

BACILLUS JAKO MODEL

Model, genetické manipulace, sporulace

Bacillus sp. - informační zdroje

- Literatura:
- *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from gene to cells. Eds.: Sonenshein, Hoch, Losick. ASM Press Washington D.C. 2001
- *Bacillus subtilis* and its closest relatives: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Eds.: Sonenshein. ASM Press Washington D.C. 1993.
- Molecular biological methods for *Bacillus*. Eds.: Harwood, Cutting. J. Wiley and Sons Ltd, England. 1990.
- *Bacillus subtilis* as a model for bacterial systems biology. Colin R Harwood, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES & 2007, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

Bacillus sp. – informační zdroje

- webové servery:
- BSORF - <http://bacillus.genome.jp/bsorf.html>
- Subtilist database – <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList>
- genová banka
- BGSC – <http://www.bgsc.org>

Bacillus Genetic Stock Center

The BGSC collection currently includes:

<ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Home <input type="radio"/> Scope <input type="radio"/> Search <input type="radio"/> Catalogs <input type="radio"/> Order <input type="radio"/> New! <input type="radio"/> Movies <input type="radio"/> DNA Services <input type="radio"/> Links 	<table border="0"> <tr> <td><i>Bacillus subtilis</i></td> <td>1053 mutants derived from <i>B. subtilis</i> 168, plus 29 other strains derived from non-168 backgrounds</td> </tr> <tr> <td><i>Bacillus thuringiensis</i></td> <td>152 wild type isolates and mutant derivatives</td> </tr> <tr> <td><i>Bacillus cereus</i>, <i>B. mycooides</i></td> <td>27 isolates, including the genomically sequenced strains ATCC 10987 and ATCC 14579</td> </tr> <tr> <td><i>Bacillus sphaericus</i></td> <td>137 isolates and mutants, plus 15 other round-spore isolates from <i>B. pycnos</i> and <i>B. fusiformis</i></td> </tr> <tr> <td><i>Bacillus licheniformis</i></td> <td>39 isolates and mutants</td> </tr> <tr> <td><i>Bacillus megaterium</i></td> <td>39 isolates and mutants</td> </tr> <tr> <td><i>Geobacillus</i></td> <td>38 isolates from <i>Geobacillus stearothermophilus</i> and 8 other <i>Geobacillus</i> species</td> </tr> <tr> <td><i>Brevibacillus</i></td> <td>18 isolates from <i>Brevibacillus brevis</i>, <i>B. laterosporus</i>, <i>B. borstelensis</i>, and <i>B. centrosporus</i></td> </tr> <tr> <td><i>Paenibacillus</i></td> <td>12 isolates from <i>Paenibacillus alvei</i>, <i>P. dentritiformis</i>, <i>P. vorticalis</i>, <i>P. popilliae</i>, <i>P. thiaminolyticus</i>, and <i>P. macerans</i></td> </tr> <tr> <td><i>Marinibacillus</i></td> <td>the type strain of <i>Marinibacillus marinus</i></td> </tr> <tr> <td><i>Aneurinibacillus</i></td> <td>the type strains of <i>Aneurinibacillus aneurinolyticus</i> and <i>A. migulanus</i></td> </tr> <tr> <td><i>Sporosarcina</i></td> <td>one sporulation-proficient derivative of <i>Sporosarcina ureae</i></td> </tr> <tr> <td><i>Virgibacillus</i></td> <td>one strain of <i>Virgibacillus marismortui</i></td> </tr> <tr> <td><i>Escherichia coli</i></td> <td>158 strains bearing cloning vectors or cloned <i>Bacillus</i> DNA</td> </tr> <tr> <td>Other species</td> <td>32 isolates from <i>B. amyloquefaciens</i>, <i>B. atrophaeus</i>, <i>B. badius</i>, <i>B. coagulans</i>, <i>B. circulans</i>, <i>B. clausii</i>, <i>B. lentus</i>, <i>B. mojavensis</i>, <i>B. pallidus</i>, <i>B. polymyxa</i>, and <i>B. pumilus</i></td> </tr> <tr> <td>Bacteriophages</td> <td>53 <i>Bacillus subtilis</i> lysogens and 42 lytic phages of <i>B. cereus</i>, <i>B. subtilis</i>, and <i>B. thuringiensis</i></td> </tr> <tr> <td>Strain collections of:</td> <td>E. W. Freese, J. Lederberg, B. Reilly, A. A. Yousten, and S. A. Zahler</td> </tr> </table>	<i>Bacillus subtilis</i>	1053 mutants derived from <i>B. subtilis</i> 168, plus 29 other strains derived from non-168 backgrounds	<i>Bacillus thuringiensis</i>	152 wild type isolates and mutant derivatives	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. mycooides</i>	27 isolates, including the genomically sequenced strains ATCC 10987 and ATCC 14579	<i>Bacillus sphaericus</i>	137 isolates and mutants, plus 15 other round-spore isolates from <i>B. pycnos</i> and <i>B. fusiformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	39 isolates and mutants	<i>Bacillus megaterium</i>	39 isolates and mutants	<i>Geobacillus</i>	38 isolates from <i>Geobacillus stearothermophilus</i> and 8 other <i>Geobacillus</i> species	<i>Brevibacillus</i>	18 isolates from <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. borstelensis</i> , and <i>B. centrosporus</i>	<i>Paenibacillus</i>	12 isolates from <i>Paenibacillus alvei</i> , <i>P. dentritiformis</i> , <i>P. vorticalis</i> , <i>P. popilliae</i> , <i>P. thiaminolyticus</i> , and <i>P. macerans</i>	<i>Marinibacillus</i>	the type strain of <i>Marinibacillus marinus</i>	<i>Aneurinibacillus</i>	the type strains of <i>Aneurinibacillus aneurinolyticus</i> and <i>A. migulanus</i>	<i>Sporosarcina</i>	one sporulation-proficient derivative of <i>Sporosarcina ureae</i>	<i>Virgibacillus</i>	one strain of <i>Virgibacillus marismortui</i>	<i>Escherichia coli</i>	158 strains bearing cloning vectors or cloned <i>Bacillus</i> DNA	Other species	32 isolates from <i>B. amyloquefaciens</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. badius</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. mojavensis</i> , <i>B. pallidus</i> , <i>B. polymyxa</i> , and <i>B. pumilus</i>	Bacteriophages	53 <i>Bacillus subtilis</i> lysogens and 42 lytic phages of <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>B. thuringiensis</i>	Strain collections of:	E. W. Freese, J. Lederberg, B. Reilly, A. A. Yousten, and S. A. Zahler
<i>Bacillus subtilis</i>	1053 mutants derived from <i>B. subtilis</i> 168, plus 29 other strains derived from non-168 backgrounds																																		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	152 wild type isolates and mutant derivatives																																		
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. mycooides</i>	27 isolates, including the genomically sequenced strains ATCC 10987 and ATCC 14579																																		
<i>Bacillus sphaericus</i>	137 isolates and mutants, plus 15 other round-spore isolates from <i>B. pycnos</i> and <i>B. fusiformis</i>																																		
<i>Bacillus licheniformis</i>	39 isolates and mutants																																		
<i>Bacillus megaterium</i>	39 isolates and mutants																																		
<i>Geobacillus</i>	38 isolates from <i>Geobacillus stearothermophilus</i> and 8 other <i>Geobacillus</i> species																																		
<i>Brevibacillus</i>	18 isolates from <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. borstelensis</i> , and <i>B. centrosporus</i>																																		
<i>Paenibacillus</i>	12 isolates from <i>Paenibacillus alvei</i> , <i>P. dentritiformis</i> , <i>P. vorticalis</i> , <i>P. popilliae</i> , <i>P. thiaminolyticus</i> , and <i>P. macerans</i>																																		
<i>Marinibacillus</i>	the type strain of <i>Marinibacillus marinus</i>																																		
<i>Aneurinibacillus</i>	the type strains of <i>Aneurinibacillus aneurinolyticus</i> and <i>A. migulanus</i>																																		
<i>Sporosarcina</i>	one sporulation-proficient derivative of <i>Sporosarcina ureae</i>																																		
<i>Virgibacillus</i>	one strain of <i>Virgibacillus marismortui</i>																																		
<i>Escherichia coli</i>	158 strains bearing cloning vectors or cloned <i>Bacillus</i> DNA																																		
Other species	32 isolates from <i>B. amyloquefaciens</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. badius</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. mojavensis</i> , <i>B. pallidus</i> , <i>B. polymyxa</i> , and <i>B. pumilus</i>																																		
Bacteriophages	53 <i>Bacillus subtilis</i> lysogens and 42 lytic phages of <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>B. thuringiensis</i>																																		
Strain collections of:	E. W. Freese, J. Lederberg, B. Reilly, A. A. Yousten, and S. A. Zahler																																		

BSORF

Bacillus subtilis Genome Database

Search ORFs:

View chromosomal locations

List of mutants [reference]

DNA array data [references]

Search against genome sequence

Search against coding sequences

Download KEGArray

KEGG Expression Database

Welcome to the SubtiList World-Wide Web Server

Data Release R16.1 (Apr 26, 2001)
WWW server v3.1

This image is clickable if your client supports HTML 3.0

Note: This server is best viewed with Netscape Navigator 3.0 or later, or Microsoft Internet Explorer 3.0 or later. It requires a browser that supports and has JavaScript enabled.

MAIN SEARCHES

Search

Gene name ?

Partial name

Synonym

Region 20 kb

Location ?

From

To

kb

Free text ?

Functional category ?

or enter code:

OTHER SEARCHES

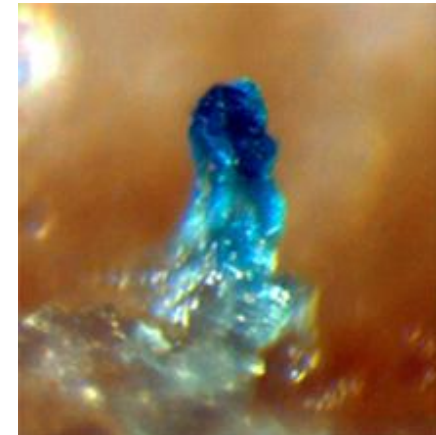
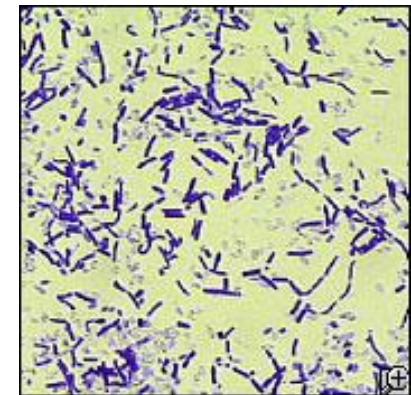
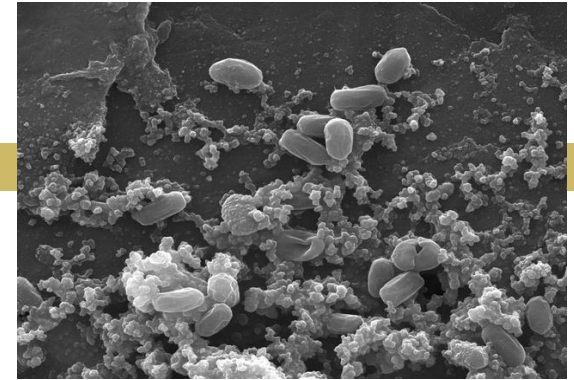
Sequence Analysis

Visit the following links to learn more about this server:

- About SubtiList
- The *Bacillus subtilis* genome sequencing project
- General help
- What's new? (last updated April 26, 2001)
- Current data release (last up-dated April 26, 2001)
- Stand-alone 4D version of SubtiList
- Downloading flat files of SubtiList

Bacillus sp.

