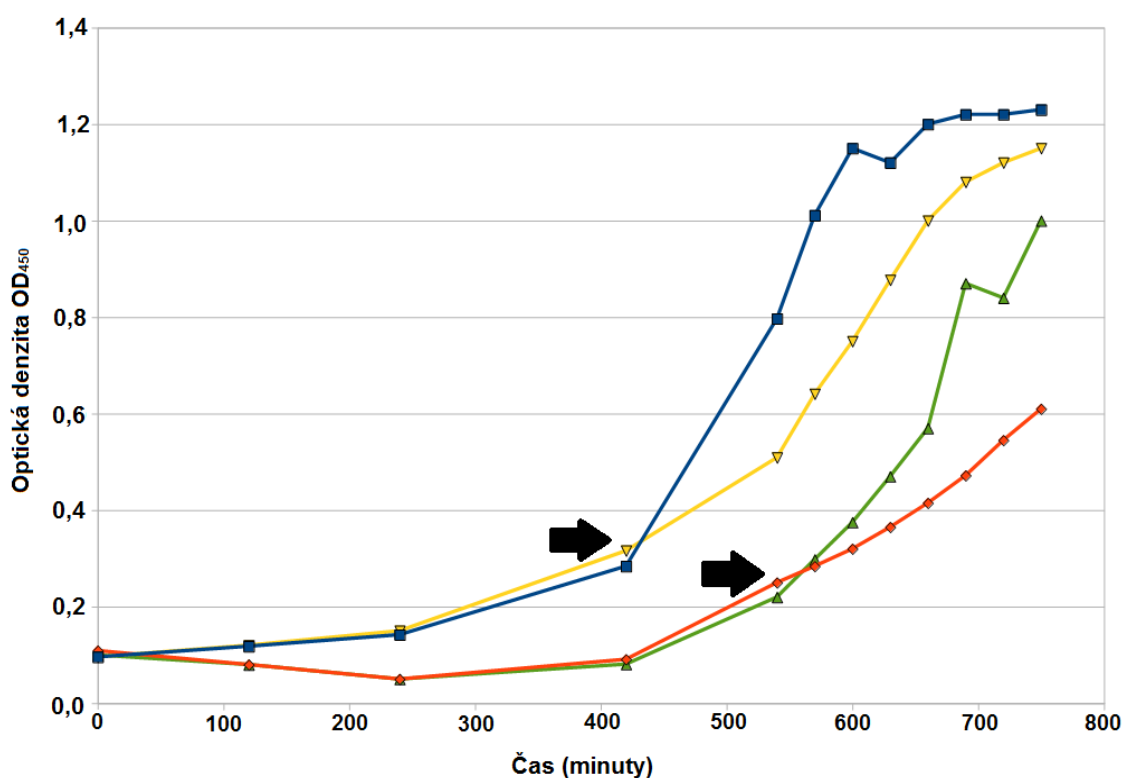
Obr. 26. Růstové křivky *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 a JTAM

Legenda:

- červeně - růstová křivka kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 (wt) bez vystavení osmotickému šoku
- zeleně - růstová křivka kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 (wt) vystaveného přibližně v $OD_{450} = 0,4$ (označeno černou šipkou) osmotickému šoku přidáním roztoku 5 M NaCl na koncentraci 0,5 mol/l.
- modře - růstová křivka kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* JTAM (mut) bez vystavení osmotickému šoku
- žlutě - růstová křivka kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* JTAM (mut) vystaveného přibližně v $OD_{450} = 0,4$ (označeno černou šipkou) osmotickému šoku přidáním roztoku 5 M NaCl na koncentraci 0,5 mol/l.

Při srovnání kinetiky růstu divokého kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 s od ním odvozeným mutantním kmenem JTAM s disrupcí genu *yxkO* byl patrný rozdíl zejména v lag fázi růstové křivky. Oproti divokému kmenu jehož lag fáze

po naočkování do čerstvého média trvala zhruba 200 minut se u kmenu mutantního prodloužila až na trojnásobek. Stejně tak byla u mutantního kmenu trojnásobná i lag fáze po vystavení osmotickému šoku. V růstových rychlostech se mutantní kmen a divoký příliš nelišily. Tyto zjištění korelují s pozorováním růstu na pevném médiu. Dlouhá lag fáze je vysvětlením v rozdílu nárůstů kolonií po 24 hodinách a vymizení rozdílu po delší kultivaci.

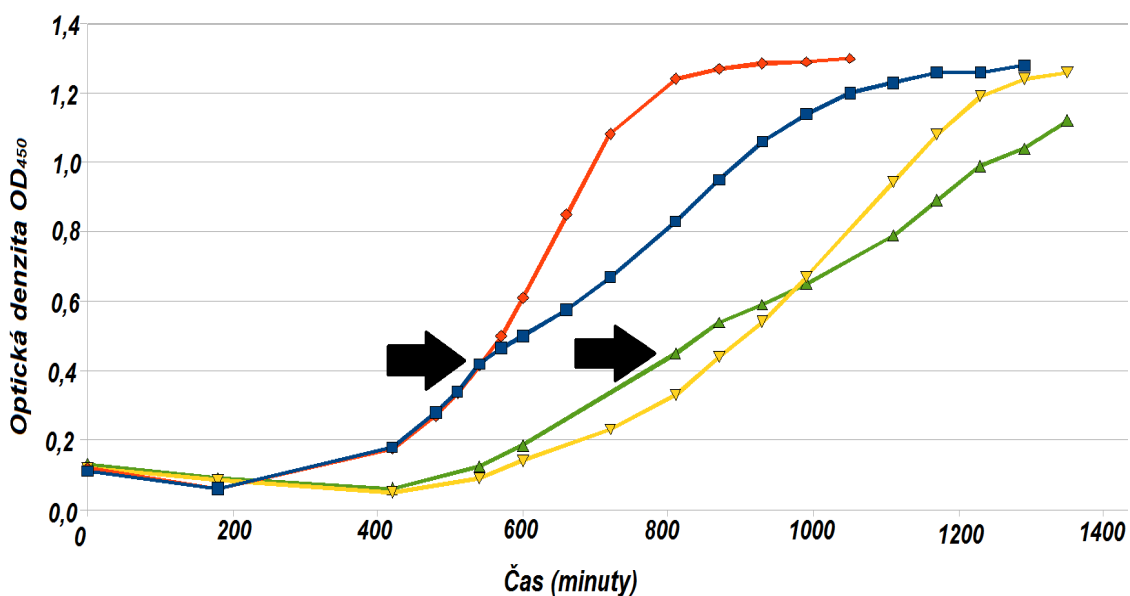


Obr. 27. Růstové křivky *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 a JTSP

Legenda:

- modře - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 (wt) bez vystavení osmotickému šoku
- žlutě - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 (wt) vystaveného přibližně v $OD_{450} = 0,4$ (označeno černou šipkou) osmotickému šoku přidáním roztoku 5 M NaCl na koncentraci 0,5 mol/l.
- zeleně - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* JTSP (mut) bez vystavení osmotickému šoku
- červeně - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* JTSP (mut) vystaveného přibližně v $OD_{450} = 0,4$ (označeno černou šipkou) osmotickému šoku přidáním roztoku 5 M NaCl na koncentraci 0,5 mol/l.

I v případě mutantního kmenu odvozeného od *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 se projevila horší schopnost adaptace po přeočkování do nového média manifestovaná prodlouženou lag fází oproti lag fázi divokého kmenu. Rozdíl od divokého a mutantního kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 a JTAM nebyl rozdíl tak výrazný. Lag fáze byla poměrně dlouhá i u divokého kmenu (cca 350 minut) a relativní prodloužení lag fáze u mutantního kmenu dosáhlo zhruba jen jedenapůlnásobku (tedy cca 500 minut). Ještě menší rozdíl v kinetice růstu mutantního a divokého kmenu se projevil po osmotickém šoku, kdy byly lag fáze v obou případech velice krátké. Tato zjištění odpovídají výsledkům při testování růstu na pevném médiu, kdy nebyl pozorován signifikantní rozdíl růstu mutantního a divokého kmenu.



Obr. 28. Růstové křivky *Bacillus subtilis* 1A680 a MP2

Legenda:

- červeně - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 (wt) bez vystavení osmotickému šoku
- modře - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 (wt) vystaveného přibližně v $OD_{450} = 0,4$ (označeno černou šipkou) osmotickému šoku přidáním roztoku 5 M NaCl na koncentraci 0,5 mol/l.
- zeleně - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* MP2 (mut) bez vystavení osmotickému šoku
- žlutě - růstová křivka kmenu *Bacillus subtilis* MP2 (mut) vystaveného přibližně v $OD_{450} = 0,4$ (označeno černou šipkou) osmotickému šoku přidáním roztoku 5 M NaCl na koncentraci 0,5 mol/l.

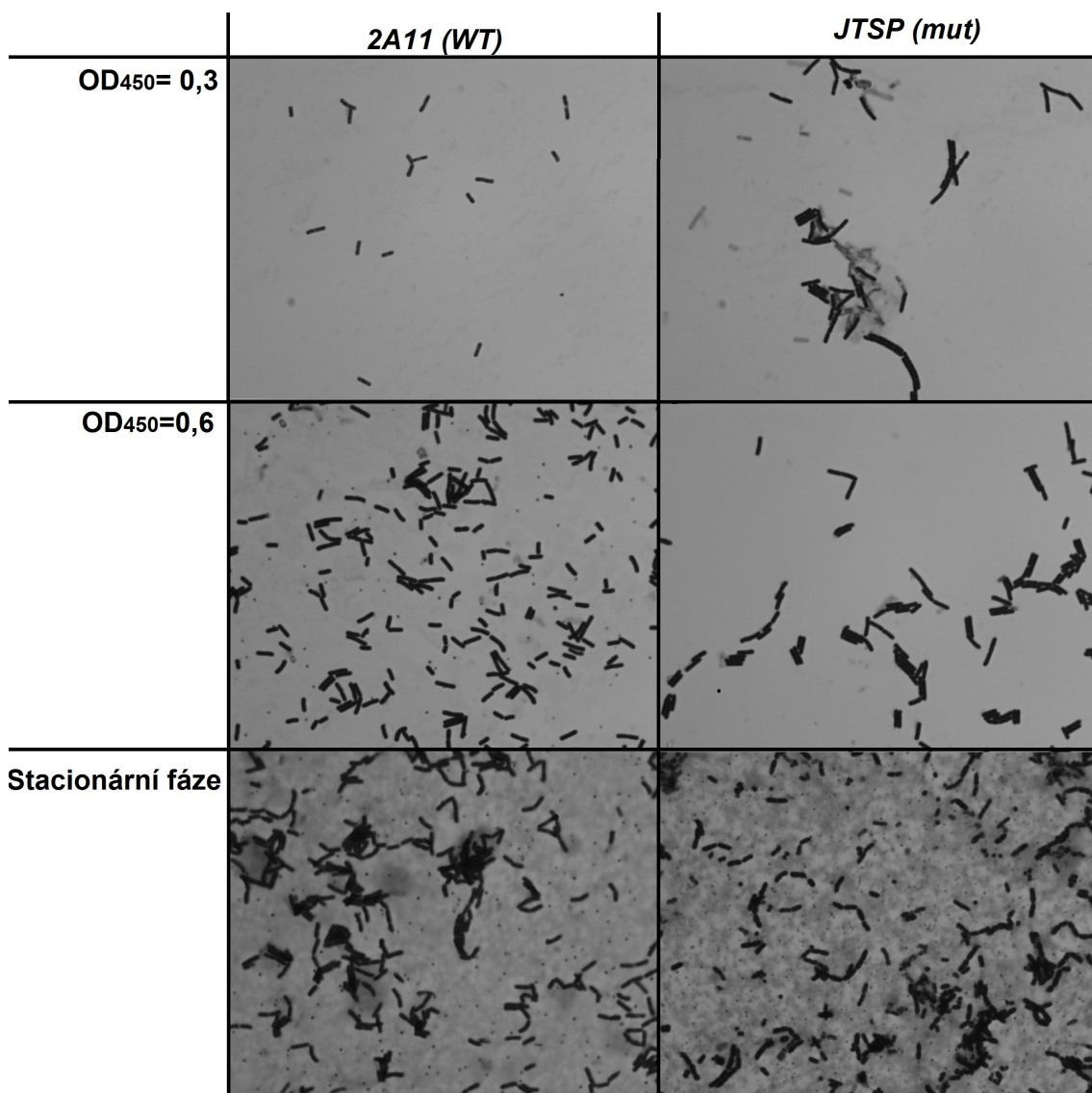
U mutantního kmenu MP2 byla jako u předchozích mutantních kmenů rovněž oproti kmenu divokému prodloužena lag fáze po přeočkování do čerstvého minerálního média zhruba 1,5 krát. Při vystavení osmotickému šoku se ovšem neobjevila dlouhá lag fáze jako v případě mutantního kmenu odvozeného od *Bacillus amyloliquefaciens*, došlo ovšem k zpomalení růstu kultury jak u mutantního, tak divokého kmenu.

4.3.4 Morfologie buněk při růstu v tekutém médiu - Gramovo barvení

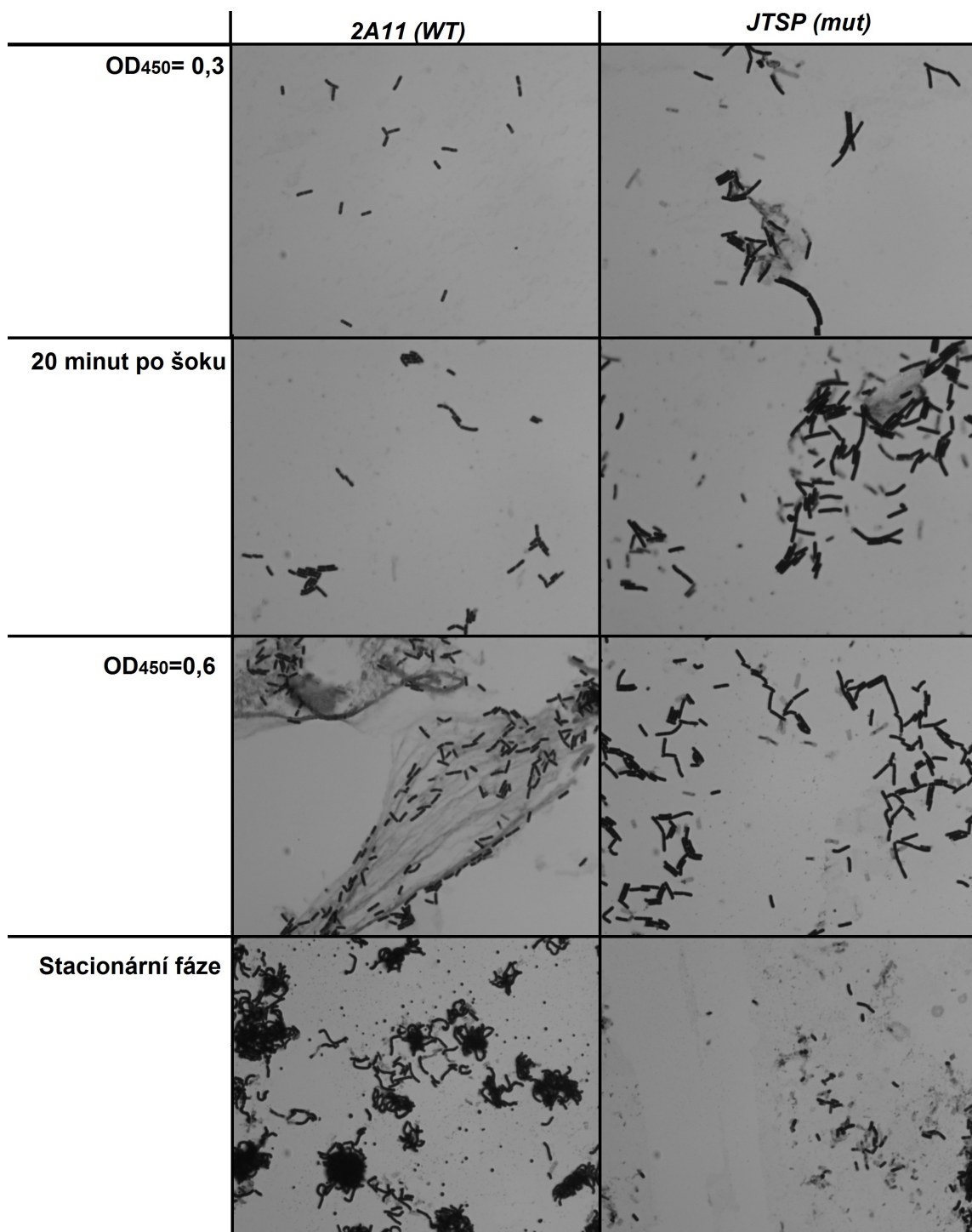
*Cíl: Zjistit jestli a případně jak se projevuje přerušení genu *yxkO* na úrovni morfologie jednotlivých buněk.*

Bakteriální kmeny napěstované přes noc na Petriho miskách s LB médiem byly inokulovány pomocí sterilního páratka do tekutého LB média a za aerace pěstovány při 37°C do optické denzity $OD_{450}=0,4 - 0,6$. Po té byly kmeny přeočkovány na optickou denzitu $OD_{450}=0,1 - 0,2$ do minerálního média K 0,5 (limitující draslík) a kultivovány do $OD_{450}=0,4 - 0,6$ a přeočkovány každý kmen do dvou Erlenmayerových baněk s minerálním médiem K 0,5. Jedna ze dvou paralelně kultivovaných kultur byla vystavena přibližně v $OD_{450}=0,4$ osmotickému šoku pomocí přidaného NaCl z 5 M zásobního roztoku na konečnou koncentraci 0,5 mol/l. Média pro mutantní kmeny navíc obsahovala erytromycin (0,3 µg/ml).

