

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

mgr Marta Hubisz

Analiza funkcjonalna receptora GerA w przetrwalnikach *Bacillus subtilis*

Functional analysis of GerA germination receptor
in *Bacillus subtilis* endospores

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. dr hab. Michał Obuchowski
Promotor pomocniczy: dr hab. Adam Iwanicki

Katedra Biotechnologii Medycznej
Zakład Bakteriologii Molekularnej

Gdańsk 2022

Powstanie tej rozprawy (głównie lata 2018-2022) to był czas niezwykle trudny, zarówno wewnątrz, jak i w kontekście wydarzeń, które temu towarzyszyły.
Z całego serca dziękuję osobom, które wówczas mnie wspierały, nawet jeśli było to tylko wsparcie na odległość.

Dziękuję dr hab. Adamowi Iwanickiemu
za poświęcony czas i pracę – bez tego, niniejsza rozprawa prawdopodobnie nie ujrzałaby światła dziennego.

Dziękuję Indze J. i Małgosi K. – „my sisters-in-arms”
za stworzenie przestrzeni do wyrzucania trosk,
ale też znajdowania motywacji w natłoku beznadziei.
Udało się!

I wreszcie, dziękuję osobie, która była w tym procesie od pierwszego dnia studiów
do ostatniej kropki tej rozprawy.
Choć wiele znaków na niebie i ziemi nieustannie mówiło,
że lepiej to porzucić, do końca nigdy w to nie uwierzyła.
Dziękuję, że jednak się nie poddałam.

*„Now this is not the end. It is not even the beginning of the end.
But it is, perhaps, the end of the beginning”
sir Winston Churchill*

Oświadczenie

Ja, niżej podpisana, oświadczam, że przedłożona praca dyplomowa została wykonana przeze mnie samodzielnie, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych innych osób.

Data

Podpis

Spis treści

STRESZCZENIE	3
SUMMARY	4
1. WSTĘP.....	5
1.1 <i>Bacillus subtilis</i> jako organizm modelowy	5
1.2 Sporulacja – formowanie przetrwalników jako alternatywna ścieżka rozwoju <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.3 Kiełkowanie – transformacja ze stanu spoczynku do aktywności metabolicznej	26
1.4 Receptory kiełkowania.....	31
2. CEL PRACY	34
3. WYNIKI.....	35
3.1 Badania nad receptorem GerA w kontekście literatury badawczej.....	35
3.2 Próba wizualizacji receptora GerA	38
3.3 Mutageneza pozycji 324 białka A receptora GerA	42
3.4 Badanie poziomu ekspresji genów operonu <i>gerA</i>	61
4. DYSKUSJA	67
5. MATERIAŁY	77
5.1 Szczepy bakteryjne i plazmidy.....	77
5.2 Pożywki do hodowli bakterii i potrzebne roztwory	79
5.3 Startery i sondy do reakcji PCR	81
5.4 Odczynniki do reakcji PCR i qPCR	82
5.5 Pozostałe odczynniki.....	83
6. METODY.....	84
6.1 Izolacja kwasów nukleinowych	84
6.2 Przygotowanie komórek kompetentnych i superkompetentnych.....	85

6.3 Transformacja bakterii	86
6.4 Procedury klonowania DNA przy tworzeniu szczepu BZBM01 i mutagenezie pozycji 324 białka A	88
6.5 Hodowle bakteryjne	91
6.6 Oczyszczanie przetrwalników	92
6.7 Analizy kiełkowania.....	93
6.8 Analiza ekspresji genów operonu <i>gerA</i>	95
6.9 Analizy bioinformatyczne	99
7. BIBLIOGRAFIA.....	101
8. ZAŁĄCZNIKI.....	115

Streszczenie

Bacillus subtilis jest uznany za organizm modelowy wykorzystywany do badań nad przemianami, jakimi podlega komórka bakteryjna w trakcie cyklu rozwojowego. W warunkach niekorzystnych do wzrostu wegetatywnego ta Gram-dodatnia bakteria uruchamia alternatywną ścieżkę rozwojową. W procesie sporulacji *B. subtilis* wytwarza przetrwalnik (endosporę), który uwolniony do środowiska, jest gwarancją przetrwania materiału genetycznego bakterii. Dzięki złożonej budowie, endospory są niezwykle odporne na szereg szkodliwych czynników środowiskowych. W formie uśpionej mogą przetrwać latami. Pozornie nieaktywne przetrwalniki stale monitorują stan środowiska w oczekiwaniu na poprawę jego warunków. W procesie kiełkowania uśpione przetrwalniki przekształcają się do formy wegetatywnej, która będzie kontynuować wzrost wegetatywny. Dotychczas najlepiej poznaną ścieżką inicjacji kiełkowania przetrwalników jest inicjacja pokarmowo-zależna z udziałem receptorów kiełkowania, z których receptor GerA uznawany jest za samodzielnie rozpoczynający kiełkowanie. Receptor GerA reaguje na obecność w środowisku aminokwasów L-alaniny lub L-waliny. Na podstawie analizy sekwencji kodującej ten receptor wiadomo, że składa się on z 3 białek: A, B i C. Ze względu na złożoną budowę i ich błonowy charakter, dane strukturalne i funkcjonalne na temat receptorów kiełkowania wciąż są bardzo ograniczone.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wybranych aspektów funkcjonowania receptora GerA i zaproponowanie możliwego sposobu działania tego kompleksu w procesie inicjacji kiełkowania.

Najpierw poczyniono próby utworzenia szczepu *B. subtilis*, w którym możliwe byłoby wykrywanie i obserwowanie poszczególnych białek receptora. Pomimo skonstruowania szczepu, w którym do każdego z genów w operonie *gerA* dołączono odpowiedni epitop antygenowy, przetrwalniki uzyskane z tego szczepu nie były zdolne do kiełkowania. Następnie, badania skupiły się na analizie konserwowanego motywu VPFP w białku A. W tym celu dokonano substytucji proliny w pozycji 324 (P324S, P324G, P324A, P324F). Uzyskane szczepy analizowano pod kątem właściwości, jakie wykazywały ich przetrwalniki w procesie kiełkowania, zarówno w obecności aktywatorów (L-alanina, L-walina, AGFK, dodecylamina), jak i inhibitora – D-alaniny. Analizy mikroskopowe i testy kiełkowania wykazały, że substytucja pozycji 324 białka A powoduje powstanie heterologicznej populacji przetrwalników o zmienionych właściwościach w stosunku do przetrwalników szczepu typu dzikiego. Przede wszystkim było to obserwowane jako przetrwalniki w fazie ciemnej lub szarej jeszcze przed rozpoczęciem kiełkowania, co wskazuje na uwodnienie ich rdzenia już w trakcie procesu formowania. Wiązało się to również ze zmniejszoną wydajnością sporulacji szczepów z mutacjami. Ponadto, przetrwalniki z mutacjami P324S i P324G były zdolne do kiełkowania w obecności inhibitora. Ponieważ wydajność kiełkowania przetrwalników poszczególnych szczepów, użytych w tych badaniach, różniła się, na koniec przeprowadzono analizę ekspresji genów operonu *gerA* w poszczególnych szczepach *B. subtilis*. Wyniki tego badania pokazały, że różnice obserwowane na poziomie wydajności kiełkowania mogą być efektem nierównego poziomu ekspresji genów w operonie, szczególnie jeśli oryginalny układ genów został zaburzony.

Uzyskane wyniki sugerują, że oryginalna organizacja genów operonu *gerA* może mieć kluczowe znaczenie dla wydajnej syntezy białek kompleksu GerA. Może to również tłumaczyć brak kiełkowania przetrwalników z receptorem GerA zawierającym epitopy antygenowe. Ponadto, wyniki analizy mutacji pozycji P324 w białku A pokazują, że motyw VPFP pełni istotną rolę w działaniu całego kompleksu GerA, prawdopodobnie jako modulator działania białka B, zawierającego przypuszczalną kieszeń wiązania ligandu. W świetle najnowszych opublikowanych danych na temat białek receptora GerA, wyniki z mutagenyzy pozycji 324, mogą stanowić ważny argument przy określaniu funkcji, jaką pełni białko A w aktywacji całego receptora.

Summary

Bacillus subtilis is considered a model organism for research on bacterial cell development during its cell cycle. Under conditions unfavourable for vegetative growth, this Gram-positive bacterium starts an alternative developmental pathway. In sporulation process *B. subtilis* forms an endospore which, upon the release to the environment, guarantees the survival of bacterial genetic material. Thanks to its complex structure, endospores are extremely resistant to harsh environmental conditions. As dormant entities spores are able to survive for years. Seemingly inactive, endospores constantly monitor the environment, expecting improvement in conditions. During the process of germination dormant spores transform into a vegetative form, which will continue the active growth. The best known pathway of germination initiation so far is the nutrient-dependent initiation by germination receptors, with GerA considered an independently acting receptor. GerA reacts to the presence of amino acids L-alanine or L-valine in the environment. Based on the protein encoding sequences it is known that the receptor consists of 3 proteins: A, B and C. Due to their complex structure and transmembrane features, structural and functional data about the germination receptors are still very limited.

Objective for this dissertation was to investigate given aspects of GerA receptor functions and to propose a possible mechanism of action for the entire protein complex in germination initiation.

First, there was made an attempt to construct a strain of *B. subtilis*, in which all of the germination receptor's proteins could be detected and visualized. Despite constructing the strain with given antigen epitopes cloned to each gene from the *gerA* operon, endospores obtained from such a strain were unable to germinate. Next, the research focused on conserved motif VPFP analysis in protein A. In order to do that substitution of proline in position 324 (P324S, P324G, P324A, P324F) was performed. Obtained strains were analysed for the properties of their spores during germination process, in the presence of both activators (L-alanine, L-valine, AGFK, dodecylamine) and an inhibitor – D-alanine. Microscopic and germination analyses showed that substitution in position 324 of protein A created a heterologous population of endospores with changed properties, in comparison to endospores from wild type strain. First of all, it was observed as spores in phase dark or grey before even the germination was initiated, which suggests a hydration of their core compartment during the formation process. It was also connected with a reduced sporulation efficiency of strains with mutations. Moreover, endospores with mutations P324S and P324G were also able to germinate in the exclusive presence of inhibitor. Because the endospore germination efficiency of analysed strains varied, in the end operon *gerA* genes expression analysis was performed. The results showed that the differences observed on the level of germination efficiency could be caused by the uneven level of operon genes expression, especially when the original genes arrangement was disturbed.

The results obtained from the research presented here suggest that the initial genes arrangement in *gerA* operon might be crucial for the efficient protein synthesis to functional GerA protein complex. It could also explain why endospores from strain with antigen epitopes in *gerA* operon have not germinated. What is more, results from mutagenesis of protein A's position 324 indicate that VPFP motif plays essential role in the function of the entire GerA complex, probably as a modulator for protein B, where a putative ligand binding pocket is located. In the light of recently published data on GerA receptor proteins, results from position 324 mutagenesis could be an important argument in determining the function for protein A in the entire receptor activation.

1. Wstęp

1.1 *Bacillus subtilis* jako organizm modelowy

Użycie organizmów zwierzęcych w badaniach jest znane człowiekowi od czasów starożytnych. Przekonanie, że obserwacja organizmów pozornie prostszych w swojej strukturze może dostarczyć informacji do poznania i zrozumienia organizmów bardziej złożonych, zachowała się w podejściu badawczym (w formie stopniowo ewoluującej) do czasów współczesnych. Prawdopodobnie jednym z pierwszych nowożytnych naukowców kierujących się takim rozumowaniem był Grzegorz Mendel. Obserwacje w dziedziczeniu cech grochu zwyczajnego potrafił zinterpretować tak, aby sformułować prawa dziedziczenia, które mogły być obserwowane też u zwierząt. Choć obecnie zdajemy sobie sprawę, że przeniesienie cech i właściwości z organizmów prostszych na bardziej złożone, nie jest tak jednoznaczne, koncept organizmu modelowego pozostaje jedną z podstaw badań m.in. z zakresu biologii molekularnej. Dlatego współcześnie wyróżniamy co najmniej kilkadziesiąt gatunków stanowiących osobne modele badań dla wirusów, organizmów prokariotycznych i eukariotycznych (protisty, grzyby, rośliny, zwierzęta).

Wśród bakterii, prawdopodobnie najbardziej rozpowszechnionym organizmem modelowym jest Gram-ujemna bakteria *Escherichia coli*. Mając na uwadze podstawowy podział na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, *E. coli* nie jest wystarczającym modelem, który mógł być wykorzystany do badań przedstawicieli obu tych grup. Dodatkowo, dane filogenetyczne pokazują, że bakterie Gram-dodatnie i Archeony są ze sobą bliżej spokrewnione, niż bakterie Gram-ujemne, które wyewoluowały później (Gupta, 2000). Dlatego równie ważnym gatunkiem, co *E. coli* dla bakterii Gram-ujemnych, jest *Bacillus subtilis*.

Ta Gram-dodatnia laseczka to obecnie stosunkowo najlepiej poznany reprezentant klasy *Bacilli*. W świecie naukowym *Bacillus subtilis* rozpoczął swoje istnienie w 2. połowie XIX w. za sprawą Ferdynanda Cohna. Zaproponował on tę nazwę gatunkową dla bakterii obserwowanych jako stosunkowo duże, wydłużone struktury, czasami z wiciami umożliwiającymi aktywny ruch, pół wieku wcześniej nazwanymi przez Ch. G. Ehrenberga *Vibrio subtilis*. F. Cohn obserwował pierwsze hodowle *B. subtilis* w naparach z łubinu i grochu lub innych mieszaninach fermentujących. Już te pierwsze wzmianki wskazują, że bakteria ta występuje w towarzystwie roślin, a także wykazuje potencjał do

przeprowadzania reakcji fermentowania. Współcześnie *B. subtilis* jest izolowany najczęściej z gleby, szczególnie z okolic ryzosfery roślin. Ponadto, jest to również element fizjologicznej mikroflory układu pokarmowego zwierząt, w tym człowieka (Ilinskaya et al., 2017).

Jak przystało na organizm modelowy, *Bacillus subtilis* wykazuje szereg cech, dzięki którym tak chętnie jest wykorzystywany w badaniach podstawowych. Należą do nich między innymi:

1. przystępność w hodowli
2. dobrze poznany genom
3. podatność na manipulacje genetyczne
4. potencjalne znaczenie organizmu w kontekście gospodarczym.

Ad.1 Przystępność w hodowli.

W warunkach laboratoryjnych *B. subtilis* nie przysparza badaczom większych problemów w hodowli. W warunkach optymalnej dostępności zasobów pokarmowych bakteria ta namnaża się szybko poprzez symetryczny podział komórki. Zazwyczaj czas generacji wynosi ok. 30 min. Zakres temperatur, w których *B. subtilis* jest zdolny do wzrostu wegetatywnego jest szeroki, ponieważ obejmuje temperatury od ok. 11°C (Nichols et al., 1995) do nawet 52°C (Holtmann et al., 2004). Sugeruje to obecność wydajnych systemów umożliwiających adaptację do wzrostu w różnych temperaturach (Budde et al., 2006; Helmann et al., 2001; Schumann, 2016). W warunkach laboratoryjnych temperatura 37°C jest używana jako optimum. Ze względu na zróżnicowane środowiska, w których występuje, nie dziwi fakt, że *B. subtilis* potrafi namnażać się zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych (Hong et al., 2009; Nakano & Zuber, 1998). Również szeroki zakres tolerancji na zmiany pH i ciśnienia osmotycznego, pozwalają na stosunkowo proste hodowanie tej bakterii w każdym laboratorium.

Co ciekawe, wzrost wegetatywny z symetrycznym podziałem komórki, to tylko jedna z kilku możliwości rozwoju w całym cyklu życiowym *B. subtilis*. W obliczu wykorzystania zasobów pokarmowych środowiska, aby przetrwać pogarszające się warunki, większość bakterii typu *Firmicutes*, do którego należy *B. subtilis*, uruchamia proces sporulacji. Ta alternatywna ścieżka rozwoju prowadzi do przekształcenia części komórki bakteryjnej w

formę przetrwalnika, który może przetrwać w środowisku, do czasu polepszenia się warunków. Wówczas, w procesie kiełkowania, przetrwalnik może na powrót przekształcić się w komórkę wegetatywną i dalej propagować jej materiał genetyczny w środowisku. Zarówno sporulacja, jak i kiełkowanie, to bardzo złożone sekwencje przemian, do opisu których powrócę w dalszej części tego rozdziału. Niemniej, zdolność *B. subtilis* do ich przeprowadzania, sprawia, że stał się on układem modelowym do badania przemian, jakim poddawana jest komórka wegetatywna w cyklu życiowym.

Ad.2 Dobrze poznany genom.

Genom *Bacillus subtilis* został zsekwencjonowany w roku 1997. Była to pierwsza kompletna sekwencja genomu bakterii Gram-dodatniej. Jego rozmiar to ponad 4,2 Mbp, w tym 43% stanowią pary guanidyny i cytozyny (Kunst et al., 1997). W genomie można obecnie wyróżnić około 4200 genów kodujących białka. Intensywne badania genetyczne pozwoliły ustalić liczbę blisko 270 genów, jako tych, które są absolutnie niezbędne do funkcjonowania komórki (Kobayashi et al., 2003). Dzięki rozwojowi technik sekwencjonowania informacje na temat genomu *B. subtilis* oraz innych gatunków z rodzaju *Bacillus* sukcesywnie są aktualizowane i gromadzone w wielu ogólnie dostępnych bazach danych, np. SubtiWiki (Zhu & Stülke, 2018) czy BioCyc (Karp et al., 2019).

Należy pamiętać, że pierwsze kompletne sekwencjonowanie genomu wykonano z użyciem szczepu laboratoryjnego, uznanego jako „typ dziki” i znanego wśród badaczy jako szczep 168. Od tego czasu stało się wiadomym, że rodzaj *Bacillus sensu lato* to bardzo zróżnicowana grupa, obejmująca gatunki wykazujące szerokie spektrum pokrewieństwa (Hernández-González et al., 2018; Wang & Ash, 2015). Szczep 168 został wyizolowany w trakcie badań botaników z Uniwersytetu Yale, Paula Burkholdera i Normana Gilesa, prowadzonych w połowie XX w. (Burkholder & Giles, 1947). Używali oni wówczas szczepu *B. subtilis* Marburg w doświadczeniach mutagenezy. Powstałe szczepy, identyfikowali pod kątem nabytych cech auktotrofii. W wyniku różnych zawirowań historycznych, projekt został porzucony i znaczna część tej kolekcji, łącznie z wyjściowym szczepem typu dzikiego, zostały utracone. Zbiegiem okoliczności, kilka szczepów, w tym ten o numerze porządkowym 168, trafiły do Charlesa Yanofsky’ego z Uniwersytetu Stanford. Następnie udostępniono tę kolekcję do dalszych badań Johnowi Spizizen. To on wykazał, że właśnie szczep o numerze 168, który był auktotrofem tryptofanowym, wykazuje największy potencjał do transformowania DNA zewnątrzkomórkowym

(Spizizen, 1958). Od tego momentu przyjęło się, że szczep 168 to oficjalny szczep *Bacillus subtilis* typu dzikiego. Niemniej, równolegle funkcjonuje kilka szczepów, również uznawanych za „typ dziki”, np. NCIB 3610, PY79, W23, PS832. Badania filogenetyczne pokazują, że szczep 168 jest najbardziej prawdopodobną wersją szczepu z eksperymentów Burkholdera i Gilesa. Przemawia za tym utrzymana auksotrofia (np. PY79 jest prototrofem) i brak niektórych cech obecnych w szczepach środowiskowych, np. zdolność do swarmingu (Zeigler et al., 2008). Choć referencyjne szczepy laboratoryjne wykazują pewne różnice genetyczne, uznaje się, że nie powinny one mieć znaczącego wpływu na badania. Ciężko jest jednoznacznie stwierdzić, czy jest to właściwe rozumowanie, szczególnie w obliczu identyfikowania wciąż nowych genów, których funkcje dopiero staramy się wpisać w znane już ścieżki metaboliczne. Niemniej jednak, praktyka laboratoryjna nakazuje, aby nie używać zamiennie różnych szczepów typu dzikiego, ponieważ minimalne różnice tła genetycznego mogą wprowadzić dodatkowe zmienne do układu doświadczalnego.

Ad.3 Podatność na manipulacje genetyczne

Znaczącym ułatwieniem w badaniach genetycznych jest zdolność laboratoryjnych szczepów *Bacillus subtilis* do aktywnego pobierania zewnątrzkomórkowego materiału genetycznego. Stan kompetencji jest aktywowany w fazie stacjonarnej wzrostu, kiedy zasoby pokarmowe zostają maksymalnie wykorzystane (Dubnau, 1991). Pobieranie obcego DNA stanowi jedną ze strategii przetrwania bakterii w obliczu pogarszających się warunków środowiskowych. Wykorzystano tę właściwość do opracowania używanych do dziś metod transformacji DNA plazmidowym lub chromosomalnym (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961; Rahmer et al., 2015; Spizizen, 1958). Jakkolwiek zjawisko naturalnej kompetencji jest bardzo użyteczne, tylko pewna frakcja komórek w hodowli aktywnie poddaje się temu procesowi. Stąd stale rozwijane są inne techniki używane do modyfikowania materiału genetycznego szczepów rodzaju *Bacillus*. W pewnych przypadkach, bardziej niż transformacja komórek kompetentnych, skuteczna okazuje się transformacja protoplastów. Jednak jest to procedura czasochłonna i złożona, a etap regeneracji po transformacji delikatnych protoplastów, niezwykle wrażliwy na warunki zewnętrzne. Poza użyciem naturalnej kompetencji *B. subtilis*, do modyfikacji materiału genetycznego tej bakterii wykorzystuje się transdukcję za pomocą fagów (Nijland et al., 2010; Takahasi, 1963; Taylor & Thorne, 1963; Yasbin & Young, 1974).

W miarę rozwijania się technik manipulacji genetycznych, dla *B. subtilis* również opracowywano dedykowane narzędzia do wprowadzania kontrolowanych zmian w obrębie genomu. Obecnie dysponujemy kolekcją wektorów integrujących do chromosomu na drodze rekombinacji homologicznej, co pozwala na wprowadzanie stabilnych zmian genetycznych. Użycie transpozonów również otworzyło kolejne możliwości do wprowadzania modyfikacji (Youngman et al., 1983).

Wspomniane do tej pory techniki wiążą się w dużej mierze ze stosowaniem markerów do identyfikacji wprowadzanych zmian genetycznych, np. genów oporności antybiotykowej. Wraz z rosnącym problemem antybiotykoodporności mikroorganizmów i zwiększającym się wykorzystaniem *B. subtilis* w hodowlach na skalę przemysłową, w ostatnich latach zaczęło pojawiać się coraz więcej metod umożliwiających modyfikacje genetyczne *B. subtilis* (i innych gatunków o znaczeniu przemysłowym) bez wykorzystywania genów markerowych, np. poprzez wykorzystanie systemów represji transkrypcji (Dong H., 2014). Kolejnym kierunkiem w rozwoju technik do manipulacji genetycznych u *B. subtilis* jest z pewnością użycie technologii edycji genów CRISPR – Cas9. Technologia ta wykorzystuje naturalny system obronny bakterii, w którym cząsteczki RNA (CRISPR RNA) wiążą się z obcymi dla genomu sekwencjami DNA, a dedykowane białka Cas zajmują się celowanym wycięciem wskazanych, obcych sekwencji (Peters et al., 2015). Zdecydowaną zaletą tego systemu jest jego wysoka specyficzność względem sekwencji, która jest celem modyfikacji oraz możliwość zrezygnowania z używania dodatkowych genów do selekcji. Choć jest to stosunkowo nowa technologia, jej wykorzystanie w badaniach genetycznych *B. subtilis* jest już powszechne (Altenbuchner, 2016; Burby & Simmons, 2017 Westbrook A.W., 2016). Szybkość i precyzyjność wprowadzania modyfikacji genetycznych, w porównaniu do tradycyjnych klonowań, sprawia, że szczepy używane w przemyśle są opracowywane właśnie w ten sposób.

Ad.4 Potencjalne znaczenie organizmu w kontekście gospodarczym

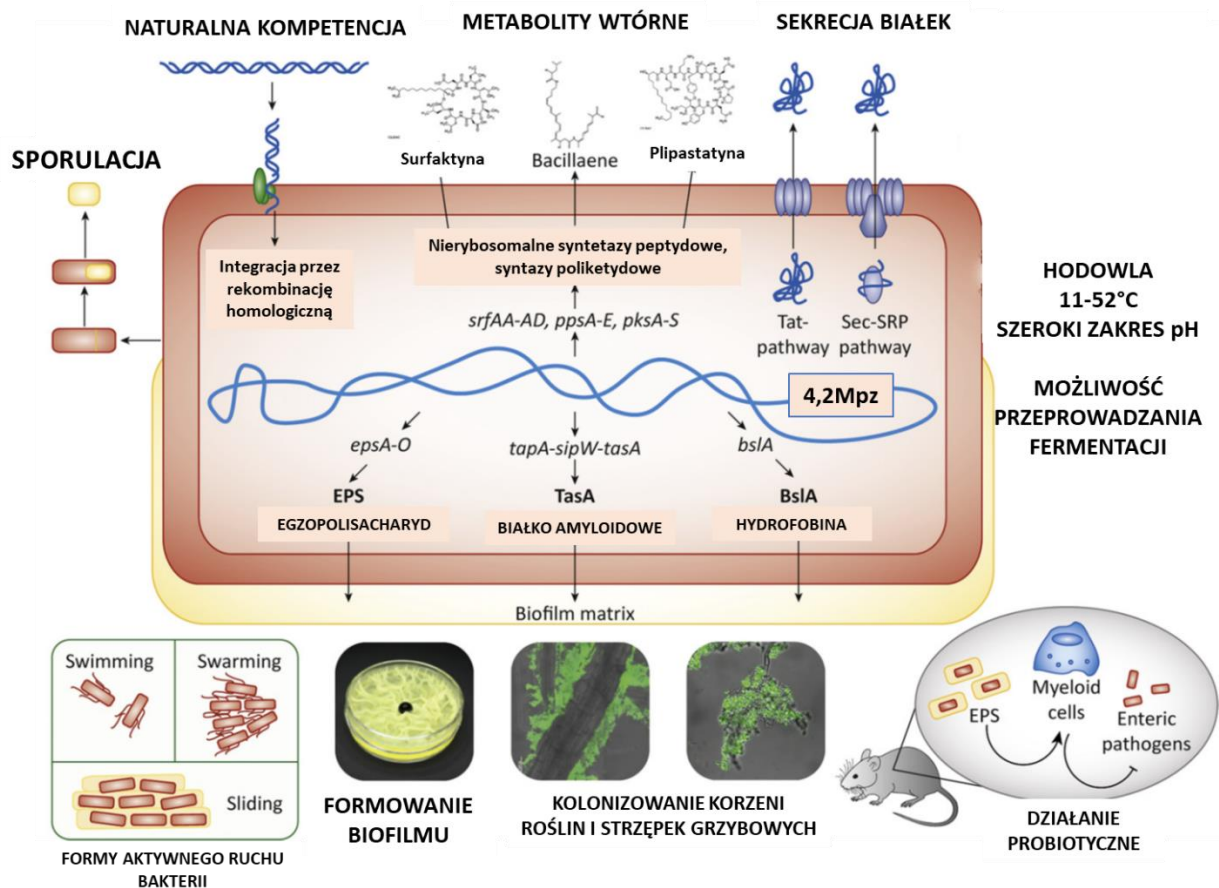
B. subtilis posiada również cechy, które stały się niezwykle cenne dla różnych gałęzi przemysłu. Jak pokazują pierwsze zapiski F. Cohna, bakteria ta obserwowana była w mieszaninach fermentujących różne rośliny (Soule, 1932). Fermentacja przeprowadzana przez *B. subtilis* jest znacznie krótsza – zazwyczaj jest to ok. 48 h, w porównaniu do ok. 180 h u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Aslankoohi E., 2015; Ma Y., 2016). Jest to znacząca przewaga ekonomiczna. Opisana wcześniej szeroka paleta narzędzi do

modyfikowania genomu pozwala na uzyskanie szczepów o najbardziej optymalnych i pożądanym właściwościach do produkcji określonych substancji. *B. subtilis* posiada również niezwykle wydajne systemy sekrecji (m.in. ścieżki Sec i Tat), które umiejętnie zostały wykorzystane do produkcji enzymów, białek heterologicznych, antybiotyków, witamin i aminokwasów (Cui et al., 2018). W przeciwieństwie do bakterii *E. coli*, która jest równie często wykorzystywana w przemyśle, *B. subtilis* posiada pojedynczą błonę, co ułatwia sekrecję do pożywki, a to upraszcza dalsze przetwarzanie wytworzonych polipeptydów. Zgodnie ze statystykami, nawet 50% całkowitego rynku enzymów przemysłowych produkowane jest z wykorzystaniem szczepów *B. subtilis* (Schallmey et al., 2004). Wyróżnia się tu m.in. amylazy, ksylanazy, lichenaza, β -galaktozydaza, celulazy, proteazy alkaliczne i inne (Su et al., 2020). Enzymy te znajdują zastosowanie w produkcji żywności, pasz, detergentów, w przemyśle włókienniczym, skórzanym, papierniczym czy farmaceutycznym (Danilova & Sharipova, 2020; Singh R. et al., 2016; Zhang et al., 2020). Przykładami takich enzymów produkowanych przez genetycznie modyfikowane przemysłowe szczepy *B. subtilis* są Durazym™, Termamyl®, Mannaway®, będące produktami do usuwania różnych plam firmy Novozymes (“NOVOZYMES — Driven by Research and Scientists,” 2001).

Co ważne, *Bacillus subtilis* jest uznany za bakterię bezpieczną dla zdrowia człowieka i zwierząt (ang. *QPS status – qualified presumption of safety*), dzięki czemu nie ma przeciwwskazań, aby używać ten gatunek do produkcji składników pożywienia lub leków. W związku z tym, wykorzystanie go do celów probiotycznych nie jest zaskoczeniem. Już w czasie II Wojny Światowej niemieccy lekarze odkryli, że podawanie mieszanin takich bakterii skutecznie chroni żołnierzy przed rozwojem czerwonki i tyfusu (Kovács, 2019). Obecnie wiadomo, że oprócz pozytywnego wpływu na układ pokarmowy człowieka, zarówno komórki wegetatywne jak i przetrwalniki *B. subtilis* działają również na zwierzęta. Jako dodatek w formie przetrwalnikowej do pasz, wykiełkowane bakterie skutecznie kolonizują układ pokarmowy zwierząt, wspomagając w ten sposób procesy trawienne. To przekłada się na poprawę ogólnego zdrowia zwierząt i np. zwiększoną produkcję mleka u krów mlecznych (Souza V.L., 2017) lub polepszoną jakość składanych jaj u kur (Abdelqader A., 2013). Ponadto, *B. subtilis* może być używany w skutecznej bioremediacji hodowli ryb oraz krewetek, równocześnie chroniąc te zwierzęta przed chorobami (Olmos J., 2020).

Szeroki wachlarz zastosowań *B. subtilis* to tylko jedna strona medalu. Choć jest to bakteria ze statusem QPS, istnieje kilka aspektów, które sprawiają, że *B. subtilis* i inne gatunki z rodzaju *Bacillus* przysparzają człowiekowi wielu problemów. Gatunki *Bacillus* są zdolne do formowania złożonych biofilmów (Dunne, 2002; Vlamakis et al., 2013). W ten sposób formy wegetatywne są dużo trudniejsze w usuwaniu, kiedy pojawiają się w niepożądanych miejscach. Z punktu widzenia przemysłu, modyfikowane genetycznie szczepy *B. subtilis* mogą tworzyć biofilmy wytwarzające określone substancje, np. wspomagające wzrost roślin (Hashmi et al., 2019). Jednak biofilmy bakteryjne pojawiające się w trakcie produkcji spożywczej to już poważny problem. Oprócz *B. subtilis*, do psucia się żywności przyczynia się *B. cereus*. Ten drugi gatunek to najczęstsza przyczyna psucia się produktów nabiałowych, nawet tych przechodzących procesy sterylizacyjne (Choi & Kim, 2020; Shugart, 2005). Jego zdolność do wydzielania toksyn stanowi poważne zagrożenie zatruciami pokarmowymi. *B. subtilis* jest częstą przyczyną psucia się pieczywa (Li Z. et al., 2020). W obu przypadkach przyczynami zanieczyszczeń jedzenia tymi mikroorganizmami jest fakt, że potrafią one przetrwać w formie przetrwalników w temperaturze ponad 100°C, przewidzianej np. do sterylizacji UHT mleka. Choć nieprzetworzone np. mleko lub soki są już rezerwuarem różnorodnych bakterii, w tak wysokich temperaturach bakterie Gram-ujemne i inne nieprzetrwalnikujące giną, co daje *B. cereus* i *B. subtilis* przewagę w późniejszym kolonizowaniu produktów żywnościowych jak i maszyn używanych w produkcji. Dlatego tak ważne jest zwiększanie wiedzy na temat funkcjonowania spor, od ich powstania po kiełkowanie.

Innym poważnym zagrożeniem z rodzaju *Bacillus* jest *Bacillus anthracis*. Jest to czynnik etiologiczny wąglika – choroby zakaźnej zwierząt hodowlanych i ludzi (D'Amelio et al., 2015; Koch, 1876). Jest to na tyle poważna jednostka chorobowa, że od początku XX wieku badania i dyskusje na ten temat wielokrotnie odbywały się w kontekście prac nad bronią biologiczną. Badania filogenetyczne pokazują, że *B. anthracis* wykazuje bliższe pokrewieństwo z potencjalnie patogennymi gatunkami (*B. cereus*, *B. thuringensis* – patogen owadzi, *B. mycoides* – patogen ryb) niż z *B. subtilis* (Wang A. & Ash, 2015). Mimo tego, badania podstawowe nad niepatogennym *B. subtilis* są potrzebne do lepszego poznania procesów życiowych, które mogą nam powiedzieć więcej o biologii tego mikroorganizmu.



Rycina 1. Najważniejsze cechy *Bacillus subtilis*, które czynią ten organizm najczęściej badanym przedstawicielem rodzaju *Bacillus*. Na podstawie (Kovács, 2019).