- Aerobní, tyčkovitého tvaru, endospory tvořící, G+bakterie s nízkým poměrem G+C párů
- 50 popsanych druhů
- 1872 Ferdinand Cohn – *Bacillus subtilis* 174 (ATCC6051)
- *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. clausii*, *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. pycnus*, *B. circulans*, *B. badius*, *B. macerans*, *B. polymyxa*,



Bacillus subtilis

□ Historie

■ Luis Pasteur – 1. antibakteriální vakcína

- teplem inaktivovaný

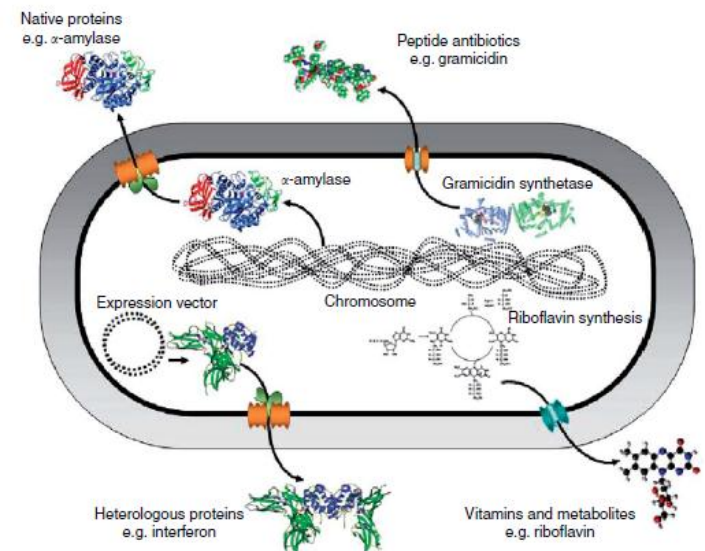
■ Robert Koch – anthrax – postulování závislosti infekčního agens a specifické nemoci

■ do poloviny 20. století – zájem o jeho funkci

- infekční choroby (lidské, zvířecí, hmyzí, rostlinné)
- producent antibiotik a proteas, další užitečné produkty
 - alkaline protease (subtilisin), α -amylase.
- vznik spor

■ jako experimentální model

- mechanismus genové regulace
- studium metabolismu
- diferenciacce



Bacillus subtilis

□ Historie

□ 1947 – P.R.Burkholder, N.H.Giles

- expozice kmene B.s. Marburg – paprsky X
 - izolace velkého množství auxotrofních mutant
 - základ pro studium syntézy a metabolismu aminokyselin
 - mechanistické studie rekombinace

□ 1958 – J. Spizizen

- B.s.168 kmen s tryptofanovou auxotrofií
 - první pokusy demonstrující transformaci

□ 1966-1977- Spizizen, Schaeffer, Hoch

- izolace a mapování nesporulujících mutant
- elektron mikroskopické snímky v různých stádiích sporulace

Bacillus subtilis

- **2. nejstudovanější bakteriální model**
 - snadná genetická manipulovatelnost
 - schopnost sporulace
- později modelový G⁺ organismus
- druhá polovina 70. let – začátek DNA rekombinantních technik
 - 1978 – 1979 – objevení alternativních sigma faktorů
 - SpoA – první respons regulátor
 - 80. léta – práce na studiu sporulace, kompetence
 - 90. léta – objasnění molekulární podstaty genové regulace v odpovědi na enviromentální stresy

Bacillus subtilis

- **rozvoj sekvenačních technologií**
 - 1989 - B.s. 168 – jeden z prvních sekvenačních projektů
 - v závěru 34 laboratoří
 - 1997 – uveřejněna sekvence celého genomu
 - Kunst et al.: Nature 790, 249-256
- **obsahuje 4 106 genů**
 - 1 500 – definovaná funkce
 - 1 000 – dedukovaná funkce
 - 1/4 genů proteiny k získávání energie a biosyntéze
 - 86 tRNA, 30rRNA, 3 stabilní RNA
 - 16 sigma faktorů
 - 200 regulačních proteinů
 - profág Sp β
 - 10 fágům podobné elementy (defektní profágy)
 - žádné IS nebo transposony
 - pouze transposon like proteiny v defektních profázích

Bacillus subtilis

- stanovení protein kodujících sekvencí – 1500 operonů
 - dobrá konservovanost RBS
 - start kodony: ATG, TTG, GTG
 - potencionální operony: Rho nezávislé terminace
 - rRNA kodující geny – 10 operonů – většina v blízkosti začátku replikace
 - tRNA genů – 88- predigovány bioinformatickými nástroji
 - 12 operonů
 - 7 z nich v blízkosti nebo uvnitř rRNA klastrů
 - 8 osamocených
 - **Subtilist database: <http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/>**
 - **FEBS Lett: 430: 28-36, 1998**
 - **Codone usage and lateral gene transfer in *B. subtilis*. Curr. Opin. Microbiol. 2: 524-528, 1999.**

Bacillus subtilis

□ Transformace -

■ přirozená kompetence –

- při saturovaném množství lineární homologní DNA (1 µg/ml buněk) – 5% buněk v populaci

- plazmidy – intaktní 10^{-2} – 10^{-3} , po ligaci 10^{-5}

■ elektroporace – frekvence 10^4 transformantů na µg DNA

- mutanty defektní v přirozené kompetenci

- efektivnost dosažena pouze u intaktních replikonů

■ transformace protoplastů – frekvence 10^7 transformantů na µg DNA

- lineární monomerní molekuly

■ indukovaná kompetence (Ca, heat shock)

- málo účinná

- plazmidy s chromosomálními markery ani v *recBC* - kmenech

Bacillus subtilis

□ **Transdukce**

- bylo popsáno několik transdukujících fágů
- PBS1, AR9 – nejčastěji používaný
 - výhody
 - jsou velcí – 250 bp – rychlé mapování
 - nevýhody
 - infekce prostřednictvím flagel – testovat kmen na motilitu
 - rekombinační mechanismus není dostatečně popsán
 - není rezistentní k restrikci
- SPP1
 - lépe popsán, menší
 - DNA ve formě konkatamerních plazmidů
 - vytvořeny rekombinantní vektory s fágovou DNA

Bacillus subtilis

□ Konjugace

- laboratorní kmen nemá plasmidy
- divoké kmeny
 - konjugativní i mobilisovatelné plasmidy, konjugativní transposony,
 - šíří se v G+ bakteriích -
 - Tn925(*tet*) – *Enterococcus faecalis*
 - přenos do *B.subtilis*
 - mobilisuje přenos chDNA -
 - neprobíhá jako u *E. coli*
 - nízká frekvence přenosu
 - probíhá pouze na pevném mediu – agar
- využití pro přenos transpozonů mezi jednotlivými kmeny

Bacillus subtilis

- **Restrikčně modifikační systémy (R/M)**
 - několik systémů – vyvinuty na ochranu proti bakteriofágové infekci
 - tyto systémy ovlivňují i další inter i intraspecifický transport DNA
 - vysoce specifické DNA vázající proteiny
 - zajímavé evolučně – dva systémy dohromady
 - review o všech systémech: Wilson, Nucleic.Acid.Res. 19, 2539, 1991.
 - v *Bacillus subtilis* 168 – pouze jeden systém – BsuMI
 - v chromosomu v 47 koordinátě
 - klasický R/M systém – methylace C → 5mC
 - podílí se na přístupnosti kmene k růstu bakteriofágů

Bacillus subtilis

- v ostatních WT kmenech R/M systémy fágového původu
 - temperované fágy *B.subtilis*. a *amyloliquefaciens* -
 - SPR, Φ_{3T} , SP β 1 , ρ 11, H2 – monospecifické a multispecifické Mtasy bez příbuzných Enas
 - místně specifické Mtasy nesouvisející s R/M systémem (Dam a Dcm)
 - nebyly u *B. subtilis* identifikovány
 - byl prokázán vztah mezi Mtasami C5 a stavem kompetence
 - Ganesan *et al.* 1979, J.Bact. 139, 270.
 - vliv na transport DNA do buňky -
 - původ substrátu
 - nároky na rec asistenci
 - počet molekul DNA

Table 1. R/M systems of *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, and some other *Bacillus* strains

Organism and system (reference)	Genomic location (reference) ^a	DNA target ^b (reference[s])	Prototype R/M system	Phages (reference[s])				
				Restricted	Nonrestricted			
<i>B. subtilis</i> <i>BsuMI</i> <i>hsd</i> _{MI} = <i>nonB</i> (80)	47 (80)	Py ↓ TCGAPu (10, 31, 47)	<i>XhoI-AsuII</i>	φ105c (85)	φ29, SPP1 (85), φ2 (46) SP18 (114), PZE (28) φ15, PZA plate only on Spo ⁻ cells (28); SP10, φNR2 plate on <i>nonA nonB</i> (<i>hsd</i> _{MI} R ⁻ M ⁻) 168 strains (80)			
				SP10, φNR2 (80)				
	59 (43)	GG ↓ CC (13, 33, 34, 50)	<i>HaeIII</i>	SPP1, φ105c, SP02 (104); SP8 (33); Z (71)	φ29, SP82, SP50, H1 (12); PBS1, SP01 (104); SPR, φ3T, ρ11 _B , ρ11 _S , SPβ, H2 (71, 109)			
				φ105c (85), SPP1 (48)				
				φ105c (85)				
				φ105c (85), SPP1 (47)				
345 (43)	CTGCA ↓ G (88, 116)	<i>PstI</i>	φ105c (85)	SPP1 (116)				
<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>BamHI</i>	ND	G ↓ GATCC (16, 79); modified base is N4mC (16)	<i>BamHI</i>	φ105c (85)	φ1 (63)			
				ND	G ↓ GATCC (87)	<i>BamHI</i>	φ105c (85, 86), φ1 (63), φNR2 (63)	φ29, SPP1 (85)
							ND	G ↓ GACC (41)
<i>B. aneurinolyticus</i> <i>BanI</i>	ND	G ↓ GPyPuCC (95)	<i>BanI</i>					
				<i>B. sphaericus</i> <i>BspRI</i>	ND	GG ↓ CC (53)	<i>HaeIII</i>	