Z tekutých kultur byly odebrány vzorky na přípravu preparátu k barvení podle Grama (kap. 3.2.4). Preparáty byly zhotoveny pro nešokovanou kulturu z odběrů v optické denzitě $OD_{450}=0,4$, $OD_{450}=0,6$ a ze stacionární fáze. V případě kultur vystavených osmotickému šoku byly preparáty zhotoveny z odběru 20 minut po osmotickém šoku, z odběru v $OD_{450}=0,6$ a ze stacionární fáze. Preparáty byly prohlédnuty světelným mikroskopem a fotograficky zdokumentovány.



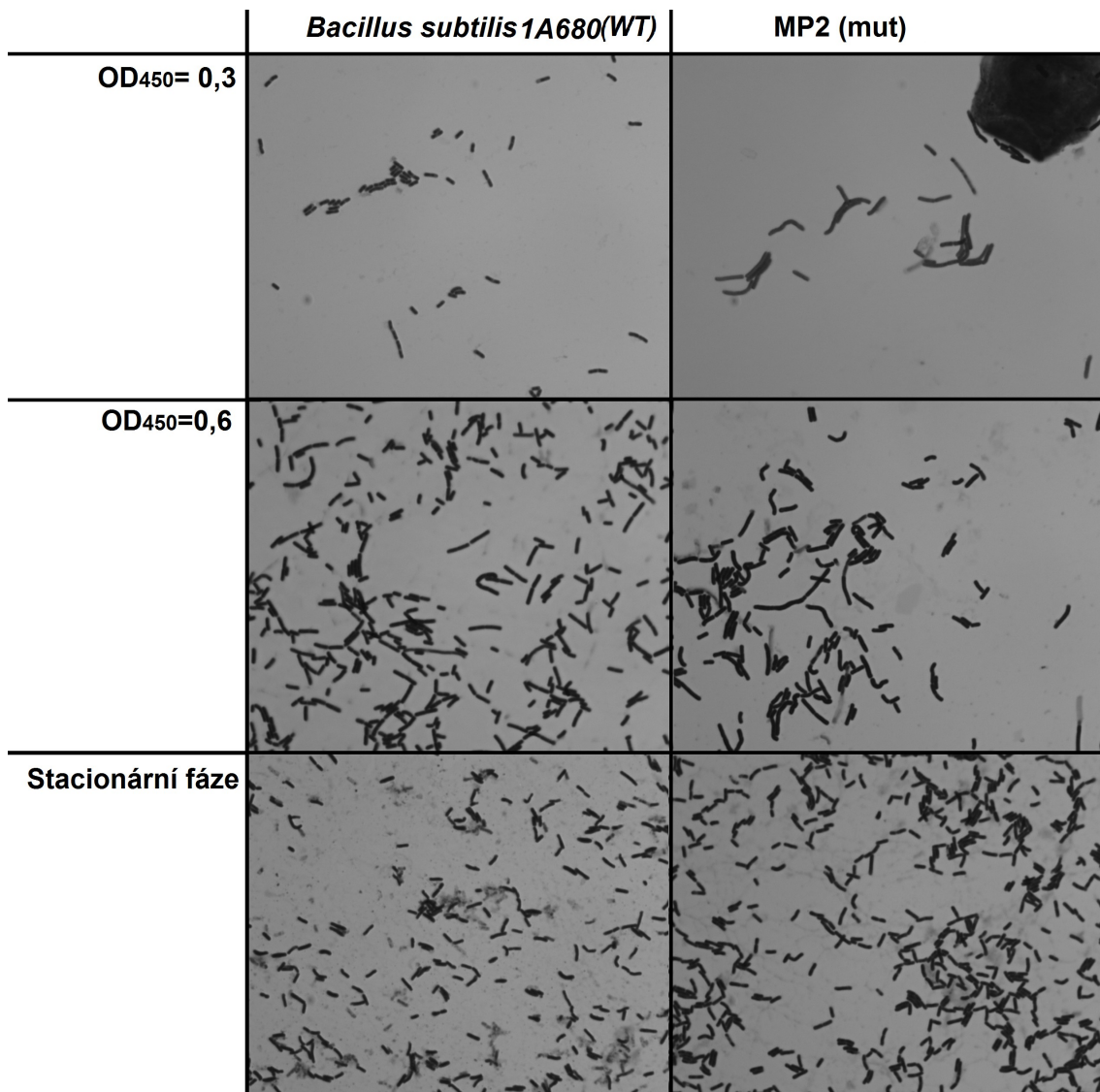
Obr. 29. Srovnání kmenů *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 a JTSP růst bez osmotického šoku, preparáty barveny podle Grama



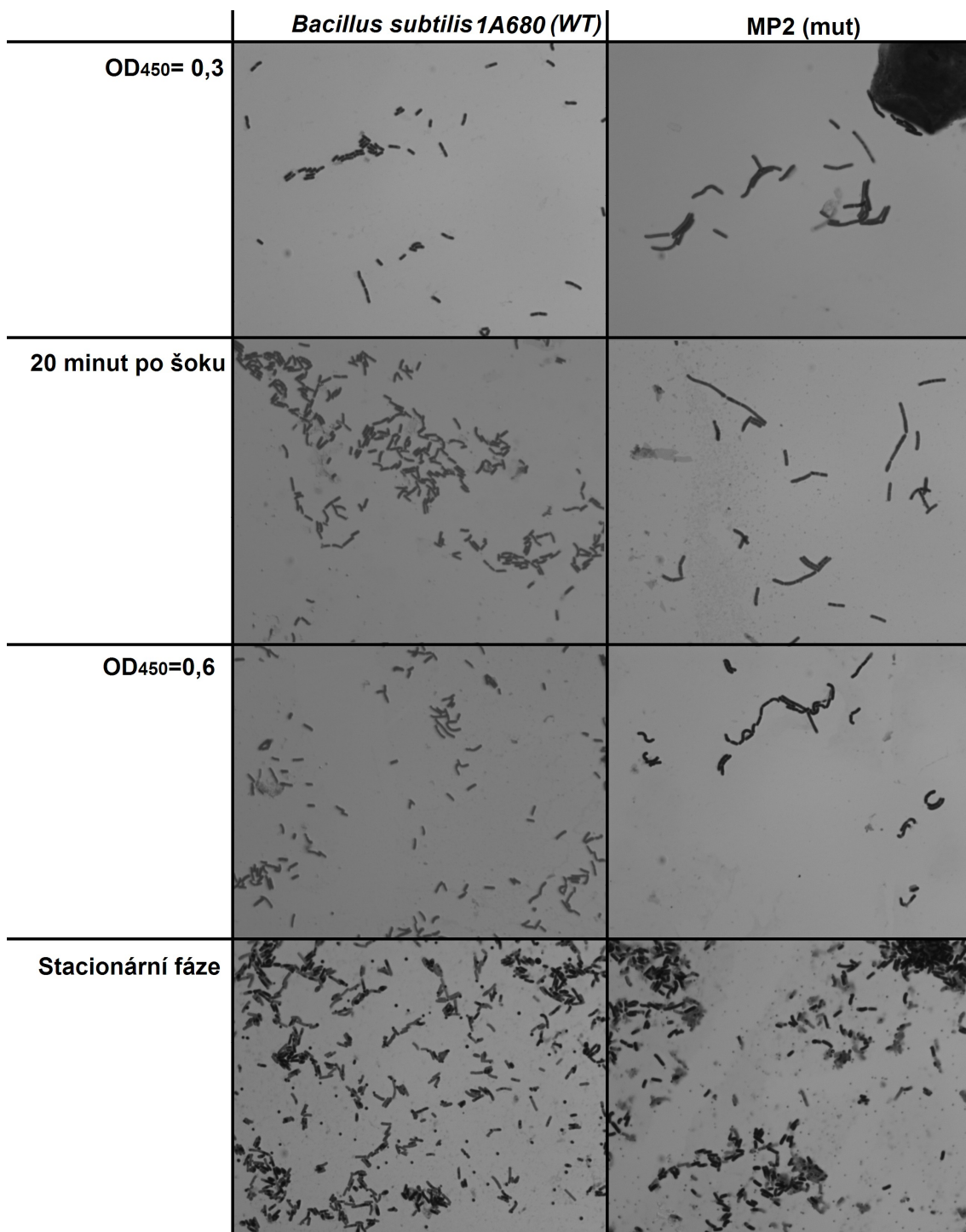
Obr. 30. Srovnání kmenů *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 a JTSP po vystavení osmotickému šoku, preparáty barveny podle Grama.

Během kultivace bez osmotického šoku si udržovaly bakteriální buňky *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 konstantní velikost, při vystavení osmotickému šoku se velikost buněk výrazně nezměnila, v stacionární fázi se začaly objevovat agregáty buněk.

Buňky mutantního kmenu JTSP při kultivaci bez osmotického šoku byly znatelně delší než buňky příslušného divokého kmenu, v stacionární fázi vymizely delší buňky a velikost buněk odpovídala divokému kmenu. Při vystavení osmotickému šoku byly buňky kmenu JTSP výrazněji delší než u divokého kmenu. Ve stacionární fázi nebyl velikostní rozdíl tolik znatelný.

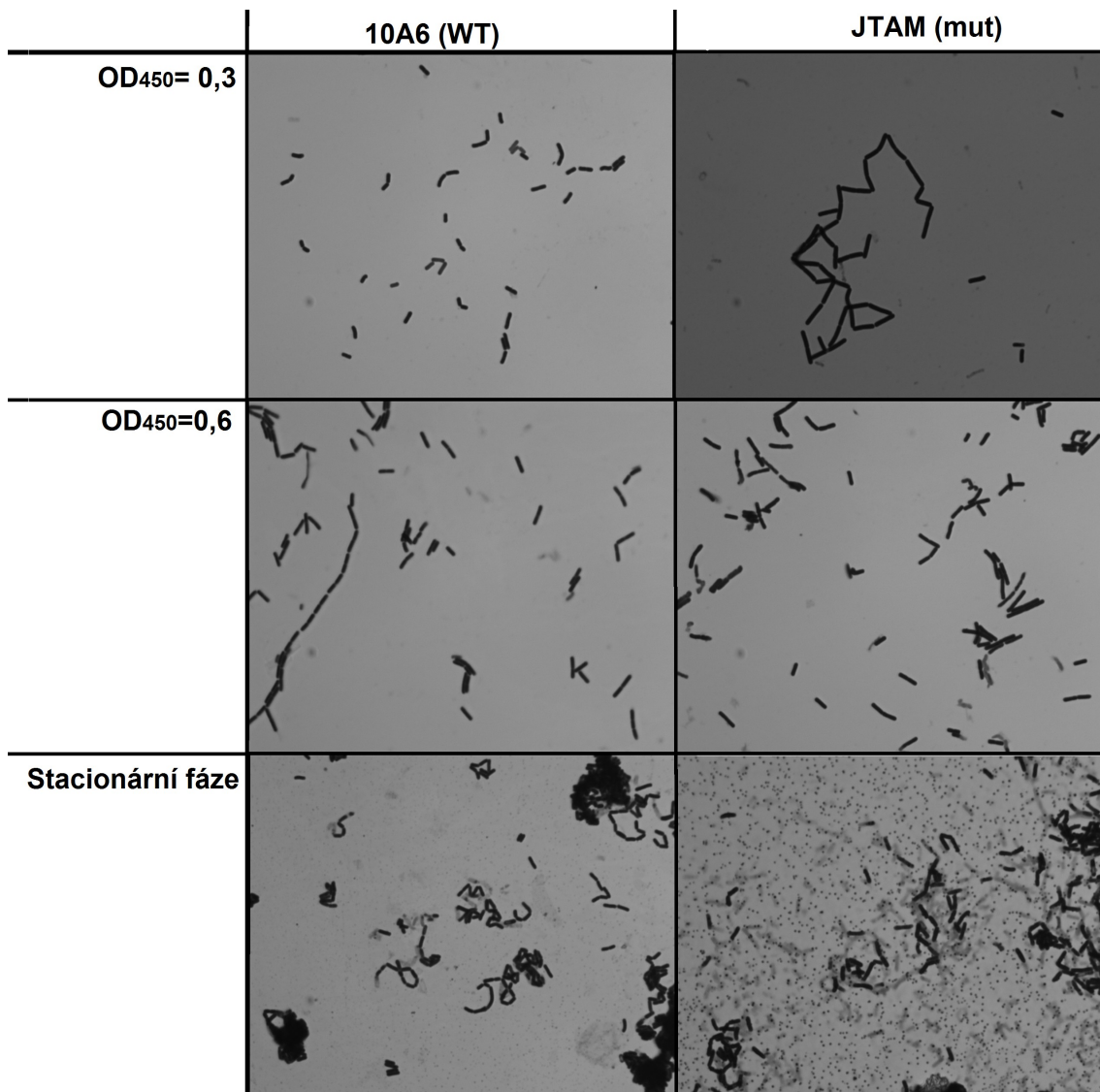


Obr. 31. Srovnání kmenů *Bacillus subtilis* 1A680 a MP2 růst bez osmotického šoku, preparáty barveny podle Grama

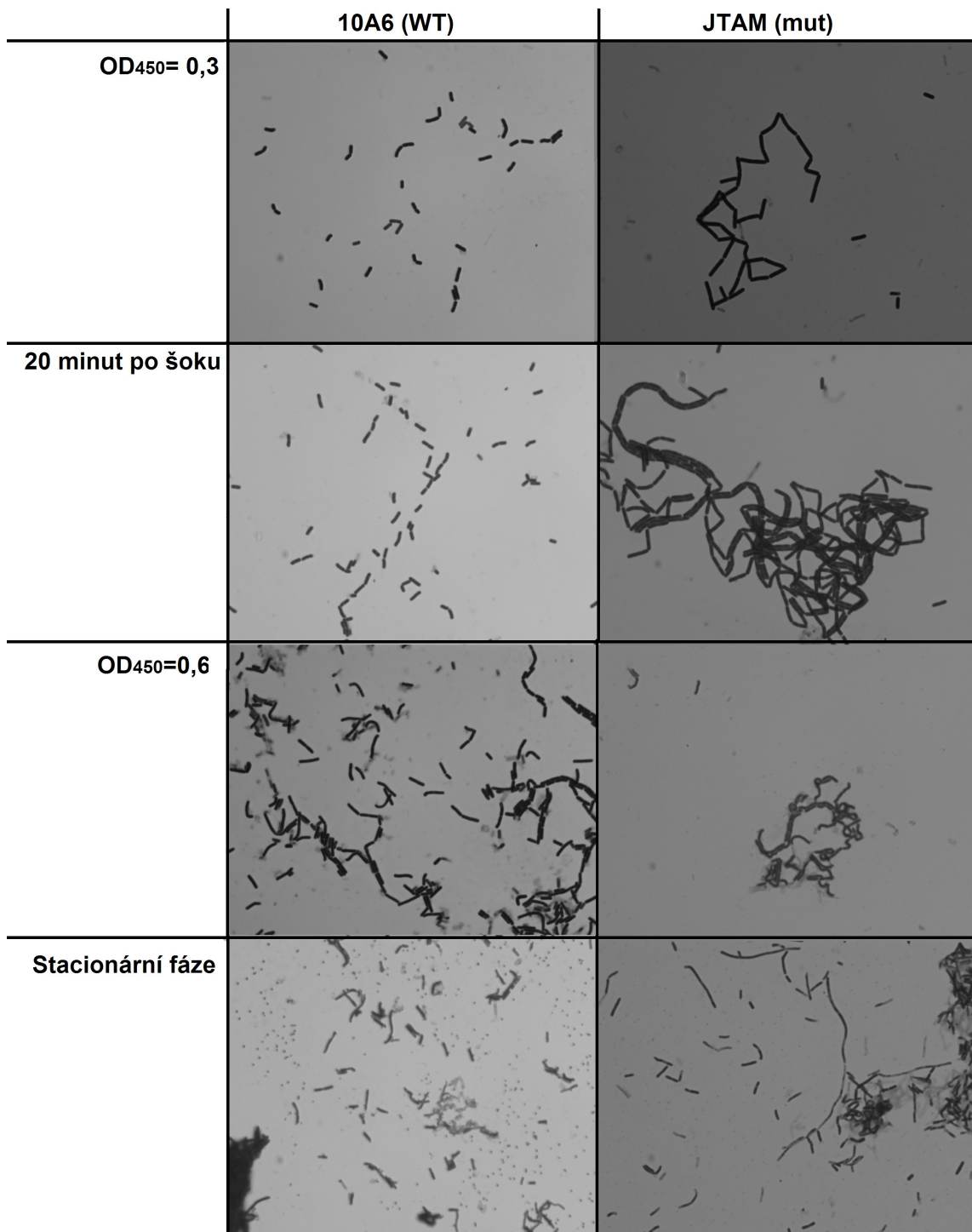


Obr. 32. Srovnání kmenů *Bacillus subtilis* 1A680 a MP2 po vystavení osmotickému šoku, preparáty barveny podle Grama

Buňky divokého kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 si udržovali uniformní velikost během kultivace a také po vystavení osmotickému šoku. Buňka mutantního kmenu v průběhu exponenciální fáze a ztelněji po vystavení osmotickému šoku byly delší oproti buňkám divokého kmenu. Ve stacionární fázi rozdíl velikosti mezi buňkami mizí.