1.2 Sporulacja – formowanie przetrwalników jako alternatywna ścieżka rozwoju *Bacillus subtilis*

Jak u większości przedstawicieli typu *Firmicutes*, w cyklu życiowym *B. subtilis* wzrost wegetatywny z symetrycznym podziałem komórki, jest tylko jednym z możliwych scenariuszy. Punktem zwrotnym w cyklu życiowym tej bakterii jest osiągnięcie fazy stacjonarnej wzrostu. W obliczu maksymalnego wykorzystania zasobów środowiska, zarówno pod względem składników odżywczych i zajmowanej powierzchni, *B. subtilis* wykorzystuje kilka strategii przetrwania, które mogą uchronić daną populację przed śmiercią. Bakterie mogą maksymalnie spowolnić wzrost, dzieląc się co kilka dni, zmieniając przy tym kształt komórki z laseczki, na bliski ziarniakom (Gray et al., 2019). W ten sposób, nie ponosząc wysokich kosztów energetycznych, mogą przeczekać niekorzystne warunki. Alternatywnie dla takiego podejścia, bakterie mogą uruchomić

syntezę białek wici i innych białek zaangażowanych w chemotaksję, aby aktywnie przemieścić się w niszę cechującą się bardziej sprzyjającymi warunkami (Rao et al., 2008). Dodatkowo może zostać uruchomiona sekrecja zarówno antybiotyków (Stein, 2005) jak i toksyn (Höfler et al., 2016), które zahamują wzrost konkurujących o niszę bakterii. Ponadto komórki bakteryjne mogą produkować enzymy, np. proteazy, które pomogą w degradowaniu makromolekuł, które pojawią się w otoczeniu (np. z lizujących bakterii), do formy łatwiej przyswajalnej (Kobayashi K. & Ikemoto, 2019). Jeśli mimo wdrożenia takich strategii, warunki środowiska pozostają niekorzystne, mniej niż połowa populacji uruchomi ścieżkę naturalnej kompetencji (Schultz et al., 2009). Te bakterie zaczną pobierać pojawiający się w środowisku egzogeny DNA pochodzący z lizujących bakterii. Przejmując nową informację genetyczną, mogą zyskać cechy, które zwiększą szanse ich przeżycia w panujących warunkach. Jednak ta strategia wciąż może być niewystarczająca w obliczu stale pogarszającego się stanu środowiska. Ostatnią możliwością przetrwania jest uruchomienie transformacji komórki wegetatywnej do formy przetrwalnikowej, czyli sporulacji. Ponieważ proces ten jest niezwykle energochłonny, bakterie uruchamiają go jedynie, gdy wszystkie wcześniejsze opcje okażą się niewystarczające.

Już w połowie XIX wieku badacze obserwowali, że bakterie z rodzaju *Bacillus* wytwarzają wewnątrz komórek pewne załamujące światło granule, które są w stanie przetrwać proces tyndalizacji (Riley, Schwarz, et al., 2021). Sto lat później, w latach 60. XX wieku ustalono, że bakterie te przeprowadzają wieloetapowy proces sporulacji, w wyniku którego do środowiska zostaje uwolniony nieaktywny metabolicznie przetrwalnik (Fitz-James, 1960; Kawata et al., 1963; Ohye & Murrell, 1962; Young & Fitz-James, 1959).

Do dzisiaj uznaje się, że sporulacja obejmuje siedem rozróżnialnych etapów formowania przetrwalnika. Zasadniczo obejmują one:

- etap przygotowujący do sporulacji (etap 0),
- charakterystyczny asymetryczny podział komórki na większą komórkę maczyną i mniejszą presporę (etapy I – II),
- wchłonięcie prespory do wnętrza komórki maczynnej i formowanie tam przetrwalnika (etapy III – V),
- uwolnienie dojrzałego przetrwalnika do środowiska (etap VI).

Badania nad *B. subtilis* stopniowo dostarczały nowych informacji na temat genów, które były przypisywane do określonych procesów w komórce, m.in. do sporulacji. Od początku każdy gen, który został powiązany z procesem sporulacji, otrzymywał nazwę zaczynającą się od *spo* (z ang. *sporulation*). W miarę rozwoju badań, można było obserwować na jakim etapie szczepy z mutacjami w genach *spo* blokowały ten proces. W związku z tym, dalsza klasyfikacja genów *spo* polegała na dopisaniu cyfry rzymskiej, odpowiadającej numerowi etapu sporulacji, na który badana mutacja genu wpływała (np. *spo0*, *spoII*, *spoIV*). Wielka litera dopisana do takiego zestawienia została użyta, aby rozróżnić poszczególne *loci*, które zostały przypisane do tego samego etapu sporulacji, np. *spoIIIA* i *spoIIIE* odnoszą się do dwóch różnych genów, których mutacje blokują sporulację na trzecim etapie. Kolejność używanych liter jest prawdopodobnie arbitralna, związana z kolejnością odkrywania. Ponieważ pewne zidentyfikowane *loci* okazywały się w rzeczywistości wielogenowymi operonami, aby rozróżnić poszczególne geny, do dotychczasowych nazw dodawano kolejne wielkie litery, np. *spoIIIA* locus to operon składający się z 8 genów o nazwach od *spoIIIAA* do *spoIIIAH*. Podobny system nazewnictwa został również użyty przy genach powiązanych z kiełkowaniem, *ger* (ang. *germination*) lub z syntezą płaszcza przetrwalnika, *cot* (ang. *coat*). Choć w świetle najnowszych badań, funkcje niektórych białek, historycznie powiązanych np. ze sporulacją, zostały zweryfikowane i często nie są już bezpośrednio zaangażowane w ten proces, ta tradycyjna nomenklatura genów i białek wciąż pozostaje w użyciu.

Całkowite uformowanie przetrwalnika trwa najczęściej około 8-10 h. Ustalenie wspomnianych wcześniej etapów rozwojowych w sporulacji znacząco pomaga w usystematyzowaniu tego złożonego procesu. Niemniej, należy pamiętać o kilku wyjątkowych aspektach tych przemian. Ekspresja genów powiązanych ze sporulacją jest ściśle zależna zarówno od określonego etapu formowania przetrwalnika, jak i przedziału komórkowego, w którym następuje. Ekspresja większości genów *spo* zostaje indukowana tylko na określonych etapach sporulacji (bez wpływania na wzrost wegetatywny) i tylko w obrębie komórki matczynej lub tylko w presporze (Losick, 1986). Ponadto obserwowana jest silna zależność w sekwencyjnej ekspresji zaangażowanych genów. Oznacza to, że ekspresja genów z późniejszych etapów sporulacji nie rozpocznie się, dopóki ekspresja wcześniejszych genów się nie powiedzie (Eichenberger et al., 2004). Ten złożony system kontroli ekspresji genów w czasie i przestrzeni okazuje się być bardzo częstym

rozwiązaniem w regulowaniu różnych procesów metabolicznych (Berkhout et al., 2013; Walker et al., 2017).

Analizując proces sporulacji należy pamiętać, że istnieje ścisła współzależność między poszczególnymi wydarzeniami. Opisywane przemiany, choć bardzo zróżnicowane, często dzieją się prawie równocześnie. Co powoduje, że kolejne etapy znane z literatury, zazębiają się, a zaangażowane w nie białka, mimo swojego nomenklaturowego przypisania do jednego z nich, *de facto* działają w różnych punktach czasowych w trakcie sporulacji.

1.2.1 Charakterystyka etapów sporulacji *Bacillus subtilis*

Etap 0

Zanim formowanie przetrwalnika rozpocznie się na dobre, komórka bateryjna musi przygotować maszynę molekularną, która będzie potrzebna do tych przemian. Sygnał do rozpoczęcia tego procesu (pochodzący m.in. z integracji sygnałów środowiskowych) dostarczany jest przez złożoną i ściśle regulowaną ścieżkę sygnalizacyjną (Burbulys D., 1991; Piggot & Hilbert, 2004). Obejmuje ona kinazy histydynowe (KinA-E, transmembranowe lub cytoplazmatyczne), które poprzez swoją autofosforylację dostarczają grupy fosforanowe do kolejnych przekaźników – fosfotransferaz (Spo0F, Spo0B). Ich celem jest dostarczenie tych grup do ostatecznego akceptora, białka Spo0A. Ta sekwencja zdarzeń, określana w języku angielskim jako *phosphorelay* (w dosłownym tłumaczeniu „sztafeta fosforanowa”), ma na celu stopniowe zwiększanie ilości ufosforylowanego Spo0A (Spo0A~P), które w takiej formie aktywuje transkrypcję genów potrzebnych do rozpoczęcia sporulacji (Fujita & Losick, 2005). W pierwszej kolejności aktywowana zostaje transkrypcja genów *spoIIA* i *spoIIG*, które kodują czynniki transkrypcji sigma F (σ^F) i sigma E (σ^E) dla polimerazy RNA, dedykowane transkrypcji genów, odpowiednio w presporze i w komórce matczynej (Losick, 1986).

Spo0A jest nazywany nadrzędnym białkiem regulatorowym u *B. subtilis* (ang. *master regulator*). Określenie to wynika z faktu, że do tej pory zidentyfikowano ponad 200 genów, których ekspresja jest regulowana, pośrednio lub bezpośrednio, przez Spo0A (Fujita et al., 2005; Molle et al., 2003). Są to geny z różnych etapów cyklu życiowego *B. subtilis*. Geny należące do regulonu Spo0A można podzielić w zależności od tego jaka ilość Spo0A~P jest wystarczająca do wywołania efektu regulującego ich transkrypcję.

Geny *spo* należą do grupy, która aktywowana jest w wyniku możliwie największej akumulacji Spo0A~P w komórce. Stopniowo zwiększające się stężenie Spo0A~P w fazie wzrostu stacjonarnego prowadzi do zahamowania procesów zależnych od mniejszych ilości Spo0A~P, np. podział komórki, replikacja DNA, co w efekcie daje czas komórce do przestawienia metabolizmu na ścieżkę sporulacyjną. Zachowanie tej sekwencji stopniowego przyrostu ufosforylowanego Spo0A gwarantuje pomyślną inicjację i zakończenie sporulacji (Vishnoi et al., 2013).

Etapy I – II

Kiedy sygnał ze ścieżki sygnalizacyjnej ostatecznie uruchomi wczesne geny *spo*, w komórce zaczynają być obserwowane znaczące zmiany (Ryc.2). Chromosom bakteryjny po ostatniej rundzie replikacji, zazwyczaj zajmujący centralną część komórki, ustawiony zostaje równolegle w stosunku do dłuższej osi komórki (Bylund et al., 1993). Taka rozciągnięta forma obu kopii chromosomu bakterii jest stabilizowana m.in. przez białka RecA i DivIVA zlokalizowane na przeciwległych biegunach komórki (Ben-Yehuda et al., 2003a, 2005).

Następnie, maszynaria molekularna zazwyczaj zaangażowana w syntezę przegrody podziałowej, zamiast w centralnej części, przesuwa ją w kierunku biegunów komórki (Ben-Yehuda & Losick, 2002). Homolog tubuliny, białko FtsZ tworzy przypominające pierścienie struktury, które rozpoczynają charakterystyczny asymetryczny podział komórki. Choć początkowo po obu stronach komórki można obserwować początki przegród, tylko na jednym z biegunów zaczyna się właściwe rekrutowanie białek potrzebnych do przeprowadzenia tego etapu, m.in. SpoIIIE, RefZ (Wollman et al., 2020). Formowanie asymetrycznej przegrody od razu umożliwia oddzielenie ok. 1/3 chromosomu do mniejszego przedziału, który będzie przetrwalnikiem (Ryc.2) (Lopez-Garrido et al., 2018). Pozostałe 2/3 zostaje aktywnie przetransportowane przez kompleks białka SpoIIIE, który w formie złożonej pompy transmembranowej umieszczonej w centrum nowo utworzonej przegrody podziałowej, bardzo wydajnie przepycha pozostałą część chromosomu z komórki matczynej do sektora prespory (Ben-Yehuda et al., 2003b; Wu & Errington, 1997). Pakowanie tak dużej ilości materiału (DNA) do tak małej przestrzeni (prespora) w zaledwie kilkanaście minut generuje ciśnienie osmotyczne, które jest porównywalne z siłą, która odkształca ścianę komórkową *E. coli* w trakcie podziału komórkowego (Deng et al., 2011). Dlatego w czasie translokacji chromosomu obserwuje

się również wybrzuszenie się błon otaczających presporę (przypominające nadmuchiwanie balona), co pozwala na uzyskanie optymalnego kształtu przed kolejnym etapem sporulacji (Lopez-Garrido et al., 2018).

Etap III

Już w trakcie translokacji chromosomu przez kanał SpoIIIE rozpoczyna się kolejny etap przemian. Oprócz białek zaangażowanych w koordynację i przemieszczanie DNA do prespory, na błonie podziałowej lokalizują się też inne białka, które odgrywają znaczącą rolę w procesie „przechwycenia” prespory. Wchłonięcie (ang. *engulfment*) tworzącego się przetrwalnika przez komórkę matczyną obejmuje stopniowe otaczanie mniejszego przedziału przez błony komórki matczynej, aż do momentu całkowitego uwolnienia przetrwalnika do cytoplazmy matczynej (Ryc.2).

Przegroda powstała po podziale asymetrycznym już w trakcie pakowania chromosomu do przedziału prespory zaczyna się odkształcać i rozciągać w kierunku wnętrza komórki matczynej. Po przeniesieniu całego chromosomu i ustaleniu wstępnego kształtu dla prespory, błony komórki matczynej rozpoczynają stopniowe okalanie mniejszego wewnętrznego przedziału. Choć często proces ten porównywany jest do fagocytozy, należy pamiętać, że w trakcie przemieszczania się błon istnieje tam jeszcze warstwa peptydoglikanu, która stanowi stosunkowo sztywną przeszkodę w swobodnym poruszaniu się. Proces równoczesnej syntezy i degradacji peptydoglikanu jest kluczowy dla pomyślnego przemieszczania się błon komórki matczynej wokół prespory (Mohamed et al., 2021; Ojkic et al., 2016). Zaangażowany jest w to kompleks transmembranowych białek SpoIID, SpoIIM, SpoIIP (DMP), które wykazują właściwości hydrolizujące peptydoglikan (Khanna et al., 2019). Kompleks ten lokalizuje się po obu stronach kanału SpoIIIE, od strony komórki matczynej, i podąża za przemieszczającymi się błonami okalającymi presporę. Od strony wnętrza prespory przy kompleksie DMP lokalizują się białka odpowiedzialne za syntezę peptydoglikanu *de novo*, m.in. białko wiążące penicylinę (ang. *Penicilin-Binding Protein*, PBP) PbpG (Ojkic et al., 2016). Nowo zsyntezowany peptydoglikan ukierunkowuje przemieszczanie się błon, równocześnie uruchamiając kompleks DMP do degradacji dotychczasowych połączeń między peptydoglikanem z przegrody podziałowej i ścianą komórkowej komórki matczynej. Aby tworzący się układ błon przetrwalnika z warstwą peptydoglikanu nie rozpadł się, białka syntezowane przez komórkę matczyną (białko SpoIIAH) i presporę (białko SpoIIQ), lokalizują się po

przeciwnych stronach błon. Takie kompleksy białkowe, niczym zatrzaski, utrzymują formujący się przetrwalnik w kształcie sfery (Dworkin, 2014).

Kiedy migracja błon z przemodelowaniem peptydoglikanu zakończy się (po ok. 1 h), membrany komórki matczynej ulegają fuzji przy pomocy m.in. białek FisB i SpoIIIE (Doan et al., 2013; Tan & Ramamurthi, 2013), a dotychczasowa prespora zostaje uwolniona do cytoplazmy. Oddzielenie nowego przetrwalnika dwoma błonami, z warstwą peptydoglikanu pomiędzy, powoduje, że dostępność składników odżywczych ze środowiska jest znacznie ograniczona. Dodatkowo pojawiają się znaczne różnice w profilu metabolicznym między przetrwalnikiem a komórką matczyną, m.in. w sporze brakuje enzymów do metabolizmu i syntezy aminokwasów lub nukleotydów (Riley, Lopez-Garrido, et al., 2021). Dlatego synteza białek przetrwalnika potrzebnych na dalszych etapach sporulacji zależy w dużej mierze od metabolizmu komórki matczynej. W przekazywaniu składników, np. aminokwasów, biorą udział kompleksy białek SpoIIIAH i SpoIIQ. Te kanały transmembranowe działają niczym swoiste „sondy do karmienia”, przez które komórka matczyzna dostarcza potrzebne metabolity do wnętrza przetrwalnika (Camp & Losick, 2009).

Etapy IV – VI

Po uwolnieniu przetrwalnika do cytoplazmy komórki matczynej, następuje seria procesów, w wyniku których kształtują się poszczególne warstwy dojrzałego przetrwalnika: rdzeń, kora i płaszcz (Ryc.2). Większość białek potrzebnych na tych etapach jest syntezowana w komórce matczynej. Transkrypcja tych genów jest kontrolowana albo przez wcześniejszy czynnik σ^E lub ostatni czynnik σ^K . Jednocześnie następuje aktywacja czynnika sigma G (σ^G), który jest niezbędny do uruchomienia transkrypcji genów wewnątrz tworzącego się przetrwalnika (Errington, 1993).

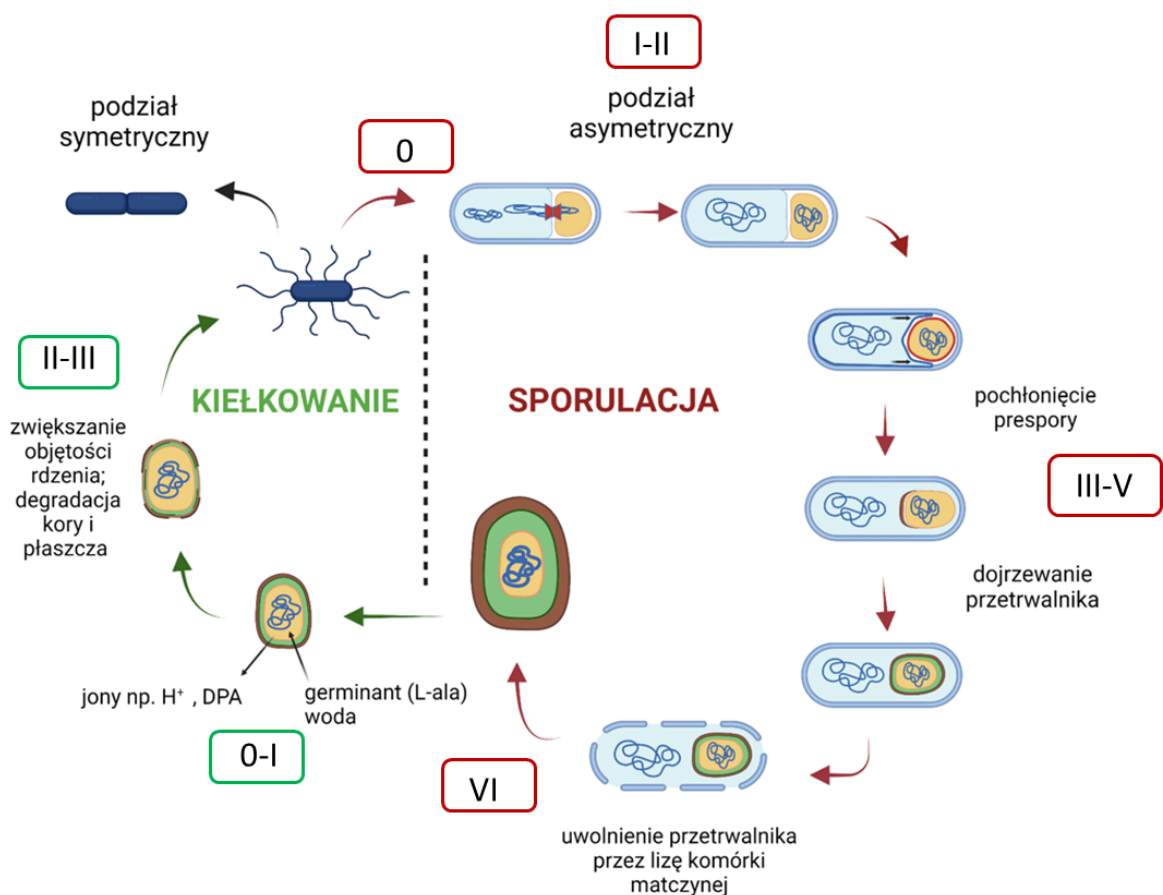
Już pod koniec wchłaniania prespory do wnętrza komórki matczynej rozpoczyna się formowanie pierwszej warstwy płaszcza przyszłego przetrwalnika. Po zewnętrznej stronie błony okalającej presporę lokalizują się białka SpoVM i SpoIVA (Kim et al., 2017; Plomp et al., 2014). Na tym etapie działa również swoisty system kontroli morfogenezy przetrwalnika. Jeśli nastąpią nieprawidłowości w syntezie lub umocowywaniu białek SpoIVA lub SpoVM, małe białko CmpA przekierowuje takie nieprawidłowe białka do proteazy ClpXP, gdzie zostaną zdegradowane, a formujący się przetrwalnik jednak ulegnie

zniszczeniu (Decker & Ramamurthi, 2017). Pomyślnie uwolnienie prespory do cytoplazmy komórki matczynej, z uformowaną już podstawą płaszczka, pozwala na syntezę i składanie kolejnych jego warstw. SpoIVA rekrutuje białka zaangażowane w rozbudowanie pierwszej warstwy płaszczka, np. LipC czy YhaX (Henriques & Moran, 2007). Następna w kolejności pojawia się warstwa płaszczka wewnętrznego, kierowana przez białko SafA (Fernandes et al., 2018), na której osadza się m.in. enzym CwlJ. Ponad nią formuje się płaszcz zewnętrzny, formowany na warstwie białka CotE, do której rekrutowane są m.in. kolejne produkty genów *cot* (de Francesco et al., 2012). Warstwy płaszczka wewnętrznego i zewnętrznego rozpoczynają formowanie się na przeciwległych biegunach prespory. Wraz ze stopniową automultimeryzacją białek płaszczka oraz przy asyście białek SpoVM i SpoVID, następuje okrycie całej powierzchni prespory kolejnymi warstwami białkowymi (ang. *encasement*). Ostatnią warstwą w płaszczu *B. subtilis* jest białkowa skorupa (ang. *crust*), która formuje się na warstwie białek CotX, CotY i CotZ (Imamura et al., 2010), również rozpoczynając ten proces z przeciwległych biegunów prespory. Niektóre gatunki *Bacillus* (np. *B. anthracis*) posiadają jeszcze jedną warstwę glikoproteinową okalającą płaszcz, nazywaną egzosporium (Henriques & Moran, 2007).

W trakcie formowania płaszczka następuje szereg przemian wewnątrz prespory. Pod płaszczem ma miejsce intensywne formowanie kory przetrwalnika. Warstwa peptydoglikanu znajdująca się pomiędzy błonami okalającymi presporę stanowi swoisty prekursor do dalszego odkładania peptydoglikanu kory. Substraty i enzymy wykorzystywane w tym procesie są produkowane w komórce matczynej i przenoszone, w nieznanym jeszcze sposób, do przestrzeni międzybłonowej. Są to m.in. produkty genów *mur* wykorzystywane do syntezy ściany komórki wegetatywnej lub białka SpoVB, SpoVD i SpoVE (Popham & Bernhards, 2015). Białka zaangażowane w polimeryzację i sieciowanie łańcuchów bocznych prekursorów peptydoglikanu syntezowane są również w presporze. Należą do nich np. białka wiążące penicylinę klasy A lub białka PdaA i CwlD (Fukushima et al., 2002; Popham et al., 1996b). W miarę odkładania kolejnych warstw zmodyfikowanego peptydoglikanu pomiędzy błony prespory, przestrzeń ta znacznie się rozszerza. Prawdopodobnie, w konsekwencji rozpoczyna się również odprowadzanie wody z najbardziej wewnętrznego przedziału prespory, nazwanego rdzeniem. W zamian, przez kanały zbudowane z białek kodowanych przez geny operonu *spoVA*, do rdzenia zostaje doprowadzony kwas dipikolinowy (ang. *dipicolinic acid*, DPA) zsyntetyzowany w

komórce matczynej. Zmiana środowiska wewnątrz prespory ma kolosalne znaczenie dla stanu jej materiału genetycznego, które opiszę w dalszej części rozdziału.

Po dostatecznym odwodnieniu przedziału z materiałem genetycznym, uformowaniu grubej warstwy peptydoglikanu i opakowaniu całej tej struktury kilkoma złożonymi warstwami białkowymi płaszczą, przetrwalnik jest gotowy. Do środowiska dostaje się dzięki autolizie komórki matczynej. Jednak dopiero po ok. 24 h od uwolnienia przetrwalnik osiąga maksymalny poziom odporności na trudne warunki środowiskowe (Sanchez-Salas et al., 2011).



Rycina 2. Alternatywny cykl życiowy *Bacillus subtilis*. Po prawej stronie przedstawiono przemiany morfologiczne, którym poddawana jest komórka po rozpoczęciu sporulacji. Po lewej stronie przedstawiono najważniejsze przemiany przetrwalnika w procesie kiełkowania. W ramkach zaznaczono numery etapów sporulacji (kolor czerwony) i kiełkowania (zielony). Skala wielkości poszczególnych elementów na schematach jest umowna.

1.2.2 Budowa przetrwalnika

Polska nazwa „przetrwalnik” skupia się na właściwościach tej formy komórkowej, ponieważ faktycznie może ona „przetrwać” różne warunki środowiskowe. Zangielszczony termin „spora/endospora” (ang. *spore*, *endospore*) pochodzi bezpośrednio od łacińskiego słowa „*sporo*” czyli nasiono, i tyczy się nie tylko form bakteryjnych, ale też np. grzybów. Niemniej, termin angielski w sposób bardziej ogólny pokazuje, czemu służą takie formy komórkowe, a mianowicie odbudowaniu (w przypadku bakterii) lub propagowaniu (w przypadku grzybów) wyjściowego organizmu. Zupełnie jak w przypadku nasion roślin.

Przetrwalnik bakteryjny nie jest komórką *sensu stricto*, ponieważ do tej pory nie wykryto, aby przeprowadzał aktywne procesy metaboliczne. Jednak, skoro zawiera materiał genetyczny komórki matczynej oraz powstał on, aby ulec procesowi kiełkowania w odpowiedzi na polepszające się warunki środowiska, możliwe jest, że metabolizm zachodzi na minimalnym poziomie, trudnym jeszcze do wykrycia (Ghosh et al., 2015). Z tego względu uznaje się przetrwalniki bakteryjne za formy nieczynne metabolicznie, znajdujące się w fazie stałego spoczynku.

Do warstw budujących typowy przetrwalnik gatunku *Bacillus subtilis* należą (od najbardziej wewnętrznej):

- rdzeń
- wewnętrzna błona przetrwalnika (ang. *spore's inner membrane*, IM)
- kora
- płaszcz

Rdzeń przetrwalnika

Ta część została jako pierwsza wyznaczona na początku procesu sporulacji, przez wydzielenie mniejszego przedziału z komórki matczynej. Jednak od początku rdzeń przetrwalnika przechodzi znaczne przemiany, które mają kluczowe znaczenie dla ochrony materiału genetycznego zamkniętego w przetrwalniku.

Przed wszystkim, przestrzeń rdzenia jest znacznie odwodniona. Szacuje się, że mniej niż połowę zawartości stanowi woda, która jednak w dużej mierze jest w stanie quasi-żelu

(Friedline et al., 2014; Kaieda et al., 2013; Sunde et al., 2009). Prawdopodobnie utrudnia to swobodne ruchy znajdujących się tam białek (Cowan et al., 2003). Blisko $\frac{1}{4}$ suchej masy rdzenia to chelat kwasu dipikolinowego i jonów dwuwartościowych, głównie wapnia (Ca-DPA). Stężenie tego kompleksu w rdzeniu sięgające nawet 1M stanowi blisko dziesięciokrotne przekroczenie rozpuszczalności tego związku (Huang S.S. et al., 2007). Z tego względu przypuszcza się, że rdzeń przetrwalnika jest w większości upakowany skryształizowaną formą chelatu Ca-DPA, co z jednej strony unieruchamia resztę komponentów rdzenia, a z drugiej przyczynia się do odporności na wysokie temperatury (Colas de la Noue et al., 2020; Setlow P., 2014). Poza Ca-DPA, w znacznej ilości w rdzeniu występuje kwas 3-fosfoglicerynowy (3-PGA) i nukleotydy adeninowe, które stanowią rezerwuar energii potrzebnej w późniejszym procesie kiełkowania (Singh R.P. et al., 1977). Duży stopień odwodnienia rdzenia przetrwalnika ma też związek ze znacznym obniżeniem pH tej przestrzeni, co z kolei pozwala na przechowywanie 3-PGA w formie nienaruszonej (Chander et al., 1998).

Chromosom bakteryjny przyjmuje bardziej skondensowaną formę w przetrwalniku, niż miało to miejsce w komórce wegetatywnej. Przyczyniają się do tego małe białka typu α i β , rozpuszczalne w kwasach (ang. *small, acid-soluble spore proteins, SASPs*), syntezowane na późnym etapie sporulacji w presporze (Cabrera-Hernandez et al., 1999). Poprzez niespecyficzne wiązanie się na całej długości do DNA, białka SASP utrudniają dostęp do chromosomu praktycznie wszystkim potencjalnie szkodliwym czynnikom, od promieniowania UV po białka normalnie oddziałujące z DNA (np. podczas transkrypcji). Wysycenie DNA przetrwalnika białkami SASP dodatkowo zmienia strukturę helisy na bardziej przypominającą helisę typu A (Ki et al., 2008). Takie skondensowanie chromosomu otoczonego warstwą białek przyczynia się do odporności przetrwalnika na promieniowanie UV lub gamma, wysokie temperatury, wysychanie czy genotoksyczne związki chemiczne (Setlow P., 2014).

Wewnętrzna błona przetrwalnika (IM)

Rdzeń przetrwalnika jest otoczony wewnętrzną błoną przetrwalnika. Jest to błona powstała już na początku sporulacji, przy asymetrycznym podziale komórki. Stanowi ona ostatnią barierę chroniącą materiał genetyczny przetrwalnika przed szkodliwymi czynnikami. Tę rolę spełnia dzięki niezwykle słabej przepuszczalności, nawet dla małych cząsteczek (np. metyloamina) czy wody (Loison et al., 2013). Z tego względu przyczynia się ona do

zapewnienia przetrwalnikom odporności na szereg związków chemicznych (Setlow P., 2014).

Ponadto, wewnętrzna błona przetrwalnika wykazuje też inne cechy, wskazujące, że jest to istotny element przetrwalnika. Kompozycja lipidowa IM nie odbiega znacząco od tej obserwowanej w błonie komórki wegetatywnej. Jednak obserwuje się, że w większości są to lipidy unieruchomione, w porównaniu do błony wegetatywnej (Cowan et al., 2004). Taka immobilizacja błony jest prawdopodobnie związana ze znacznym obkurczeniem się wokół małego przedziału rdzenia. Dodatkowo może to utrudniać swobodną dyfuzję cząstek przez taką błonę. Wewnętrzna błona przetrwalnika to lokalizacja ponad 900 białek, z czego ponad 300 to białka całkowicie w niej zanurzone (Zheng et al., 2016). Należą do nich m.in. transportery jonów oraz większych molekuł (np. BceB – eksporter bacytracyny, YfIS – transporter jabłczanu), proteazy (np. zaangażowane w naprawę DNA lub usuwanie białek SASP), helikazy, białka szoku cieplnego, enzymy z cykli biochemicznych (np. spermidyny, koenzymu A). Co ciekawe, właśnie w IM zlokalizowane są białka powiązane z procesem kiełkowania – receptory kiełkowania (GerA, GerB, GerK), kanał do transportu DPA (białka z operonu *spoVA*) czy białko GerD.

Wewnętrzna błona przetrwalnika, w procesie kiełkowania, ulega przekształceniu do właściwej błony komórki wegetatywnej. Jednak, wymaga to zwiększenia powierzchni wyjściowej błony, co najmniej o połowę. Pomagają w tym, znajdujące się po stronie rdzenia, małe pęcherzyki, które w procesie kiełkowania zostają wchłonięte przez rozprężającą się błonę otaczającą rdzeń, dodając brakującą powierzchnię (Laue et al., 2018).