- transformace lineární DNA
 - během transportu – ssDNA – necitlivá k R/M modifikacím
 - *rec* dependentní
 - vznik segmentu hemimethylované DNA v rámci chromosomu
 - může být více rezistentní vůči Enasam
 - rychleji se přemění na plně methylovanou M_{tas}mi
 - po transformaci jednoho markeru platí
 - vztah mezi koncentrací transformované DNA a počtem získaných transformantů je lineární
- transformace plazmidů
 - vyžaduje multimerní molekulu
 - při formování plazmidu se tvoří dimer
 - je citlivý k restriktázám

Bacillus subtilis

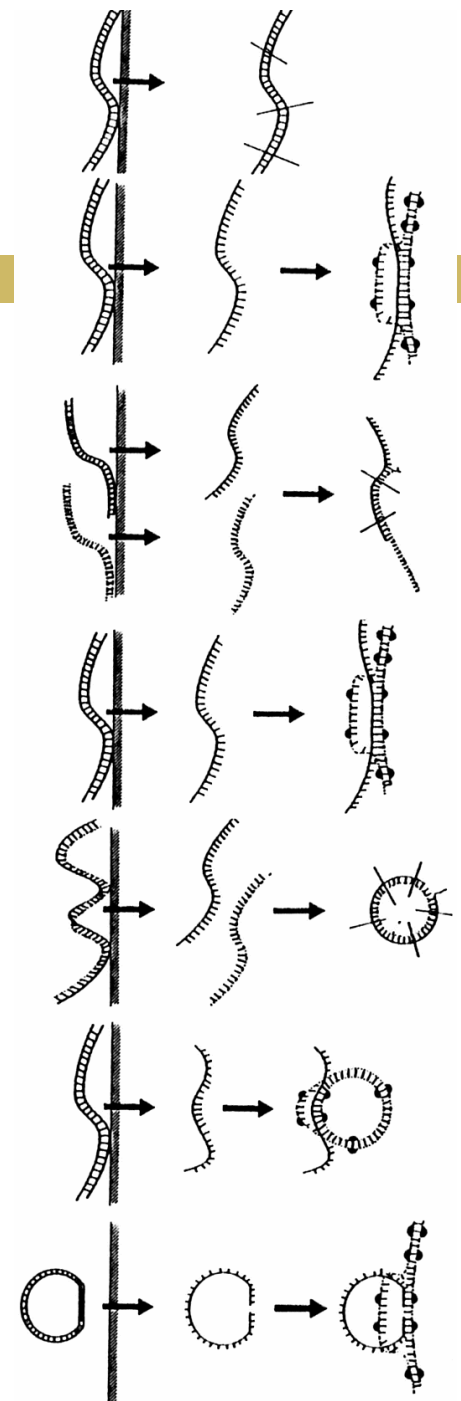
- transformace plazmidů
 - Cornosi et al. 1981 -
 - při inserci fragmentů chDNA *B. subtilis* do plazmidů
 - umožňuje transformaci monomerního plazmidu
 - při rec aktivních kmenech synapse homologních částí s chromozomem –
 - vznik hemimethylované dsDNA po syntéze DNA v místech synapse
 - rezistentní k restrikci
 - nehomologní části – při existenci restrikčního místa nechráněné
 - pokud se použije Rec- kmen
 - efektivnost transformace se radikálně sníží
 - restrikční místa nejsou chráněna hemimethylovanou formou – chová se jako plazmid bez homologie

Bacillus subtilis

- transfekce – kompetentních buněk
 - sice transport ssDNA -
 - uvnitř buněk hybridizace s komplementárním vláknem -dsDNA
 - citlivé k restrikci
 - možnost transfekce nemodifikované DNA
 - její hybridizace s preinfikovanou buňkou (marker rescue)
 - hemimethylovaná DNA je k restrikci rezistentní
- transdukce – citlivá k restrikci – dsDNA
- transformace protoplastů – dsDNA

schéma rekombinačních událostí

- fágová infekce, transdukce, transformace protoplastů
- transformace s homologní sekvencí
- transfekce
- transfekce za podmínek marker rescue
- transformace plazmidů bez homologie
- transformace s homologií k plazmidu
- transformace plazmidu s homologií v chromosomu



Plazmidy

- laboratorní kmeny nemají vlastní plazmidy
- používají se plazmidy Stafylokoků a Streptokoků
 - dva druhy plazmidů
 - malé s RSR replikací -
 - velké s Θ replikací (pLS20 izolován z Bacillus (1995))
 - RSR plasmid – 4 třídy – pE194, pC194, pT181, pSN2
 - vlastní Rep protein -
 - reguluje počet kopií
 - iniciuje a terminuje replikaci
 - terminace občas neproběhne – vznik multimerních ssDNA plazmidových vláken HMW (high-molecular-weight)
 - cizorodá DNA zvyšuje vznik HMW struktur – nestabilita
 - nepomáhá RecBCD mutace jako u *E. coli*
 - nevhodnost jako klonovací vektory
 - Ts mutace – doprava transpozonů

Bakteriofágy *B.s.* - *temperované*

- používají/li se ke genetickým manipulacím a analýzám
- klonovací experimenty – fágové vektory – Φ_{105} , SP β
 - ▣ infektivnost, stabilní lysogeny s profágem v jedné kopii
 - ▣ komplementace
 - ▣ exprese genových fúzí na různých genetických pozadí
 - ▣ nadprodukce heterologních a rekombinantních proteinů
 - ▣ klonování genů
 - ▣ přímá selekce pomocí markeru nebo komplementací
 - ▣ možnost screeningu žádoucích rekombinant
- generalizovaná transdukce – PBS1 – pseudotemperovaný
 - ▣ velký fág – 5-10% genomu

Bakteriofágy *B.s.* - *temperované*

- Φ_{105} - podobný λ
 - velikostí, morfologií, organizací genů
 - kap. 57 – *Bacillus subtilis* and relatives , ASM Press, 1993
 - používané vektory deleční mutanty $\Phi_{105DI:1t}$
 - klonovací vektory –
 - kapacita 5-6 kbp,
 - 3 klonovací místa (BamHI, SalI, XbaI)
 - rekombinantní molekuly – amplifikovány transfekcí protoplastů
 - knihovna – infekcí citlivých bakterií a sklizení generace fágů
 - screening – infekce patřičného kmene knihovnou a vyšetí na selekční nebo diferenční medium
 - malá část vytvoří lysogeny – naklonování žádoucího

Bakteriofágy *B.s.* - *temperované*

- úspěšné při klonování sporulačních genů
- nevýhody – nízká klonovací kapacita vektorů
- byly izolovány delší delece
 - infekce v přítomnosti pomocného fága
 - neumožňuje přímé klonování
- transformace profága
 - unikátní pro *B. subtilis*
 - transformace lineární DNA
 - restriční fragmenty jsou ligovány s fragmenty fágové DNA
 - výsledná lineární DNA transformována do kmene nesoucí profága
 - inserce do profága homologní rekombinací

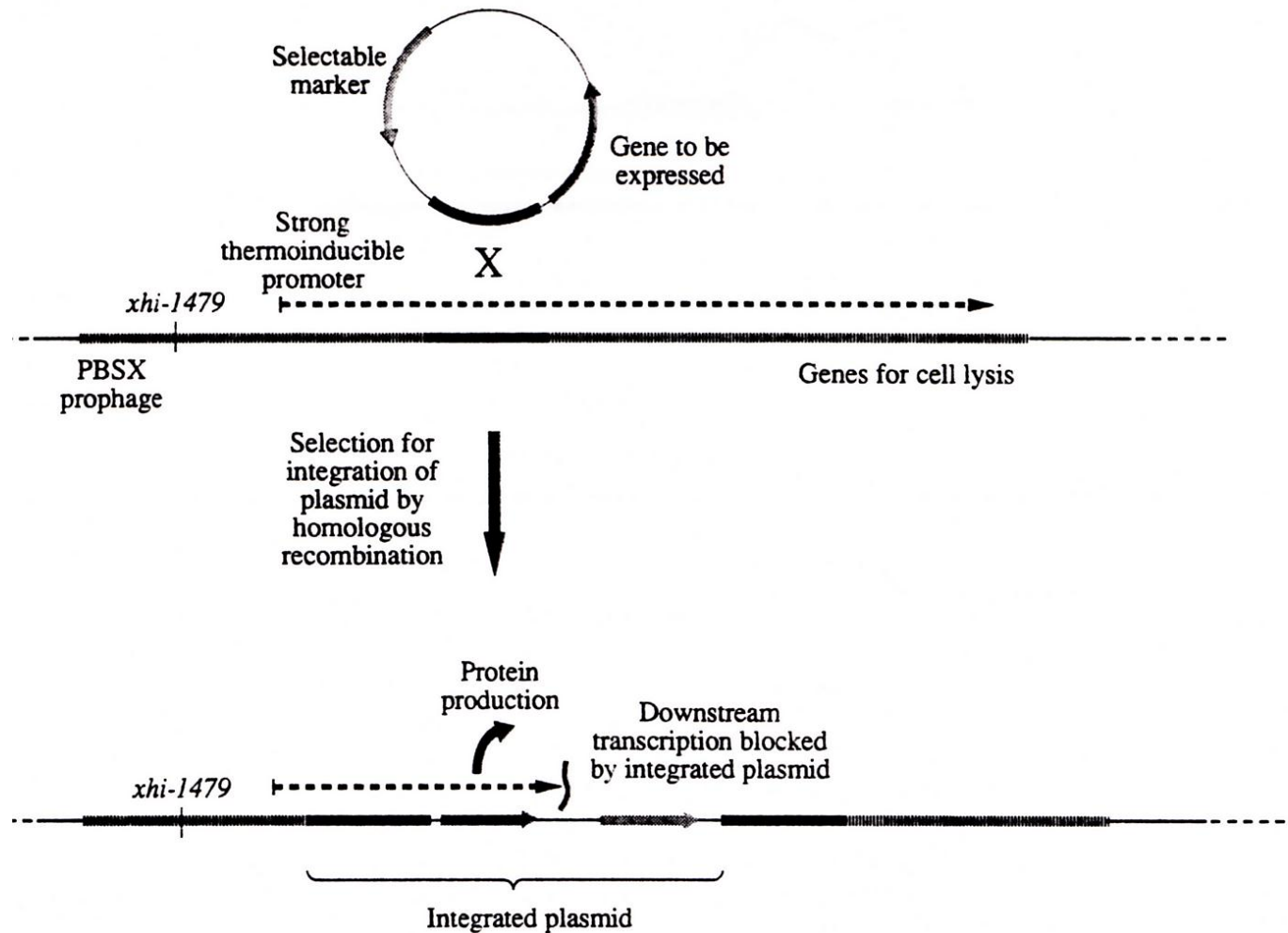
Bakteriofágy *B.s.* - *temperované*

- zvýšení efektivity –
 - ligace do plazmidu obsahující definovanou fágovou sekvenci
 - nutná znalost sekvence a funkce ORFs fága
 - možnost umístění selektovatelného markeru
- SP β -
 - větší – 120 kbp
 - méně popsán
 - profág přítomen v původním kmeni Marburg
 - izolován kmen s 27 kbp neesenciálními delecemi
 - větší kapacita pro heterologní DNA
 - použití pro specializovanou transdukcii