Obr. 33. Srovnání kmenů *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 a JTAM
růst bez osmotického šoku, preparáty barveny podle Grama



Obr. 34. Srovnání kmenů *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 a JTAM po vystavení osmotickému šoku, preparáty barveny podle Grama

U divokého kmenu se při kultivaci bez osmotického šoku udržovala délka buněk konstantní. V stacionární fázi se objevovaly agregáty buněk. Po vystavení osmotickému šoku se v $OD_{450} = 0,6$ objevily shluky buněk vytvářející provazcovitá vlákna, která ale v stacionární fázi vymizela.

U mutantního kmenu se objevovaly vláknité shluky již v nízké optické densitě bez vystavení osmotickému šoku. Později při kultivaci bez osmotického šoku nebyly přítomny a velikostně se buňky příliš nelišily od buněk divokého kmenu. Při vystavení osmotickému šoku nedošlo k vymizení vláknitých shluků během exponenciální fáze a buňky byly zřetelně delší oproti divokému kmenu. Vlákenné shluky následně vymizely až během stacionární fáze, buňky byly stále delší než u divokého kmenu.

4.4 Studium motility

Cíl: Porovnat schopnosti motility mutantních kmenů s přerušením genu yxkO B. subtilis 1A680, B. subtilis spizizenii a B. amyloliquefaciens a kmenů od nichž byly odvozeny.

V dřívějších pracích byl zdokumentován vliv přerušení genu *yxkO* u *Bacillus subtilis* 168 na expresi flagelínového proteinu *hag* (Petrovová 2010) a na motilitu v tekutém médiu (Streitová 2010), proto bylo rozhodnuto zaměřit se na studium motility i u kmenů odvozených od *B. subtilis spizizenii* a *B. amyloliquefaciens*.

4.4.1 Motilita v tekutém médiu

Bakteriální kmeny byly z pevných agarových LB pěst, na kterých rostly přes noc, přeočkovány do tekutého LB média. V LB médiu byly kultivovány při 37°C za aerace do optické denzity $OD_{450} = 0,8$ a poté přečkovány do minerálního média K 0,5. Kultivovány do $OD_{450} = 0,8$ a znovu přeočkovány do čerstvého média K 0,5. Média pro mutantní kmeny navíc obsahovala erytromycin (0,3 µg/ml). Z kultivací byly odebírány vzorky a pozorovány pod světelným mikroskopem.

Vzorky byly odebrány v optické denzitě $OD_{450} = 0,3$, což představuje stav kultury před vystavením osmotickému šoku, kterému byly následně bakterie vystaveny a to přidáním 5 M roztoku NaCl na konečnou koncentraci NaCl 0,5 mol/l. Druhý odběr byl proveden po 20 minutách od osmotického šoku a třetí v době, kdy kultury dosahly optické denzity $OD_{450} = 0,6$.

Za motilní byly považovány bakterie z těch vzorků, kde se většina buněk (více než dvě třetiny) pohybovala aktivním neuspořádaným pohybem všemi směry s častou změnou směru pohybu jednotlivých bakterií. Výsledky viz Tabulka 3. Motilní bakterie označeny (+), nepohyblivé (-).

Kmen	OD ₄₅₀ = 0,3	20 minut po šoku	OD ₄₅₀ = 0,6
<i>B. amyloliquefaciens</i> 10A6 (wt)	+	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> JTAM (mut)	+	-	-
<i>B. subtilis</i> spizizenii 2A11 (wt)	+	+	-
<i>B. subtilis</i> spizizenii JTSP (mut)	-	+	-
<i>B. subtilis</i> 1A680 (wt)	+	-	-
<i>B. subtilis</i> MP2 (mut)	+	+	+

Tabulka 3: Pozorování motility v tekutém médiu.

U divokých kmenů došlo ve všech případech po vystavení osmotickému stresu k ztrátě motility a to bezprostředně (10A6 a 1A680) nebo po delším intervalu (2A11). U mutantních kmenů se naopak výsledky lišily. U kmenu JTAM se neprojevil rozdíl v motilitě oproti divokému kmenu. Kmen JTSP ztratil po delším intervalu po osmotickém šoku motilitu, ale v nízké optické densitě se jevil jako nepohyblivý. Kmen MP2 byl pohyblivý při všech pozorováních.

4.4.2 Motilita na povrchu tuhého média - Swarming

Cíl: Rozšířit studium rozdílu motility mezi divokými kmeny a kmeny s mutací v genu yxkO také na swarming, pohyb po povrchu pevného média.

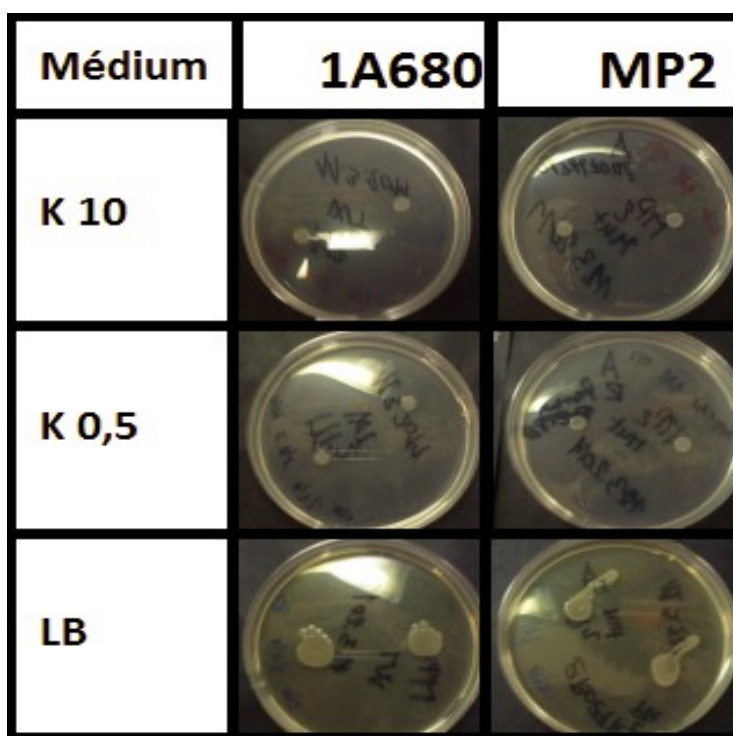
Po zjištění vlivu mutace v genu *yxkO* na pohyb v tekutém médiu, který pravděpodobně souvisí se změnou v expresi flagelínového proteinu kódovaného genem *hag* (Petrovová 2010), bylo rozhodnuto otestovat vliv této mutace také na jiný druh motility, na swarming, který probíhá na povrchu pevného média. Pro swarming je kromě produkce extracelulárně sekretovaného surfaktantu (látky snižující povrchové napětí) surfaktinu, změně tvaru buněk a kultivaci na speciálně upraveném médiu také nezbytná přítomnost bičíků. Dokonce u swarmujících buněk dochází k extenzivnímu zmnožení bičíků (Kearns a Losick 2003). Tyto skutečnosti vedly k rozhodnutí zaměřit se také na tento fenomén.

Pro studium schopností swarmingu byly použity tři druhy tuhého média pro swarming s obsahem agaru 0,7 % (w/v):

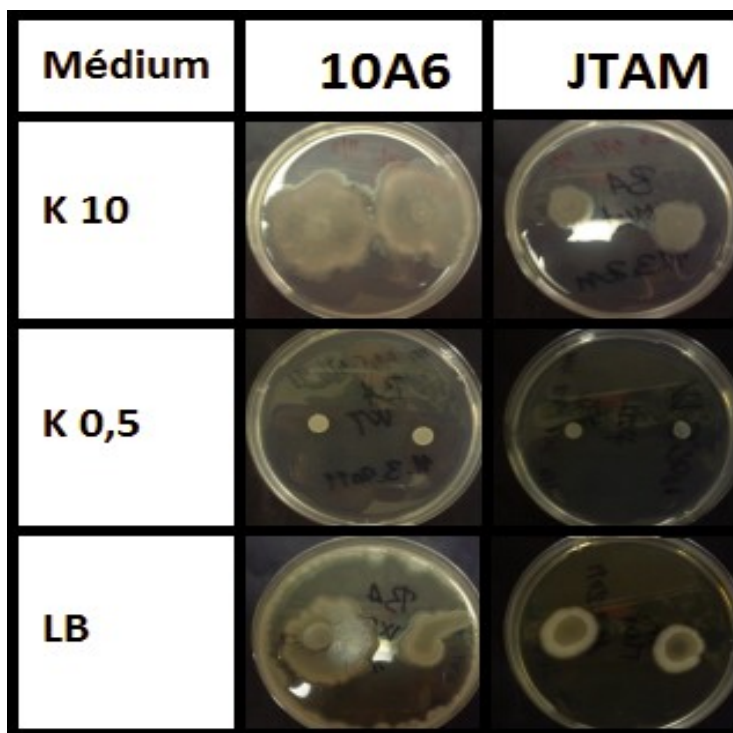
- komplexní médium LB.
- minerální médium K 0,5 obsahující 0,5 mM koncentraci draselných iontů.
- minerální médium K 10 obsahující 10 mM koncentraci draselných iontů.

Bakteriální kmeny byly kultivovány přes noc v LB médiu za aerace při 37°C. Následně byly noční kultury přeočkovány do čerstvého LB média, ve kterém byly kultivovány do optické denzity $OD_{450} = 0,2$. Poté byly kultury 100x naředěny sterilní vodou a nanесeny v objemu 10 μ l na Petriho misky s 0,7% (w/v) agarem a ty byly kultivovány v termostatu při 28°C.

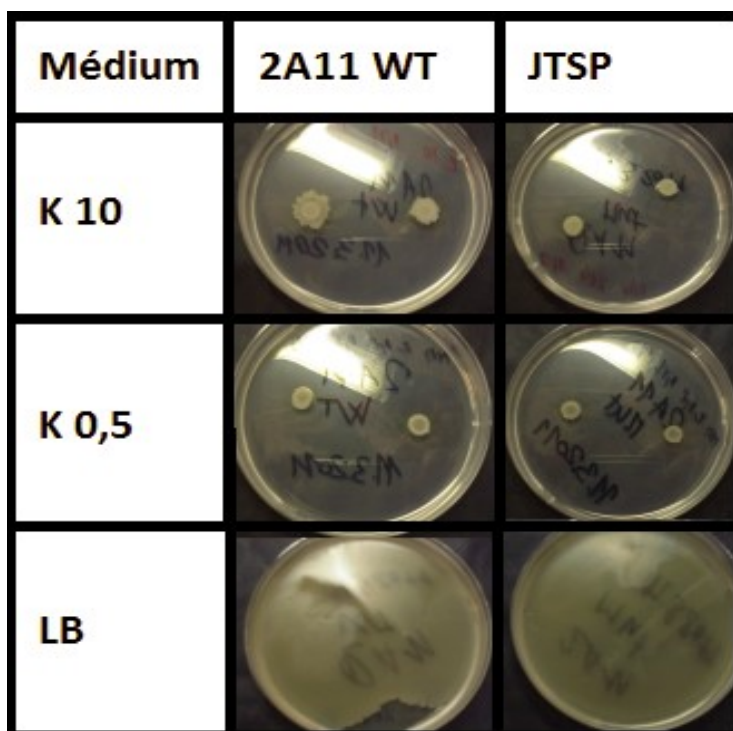
Po 24 hodinách byl fotograficky zdokumentován růst na Petriho miskách (Obr. 35., 36. a 37.)



Obr. 35. Srovnání schopnosti swarmingu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis* 1A680 po 24 hodinách.



Obr. 36. Srovnání schopnosti swarmingu mutantního a divokého kmenu *B. amyloliquefaciens* 10A6 po 24 hodinách.



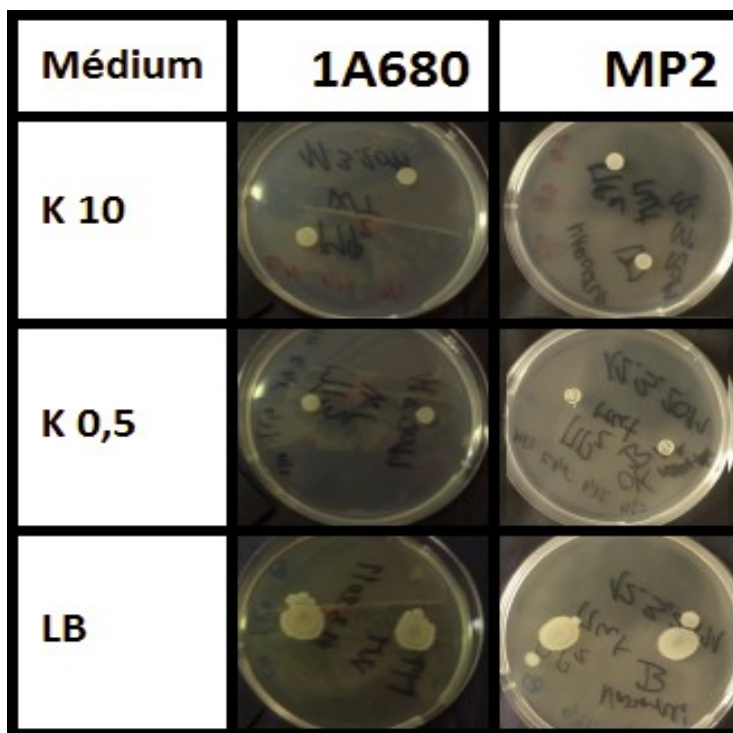
Obr. 37. Srovnání schopnosti swarmingu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis spizizenii* 2A11 po 24 hodinách.

U mutantního kmenu MP2 se na všech třech médiích projevila neschopnost pohybovat se pomocí swarmingu po povrchu pevného média, která byla předpokládána a souvisí s defektem v biosyntetické dráze surfaktinu u kmenu *Bacillus subtilis* 168 a pravděpodobně dalších dosud přesně neurčených mutacích narušujících schopnost swarmingu (Kearns a Losick, 2003). Kmen MP2, stejně jako příslušný divoký kmen, na agarových půdách pouze rostl bez pohybu formou swarmingu.

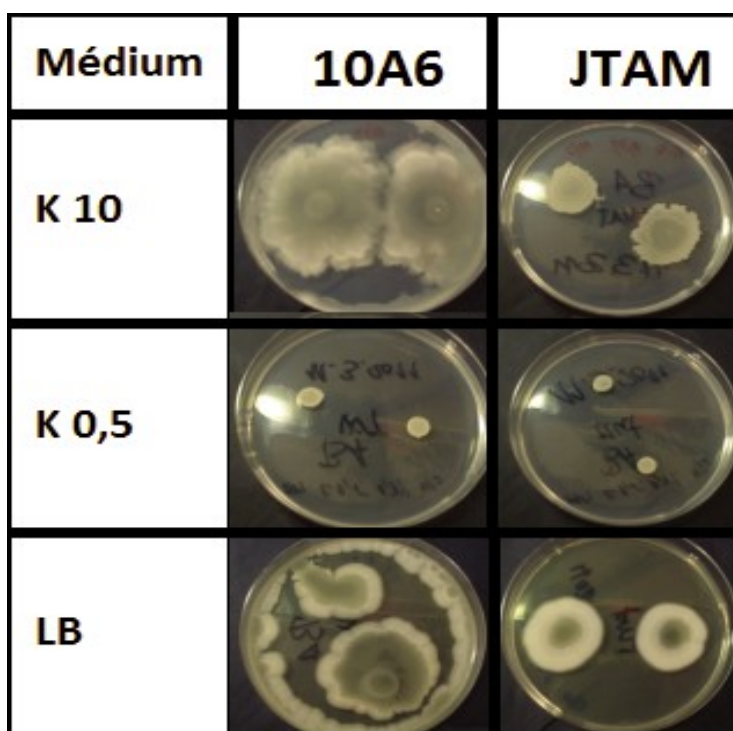
Mutantní kmen JTAM vykazoval oproti divokému kmenu od něhož je odvozen (*B. amyloliquefaciens* 10A6) změněnou schopnost swarmingu na komplexním médiu a minerálním médiu s dostatkem draslíku K10. Za podmínek limitující koncentrace draselných iontů byla patrná neschopnost pohybu swarmingem jak u divokého tak mutantního kmenu.