Kora przetrwalnika

Ponad wewnętrzną błoną przetrwalnika rozciąga się stosunkowo gruba, niejednorodna warstwa peptydoglikanu. Można wyróżnić w niej dwie zasadnicze części. Tuż nad IM znajduje się prekursorowa ściana komórkowa (ang. *germ cell wall*). Jest to ciasno usieciowany peptydoglikan, strukturalnie przypominający ścianę komórki wegetatywnej. Istotnie, po procesie kiełkowania, warstwa ta zostaje przekształcona w ścianę komórkową nowej bakterii. Ponad prekursorową ścianą komórkową poziom usieciowania peptydoglikanu stopniowo zmniejsza się. Łańcuchy peptydoglikanu kory przetrwalnika składają się naprzemiennie z N-acetyloglukozaminy (NAG) i kwasu N-

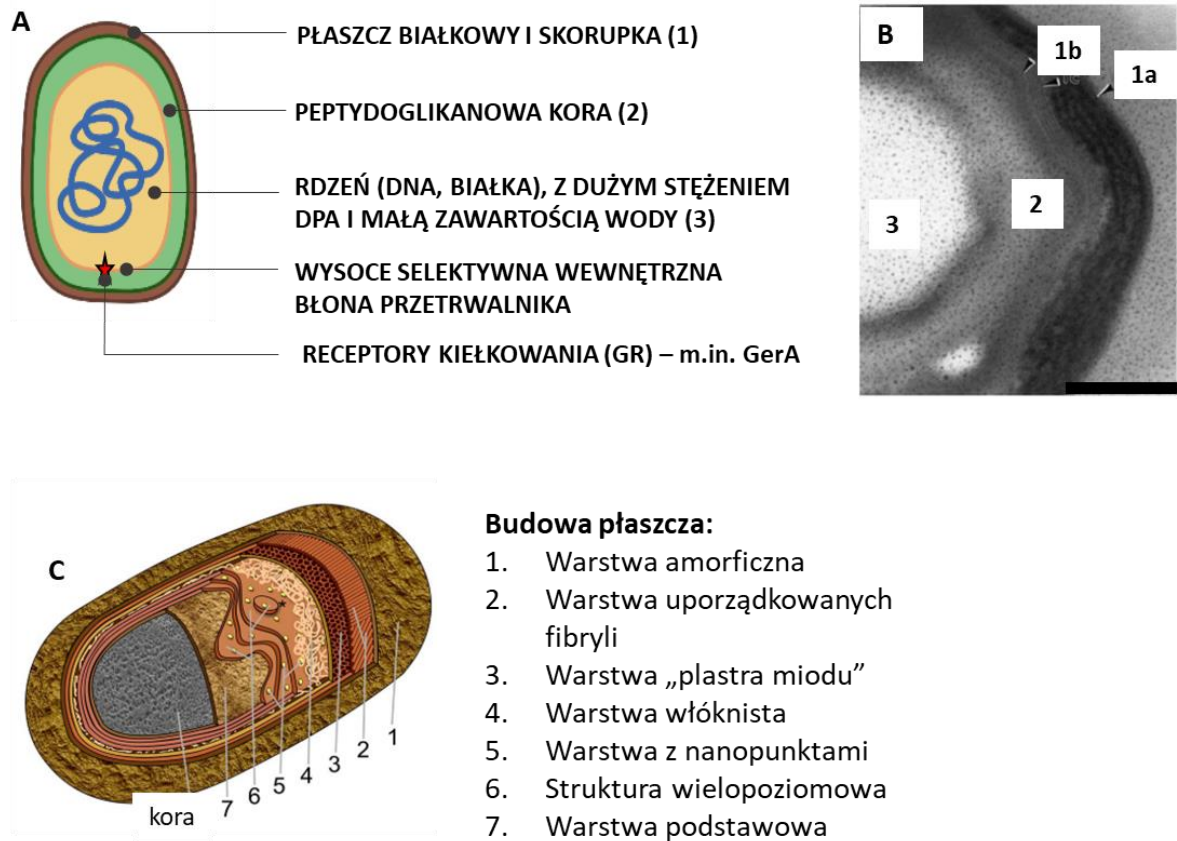
acetylmuraminowego (NAM). Około połowa NAM nie posiada łańcuchów bocznych i jest przekształcona za pomocą odpowiednich enzymów, do cyklicznego laktamu muraminowego (MAL) (Popham et al., 1996a). Usieciowanie włókien glikanowych następuje poprzez oddziaływanie łańcuchów bocznych. Pojawienie się MAL zmniejsza usieciowanie w korze peptydoglikanu (Popham et al., 1996b). Obecność tej modyfikacji kwasu muraminowego jest spotykana tylko w korze przetrwalników. Ma to znaczenie dla późniejszych przemian w procesie kiełkowania, gdzie dedykowane enzymy lityczne degradują tylko peptydoglikan kory, a nie prekursorowej ściany komórkowej (Moir & Cooper, 2015). Gruba warstwa usieciowanego peptydoglikanu, choć nie stanowi znaczącej bariery mechanicznej dla szkodliwych czynników środowiskowych, wydaje się mieć wpływ na zachowanie przez rdzeń swoich właściwości np. odwodnienie i utrzymanie dużego stężenia DPA.

Płaszcz przetrwalnika

Kora przetrwalnika rozciąga się od wewnętrznej do zewnętrznej błony przetrwalnika, które pochodzą od błon z podziału asymetrycznego i etapu wchłaniania prespory do komórki matczynej. Ponad błoną zewnętrzną rozciąga się wielowarstwowy białkowy płaszcz przetrwalnika. W jego utworzenie zaangażowane jest ponad 70 białek, które tworzą kilka warstw zróżnicowanych morfologicznie, które można obserwować w mikroskopie sił atomowych (Plomp et al., 2014). Podstawowa warstwa białek w płaszczu wewnętrznym jest gęsto usieciowana. Pokrywa ją kilkupoziomowa warstwa białkowa z nanopunktami. Ponad nią lokalizuje się warstwa płaszcza zewnętrznego, przypominająca ciasno upakowane włókna. Dalej obserwuje się dwie wysoce uporządkowane warstwy. Niższa posiada mikrootwory o periodycznym układzie, co przypomina plastry miodu. Natomiast wyższa to uporządkowane, gęsto ułożone fibryle. Najbardziej zewnętrzną warstwą płaszcza jest białkowa amorficzna skorupa. Na całej jej powierzchni obserwuje się pewne wybrzuszenia, które bardziej uwidaczniają się, kiedy rdzeń przetrwalnika ma mniejszą zawartość wody, a zanikają, kiedy poziom wody wzrasta. Sugeruje to, że mimo krystalicznego charakteru całej struktury, płaszcz przetrwalnika jest w pewien sposób elastyczny i odpowiada na zmiany (np. wilgotność) zachodzące wewnątrz i na zewnątrz przetrwalnika .

Ten wielopoziomowy układ białkowy umożliwia jednak swobodną dyfuzję cząsteczek, co może przyczyniać się do aktywnego monitorowania stanu środowiska (Knudsen et al.,

2016). Struktura płaszcz stanowi skuteczną barierę mechaniczną przed drapieżniczym działaniem pierwotniaków czy egzogennymi enzymami w środowisku, działającymi na wewnętrzne partie przetrwalnika. Dodatkowo, wiele białek płaszcz wykazuje działanie enzymatyczne (np. peroksydaza, katalaza, dysmutaza), co stanowi pierwszą linię obrony przed szkodliwymi substancjami chemicznymi (Mckenney et al., 2013).



Rycina 3. Budowa przetrwalnika *B.subtilis*. (A) Schemat ułożenia warstw w przetrwalniku. Na wewnętrznej błonie przetrwalnika zaznaczono lokalizację receptorów kiełkowania. Grubość poszczególnych warstw nie odpowiada skali rzeczywistej. (B) Fragment zdjęcia przetrwalnika (przekrój poprzeczny) w mikroskopie elektronowym. Numerami zaznaczono kolejne warstwy odpowiadające elementom ze schematu w (A). Podziałka odpowiada 0,2 μm Na podstawie (Moir, 2003). (C) Schematyczna reprezentacja warstw budujących płaszcz przetrwalnika. Na podstawie (Plomp et al., 2014).

Odporność komórek wegetatywnych i przetrwalników <i>B.subtilis</i> [%]		
	Komórki wegetatywne	Przetrwalniki
„Mokre ciepło” 85°C 30min.	<10 ⁻⁴	79
„Suche ciepło” 90°C 15min	0,2	>90
„Suche ciepło” 120°C 30min	<10 ⁻⁵	14
Promieniowanie UV (254nm)	<10 ⁻⁶	10
Cykl „zamrażanie/ suszenie/ponowne uwodnienie	2	>90
Cykl zamrażanie/ suszenie/ ponowne uwodnienie x6	0	>90
0,5M HCl 24°C 30min	<10 ⁻⁶	65
4M H ₂ O ₂ 24°C 30min	<10 ⁻⁶	70

Tabela 1. Porównanie właściwości komórek wegetatywnych i przetrwalników *B.subtilis*. Wyniki przedstawiają procent przeżywalności badanych populacji. Na podstawie (Setlow P, 2005).

1.3 Kiełkowanie – transformacja ze stanu spoczynku do aktywności metabolicznej

Przywołując analogię nasion roślin, kiełkowanie przetrwalnika to odbudowanie nowej komórki wegetatywnej z informacji i zasobów zawartych w przetrwalniku – nasionie. Jednak wciąż nie wiadomo, jakie dokładnie mechanizmy molekularne leżą u podstaw tej złożonej transformacji.

Proces kiełkowania obserwowany jest w kilku rozróżnialnych fazach, tzn.:

- inicjacja procesu (Etap 0)
- przemiany w obrębie rdzenia przetrwalnika (Etap I)
- przemiany degradacyjne w przetrwalniku (Etap II)
- odtworzenie komórki wegetatywnej i uruchomienie metabolizmu (Etap III)

Etap 0 – Inicjacja kiełkowania

Kiełkowanie obserwowane jest jako odpowiedź na polepszające się warunki środowiska, co głównie wiąże się ze zwiększoną dostępnością składników odżywczych (Moir, 2006). Z tego względu, w środowisku naturalnym zazwyczaj inicjatorami kiełkowania (inaczej germinantami) są składniki odżywcze, a w szczególności aminokwasy i cukry. Obecność białek kodowanych przez operon *gerA* umożliwia zainicjowanie kiełkowania przez cząsteczki L-alaniny. Z kolei białka kodowane przez operony *gerB* i *gerK* przyczyniają się do aktywacji kiełkowania przy obecności mieszaniny asparaginy, glukozy, fruktozy i jonów potasowych (AGFK, ang. *Asparagine, Glucose, Fructose, K ions*). Stąd, białka kodowane przez wspomniane operony genów nazwano receptorami kiełkowania (ang. *germination receptors*, GR). Oprócz wspomnianych wyżej pokarmowych inicjatorów kiełkowania, potencjalnie aktywującymi wymienione receptory są również np. analogi L-alaniny lub L-walina. Jednak molekularne podstawy tego sposobu inicjacji kiełkowania są nieznane.

Innym sposobem na rozpoczęcie kiełkowania mogą być sygnały płynące z samej populacji. Innymi słowy, egzogenny DPA (Paidhungat et al., 2001) lub fragmenty peptydoglikanu (Shah et al., 2008), które pojawiają się w środowisku jako efekt spontanicznego kiełkowania niektórych przetrwalników, mogą zainicjować kiełkowanie w sąsiadujących przetrwalnikach. Podstawy molekularne tych sposobów inicjacji również nie są do końca znane. Jednak w tym przypadku, nie obecność receptorów kiełkowania a np. funkcjonalnych enzymów hydrolizujących peptydoglikan lub kinazy PrkC z wewnętrznej błony przetrwalnika jest ważniejsza (Setlow P., 2008; Shah et al., 2008).

Kiełkowanie przetrwalników może być również zainicjowane przez czynniki nie związane z sygnałami pokarmowymi. W warunkach laboratoryjnych kiełkowanie może być zainicjowane przez dodecyloaminę (Setlow B. et al., 2003) lub lizozym. Ponadto, użycie np. bardzo wysokiego ciśnienia (nawet do 800 MPa), ultradźwięków lub pola elektromagnetycznego skutecznie uruchamia kiełkowanie przetrwalników (Cho & Chung, 2020). Sposoby te są najbardziej doceniane w przemysłowych procesach dekontaminacji. Jednak molekularne podstawy skuteczności tych sposobów inicjacji kiełkowania również pozostają nieznane.

Choć znamy zestaw sygnałów, które mogą zapoczątkować kiełkowanie, *de facto* wciąż nie wiadomo w jaki sposób przetrwalnik odbiera i przetwarza impuls ze środowiska na sygnał inicjujący dalsze przemiany. Niemniej, raz rozpoczęty proces kiełkowania, nie jest zatrzymywany i w przeciągu 2-3 h doprowadza do odtworzenia komórki wegetatywnej z przetrwalnika.

Etap I – przemiany w obrębie rdzenia przetrwalnika

Po zainicjowaniu kiełkowania, w przetrwalniku obserwuje się zmiany w jego najbardziej wewnętrznym przedziale (Ryc.2). Z rdzenia zostają uwalniane jony (m.in. H^+ , K^+ , Zn^{2+}) (Powell & Strange, 1953). Wpływa to na zwiększanie się pH potrzebnego do uaktywnienia niektórych enzymów (np. do metabolizmu 3-PGA). Sposób uwalniania tych jonów jest do tej pory niepoznany. Następnie, najprawdopodobniej za pośrednictwem kanałów zbudowanych z białek kodowanych w operonie *spoVA*, następuje odprowadzenie chelatu Ca-DPA (Vepachedu & Setlow, 2007). W konsekwencji, w rdzeniu zwalnia się miejsce na doprowadzenie wody (w sposób dotąd niepoznany). Uwodnienie tej przestrzeni jest pierwszym krokiem na drodze do przywrócenia aktywności metabolicznej kiełkującego przetrwalnika. Oprócz Ca-DPA, z rdzenia uwalniane są też inne małe cząsteczki, np. glutaminian, arginina, ale nie nukleotydy adeninowe i 3-PGA, co wskazuje, że przepuszczalność błony otaczającej rdzeń na tym etapie jest jednak selektywna (Setlow B. et al., 2008).

Zwiększenie uwodnienia rdzenia przetrwalnika wiąże się z utratą odporności na wysoką temperaturę. Ta cecha kiełkujących przetrwalników bakteryjnych jest często wykorzystywana w przemysłowych procesach sterylizacji. Ponadto, uwalniany DPA może być wykorzystywany jako indykator obecności kiełkujących przetrwalników (Hindle & Hall, 1999; Rattray et al., 2020)

Etap II – przemiany degradacyjne w przetrwalniku

Stopniowe doprowadzenie wody do rdzenia powoduje powolne rozrastanie się tej części przetrwalnika (Ryc.2). Obserwując ten proces w mikroskopie świetlnym, można zauważyć, że uśpione przetrwalniki, które w centralnej części są jasne (przetrwalniki w tzw. fazie jasnej), w miarę postępowania kiełkowania ciemnieją (przetrwalniki w tzw. fazie ciemnej), a część rdzeniowa zwiększa swoje rozmiary. Uwodnienie rdzenia wpływa na

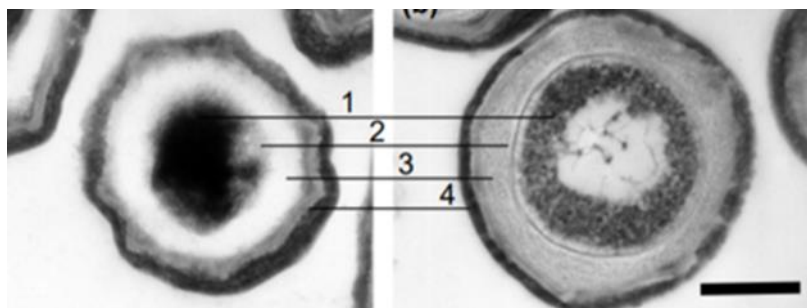
uaktywnienie enzymów hydrolizujących peptydoglikan, znajdujących się w okolicach wewnętrznej (m.in. SleB, YpeB) lub zewnętrznej błony przetrwalnika i dolnych partii płaszczu (m.in. SleB, CwlJ). Degradowany peptydoglikan (tylko kory, nie prekursorowej ściany komórkowej) zwiększa przestrzeń dla powiększającego się rdzenia, do którego dalej napływa woda. W tym czasie aktywowane są również, niezidentyfikowane do tej pory, enzymy degradujące białka płaszczu. Prawdopodobnie od wewnątrz następuje stopniowa proteoliza kolejnych jego warstw, obserwowana jako lokalne degradowanie i perforacja otoczki przetrwalnika (Plomp et al., 2007).

Etap III – odtworzenie nowej komórki wegetatywnej i uruchomienie metabolizmu (ang. *outgrowth*)

Etap hydrolizy peptydoglikanu kory i proteolizy płaszczu, prowadzi w konsekwencji do całkowitego uwodnienia rdzenia przetrwalnika oraz lipidów błony wewnętrznej, które teraz stopniowo powiększają się do rozmiarów komórki wegetatywnej. Wiąże się to już z całkowitym zanikiem odporności na wszelkie szkodliwe czynniki środowiskowe. W rdzeniu przetrwalnika działają również proteazy, które pomagają w uwolnieniu DNA od białek SASP (Illades-Aguiar & Setlow, 1994; Traag et al., 2013). W ten sposób następuje stopniowe odblokowywanie transkrypcji genów potrzebnych w odbudowaniu komórki. Na tym etapie następuje również naprawienie uszkodzeń DNA nabytych w trakcie metabolicznego uspienia przetrwalnika.

Wznowienie metabolizmu i synteza makromolekuł *de novo*, na początku musi polegać na energii i składnikach powstałych z katabolizmu dotychczasowych elementów przetrwalnika, np. produkty proteolizy białek SASP lub zapasy 3-PGA. Wystarcza to do wznowienia biosyntezy niektórych aminokwasów, puryn lub pirymidyn (Keijser et al., 2007; Sinai et al., 2015). Stopniowo zostaje aktywowana cała maszyna transkrypcyjna i translacyjna potrzebna komórce wegetatywnej. Już od początku kiełkowania obserwowane są dynamiczne zmiany transkrypcji genów przetrwalnika. Jednak właśnie na końcowych etapach procesu odtwarzania nowej komórki wegetatywnej, intensywność transkrypcji genów, których produkty zaangażowane są m.in. w szereg cykli biochemicznych, jest zdecydowanie największa (Swarge et al., 2020). Wiąże się to z aktywowaniem wielu ścieżek biosyntezy makromolekuł, prekursorów energetycznych *de novo* czy maszyny białkowej potrzebnej przy replikacji DNA, podziale komórkowym i utrzymaniu kształtu komórki. Choć wcześniej opisane aktywne przemiany przetrwalnika zajmują nieco ponad

godzinę, odbudowanie i uruchomienie metabolizmu tworzącej się jeszcze komórki wegetatywnej trwa mniej więcej drugie tyle czasu.



Rycina 4. Struktura przetrwalnika w stanie spoczynku (po lewej) i kiełkującego (po prawej). Numerami zaznaczono kolejne warstwy: (1) rdzeń, (2) wewnętrzna błona przetrwalnika, (3) kora, (4) wielowarstwowy płaszcz. Podczas kiełkowania rdzeń ulega uwodnieniu, co obserwowane jest w mikroskopie elektronowym jako stopniowe rozjaśnianie się centralnej części. Całkowita objętość kiełkującego przetrwalnika również się zwiększa. Podziałka reprezentuje 0,4 μ m. Na podstawie (Moir, 2003).

Analizując proces kiełkowania przetrwalników *Bacillus subtilis* należy pamiętać, że nie może być on traktowany w oderwaniu od procesu morfogenezy przetrwalnika. Wiele badań wskazuje, że warunki w trakcie sporulacji mają bezpośredni wpływ na kształtowanie się spory i jej dalsze losy w środowisku (Black et al., 2005; Bressuire-Isoard et al., 2018; Eijlander et al., 2011; Warriner & Waites, 1999). Ponadto, obserwowane fenotypy szczepów badanych pod kątem procesów zaangażowanych w kiełkowanie przetrwalników, mają często charakter stochastyczny. Jednym z powodów jest wciąż względnie mała wiedza na temat podstaw molekularnych kiełkowania, a co za tym idzie problem w interpretacji wyników. Kolejną przyczyną może być presja selekcyjna w populacji przetrwalników na przetrwanie tych kopii, które mają większe szanse w środowisku. Obserwowany kompromis pomiędzy rozmiarem a dostosowaniem populacji do warunków środowiskowych jest coraz częściej uznawany za swoistą strategię przeżycia *Bacillus subtilis* w środowisku (Bischofs, 2020; Mutlu et al., 2018, 2020), którą należy mieć na uwadze również w warunkach laboratoryjnych.

1.4 Receptory kiełkowania

Porównując stan wiedzy na temat sporulacji i kiełkowania u *Bacillus subtilis*, ten drugi proces wciąż pozostawia dużo więcej pytań niż odpowiedzi. Jedną z takich kwestii są receptory kiełkowania.

Jak wskazuje nazwa, receptory kiełkowania są strukturami białkowymi, które – w niepoznany dotąd sposób – odbierają sygnał niezbędny do rozpoczęcia kiełkowania przetrwalnika. W chromosomie *Bacillus subtilis*, geny kodujące receptory kiełkowania zorganizowane są w operony, których ekspresja w presporze jest pod kontrolą czynnika σ^G (Errington, 1993). Do tej pory zidentyfikowano 5 takich operonów: *gerA*, *gerB*, *gerK*, *yndDEF*, *yfkQRT*. Wszystkie składają się z 3 genów, oznaczanych kolejnymi literami A, B, C (w przypadku 3 pierwszych operonów: *gerAA*, *gerAB*, *gerAC*; *gerBA*, *gerBB*, *gerBC*; *gerKA*, *gerKC*, *gerKB*). Obecność białek kodowanych przez operon *gerA* została powiązana z zainicjowaniem kiełkowania przez L-alaninę. Natomiast białka kodowane przez operony *gerB* i *gerK* umożliwiają rozpoczęcie kiełkowania w obecności tzw. mieszaniny AGFK. W przypadku 2 ostatnich wymienionych tu receptorów, nie zaobserwowano, aby miały podobny wpływ na kiełkowanie jak receptory GerA czy GerB i GerK (Paidhungat & Setlow, 2000). Analiza sekwencji pokazuje, że operony kodujące receptory kiełkowania *B. subtilis* są homologiczne. W innych gatunkach rodzaju *Bacillus* również spotykane są geny kodujące receptory kiełkowania, choć ich organizacja może się różnić, np. u *B. licheniformis* znajduje się receptor Ynd kodowany przez operon pentacystronowy (Aspholm et al., 2019).

Analiza proteomiczna wewnętrznej błony przetrwalnika oraz wcześniejsze analizy ze specyficznymi przeciwciałami względem niektórych białek pokazały, że receptory kiełkowania znajdują się głęboko we wnętrzu przetrwalnika, na granicy otaczającej jego rdzeń (Griffiths et al., 2011; Hudson et al., 2001; Korza & Setlow, 2013; Paidhungat & Setlow, 2001; Zheng et al., 2016). Nie dziwi więc fakt, że receptory kiełkowania to w dużej mierze białka błonowe. Zgodnie z analizą sekwencji aminokwasowej, białko A posiada kilka helis transmembranowych i dwie domeny końcowe najprawdopodobniej znajdujące się poza błoną (od strony kory lub rdzenia przetrwalnika). Dysponujemy strukturą fragmentu N-końcowej domeny białka GerKA, która wykazuje pewne podobieństwo do domeny wiążącej ligand w bakteryjnych transporterach ABC (Li Y. et

al., 2019). Sekwencja białka B sugeruje, że jest całkowicie zanurzone w błonie i składa się z nawet kilkunastu helis transmembranowych. Dotychczas nie opracowano żadnej metody pozwalającej na wykrywanie tego białka, co może potwierdzać jego lokalizację błonową. Natomiast białko C to przytwierdzona do błony lipoproteina. Struktura części pozabłonowej białka GerBC pokazała, że przyjmuje ono nieopisaną do tej pory strukturę trzeciorzędową (Li Y et al., 2010).

Choć nomenklaturowo mówi się o receptorach kiełkowania, brakuje jednoznacznych danych potwierdzających, że białka kodowane przez dany operon (nazywane też podjednostkami receptorów) wchodzi w bezpośrednią interakcję tworząc jeden nadrzędny receptor. Jednak analizy funkcjonalne pokazują, że wszystkie trzy białka z danego operonu są konieczne do udanego rozpoczęcia kiełkowania za pośrednictwem konkretnego receptora (Moir & Smith, 1990; Setlow P., 2003). Co więcej, część białka C przytwierdzająca je do błony, jest również istotna dla powodzenia inicjacji kiełkowania drogą pokarmową (Igarashi & Setlow, 2005). Ponadto, obserwuje się swoistą współpracę pomiędzy receptorami A, B i K, kiedy obecne są mieszaniny różnych składników pokarmowych (Atluri et al., 2006; Yi et al., 2011). To wskazuje, że białka kodowane przez operony *ger* mogą ze sobą współpracować, jako odrębne białka w ramach operonu (Igarashi & Setlow, 2005), jednocześnie nie tworząc wielkocząsteczkowego kompleksu.

Receptory kiełkowania to nieliczne białka w proteomie przetrwalnika. Szacuje się, że każdego z 3 białek receptorów GerA, GerB i GerK może być po ok. 1000 cząsteczek na przetrwalnik (Stewart & Setlow, 2013). Niemniej, ze względu na duże problemy w wykrywaniu wszystkich białek receptorów, nie można nadal określić stechiometrii takich kompleksów białkowych. Brak danych strukturalnych i problemy w znalezieniu homologicznych struktur wśród białek już poznanych strukturalnie, utrudnia opracowanie mechanizmu działania receptorów w kontekście inicjacji kiełkowania przetrwalników. Próby zlokalizowania receptorów kiełkowania z użyciem analiz mikroskopowych pokazują, że receptory GerA, GerB i GerK, z dużym prawdopodobieństwem, mogą mieścić się w jednym miejscu na błonie przetrwalnika (Griffiths et al., 2011). W skupisku tym identyfikowane są również inne białka, np. GerD, które mają znaczenie dla stabilnego utworzenia takiej struktury nazwanej germinosomem (Pelczar et al., 2007). Wydaje się być to trafne wytłumaczenie współdziałania ograniczonych liczebnie receptorów kiełkowania. Choć brak jest danych na temat wszystkich białek wchodzących w skład germinosomu,

najnowsze dane pokazują, że może być to struktura dynamiczna i tymczasowa, która zostaje utworzona tylko w celu odebrania sygnału w postaci napływających germinantów (Breedijk et al., 2020).

Wszystkie opublikowane dane na temat receptorów kiełkowania pochodzą z badań nad receptorami GerA, GerB i GerK. Wynika to przede wszystkim z faktu, że historycznie zostały one uznane za kluczowe struktury białkowe w inicjacji kiełkowania przez składniki pokarmowe. Najnowsze analizy genetyczne wskazują, że receptory kiełkowania mogą jednak nie być jedynymi elementami zaangażowanymi w tę ścieżkę rozpoczęcia kiełkowania (Sayer et al., 2019). Niemniej, początkowe badania nad receptorami kiełkowania pokazały, że GerA to receptor nadrzędny w stosunku do receptorów GerB i GerK, ponieważ transkrypcja jego genów odbywa się na nieco wyższym poziomie. Ponadto łatwiej jest obserwować jego działanie, czyli odpowiedź na pojedyncze aminokwasy (np. L-alaninę czy L-walinę), a nie na mieszaninę germinantów. Co więcej, obserwuje się, że w obecności D-alaniny kiełkowanie nie zachodzi (Yasuda & Tochikubo, 1985). To z kolei przypisuje się stereospecyficzności receptora GerA. Choć brak danych strukturalnych i mechanistycznych na temat receptorów (np. czy zachodzi tylko wiązanie czy może transport germinantów?) nie pozwala jednoznacznie ocenić tego argumentu, receptor GerA uznawany jest za receptor kiełkowania przetrwalników *B. subtilis* najczęściej poddawany badaniom.

Niniejsza praca skupi się na zgłębieniu kilku aspektów dotyczących receptora GerA w przetrwalnikach *Bacillus subtilis*. Nomenklatura używana w literaturze przedmiotu mianem receptora GerA określa kompleks wszystkich 3 białek kodowanych przez operon *gerA*, natomiast podjednostkami receptora GerA – poszczególne białka kodowane przez geny operonu *gerA*: GerAA, GerAB, GerAC. Ponieważ pojęcie podjednostka, jako integralna część receptora, może wprowadzać w błąd, na potrzeby tej pracy poszczególne białka kodowane przez operon *gerA* będą nazywane kolejno, białkiem A, B i C.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie wybranych aspektów funkcjonowania receptora kiełkowania GerA w przetrwalnikach *Bacillus subtilis*. W szczególności dotyczyło to:

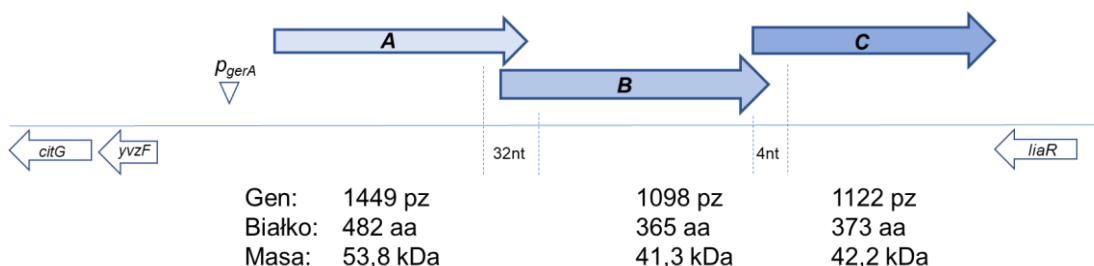
- a) sprawdzenia, czy możliwa jest wizualizacja w jednym szczepie wszystkich białek kodowanych w operonie *gerA*
- b) zbadania, jaki wpływ na działanie receptora GerA ma pozycja P324 w białku A
- c) zbadania poziomu ekspresji genów operonu *gerA* w szczepach z różnym tłem genetycznym i różnymi konfiguracjami w ułożeniu genów operonu oraz powiązaniem tego z efektami fenotypowymi obserwowanymi w procesie kiełkowania.

3. Wyniki

3.1 Badania nad receptorem GerA w kontekście literatury przedmiotu.

Geny kodujące receptor GerA zostały zidentyfikowane ponad dekadę wcześniej niż dokonano pierwszego kompletnego zsekwencjonowania genomu *B. subtilis*. Początkowo myślano, że w *locus gerA* znajduje się tylko jeden gen (Feavers et al., 1985). Szybko zweryfikowano ten pogląd, identyfikując 3 otwarte ramki odczytu, wchodzące w skład potencjalnego operonu *gerA* (Zuberi et al., 1985, 1987). Dalsze badania genetyczne pozwoliły na scharakteryzowanie rejonu promotorowego operonu, rozpoznawanego przez czynnik σ^G oraz przypisanie transkrypcji tych genów (i potencjalnie też translacji) do obszaru *prespory* (Feavers et al., 1990).

W *locus gerA* znajdują się trzy geny, ułożone w kolejności *gerAA*, *gerAB*, *gerAC*, gdzie geny pierwszy z drugim zachodzą na siebie 32 nukleotydami, a gen drugi z trzecim 4 nukleotydami. Zarówno powyżej jak i poniżej operonu *gerA* znajdują się geny będące w przeciwnej orientacji do *locus gerA* (Ryc.5). Mimo dostępności dokładnie anotowanej sekwencji genetycznej chromosomu *B. subtilis*, dalsze badania nad genami operonu *gerA* nie były prowadzone. W niektórych bazach danych pojawia się wzmianka o potencjalnym terminatorze Rho-niezależnym na końcu operonu, jednak brak jest danych literaturowych, które powiązałyby tę informację z operonem *gerA*. Poza tym, wciąż nie wyjaśniony zostaje fakt czy taka organizacja genów w operonie wpływa na proces ich transkrypcji.



Rycina 5. Schematyczne przedstawienie organizacji operonu *gerA*. Liniami przerywanymi zaznaczone są fragmenty sekwencji nakładające się pomiędzy genami. Poniżej schematu wymienione są rozmiary genów i białek odpowiadających elementom operonu. Pozostałe elementy na schemacie: P_{gerA} – promotor operonu *gerA*, *yvzF* – gen kodujący konserwowane białko o nieznannej funkcji, *citG* (*fumC*) – gen kodujący hydratazę fumarową, *liaR* – regulator odpowiedzi dwuskładnikowej, element operonu *liaGFSR*. Schematyczna reprezentacja genów nie odzwierciedla ich rzeczywistej wielkości.

Naturalną kontynuacją badań nad operonem *gerA* była analiza receptora jako białka lub raczej kompleksu białek. Ponieważ lokalizacja receptorów kiełkowania była początkowo nieznana, pierwsze wzmianki o wykrywaniu „białek GerA” dotyczyły opracowania specyficznych przeciwciał (Yasuda et al., 1996). Z perspektywy czasu można zauważyć, że były to przeciwciała wysoce niespecyficzne, ponieważ wykrywały wszystkie 3 białka w różnych frakcjach. Dało to błędny obraz występowania receptorów GerA, od płaszcza po rejon bliski rdzeniowi przetrwalnika. Badania opublikowane już od początku XXI wieku pokazują, że badacze próbowali opracować inne przeciwciała wykrywające białka receptora GerA (Hudson et al., 2001; Ramirez-Peralta et al., 2012). Co ciekawe, wyniki te pokazują, że przeciwciała anti-GerAB okazywały się być nieskuteczne, przez co wykrywane mogły być tylko białka GerAA i GerAC. Jest to przesłanka za transbłonowym charakterem białka B w całej jego strukturze. Kolejnym etapem badań wykrywających białka receptorów kiełkowania było wykorzystanie zjawiska fluorescencji. Zastosowanie białek o takich właściwościach jako znaczników do kolejnych komponentów receptora kiełkowania jest z pewnością podejściem atrakcyjnym, z punktu widzenia obserwatora. Badania opublikowane do tej pory pokazują, że jest możliwe wyznaczenie fluorescencyjne jednego białka spośród wszystkich trzech w operonie (Breedijk et al., 2020; Griffiths et al., 2011). Użycie tak zmodyfikowanych receptorów pozwala na obserwację procesu kiełkowania.

Analizując opublikowane dane na temat białek receptorów kiełkowania (nie tylko GerA), wskazać można pewne niedostatki w zastosowanej metodologii badawczej. Po pierwsze, brak specyficznego przeciwciała anti-białko B zupełnie uniemożliwia umiejscowienie tego białka w badaniach. Badacze przyjmują podejście, że skoro w doświadczeniu wykrywane jest białko A i C, białko B na pewno tam jest. Jeśli warunek, że wszystkie 3 białka z operonu *ger* są niezbędne do inicjacji kiełkowania, jest prawdziwy, to jest to podejście zasadne. Jednak do tej pory nie ma badań pokazujących obecność wszystkich trzech białek w jednym doświadczeniu. Po drugie, użycie znaczników fluorescencyjnych dla pojedynczych białek z poszczególnych receptorów kiełkowania, choć jest podejściem przełomowym, wciąż nie pozwala na zlokalizowanie wszystkich trzech komponentów jednego receptora. Oczywiście, opublikowane badania ze znakowanymi fluorescencyjnie białkami Ger dały mocny argument za działaniem receptorów kiełkowania w postaci germinosomów. Jednak nie mogą one być traktowane jako ostateczny dowód na to, że wszystkie 3 białka danego receptora na pewno lokalizują się w tym samym miejscu na

blonie wewnętrznej przetrwalnika. Po trzecie, dane na temat procesu translacji tych białek wciąż nie są znane. Z pewnością, brak skutecznych przeciwciał uniemożliwia odpowiedzenie na pytanie, ile białek powstaje z początkowego transkryptu mRNA. Mimo to, pojawiły się wstępne szacunki, że są to jednak białka nieliczne w proteomie przetrwalnika (Stewart & Setlow, 2013). Może być to jedynie argument przemawiający za tym, że w przypadku tych białek pewne tradycyjne metody wykrywania mogą okazać się za mało czułe. Zainteresowanie znacznikami fluorescencyjnymi jest z tego powodu uzasadnione. Należy jednak pamiętać, że przetrwalniki wykazują duży stopień autofluorescencji, co dodatkowo utrudnia prowadzenie badań z zastosowaniem omawianej metodologii.