Bakteriofágy *B.s.* - *temperované*

- Expresní vektory – produkce proteinů
- Φ_{105} a defektní PBSX (podobný SP β)
 - modifikace profága –
 - mutace umožňující teplotní aktivaci profága
 - identifikace restriční místa v silně indukované restriční jednotce
 - mutace zabraňující lysi hostitelských buněk
 - systém odvozený od PBSX
 - integrace plazmidu s inzertem a fágovou sekvencí do profága – Campbell like rekombinace
 - inzercí plazmidu se blokuje lýze buněk

Schéma systému



Integrační plazmidy

plazmidy neschopné se replikovat v *B. subtilis* a obsahující homologní sekvenci z *B. subtilis*

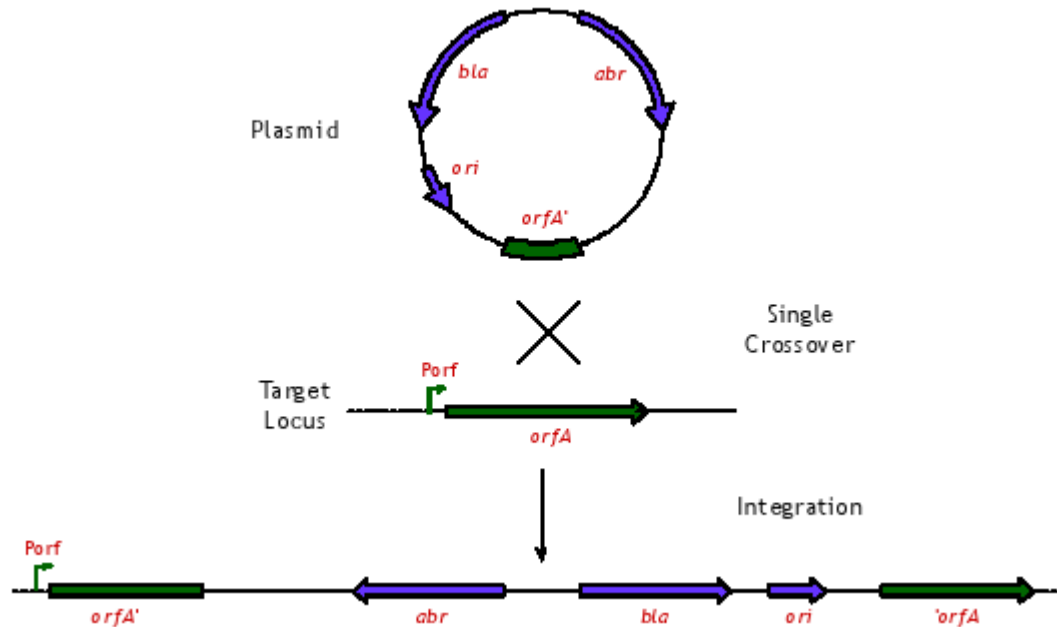
- genetické manipulace
- mutagenní studie
 - biologická vlastnost *B. subtilis* - vysoká rekombinační schopnost při přenosu DNA u kompetentních buněk
 - heterologní DNA
 - pokud je ohraničena homologní sekvencí je inzertována do místa homologie
 - „nalogovanou“ studovanou sekvenci
 - sekvenci „nepotřebného“ genu - *amy*

Integrační plazmidy

- v současné době mnoho typů – mnoho způsobů využití
 - klonování
 - knock out genů
 - komplementace
 - fúze s reportérovým genem
 - exprese pod regulací vlastního promotoru
 - studium regulace transkripce
 - exprese proteinu
- Seznam dostupných přes BGSC
 - <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>

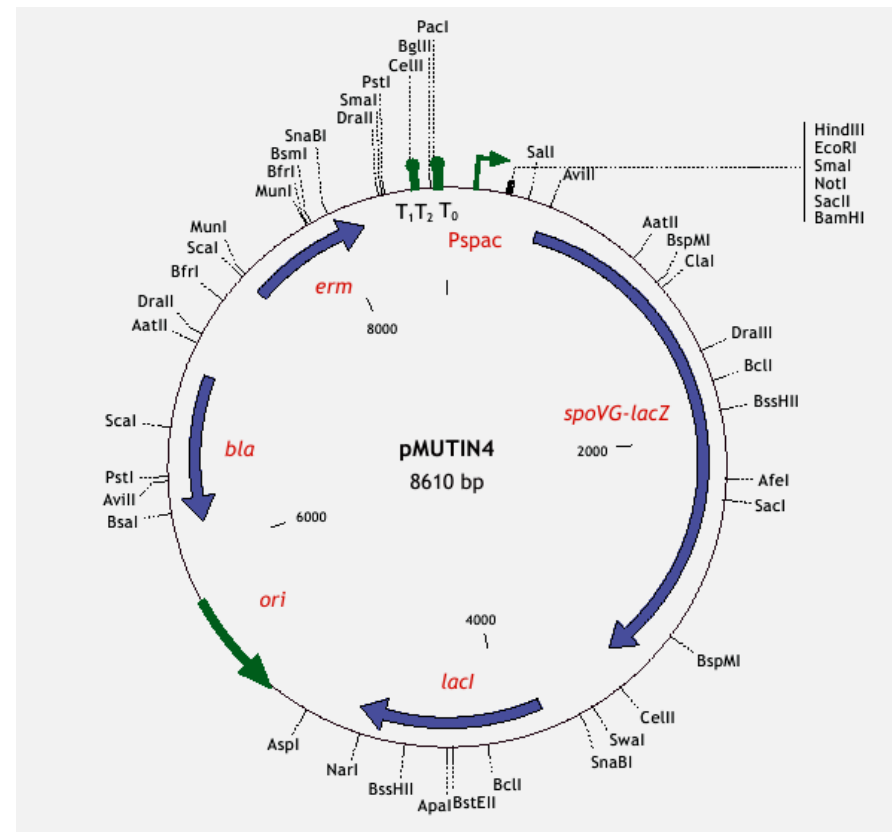
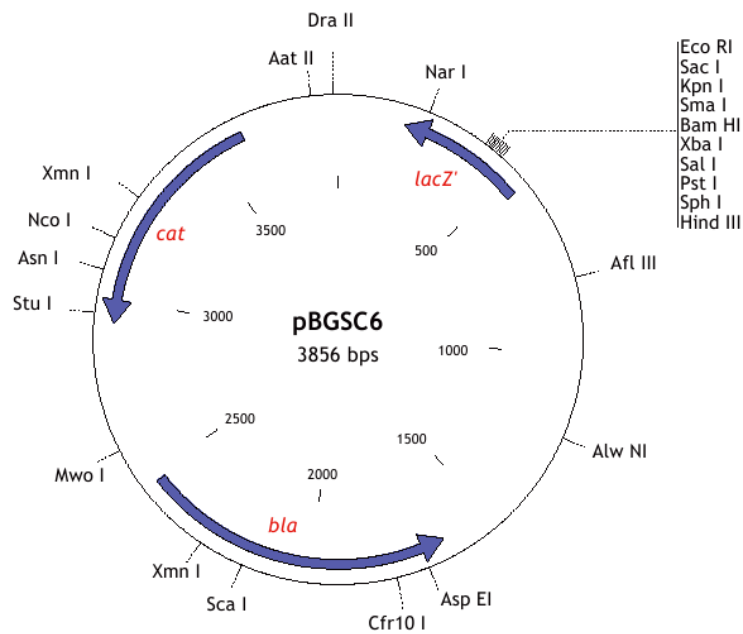
Integrační plazmidy