U kmenu JTSP byla pozorována na komplexním médiu mohutná kolonizace Petriho misky pokrývající celý povrch pevné půdy. Stejně se choval i divoký kmen *B. subtilis spizizenii* 2A11. Na minerálním médiu s limitující koncentrací draselných iontů K 0,5 nebyly znatelné viditelné rozdíly mezi divokým a mutantním kmenem, oba kmeny utvořily drobné kolonie a nerozrůstaly se do okolí. Na Petriho misce s médiem s nelimitující koncentrací draselných iontů tvořil divoký kmen větší kolonie oproti mutantnímu kmenu JTSP.

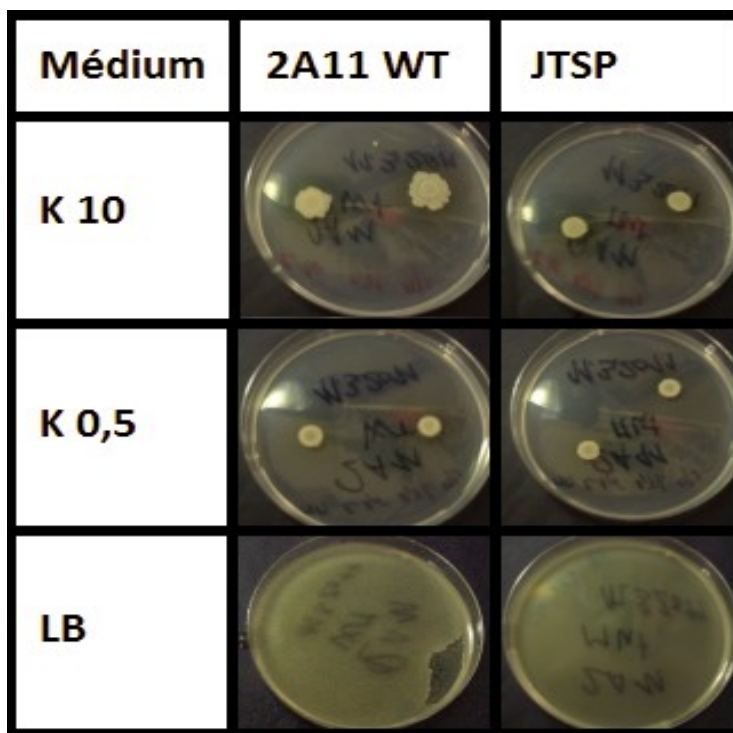
Po 48 hodinách byl růst na Petriho miskách znovu fotograficky zdokumentován.



Obr. 38. Srovnání schopnosti swarmingu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis* 1A680 po 48 hodinách.



Obr. 39. Srovnání schopnosti swarmingu mutantního a divokého kmenu *B. amyloliquefaciens* 10A6 po 48 hodinách.



Obr. 40. Srovnání schopnosti swarmingu mutantního a divokého kmenu *B. subtilis spizizenii* 2A11 po 48 hodinách.

Po 48 hodinách u kmenu MP2 a příslušného divokého kmenu *B. subtilis* 1A680 zůstal zachován vzhled kolonií z pozorování po 24 hodinách.

U divokého kmenu *B. amyloliquefaciens* 10A6 se dále rozšiřovala plocha nárůstu na komplexním médiu a minerálním médiu K10, také mutantní kmen JTAM na těchto médiích začal vytvářet širočejí rozrostlé kolonie, ale stále velikostně i tvarově odlišné od kmenu divokého. V případě minerálního média zůstala velikost a vzhled kolonií mutantního i divokého kmenu bez větších změn oproti pozorování po 24 hodinách.

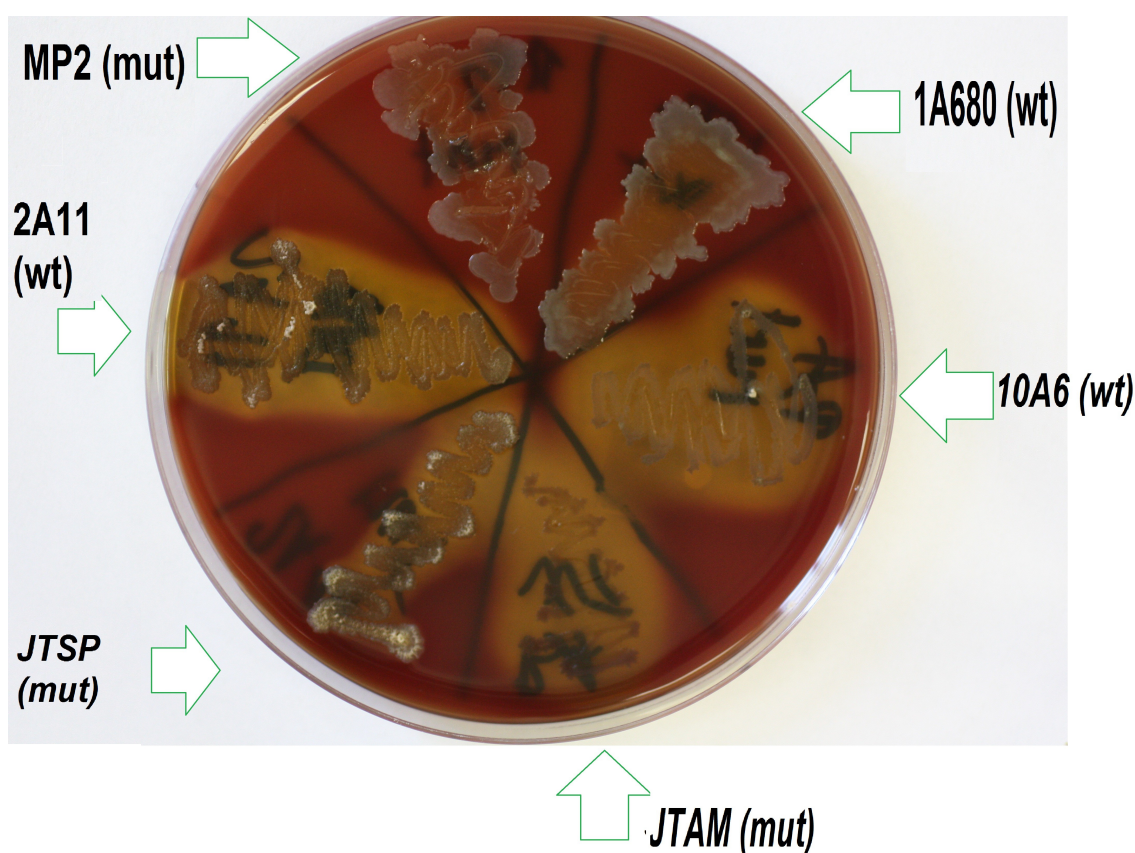
Mutantní kmen JTSP a příslušný divoký kmen *B. subtilis spizizenii* 2A11 nevykazovali rozdíl v růstu oproti stavu při pozorování po 24 hodinách kultivace.

4.4.2.1 Detekce produkce surfaktinu

Pro upřesnění výsledků získaných studiem swarmingu bylo rozhodnuto u jednotlivých kmenů detekovat produkci pro tento druh motility nezbytné substance a to surfactantu surfaktinu (Kearns a Losick 2003).

Pro základní testování produkce této látky bylo použito metody detekce surfaktinu prostřednictvím jeho hemolytické aktivity (Youssef *et al.* 2004).

Na Petriho misku s krevním agarem byly kličkou rozetřeny jednotlivé bakteriální kmeny a kultivovány v termostatu při 37°C 48 hodin. Po té byl krevní agar zkontrolován a výsledek fotograficky zdokumentován.



Obr. 41. Testování produkce surfaktinu na základě jeho hemolytické aktivity.

U kmenů 1A680 a MP2 není znatelná zóna hemolýzy, tyto kmeny mají narušenou biosyntézu surfaktinu, jejich použití pro testování surfaktinem zprostředkované hemolýzy sloužilo jako kontrola jak působí na krevní agar růst kmenu bez produkce surfaktinu.

U kmenů *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 (wt) a JTAM (mut) byla pozorována široká zóna hemolýzy svědčící pro intenzivní produkci surfaktinu.

U kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 (wt) byla zóna hemolýzy stejně široká jako u kmenů *B. amyloliquefaciens*, u mutantního kmenu JTSP byla zóna naopak méně znatelná.

4.4.3 Barvení bičků Leifsonovou metodou

Po zkušenostech s problematickými výsledky elektronové mikroskopie při zobrazení přítomnosti bičku bylo rozhodnuto pokusit se najít jinou metodu pro tento účel.

Po prostudování literatury byla vybrána metoda barvení bičku vyvinutá Einarem Leifsonem pro světelnou mikroskopii. Metoda umožňuje barvení bakterií jak z pevného media, tak z tekuté kultury.

Cílem bylo zjistit zejména přítomnost bakteriálních bičků u divokých versus mutantních kmenů s disrupcí genu *yxkO* před a po vystavení osmotickému šoku.

Bakteriální kmeny napěstovány přes noc na Petriho misce s LB médiem, byly inokulovány do tekutého LB média a kultivovány za aerace při 37°C do $OD_{450}=0,4 - 0,6$. Následně byly přeočkovány do minerálního média K 0,5 (limitující koncentrace draslíku) a také do minerálního média K10 (nelimitující koncentrace draslíku) a v nich znovu pěstovány do $OD_{450}=0,4 - 0,6$. Po té byly přeočkovány znovu do čerstvých médií K 0,5 a K 10 a z těchto kultivací byly zhotovovány preparáty a to u každého kmenu v $OD_{450}=0,3$ před osmotickým šokem, po 20 minutovém intervalu po osmotickém šoku a z $OD_{450}=0,6$. Při odběru byly také provedeny nativní pozorování motility bakterií.

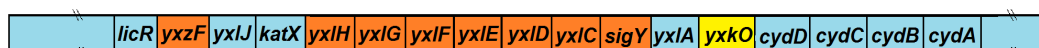
Preparáty byly barveny dle protokolu (kap. 3.2.5) a prohlédnuty pod světelným mikroskopem. Bohužel výsledky nebyly uspokojivé a ani po vícero opakování a odstranění případných technických nedostatků (použití basického fuchsinu určeného přímo na barvení bičků a ošetření podložních skel roztokem dichromanu draselného v kyselině sírové, kvůli jejich vysoké čistotě) se nepodařilo metodu natolik optimalizovat aby měly získané výsledky dostatečnou validitu.

4.5 Srovnání kmenů *Bacillus subtilis* 1A680, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10^T

Kmeny byly vybrány podle kritérií:

1. různé/stejně bezprostřední okolí genu *yxkO* vzhledem k původně studovanému kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 (respektive 168)
2. úroveň laboratorní domestikace kmenů tj. rozlišení laboratorní kmen/přírodní izolát.

Bacillus subtilis 1A680 (s 2A11 shodné) - schéma okolí genu *yxkO*



Bacillus amyloliquefaciens 10A6 - schéma okolí genu *yxkO*



Obr. 42. Pořadí genů v okolí genu *yxkO*.

(kmeny 2A11 a 1A680 kvůli shodnému genetickému okolí *yxkO* reprezentovány jedním schématem)

modře - značeny geny společné pro všechny tři kmeny

žlutě - gen *yxkO*

červeně - geny, jimiž se liší 1A680 (s 2A11) od 10A6.

N - označení genů, které mají jen číselné označení a neznámou funkci (geny RBAM_035820, 035830 a 035840)

Jak je vidět na obrázku č. 42 je bezprostřední okolí vpravo od genu *yxkO* u třech studovaných kmenů značně konzervované, obsahuje *cydABCD* operon kódující cytochrom bd oxidázu, a i dál za tímto operonem je pro studované kmeny shodné. Naopak levé okolí u *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 se liší od sestavy genů u zbývajících dvou kmenů. U všech tří kmenů je vlevo před genem *yxkO* gen *yxIA* kódující permeázu. Následuje odlišný region končící *lic* operonem, který spolu s vzdalenějším okolím je opět shodný. Rozdílný region obsahuje dva geny *katX* (spórová kataláza) a *yxIJ* (DNA glykozyláza, u 2A11 gen *aag*) přítomné u všech tří kmenů ovšem u 10A6 v jiném pořadí.

U kmenů 1A680 a 2A11 je v tomto regionu *sigY* operon zahrnující gen *sigY* kódující sigmafaktor Y a geny *yxIC, D, E, F a G* podílející se na regulaci jeho funkce. *SigY* je sigmafaktor pro extracytoplazmatické funkce (ECF), indukovaný hladověním na dusík. Disrupce *sigY*, má vliv na sporulaci indukovanou hladověním na dusík. Přesná funkce tohoto sigmafaktoru je dosud neznámá, obecně je o ECF sigmafaktorech (krom Y jsou známy také M, W, X, Z, V) známé, že se podílí na funkcích spojených s buněčnou stěnou, některé (σ^M) mohou být indukovány vnějším stresem (teplotním, osmotickým, etanolovým, aj.)(Luo *et al*, 2010). V tomto regionu zbývají u 1A680 a 2A11 ještě gen *yxIH* kódující efluxní transporter a gen *yxzF* s neznámou funkcí.

U *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 obsahuje rozdílný region další rozdílné geny. *yxel* je předpokládaná penicilin amidáza. Geny *ydhM, N, O, P, R, S a T* kódují předpokládané enzymy metabolismu sacharidů a komponenty fosfotransferázového systému. *ydfA* je gen pro arzenovou pumpu a *ydeT* transkripční regulátor z *arsR* rodiny (metaloregulované transkripční represory). Co se týká vlivu na výsledky fenotypových studií jeví se zejména přítomnost sigma faktoru σ^Y u kmenů 10A6 a 2A11 jako významná.

Pro charakterizaci na úrovni celých genomů bylo vybráno několik základních charakteristik genomů, jejichž parametry byly srovnány mezi studovanými kmeny (sumarizace viz Tabulka 4 a 5).

	<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>FZB42</i>	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis spizizenii</i> 2A11
Délka DNA	3 918 589 bp.	4 215 606 bp.	4 027 676 bp.
Délka kodujících sekvencí	3 500 425 bp. (89,33%)	3 754 971 bp. (89,07%)	3 595 505 bp. (89,27%)
GC páry	46,48%	43,51%	43,89%
Počet genů	3814	4354	4168
Z toho kódujících:			
proteiny	3696	4176	4062
RNA (celkově)	118	178	106
rRNA	30	30	24
tRNA	87	86	77
jiné RNA	1	62	5
enzymy	1028	1085	1038
signální peptidy	777	859	1175
transmembránové proteiny	998	1157	1126
transportérové proteiny	529	594	571
fúzované proteiny	344	386	356
geny účastníci se metabolismu	706	730	720
necharakterizované proteiny	358	915	918
geny získané HGT	56	15	1

Tabulka 4. Srovnání základních charakteristik genomů studovaných kmenů. (zdroj <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>)

Genom	10A6	168	2A11
10A6	1,00	0,94	0,94
168	0,94	1,00	0,97
2A11	0,94	0,97	1,00

Tabulka 5. Korelace genomů na základě funkční charakterizace.

Korelace byla vyhodnocena pomocí nástroje pro srovnání genomů na <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi> , genomy jsou srovnány na základě funkčních profilů určených podle rozdělení proteinů do klastrů dle COG databáze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Hodnota korelace 2 genomu je vyjádřena Pearsonovým koeficientem.

Z hlediska porovnání laboratorní domestikace kmenů představují kmeny *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 a *Bacillus subtilis spizizenii* 2A11 přírodní izoláty u nichž by měl být vliv domestikace minimální. Naproti tomu *Bacillus subtilis* 168 je standardní laboratorní kmen u něhož byl fenomén domestikace studován (viz kap 2. 4).

4.6 Studium stresové odpovědi u *Bacillus subtilis* s přerušným genem *yxkO*

Cíl: Připravit kmeny Bacillus subtilis 1A680 a Bacillus subtilis 1A680 s mutací v genu yxkO (MP2) u nichž by bylo možné pomocí promotorové fúze sledovat aktivitu genů stresové odpovědi σ^B regulonu a vzájemně ji mezi kmeny porovnat.

Při studiu růstu na pevném médiu i v tekutém médiu byla pozorována zhoršená schopnost adaptace kmenů s přerušným genem *yxkO* k změnám podmínek kultivace, jmenovitě při přeočkování do čerstvého média a při vystavení osmotickému šoku a to zejména při podmínkách limitující koncentrace draselných iontů.