Współczesne badania dotyczące białek zazwyczaj zawierają etap ich oczyszczania oraz próby krystalizacji, aby w ten sposób pozyskać jak najwięcej danych biochemicznych i strukturalnych potrzebnych m.in. do opracowania dobrych modeli *in silico*. W przypadku receptorów kiełkowania przeniesienie badań do wymiaru *in vitro* wciąż jest bardzo utrudnione. Jednym z powodów jest z pewnością transbłonowy charakter wszystkich białek Ger. Niemniej, do tej pory zostały skrytalizowane dwa spośród wszystkich komponentów receptorów kiełkowania. Struktura białka GerBC (reszty aminokwasowe od 25 do 374) została pozbawiona fragmentu transbłonowego, który był czynnikiem limitującym przy wydajnej nadprodukcji (Li Y. et al., 2010). Drugim kryształem białka Ger jest fragment białka GerKA, a dokładniej N-końcowa domena pozabłonowa (reszty aminokwasowe od 26 do 374) (Li Y. et al., 2019). Analizując opublikowane dane na temat tego kryształu, stwierdzić można, że nadprodukcja części pozabłonowej, choć zazwyczaj możliwa, nie zawsze odbywała się na dostatecznie wysokim poziomie. Dlatego badacze byli zmuszeni do wypróbowania różnych skróconych wariantów tego białka przy procesie nadprodukcji i oczyszczania. Jest to informacja o tyle istotna, ponieważ wskazuje, że ekspresja genów receptorów kiełkowania oraz późniejsza translacja poza natywnym środowiskiem mogą napotykać znaczne problemy.

Często, przy braku danych biochemicznych, naukowcy kierują się ku symulacjom *in silico*, aby zyskać punkt wyjścia do dalszych badań. Dzięki poszukiwaniu homologii ze znanymi już strukturami białkowymi, można uzyskać cenne wskazówki na temat białka, które jest obiektem badań. W przypadku receptorów kiełkowania to podejście również napotyka szereg problemów. Największy z nich to brak bliskiego podobieństwa do jakiegokolwiek ze znanych skrytalizowanych białek bakteryjnych. Powodem tych problemów może być

charakter błonowy tych białek. Ze względu na to, że białka Ger wykazują silną homologię między sobą, doniesienia o skryzalizowanych fragmentach niektórych z nich są bardzo cenne. Stosunkowo duże rozmiary białek Ger również stwarzają pewne ograniczenia w ich modelowaniu *de novo*, np. w postaci wielomerów.

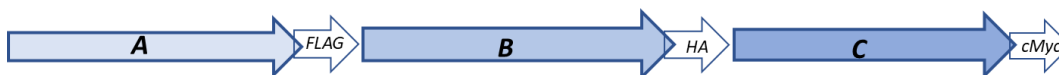
Receptory kiełkowania Ger to białka transbłonowe, głęboko ukryte przed środowiskiem zewnętrznym wewnątrz przetrwalnika. Brak podobieństwa do znanych molekuł, zarówno pod względem budowy jak i funkcji, zdecydowanie utrudnia wdrożenie wielu standardowych procedur badawczych.

3.2 Próba wizualizacji receptora GerA

Analiza literatury pozwala na stwierdzenie, że immunologiczna detekcja białek receptora GerA, oparta o wykrywanie fragmentów szukanych białek nie zawsze się sprawdza. Dlatego też w niniejszej pracy została podjęta próba wykrycia tych białek poprzez immunologiczną detekcję odpowiednich znaczników przyłączonych do poszczególnych białek składowych receptora. Ze względu na stosunkowo nieduże rozmiary, jako znaczniki wybrane zostały sekwencje:

- FLAG (m = 1,01kDa; 8aa) do białka A
- HA (m = 1,1kDa; 9aa) do białka B
- c-Myc (m = 1,203kDa; 10aa) do białka C

Aby zminimalizować potencjalne problemy wynikające z zaburzenia układu operonu, postanowiono, że wybrane znaczniki zostaną dołączone do białek bez dodatkowych łączników. Dlatego w procesie projektowania poszczególnych fragmentów sekwencji do syntezy w ośrodku zewnętrznym, do końców 3' genów kodujących dane białka, dołączono sekwencje kodujące poszczególne znaczniki białkowe. W ten sposób oryginalny układ genów operonu został zmieniony, tzn. zaniknęły wyjściowe nakładania się genów, jednakże całość pozostała w oryginalnym *locus* operonu *gerA* (Ryc.6).



	A	FLAG	B	HA	C	cMyc
Gen (pz)	1449	24	1098	26	1122	30
Białko (aa)	482	8	365	9	373	10
Masa (kDa)	53,8	1,01	41,3	1,1	42,2	1,2

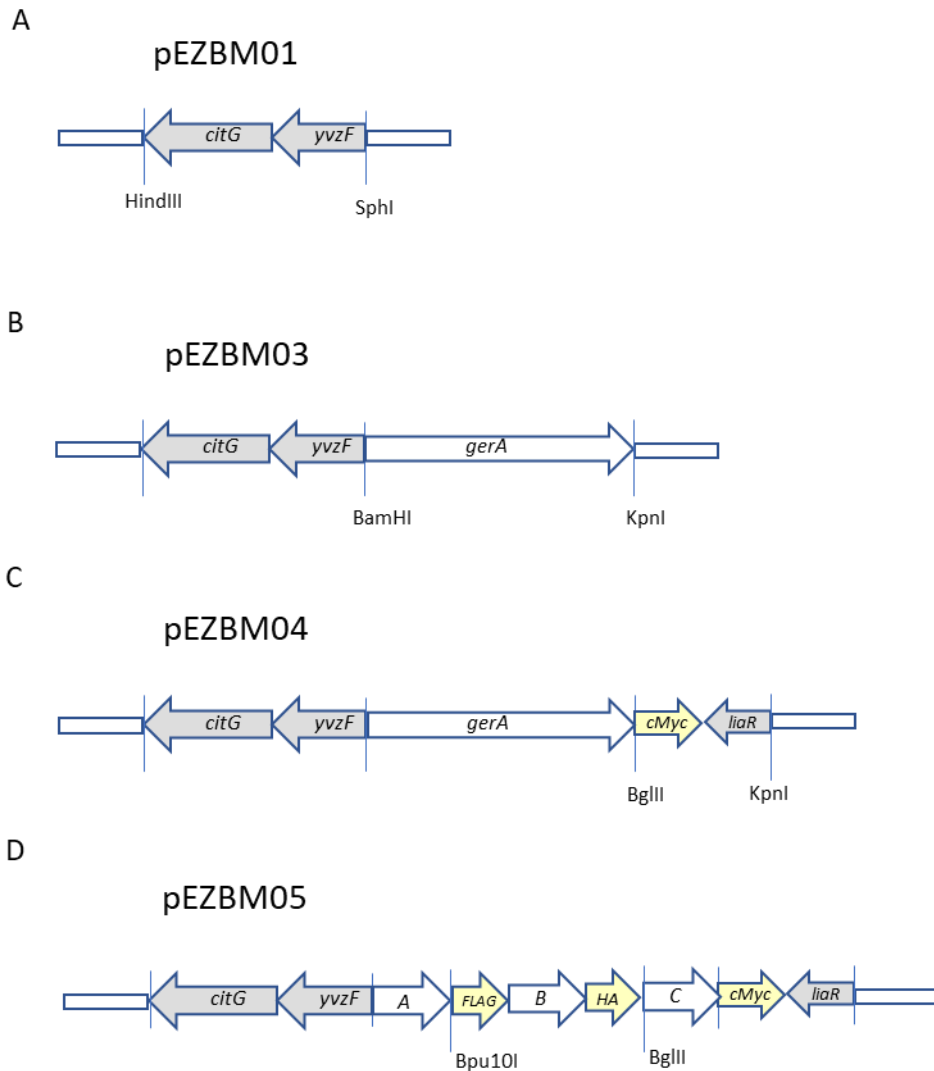
Rycina 6. Schematyczna reprezentacja układu genów operonu *gerA* w szczepie BZBM01. W tabeli zamieszczone są liczba par zasad, reszt aminokwasowych i masa poszczególnych elementów tego konstruktów.

3.2.1 Konstrukcja szczepu BZBM01

Prace rozpoczęto od skonstruowania wektora, który wprowadziłby zmienioną sekwencję operonu *gerA* w oryginalnym *locus* na chromosomie *B. subtilis*, w szczepie BAG13, w którym operon *gerA* został usunięty przez wklonowanie w oryginalnym *locus* genu oporności na neomycynę.

Na początku do plazmidu pBEST501 (Itaya et al., 1989) została wklonowana sekwencja znajdująca się powyżej operonu *gerA* (Ryc.7A). Obejmuje ona m.in. gen *yvzF* oraz gen *citG*. Powstały plazmid pEZBM01 posiadał gen oporności na neomycynę. Szczep BAG13, do którego docelowo miała nastąpić transformacja całego konstruktów posiadał również gen oporności na neomycynę. Aby uniknąć konfliktu selekcji gen oporności na neomycynę z wektora pEZBM01 został wymieniony na gen oporności na chloramfenikol. Do powstałego w ten sposób wektora pEZBM02 została wklonowana kompletna sekwencja operonu *gerA* wraz z rejonem promotorowym, pozyskana z chromosomu szczepu *B. subtilis* 168 (Ryc.7B). W ten sposób na plazmidzie pEZBM03 znalazła się kompletna sekwencja operonu *gerA*, jego rejon promotorowy oraz geny poprzedzające go w oryginalnym *locus* chromosomu. W kolejnym kroku, wykorzystano zsyntezowaną sekwencję obejmującą końcowy fragment genu *gerAC*, sekwencje kodującą znacznik (*cMyc*) oraz fragment sekwencji genu znajdującego się w sąsiedztwie oryginalnego *locus* (*liaR*). Dzięki kompatybilnym miejscom restrykcyjnym, sekwencja ta została przeklonowana do plazmidu pEZBM03. W ten sposób powstał plazmid pEZBM04, który zawierał cały operon *gerA* i jeden znacznik (*cMyc*) oraz geny flankujące operon po obu stronach oryginalnego *locus* (Ryc.7C). Ostatnim etapem tego procesu było wklonowanie do utworzonego wcześniej plazmidu, zsyntezowanej sekwencji zawierającej końcowy

fragment genu *gerAA* i odpowiadającego mu znacznika (FLAG) oraz gen *gerAB* z odpowiednim znacznikiem (HA). Powstały w ten sposób plazmid pEZBM05 zawiera kompletną sekwencję operonu *gerA* z sekwencjami trzech znaczników oraz sekwencje genów flankujących oryginalne *locus* (Ryc.7D).



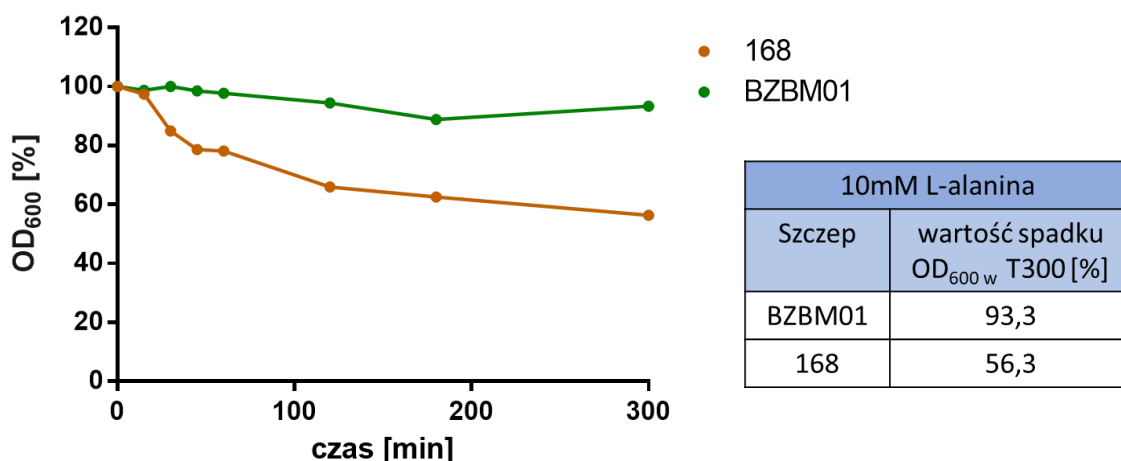
Rycina 7. Schematyczne przedstawienie kolejnych etapów (A-D) klonowania w procedurze utworzenia plazmidu pEZBM05. Kierunek strzałek określa orientację genów. Pionowymi liniami zaznaczone są wprowadzane miejsca restrykcyjne. Wielkość poszczególnych sekwencji jest umowna i nie odpowiada skali rzeczywistych rozmiarów sekwencji użytych w klonowaniu.

Dzięki obecności genów otaczających operon *gerA* na plazmidzie pEZBM05 możliwe było przeprowadzenie transformacji szczepu *B. subtilis* BAG13. Zaprojektowana sekwencja zmienionego operonu *gerA* mogła być wprowadzona w oryginalne *locus* na drodze rekombinacji homologicznej. Poprawność transformacji była sprawdzona za pomocą reakcji PCR, która wykrywała obecność sekwencji każdego ze znaczników. Na poziomie genetycznym, znaczniki znajdowały się w chromosomie szczepu BZBM01.

3.2.2 Produkcja przetrwalników i kiełkowanie szczepu BZBM01

W celu zweryfikowania czy utworzona modyfikacja szczepu 168 nie wpływa na właściwości wytwarzanych przetrwalników, konieczne było sprawdzenie ich funkcjonalności. Zarówno w hodowli wegetatywnej, jak i sporulacyjnej szczep BZBM01 nie wykazywał żadnych różnic we wzroście w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. Po standardowo stosowanym czasie hodowli w pożywce sporulacyjnej pojawiały się przetrwalniki, które morfologicznie nie odbiegały od przetrwalników wytwarzanych przez bakterie szczepu dzikiego. W trakcie procedury oczyszczania również nie napotkano problemów sugerujących zmienione właściwości analizowanych przetrwalników

Następnie, jako metodę pierwszego wyboru do sprawdzenia zdolności kiełkowania, zastosowano pomiar spadku gęstości optycznej zawiesiny przetrwalników. Jako germinant wykorzystano L-alaninę w stężeniu 10mM, który pozwala na sprawdzenie funkcjonalności receptora GerA. Przetrwalniki szczepu BZBM01 w standardowej procedurze pomiaru spadku OD₆₀₀ nie wykazują kiełkowania w odpowiedzi na użyty germinant (Ryc.8). Wynik ten może zatem sugerować, że zaproponowana modyfikacja operonu *gerA* zaburzyła funkcjonowanie receptora.



Rycina 8. Spadek gęstości optycznej zawiesiny przetrwalników szczepu BZBM01 w 10mM L-alaninie. Jako kontrola użyte zostały przetrwalniki szczepu 168. W tabeli znajdują się dokładne wartości spadku OD₆₀₀ w punkcie T300.

3.3 Mutageneza pozycji 324 białka A receptora GerA

3.3.1 Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej białek A receptora GerA

Równoległe do badań genetycznych prowadzona została analiza sekwencji DNA genu *gerAA* oraz sekwencji aminokwasowej białka A receptora GerA. Początkowe dane literaturowe mówiły o konserwowaniu genów receptorów kiełkowania, jednak bez podawania szczegółów takich porównań (Beskrovnaya et al., 2021; Ross & Abel-Santos, 2010). Podobnie było z opisanymi wcześniej mutacjami w konserwowanym motywie PFFP (Mongkolthanaruk et al., 2011).

Porównując ze sobą sekwencje aminokwasowe białek A receptorów GerA, GerB i GerK obecnych u *Bacillus subtilis* można zauważyć duży stopień podobieństwa wszystkich trzech. Dodatkowo, reszta w pozycji 324 jest konserwowana w każdym z nich. Można nawet stwierdzić, że reszta ta znajduje się w konserwowanym motywie VFPF (323-326).

AA_Bsub	1	M -----E QT -----EFKEYI HDN LALV L PKL K ENDDLV K N
BA_Bsub	1	M-----Q IDS L Q NNLDT K KT L GL Q ND M MFY
KA_Bsub	1	M PLFSKRKNNTSDKDKQNTDERN Q EQ Q EKERPV L TS P SLAK N IA E T K KE V GS S SDV L IR
consensus	1	**.....*
AA_Bsub	31	KK M LANG-LV-FYY L Y F SEMTDEN K VE A TK L LK D E E TT----T L D Q L K R L D Q L D ER P
BA_Bsub	28	TF A F G ES-R Q K A CL L Y D GL T EN K MA Q Y V IS P L Q KE A L A H K EC S I D SA F FF F G H HS V
KA_Bsub	61	E I K Q H Q D H V H L A V I Y I S G L V D N NT H ES L ID P L V Q E SI Q N T H A IQ L LE K T L PL G V K
consensus	61*.....*
AA_Bsub	85	V E T A - K K T IES I L N G N CA V F I N G L D K A Y L L T T G KK K TR S L T E P T E K V V R G P K V A F E D I
BA_Bsub	87	V S T M - K E E Q L V F S G A I L L A D G Y R G L A F D T K S V A T R S L D E P S S E V V E R G P K I G F E K L
KA_Bsub	121	A E K SW D K I F S E L M I G N A L I F A D G H D E A L I C S T Q G G E Q R S L Q E P S T Q V S F R G P R Q G F T E S L
consensus	121*.....*
AA_Bsub	144	D T N L A L I R Q R T S H P K L L T K K I M I G E N K L K P A A I M Y E G K A K K S V I K E V K A R L K N I Q L E D I
BA_Bsub	146	R T N T A L L R E R T S D P N L V I K E M T L G K R T K K I A V A Y I Q D I A P D Y V V K E V F K R L K S V N I D N L
KA_Bsub	181	Q T N S M I R R Y I K N P N L V E K M K K G S V T N T D I A L M Y I Q G I C D E K V L K E V K Q R L E K I D I D S I
consensus	181	**.....*.....*
AA_Bsub	204	Q D S G T L E E L I E D N K V S P F P Q I Q N T E R P D K V S S A L F N G R V A I L V D S S P F V L I V P V S I G I L M
BA_Bsub	206	P E S G T L E Q L I E D E P F S T F P T I L S T E R P D R V E S S L E G R V S I L V D G T P F A L I V P A T V D E F I
KA_Bsub	241	L E S G Y L E Q L I E D E T F T F P T M Y H T E R P D V V A G N L L E G R F A I I V D G T P F V L I A P A L F V Q E F
consensus	241	**.....*.....*

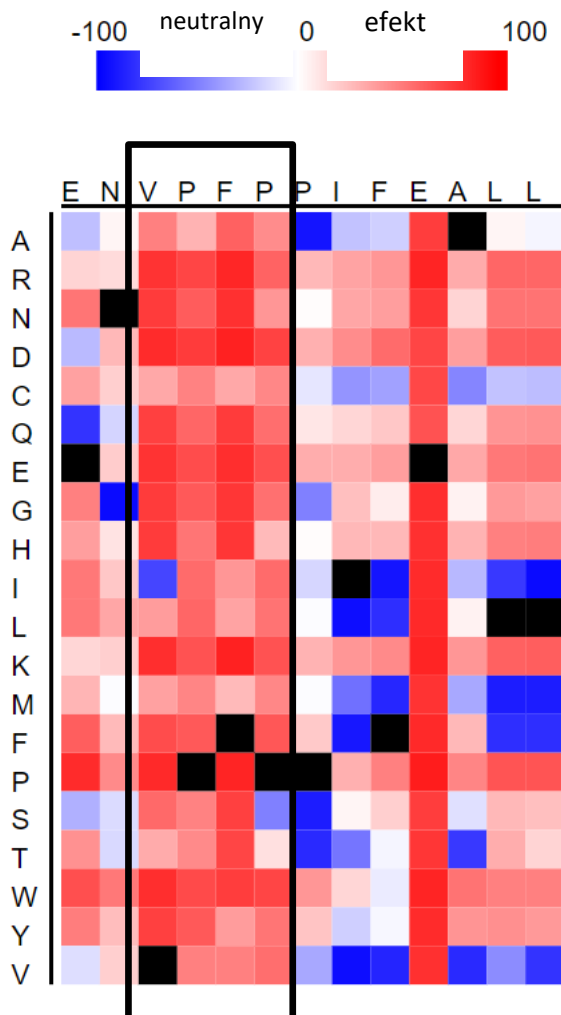
AA_Bsub	264	QSPDDYERWISASLIRSLRFASIFITLLELSSIYIILVFSHQGLLPTALAVTISANRENV
BA_Bsub	266	HSPDDYSQRWIPMSLRLRLRYSSILITITLPLGLYIILVFSFHTGLLPTRMATSIAGSRLNV
KA_Bsub	301	QSVDDYISRFDIASIRLRLVLVFFILSLVAPAVYVAATLFHQEMPTQLLVVIAAQRITV
consensus	301	.*.***.*.*..***.***.....***..*..*
AA_Bsub	324	PFPPFVEALIMEVTIELLREAGLRLENPIGQTIGLVGGVVIGQAAVEANIVSSIIIVIVVS
BA_Bsub	326	PFPPFVEAFIMIFITIELLREAGLRLPKPIGQTIGLVGGVVIGQAAVQAIVSAIMVIVVS
KA_Bsub	361	PFPAVVEALTMEVAFEILREAGVRLPRVVGSAVSVGATVIGQAAVQAIVSPAMVIIVA
consensus	361	*** ..**.*..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
AA_Bsub	384	VIALASFTVPQYGMGISFRVLRFLSMFSAATLGLYGIILFMLVVTHTLTROTSTFGSPYFS
BA_Bsub	386	VTALASFTVPSYAYNFPLRIIRIGVMISATALGMYGILVVYLFVIGHLMRLKSTFGQDYII
KA_Bsub	421	LTAASEFATPAPAMASARLIRFIFIASAVMGFYGIILGIMMFMVHLCSLRSTFGVPYMS
consensus	421	..*...**.* ..*.....*.....*.....*.....*.....***** ..*
AA_Bsub	444	PNGFSLKNTDSDSIRLPFKNKPKKVNPN-----IPKT
BA_Bsub	446	PIMAQPGQDLKDIVLRIPTMFLKRRPT-RN-----DPED
KA_Bsub	481	PLAPFSSQGVKDALFRMFWWADEKREPE-SVSKEDKVRQGDQRPEPAASRGMVNKDLREG
consensus	481	*.. . . .*.....*..... ..*.....
AA_Bsub	478	DSTET
BA_Bsub	479	NIRQR
KA_Bsub	540	DQNGT
consensus	541	.

Rycina 9. Porównanie sekwencji aminokwasowych GerAA, GerBA, GerKA *Bacillus subtilis*. Kolorem czerwonym zaznaczono konserwowany rejon VFPF.

Porównując sekwencje aminokwasowe białek A u różnych przedstawicieli bakterii przetrwalnikujących można zauważyć, że wykazują one większe podobieństwo wśród bakterii rodzaju *Bacillus* (Ryc.S1, Załączniki). Co ważne, reszta z pozycji 324, razem z całym motywem VFPF, jest konserwowana u praktycznie wszystkich użytych w zestawieniu przedstawicieli, poza *Clostridium botulinum*.

Ponieważ kompletna struktura białka A wciąż nie jest dostępna, na potrzeby niniejszych badań sekwencja aminokwasowa tego białka została przeanalizowana przy pomocy serwisów PredictProtein (Bernhofer et al., 2021) i ConSurf (Armon et al. 2001; Ashkenazy et al. 2010, 2016; Celniker et al. 2013; Glaser et al., 2003). Oba serwisy łączą metody uczenia maszynowego oraz analizę danych z dostępnych baz danych (np. PDB, Pfam) pod kątem m.in. ewolucyjnego pokrewieństwa z analizowaną sekwencją. Wyniki te potwierdzają konserwowanie reszty 324 i sąsiadujących z nią pozycji, co wskazywane jest jako istotne dla funkcji białka. Ponadto, przewidywania co do struktury drugorzędowej tego białka sugerują, że reszta 324 może znajdować się w części białka eksponowanej poza błonę, ale będącej w bliskiej odległości od niej. Wyniki z serwisu SNAP2 (Bromberg & Rost, 2007), przewidującego jaki efekt funkcjonalny może mieć podstawienie danej reszty w białku pokazują, że podstawienie reszty 324 w białku A jest zdecydowanie w grupie

substytucji mogących mieć znaczny wpływ na działanie tego białka. Podobnie wyglądają przewidywania dla reszt w całym konserwowanym motywie VPFP.



Rycina 10. Fragment wyników przewidywań serwisu SNAP2 dla substytucji wszystkich pozycji w białku A receptora GerA. W górnej części znajduje się sekwencja aminokwasowa białka A. Po lewej znajduje się lista możliwych substytucji. Substytucje znacząco wpływające na funkcjonalność białka zaznaczone są na czerwono. Substytucje nie wpływające na działanie białka zaznaczone są na niebiesko. W ramce zaznaczona jest sekwencja VPFP.

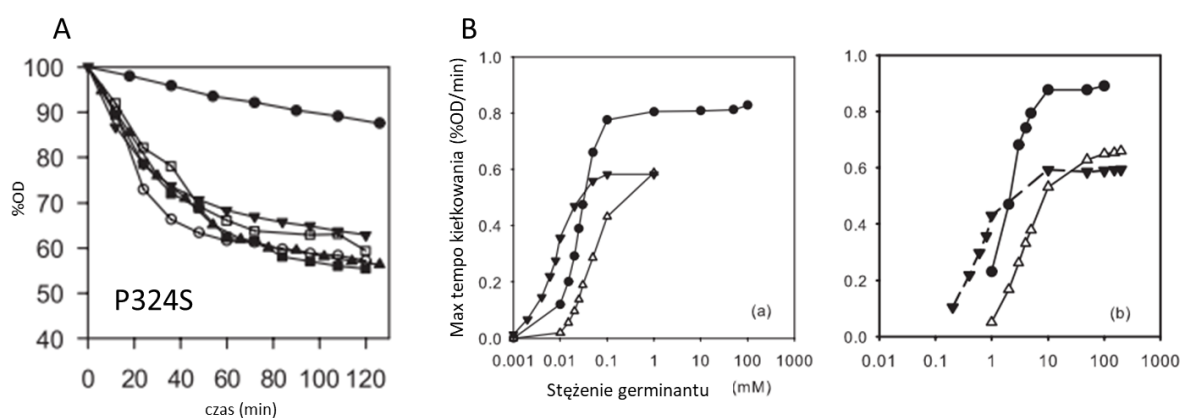
Biorąc pod uwagę powyższe wyniki bioinformatyczne można stwierdzić, że istotnie pozycja 324 w białku A może być ważna w kontekście funkcjonalności tego białka, jak i całego receptora.

3.3.2 Pozycja 324 w kontekście literatury przedmiotu.

Dotychczas opublikowane badania sugerują, że białka A i B receptora GerA mogą brać udział w rozpoznawaniu i/lub wiązaniu L-alaniny. Pewne mutacje wprowadzane w obrębie tych białek, były obserwowane zazwyczaj jako pogarszające proces kiełkowania w L-alaninie. Jednak możliwe są również mutacje nie wpływające na wydajność kiełkowania lub takie, które w pewien sposób zmieniają odpowiedź receptora GerA w procesie

kiełkowania. Jedną z nich jest mutacja P324S w białku A receptora GerA (Mongkoltharuk et al., 2011).

Substytucja proliny w pozycji 324 seryną w kiełkowaniu z L-alaniną lub AGFK skutkowało porównywalną do przetrwalników szczepu typu dzikiego wydajnością kiełkowania (Ryc.11). Użycie różnych zakresów stężeń germinantów (L-alanina i jej analogi) pokazało również, że przetrwalniki z tą substytucją w białku A wykazują wyższy poziom kiełkowania przy niskich stężeniach, w stosunku do przetrwalników szczepu typu dzikiego (Ryc.11). Co więcej, przywołana tutaj publikacja, omawia również substytucje w dwóch następujących po sobie pozycjach. Podstawienie fenyloalaniny w pozycji 325 przez alaninę również skutkowało porównywalnym do przetrwalników typu dzikiego fenotypem kiełkowania w standardowych warunkach, jak w przypadku P324S. Jednak tutaj kiełkowanie przy bardzo niskich stężeniach germinantów już nie było obserwowane. Mutacja F325A wiązała się również ze spowolnionym tempem uwalniania DPA w trakcie kiełkowania. Z kolei substytucja proliny w pozycji 326 seryną spowodowała, że szczep nie mógł ukończyć formowania przetrwalników. Wzrost wegetatywny szczepu z mutacją P326S nie był zaburzony, jednak w trakcie sporulacji większość komórek ulegała lizie, a przetrwalniki, które powstawały, były już w fazie ciemnej, sugerującej częściowe uwodnienie rdzenia.



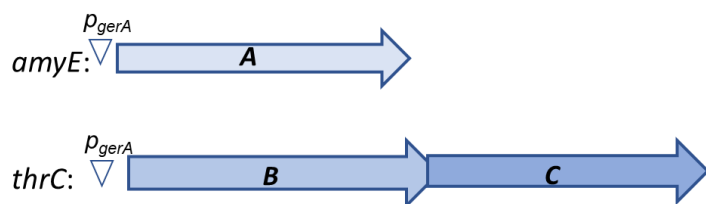
Rycina 11. Kiełkowanie przetrwalników z mutacjami P324S i P325A w białku A – dane opublikowane dotychczas. Panel A: Kiełkowanie przetrwalników szczepu P324S. Symbole: • bufor, ○ L-alanina, □ L-alanina + glukoza, ▪ L-alanina + glukoza + fruktoza, ▲ - L-alanina + fruktoza, ▼ – AGFK. Panel B: Tempo kiełkowania przetrwalników szczepów WT (●), P324S (▼), P325A (Δ) w obecności L-alaniny (a), i L-waliny (b). Wykresy na podstawie (Mongkoltharuk et al., 2011).

Dodatkowo, próbowano zbadać działanie inhibitora, D-alaniny, na przetrwalniki z mutacjami P324S i F325A, również w białku A. Mutacja w pozycji 324 skutkowała mniejszą wrażliwością przetrwalników na zahamowanie kiełkowania, w porównaniu z przetrwalnikami szczepu typu dzikiego. Z kolei przetrwalniki z mutacją w pozycji 325 były stosunkowo bardziej podatne na inhibicyjny efekt D-alaniny. Jednakże, w doświadczeniu tym nie badano wpływu inhibitora jako jedynego czynnika, a mieszaniny dwóch izomerów alaniny, gdzie L-alanina została użyta w najniższym stężeniu, przy którym obserwowano najwyższą wydajność kiełkowania. Dlatego wyniki dotyczące wpływu mutacji w tych pozycjach na działanie D-alaniny w kiełkowaniu receptora GerA pozostaje niejasny.

Zgodnie z przewidywaniami przytoczonej pracy (Mongkolthanaruk et al., 2011) reszty 324-326 białka A znajdują się w sekwencji PFPP, określonej tam jako „pętla bogata w proliny”. Rejon ten opisany został jako konserwowany, choć nie wyjaśniono na podstawie zestawień jakich sekwencji został wysnuty taki wniosek. Przesłanka o konserwowaniu wspomnianych reszt oraz nieodnotowany wcześniej fenotyp kiełkowania sugerują, że są to pozycje istotne w działaniu receptora GerA. Ponieważ reszty prolinowe są bardzo często istotne pod względem strukturalnym, dalsze prace w tym projekcie skupiły się na weryfikacji i zgłębieniu dotychczasowych danych na temat pozycji 324 w białku A receptora GerA.

3.3.3 Mutageneza reszty w pozycji 324 białka A receptora GerA

Aby móc zweryfikować dotychczasowe informacje, należało przede wszystkim odtworzyć mutację P324S. W tym celu został wykorzystany plazmid pAG102, niosący gen *gerAA* typu dzikiego razem z jego natywnym promotorem. Dodatkowo jest to wektor integracyjny, umożliwiający wprowadzenie genu *gerAA* do *locus amyE*. Integracja genów do tego *locus* była w przeszłości używana w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej (ZBM). Dodatkowo takie ułożenie genu *gerAA* do chromosomu było kompatybilne ze szczepem BAG14, obecnym w kolekcji ZBM. Szczep BAG14 nie posiada operonu *gerA* w natywnym *locus*, a jedynie geny *gerAB* i *gerAC* (pod kontrolą natywnego promotora) w *locus thrC*. Taki układ genetyczny również był wcześniej używany w badaniach prowadzonych w ZBM (Grela et al., 2018) (Ryc.12).



Rycina 12. Schemat układu genów operonu *gerA* w szczepach z mutacjami w pozycji 324 i szczepie BAG17.

Na etapie projektowania starterów do mutagenyzy miejscowo-specyficznej, wyniki z przewidywań serwisu SNAP2 nie były jeszcze znane. Niemniej pojawiło się pytanie, czy rodzaj reszty aminokwasowej wprowadzanej w miejsce konserwowanej proliny ma wpływ na wywoływany efekt kiełkowania. Praca publikująca mutację P324S (Mongkoltharuk et al., 2011) nie wyjaśnia dlaczego użyto podstawienia seryny, a nie standardowo używanych najmniejszych aminokwasów, np. alaniny lub glicyny. Aby móc zweryfikować hipotezę o wpływie rozmiaru reszty wprowadzanej w pozycję 324, dalsze prace skupiły się na wprowadzeniu czterech mutacji:

- P324S – odtworzenie opublikowanej mutacji
- P324A – standardowo stosowane podstawienie alaninowe
- P324G – podstawienie najmniejszej reszty aminokwasowej o większym zakresie ruchliwości w strukturach białkowych niż alanina
- P324F – podstawienie reszty aminokwasowej większych rozmiarów, jako kontrast do pozostałych użytych substytucji

Poszczególne mutacje zostały wprowadzone w reakcji PCR do genu *gerAA* na plazmidzie pAG102. Zaprojektowane startery posiadały kodony poszczególnych aminokwasów w swojej centralnej części. Poprawność procesu była sprawdzana poprzez sekwencjonowanie plazmidów wyizolowanych z wybranych klonów. Następnie, w procesie transformacji, mutacje zostały wprowadzone do chromosomu szczepu BAG14.