- obecné schema integrace Campbellova typu



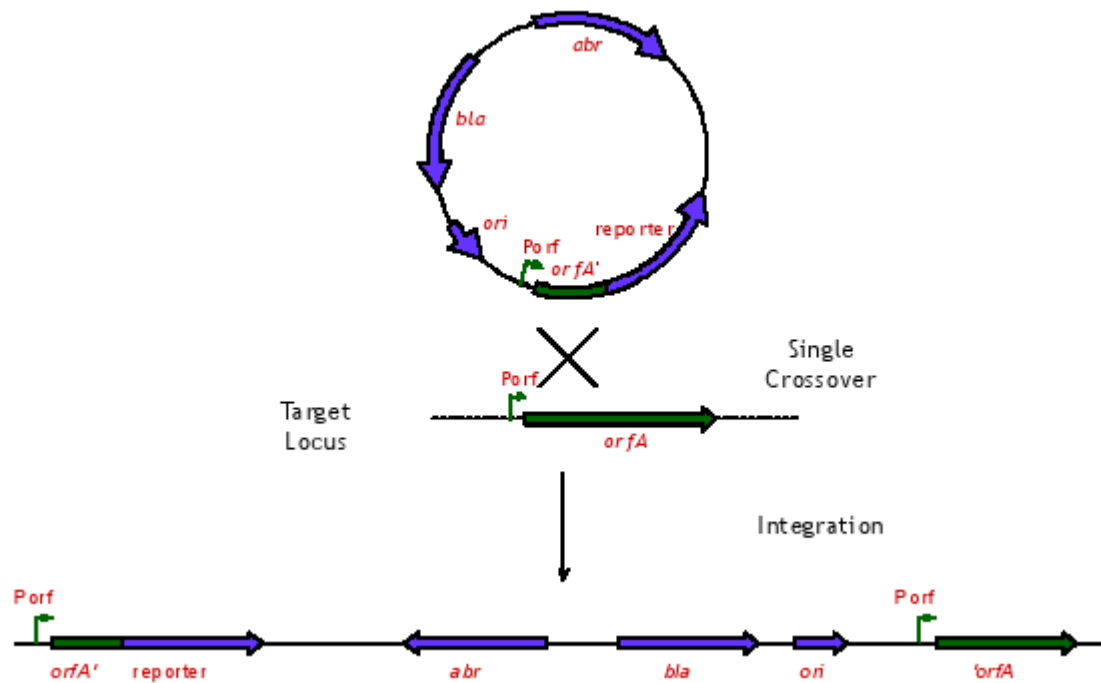
Integrační plazmidy

- Klonování, knock – out genů



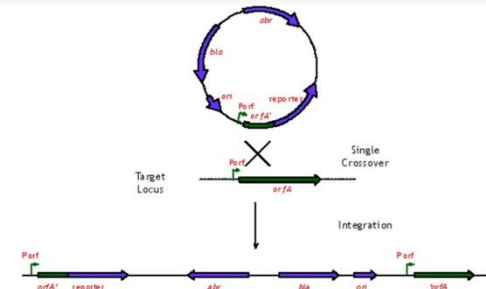
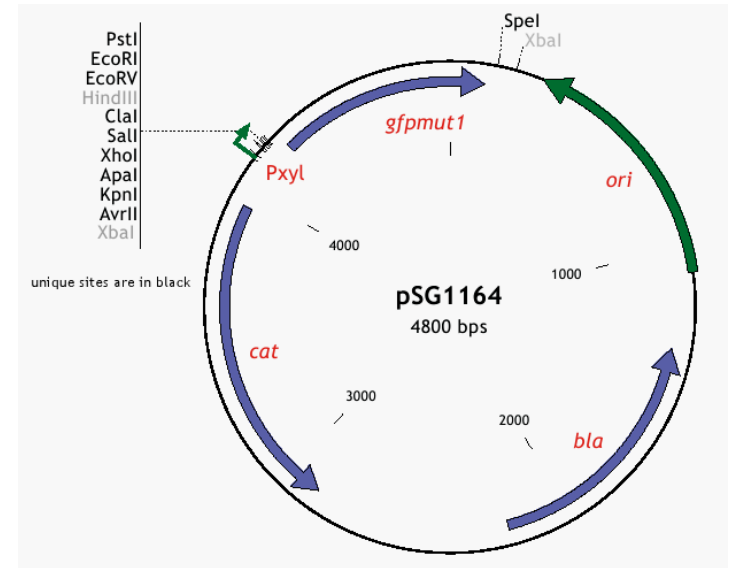
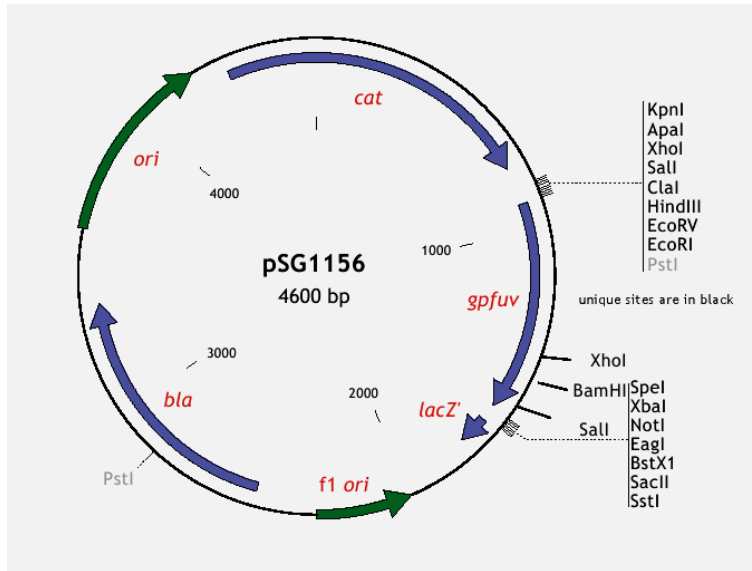
Integrační plazmidy

- obecné schéma vytvoření fúze s reportérovým genem



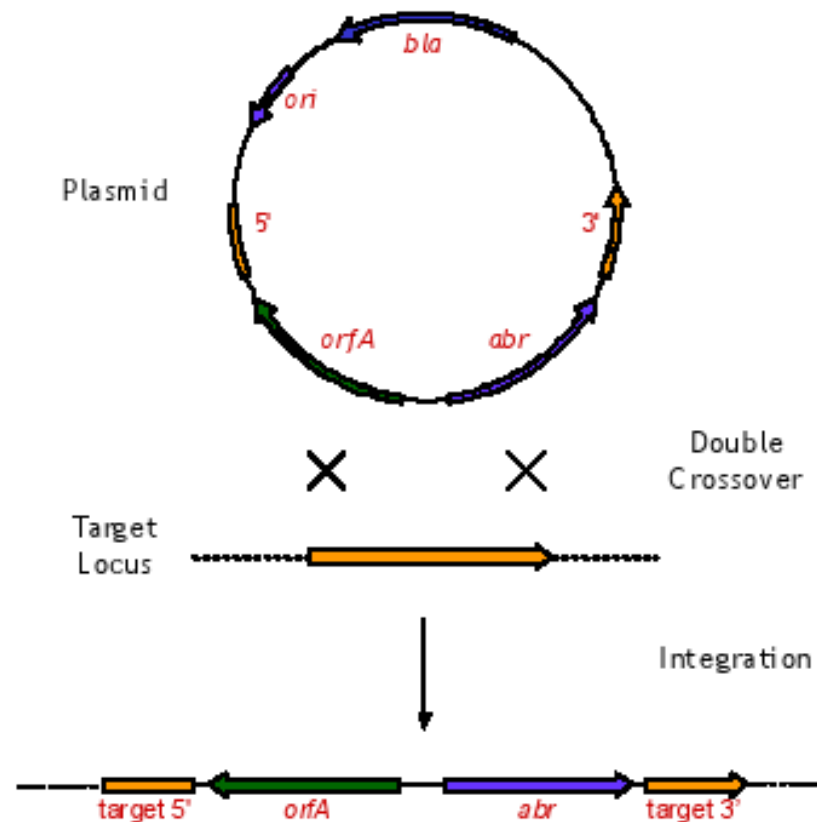
Integrační plazmidy

- GFP – exprese celého proteinu pod regulací vlastního promotoru, fúze proteinu v operonu



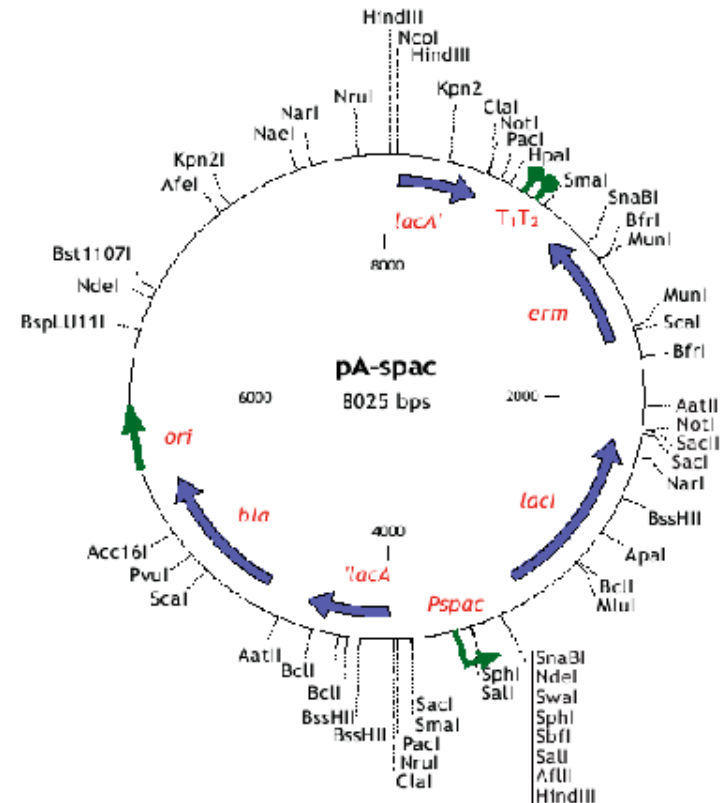
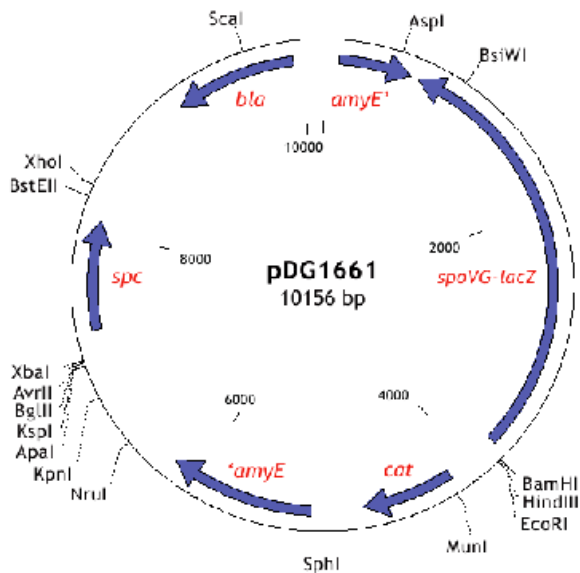
Integrační plazmidy

- obecné schéma inserce do nepotřebného genu (*amy* lokusu)

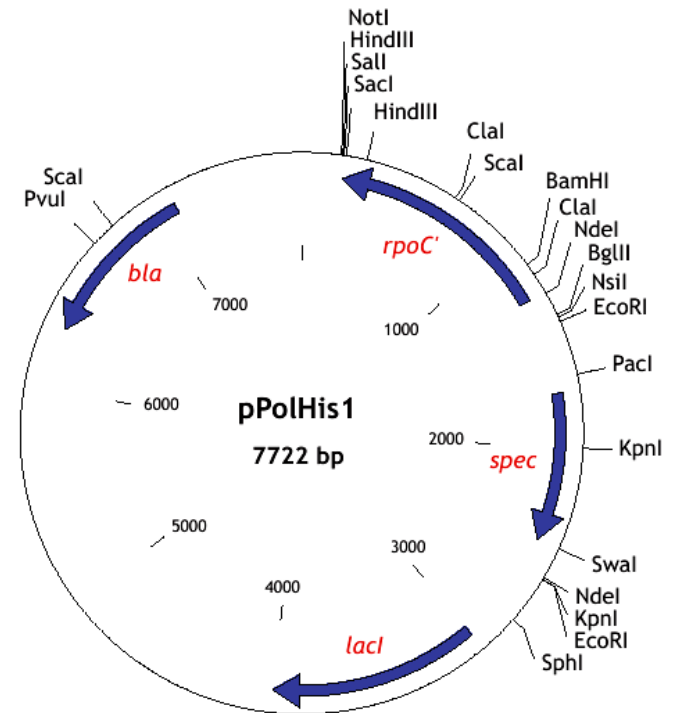
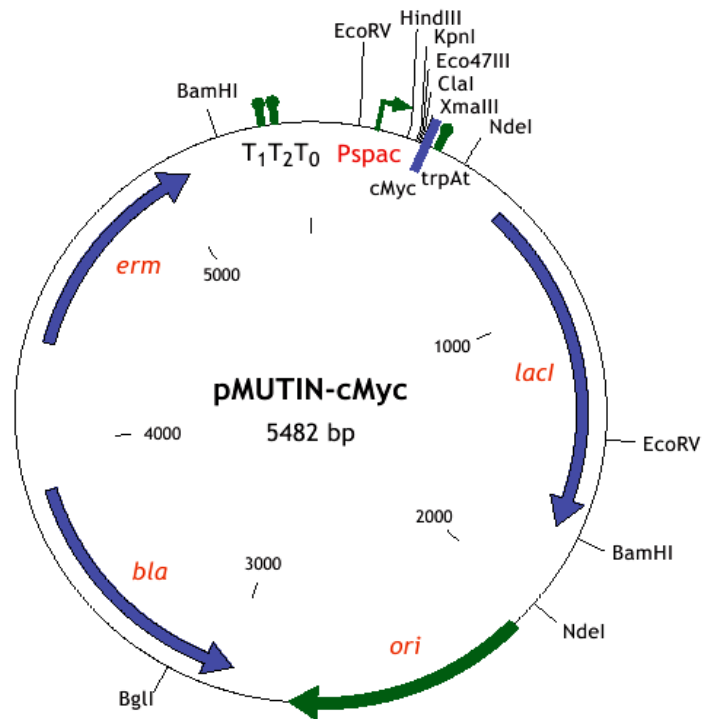