Jedním z mechanismem hrajícím roli při adaptaci na změny vnějších podmínek je obecná stresová odpověď. Za účelem ověření potenciálního vlivu genu *yxkO* na expresi genů obecné stresové odpovědi z regulonu σ^B byli vytvořeni mutanti s promotorovou fúzí genu *ctc* a genu pro β - galaktosidázu *lacZ*. Gen *ctc* patří do σ^B regulonu a byl již dříve použit jako markerový gen obecné stresové odpovědi u *Bacillus subtilis* (Ray *et al.* 1985). Použití jeho promotoru, který je poměrně dobře charakterizován je výhodnější oproti přímému studiu promotoru genu *sigB*, který je autoregulován, je součástí komplexního regulonu s překryvem genů a jeho regulace není zcela známá (Boylan *et al.* 1992).

4.6.1 Příprava rekombinantního plazmidu pDG1661 - p*ctc*

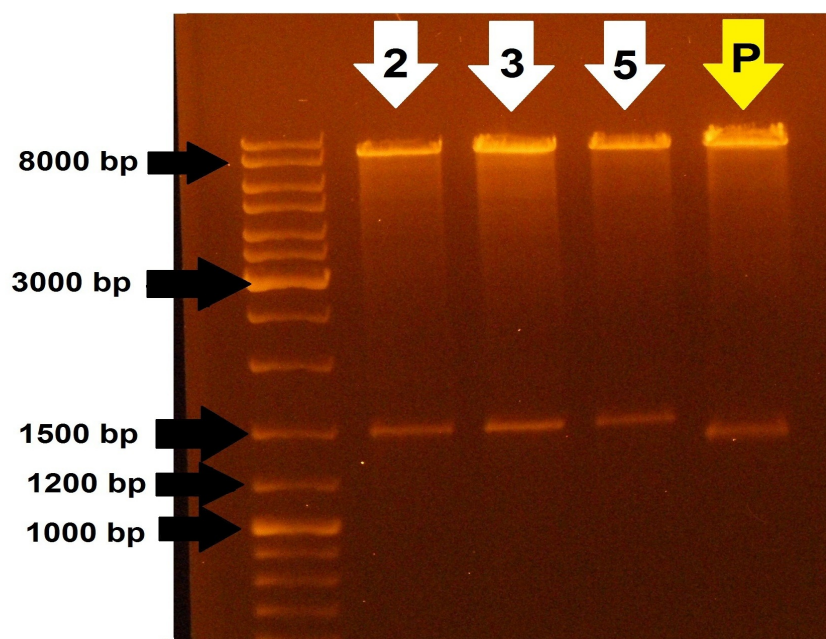
Pomocí primerů *ctc_prom_F* a *ctc_prom_R* byl PCR reakcí (kap. 3.2.2.6) amplifikován z chromozomální DNA *Bacillus subtilis* 1A680 úsek DNA dlouhý 124 bp zahrnující promotorovou část genu *ctc* (*ctc_prom*).

Vyizolovaný (kap. 3.2.2.3) fragment *ctc_prom* byl podroben restrikční reakci enzymy BamHI a EcoRI (kap. 3.2.2.7), jejichž restrikční místa byly součástí použitých primerů. Následně byl fragment ligován do stejnými enzymy linearizovaného plazmidu pDG1661 (kap. 3.2.2.8). Vzniklou ligační směsí byly metodou heat shock transformace transformovány kompetentní buňky

Escherichia coli DH5 α (kap. 3.2.1.5). Transformované buňky byly vysety na Petriho misky s LB médiem obsahujícím ampicilin (50 μ g/ml).

Z přes noc narostlých kolonií bylo vybráno sedm klonů, které byly označeny, přečárkovány na novou půdu s ampicilinem a byly z nich připraveny noční kultury pro izolaci plazmidů.

Izolované plazmidy (kap. 3.2.2.2.1) z klonů 2, 3 a 5 byly podrobeny restriční analýze (kap. 3.2.2.7). Jejich restriční profil získaný použitím restriktázy Sall byl srovnán s profilem prázdného plazmidu pDG1661 získaného působením stejného enzymu. Rovněž byla na těchto plazmidech ověřena přítomnost inzertu pomocí PCR reakce (kap.3.2.2.6) s primery ctc_prom_F a ctc_prom_R, která potvrdila přítomnost inzertu ve všech případech.



Obr. 43. Restrikce rekombinantních plazmidů enzymem Sall

Bílými šipkami jsou označeny restrikce plazmidů izolovaných z transformovaných buněk, žlutou šipkou restrikce prázdného plazmidu.

Plazmidy byly také dány k osekvenování (kap. 3.2.2.9), které potvrdilo přítomnost a správnou pozici inzertu ve všech třech případech.

4.6.2 Transformace kmenů *Bacillus subtilis* 1A680 a MP2 rekombinantním plazmidem

Pro transformování bakteriálních kmenů byl použit plazmid z klonu číslo 2. Ten byl znovu izolován z buněk *E.coli* (kap. 3.2.2.2.2) a linearizován restriční enzymem BstEII (kap. 3.2.2.7). Linearizovaným plazmidem byly transformovány kompetentní buňky (kap. 3.2.1.9) kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 a od něj odvození mutanti s disrupcí genu *yxkO* *Bacillus subtilis* MP2. Transformované bakterie byly kultivovány přes noc na pevném LB médiu s chloramfenikolem (5µg/ml). Z přes noc narostlých kolonií bylo vybráno 10 od *Bacillus subtilis* 1A680 a 11 od *Bacillus subtilis* MP2, které byly označeny a rozčárkovány na nové Petriho misky s chloramfenikolem a následně také na misky se spectinomycinem (100 µg/ml) a další misky obsahující škrob. Při správně proběhlé integraci dvojitým crossingoverem není část plazmidu nesoucí resistenci k spectinomycinu integrována a tudíž bakterie nevykazují resistenci k tomuto antibiotiku. Rovněž dochází k porušení cílového genu pro integraci v chromozómu recipientního kmenu *amyE* projevujícím se neschopností bakterie využít škrob.

Druhý den bylo detekována u všech vybraných klonů rostoucí na miskách s chloramfenikolem neschopnost růstu na miskách se spectinomycinem a na miskách se škrobem bylo detekováno pomocí Lugolova roztoku, že nedošlo k jeho utilizaci.

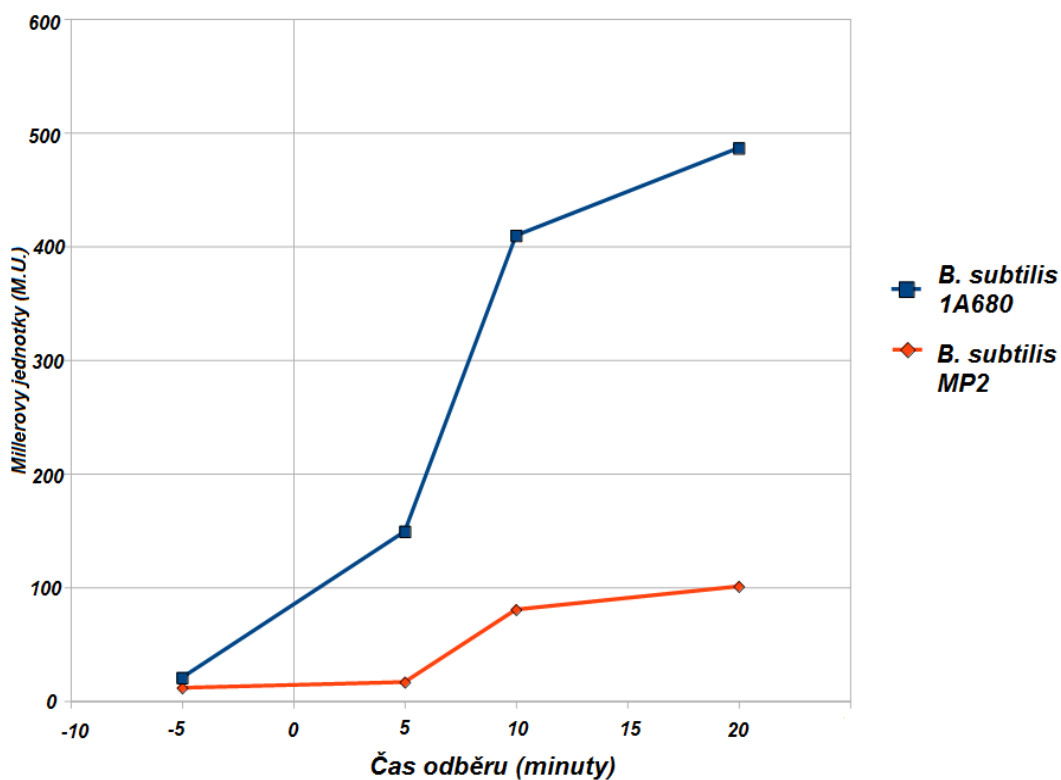
Z deseti klonů *Bacillus subtilis* 1A680 byly vybrány tři, u nichž byla na izolované chromozomální DNA (kap. 3.2.2.1) pomocí PCR (kap. 3.2.2.6) s primery ymyE2R (primer nasedající uvnitř genu *amyE*) a ctc_prom_R (jeden z primeru pro tvorbu fragmentu ctc_prom) ověřena integrace rekombinantního plazmidu s promotorovou fúzí genu *ctc*, stejně tak u kmenu *Bacillus subtilis* MP2. Získané kmeny byly označeny *Bacillus subtilis* 1A680/Pctc a *Bacillus subtilis* MP2/Pctc.

4.6.3 Studium obecné stresové odpovědi u *B. subtilis* 1A680 a *B. subtilis* MP2 kmenu s přerušným genem *yxkO*

S využitím připravených kmenů *Bacillus subtilis* 1A680/Pctc a *Bacillus subtilis* MP2/Pctc bylo testováno prostřednictvím aktivity β - galaktosidázy (kap. 3.2.3) hladina exprese z promotoru genu *ctc* a tím zprostředkovaně míra obecné stresové odpovědi u divokého kmenu a kmenu s přerušným genem *yxkO*.

4.6.3.1 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při etanolovém šoku v LB médiu

Kmeny pro etanolový stres byly inokulovány z pevného média, na kterém byly kultivovány přes noc, do vytemperovaného tekutého LB média a kultivovány za aerace při 37°C do optické denzity $OD_{595}=0,8$ po té byly kultury přeočkovány do čerstvého LB média na $OD_{595}=0,1$. Kmeny byly pěstovány přibližně do $OD_{595}=0,4$, kdy byl ke kulturám přidán etanol na konečnou koncentraci 4% (v/v). Vzorky pro stanovení β - galaktosidázy (kap. 3.2.3) byly odebrány v intervalech 5 minut před osmotickým šokem, 5, 10 a 20 minut po šoku. Tento pokus byl také dalším ověřením správné integrace rekombinantního plazmidu.



Obr. 44. Stanovení míry obecné stresové odpovědi při etanolovém šoku v LB médiu.

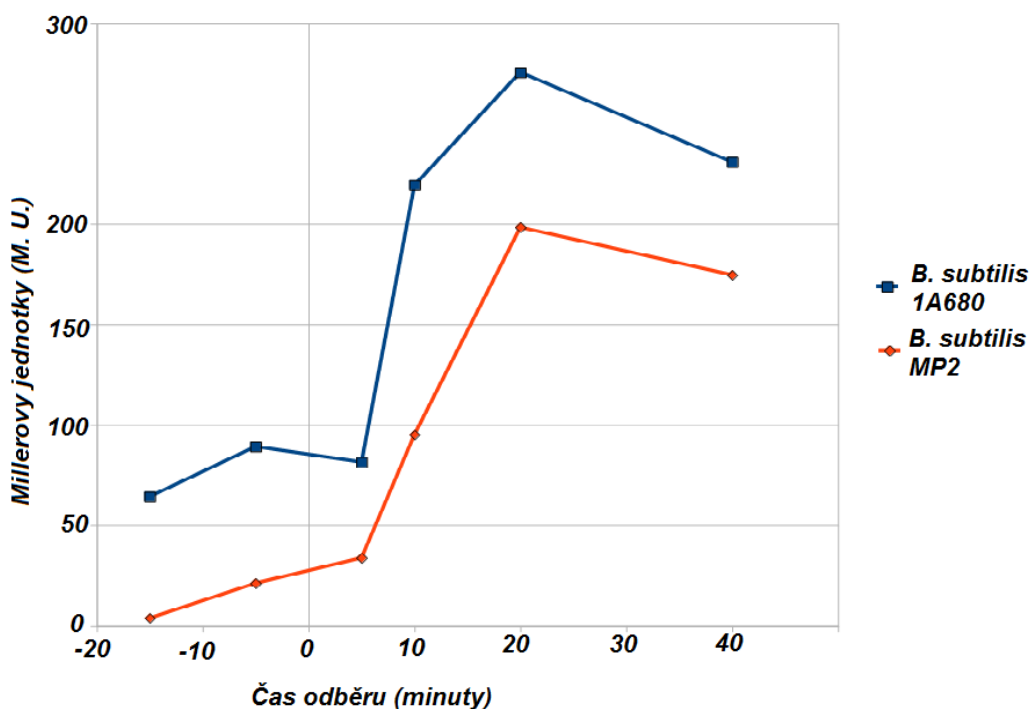
Bakterie byly vystaveny šoku přidáním etanolu v čase 0.

Čas odběru (min)	-5	5	10	20
OD ₅₉₅ 1A680	0,450	0,740	0,760	0,900
OD ₅₉₅ MP2	0,583	0,671	0,720	0,783

Tabulka 6. Optické denzity odběrů pro stanovení aktivity β - galaktosidázy

4.6.3.2 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v LB médiu

Kmeny pro osmotický šok v LB médiu byly kultivovány stejně jako pro šok etanolový. Po přeočkování do čerstvého LB média byly kmeny pěstovány do přibližné optické denzity $OD_{595}=0,4$, kdy byly vystaveny osmotickému šoku přidáním NaCl ze zásobního 5 M roztoku na konečnou koncentraci v médiu 0,5 mol/l. Vzorky pro stanovení β - galaktosidázy (kap. 3.2.3) byly odebrány v intervalech 15 a 5 minut před osmotickým šokem, 5, 10, 20 a 40 minut po šoku.



Obr. 45. Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v LB médiu.

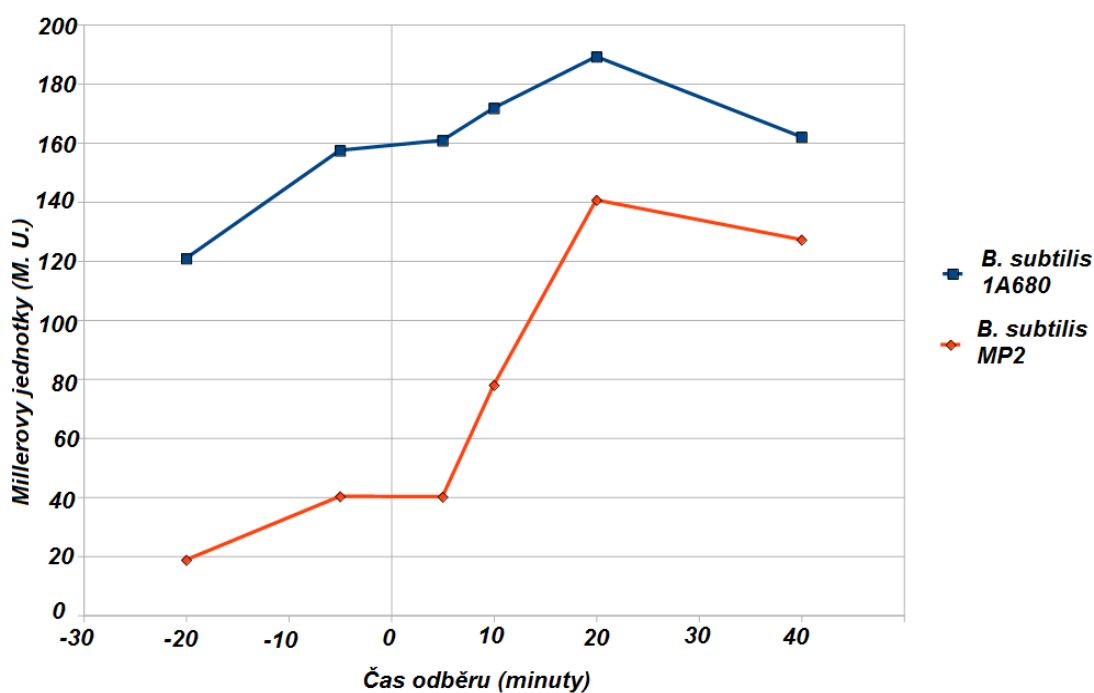
Bakterie byly vystaveny šoku přidáním NaCl v čase 0.