W dalszej części tego rozdziału poszczególne szczepy niosące mutację w pozycji 324 białka A, będą nosiły nazwy pochodzące bezpośrednio od mutacji, tzn. szczep P324S, szczep P324A, szczep P324G i szczep P324F. Jako szczep kontrolny, będący punktem odniesienia dla badania wymienionych szczepów, został wybrany szczep BAG17, znajdujący się w kolekcji ZBM. Posiada on identyczny układ genetyczny genów

operonu *gerA* typu dzikiego, tzn. gen *gerAA* w *locus amyE* i geny *gerAB* i *gerAC* w *locus thrC*.

3.3.4 Produkcja przetrwalników szczepów z mutacjami w pozycji 324

Po uzyskaniu szczepów z odpowiednimi mutacjami, należało sprawdzić funkcjonalność receptora GerA w przetrwalnikach wytworzonych przez te szczepy. W trakcie zakładania i prowadzenia hodowli wegetatywnych żaden ze szczepów nie wykazywał odmiennych właściwości wzrostowych. Również po przeniesieniu do pożywki sporulacyjnej. Jak opisano w rozdziale „Metody” hodowle szczepów z mutacjami i BAG17 były prowadzone równolegle i w porównywalnym czasie obserwowane było pojawianie się przetrwalników w fazie jasnej. Jako metodę oczyszczania wybrano kilkudniowe płukanie w wodzie, ponieważ jest to metoda uznana za najmniej inwazyjną i nie ingerującą w strukturę przetrwalników.

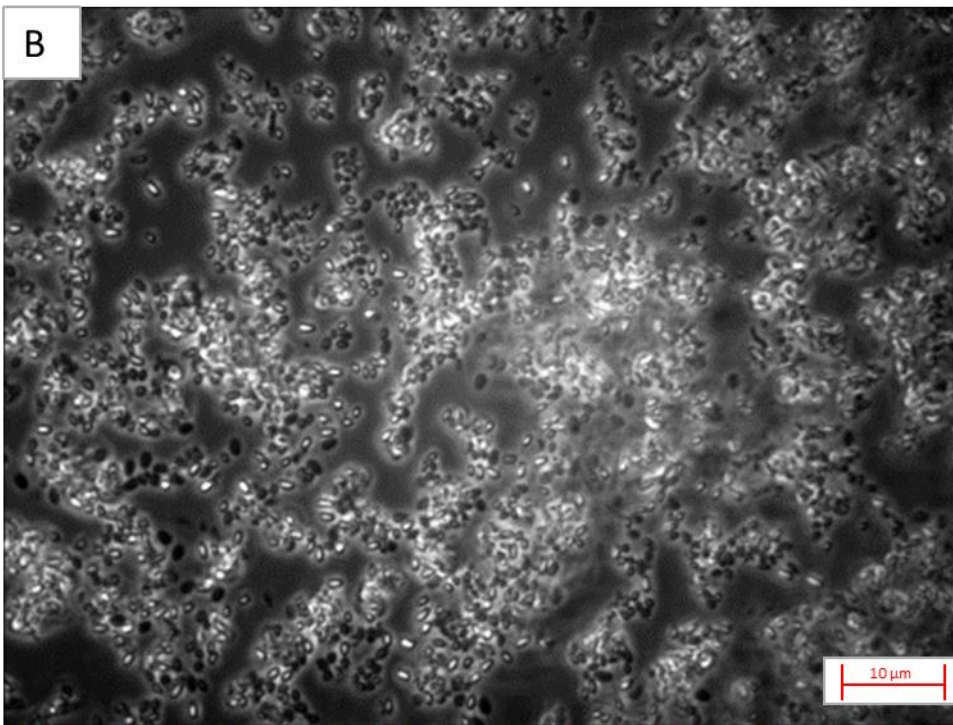
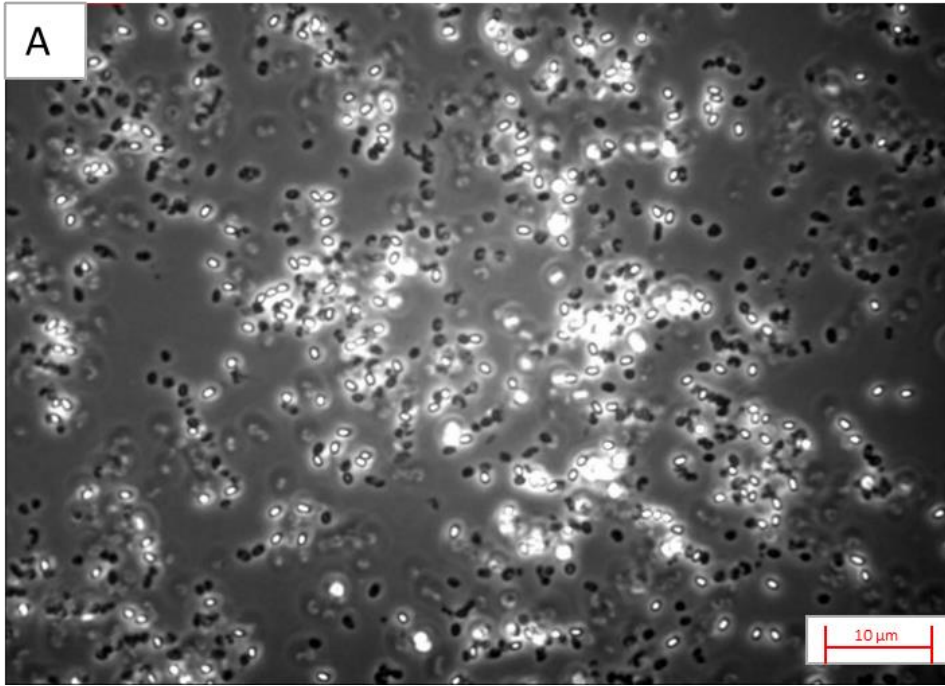
Na etapie wirowania hodowli przetrwalniki wszystkich czterech szczepów z mutacjami dużo słabiej osiadały na dnie próbek, w porównaniu do szczepu BAG17. Zawsze pozostawała wyraźna warstwa przetrwalników unosząca się na powierzchni nadsącza, nawet jeśli czas wirowania był wydłużany. Stanowiło to znaczący problem przy oczyszczaniu przetrwalników metodą wodną. Nawet przy bardzo ostrożnym zawieszaniu w świeżej wodzie (np. przy pomocy pipety Pasteura), wydłużonym czasie wirowania i ostrożnym zlewaniu nadsącza, część przetrwalników z mutacjami zawsze była tracona.

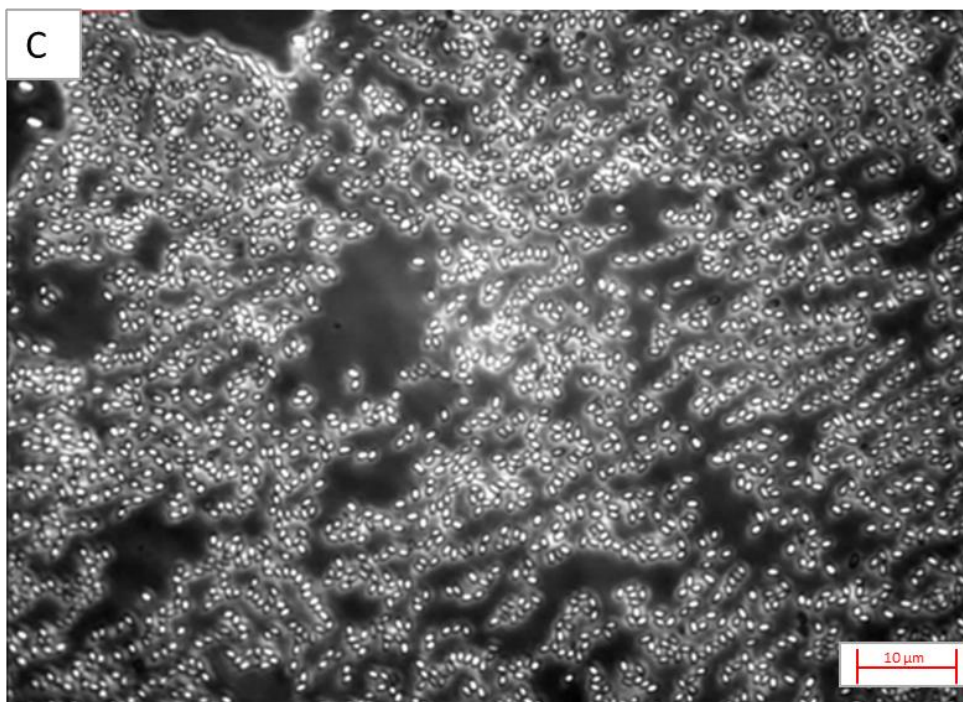
Po pierwszym zwirowaniu hodowli sporulacyjnych widoczna była również różnica w ilości osadu pomiędzy szczepami, w porównaniu do szczepu BAG17. Ilość przetrwalników po hodowli szczepów P324S i P324G była średnio o połowę mniejsza w stosunku do szczepu BAG17. W przypadku szczepów P324A i P324F ilość osadu była porównywalna do szczepu BAG17. Dodając do tego wspomniane wcześniej problemy z wirowaniem przetrwalników z mutacjami, produkcja tych preparatów zawsze skutkowała tym, że próbki z przetrwalnikami z mutacjami miały niższą gęstość optyczną niż próbka BAG17 – w przypadku szczepów P324A i P324F było to średnio o 1/5 mniej, a w przypadku szczepów P324S i P324G nawet o 1/2.

W trakcie procesu oczyszczania przetrwalniki były analizowane mikroskopowo, standardowo w celu kontrolowania jakości preparatu. W trakcie analizy okazało się, że

wszystkie preparaty szczepów z mutacjami składają się z niejednorodnych populacji przetrwalników. Innymi słowy, w przeciągu kilku dni od zwirowania hodowli sporulacyjnych, wszystkie preparaty przetrwalników z mutacjami, poddane płukaniu wodą dejonizowaną, w różnym stopniu, zmieniały się z homogennej populacji przetrwalników w fazie jasnej w mieszaninę przetrwalników w fazie jasnej, ciemnej i pośredniej („szarej”). W preparatach P324A i P324F udział przetrwalników fazy ciemnej był najmniejszy spośród wszystkich preparatów z mutacjami, jednak widocznie większy niż w preparacie BAG17. Preparaty P324S i P324G wykazywały zdecydowanie największy udział przetrwalników w fazie ciemnej i „szarej” (Ryc.13). Ponieważ prezentowane obserwacje mikroskopowe nie pozwalały jednoznacznie rozróżnić przetrwalników w fazie ciemnej i pośredniej (różnych odcieni szarości) nie zostały wykonane próby liczbowego określenia udziału takich przetrwalników w populacji. W obserwowanych preparatach nigdy nie dochodziło do kompletnego odtworzenia komórek wegetatywnych z przetrwalników. Mimo kilkukrotnego powtarzania hodowli sporulacyjnych szczepów z mutacjami, heterogenność preparatów powtarzała się. Można było również zauważyć, że udział przetrwalników „ciemnych” bądź „szarych” jest zmienny pomiędzy szczepami oraz morfologia przetrwalników również ulegała zmianom, np. w preparacie P324S pojawiały się przetrwalniki wyraźnie większe od pozostałych preparatów.

Początkowo można było przypuszczać, że wybrana metoda oczyszczania przetrwalników (metoda wodna) jest w przypadku tych szczepów nieodpowiednia i niewydajna. Dlatego wypróbowano również metody wirowania w gradiencie HistoDenzTM. Jednak jak pokazały późniejsze analizy kiełkowania takich preparatów, oczyszczanie przetrwalników metodą inną niż wodna, pozbawiło te szczepy wyróżniających się fenotypów (które będą opisane w dalszej sekcji). Na tym etapie badań oczywistym było, że wprowadzone mutacje w pozycji 324 białka A mają związek z heterogennością przetrwalników w hodowli, nawet bez obecności czynników aktywujących kiełkowanie.





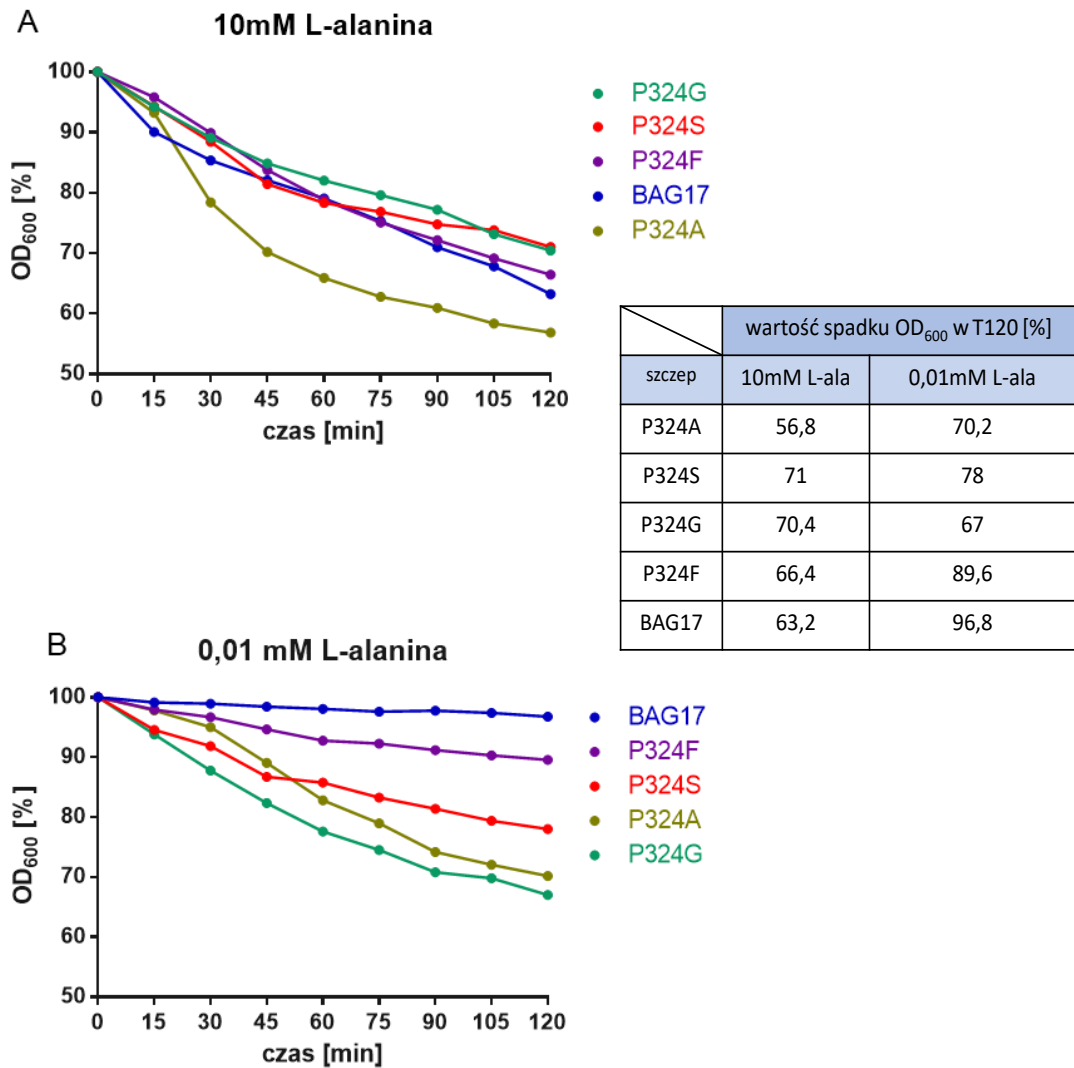
Rycina 13. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe przetrwalników szczepu P324S (A), P324G (B) i 168 (C) w trakcie procesu oczyszczania.

3.3.5 Kiełkowanie przetrwalników szczepów z mutacjami z pozycji 324 białka A

W celu sprawdzenia działania receptora GerA z wytypowanymi mutacjami, przeprowadzono analizy kiełkowania przetrwalników uzyskanych szczepów. Jako pierwszą metodę wykorzystano pomiar spadku gęstości optycznej kiełkującej mieszaniny, a jako pierwszego germinantu użyto L-alaninę w stężeniu 10mM, która jest standardowo używanym ligandem receptora GerA (Ryc.14A).

Przetrwalniki wszystkich szczepów z mutacjami w pozycji 324 wykazywały kiełkowanie przy standardowym stężeniu L-alaniny. Przetrwalniki szczepu P324A wykazały się wydajniejszym kiełkowaniem w tych warunkach niż przetrwalniki szczepu BAG17. Przetrwalniki pozostałych szczepów kiełkowały wydajnością porównywalną do przetrwalników szczepu BAG17. Przetrwalniki szczepów P324S i P324G okazały się najmniej wydajnie kiełkującymi w tym doświadczeniu.

Ze względu na to, że mutacja P324S została powiązana ze zwiększoną wrażliwością przetrwalników na niskie stężenia germinantów, przetrwalniki uzyskanych szczepów zostały zbadane również pod tym względem. W analizie spadku gęstości optycznej przetrwalniki szczepów z mutacjami w pozycji 324 kiełkowały w obecności 0,01 mM L-alaniny. Stężenie to zostało wybrane na podstawie wyników opublikowanych w (Mongkoltharuk et al., 2011) (Ryc.14B).



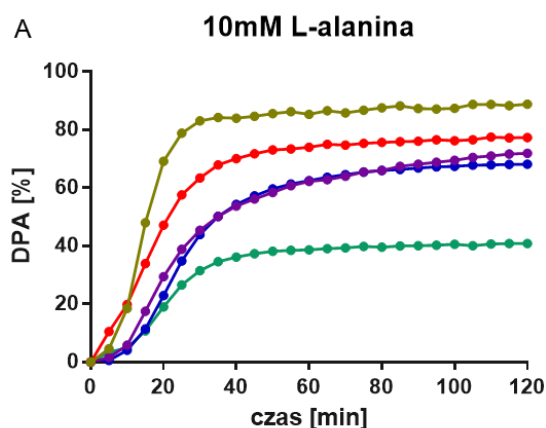
Rycina 14. Spadek gęstości optycznej przetrwalników szczepów z mutacjami i szczepu BAG17 w 10mM (A) i 0,01mM (B) L-alaninie. W tabeli znajdują się dokładne wartości spadku OD₆₀₀ w punkcie T120.

Zgodnie z oczekiwaniami, przetrwalniki wszystkich szczepów z mutacją w pozycji 324 wykazywały wydajniejsze kiełkowanie od przetrwalników szczepu BAG17 przy niskim stężeniu L-alaniny. W tych warunkach najwydajniej kiełkowały przetrwalniki szczepu P324G. Z podobną wydajnością kiełkowały również przetrwalniki szczepu P324A. Zdecydowanie najslabiej kiełkowały przetrwalniki szczepu P324F, choć nadal była to wydajność większa niż przetrwalników szczepu BAG17 w tych warunkach.

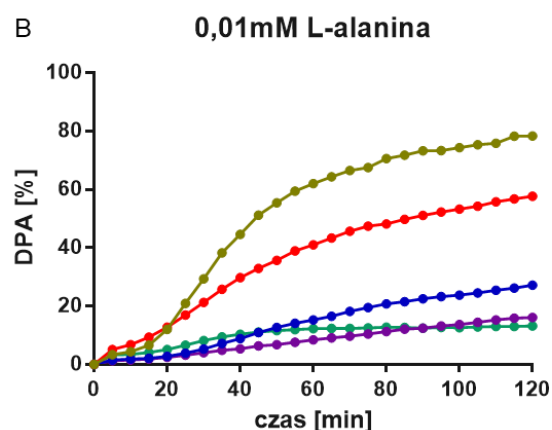
Ponieważ wyjściowo preparaty przetrwalników z mutacjami były heterogenne, a co za tym idzie, już przed dodaniem germinantu znajdowały się tam przetrwalniki o potencjalnie uwodnionym rdzeniu, istniało ryzyko, że pomiar spadku gęstości optycznej będzie obarczony błędem. Z tego powodu przetrwalniki szczepów z mutacjami zostały poddane kolejnej analizie kiełkowania – pomiarze uwolnianego DPA. Jako germinant znowu została użyta L-alanina w stężeniach 10 i 0,01mM.

W analizie kiełkowania przez pomiar uwolnianego DPA tendencje w wydajności kiełkowania przetrwalników szczepów z mutacjami zmieniły się. Przy standardowym stężeniu L-alaniny przetrwalniki szczepu P324G kiełkowały najslabiej – ilość uwolnionego DPA była najmniejsza. Wydajniej niż przetrwalniki szczepu BAG17 kiełkowały przetrwalniki szczepów P324A i P324S. Przetrwalniki szczepu P324F kiełkowały z wydajnością porównywalną do przetrwalników szczepu BAG17 (Ryc.15A).

W przypadku kiełkowania z L-alaniną w stężeniu suboptymalnym tylko przetrwalniki szczepów P324A i P324S kiełkowały wydajnie. Poziom uwolnionego DPA był nieznacznie obniżony, jednak porównywalny do tego z kiełkowania indukowanego 10mM L-alaniną. Poziom uwolnionego DPA był najniższy dla przetrwalników szczepów P324G i P324F. Wydajność ich kiełkowania w tej analizie była niższa niż przetrwalników szczepu BAG17 (Ryc.15B).



szczep	ilość uwolnionego DPA w T120 [%]	
	10mM L-ala	0,01mM L-ala
P324A	88,8	78,3
P324S	77,4	57,7
P324G	40,8	13,2
P324F	72	16,1
BAG17	68,2	27,2



Rycina 15. Uwalnianie DPA kiełkujących przetrwalników szczepów z mutacjami i szczepu BAG17 w 10mM (A) i 0,01mM (B) L-alaninie. W tabeli znajdują się dokładne wartości uwolnionego DPA w punkcie T120.

Początkowa analiza kiełkowania przetrwalników szczepów P324S, P324A, P324G i P324F pokazała, że wprowadzone mutacje zmieniają fenotyp ich kiełkowania zarówno w warunkach optymalnego stężenia L-alaniny, jak i w stężeniu stukrotnie niższym. Dodatkowo porównanie wyników różnych analiz kiełkowania sugeruje, że w przypadku badanych szczepów spadek gęstości optycznej kiełkującej zawiesiny przetrwalników może nie być tożsamy z ilością uwolnionego DPA w tym procesie.

Analizy kiełkowania w tych samych warunkach przetrwalników wszystkich czterech szczepów z mutacjami zostały powtórzone trzykrotnie. Przetrwalniki szczepu P324A wykazywały najmniej stabilny fenotyp kiełkowania. Różne preparaty przetrwalników tego szczepu wykazywały odmienną wydajność kiełkowania, co skutkowało zupełnie inną ich

pozycją w zestawieniu wszystkich szczepów z mutacjami. Przetrwalniki szczepu P324F kiełkowały z wydajnością porównywalną do przetrwalników szczepu BAG17, często z bardzo podobną kinetyką całego procesu. Jedynie przetrwalniki szczepów P324S i P324G zachowywały swoją początkową wydajność kiełkowania, choć jej poziom również ulegał nieznacznym zmianom pomiędzy kolejnymi oczyszczaniami. Z tego powodu dalsze badania skupiły się na scharakteryzowaniu kiełkowania przetrwalników jedynie szczepów P324S i P324G. Jak wspomniano wcześniej w sekcji „3.3.4 Produkcja przetrwalników szczepów z mutacjami w pozycji 324”, produkcja nowych preparatów przetrwalników szczepów z mutacjami wiązała się z tym, że miały one zawsze mniejszą gęstość optyczną od preparatu przetrwalników szczepu BAG17. Z tego względu, aby jeden zestaw reakcji mógł być przeprowadzony z użyciem tych samych preparatów, dalsze analizy kiełkowania dotyczą tylko pomiarów uwalnianego DPA w badanych szczepach. Jak zostało opisane w rozdziale „Metody”, analiza ta wykorzystuje próbki o niższej gęstości optycznej niż analiza pomiaru spadku gęstości optycznej, a co za tym idzie, pozwala na użycie mniejszej ilości przetrwalników w pojedynczej reakcji.

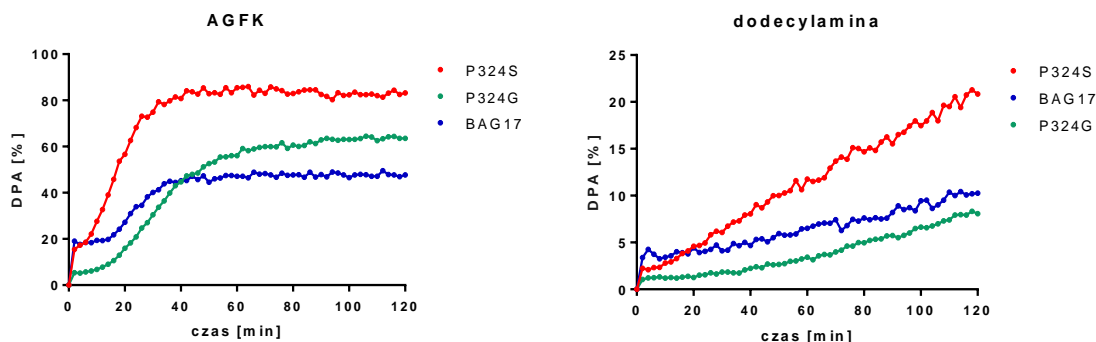
3.3.6 Kiełkowanie przetrwalników szczepów P324S i P324G

Ponieważ wstępne analizy kiełkowania pokazały, że receptor GerA z mutacją w pozycji 324 białka A jest funkcjonalny, pojawiło się pytanie czy pozostałe ścieżki aktywacji kiełkowania w takich przetrwalnikach również działają. Aby to sprawdzić przeprowadzono kiełkowania w obecności mieszaniny AGFK oraz 1mM dodecylaminy. Doświadczenie z AGFK miało na celu sprawdzenie funkcjonalności innych receptorów kiełkowania, GerB i GerK. Natomiast kiełkowanie z dodecylaminą przeprowadzono, aby sprawdzić czy przetrwalniki badanych szczepów są zdolne do rozpoczęcia kiełkowania bez aktywacji termicznej i bez użycia receptorów kiełkowania.

W obu doświadczeniach widać, że przetrwalniki zarówno szczepu P324S jak i P324G posiadają funkcjonalne receptory GerB i GerK oraz są zdolne do kiełkowania niezależnego od receptorów kiełkowania. Przetrwalniki szczepu P324S blisko dwukrotnie lepiej kiełkują w obecności mieszaniny AGFK, w porównaniu do przetrwalników szczepu BAG17 (Ryc.16A). Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku kiełkowania niezależnego od receptorów kiełkowania (Ryc.16B). W przypadku szczepu P324G, wydajność kiełkowania przetrwalników w obecności mieszaniny AGFK jest blisko 1,5 razy wyższa niż

przetrwalników szczepu BAG17. Jednak wydajność kiełkowania niezależnego od receptorów kiełkowania jest obniżona dla tego szczepu, w stosunku do szczepu BAG17.

Doświadczenia te pokazują, że wprowadzone mutacje do białka A receptora GerA nie blokują działań innych ścieżek inicjacji kiełkowania przetrwalników.



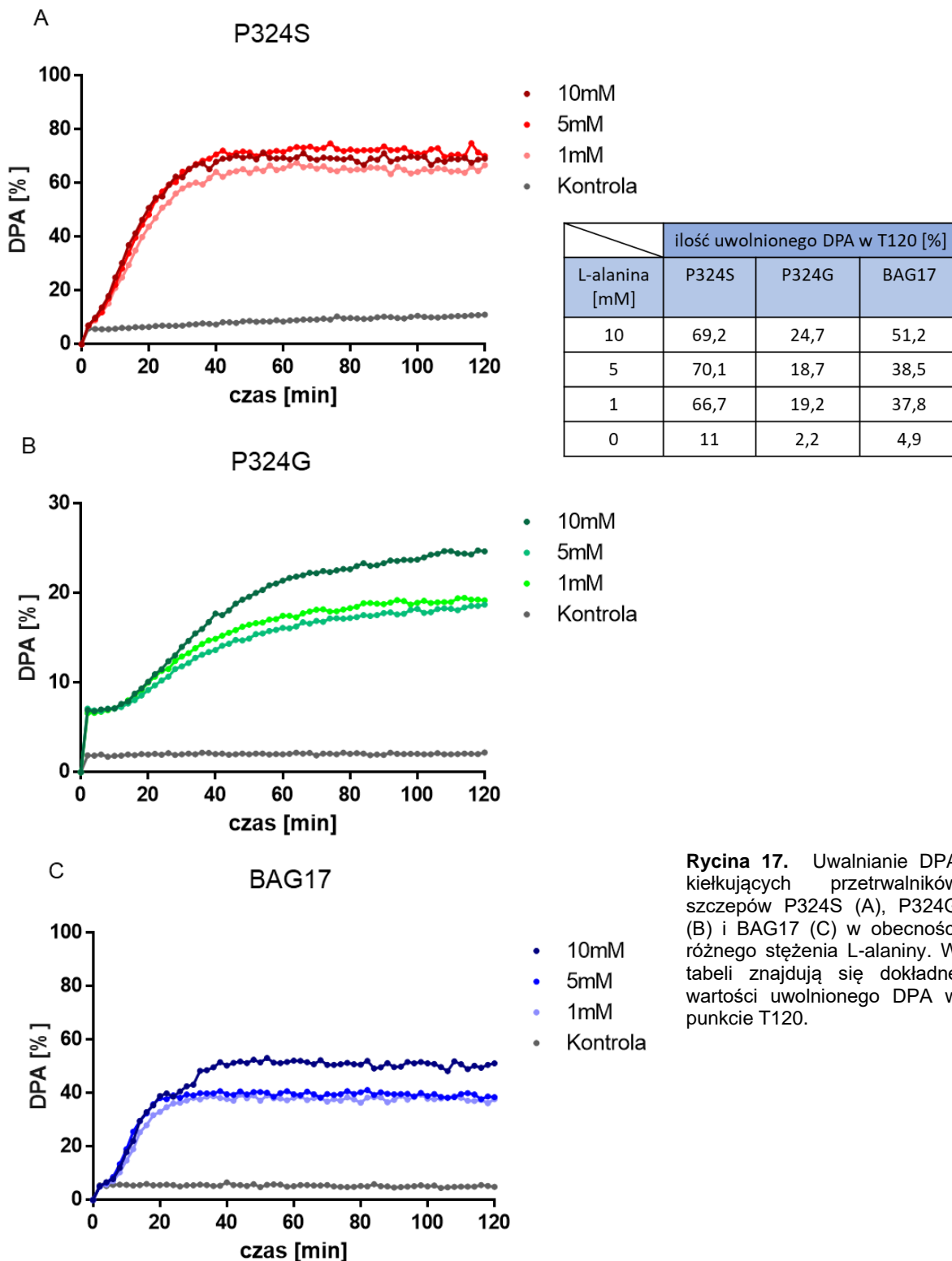
szczepy	ilość uwolnionego DPA w T120 [%]	
	AGFK	dodecylamina
P324S	83,2	20,8
P324G	63,5	8,1
BAG17	47,7	10,3

Rycina 16. Uwalnianie DPA kiełkujących przetrwalników szczepów P324S, P324G i BAG17 w obecności mieszaniny AGFK (A) i 1mM dodecylaminy (B). W tabeli znajdują się dokładne wartości uwolnionego DPA w punkcie T120.

Dotychczas opisane wyniki pokazują, że mutacje P324S i P324G pozwalają na inicjację kiełkowania przetrwalników zarówno przez receptory kiełkowania jak i ścieżką alternatywną. W kontekście działania receptora GerA zostało do tej pory zbadane kiełkowanie tych szczepów jedynie w stężeniu optymalnym (10mM) i suboptymalnym (0,01mM). Kolejne analizy miały na celu sprawdzenie czy działanie receptora GerA w zmienionych warunkach jest wciąż możliwe. Najpierw sprawdzono, czy zmiana stężenia podstawowego germinanta (L-alanina) wpływa na wydajność procesu w przypadku przetrwalników szczepów z mutacjami. W tym celu przeprowadzono kiełkowanie przetrwalników w zakresie stężeń 1mM, 5mM, 10mM L-alaniny (Ryc.17) Jako kontroli dla każdego szczepu użyto próbkę przetrwalników aktywowanych termicznie, do których nie został podany żaden germinant.