Integrační plazmidy

- fúze s galaktozidázou – studie promotoru,
- expresní vektor s inzercí do *lacA*

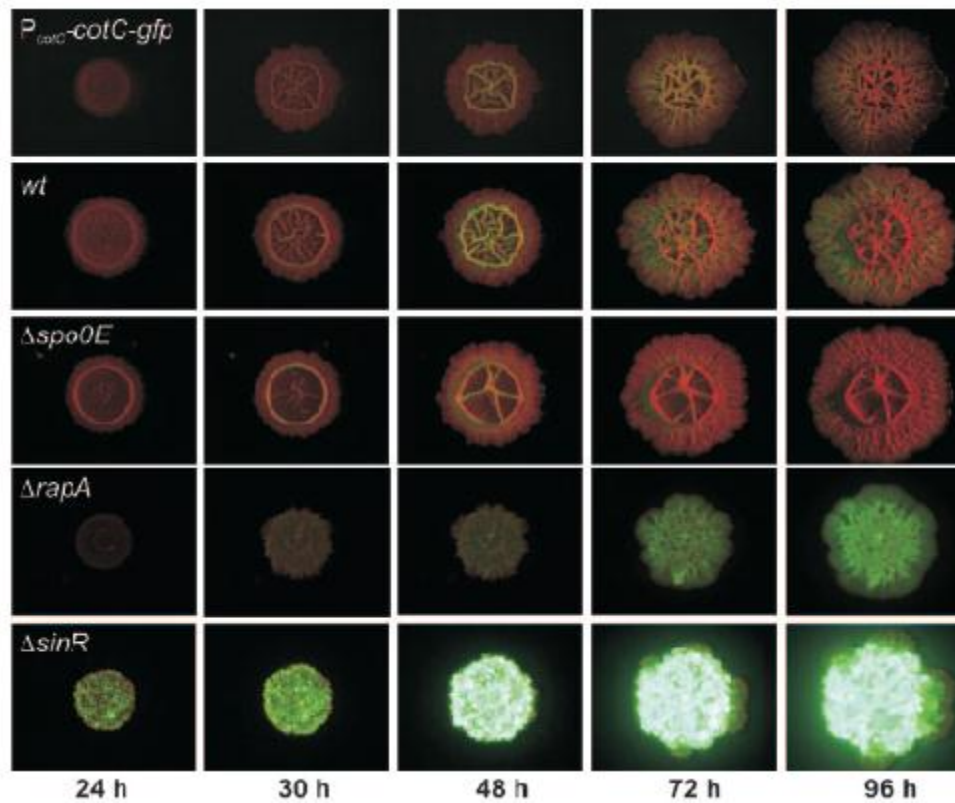


- značení proteinů – snadná detekce pomocí protilátky proti značce (tag), snadná izolace (His)



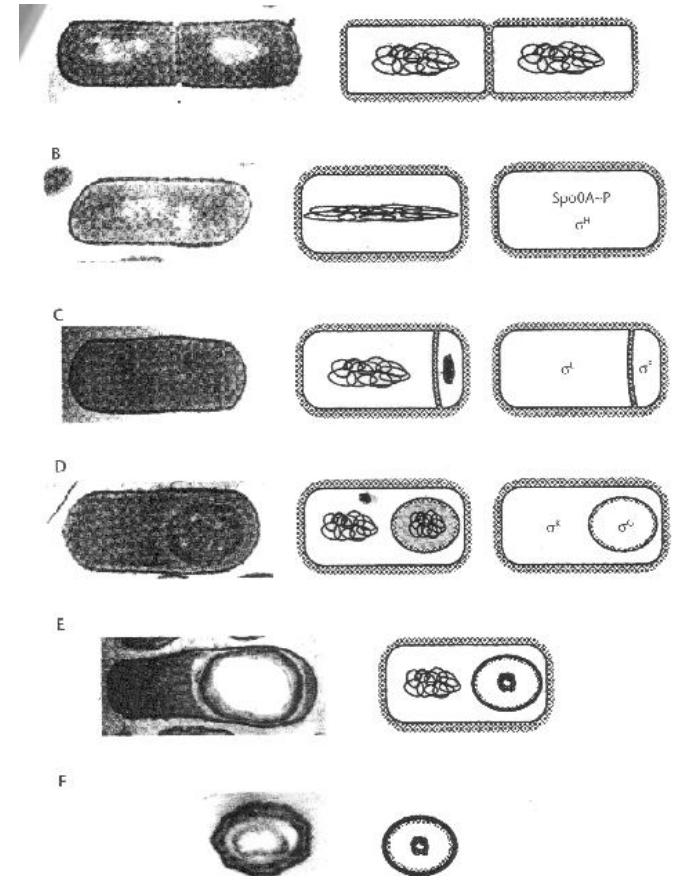
sporulace

- Efekt změn v signálních drahách na formování biofilmů. Monitorování pomocí time-lapse fluorescence microscopy
- Použité kmeny *B.subtilis* *cotC-gfp* (P_{cotC} -*cotC-gfp*), IIA-gfp (P_{spoIIA} -*gfp* [wt]), IIA/spo0E (P_{spoIIA} -*gfp* [*spo0E*]), IIA/rapA (P_{spoIIA} -*gfp* [*rapA*]), and IIA/sinR (P_{spoIIA} -*gfp* [*sinR*])

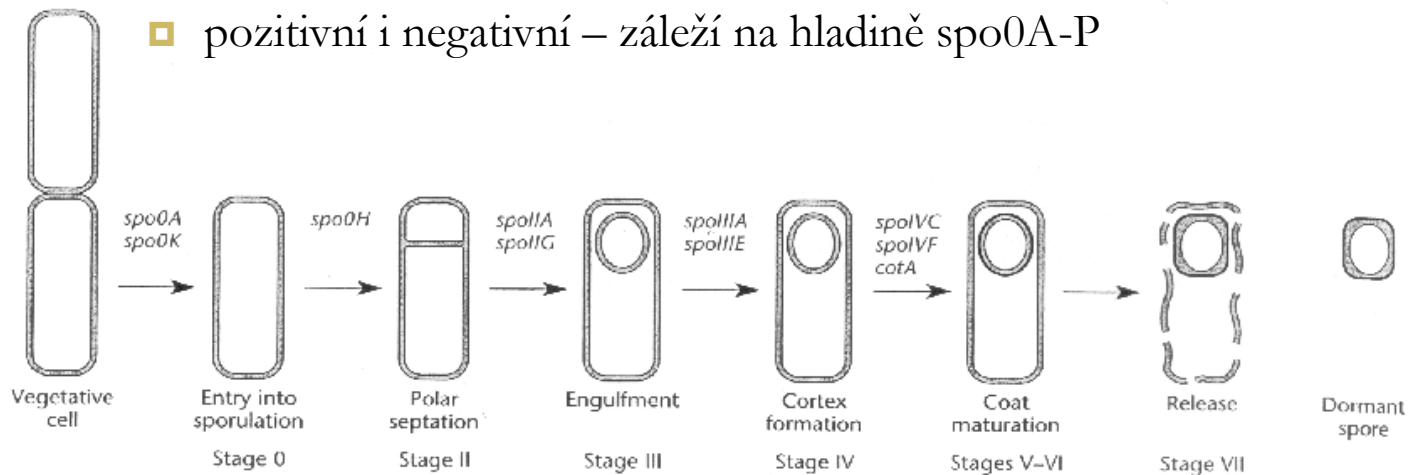


Sporulace *Bacillus subtilis*

- izolace Spo⁻ mutant – zásadní – mnoho
 - identifikace – nesporeující kolonie
 - sporující – tmavě hnědé
 - nesporeující – bez pigmentu
 - fenotyp – elektronový mikroskop
 - rozděleny podle stádií sporulace
 - genetická analýza jednotlivých mutant
 - nomenklatura
 - spo – římská číslice – písmeno
 - 0-VII – šest stádií sporulace
 - jednotlivé ORFs klusterů



- **Spo0** - Regulace iniciace sporulace –
 - ▣ mnoho má pleiotropní fenotyp
 - ▣ ovlivnění též produkce antibiotik, degradativních enzymů, vývoj transformace
- **KinABCDE** – signální kinázy –
 - ▣ reagují na různé environmentální signály
- **spo0F** – fosforylován kinázami –
 - ▣ první článek kaskády
- **spo0B** – fostransferázový enzym
- **spo0A** – vlastní transkripční faktor
 - ▣ pozitivní i negativní – záleží na hladině spo0A-P