Čas odběru (min)	-15	-5	5	10	20	40
OD_{595} 1A680	0,260	0,360	0,430	0,440	0,490	0,585
OD_{595} MP2	0,371	0,464	0,500	0,510	0,550	0,630

Tabulka 7. Optické denzity odběrů pro stanovení aktivity β - galaktosidázy

4.6.3.3 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v minerálním médiu K 10

Pro testování aktivity β - galaktosidázy v minerálním médiu K 10 představujícím prostředí s nelimitující koncentrací draselných iontů byly kmeny z přes noc narostlých agarových pěstí inokulovány do vytemperovaného tekutého LB média a kultivovány do optické hustoty $OD_{595}=0,8$. Po té byly kmeny přeočkovány na $OD_{595}=0,1$ do tekutého média K 10, ve kterém byly kultivovány znovu do $OD_{595}=0,8$ a následně přeočkovány do čerstvého vytemperovaného média K 10, kde byly v $OD_{595}=0,4$ vystaveny, přidáním 5 M roztoku NaCl na konečnou koncentraci 0,5 mol/l (v/v), osmotickému šoku. Vzorky pro stanovení β - galaktosidázy (kap. 3.2.3) byly odebrány v intervalech 20 a 5 minut před osmotickým šokem, 5, 10, 20 a 40 minut po šoku.



Obr. 46. Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v minerálním médiu K10.

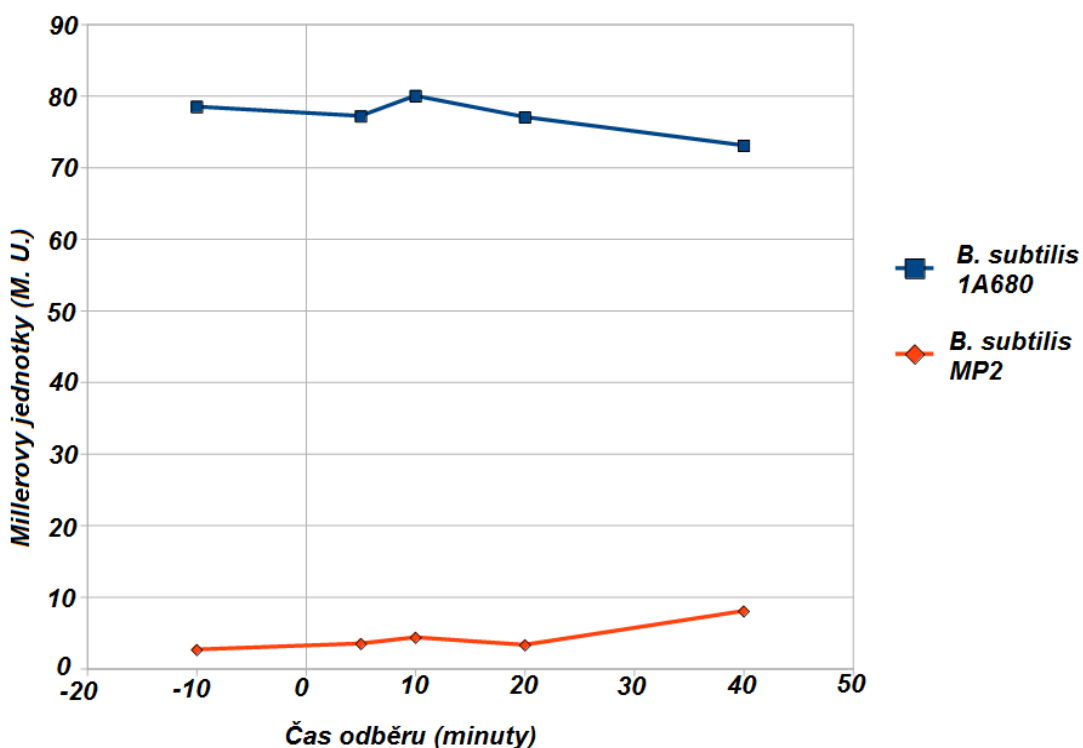
Bakterie byly vystaveny šoku přidáním NaCl v čase 0.

Čas odběru (min)	-20	-5	5	10	20	40
OD ₅₉₅ 1A680	0,400	0,450	0,430	0,460	0,450	0,530
OD ₅₉₅ MP2	0,410	0,450	0,440	0,470	0,490	0,580

Tabulka 8. Optické denzity odběrů pro stanovení aktivity β - galaktosidázy

4.6.3.4 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v minerálním médiu K 0

Kmeny byly naočkovány z agarových pŕd do tekutého LB média, kultivovány do $OD_{595}=0,8$ a pŕeočkovanány na $OD_{595}=0,1$ do minerálního média K 0 (limitující koncentrace draselných iontů), kultivovány do $OD_{595}=0,8$ a znovu pŕeočkovanány do čerstvého média K 0. Poté byly kmeny kultivovány do $OD_{595}=0,4$, kdy byly vystaveny osmotickému šoku pŕidáním NaCl na konečnou koncentraci v médiu 0,5 mol/l (v/v). Vzorky pro stanovení β - galaktosidázy (kap. 3.2.3) byly odebrány v intervalech 10 minut pŕed osmotickým šokem, 5, 10, 20 a 40 minut po šoku.



Obr. 47. Stanovení míry obecné stresové odpovědi při osmotickém šoku v minerálním médiu K 0.

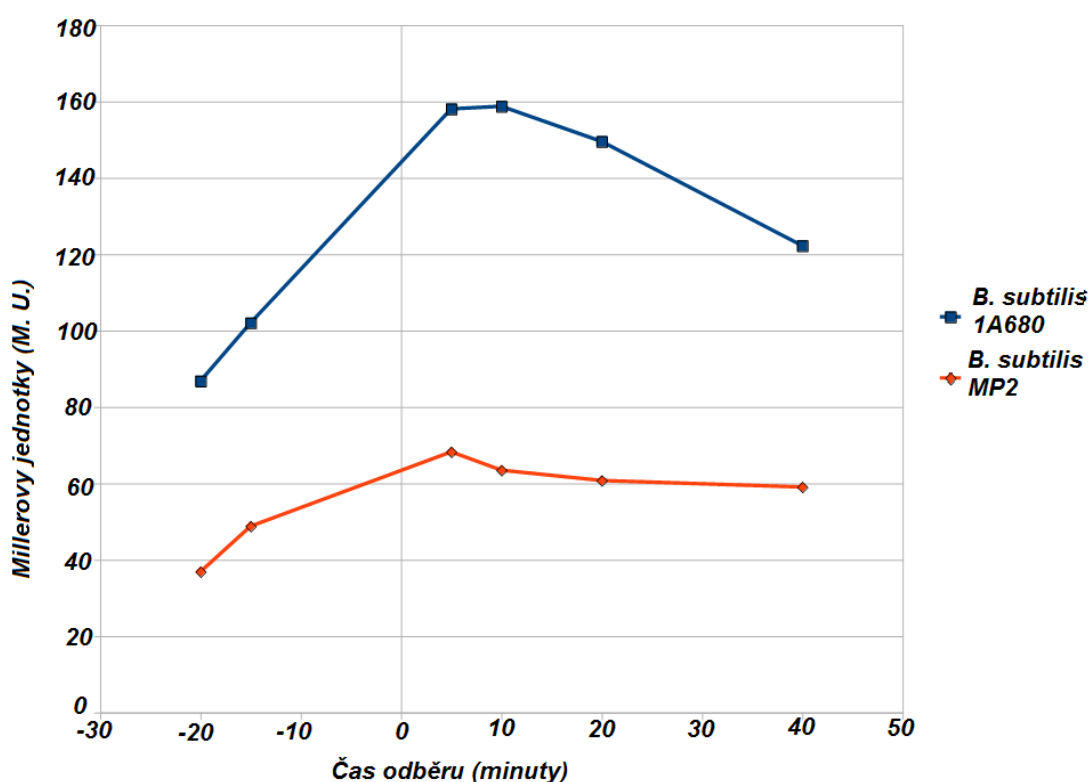
Bakterie byly vystaveny šoku pŕidáním NaCl v čase 0.

Čas odběru (min)	-10	5	10	20	40
OD ₅₉₅ 1A680	0,430	0,430	0,430	0,450	0,474
OD ₅₉₅ MP2	0,380	0,360	0,360	0,380	0,390

Tabulka 9. Optické denzity odběrů pro stanovení aktivity β - galaktosidázy

4.6.3.5 Stanovení míry obecné stresové odpovědi při přenosu z média K 10 do média K 0

Kmeny byly přeočkovány z agarových půd do tekutého LB média, kultivovány do $OD_{595}=0,8$ a přeočkovány na $OD_{595}=0,1$ do minerálního média K 10, znovu pěstovány do $OD_{595}=0,8$ a přeočkovány do čerstvého média K 10, kde byly pěstovány do $OD_{595}=0,4$, kdy byly bakterie pomocí filtrace separovány z média a resuspendovány v čerstvém médiu K 0. Vzorky pro stanovení β - galaktosidázy (kap. 3.2.3) byly odebrány v intervalech 20 a 15 minut před před filtraci, 5, 10, 20 a 40 minut po resuspendování v médiu K 0.



Obr. 48. Stanovení míry obecné stresové odpovědi při přesunu z minerálního média K10 do minerálního média K 0.

Čas 0 představuje chvíli, kdy byly filtrací zachycené bakterie resuspendovány v čerstvém vytemperovaném médiu K 0.

Čas odběru (min)	-20	-15	5	10	20	40
OD ₅₉₅ 1A680	0,480	0,490	0,290	0,320	0,340	0,380
OD ₅₉₅ MP2	0,390	0,410	0,320	0,330	0,360	0,420

Tabulka 10. Optické denzity odběrů pro stanovení aktivity β - galaktosidázy

5. DISKUZE

Bakterie patří s ohledem na jejich všeobecné rozšíření a všudypřítomnost mezi evolučně nejúspěšnější organizmy. Jako jednobuněčné organizmy mají bakterie velmi omezené prostředky, jak udržovat vzhledem k vnějším fyzikálním a chemickým podmínkám homeostázi. Bakterie pro svou úspěšnou existenci vyvinuly řadu adaptivních strategií, jak se s podmínkami měnícího se prostředí vyrovnat.

Bakteriální rod *Bacillus* je rodem půdních bakterií. Tyto druhy se musejí potýkat s častými změnami vnějších podmínek mezi, které patří zejména změny vlhkosti, se kterými souvisí i změny osmolality prostředí. Adaptace na osmotický šok je pro tyto bakterie rozhodujícím faktorem určujícím jejich životaschopnost. Osmoadaptace těchto bakterií probíhá dvoufázovým mechanismem, kdy v první fázi reakce na osmotický šok jsou do buňky z prostředí čerpány draselné ionty vyrovnávající osmotický tlak, a v druhé fázi jsou draselné ionty nahrazeny kompatibilními soluty neinteragujícími s metabolismem ani funkčními strukturami buňky.

V předchozích letech byla na studium osmoadaptace zaměřena pozornost naší laboratoře. Pomocí nespecifické inzerční mutagenese byl připraven osmosenzitivní kmen L-42, odvozený od asporgenního mutanta kmenu *Bacillus subtilis* 168. U tohoto kmenu byla pozorována neschopnost osmoadaptace při osmotickém šoku na médiu s limitujícím množstvím draslíku. Jako místo mutace u tohoto kmenu byl identifikován gen s neznámou funkcí *yxkO* (Ulanova, 2005).

Na gen *yxkO* byla poté zaměřena pozornost naší pracovní skupiny. Byly připraveny mutantní kmeny MP2 a ES091 odvozené od *Bacillus subtilis* 1A680 a *Bacillus subtilis* 1A839 s přerušením tohoto genu pomocí plazmidu pMUTIN4 (Petrovová 2010, Streitová 2010). U těchto kmenů byla prokázána, obdobně jako u kmenu L-42, omezená schopnost růstu na minerálním médiu při vystavení osmotickému šoku. Dále byla při kultivaci na minerálním médiu s limitující koncentrací draselných iontů zjištěna zvýšená citlivost mutantního

kmenu MP2 k tetracyklinu, která je dávana do souvislosti s funkcí proteinu resistance k tetracyklinu TetA(L), který se u *Bacillus subtilis* podílí na transportu draselných iontů (Petrovová 2010). Také byla zjištěna změna morfologie buněk a schopnosti motility (Streitová 2010). Charakter mutace také dovozoval díky vnesenému reportérovému genu *lacZ* sledovat expresi z promotoru studovaného genu. Při experimentálním ověření za podmínek osmotického a etanolového šoku, ale nedocházelo k transkripci z tohoto promotoru (Petrovová 2010). Bylo také provedeno porovnání proteinových profilů kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 (wt) a mutantního kmenu MP2, při kterém byl zjištěn vliv genu *yxkO* na expresi řady proteinů, zejména energetického metabolismu a strukturního proteinu vlákna bičíku flagelinu (Petrovová 2010).

Cílem mé diplomové práce bylo rozšíření výsledků předchozích studií na další příbuzné bakteriální kmeny s přihlédnutím k úrovni laboratorní domestikace studovaných kmenů a okolí studovaného genu *yxkO*. A dále také ověřit vliv tohoto genu na expresi proteinů obecné stresové odpovědi.

Prvním úkolem byla příprava mutantního kmenu *Bacillus subtilis* 168 s kompletní *in frame* delecí genu *yxkO*, jehož vlastnosti měli být následně studovány. Pro tento účel byly pomocí PCR reakce z primerů *yxkO*-D1F a *yxkO*-D1R, respektive *yxkO*-D2F a *yxkO*-D2R, připraveny dva fragmenty z úseků DNA na okrajích genu *yxkO*. Tyto fragmenty byly následně pomocí PCR reakce spojeny a vzniklý konstrukt s delecí genu *yxkO* byl ligován do plazmidu pBGSC6. V dalším kroku se bohužel nepodařilo po transformaci kompetentních buněk *Escherichia coli* touto ligační směsí selektovat klon nesoucí rekombinantní plazmid. Ani po několikanásobném opakování ligace a po obměně transformační metody a využití několika kontrol životaschopnosti a transformovatelnosti buněk se nepodařilo rekombinantní plazmid získat. Již při dřívějších manipulacích s oblastí genu *yxkO* bylo zjištěno, že tato oblast je špatně klonovatelná (Lichá, osobní sdělení).

Kvůli tomuto neúspěchu byl zvolen alternativní přístup. Rozhodli jsme se připravit mutanty odvozené od dalších bakteriálních druhů rodu *Bacillus* pomocí dříve připraveného konstruktů pMUTIN4-*yxkO*' (Streitová 2010). Jako

vhodní kandidáti byly vybrány druhy *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (10A6) a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10^T(2A11). Tyto kmeny byly vybrány na základě rozdílného okolí genu *yxkO* (10A6) a úrovni laboratorní domestikace (2A11) (srovnání kmenů viz kap. 4.5). Rekombinantní plazmid pMUTIN4-*yxkO*´ byl namnožen v kompetentních buňkách *Escherichia coli*, izolován a byly jím transformovány kmeny 10A6 a 2A11 (schéma integrace pMUTIN4-*yxkO*´ obrázek 19, kap. 4.2.3). U získaných mutantů byla ověřena správná integrace pMUTIN4-*yxkO*´ pomocí PCR reakcí z dvojic primerů *mutinR/yxkOSDF* a *mutinF/yxkOR2*. Následně byla integrace ověřena také sekvenací.

K připraveným mutantním kmenům odvozeným od *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, mutantní kmen JTAM, a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10^T, mutantní kmen JTSP, byl přibrán kmen odvozený od *Bacillus subtilis* 1A680 (derivát kmenu 168 s mutací v mutaci v genu kódujícím β - galaktosidázu), mutantní kmen MP2, připravený již dříve Mirkou Petrovovou (Petrovová 2010).

U takto připravených mutantů byla nejprve testována schopnost růstu na pevném minerálním médiu při vystavení osmotickému šoku a za limitující koncentrace draselných iontů v prostředí. Výsledky pozorování pro mutantní kmeny MP2 a JTAM potvrzovaly dřívější pozorování zvýšené osmosenzitivity u kmenů s mutací v genu *yxkO* (obrázky 20 a 21, kap. 4.3.1). Při dlouhodobější kultivaci nebyl osmosenzitivní fenotyp pozorován a rozdíl růstu mutantní/divoký kmen nebyl znatelný (obrázky 23 a 24, kap. 4.3.1). U mutantního kmenu JTSP se mutace v genu *yxkO* při tomto typu kultivace neprojevovala zvýšenou osmosenzitivitou (obrázky 22 a 25, kap. 4.3.1).

Pro lepší porozumění tomuto fenoménu bylo rozhodnuto studovat růstové vlastnosti kmenů na úrovni dynamiky růstu bakteriální kultury v tekutém médiu. Mutantní a divoké kmeny byly kultivovány v tekutém minerálním médiu s limitací draselných iontů a část kultur byla vystavená osmotickému šoku. Růstové křivky sestavené dle výsledku těchto kultivací (obrázky 26, 27 a 28, kap. 4.3.3) ukazují v různé míře prodloužení lag fáze u mutantních kmenů oproti kmenům divokým po vystavení osmotickému šoku. Nejpatrnější prodloužení lag fáze bylo u kmenu JTAM, méně patrná u kmenů JTSP a MP2. Tato pozorování korelují s

pozorováním sníženého růstu na pevném médiu a také mizením rozdílu divoký/ mutantní kmen při dlouhodobější kultivaci. Z uvedeného plyne, že gen *yxkO* se dosud neznámým mechanismem účastní procesu adaptace k osmotickému šoku v podmínkách nedostatečné koncentrace draslíku. U přírodního izolátu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 má mutace v genu *yxkO* na osmoadaptaci mnohem menší vliv, pravděpodobněji díky komplexnějšímu mechanismu osmoadaptace než jaký je přítomen u laboratorního kmenu *Bacillus subtilis* 1A680.