Wydajność kiełkowania przetrwalników szczepu P324S jest zwiększona w stosunku do przetrwalników szczepu BAG17. Jednakże w tym przypadku nie jest ona zależna od użytego stężenia L-alaniny. W przypadku przetrwalników szczepu P324G ogólna

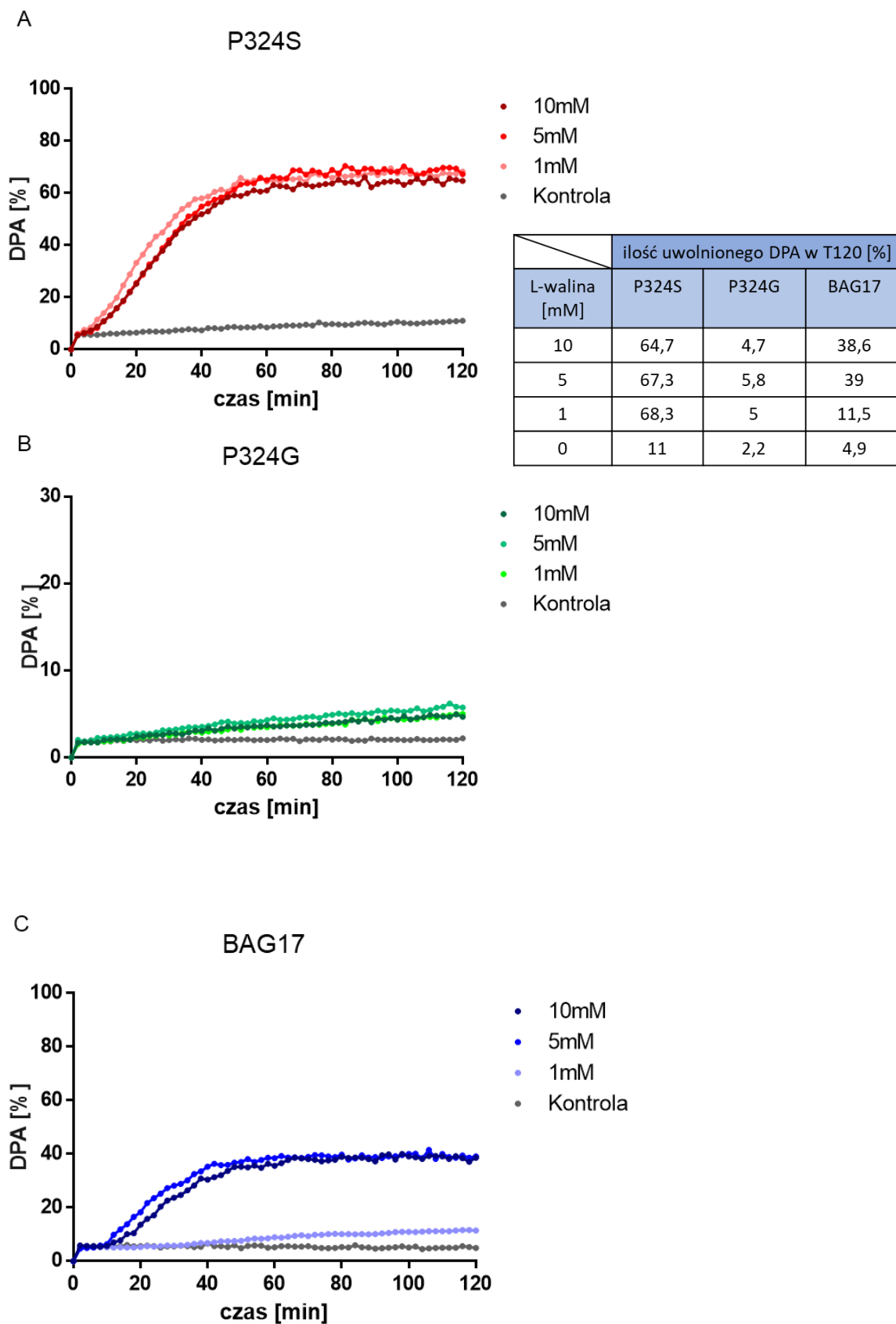
wydajność procesu jest dwukrotnie niższa niż szczepu BAG17. Choć przy stężeniu 10mM L-alaniny przetrwalniki szczepu P324G kielkują najwydajniej, przy niższych stężeniach wydajność nie zależy od stężenia germinantu.



Rycina 17. Uwalnianie DPA kielkujących przetrwalników szczepów P324S (A), P324G (B) i BAG17 (C) w obecności różnego stężenia L-alaniny. W tabeli znajdują się dokładne wartości uwolnionego DPA w punkcie T120.

Receptor GerA, oprócz L-alaniny, rozpoznaje L-walinę jako potencjalny ligand. W kolejnej analizie sprawdzono czy wprowadzone mutacje wpływają na tę cechę receptora. Do doświadczenia użyto zakres stężeń L-waliny taki jak w doświadczeniach z L-alaniną (1mM, 5mM, 10mM). Jako kontrolę dla każdego szczepu użyto próbkę przetrwalników aktywowanych termicznie, do których nie został podany żaden germinant (Ryc.18).

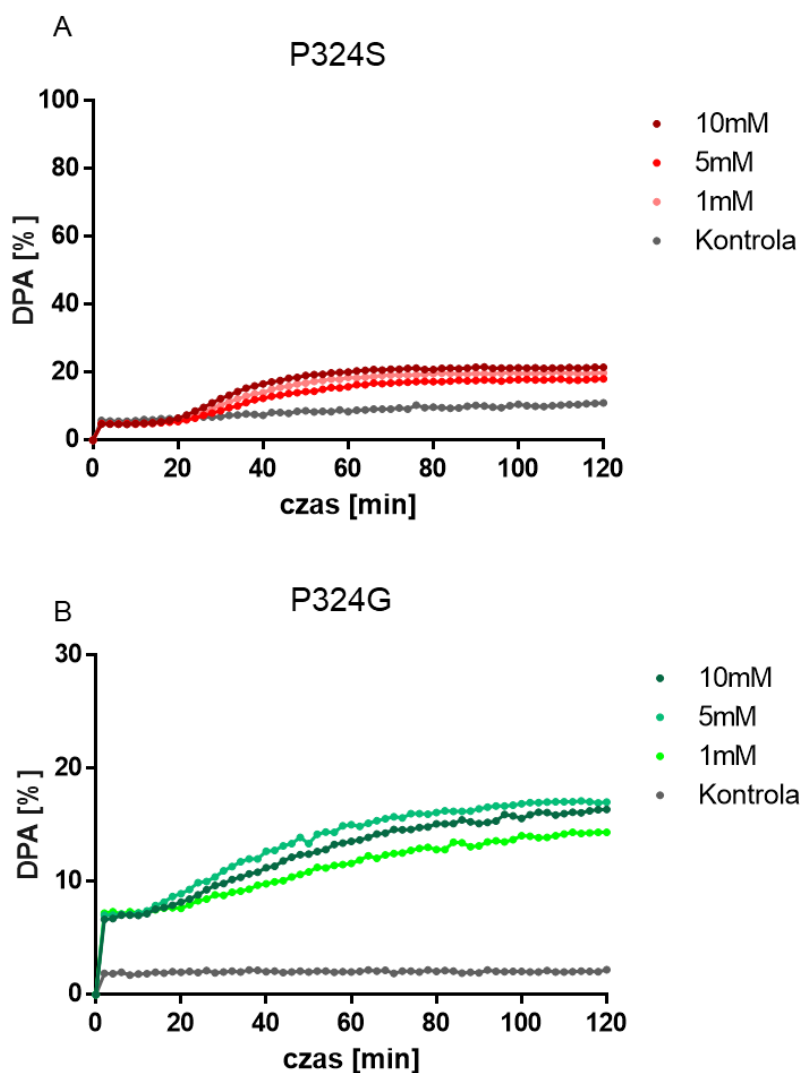
Wyniki tej analizy kiełkowania pokazują, że przetrwalniki zarówno szczepu P324S, jak i szczepu P324G kiełkują w obecności L-waliny. Wydajność procesu kiełkowania dla przetrwalników szczepu P324S jest nieco obniżona w stosunku do kiełkowania indukowanego przez L-alaninę. Przypomina to tendencje obserwowane w przypadku przetrwalników szczepu BAG17. Jednak nadal nie można zaobserwować, aby stężenie germinanta wpływało na wydajność kiełkowania przetrwalników szczepu P324S. Przetwalniki szczepu P324G kiełkują ponad pięciokrotnie słabiej w obecności L-waliny niż w obecności L-alaniny. Ponadto, w tej analizie kinetyka kiełkowania przetrwalników tego szczepu nie przypomina typowej krzywej kiełkowania, tzn. nie widać w niej typowego wyrzutu DPA w początkowej fazie pomiaru.

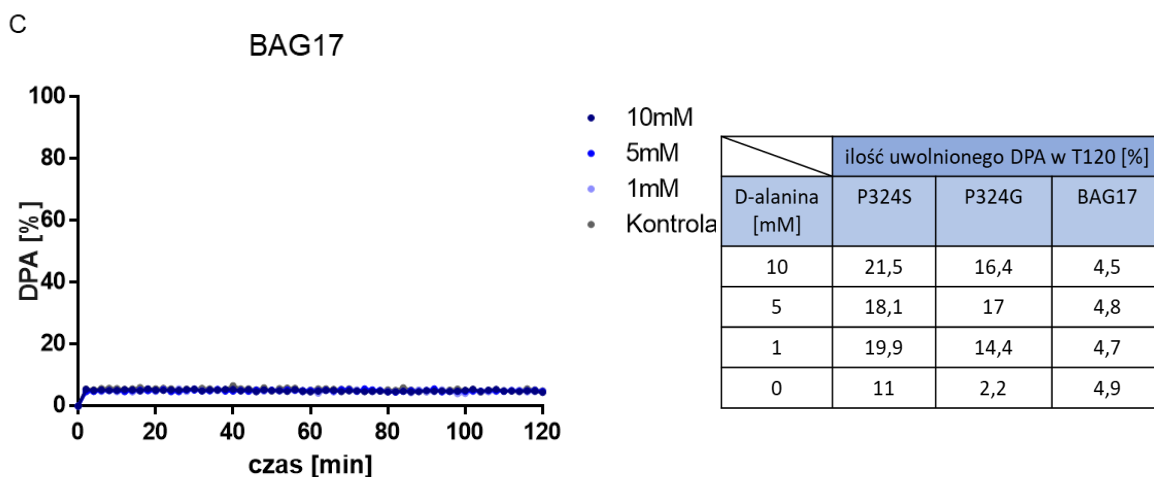


Rycina 18. Uwalnianie DPA kiełkujących przetrwaliników szczepów P324S (A), P324G (B) i BAG17 (C) w obecności różnego stężenia L-waliny. W tabeli znajdują się dokładne wartości uwolnionego DPA w punkcie T120.

Ostatnia analiza kiełkowania przetrwalników szczepów P324S i P324G dotyczyła wpływu inhibitora kiełkowania, D-alaniny. Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach wykorzystano zakres stężeń czynnika (tutaj: D-alanina) 1mM, 5mM i 10mM. Jako kontroli ponownie użyto aktywowanych termicznie przetrwalników, do których nie dodano żadnego czynnika (Ryc.19).

Nieoczekiwanie, zarówno przetrwalniki szczepu P324S, jak i P324G kiełkują w obecności D-alaniny. W przypadku szczepu P324S wydajność kiełkowania w D-alaninie stanowi ponad 1/3 wydajności kiełkowania w L-alaninie. Natomiast w przypadku szczepu P324G wydajność kiełkowania z inhibitorem to już blisko 2/3 wydajności kiełkowania z aktywatorem. Niniejsze wyniki pokazują, że w szczepach z mutacjami P324S i P324G inhibitor, jakim jest D-alanina, może aktywować kiełkowanie z zachowaniem charakterystycznej dla tego procesu kinetyki uwalniania DPA z przetrwalników.



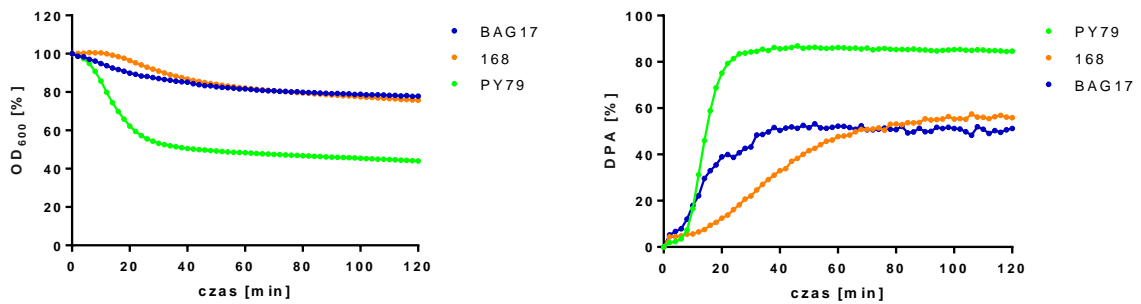


Rycina 19. Uwalnianie DPA kiełkujących przetrwalników szczepów P324S (A), P324G (B) i BAG17 (C) w obecności różnego stężenia D-alaniny. W tabeli znajdują się dokładne wartości uwolnionego DPA w punkcie T120.

3.4 Badanie poziomu ekspresji genów operonu *gerA*

W trakcie badania procesu kiełkowania przetrwalników szczepów z mutacjami w pozycji 324 białka A, często jako wewnętrzną kontrolę dla przebiegu doświadczenia stosowane były przetrwalniki szczepu 168. Porównując wydajność tego procesu u przetrwalników szczepu 168 z przetrwalnikami szczepu BAG17 można było zauważyć pewne różnice. W części eksperymentów wydajność kiełkowania przetrwalników szczepu BAG17 była niższa, jednak kinetyka tego procesu zawsze znacząco się różniła pomiędzy szczepami. Aby zweryfikować czy czynniki genetyczne (tło genetyczne szczepu, układ genów *gerA*) wpływają na proces kiełkowania sprawdzone zostało również kiełkowanie przetrwalników szczepu PY79. Kiełkowanie zostało zmierzone za pomocą spadku gęstości optycznej oraz przez pomiar uwalnianego DPA, w obu przypadkach w obecności 10mM L-alaniny. Miało to na celu sprawdzenie czy receptor GerA, wyjściowo typu dzikiego, ale w różnych warunkach genetycznych, wykazuje różne funkcjonowanie.

Jak pokazują wyniki analiz kiełkowania w warunkach standardowych (Ryc.20), kiełkowanie przetrwalników szczepu PY79 jest zdecydowanie bardziej wydajne w porównaniu z przetrwalnikami szczepów 168 i BAG17. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem tego jest różnica w tle genetycznym tych szczepów. Pytaniem pozostaje, dlaczego przetrwalniki szczepu BAG17 i 168 wykazują różnice w kinetyce tego procesu?



Rycina 20. Kiełkowanie przetrwalników szczepów PY79, 168, BAG17. A) pomiar spadku gęstości optycznej, B) pomiar uwalnianego DPA, kiełkowanie w obecności 10mM L-alaniny.

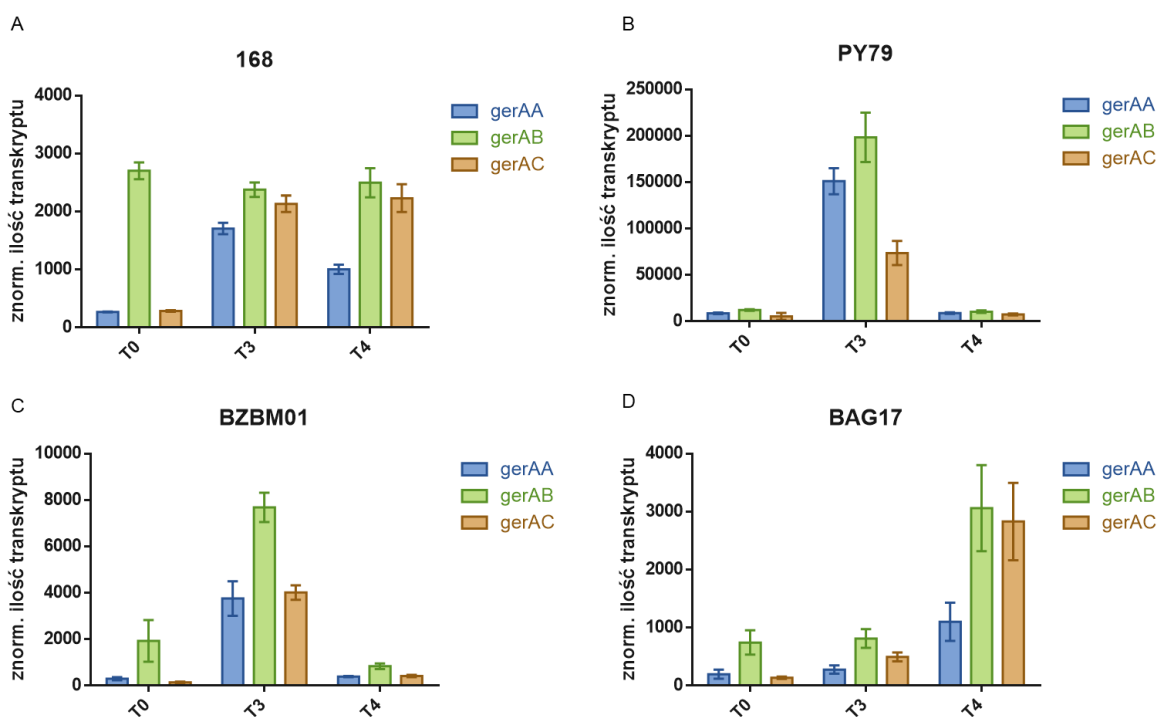
Postawiono zatem hipotezę zakładającą, że przyczyną różnic może być układ genów operonu *gerA*, a co za tym idzie sposób i poziom transkrypcji odpowiednich genów. Dlatego przystąpiono do analizy ekspresji genów w szczepach typu dzikiego (168, PY79) oraz w szczepach użytych w analizie pozycji 324 białka A (BAG17, P324S, P324G) za pomocą reakcji qPCR wykorzystującej specyficzne sondy komplementarne do fragmentów poszczególnych genów w operonie *gerA*. Dodatkową analizę przeprowadzono na szczepie BZBM01, aby zweryfikować czy zaproponowane zmiany w operonie *gerA* wpłynęły na poziom ekspresji tych genów.

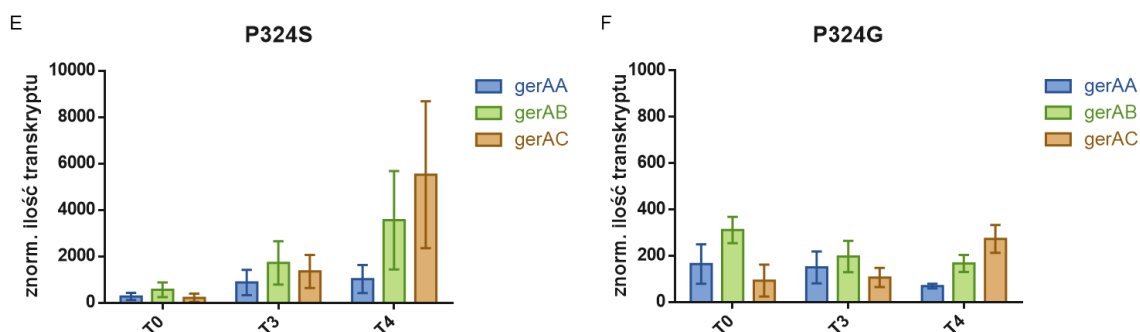
Próbki pobierano (zgodnie z opisem w rozdziale „Metody”) w trzech punktach czasowych: przed rozpoczęciem sporulacji (T0), trzy godziny (T3) i cztery godziny (T4) po rozpoczęciu sporulacji. Miało to odpowiadać przewidywanemu w literaturze momentowi maksymalnego poziomu transkrypcji genów operonu *gerA* (Corfe et al., 1994; Feavers et al., 1990). Izolowane próbki RNA były przepisywane do cDNA przy użyciu mieszaniny heksametrów, o losowych sekwencjach, dostępnej w używanym zestawie (szczegóły procedury opisane są w rozdziale „Metody”).

Optymalizacja reakcji qPCR została przeprowadzona zgodnie z opisem w rozdziale „Metody”. Umożliwiło to ustalenie warunków do przeprowadzenia jednej reakcji PCR z trzema sondami dla genów *gerA* (*gerAA*-Tet, *gerAB*-TexasRed, *gerAC*-Cy5) oraz dla wzorca wewnętrznego, którym był gen *sigA* (*sigA*-FAM). Wydajność reakcji dla poszczególnych sond wynosiła:

- *sigA*-FAM 100,85% współczynnik amplifikacji 2,01
- *GerAA*-Tet 97,42% współczynnik amplifikacji 1,97
- *GerAB*-TexasRed 101,19% współczynnik amplifikacji 2,01
- *GerAC*-Cy5 99,29% współczynnik amplifikacji 1,99

Tak zaprojektowana analiza ekspresji genów operonu *gerA* pokazała, że istnieje duże różnicowanie pod tym względem w badanych szczepach (Ryc.21).





	T0			T3			T4		
	<i>gerAA</i>	<i>gerAB</i>	<i>gerAC</i>	<i>gerAA</i>	<i>gerAB</i>	<i>gerAC</i>	<i>gerAA</i>	<i>gerAB</i>	<i>gerAC</i>
168	271,58	2704,09	288,93	1709,3	2378,72	2136,41	1004,43	2498,64	2232,09
BZBM01	304,34	1933,52	149,68	3759,78	7688,55	4016,96	393,79	842,09	420,64
BAG17	199,22	746,46	138,95	279,69	813,7	498,02	1103,07	3060,04	2832,27
P324S	272,27	562,81	216,13	879,04	1721,91	1351,43	1021,86	3558,86	5521,91
P324G	164,72	311,19	93,04	150,24	197	106,6	69,54	166,92	272,74
PY79	8881,99	12404,55	5429,03	151158,5	198469,3	73741,42	9110,87	10581,64	7587,03

Rycina 21. Ekspresja genów operonu *gerA* w szczepach (A)168, (B) PY79, (C) BZBM01, (D) BAG17, (E) P324S i (F) P324G, znormalizowana względem ekspresji genu *sigA*. W tabeli zebrane są dokładne wartości poziomu ekspresji poszczególnych genów wyrażone jako ilości oszacowane transkryptów.

Zdecydowanie najwyższy poziom ekspresji wszystkich genów operonu *gerA* (bez względu na punkt czasowy) zaobserwowano w szczepie PY79 (Ryc.21B). Porównując ekspresję tylko genu *gerAA* między szczepem PY79 i 168 w punkcie T0, czyli jeszcze przed rozpoczęciem sporulacji, różnica jest ponad trzydziestokrotna na korzyść szczepu PY79. Pozostałe geny z operonu w szczepie PY79 również wykazują wyższą ekspresję w punkcie T0 niż w szczepie 168. Biorąc pod uwagę geny operonu *gerA* w wariantach typu dzikiego, poziom ekspresji genów operonu *gerA* w szczepie BAG17 jest najniższy w porównaniu do szczepów PY79 i 168. Próbkę pobraną w punkcie T3, według danych literaturowych, powinny wskazywać wzrost ekspresji genów *gerA*, co wskazuje na rozpoczęty proces sporulacji (Sonenshein A.L., 2000; Piggot & Hilbert, 2004). W przypadku szczepu 168 wzrost ekspresji genów operonu *gerA* obserwowany jest od punktu T3 aż do punktu T4, na porównywalnym poziomie. W przypadku szczepu PY79, gwałtowny kilkunastokrotny wzrost ekspresji genów operonu *gerA* następuje w punkcie T3. W punkcie T4 ekspresja genów operonu *gerA* powraca do poziomu z punktu T0. Z kolei w szczepie BAG17 zmiany ekspresji genów operonu *gerA* wyglądają zupełnie inaczej. W punkcie T3 następuje nieznaczny wzrost ekspresji wszystkich trzech genów operonu. Dopiero w

punkcie T4 obserwowany jest wzrost ekspresji, porównywalny z ekspresją genów operonu *gerA* w szczepie 168. Jak widać z powyższej analizy, geny operonu *gerA* w różnym tle genetycznym i w różnej lokalizacji na chromosomie wykazały się bardzo zróżnicowanym poziomem i czasem ekspresji, co może być bezpośrednio obserwowane jako różnice w poziomie wydajności kiełkowania przetrwalników za pośrednictwem receptora GerA.

Szczep BZBM01 również zawiera geny operonu *gerA* w wariacie typu dzikiego. Jednak cały operon jest rozbudowany o sekwencje kodujące odpowiednie znaczniki białkowe. Na poziomie funkcjonalnym, przetrwalniki produkowane przez ten szczep nie kiełkują za pośrednictwem receptora GerA. Analizując dane z ekspresji genów operonu *gerA* w szczepie BZBM01 można zauważyć, że początkowy poziom ekspresji tych genów jest porównywalny z ekspresją w szczepie 168. Oba szczepy dzielą to samo tło genetyczne. Jednak gwałtowny wzrost ekspresji następuje tylko w punkcie T3 i około dwukrotnie przewyższa ekspresję tych genów w szczepie 168. W punkcie T4 ekspresja genów operonu *gerA* w szczepie BZBM01 powraca do poziomu z punktu T0. Ponieważ widać różnice w poziomie i czasie, w jakim następuje ekspresja genów operonu *gerA* w obu szczepach, nie można wykluczyć, że już te różnice wpływają na utworzenie funkcjonalnego receptora GerA.

W analizie ekspresji genów operonu *gerA* sprawdzono również szczepy P324S i P324G. Jak się okazało, szczep z podstawieniem glicynowym wykazywał najniższy poziom ekspresji spośród wszystkich zbadanych szczepów. Ekspresja genów *gerA* w szczepie P324S utrzymywał się na poziomie porównywalnym do ekspresji w szczepie BAG17. Co ciekawe, w szczepie P324S również obserwowany był powolny wzrost ekspresji tych genów w punkcie T3, który gwałtownie zwiększał się dopiero w punkcie T4 – jak miało to miejsce w szczepie BAG17. W przypadku szczepu P324G ekspresja wszystkich genów operonu *gerA* wydaje się utrzymywać na porównywalnym poziomie w trakcie całego eksperymentu. Wyniki te mogą sugerować, że wprowadzone mutacje również wpływają na sposób ekspresji genów w operonie *gerA*.

Jak można zauważyć w powyższej analizie ekspresji genów operonu *gerA*, prawie zawsze najwyższym poziomem ekspresji charakteryzował się gen *gerAB*, niezależnie od badanego szczepu czy punktu czasowego analizy. Wynik ten jest o tyle nieoczekiwany, ponieważ dotychczasowa literatura na temat receptora GerA zakłada równocenną ekspresję genów operonu, a co za tym idzie podobną ilość powstałych białek. Zaprojektowane sondy są

specyficzne względem badanych genów, więc nie można tu raczej mówić o artefakcie, powstałym z dużej ilości podobnych genów. Należy jednak pamiętać, że RNA użyty do niniejszej analizy, został przepisany przy użyciu gotowej mieszaniny starterów, które nie były projektowane z uwzględnieniem badanych genów, co może wpływać na niespecyficzną uzyskanego cDNA. Dodatkowe analizy ekspresji, przeprowadzone na cDNA uzyskanym z przepisania ze starterami specyficznymi dla danego genu z operonu *gerA*, nie dostarczyły danych pozwalających na jednoznaczne wyjaśnienie różnic w poziomie transkryptów badanych genów. Późniejsza analiza danych zdeponowanych w bazie SubtiWiki natomiast pokazała, że w *locus gerA* od strony genów *gerAC* i *gerAB* biegnie dodatkowy transkrypt skierowany przeciwnie do operonu *gerA*. Jednak w tej analizie ekspresji nie można ich rozróżnić. Ponieważ transkrypt ten (o nazwie S1275) jest wciąż niescharakteryzowany, nie można wykluczyć, że jest on powiązany z transkrypcją genów operonu *gerA*.

4. Dyskusja

Badania przedstawione w niniejszej pracy dotyczą dwóch aspektów biologii receptora GerA przetrwalników *Bacillus subtilis*.

Pierwszy z nich obejmuje analizę mutacji pozycji P324 w białku A receptora i jej wpływu na działanie receptora w inicjacji kiełkowania przetrwalników. Pozycja P324 znajduje się w konserwowanym motywie VPFP, który stanowi fragment pętli pomiędzy helisami transbłonowymi. Uzyskane w tej pracy mutacje (P324S, P324G, P324A i P324F) spowodowały zmiany w działaniu receptora GerA. Przede wszystkim, można było to obserwować jako zwiększoną wrażliwość przetrwalników na niskie stężenie L-alaniny (0,01mM). Choć wydajność kiełkowania przetrwalników poszczególnych szczepów przy niskim stężeniu germinantu różniła się niezależnie od charakteru podstawionej reszty aminokwasowej, wspólną cechą wszystkich analizowanych szczepów była heterogenność populacji uzyskanych przetrwalników. Innymi słowy, przetrwalniki uzyskane ze szczepów P324S, P324A, P324G i P324F były mieszaniną przetrwalników w fazie jasnej, ciemnej i pośredniej (w różnych proporcjach, zależnie od mutacji). Obserwowane przetrwalniki w fazie ciemnej świadczą o częściowym uwodnieniu rdzenia przetrwalnika, co sugeruje rozpoczęcie procesu kiełkowania, jeszcze przed pojawieniem się germinantu. Co więcej, przetrwalniki szczepów P324S i P324G kiełkowały w obecności inhibitora, D-alaniny. Analizy kiełkowania przeprowadzone na przetrwalnikach szczepów P324S i P324G pokazały, że receptor nie tylko nie odróżnia germinantu od inhibitora, ale również zanikł efekt regulacji wydajności kiełkowania przetrwalników przez zmianę stężenia germinantów (L-alanina, L-walina). Wyniki te mogą sugerować, że mutacja w pozycji P324 białka A spowodowała zmianę konformacji białka na stale aktywną. Taka forma białka A może być sygnałem dla pozostałych elementów receptora GerA do zmian konformacyjnych, które mogą zainicjować kiełkowanie. Przetrwalniki w fazie ciemnej powstałe ze szczepów z mutacjami w pozycji P324 białka A mogą być, nie tyle efektem zmian w obrębie hipotetycznej kieszeni wiążącej ligand i przedwczesnego wylapywania śladowych ilości germinantów w środowisku przetrwalnika, a otwarciem kanału, który może dostarczać wodę do wnętrza przetrwalnika. Taka zmiana konformacyjna całego kompleksu receptora GerA, po wykryciu wysycającej ilości germinantu, może stanowić kluczowy sygnał do aktywacji kanału SpoVA do uwolnienia DPA z rdzenia przetrwalnika,

otwarcia kanału do doprowadzenia wody oraz do aktywacji enzymów hydrolizujących peptydoglikan kory przetrwalnika.

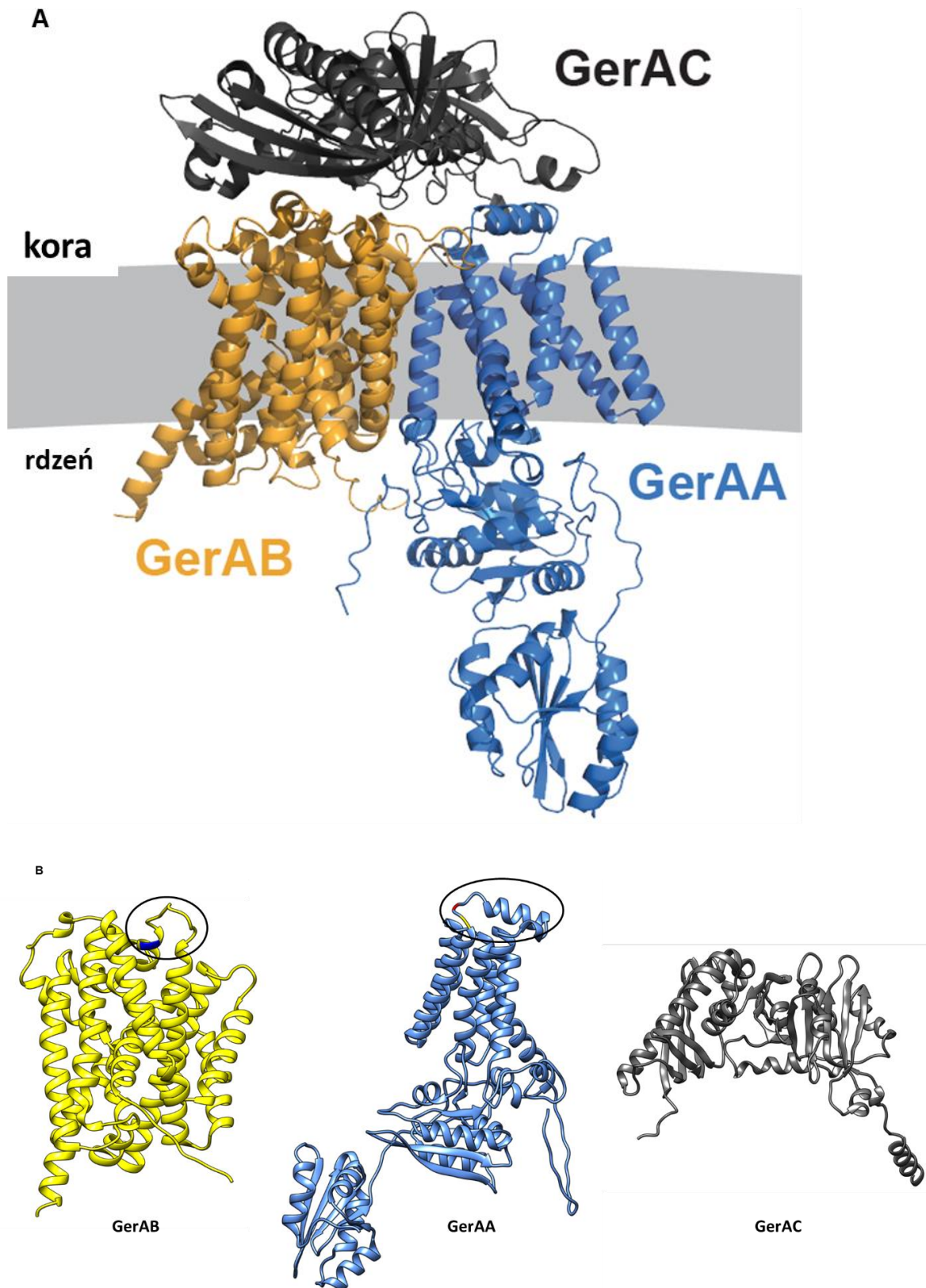
Najnowsze wyniki innych zespołów dostarczają informacji, które znacząco zmieniają perspektywę w dotychczasowych badaniach nad receptorem GerA. Jak zostało wspomniane we wcześniejszych sekcjach niniejszej rozprawy, dane strukturalne na temat poszczególnych białek kodowanych przez operon *gerA* są bardzo ograniczone. Do niedawna dysponowaliśmy tylko kryształem białka GerBC bez fragmentu błonowego (Li Y. et al., 2010) oraz pozabłonowym fragmentem białka GerKA (Li Y. et al., 2019). Jednak wciąż brakowało kompletnych i wiarygodnych modeli dla wszystkich białek kodowanych przez operon *gerA*. Opublikowany model *in silico* białka B receptora GerA (Blinker et al., 2021) dostarczył zupełnie nowych przesłanek do postrzegania receptora jako kompleksu białek. Wzorując się na bakteryjnych transporterach GkApcT i LeuT, stworzono kompletny model białka GerAB, w którym zlokalizowano potencjalną kieszeń wiążącą ligand oraz kanał, którym może być transportowana woda. Dalsze badania białka B receptora GerA pokazały, że wprowadzenie mutacji w obrębie wytypowanej kieszeni wiążącej ligand istotnie zaburza lub uniemożliwia inicjację kiełkowania przetrwalników (Artzi et al., 2021). Co więcej, wprowadzanie większych reszt aminokwasowych w hipotetycznej kieszeni wiążącej ligand powodowało, że powstałe przetrwalniki przybierały od razu fazę ciemną, co zinterpretowano jako przedwczesne rozpoczęcie kiełkowania. Jako, że struktury białek, będących szablonem do modelowania białka B również posiadają taką kieszeń do rozpoznania ligandów, można uznać, że białko B z receptora GerA to nadrzędny sensor ligandu (L-alanina), który być może również bierze udział w transporcie wody przez błonę.