□ *spo0A*-P - vlastnosti

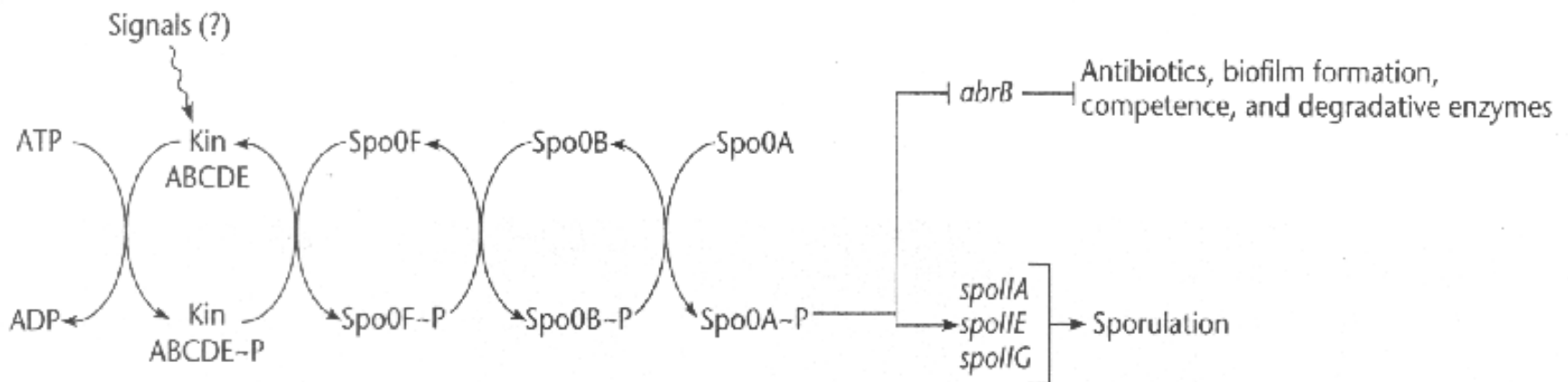
□ nízké koncentrace – pozitivní regulace

- syntéza antibiotik, degradativních enzymů, vývoj kompetence a biofilmů

□ vysoká koncentrace – aktivace několika sporulačních operonů

- *apoIIA*, *spoIIF*, *spoIIG*

□ aktivací – nezvratný vstup do sporulace



- Spo0A-P – regulace koncentrace
 - KinA, KinB – sensory intenzivního hladovění
 - vysoká koncentrace Spo0A-P
 - sporulace
 - KinC, KinD, KinE – stimuly neznámé
 - nízká koncentrace Spo0A-P
 - syntéza antibiotik, degradativních enzymů, vývoj kompetence a biofilmů
 - zabíjení některých buněk – kanibalismus
 - fosfatázy – stimuly fyziologické i environmentální
 - defosforylace též Spo0F-P
 - působí jako negativní regulátory sporulace
 - málo probádané

□ fosfatázy

□ **Spo0E** – fosfatáza Spo0A

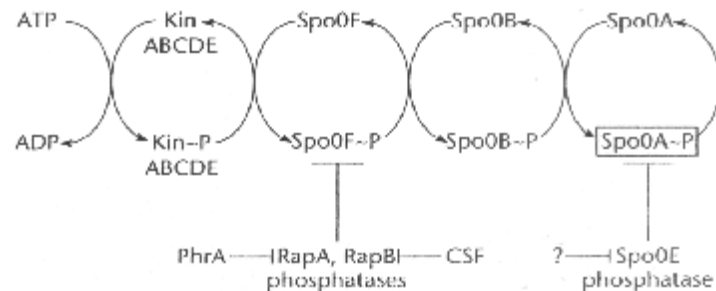
- null mutant – hypersporulační
- nadprodukce – inhibice sporulace
- typické chování negativní regulace

□ **Spo0L** – fosfatáza Spo0F

- supresorovou mutací
- podobné genetické vlastnosti jako Spo0E

□ **RapA, RapB** – fosfatáza Spo0F

- fosfatázy reagující na kompetenční faktor



- Kompartmentalizovaná regulace sporulačních genů
 - diferenciace do spory – během dělení buněk
 - mateřská buňka a prespora – geneticky identické
 - x
 - exprese specifických proteinů pro vytvoření spor v cytoplasmě mateřské buňky
 - nutná kompartmentizace
 - regulace sporulačních genů – 5 sigma faktorů
 - sigma E,F,G,H,K
 - mateřská buňka – E,K
 - prespora – FG
 - načasování transkripce a kompartmentizace

- přístupy studia regulace
 - fúze s repotérovými geny – lacZ, gus, GFP
- načasování transkripce genů
 - korelace začátku transkripce od začátku sporulace
 - korelace s morfologickými změnami
- závislost exprese jednoho genu na druhém
 - přímá nebo nepřímá regulace
 - př.: exprese spoIIA::lacZ je závislá na všech genech spo0 ale ani na jednom z „pozdějších lokusů“

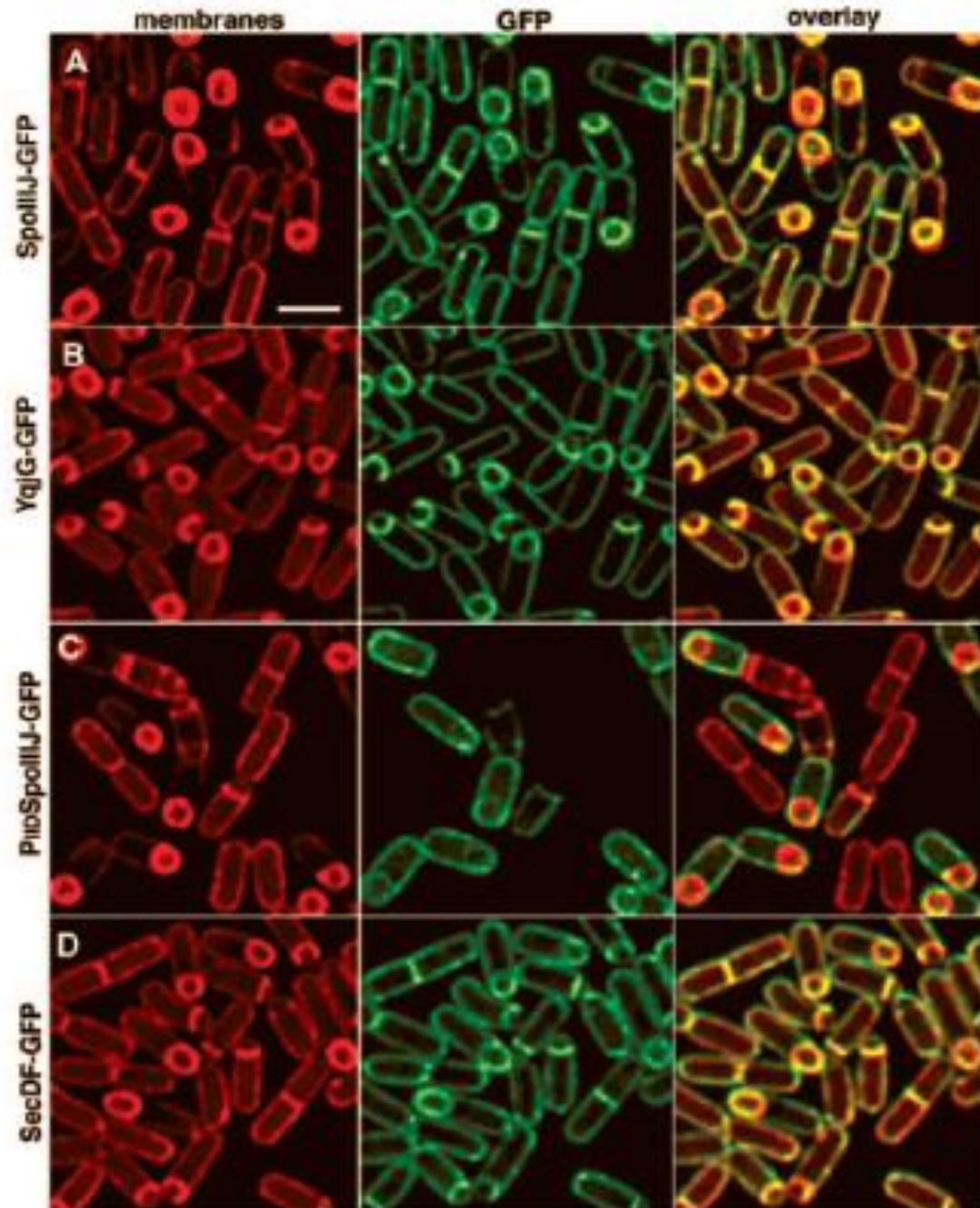
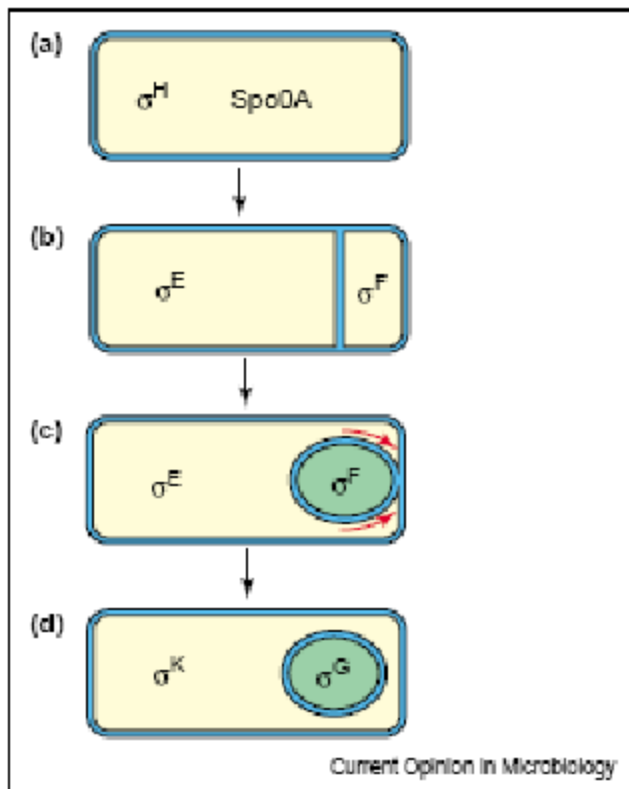
TABLE 14.3 Timing and dependence patterns of gene expression

Gene or operon fusion ^a	Time of expression (min)	Expression in mutants of gene or operon:					
		<i>spo0</i>	<i>spoIIA</i> (σ^F)	<i>spoIIE</i>	<i>spoIIIG</i> (σ^E)	<i>spoIIIG</i> (σ^{E-})	<i>spoIVC</i> (σ^B)
<i>spoIIA</i>	40	-	+	+	+	+	+
<i>spoIIE</i>	30-60	-	+	+	+	+	+
<i>spoIIIG</i>	0-60	-	+	+	+	+	+
<i>gpr</i>	80-120	-	-	-	+	-	+
<i>spoIIIG</i>	120	-	-	-	-	+	+
<i>ssp</i>	>120	-	-	-	-	-	+
<i>spoIVC</i>	150	-	-	-	-	+	+
<i>cotA</i>	240	-	-	-	-	-	-