V souvislosti s možností zapojení multifunkčního přenašeče TetA(L)(efflux tetracyklinu) schopného přenášet, kromě jiných substrátů, také draselné ionty, do procesu osmoadaptace u *Bacillus subtilis* 168 (Wang *et al.* 2000), jsme u studovaných kmenů diskovou diluční metodou stanovili relativní citlivost k tetracyklinu jednotlivých mutantů za různých růstových podmínek. Bakteriální kmeny byly kvantitativně naočkované na Petriho misky s různými médii a doprostřed naočkované půdy byl umístěn disk napuštěný antibiotikem, po 24 hodinové kultivaci jsme odečetli průměry inhibičních zón (Tabulka 2, kap. 4.3.2).

U divokého kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 (derivát kmenu 168) byla citlivost k tetracyklinu relativně nezávislá na typu média, od něj odvozený mutantní kmen MP2 naproti tomu vykazoval vyšší citlivost k tetracyklinu při vystavení osmotickému šoku a při limitním množství draslíku. Tato zjištění nasvědčují společnému zapojení produktu genu *yxkO* a proteinu TetA(L) do mechanismu osmoadaptace při limitní koncentraci draslíku.

Kmen *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6, u něž se vyskytuje protein TetB homologní k TetA(L) byl celkově citlivější než kmeny 1A680 a MP2, nejnižší citlivost k tetracyklinu vykazoval na LB médiu, na minerálních médiích se citlivost k tetracyklinu zvyšovala, zejména v kombinaci s osmotickým šokem, od něj odvozený mutantní kmen JTAM vykazoval oproti divokému kmenu mírně zvýšenou citlivost ve všech případech.

U kmenů 2A11 a JTSP není prokázána přítomnost homologního proteinu k TetA(L), což může být důvodem, proč u těchto kmenů nebylo pozorováno

zvýšení citlivosti k tetracyklinu v korelaci s přítomností mutace v genu *yxkO*. Nepřítomnost přenašeče může vysvětlovat i značnou citlivost obou kmenů k tetracyklinu ve srovnání s laboratorním kmenem *Bacillus subtilis* 168.

V předchozím studiu byl také popsán vliv mutace genu *yxkO* na velikostní odlišností mezi buňkami kmenů *Bacillus subtilis* 1A680 a MP2 (Streitová 2010). Rozhodli jsme se prověřit vliv mutace na morfologii buněk během růstu v minerálním tekutém médiu při vystavení osmotickému šoku a limitní koncentrací draslíku také v nedomestikovaných kmenech. U všech mutantních kmenů bylo pozorováno prodloužení buněk zejména po vystavení osmotickému šoku.

V dřívějších pracích byl také pozorován vliv mutace genu *yxkO* na motilitu buněk. Při kultivaci v minerálním médiu kmen MP2 neztrácel po vystavení osmotickému šoku motilitu na rozdíl od kmenu divokého (Streitová 2010). Studovali jsme motilitu mutantních kmenů při růstu v tekutém minerálním médiu s limitující koncentrací draslíku. Kmen MP2 se choval stejně jak již bylo popsáno. Na rozdíl od divokého kmenu neztrácel motilitu. Mutantní kmen JTAM nevykazoval rozdíl v motilitě od divokého kmenu 10A6, pohyblivé buňky po vystavení působení osmotického šoku ztráceli rychle schopnost motility. Kmen 2A11 ztrácel motilitu po osmotickém šoku pomaleji než ostatní kmény. Kmen JTSP se jevil před osmotickým šokem jako nepohyblivý po osmotickém šoku byl pohyblivý, ale později znovu motilitu ztratil (Tabulka 3).

V souvislosti se změnami motility a se změnou v zastoupení izoformem flagelinové proteinu Hag u mutantního kmenu MP2 oproti divokému kmenu po vystavení osmotickému šoku (Petrovová 2010) jsme se pokusili nalézt vhodnou metodu, s jejíž pomocí by bylo možné detekovat přítomnost bakteriálního bičíku. Pokusili jsme se optimalizovat Leifsonovu metodu barvení pro světelnou mikroskopii (Leifson 1951), ale výsledky nebyly optimální. Pokud se bičíky obarvily tak velice slabě a nedalo se s jistotou říci, zda se nejedná o artefakt při přípravě preparátu. Také se zdálo, že barvením se podařilo vizualizovat bičíky jen u malé frakce bakterií, které byly ale při nativním pozorování vysoce pohyblivé. Tato metoda se nakonec ukázala nepřesvědčivá pro vizualizaci bičíkatosti bakterií.

Obecně se dá říct, že bakteriální bičíky jsou k zobrazování nepříliš vděčným objektem, ať už se jedná o metody využívající elektronovou mikroskopii či světelnou. Problematická je zejména křehkost této struktury a ochotnost bakterií ztrácet bičíky po vystavení různým fyzikálním či chemickým stimulům.

V rámci změn motility jsme se při svém studiu zaměřili také na formu povrchové motility zvanou swarming. Tento druh translokace je uskutečňován pohybem bakteriální populace po povrchu tuhého média a jeho nezbytností jsou funkční bakteriální bičíky a sekrece látky snižující povrchové napětí surfaktinu (Kearns a Losick 2003). Bakteriální kmeny byly kultivovány v tekutém médiu a poté po dosažení $OD_{450} = 0,2$ byly kultury 100x naředěny sterilní vodou a nanесeny ve formě kapky o objemu 10 μ l do středů Petriho misek s 0,7% (w/v) agarem a ty byly kultivovány v termostatu při 28°C. Na kultivaci byla použita pevná média : LB (komplexní médium), K 0,5 (minerální médium s limitujícím draslíkem) a K 10 (minerální médium s nelimitujícím draslíkem).

Kmeny *Bacillus subtilis* 1A680 a MP2, v souvislosti s řadou známých mutací redukujících schopnost pohybu swarmingem u *Bacillus subtilis* 168 (Kearns a Losick, 2003), sloužily jako kontrola fenotypu kmenu, který není schopen tohoto pohybu. Na všech třech typech médií nebyl signifikantní rozdíl divoký versus mutantní kmen. Tyto dva kmeny na půdách pouze vytvářely ohraničené kolonie bez pohybu pomocí swarmingu (obrázky 35 a 38, kap. 4.4.2).

Kmeny *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 a JTSP vykazovaly stejné chování bez viditelného rozlišení mutantního kmenu od divokého. Tyto kmeny nevykazovaly swarming na minerálních médiích, ale na médiu komplexním byl swarming velmi robustní a rychlý u obou kmenů, kdy přes noc, co byly kultivovány, přerostly celý povrch Petriho misky (obrázky 37 a 40, kap. 4.4.2).

Rozdílné výsledky přineslo testování kmenů *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 a JTAM, oba tyto kmeny nebyly schopny swarmingu na minerálním médiu s limitní koncentrací draslíku. Na komplexním médiu a minerálním médiu s nelimitujícím draslíkem bylo pozorováno znatelné snížení projevů tohoto typu pohybu u mutantního kmenu (obrázky 36 a 39, kap. 4.4.2). Tyto výsledky

nasvědčují pro regulační vliv genu *yxkO* i na tento typ povrchové aktivity u *Bacillus amyloliquefaciens*.

Shrneme-li si některé výsledky našich pokusů:

- Swarming u žádného z testovaných kmenů nebyl pozorován na minerálním médiu s limitní koncentrací draslíku.
- *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 byl schopen swarmingu (kromě média komplexního) na minerálním médiu s nelimitující koncentrací draselných iontů, ale mutant tohoto kmenu s disrupcí genu *yxkO* swarmingu nebyl schopen.
- U kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 nebyl swarming na minerálním médiu s nelimitující koncentrací draslíku pozorován, byl pozorován pouze na LB médiu, kde se mutace v genu *yxkO* neprojevovala.

Z těchto faktů plyne závislost schopnosti swarmingu u *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 na dostatečné koncentraci draslíku v prostředí, a že mutace v *yxkO* tuto schopnost narušuje. U kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 není vysoká koncentrace draslíku dostačující pro umožnění tohoto pohybu. To nasvědčuje rozdílu v některém z mechanismů podílejících se na schopnosti swarmingu u těchto dvou kmenů, přičemž v tomto mechanismu hraje u *Bacillus amyloliquefaciens* roli gen *yxkO*.

Dosud je známo, že pro swarming je nezbytná změna morfologie buňky, zmnožení a funkčnost bičků a produkce surfaktinu. U *Bacillus amyloliquefaciens* by mohl být mechanismus podílející se na swarmingu, který je narušen mutací v genu *yxkO* (s ohledem na roli genu *yxkO* v osmoadaptaci při limitujícím draslíku) závislý na koncentraci draslíku v médiu. Kandidátem na mechanismus závislý na koncentraci draslíku je sekrece surfaktinu. Sekrece surfaktinu není dosud přesně popsána, předpokládá se role transportéru SwrC z rodiny AcrB transportérů (multidrug resistance pump) (Kearns *et al.* 2004), ale není vyloučena role dalších přenašečů.

K ověření vlivu mutace v genu *yxkO* na sekreci surfaktinu jsme na krevním

agaru testovali schopnost studovaných kmenů hemolyzovat červené krvinky, což je dokladem sekrece surfaktinu (metoda Youssef *et al.* 2004). Výsledky však neukázaly rozdílnou sekreci surfaktinu u kmenů *Bacillus amyloliquefaciens* 10A6 a JTAM, ale u kmenů *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* 2A11 a JTSP (obrázek 41, kap. 4.4.2.1). Tyto výsledky naznačují, že je sekrece surfaktinu ovlivněná mutací v genu *yxkO*, ale celkově je její interpretace obtížná a pochopení tohoto problému by si vyžadovalo další podrobnější studium.

V rámci diplomové práce jsme také provedli základní srovnání podobnosti studovaných kmenů. Kmeny *Bacillus subtilis* 168 a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, jakožto blízké příbuzné vykazují na úrovni organizace genomu, jeho velikosti i jím nesených funkcí, značnou podobnost. Kmen *Bacillus amyloliquefaciens* je fylogeneticky vzdálenější a vykazuje větší rozdíly k oběma dalším kmenům. Významným pro tuto práci byl zejména rozdíl v bezprostředím okolí genu *yxkO*, a to zejména absence operonu sigmafaktoru σ^Y , jehož ovlivnění případným polárním efektem mutace genu *yxkO* by mohlo hrát roli v projevech této mutace (obrázek 42, kap. 4.5). Naše výsledky tento předpoklad nepotvrdily.

Rozdílné projevy mutace genu *yxkO* u tří studovaných kmenů jsou otázkou hlubšího poznání mechanismů uplatňujících se nejen při osmoadaptaci, ale také motilitě, citlivosti k tetracyklinu a produkci surfaktinu. Projevy mutace v *yxkO* částečně korelovali u kmenů odvozených od *Bacillus subtilis* 168 a *Bacillus amyloliquefaciens*, zejména v porovnání růstových vlastností. Vysvětlením některých vlastností těchto kmenů souvisejících s osmoadaptací a resistencí k tetracyklinu by mohla být role *yxkO* v regulaci funkce přenašeče TetA(L), respektive TetB, u těchto kmenů. Tuto hypotézu podporuje relativně nižší projev mutace v *yxkO* u kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, u kterého není přítomen obdobný transportní systém. Rozdíl v schopnosti swarmingu kmenů odvozených od *Bacillus amyloliquefaciens* a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* naznačuje rozdílný mechanismus regulace tohoto pohybu, ve kterém zřejmě u *Bacillus amyloliquefaciens* hraje roli dostatek draslíku v prostředí.

Vysvětlením rozdílu zejména mezi kmeny *Bacillus subtilis* 168 a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, může být také rozdílná míra laboratorní domestikace těchto kmenů, u které je známo že ovlivňuje řadu vlastností spojených se swarmingem (Kearns a Losick 2003) a strukturou bakteriálních kolonií (Branda *et al.* 2001). Laboratorní domestikace probíhá jako určitý typ adaptace, bakterie jsou selektovány prostředím, které je při laboratorních manipulacích často velmi konstantní nebo jen omezeně variabilní, zejména pokud nejde o kultivace pokusné, ale sloužící k namnožení a uchování bakteriálního kmenu. Je známo, že při evolučních pokusech, kdy byla *Escherichia coli* soustavně kultivována v minerálním médiu s glukózou, docházelo velmi rychle ke genetickým změnám, adaptivní mutace se rychle objevovaly již v prvních 2 000 generacích (Croizat *et al.* 2005, Schneider *et al.* 2000). 2 000 generací při růstu v komplexním médiu, kde může být doba zdvojení blízka 30 minutám, představuje asi 1000 hodin kultivace, což při vědomí, že například *Bacillus subtilis* a jiné modelové organizmy jsou studovány už několik desetiletí, zvyšuje důležitost fenoménu laboratorní domestikace. U *Bacillus subtilis* nebyly dosud provedeny obdobné studie dlouhodobé kultivace jako u *Escherichia coli*. Výhodou takového dlouhodobého pokusu u *Bacillus subtilis* jsou u tohoto druhu známé projevy domestikace na úrovni multicelulárních vlastností jako je komplexnost morfologie kolonií nebo schopnost swarmingu. U *Bacillus subtilis* by tedy bylo možné sledovat během dlouhodobé kultivace, zda dochází ke ztrátě zmíněných vlastností a to relativně jednoduchými metodami a pak následně přistoupit k sekvenačním analýzám.

Během procesu domestikace, ale i obecněji během evoluce druhu, dochází nejen k získávání nových adaptivních vlastností, ale i ztrátě vlastností, které by kdysi poskytovaly organizmu výhodu staly se časem zbytečnými. Takto se mohou organizmy po dlouhodobé kultivaci zbavit některých mechanismů zprostředkujících jim adaptaci na prostředí, se kterým se již dlouho nesečkali a při následném vystavení takovému prostředí u nich nabývají významu mechanismy původně podružné nebo regulující jiné procesy. Toto by mohl být i případ genu *yxkO* a s ním spojené reakce na osmotický stres.

Dalším úkolem v rámci mé diplomové práce bylo studium obecné stresové

odpovědi u kmenu s mutací v genu *yxkO*. Rozhodli jsme se pro sledování exprese genů σ^B regulonu řídícího obecnou stresovou odpověď. Pro tento účel jsme připravili rekombinantní plazmid nesoucí fúzi promotorové části genu *ctc* kódující obecně stresový protein, genu ze σ^B regulonu, který byl pro tento účel již dřív využit (Ray *et al.* 1985), se strukturní částí reportérového genu *lacZ* kódujícího β - galaktosidázu. Tento konstrukt jsme transformovali do kmenů *Bacillus subtilis* 1A680 a *Bacillus subtilis* MP2. Použitý plazmid nesl dvojici homologních sekvencí k částem genu *amyE* *Bacillus subtilis* díky nimž došlo pomocí dvojitého crossingoveru k vložení části plazmidu s fúzí promotoru *ctc* a genu *lacZ* do chromozomálního genu *amyE* u studovaných kmenů. Tyto kmeny byly nazvány *Bacillus subtilis* 1A680/Pctc a *Bacillus subtilis* MP2/Pctc.

U připravených kmenů byla ověřena přítomnost fúzovaného genu *ctc/lacZ* pomocí PCR reakce z primerů ymyE2R (primer nasedající uvnitř genu *amyE*) a *ctc_prom_R* (jeden z primeru pro tvorbu fragmentu *ctc_prom*). Ověření bylo doplněno sekvenací. Funkčním ověřením přítomnosti fúze *ctc/lacZ* bylo testování aktivity β - galaktosidázy při etanolovém šoku v LB médiu. Toto ověřením ukázalo detekovatelnou aktivitu β - galaktosidázy vzrůstající po etanolovém šoku u obou kmenů (obrázek 44, kap. 4.6.3.1) a tedy i funkčnost našeho systému pro stanovení míry obecné stresové odpovědi.