Pozycje z konserwowanego fragmentu VPFP w białku A również pozostają w zasięgu zainteresowań badaczy. Analizując hipotezę o tym, że to właśnie białko B jako pierwsze rozpoznaje ligand, pozostawało pytanie, skąd wziął się efekt fenotypowy mutacji w pozycji P326S, czyli zwiększona wrażliwość na niższe stężenie germinantu (podobnie jak w przypadku analizowanej w tej rozprawie mutacji w pozycji P324). Analiza odpowiednich szczepów z „nadaktywnymi” allelami *gerAA* pokazała, że przedstawiona mutacja w jednym genie operonu skutkowałą kolejnymi mutacjami w innych genach operonu *gerA*, często o charakterze kompensującym (Amon et al., 2021). Mutacje te pojawiały się zarówno w obrębie białka B, jak i C, co może sugerować, że rzeczywiście współdziałanie i wzajemne oddziaływanie wszystkich trzech jest istotne dla funkcji całego

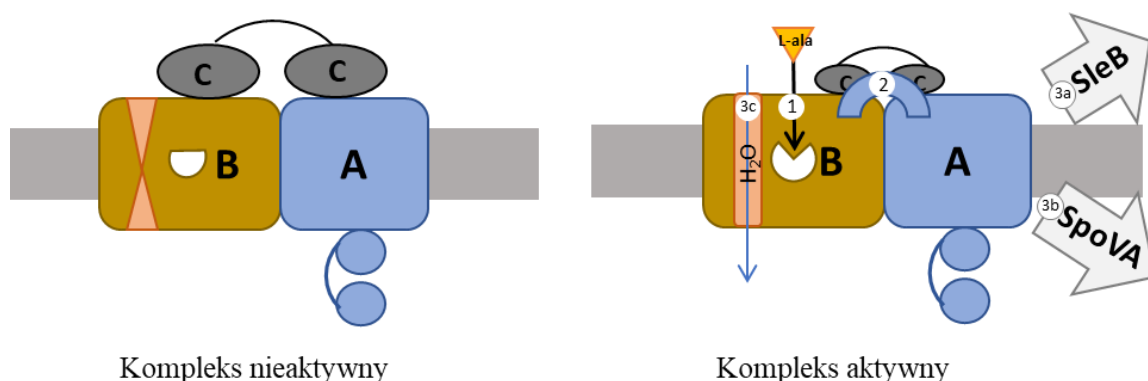
kompleksu, czyli receptora GerA. Dane te sugerują również, że białko A może pełnić funkcję pośredniczącą pomiędzy białkiem B – pierwotnym receptorem dla aminokwasów, a kolejnymi etapami w inicjacji kiełkowania. Co więcej, pozycja P326 znajduje się u podstawy pętli wchodzącej w bliski kontakt z pętlą białka B. Wprowadzenie mutacji w pozycji P326 białka A skutkowało mutacją w oddziałującej pętli białka B, co może sugerować obszar oddziaływań pomiędzy białkami.

Biorąc pod uwagę te dane, można stwierdzić, że nie tylko mutacja P326S, ale też mutacje P324S i P324G przyczyniają się do utworzenia „nadaktywnej” wersji kompleksu GerA. Aby to potwierdzić, należałoby przeprowadzić sekwencjonowanie pozostałych genów operonu *gerA*, pod kątem występowania mutacji, które albo dają efekt kompensujący albo promujący nadaktywny fenotyp. Poza tym, analiza proteomiczna przetrwalników z proponowaną mutacją białka A mogłaby dostarczyć danych na temat tego, czy mutacja w obrębie kompleksu GerA ma wpływ na inne białka, które wchodzi z nim w bezpośrednią interakcję. To z kolei, być może, pozwoliłoby na odpowiedzenie na pytanie, w którym kierunku białko A przesyła sygnał o inicjacji kiełkowania.

Dzięki bardzo szybkiemu rozwojowi modelowania białek przy użyciu sztucznej inteligencji (Tunyasuvunakool et al., 2021) stosunkowo niedawno można było uzyskać hipotetyczny model ułożenia białek kompleksu GerA (Amon et al., 2021). Według tego modelu receptor GerA, jak jest zwyczajowo nazywany, to kompleks trzech osobnych białek – A, B i C. Białka A i B stanowią transbłonowy rdzeń tego kompleksu. Część pozabłonowa białka A znajduje się po stronie rdzenia przetrwalnika. Natomiast białko C usytuowane jest po stronie kory. Związanie wysycającej ilości ligandu w obrębie białka B może indukować zmiany konformacyjne zarówno w białku B, jak i sąsiadującym białku A. Z kolei zmiana konformacji białka A może być sygnałem albo do aktywacji enzymów hydrolizujących korę przetrwalnika albo do otwarcia kanału SpoVA. Równocześnie może zachodzić stopniowe otwieranie kanału wodnego w białku B. W przypadku białka C, jego rola w kompleksie GerA może obejmować stabilizację całego kompleksu albo również koordynowanie samego procesu kierowania L-alaniny do kieszeni wiążącej w białku B (Ryc.22).



Rycina 22. Struktura kompleksu GerA. A) Schemat kompleksu receptora GerA. Kolorem szarym zaznaczona jest wewnętrzna błona przetrwalnika. (Amon et al., 2021) B) Struktury poszczególnych białek kompleksu GerA zdeponowane w AlphaFold Protein Structure Database. Okręgami zaznaczone są fragmenty białek GerAB i GerAA, które potencjalnie oddziałują ze sobą. W białku GerAA pętla obejmuje pozycje P324 (czerwony) i P326 (żółty).



Rycina 23. Schematyczne przedstawienie działania kompleksu białek GerA w inicjacji kiełkowania. Po lewej: kompleks bez związanego ligandu. Po prawej: kompleks w obecności ligandu (L-ala). Cyframi zaznaczona jest prawdopodobna sekwencja zdarzeń: 1) wiązanie ligandu do kieszeni wiążącej, która zmienia kształt; 2) zmiana konformacji białka A; w następnej kolejności zmiany mogą zachodzić niemal równocześnie – 3a) aktywacja enzymów hydrolizujących korę, 3b) aktywacja kanału do uwalniania DPA, 3c) otwarcie kanału wodnego w celu uwodnienia rdzenia przetrwalnika. Zmiany w obrębie białka C nie były brane tu pod uwagę, ze względu na brak danych funkcjonalnych.

Mając na uwadze opisany wyżej model działania kompleksu GerA, wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy nabierają większego znaczenia. Mutacja w pozycji P324 białka A najprawdopodobniej powoduje kompensujące mutacje, co najmniej w obrębie białka B. Skutkiem może być brak rozróżniania ligandów i inhibitora przez pierwotny sensor – białko B oraz brak modulacji działania receptora przez stężenie ligandu. Wprowadzona mutacja białka A prawdopodobnie powoduje wystarczającą zmianę konformacyjną, która może być sygnałem do aktywacji kolejnych etapów inicjacji kiełkowania – uwalnianie DPA oraz aktywacja enzymów hydrolitycznych. Zanim ligand dotrze do miejsca wiązania w białku B, „nadaktywny” wariant białka A przynajmniej częściowo aktywuje kanały SpoVA do usuwania DPA, co może tłumaczyć mniejszą ilość uwalnianego DPA w analizach kiełkowania w niektórych przypadkach badanych mutacji. Niewykluczone, że usuwanie DPA z rdzenia wywołane transdukcją sygnału przez białko A kompleksu GerA powoduje otwarcie kanału dla wody w białku B. Ponieważ mutacja w pozycji P324 sprawia, że część typowych wydarzeń z inicjacji kiełkowania dzieje się jeszcze przed właściwym związaniem ligandu z receptorem, częściowe otwarcie kanału wodnego w białku B od początku złożenia kompleksu w błonie może mieć miejsce. To z kolei może tłumaczyć heterogenną populację przetrwalników z mutacjami w pozycji P324 w białku A, które wykazują częściowe uwodnienie rdzenia, jeszcze przed właściwą inicjacją kiełkowania w analizach.

Skoro mutacje punktowe w obrębie pojedynczych genów operonu *gerA* indukują mutacje w innych genach operonu, kwestia szczepu BZBM01 posiadającego znaczniki białkowe do immunodetekcji poszczególnych białek kodowanych w tym operonie może zostać lepiej zrozumiana. Do utworzenia działającego kompleksu GerA, wszystkie trzy białka kodowane przez operon muszą pozostawiać w kontakcie. Ponieważ dokładne powierzchnie interakcji jak również ich charakter nie są jeszcze znane, niewykluczone, że modyfikacje zaproponowane w szczepie BZBM01 zaburzają możliwość oddziaływania tych trzech białek, a tym samym skuteczną transdukcję sygnału po rozpoczęciu kiełkowania.

Kolejnym aspektem poruszonym w tej pracy był związek między ekspresją genów operonu *gerA* a działaniem receptora. Informacje na temat transkrypcji operonu *gerA* i jego translacji są jeszcze bardziej ograniczone niż dane strukturalne na temat białek tworzących kompleks receptora. Operon *gerA* obejmuje sekwencje genów *gerAA*, *gerAB* i *gerAC*. Do tej pory rozpoznany został jeden promotor na początku operonu. Na temat terminatorów transkrypcji brak konkretnych danych w literaturze. Zgodnie z podstawowym znaczeniem pojęcia „operon”, jest to sekwencja genów, położonych blisko siebie i podlegających wspólnej regulacji, zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji (Jacob & Monod, 1961). Takie postrzeganie genów zorganizowanych w operonie sugeruje, że w wyniku ich transkrypcji powstaje pojedyncza cząsteczka policistronowego mRNA, z której, w procesie translacji, powstają stechiometryczne ilości białek. Wyniki analizy ekspresji genów operonu *gerA* przedstawione w niniejszej rozprawie pokazują, że poziom transkrypty dla poszczególnych genów operonu różni się. O ile zróżnicowany poziom ekspresji genów w szczepach BAG17, P324S i P324G może być wytłumaczony faktem rozbicia natywnego operonu na dwa różne *loci*, różnice pomiędzy ekspresją genów operonu w szczepach, które posiadają go w oryginalnym *locus*, jest sprzeczny z oczekiwaniami.

Dotychczasowe badania na temat ilości białek receptora GerA mówią, że są to białka nieliczne w proteomie przetrwalnika (Stewart & Setlow, 2013). Ilości białek A i C zostały określone na podobnym poziomie. Ze względu na problemy w identyfikacji białka B, określenie stechiometrii całego kompleksu było utrudnione. Stąd często przyjmowane w badaniach założenie, że stosunek białek w kompleksie GerA to 1:1:1. Analizując przedstawione tu wyniki ekspresji genów, ciężko jest odnaleźć podstawę do takiego założenia. Pochylając się nad zagadnieniem transkrypcji genów operonu i powiązaniu tego procesu z powstaniem białek, należy pamiętać, że bakterie wykształciły szereg

mechanizmów, dzięki którym proces syntezy takich białek zachodzi w sposób efektywny i bez strat energetycznych dla komórki.

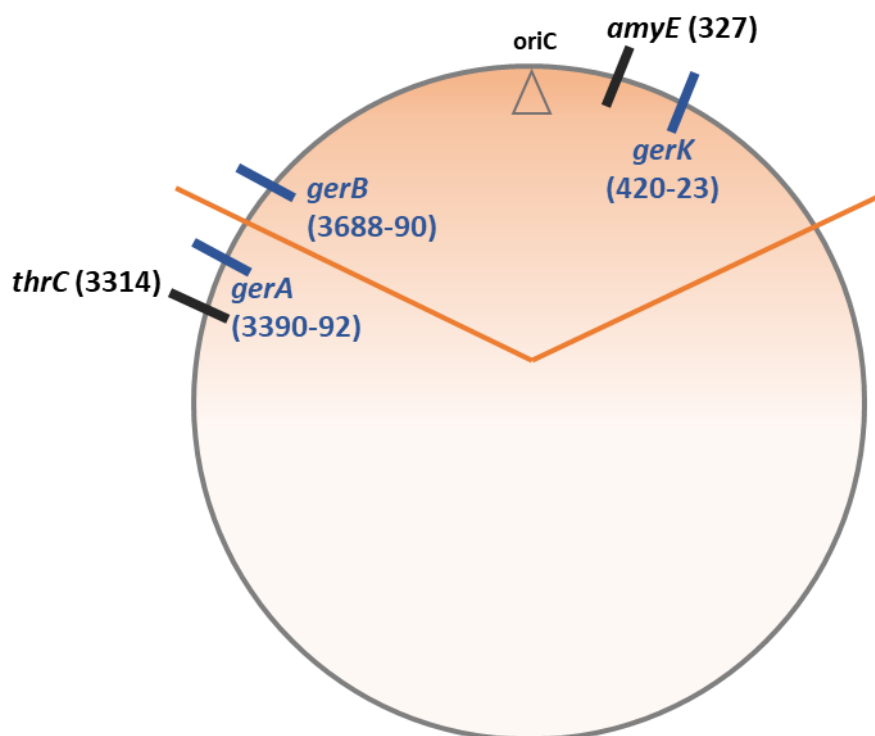
Operon to sekwencja genów, które kodują białka powiązane ze sobą funkcjonalnie. Może to dotyczyć albo uczestniczenia w tym samym szlaku metabolicznym (De Daruvar et al., 2002; Rogozin et al., 2002) albo współtworzenia kompleksów białkowych, np. receptor kiełkowania GerA u *B. subtilis*. Składanie kompleksów białkowych wiąże się z sekwencyjnym fałdowaniem się poszczególnych elementów kompleksu lub nawet współzależności fałdowania się jednego polipeptydu od drugiego (Han et al., 2007; Inanami et al., 2014; Liu et al., 2019; Liutkute et al., 2020). Jednoczesna translacja wszystkich białek z policistronowego mRNA mogłaby wprowadzić duże obciążenie dla maszyneryi molekularnej komórki (lub formującej się spory w przypadku operonu *gerA*). Dlatego już na poziomie transkrypcji obserwowane są różne mechanizmy regulujące powstawanie mRNA. Założenie, że w przypadku operonu *gerA* mamy do czynienia z pojedynczym, policistronowym mRNA, na razie nie ma potwierdzenia w badaniach. Przedstawione tutaj wyniki analizy ekspresji pokazują, że ilość transkrypu dla poszczególnych genów operonu jest różna, a to z kolei może sugerować, że transkrypcja dla tego operonu nie jest równocenna dla wszystkich trzech genów. Zróżnicowanie poziomu transkryptu poszczególnych genów w operonie może zajść dzięki występowaniu wewnętrznych promotorów lub innych sekwencji inicjujących transkrypcję niezależnie od pierwszego promotora (Huang P. et al., 2007; Kobayashi H. et al., 2007; Wang Y. et al., 2021). W przypadku operonu *gerA* należy również pamiętać, że geny nachodzą na siebie. Choć nakładanie się genów w operonach, w ujęciu ewolucyjnym, uważane jest za naturalną plastyczność genomu, która niekoniecznie musiała być zawsze obecna (Huvet & Stumpf, 2014), jeśli występuje, może pełnić funkcję regulatorową, np. poprzez modulowanie procesu transkrypcji w kierunku powstania transkryptów o różnej długości, zależnie od zapotrzebowania na dane białko. Aby zweryfikować tę hipotezę, należałoby przeanalizować sekwencję operonu *gerA* pod kątem konsensusowych sekwencji regulatorowych, ze szczególnym uwzględnieniem fragmentów nakładających się genów.

Kolejnym aspektem, który może mieć istotne znaczenie dla regulacji transkrypcji operonu *gerA* jest jego genetyczne otoczenie, zarówno na nici kodującej, jak i komplementarnej. Zgodnie z oznaczeniem w bazie danych SubtiWiki, na nici komplementarnej do tej kodującej geny operonu *gerA*, znajduje się transkrypt S1275. Jest to niescharakteryzowany, długi (2,6kbp) fragment poprzedzającego go białka LiaR, nie

poddany translacji (3' UTR). Sam transkrypt S1275 jest skierowany w przeciwną stronę do operonu *gerA* i swoją długością obejmuje *gerAC*, *gerAB* i koniec *gerAA*. Choć nie dysponujemy żadnymi danymi na temat potencjalnego białka kodowanego przez S1275, to właśnie RNA może tutaj odgrywać kluczową rolę. Sposobem na modulację procesu transkrypcji u bakterii są również cząsteczki RNA, które mogą występować jako fragment gotowego już mRNA (np. riboswitch), mogą aktywnie kontrolować proces zachodzący w innym miejscu na chromosomie lub nakładają się z danymi genami, ponieważ są kodowane na nici komplementarnej (asRNA, ang. *cis-encoded antisense RNA*) (Sesto et al., 2013). Działanie asRNA skutkuje kontrolą transkrypcji genu komplementarnego, kontrolą stabilności mRNA lub kontrolą rozpoczęcia translacji. Działanie regulatorowe cząsteczek RNA może obejmować zarówno pojedyncze geny, jak i całe operony lub nawet sąsiadujące ze sobą fragmenty operonów. Z tego względu otoczenie genetyczne operonu *gerA* może istotnie wpływać na proces transkrypcji tych genów. Zarówno sekwencje na nici kodującej flankujące operon, jak i cały fragment komplementarny na nici antysensownej powinny być dokładnie przeanalizowane pod kątem możliwych cząsteczek RNA, które mogłyby, np. jako fizyczna przeszkoda, kontrolować proces transkrypcji trzech genów operonu *gerA*.

Transkrypcja genów operonu występującego w jednym *locus* na chromosomie niewątpliwie podlega kontroli w wielu wymienionych powyżej aspektach. W przypadku szczepów użytych w tej rozprawie (BAG17, P324S, P324G) operon *gerA* został rozdzielony do dwóch oddzielnych *loci* (*amyE::gerAA*, *thrC::gerABAC*). W trakcie formowania się przetrwalnika, po utworzeniu asymetrycznej przegrody podziałowej, około 1/3 chromosomu (od strony *oriC*) zostaje upakowana w presporze (Chary et al., 2006). W obszarze tym znajduje się m.in. *locus amyE* (Ryc.24). W trakcie sporulacji ma miejsce aktywacja transkrypcji zależnie od przedziału komórkowego. Wówczas ten obszar chromosomu, który zostaje już upakowany w presporze, zostaje poddawany ekspresji. W sytuacji, gdy geny operonu występują w jednym *locus*, czas przeznaczony na ich ekspresję jest taki sam, ponieważ rozpoczyna się w tym samym momencie (przeniesienie do prespory). Daje to szansę na uzyskanie optymalnych ilości białek do stworzenia funkcjonalnych kompleksów. W przypadku, gdy geny operonu rozdzielone są na dwa *loci*, które w różnym czasie trafiają do prespory, ich transkrypcja nie jest uruchamiana w tym samym momencie. Nieskoordynowanie transkrypcji genów operonu może doprowadzić do nierównej syntezy mRNA poszczególnych genów. W przypadku szczepów użytych w tej

pracy, do prespory najpierw trafia gen *gerAA* z *locus amyE*, a dopiero później geny *gerAB* i *gerAC* z *locus thrC*. Może to skutkować większą syntezą GerAA (ze względu na dłuższą obecność w presporze) niż GerAB i GerAC, których geny później zostają poddane transkrypcji. W tej sytuacji nadmiar białka A w stosunku do białek B i C może prowadzić albo do utworzenia mniejszej ilości funkcjonalnych kompleksów GerA albo całkowicie zaburzyć ich formowanie, co z kolei powinno być obserwowane jako zmiany w poziomie kiełkowania przetrwalników. Jednak, żeby jednoznacznie móc ocenić taką hipotezę potrzebna jest wydajna metoda detekcji i ilościowego opisanie białek kompleksu GerA.



Rycina 24. Schematyczne przedstawienie genomu *B. subtilis*. Linia koloru pomarańczowego została oddzielona ta część chromosomu, która zostaje w pierwszej kolejności upakowana do formującej się prespory i aktywowana w transkrypcji. Kolorem niebieskim zaznaczono pozycje operonów receptorów kiełkowania (*gerA*, *gerB*, *gerK*). Kolorem czarnym zaznaczono loci *thrC* i *amyE*. W nawiasach podano pozycje poszczególnych genów na chromosomie. Opracowanie własne na podstawie (Kunst et al., 1997).

Sama ilość powstałego mRNA po transkrypcji nie gwarantuje, że równoważna ilość białek powstaje w procesie translacji. Bakterie wykształciły proces programowego rozkładu mRNA (Dar & Sorek, 2018). Proces ten może służyć powstaniu niestechiometrycznej ilości transkryptów z jednego operonu, np. jeśli w kompleksie potrzebny jest nadmiar jednego z białek. Wówczas, określone fragmenty mRNA są chronione przed zniszczeniem, więc pozostaje tylko taka ilość, która ulegnie translacji. Badanie nad genetyką operonów i białek w nich kodowanych pokazują, że kluczowym etapem kontroli ekspresji genów

zorganizowanych w operonach jest etap translacji (Quax et al., 2013). Ten aspekt badań nad białkami kompleksu GerA do tej pory nie został poruszony. Odpowiedź na pytanie czy w tym wypadku zachodzi tzw. sprzężenie translacyjne (ang. *translational coupling*), czyli rybosom przyłącza się raz do mRNA i kolejno odczytuje kolejne cistrony, czy też występują na transkrypcie wewnętrzne sekwencje translacyjne lub odpowiednie sekwencje Shine-Dalgarno/anty-Shine-Dalgarno (Li G.W. et al., 2012), które mogą regulować wydajność translacji i modulować cały proces, mogłaby dostarczyć cennych informacji dla dalszych badań strukturalnych, np. przy opracowywaniu sposobów nadprodukcji tych białek poza natywnym środowiskiem.

Biorąc pod uwagę możliwe okoliczności syntezy białek kompleksu GerA, można przypuszczać, że zarówno transkrypcja genów operonu, jak i translacja muszą zachodzić szybko i wydajnie, bez wielu etapów pośrednich. Ponieważ są to białka nieliczne w proteomie, tworzące razem kompleks, translacja i jego składanie powinno odbywać się jak najbliżej wewnętrznej błony przetrwalnika. Być może optymalna ilość transkryptu, zabezpieczona przed degradacją, trafia już do właściwego miejsca składania kompleksu. Obecność błony i kotranslacja kolejnych polipeptydów może pomagać w ich fałdowaniu i przybieraniu odpowiednich konformacji do złożenia kompleksu GerA – białka B jako receptora ligandu z zamkniętym kanałem wodnym, sąsiadującym białkiem A w formie nieaktywnej i białka C, które być może częściowo zamyka i stabilizuje kompleks od strony kory.

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki dostarczają kolejnych danych pogłębiających wiedzę na temat działania całego kompleksu GerA. Wyniki mutagenезy pozycji P324 w białku A wpisują się w opublikowane dane innych zespołów, pokazując, że pętla z tą pozycją jest istotna dla funkcjonowania całego kompleksu. Dalsze badania nad wspomnianym fragmentem białka A mogą przyczynić się do poznania istoty interakcji białek A i B. Wyniki analiz ekspresji genów operonu *gerA* pokazują, że poziom transkrypcji i translacji tych genów to złożony układ badawczy. Przedstawiona tutaj analiza nie była w stanie rozróżnić transkryptów z nici kodującej i komplementarnej, przez co można było obserwować prawdopodobne zawyżenie sygnału w przypadku *gerAB* i *gerAC*. Niemniej, poznanie mechanizmów nadzorujących te procesy i zmierzenie ilości powstałego transkryptu oraz białek znacząco przyczyni się do poznania również innych receptorów kiełkowania.

5. Materiały

5.1 Szczepy bakteryjne i plazmidy

Escherichia coli

szczep/plazmid	genotyp/opis	źródło
DH5α	<i>supE44 ΔlacUI69 (φlacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983) kolekcja ZBM
pDG268	Amp ^r Cm ^r	kolekcja ZBM
pBEST501	Amp ^r Nm ^r	(Itaya et al., 1989) kolekcja ZBM
pEZBM01	0,5kbpz fragment obejmujący <i>yzF</i> , <i>citG</i> ; Amp ^r Nm ^r	ta praca
pEZBM02	0,5kbpz fragment obejmujący <i>yzF</i> , <i>citG</i> ; Amp ^r Cm ^r	ta praca
pEZBM03	4kbz fragment obejmujący <i>yzF</i> , <i>citG</i> , operon <i>gerA</i> z rejonem promotorowym; Amp ^r Cm ^r	ta praca
pEZBM04	4,5kbpz fragment obejmujący <i>yzF</i> , <i>citG</i> , operon <i>gerA</i> z rejonem promotorowym, znacznik cMyc i fragment <i>liaR</i> ; Amp ^r Cm ^r	ta praca
pEZBM05	5,2kbpz fragment obejmujący <i>yzF</i> , <i>citG</i> , operon <i>gerA</i> z sekwencjami znaczników FLAG, HA, cMyc, rejon promotorowi <i>gerA</i> i fragment <i>liaR</i> ; Amp ^r Cm ^r	ta praca
pDL (ECE144)	<i>amyE</i> '-' <i>amyE bgaB</i> ; Amp ^r Cm ^r	(Yuan & Wong, 1995) kolekcja ZBM
pAG102 (EAG102)	<i>amyE</i> ' <i>P_{gerA}-gerAA(WT)</i> ' <i>amyE</i> ; Amp ^r Cm ^r	kolekcja ZBM
pMHP324A	<i>amyE</i> ' <i>P_{gerA}-gerAA(P324A)</i> ' <i>amyE</i> ; Amp ^r Cm ^r	ta praca
pMHP324S	<i>amyE</i> ' <i>P_{gerA}-gerAA(P324S)</i> ' <i>amyE</i> ; Amp ^r Cm ^r	ta praca
pMHP324G	<i>amyE</i> ' <i>P_{gerA}-gerAA(P324G)</i> ' <i>amyE</i> ; Amp ^r Cm ^r	ta praca
pMHP324F	<i>amyE</i> ' <i>P_{gerA}-gerAA(P324F)</i> ' <i>amyE</i> ; Amp ^r Cm ^r	ta praca

Bacillus subtilis

szczep	genotyp/opis	źródło
168	<i>trpC2</i>	(Kunst et al., 1997) kolekcja ZBM
PY79	prototrof SPβ ^s	(Schroeder & Simmons, 2013) kolekcja ZBM
BAG13	168 Δ <i>gerA</i> ; Neo ^r	kolekcja ZBM
BZBM01	BAG13 transformowany pEZBM05 zawierającym sekwencję operonu <i>gerA</i> zawierającą geny z dodanymi sekwencjami znaczników FLAG, HA, cMyc; Neo ^r Cm ^r	ta praca
BAG14	168 Δ <i>gerA thrC::gerAB-gerAC</i> ; Neo ^r Erm ^r	kolekcja ZBM
BAG17	BAG14 transformowany pAG102; 168 Δ <i>gerA thrC::gerAB-gerAC amyE::gerAA(WT)</i> ; Neo ^r Erm ^r Cm ^r	kolekcja ZBM
BMHP324A	BAG14 transformowany pMHP324A; 168 Δ <i>gerA thrC::gerAB-gerAC amyE::gerAA(P324A)</i> Neo ^r Erm ^r Cm ^r	ta praca
BMHP324S	BAG14 transformowany pMHP324S; 168 Δ <i>gerA thrC::gerAB-gerAC amyE::gerAA(P324S)</i> Neo ^r Erm ^r Cm ^r	ta praca
BMHP324G	BAG14 transformowany pMHP324G; 168 Δ <i>gerA thrC::gerAB-gerAC amyE::gerAA(P324G)</i> Neo ^r Erm ^r Cm ^r	ta praca
BMHP324F	BAG14 transformowany pMHP324F; 168 Δ <i>gerA thrC::gerAB-gerAC amyE::gerAA(P324F)</i> Neo ^r Erm ^r Cm ^r	ta praca

5.2 Pożywki do hodowli bakterii i potrzebne roztwory

LB (*Lysogeny Broth*)

1% (w/v) pepton, 1% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) ekstrakt drożdżowy

LA (*Lysogeny Agar*)

1% (w/v) pepton, 1% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) ekstrakt drożdżowy, 2% (w/v) agar

Pożywki do transformacji *Bacillus subtilis*

MSM (*Minimal Salt Medium*): 0,5% glukoza, 0,02% hydrolizat kazeiny (Casamino acids), 14μg/ml tryptofan, 2,2μg/ml cytrynian żelazowo-amonowy, 1x roztwór soli MSM

pożywka „głodząca”: 0,5% glukoza, 1x roztwór soli MSM

5x roztwór soli MSM: 10g/L (NH₄)₂SO₄, 70g/L K₂HPO₄, 30g/L KH₂PO₄, 5g/L cytrynian trisodowy, 1g/L MgSO₄•7H₂O

Pożywka sporulacyjna DSM (*Difco Sporulation Medium*)

0,8% NB (*Nutrient Broth*), 0,1% KCl, 1mM MgSO₄, 0,5mM NaOH, 1mM CaCl₂, 0,01mM MnCl₂, 1μM FeSO₄

Pożywki użyte w analizie ekspresji genów

pożywka wzrostowa (100ml): 94ml roztworu CHI+II, 5ml roztworu CHIII, 0,2ml roztworu CHIV, 1ml roztworu CHV

pożywka sporulacyjna (100ml): 0,1ml roztworu A, 1ml roztworu B, 4ml roztworu C, 1ml roztworu D, 4ml roztworu E, 1ml roztworu CHV

roztwór CHI+II: 10g/L hydrolizat kazeiny, 3,68g/L kwas L-glutaminowy, 1,25g/L L-alanina, 1,39g/L L-asparagina, 1,36g/L KH₂PO₄, 1,34g/L NH₄Cl, 0,11g/L Na₂SO₄, 0,1g/L NH₄NO₃, 1mg/L FeCl₃•6H₂O; pH 7

roztwór CHIII: 1,98g/L MgSO₄•7H₂O, 0,04% (w/v) CaCl₂

roztwór CHIV: 1,1% MnSO₄•4H₂O

roztwór CHV: 1% tryptofan

roztwór A: 0,1% FeCl₃•6H₂O, 0,8% MgCl₂•6H₂O, 2% MnCl₂•4H₂O

roztwór B: 5,4% NH₄Cl, 1,1% Na₂SO₄, 0,7% KH₂PO₄, 1% NH₄NO₃

roztwór C: 10% kwas L-glutaminowy, pH 7

roztwór D: 0,1M CaCl₂

roztwór E: 1M MgSO₄•7H₂O

Pożywki i roztwory do przygotowania komórek kompetentnych

Pożywka SOB (*Super Optimal Broth*): 2% pepton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂•6H₂O, 10mM MgSO₄•7H₂O, pH 6,7-7

roztwór TB: 10mM PIPES, 55mM MnCl₂•4H₂O, 15mM CaCl₂, 250mM KCl, pH 6,7

roztwór 50mM CaCl₂

Roztwory do analiz kiełkowania przetrwalników

L-alanina: 10mM/5mM/1mM L-alanina (w zależności od reakcji), 10mM Tris-HCl lub 25mM HEPES, pH 7,5

D-alanina: 10mM/5mM/1mM D-alanina (w zależności od reakcji), 10mM Tris-HCl lub 25mM HEPES, pH 7,5

L-walina: 10mM/5mM/1mM L-walina (w zależności od reakcji), 10mM Tris-HCl lub 25mM HEPES, pH 7,5

AGFK: 3,3mM L-asparagina, 5,6mM D-glukoza, 5,6mM D-fruktoza, 10mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,5

dodecylamina: 1mM roztwór dodecylaminy w etanolu

5.3 Startery i sondy do reakcji PCR

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'	Uwagi
citG-up	TTATAAGCTTGCTACCACTTCGTTTCATG	konstrukcja pEZBM01
citG-dn	TTAAGCATGCCATTAGATCATTTGAACAGC	konstrukcja pEZBM01
gerAA-up	TTAAGGATCCCACGATTTTCGGCGAACAG	amplifikacja operonu <i>gerA</i>
gerAA-dn	AATAGGTACCTTATTTGTTTGCGCCTTTTCG	amplifikacja operonu <i>gerA</i>
gerAA-FLAG_spr-up	CCTAACGAGACAAACGAG	wykrywanie znacznika FLAG
gerAA-FLAG_spr-dn	TTGTCATCATCATCTTTATAA	wykrywanie znacznika FLAG
gerAB-HA_spr-up	ACAAGCATGGTGATTATC	wykrywanie znacznika HA
gerAB-HA_spr-dn	CATAATCTGGAACATCATAC	wykrywanie znacznika HA
gerAC-Myc_spr-up	AACGAGGTCAGAATTCATTATC	wykrywanie znacznika cMyc
gerAC-Myc_spr-dn	TCGCTGATCAATTTCTGTTC	wykrywanie znacznika cMyc
P324A-f	GAAAACGTGGCATTCCCTCCGATATTTGAAGC	substytucja P324A
P324A-r	GCTTCAAATATCGGAGGGAATGCCACGTTTTTC	substytucja P324A
P324S-f	GAAAACGTGAGCTTCCCTCCGATATTTGAAGC	substytucja P324S
P324S-r	GCTTCAAATATCGGAGGGAAGCTCACGTTTTTC	substytucja P324S
P324G-f	GAAAACGTGGGCTTCCCTCCGATATTTGAAGC	substytucja P324G
P324G-r	GCTTCAAATATCGGAGGGAAGCCCACGTTTTTC	substytucja P324G
P324F-f	GAAAACGTGTTCTTCCCTCCGATATTTGAAGC	substytucja P324F
P324F-r	GCTTCAAATATCGGAGGGAAGAACACGTTTTTC	substytucja P324F
sekw1	TTGATAATAAGGGTAACTATTGC	powielania <i>gerAA</i> po mutageniezie do sekwencjonowania

sekw2	GATAACACATTCATAATTATTCCC	powielania <i>gerAA</i> po mutagenezie do sekwencjonowania
GerAA-F	GACAGTTCACCATTTGTG	reakcja qPCR
GerAA-R	CGGATAAGAGATGCTGAA	reakcja qPCR
GerAB-F	GCCGGACTTTTAACATTG	reakcja qPCR
GerAB-R	GAGCGTGTTTAAATAAATGAAG	reakcja qPCR
GerAC-F	GTCTCATTCTGCTTTCCA	reakcja qPCR
GerAC-R	GGTGATAAAGACGTAGGAA	reakcja qPCR
sigA-up	GGAAGATGTGCTTGATAC	reakcja qPCR
sigA-dn	CTCTCGTTACTCCAAATAC	reakcja qPCR
sigA	6-FAM-TTGCCGACCTCTTCTAATGTTCTTGTA- BHQ-1	sonda do <i>sigA</i>
GerAA	Tet-TCCAGCGTTCATAGTAGTCATCCG-BHQ-1	sonda do <i>gerAA</i>
GerAB	TexasRed-CGCTGACCACTAAGGCTAATACG-BHQ-2	sonda do <i>gerAB</i>
GerAC	Cy5-TCCTCCTTGTTCCGTTGTCTCTG-BHQ-2	sonda do <i>gerAC</i>

5.4 Odczynniki do reakcji PCR i qPCR

- polimerazy:
 - DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific™)
 - Polimeraza MARATHON (A&A Biotechnology)
 - Polimeraza Phanta® Max Super-Fidelity (Vazyme Biotech)
 - Mieszanka reakcyjna do qPCR - SensiFAST Probe No-ROX kit (Meridian Bioscience)
- inne składniki reakcji:
 - dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Thermo Scientific)
 - woda wolna od nukleaz (Thermo Scientific)
- gotowe zestawy:
 - Zestaw do izolacji DNA plazmidowego PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)
 - Zestaw do izolacji DNA genomowego GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Merck)

Zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)

Zestaw do izolacji RNA GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific)

Zestaw do odwrotnej transkrypcji Prime Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser Perfect Real Time (TaKaRa)

5.5 Pozostałe odczynniki

- antybiotyki: ampicylina, neomycyna, chloramfenikol, kanamycyna (Merck)
- enzymy: HindIII, SphI, BamHI, KpnI, BglII, Bpu10I, EcoRI, ScaI, DpnI, SapI, ligaza DNA faga T4 (Thermo Scientific), lizozym, proteinaza K (Merck)
- inne: Histodenz[™] (Merck), Diamond[™] Nucleic Acid Dye (Promega), Poli-L-lizyna, sześciowodny chlorek terbu (III) (Merck); wszystkie składniki pożywek i roztworów pochodziły z firmy Merck

6. Metody

6.1 Izolacja kwasów nukleinowych

Izolacja DNA plazmidowego

Plazmidowy DNA z komórek bakteryjnych *E. coli* był izolowany z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), zgodnie z instrukcją producenta. Najpierw przygotowywany był lizat z 3ml nocnej hodowli płynnej bakterii, który następnie był przepuszczany przez kolumnkę zawierającą złożo krzemionkowe, wiążące plazmidowy DNA. Potem następowało płukanie złoża dedykowanymi temu roztworami, aby na koniec eluować DNA z kolumnki 50μl jałowej wody. Stężenie otrzymanego preparatu było sprawdzane spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) przez pomiar absorbancji próbki przy długości fali świetlnej $\lambda=260$ nm. Wyizolowane próbki były przechowywane w -20°C .