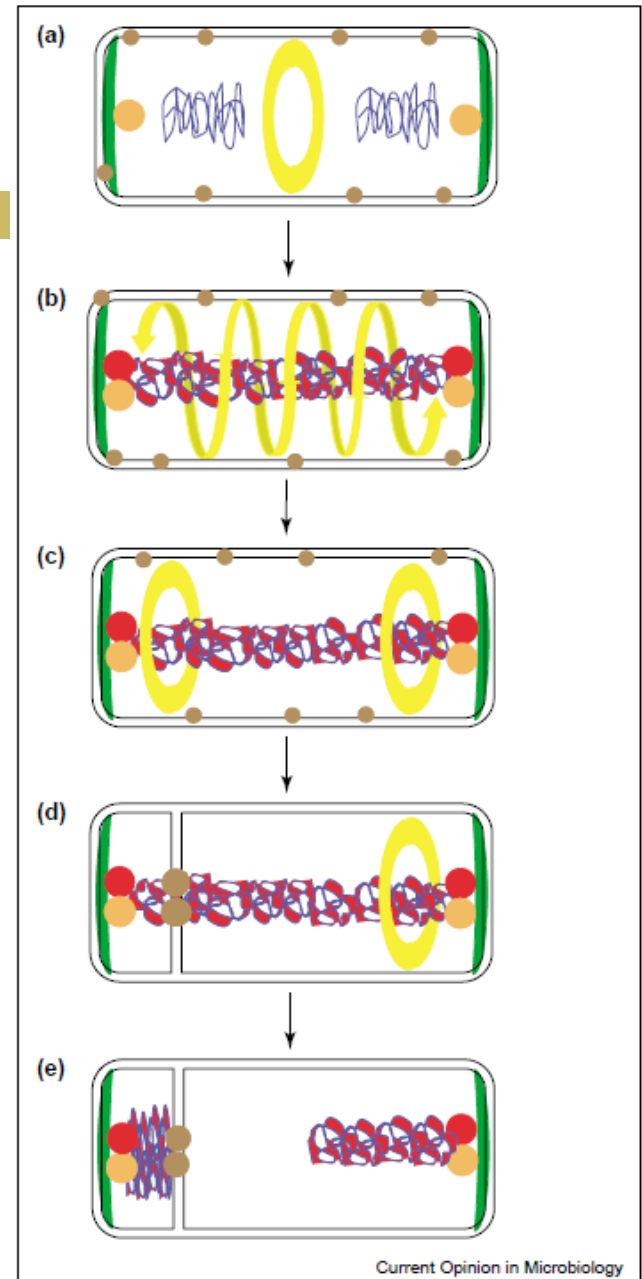
^a The functions of these genes described in the following sections.

- závislost na jednotlivých sigma faktorech
 - ▣ identifikace podle databází sekvence
 - ▣ predikce promotorových motivů
 - ▣ in vitro transkripční pokusy
 - ▣ microarrays
- buněčná lokalizace
 - ▣ fúze s lacZ– mateřská buňka je citlivější k lysosmu
 - ▣ imunoelektronovou mikroskopií vizualizace beta galaktozidázové aktivity
 - ▣ fúze s GFP – po septaci vizualizace v jednom kompartmentu

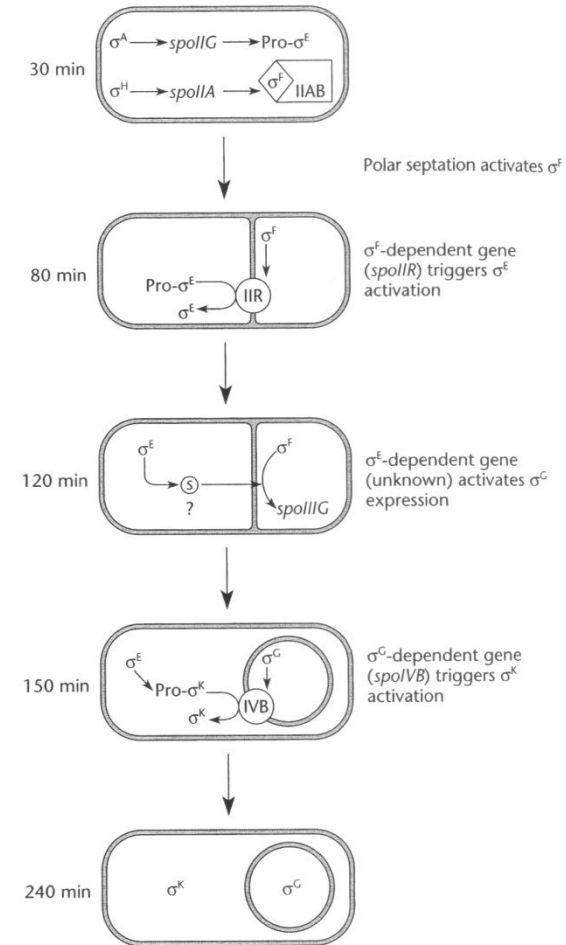
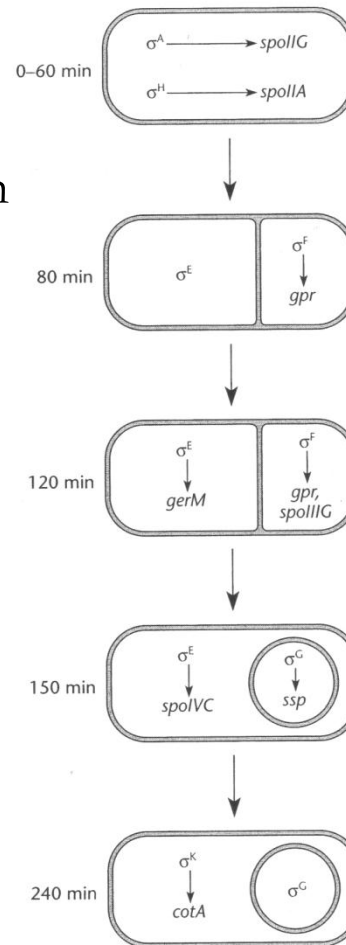
□ GFP -fúze



- Nesouměrná septace
- DivIVA - zelený
- FtsZ - žlutý
- RacA - červený
- Soj - oranžový
- SpoIIIE - hnědý



- regulace a kompartmentizace
 - ▣ signalizace mezi kompartmenty
 - ▣ rozdílná exprese v obou částech
 - ▣ kaskády sigma faktorů
- prespora
 - ▣ časný gen – *gpr* – proteasa
 - ▣ *spoIIIG* – σ^G - sigma faktor
 - ▣ vyžaduje *spoIIG* - σ^G
 - ▣ transkripce *ssp* genů
- mateřská buňka
 - ▣ mezikompartimentová regulace



□ model regulace aktivace σ^E a σ^F v mateřské buňce

■ σ^E proteolytická aktivace z prekurzoru $\text{Pro}\sigma^E$

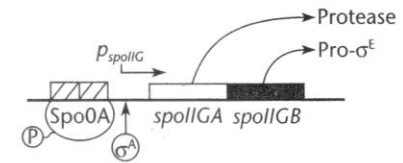
■ *spoIIGA* – aktivační proteáza

■ aktivní až po vzniku septa

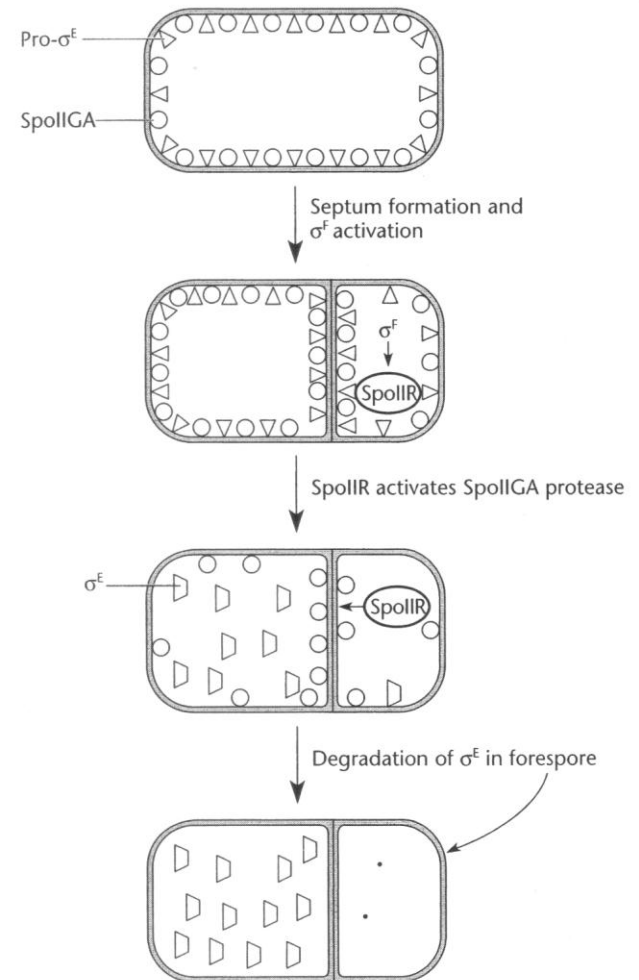
■ aktivace σ^F – transkripce *SpoIIR*

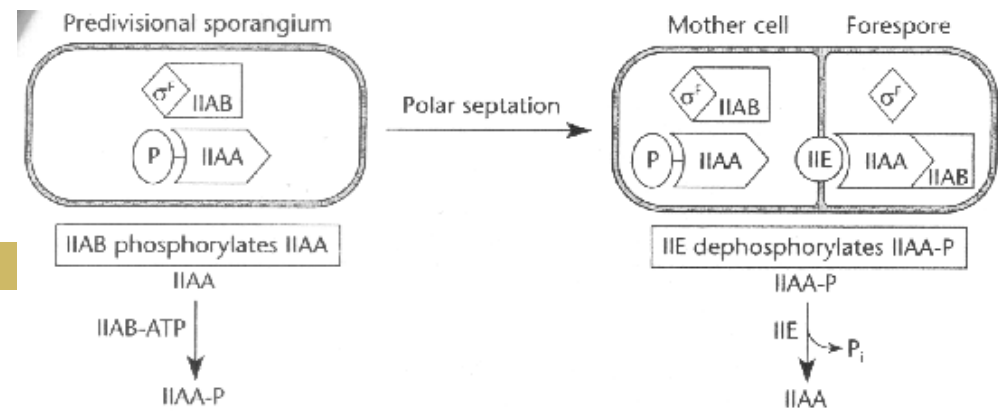
■ sekretován do mezimembránového prostoru

A



B





- σ^F inaktivace v komplexu se SpoIIAB
 - ▣ anti-sigma faktor
 - ▣ aktivace - komplex SpoAA a SpoIIAB
 - neváže se na σ^F
 - ▣ modulace vazby – fosforylací SpoIIAA
 - vazba k SpoIIAB nefosforylovaný
 - ve sporangiu – SpoIIAA-P
 - po vytvoření septa – defosforylace
 - ▣ SpoIIAB -
 - sporangie – kinázová aktivita
 - prespora – fosfatázová aktivita
 - ▣ SpoIIE- druhá fosfatáza v prespoře