Kromě již zmíněného stanovení σ^B odpovědi pro etanolový šok, byla míra obecné stresové odpovědi stanovena také pro šok osmotický a to při růstu na komplexním médiu LB (obrázek 45, kap. 4.6.3.2), na médiu minerálním K0 s limitující koncentrací draselných iontů (obrázek 47, kap. 4.6.3.4) a minerálním médiu s nelimitující koncentrací draselných iontů K10 (obrázek 46, kap. 4.6.3.3). Dále pak byla také testována schopnost náhlého snížení koncentrace draselných iontů vyvolat obecnou stresovou odpověď u *Bacillus subtilis* 1A680. Po osmotickém šoku stejně jako po etanolovém byl relativní nárůst aktivity β - galaktosidázy spojené s expresí z promotoru genu *ctc* signifikantně vyšší u divokého kmenu 1A680 než u kmenu s přerušením genu *yxkO*. Z dosažených výsledků vyplývá, že gen *yxkO* není pouze, jako σ^B závislý gen, řízen obecnou stresovou odpovědí, ale že se pravděpodobně sám neznámým mechanismem účastní její modulace na úrovni exprese σ^B genů. Situace při osmotickém šoku

na K 0 médiu s limitací draselnými ionty, naznačovala aktivovanou σ^B odpověď u divokého kmenu 1A680 již před vystavení osmotickému šoku, tedy aktivací prostřednictvím nízké koncentrace draselných iontů. Pro ověření této hypotézy, že snížení extracelulární koncentrace draselných iontu je schopné vyvolat obecnou stresovou odpověď u *Bacillus subtilis* 168 jsme provedli pokus, kdy byly bakteriální kultury kmenů *Bacillus subtilis* 1A680 a *Bacillus subtilis* MP2 přeneseny z minerálního média s dostatečnou koncentrací draselných iontů přeneseny do minerálního média s limitací draselných iontů. Kmeny byly kultivovány v minerálním médiu s nelimitující koncentrací draselných iontů K 10 a po dosažení optické denzity $OD_{450} = 0,4$ byly tyto kultury filtrovány přes bakteriologický filtr a následně resuspendovány a kultivovány v médiu s limitující koncentrací draselných iontů K 0. Stoupající aktivita β - galaktosidázy u kmenu *Bacillus subtilis* 1A680 po přenesení do média s limitací draselných iontů potvrzuje předpoklad, že nedostatek draslíku vyvolává obecnou stresovou odpověď. Navíc tento pokus potvrdil, že je vyvolávána snížená míra obecné stresové odpovědi u kmenu s mutací genu *yxkO* *Bacillus subtilis* MP2.

Toto zjištění může vysvětlovat i pozorování vlivu genu *yxkO* na ostatní fenotypy a nižší vliv přerušení tohoto genu v přírodních izolátech, ve kterých může být lépe zajištěno udržování homeostáze během limitní koncentrace draslíku. Toto bude muset být podpořeno dalšími pokusy. Bohužel se nám nepodařilo připravit mutanty umožňující měřit míru obecné stresové odpovědi i u ostatních testovaných kmenů, protože *amy* locus, který je využit pro vložení rekombinantního plazmidu má u těchto kmenů pouze 95 a 90% homologii k *amy* locusu *Bacillus subtilis* 168, což nestačí k vytvoření potřebných rekombinant. Do budoucna je potřeba upravit použité vektory a provést měření i na nedomestikovaných kmenech.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo popsat fenotypové projevy, zejména spojené s růstovými vlastnostmi, motilitou a schopností osmoadaptace u bakteriálních kmenů rodu *Bacillus* s přerušením genu *yxkO*. Během této práce bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Byly připraveny mutantní kmeny odvozené od přírodního izolátu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, kmen JTSP, a *Bacillus amyloliquefaciens*, kmen JTAM, s přerušením genu *yxkO* inzercí plazmidu pMUTIN4.
2. Na těchto kmenech, ke kterým byl připojen také kmen se stejnou mutací odvozený od laboratorního kmenu *Bacillus subtilis* 168, kmen MP2, připravený v naší laboratoři již dříve, byl potvrzen vliv genu *yxkO* na osmoadaptaci při limitující koncentraci draslíku v prostředí, zejména u kmenů MP2 a JTAM. Také byla pozorována změna morfologie bakteriálních buněk. U kmenu JTSP byly projevy mutace v *yxkO* mnohem slabší.
3. U kmenů MP2 a JTAM bylo zjištěno zvýšení citlivosti k tetracyklinu zřejmě v souvislosti vlivu mutace genu *yxkO* na multifunkční tetracyklin/ K^+ přenašeč TetA(L), respektive TetB, o němž se předpokládá, že se účastní mechanismu osmoadaptace. Kmen 2A11 byl celkově citlivější k tetracyklinu než kmen MP2. U tohoto kmenu nebyl pozorován vliv mutace v genu *yxkO* na citlivost k tetracyklinu. Tento kmen neobsahuje transportní protein odpovídající transportéru TetA(L).
4. Při studiu vlivu mutace v genu *yxkO* na motilitu studovaných kmenů byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými kmeny :
 - I. Vliv mutace na motilitu v tekutém médiu při vystavení osmotickému šoku. U kmenu MP2 byl potvrzen vliv mutace na motilitu v tekutém médiu při vystavení osmotickému šoku, na rozdíl od příslušného divokého kmenu je motilní i po vystavení osmotickému šoku. Tento projev nebyl u kmenů JTAM a JTSP pozorován.
 - II. Byl prokázán vliv mutace v genu *yxkO* na schopnost swarmingu pouze u kmenu JTAM. Následující stanovení produkce surfaktinu (surfaktantu nezbytného pro tento pohyb) nasvědčuje, že ztráta

swarmingu u JTAM není dána narušením jeho produkce. JTSP byl mobilní i po osmotickém šoku.

5. Ve všech případech porovnávání vlastností testovaných kmenů byl pozorován rozdílný vliv mutace v genu *yxkO* v závislosti na úrovni laboratorní domestikace. U kmenu JTSP odvozeného od nedomestikovaného kmenu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* byl projev mutace znatelně menší než u dvou dalších kmenů.
6. Byly připraveny kmeny *Bacillus subtilis* 168 a MP2 s detekovatelnou expresí reprezentativního genu obecné stresové odpovědi.
7. Byla měřena míra obecné stresové odpovědi u těchto kmenů při vystavení osmotickému a etanolovému šoku. Byla detekována významně nižší úroveň obecné stresové odpovědi u kmenu s mutací genu *yxkO*.
8. Bylo prokázáno, že snížení koncentrace draselných iontů v prostředí je schopné vyvolat obecnou stresovou odpověď u *Bacillus subtilis* 168.

7. SEZNAM LITERATURY

Aguilar, C., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2007): Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiol.* 10: 638-643.

Altendorf, K., Voelker, P., Puppe, W., (1994): The sensor kinase KdpD and response regulator KdpE control expression of the kdpFABC operon in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 145: 374-381.

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

Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G. M., Hughes, C. (2001): Flagellin polymerisation control by cytosolic export chaperon. *J. Mol. Biol.* 2: 221-229.

Barrick, J. E., Su Yu, D., Ho Yoon, S., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Lenski, R. E., Kim, J. F. (2009): Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* 461: 1243-1247.

Bergara, F., Ibarra, C., Iwamasa, J., Patarroyo, J. C., Aguilera, R., Márquez-Magana, L. M. (2003): CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185: 3118-3126.

Benson, A. K., Haldenwang, W. G. (1993): The σ_B -dependent promoter of the *Bacillus subtilis* sigB operon is induced by heat shock. *J. Bacteriol* 175: 1929-1936

Bennett, A. F., Lenski, R. E. (2007): An experimental test of evolutionary trade-offs during long temperature adaptation. *PNAS* 104: 8649-8654.

Bindel Connelly, M., Young, G. M., Sloma, A. (2004): Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186: 4158-4167.

- Boylan, A. S., Rutherford, A., Thomas, S. M., Price, Ch. W. (1992): Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B by a regulatory pathway responsive to stationary-phase signals. *J. Bacteriol.* 174: 3695-3706.
- Boylan, A. S., Redfield, A. N., Brody, M. S., Price, Ch. W. (1993): Stress-induced activation of the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175: 7931-7937.
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. (2001): Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *PNAS* 98: 11621-11626.
- Brantl, S., Licht, A. (2010): Characterisation of *Bacillus subtilis* transcriptional regulators involved in metabolic processes. *Current Protein and Peptide Science* 11:274-291.
- Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Cecilian, F., Galizzi, A., Senesi, S. (2005): Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J. Bacteriol.* 187: 5356-5366.
- Calvio, C., Osera, C., Amati, G., Galizzi, A. (2008): Autoregulation of *swrAA* and motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190: 5720-5728.
- Caramori, T., Barilla, D., Nesii, C., Sacchi, L., Galizzi, A. (1996): Role of FlgM in sigma D-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178: 3113-3118.
- Chilcott, G. S., Hughes, K. T. (2000): Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. and Mol. Biol. Review.* 64: 694-708.
- Conrad, T. M., Lewis, N. E., Palsson, B. O. (2011): Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol. Systems Biol.* 7: 509.

Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H., Zuber, P. (1998): Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on Spo0K oligopeptide permease and the ComXQ system of extracellular control. *J. Bacteriol.* 180: 1438-1445.

Crozat, E., Philippe, N., Lenski, R. E., Giselman, J., Schneider, D. (2005): Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection. *Genetics* 169: 523-532.

Crozat, E., Hindré, T., Kühn, L., Garin, J., Lenksi, R. E., Schneider, D. (2011): Altered regulation of OmpF porin by Fis in *Escherichia coli* during an evolution experiment between B and K-12 strains. *J. Bacteriol* 193: 429-440.

Czonka, L. N., Hanson, A. D. (1991): Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Rev. Microbiol.* 45:569-606.

Dixit, M., Murudkar, Ch. S., Rao, K. K. (2002): *epr* is transcribed from a σ^D promoter and is involved in swarming of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184: 596-599.

Dordet-Frisoni, E., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Leroy, S. (2008): Surface migration of *Staphylococcus xylosus* on low-agar media. *Research in Microbiol.* 159: 163-169.

Errington, J., Vogt, C. (1990): Isolation and characterization of mutations in the gene encoding an endogenous *Bacillus subtilis* β - galactosidase and its regulator. *J. Bacteriol.* 172: 488 - 490.

Fraser, G. M., Hughes, C. (1999): Swarming motility. *Current Opinion in Microbiol.* 2: 630-635.

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.

Gassel, M., Altendorf, K. (2001): Analysis of KdpC of the K⁺-transporting KdpFABC complex of *Escherichia coli*. European J. of Biochemistry 6: 1772-1781.

Gupta, M., Rao, K. K. (2009): Epr play a key role in DegU-mediated swarming motility of *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 295: 187-194.

Handke, L. D., Shivers, R. P., Sonenshein, A. L. (2008): Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. J. Bacteriol. 190: 798-806.

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

Henrichsen, J. (1972): Bacterial surface translocation: a survey and a classification. Bacteriol. Reviews. 36: 478-503.

Hellman, J. D. (1991): Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. Molecular Biology 5 (12): 2875-2882.

Hoffmann, T., Boiangiu, C., Moses, S., Bremer, E. (2008): Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. App. Env. Microbiol. 74: 2454-2460.

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

Holtman, 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. 185:1289-1298.

- Holtman, G., Bremer, E. (2004): Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J. Bacteriol.* 186: 1683-1693.
- Hsueh, Y-H., Cozy, L. M., Sham, L-T., Calvo, R. A., Gutu, A. D., Winkler, M. E., Kearns, D. B. (2011): DegU-phosphate activates expression of the anti-sigma factor FlgM in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 81: 1092-1108.
- Ikeda, T., Oosawa, K., Hotani, H., (1996): Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure. *J. Mol. Biol.* 4: 679-686.
- Joseph, P., Ratnayake- Lecamwasam, M., Sonenshein, A. L. (2005): A region of *Bacillus subtilis* CodY protein for interaction with DNA. *J. Bacteriol.* 187: 4127-4139.
- Kearns, D. B., Losick, R. (2003): Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiology*: 49: 581-590.
- Kearns, D. B., Chu, F., Rudner, R., Losick, R. (2004): Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol. Microbiol.* 52: 357-369.
- Kearns, D. B., (2010): A field guide to bacterial swarming motility. *Nature* 8: 634-644.
- Kensuke, T., Ogura, M. (2008): Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/che* operon and *sacB*. *BMC Mikrobiol.* 8:8
- Kobayashi, K. (2007): Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. biology* 66:395-409.

Laimins, L. A., Rhoads, D. R., Altendorf, K., Epstein, W. (1978): Identification of the structural proteins of an ATP-driven potassium transport system in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 3216-3219.

Leifson, E. (1951): Staining, Shape, and Arrangement of Bacterial Flagella. J. Bacteriol. 62: 377-389.

Link, A. J., Phillips, D., Church, G. M. (1997): Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. J. Bacteriol. 179: 6228–6237.

Luo, Y., Asay, K., Sadaie, Y., Helmann, J. D. (2010): Transcriptomic and phenotypic characterization of a *Bacillus subtilis* strain without extracytoplasmatic function σ factors. J. Bacteriol. 192: 5736 - 5745

Majerczyk, Ch. D., Sadykov, M. R., Luong, T. T., Lee, Ch., Somerville, G. A., Sonenshein, A. L. (2008): *Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. J. Bacteriol. 190: 2257-2265.

Mignot, T. (2007): The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. Cell. Mol. Life Sci. 64: 2733-2745.

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

Nakano, M. M., Marahiel, M. A., Zuber, P. (1988): Identification of genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptid antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 170: 5662-5668.

Nakano, M. M., Corbell, N., Besson, J., Zuber, P. (1992): Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. Mol. and Gen. Genetics MGG. 232: 313-321.

Oren, A. (2008): Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems* 4:2.

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

Petrovová, M. (2010): Úloha genu *yxkO* *Bacillus subtilis* v odpovědi na enviromentální stres. Diplomová práce.

Philippe, N., Pelosi, L., Lenski, R. E., Schneider, D. (2009): Evolution of penicillin-binding protein 2 concentration and cell shape during a long-term experiment with *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191: 909-921.

Preis, H., Eckart, R. A., Gudipati, R. K., Heidrich, N., Brantl, S. (2009): CidY activates transcription of a small RNA in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191: 5446-5457.

Ray, C., Hay, R. E., Carter, H. L., Moran jr., Ch. P. (1985): *J. Bacteriol.* 163: 610-614

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

Schneider, D., Duperchy, E., Coursange, E., Lenski, R. E., Blot, M. (2000): Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* 156: 477-488.

Sleator, R. D., Hill, C. (2001): Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbial Reviews.* 26: 49-71.

Stanek, M. T., Cooper, T. F., Lenski, R. E. (2009): Identification and dynamics of beneficial mutation in a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. BMC Evolutionary Biol. 9: 302.

Streitová, E. (2010): Studium vlivu genu *yxkO* *Bacillus subtilis* na motilitu během odpovědi na osmotický stres. Diplomová práce.

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

Sturr, M. G., Ablooglu, A. J., Krulwich, T. A. (1997): A *Bacillus subtilis* locus encoding several gene products affecting transport of cations. Gene 188: 91-94.

Šebestian, J., Petrmichlová, Z., Šebestianová, Š., Náprstek, J., Svobodová, J. (2001): Osmoregulation in *Bacillus subtilis* under potassium limitation: a new inducible K⁺ -stimulated, VO₄³⁻-ATPase. Can. J. Microbiol. 47: 116-1125.

Timmermans, J., Van Melderen, L. (2010) Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. Cell. Mol. Life Sci. 67: 2897-1908.

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

Trchounian, A., Kobayashi, H. (1999): Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH. FEBS Letters 447: 144-148.

Ulanova, D. (2005): Genetická analýza osmosenzitivní mutanty *Bacillus subtilis*. Diplomová práce.

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

Veening, J-W., Kuipers, O. P., Brul, S., Hellingwerf, K. J., Kort, R. (2006): Effects of phosphorelay perturbation on architecture, sporulation and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188: 3099-3109.

Verhamme, D. T., Kiley, T. B., Stanley-Wall, N. R. (2007): DegU co-ordinates multicellular behavior exhibited by *Bacillus subtilis*. *Mol. Biology* 65: 554-568.

Wang, W., Guffanti, A. A., Wei, Y., Ito, M., Krlwich, T. A. (2000): Two types of *Bacillus subtilis tetA(L)* deletion strains reveal the physiological importance of TetA(L) in K⁺ acquisition as well as in Na⁺, alkali, and tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* 182: 2088-2095

West, J. T., Estacio, W., Márquez-Magana, L. M. (2000): Relative roles of the *fla/che PA*, *PD-3* and *PsigD* promoters in regulating motility and *sigD* expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182: 4841-1818.

Whatmore, A. M., Chudek, J. A., Reed, R. H. (1990): Effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. General Microbiol.* 136:2527-2535.

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

Yasumura, A., Abe, S., Tanaka, T. (2008): Involvement of nitrogen regulation in *Bacillus subtilis degU* expression. *J. Bacteriol.* 190: 5162-5171.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., McInerney, M. J. (2004): Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiological Methods* 56: 339-347.

Zhang, R. G., Grembecka, J., Vinokour, E., Collart, F., Dementieva, I., Minor, W., Joachimiak, A.,(2002): Structure of *Bacillus subtilis* YXKO- a member of the UPF0031 family and a putative kinase. *J. Structural Biology* 193: 161-170.