Izolacja DNA genomowego

Genomowy DNA z komórek bakteryjnych *Bacillus subtilis* był izolowany z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Merck). Najpierw przygotowywany był lizat z 3ml nocnej hodowli płynnej bakterii. W tym celu zawiesina komórek była najpierw poddawana działaniu lizozymu (45', 37°C). Następnie traktowano ją właściwym roztworem lizującym, RNazą A i proteinazą K. Tak przygotowany lizat był przepuszczany przez kolumnkę ze złożem krzemionkowym. Kolejno następowało płukanie złoża dedykowanymi roztworami i elucja DNA z kolumnki 200μl jałowej wody. Stężenie otrzymanego preparatu było sprawdzane spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) przez pomiar absorbancji próbki przy długości fali świetlnej $\lambda=260$ nm. Wyizolowane próbki były przechowywane w -20°C .

Izolacja całkowitego RNA

Całkowity RNA z komórek bakteryjnych *Bacillus subtilis* był izolowany z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific), zgodnie z instrukcją producenta. Najpierw przygotowywany był lizat z 3ml hodowli płynnej bakterii, z użyciem buforu lizującego suplementowanego DTT. Następnie

uzyskany lizat był przepuszczany przez kolumnkę ze złożem krzemionkowym. Potem następowało płukanie złoża dedykowanymi temu roztworami, aby na koniec eluować RNA z kolumnki 100µl jałowej wody wolnej od nukleaz. Stężenie otrzymanego preparatu było sprawdzane spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) przez pomiar absorbancji próbki przy długości fali świetlnej $\lambda=260$ nm. Wyizolowane próbki były przechowywane w -20°C.

6.2 Przygotowanie komórek kompetentnych i superkompetentnych

Komórki kompetentne

Bakterie *E. coli* szczepu DH5 α były hodowane w hodowlach płynnych w pożywce LB przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temperaturze 37°C. Następnego dnia przenoszono 1ml hodowli nocnej do 99ml świeżej pożywki LB. Odmłodzona hodowla była inkubowana w tych samych warunkach do uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀=0,5. Następnie bakterie schładzano przez 20 minut w lodzie. Potem porcjami schłodzone hodowle przenoszono do jałowej 50ml plastikowej probówki i osadzano przez wirowanie (5000 obr./min.; 5min; 4°C; Sigma; rotor 11192). Supernatant usuwano, a osad bakteryjny został zawieszony w 50ml schłodzonego jałowego roztworu 50mM CaCl₂. Całość była inkubowana w lodzie przez 30min i ponownie wirowana w tych samych warunkach. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 7ml 50mM CaCl₂ i pozostawiano na noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia do bakterii dodawano 1,5ml jałowego 50% (v/v) roztworu glicerolu, delikatnie mieszano zawiesinę i porcjowano po 100µl do jałowych 1,5ml plastikowych probówek. Próbkki były mrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C.

Komórki kompetentne były wykorzystywane do transformacji gotowymi plazmidami w celu propagacji wektorów.

Komórki superkompetentne

Bakterie *E. coli* szczepu DH5 α były hodowane w hodowlach płynnych w pożywce SOB przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temperaturze 30°C. Następnego dnia przenoszono 1ml hodowli nocnej do 99ml świeżej pożywki SOB. Odmłodzona hodowla była inkubowana w tych samych warunkach do uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀=0,6. Następnie bakterie schładzano przez 10 minut w lodzie. Potem schłodzone hodowle

przenoszono do jałowej 50ml plastikowej probówki i osadzano przez wirowanie (5000 obr./min.; 5min; 4°C; Sigma; rotor 11192). Supernatant usuwano, a osad bakteryjny został delikatnie zawieszony w 80ml schłodzonego jałowego roztworu TB. Całość była inkubowana w lodzie przez 10 minut i ponownie wirowana w tych samych warunkach. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 20ml schłodzonego roztworu TB. Do tak przygotowanych zawiesin bakteryjnych dodawano DMSO, tak aby stanowił 7% stężenia końcowego. Próbkę inkubowano przez 10 minut w lodzie. Następnie porcjowano je po 100µl do jałowych plastikowych probówek 1,5ml. Próbkę były mrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C.

Komórki superkompetentne były używane do transformowania mieszaninami po klonowaniu DNA.

6.3 Transformacja bakterii

E. coli – metoda szoku cieplnego

Porcja komórek kompetentnych lub superkompetentnych *E. coli* przeznaczona do transformacji była najpierw rozmrażana na lodzie, po czym dodawano do niej około 100 ng plazmidowego DNA (w przypadku transformacji po klonowaniu DNA zazwyczaj używano całej objętości mieszaniny reakcyjnej). Mieszaninę inkubowano na lodzie przez godzinę, po czym poddawano trzyminutowemu szokowi cieplnemu w temperaturze 42°C w termobloku. Następnie bakterie były wstawiane na 3 minuty do lodu. Po tym czasie zawieszano je w 1ml ciepłej pożywki LB i inkubowano przez godzinę w termomikserze (37°C; 800 obr./min.; Eppendorf). Uzyskaną hodowlę wirowano (1500g; 5min; Sigma; rotor 12134). Prawie cały supernatant usuwano, zostawiając około 100µl, w których zawieszano komórki bakterii i wysiewano je na płytkę z pożywką LA, zawierającą antybiotyk będący czynnikiem selekcyjnym odpowiednim dla wykorzystywanego plazmidu. Płytkę inkubowano przez noc w cieplarni w temperaturze 37°C. Następnego dnia kilka losowo wybranych kolonii przesiewano na nową płytkę z pożywką zawierającą antybiotyk. Jako kontrolę dla całego procesu wykorzystywano komórki kompetentne, do których nie dodawano porcji DNA, ale wysiewano na koniec na podłoża z antybiotykiem selekcyjnym i bez niego.

B. subtilis

Bakterie *B. subtilis* wybranego szczepu były hodowane w 5ml pożywki MSM przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temperaturze 37°C. Następnego dnia 0,5ml hodowli nocnej przenoszono do 4,5ml świeżej pożywki MSM. Odmłodzona hodowla była prowadzona w tych samych warunkach przez 3 godziny. Następnie hodowla ta była rozcieńczana 1:1 w ogrzanej pożywce „głodzącej”. Inkubacja była kontynuowana przez kolejne 2 godziny, w takich samych warunkach. Po tym czasie, do hodowli bakteryjnej dodawano plazmidowy DNA w stosunku: około 1µg DNA plazmidowego do 100µl hodowli. Tak przygotowaną mieszaninę w jałowych plastikowych probówkach 1,5ml inkubowano przez 30 minut, w warunkach jak do tej pory. W przypadku transformacji DNA plazmidowego, wcześniej należało przeprowadzić linearyzację wektora przez cięcie restrykcyjne enzymem przecinającym DNA poza kasetą genetyczną, która miała być transformowana do szczepu. Po trzydziestominutowej inkubacji, zawiesinę bakterii rozcieńczano czterokrotnie w cieplej pożywce LB i inkubowano przez 45 minut, w warunkach jak dotychczas. Po zakończonej inkubacji całą mieszaninę wysiewano na płytkę z pożywką LA, zawierającą antybiotyk będący czynnikiem selekcyjnym. Płytki inkubowano przez noc w cieplarni w temperaturze 37°C. Następnego dnia kilka losowo wybranych kolonii przesiewano na nową płytkę z pożywką zawierającą antybiotyk. Kolonie, które wyrastały po przesianiu, były testowane na obecność oczekiwanych konstruktów genetycznych w analizach PCR wykonywanych na ich DNA genomowym.

W niektórych przypadkach inkubacja płytek po transformacji trwała 48h. Jako kontrolę dla całego procesu wykorzystywano komórki po inkubacji w pożywce „głodzącej”, do których nie dodawano porcji DNA, ale wysiewano na koniec na podłoża z antybiotykiem selekcyjnym i bez niego (zgodnie z fenotypem szczepu, do którego wykonywano transformację).

6.4 Procedury klonowania DNA przy tworzeniu szczepu BZBM01 i mutagenezie pozycji 324 białka A

Konstrukcja szczepu BZBM01

1. Procedurę rozpoczęto od powielenia fragmentu (ok. 0,5kpz) genomu *B. subtilis* 168, znajdującego się powyżej operonu *gerA* w reakcji PCR ze starterami citG-up i citG-dn. Powielony fragment posiadał na końcach miejsca restrykcyjne rozpoznawane przez enzymy HindIII i SphI. Uzyskany fragment DNA i docelowy wektor (pBEST501) poddawano trawieniu restrykcyjnemu wspomnianymi enzymami, a następnie ligacji. Na koniec mieszaniną ligacyjną transformowano komórki superkompetentne. Z uzyskanych klonów izolowano plazmid (pEZBM01) do dalszych procedur.

2. W reakcji PCR z plazmidu pDG268 została powielona sekwencja genu oporności na chloramfenikol. Fragment ten posiadał na końcach miejsca restrykcyjne dla enzymów SphI i BamHI. Dzięki trawieniu tego fragmentu i plazmidu pEZBM01 wspomnianymi enzymami, można było dokonać wymiany genu oporności na neomycynę z pEZBM01 na gen oporności na chloramfenikol. Jak poprzednio, mieszanina ligacyjna była użyta do transformowania komórek superkompetentnych. Z uzyskanych klonów izolowano plazmid (pEZBM02) do dalszych procedur.

3. W reakcji PCR z genomowego DNA *B. subtilis* 168 została powielona sekwencja operonu *gerA*, przy użyciu starterów gerAA-up i gerAA-dn. Uzyskany produkt posiadał na końcach miejsca restrykcyjne rozpoznawane przez BamHI i KpnI. Trawienie produktu tej reakcji PCR i plazmidu pEZBM02 pozwoliło na utworzenie plazmidu pEZBM03, zawierającego sekwencję operonu *gerA* razem z fragmentem poprzedzającym go w genomie. Po transformacji komórek superkompetentnych mieszaniną ligacyjną, izolowano plazmid (pEZBM03) z uzyskanych transformantów do dalszych procedur.

4. Sekwencja *gerAC* ze znacznikiem cMyc i następującym po nim fragmentem *liaR*, została zsyntezowana w firmie zewnętrznej. Zaprojektowany fragment posiadał na końcach miejsca restrykcyjne dla enzymów BglII i KpnI. Trawienie restrykcyjne tego fragmentu i plazmidu pEZBM03 pozwoliło na dołączenie pierwszego znacznika do operonu *gerA*. Jak poprzednio, mieszanina ligacyjna była użyta do transformacji komórek

superkompetentnych. Z uzyskanych klonów izolowano plazmid (pEZBM04) do dalszych procedur.

5. Sekwencja *gerAA-FLAG-gerAB-HA* została zsyntezowana w firmie zewnętrznej. Zaprojektowany fragment posiadał na końcach miejsca restrykcyjne dla enzymów Bpu10I i BglIII. Trawienie restrykcyjne tego fragmentu i plazmidu pEZBM04 pozwoliło na dołączenie dwóch kolejnych znaczników do operonu *gerA*. Jak w poprzednich etapach, mieszanina ligacyjna była użyta do transformacji komórek superkompetentnych. Z uzyskanych klonów izolowany był plazmid pEZBM05.

6. Plazmid pEZBM05 był użyty do transformacji szczepu *B. subtilis* BAG13, zgodnie z procedurą transformacji bakterii *B. subtilis*. Na drodze rekombinacji homologicznej utworzona sekwencja operonu *gerA*, powiększona o sekwencje znaczników dla każdego genu w operonie, mogła być wbudowana do genomu bakterii w natywnym *locus gerA*. Z klonów uzyskanych po transformacji izolowano genomowy DNA (gotowy zestaw odczynników GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit, Merck), który wykorzystywano w reakcji PCR ze starterami wykrywającymi poszczególne znaczniki (*gerAA-FLAG_spr-up/dn*, *gerAB-HA_spr-up/dn*, *gerAC-Myc_spr-up/dn*). Szczep, w którym wykryto sekwencje znaczników, hodowano w pożywce sporulacyjnej do uzyskania przetrwalników, które następnie oczyszczano metodą „wodną” lub poprzez wirowanie w gradiencie HistoDenz™. Otrzymane przetrwalniki używano w analizie kiełkowania przez pomiar spadku gęstości optycznej w kuwetach spektrofotometrycznych.

Reakcje PCR w procesie konstrukcji szczepu BZBM01 były wykonywane z użyciem polimerazy Phanta® Max Super-Fidelity (Vazyme Biotech), w przypadku powielania sekwencji używanych bezpośrednio do klonowania lub polimerazy DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), w przypadku sprawdzania poprawności utworzonych konstruktów. Parametry reakcji były ustalane zgodnie z zaleceniami producentów. Reakcje PCR były przeprowadzane w termocyklerze C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad).

Trawienie restrykcyjne: wszystkie parametry reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi były przeprowadzane zgodnie z zaleceniami producentów enzymów. Zazwyczaj była to 1h w 37°C. Po zakończonej inkubacji produkty reakcji były oczyszczane przy użyciu zestawu gotowych odczynników Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Ligacja DNA: Oczyszczone fragmenty uzyskane po trawieniu restrykcyjnym poddawano ligacji (ligaza DNA faga T4, Thermo Scientific) przez noc w 4°C. Stężenie składników w reakcji było zgodne z zaleceniami producenta. Wykorzystywano różne stosunki molowe insertu i wektora w reakcji ligacji (1:1, 2:1 lub 3:1). Po zakończonej inkubacji, nieoczyszczona mieszanina reakcyjna była używana do transformacji superkompetentnych komórek *E. coli*.

Mutageneza pozycji P324 w białku A

1. Procedurę mutagenezy miejscowo-specyficznej rozpoczęto od powielenia plazmidu pAG102 w reakcjach PCR z parami starterów zamierającymi odpowiednie mutacje (P324-f/r, P324S-f/r, P324G-f/r, P324F-f/r). Do tej reakcji wykorzystano polimerazę MARATHON (A&A Biotechnology). Parametry procedury zostały dopasowane do zaleceń producenta: 93°C 60s, 35x[93°C 30s, 59°C 30s, 68°C 12min], 10°C; 0,25µM dNTPs, 0,5µM starter F/R. 50ng DNA, 1U polimerazy.

2. Po zakończeniu reakcji PCR następowało trawienie mieszaniny reakcyjnej enzymem DpnI przez 1h w 37°C (stężenia składników zgodne z instrukcjami producenta). Po zakończonej inkubacji mieszaninę oczyszczano gotowym zestawem odczynników Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Uzyskany produkt wprowadzono do superkompetentnych komórek *E. coli* na drodze transformacji. Po 24- lub 48-godzinnej inkubacji w 37 °C uzyskiwano pojedyncze kolonie, które przesiewano na świeże podłoże z antybiotykiem.

3. Z uzyskanych transformantów izolowano plazmidy, które wykorzystywano do reakcji PCR, w której powielano tylko fragment zawierający sekwencję *gerAA*. Była to reakcja z wykorzystaniem polimerazy Phanta® Max Super-Fidelity (Vazyme Biotech) i pary starterów sekw1 i sekw2. Parametry procedury zostały dopasowane do zaleceń producenta: 95°C 30s, 35x[95°C 15s, 45°C 15s, 72°C 60s], 72°C 5min; 10°C; 0,25µM dNTPs, 0,5µM starter F/R. 8ng DNA, 1U polimerazy. Uzyskany produkt oczyszczano za mocą zestawu odczynników Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) i wysyłano do sekwencjonowania. Plazmidy z potwierdzoną mutacją były wprowadzane do szczepu BAG14. Na drodze rekombinacji homologicznej gen zawierający mutację mógł być wprowadzony do *locus amyE* w chromosomie szczepu BAG14. Kolonie uzyskane po transformacji przesiewano na świeże podłoże selekcyjne. Następnie wybrane zaszczepiano

do hodowli wzrostowych i sporulacyjnych, aby kolejno analizować kiełkowanie uzyskiwanych przetrwalników.

6.5 Hodowle bakteryjne

Hodowle wzrostowe *B. subtilis*

Płynne hodowle wzrostowe bakterii *B. subtilis* były prowadzone w pożywce LB z energicznym wytrząsaniem w 37°C.

W celu sprawdzenia czy analizowane konstrukty genetyczne nie wpływają na wzrost wegetatywny bakterii *B. subtilis*, nocne hodowle płynne były rozcieńczane dziesięciokrotnie w świeżej pożywce LB i prowadzone w takich samych warunkach aż do osiągnięcia przez hodowlę fazy stacjonarnej wzrostu (około 8 godzin). Co godzinę sprawdzano gęstość optyczną, aby monitorować wzrost hodowli.

Hodowle sporulacyjne

Bakterie *B. subtilis* hodowano w hodowlach płynnych w pożywce LB przez noc z wytrząsaniem w temperaturze 37°C. Następnego dnia 0,1ml hodowli nocnej przenoszono do 10ml świeżej pożywki LB i kontynuowano hodowlę przez 5 godzin w dotychczasowych warunkach. Po wyznaczonym czasie, 0,25ml tej hodowli przenoszono do 100ml ciepłej pożywki DSM, bez antybiotyków. Tak przygotowane hodowle sporulacyjne prowadzono z energicznym wytrząsaniem w 37°C przez 48 godzin.

Hodowle sporulacyjne szczepów P324S, P324G, P324A i P324F zawsze były prowadzone równolegle. Podobnie miały miejsce hodowle szczepów kontrolnych (168, BAG17). Miało to na celu zminimalizowanie różnic pojawiających się pomiędzy kolejnymi preparatami. Objętość hodowli sporulacyjnych w przypadkach szczepów do analiz kiełkowania nie przekraczała 100ml. Była to objętość przy której jakość preparatu była możliwie optymalna, a ilość przetrwalników pozwalała na wykonanie najważniejszych analiz, jeszcze bez utraty fenotypu spor.

Analizy mikroskopowe

Na szkiełko podstawowe pokryte roztworem poli-L-lizyny nakładano 2μl hodowli bakteryjnej lub zawiesiny przetrwalników. Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego MB300 z kontrastem fazowym (OPTA-TECH) przy powiększeniu

1000-krotnym. Analizy mikroskopowe były prowadzone w miarę możliwości regularnie przy analizie każdego szczepu omawianego w tej pracy.

Obserwacje mikroskopowe prowadzonych hodowli miały na celu ich kontrolę jakościową – zweryfikowanie czy modyfikacje genetyczne szczepów *B. subtilis* wpływają na wzrost wegetatywny bakterii oraz kontrolę procesu sporulacji tych szczepów, zarówno na etapie tworzenia się przetrwalników, jak i w trakcie ich oczyszczania.

6.6 Oczyszczanie przetrwalników

Metoda „wodna”

Po 48 godzinach hodowla sporulacyjna była zwirowywana (8000g, 15min, 4°C; Sigma 6K15). Supernatant usuwano, a osad zawieszano w wodzie dejonizowanej. Procedurę wirowania i zawieszania osadu w świeżej wodzie dejonizowanej powtarzano przez kolejne 10 dni, aby uzyskać preparat przetrwalników wolnych od pozostałości komórkowych. Oczyszczone przetrwalniki przechowywano w wodzie dejonizowanej w 4°C.

Wirowanie w gradiencie HistoDenz™ (Sanchez-Salas et al., 2011)

Po 48 godzinach hodowla sporulacyjna była zwirowana (8000g, 15min, 4°C; Sigma 6K15). Supernatant usuwano, a osad zawieszano w wodzie dejonizowanej. Płukanie wodą dejonizowaną powtórzono. Po drugim wirowaniu osad zawieszono w mniejszej objętości wody dejonizowanej. Następnie zawiesinę przetrwalników delikatnie nakładano pipetą Pasteura na 50% roztwór HistoDenz™, zachowując stosunek 1 objętość przetrwalników do 10 objętości HistoDenz™. Tak przygotowaną mieszaninę wirowano w 20°C przez 45 minut (13000g). W takich warunkach, w pełni dojrzałe przetrwalniki lokują się w osadzie na dnie probówki, a przetrwalniki uwięzione w komórkach lub wszelkie pozostałości komórkowe pozostają w górnej warstwie roztworu HistoDenz™. Po wirowaniu, górne warstwy mieszaniny odrzucono, a osad z dna probówki trzykrotnie płukano w świeżej wodzie dejonizowanej. Oczyszczone w ten sposób przetrwalniki przechowywano w wodzie dejonizowanej w 4°C.

6.7 Analizy kiełkowania

Analizy kiełkowania dla wszystkich badanych szczepów, w miarę możliwości, były prowadzone równoległe, tego samego dnia lub w przeciągu jednego tygodnia dla preparatów otrzymanych w podobnym czasie.

Spadek gęstości optycznej

Analiza kiełkowania przetrwalników na podstawie obserwacji spadku gęstości optycznej była przeprowadzana w dwóch wariantach: (1) pomiar w kuwetach spektrofotometrycznych i (2) pomiar w płytce 96-dołkowej.

1. Pomiar w kuwetach spektrofotometrycznych – 1ml mieszaniny przetrwalników o OD₆₀₀ 1,0 (do kiełkowania z pojedynczymi aminokwasami) lub OD₆₀₀ 1,5 (do kiełkowania z AGFK) był aktywowany termicznie w 80°C przez 20min. Następnie mieszaninę odwirowywano (3min; 8000g), supernatant odrzucano, a osad zawieszano w 1ml odpowiedniego germinantu. Całą zawiesinę przenoszono do kuwety i rozpoczynano pomiar przy długości fali $\lambda=600$ (spektrofotometr SmartSpecTM Plus, BioRad). Pomiędzy pomiarami, kuweta z przetrwalnikami zabezpieczona folią uszczelniającą (Parafilm[®]M, BemisCompany) była inkubowana w cieplarni w 37°C. Pomiary gęstości optycznej były wykonywane przez 2h co 15min (analiza mutacji w pozycji P324) lub przez 5h w nieregularnych odstępach czasu (analiza przetrwalników szczepu BZBM01). Dla każdego z analizowanych szczepów procedura była powtarzana trzykrotnie.

Uzyskane wartości gęstości optycznej zostały przeliczone jako procent OD₆₀₀, gdzie 100% stanowi pierwszy pomiar (T0) spadku gęstości optycznej. Wyniki zostały przedstawione jako wykres zależności spadku gęstości optycznej kiełkujących przetrwalników od czasu. Punkty na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z 3 powtórzeń dla danego szczepu.

2. Pomiar w płytce 96-dołkowej – Mieszanina przetrwalników o gęstości optycznej OD₆₀₀ 10 była aktywowana termicznie w 80°C przez 20min. Tris-HCl (stężenie w reakcji: 10mM; roztwór roboczy: 40mM) i woda dejonizowana zostały umieszczone na płytce przed rozpoczęciem doświadczenia. Po zakończonej aktywacji termicznej, 50 μ l przetrwalników umieszczano w odpowiednich dołkach. Na koniec, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 20 μ l roztworu L-alaniny (stężenie w reakcji: 10mM; roztwór roboczy: 100mM). Pomiar spadku gęstości optycznej przy długości fali $\lambda=600$ prowadzono w przezroczystych

plytkach 96-dołkowych (Thermo Scientific™) za pomocą czytnika płytek Multimode Plate Reader EnVision (PerkinElmer). Odczyty były prowadzone przez 2h, co 2min.

Uzyskane wartości gęstości optycznej zostały przeliczone jako procent OD₆₀₀, gdzie 100% stanowi pierwszy pomiar (T0) spadku gęstości optycznej. Wyniki zostały przedstawione jako wykres zależności spadku gęstości optycznej kiełkujących przetrwalników od czasu. Punkty na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z 3 powtórzeń dla danego szczepu.

Uwalnianie DPA

Mieszanina przetrwalników o gęstości optycznej OD₆₀₀ 2,0 była aktywowana termicznie w 80°C przez 20min (w przypadku kiełkowania z AGFK – 60min, z dodecylaminą – nie stosowano aktywacji termicznej). Następnie poddano ją schłodzeniu w lodzie przez 10min. Po skończonej inkubacji, 50µl aktywowanych przetrwalników dodano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej HEPES pH 7,5 (stężenie w reakcji: 25mM; roztwór roboczy: 100mM), chlorek terbu (stężenie w reakcji: 0,1mM; roztwór roboczy: 1mM) i wodę dejonizowaną. Na koniec dodawano 20µl odpowiedniego germinantu (AGFK; L-alanina, D-alanina, L-walina; stężenia w reakcji: 10, 5, 1mM; roztwory robocze: 10-krotnie stężone). Pomiar fluorescencji tworzącego się w trakcie kiełkowania kompleksu DPA-Tb³⁺ ($\lambda_{wzbudzenie}=270\text{nm}$, $\lambda_{emisja}=545\text{nm}$) prowadzono w czarnych płytkach 96-dołkowych (Thermo Scientific™) za pomocą czytnika płytek Multimode Plate Reader EnVision (PerkinElmer). Odczyty były prowadzone przez 2h, co 2min. Dla każdego szczepu stosowana była kontrola w postaci przetrwalników aktywowanych termicznie (oprócz kiełkowania z dodecylaminą), do których nie dodawano germinantów.

Równolegle do doświadczenia badającego uwalnianie DPA z kiełkujących przetrwalników przygotowywany był zestaw reakcyjny do pomiaru całkowitego DPA w przetrwalnikach. W tym celu, mieszanina przetrwalników danego szczepu o gęstości optycznej OD₆₀₀ 2,0 była inkubowana w 100°C przez 30min. Następnie, po 10-minutowym schłodzeniu w lodzie, próbkę wirowano (2min, 130000g). 50µl uzyskanego supernatantu dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej HEPES i chlorek terbu (stężenia jak przy analizie uwalnianego DPA). Pomiar fluorescencji utworzonego kompleksu DPA-Tb³⁺ był prowadzony równolegle, w takich samych warunkach jak przy analizie uwalnianego DPA z kiełkujących przetrwalników. Maksymalna ilość uwalnianego DPA była ustalana na podstawie 6 najwyższych odczytów dla danego szczepu, z których obliczano średnią arytmetyczną.

Uzyskane wartości fluorescencji w analizach kiełkowania zostały przeliczone jako procent uwolnionego DPA, gdzie 100% stanowi wartość całkowitego DPA, charakterystyczna dla danego szczepu. Wyniki zostały przedstawione jako wykres zależności ilości uwalnianego DPA kiełkujących przetrwalników od czasu. Punkty na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z 3 powtórzeń dla danego szczepu.

6.8 Analiza ekspresji genów operonu *gerA*

Pobieranie próbek

Hodowle płynne wybranych szczepów *B. subtilis* były prowadzone w 5ml pożywki wzrostowej przez noc z wytrząsaniem w 25°C. Następnego dnia hodowle nocne rozcieńczono w 20ml ogrzanej pożywki wzrostowej do OD₆₀₀=0,05. Hodowle prowadzono z wytrząsaniem w 37°C, aż do uzyskania OD₆₀₀=0,6. Następnie, hodowle zwirowano (5000g, 5 minut, temperatura pokojowa), supernatant usunięto, a osad zawieszono w takiej samej objętości pożywki sporulacyjnej.

Moment zawieszenia bakterii w pożywce sporulacyjnej zostaje oznaczony jako T0 – czas, kiedy bakterie uruchamiają proces sporulacji. Wówczas zostaje pobrana pierwsza próbka o gęstości optycznej OD₆₀₀=2,0. Od tego czasu zostają pobrane próbki w czasie T3 (3h po zawieszeniu w pożywce sporulacyjnej) i T4 (4h po zawieszeniu w pożywce sporulacyjnej). Pobierane próbki są wirowane, supernatant jest usuwany, a osad jest przechowywany w -20°C, do czasu izolacji potrzebnego materiału.

Izolacja materiału

Pierwszym etapem była izolacja całkowitego RNA z pobranych próbek, według instrukcji producenta zestawu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) (6.1 Izolacja kwasów nukleinowych). Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji wyizolowanego RNA do komplementarnego DNA (cDNA) przy użyciu gotowego zestawu odczynników Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser Perfect Real Time (TaKaRa). Proces ten obejmował wstępną eliminację DNA genomowego z próbki oraz właściwą reakcję odwrotnej transkrypcji przy użyciu mieszaniny przypadkowych starterów, dołączonej do zestawu. Stężenie otrzymanych w ten sposób preparatów cDNA było sprawdzane spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) przez

pomiar absorbancji próbki przy długości fali świetlnej $\lambda=260$ nm. Próbki były przechowywane w -20°C .

Optymalizacja warunków i przebieg reakcji qPCR

W analizie ekspresji genów operonu *gerA* zaprojektowano sondy z 3 rodzajami fluoroforów: Tet dla *gerAA*, TexasRed dla *gerAB*, Cy5 dla *gerAC*. Jako standard wewnętrzny wybrano gen *sigA*, dla którego sonda posiadała fluorofor FAM. Parametry poszczególnych sond wynikały z ustawień urządzenia, na którym wykonywano analizę (termocykler CFX96 Bio-Rad z oprogramowaniem Bio-Rad CFX Manager).

Optymalizacja warunków reakcji rozpoczęto od ustalenia stężeń dla starterów, sond i matrycy. Proces optymalizacji rozpoczęto od reakcji z pojedynczymi sondami. Dla każdej pary starterów (*GerAA-F/R*, *GerAB-F/R*, *GerAC-F/R*, *sigA-up/dn*) wykonano po 16 reakcji qPCR o różnym stężeniu każdego ze starterów. W tabeli przedstawiono możliwe kombinacje w przetestowanym zakresie stężeń:

stęż. starterów For/Rev	100nM	300nM	500nM	900nM
100nM	100/100	100/300	100/500	100/900
300nM	300/100	300/300	300/500	300/900
500nM	500/100	500/300	500/500	500/900
900nM	900/100	900/300	900/500	900/900

W wyniku serii tych reakcji wytypowano następujące stężenia starterów:

starter	For	Rev
GerAA	300nM	500nM
GerAB	300nM	300nM
GerAC	300nM	300nM
sigA	300nM	300nM

Optymalizacja sond polegała na wykonaniu po 4 reakcji dla każdej sondy w osobnych reakcjach, w zakresie stężeń 100nM, 300nM, 500nM i 900nM. W wyniku tych reakcji, ustalono, że optymalne stężenie każdej sondy wynosi 100nM. Po ustaleniu stężeń

starterów i sond, przetestowano reakcje dla pojedynczych sond z różnym stężeniem matrycy – genomowym DNA *B.subtilis* 168 w stężeniach 100ng, 10ng, 0,1ng, 0,01ng (w 3 powtórzeniach). W zaproponowanym zakresie stężeń matrycy, zaproponowany układ doświadczalny dla każdej z sond działał.

Z tego względu postanowiono przejść do połączenia ustalonych parametrów w reakcję multipleksową ze wszystkimi czterema sondami w jednej reakcji. Do reakcji multipleksowej używano premix wszystkich sond (5µM), premix starterów (10µM) (startery GerAA-F/R dodawano do reakcji osobno) oraz gotową mieszaninę odczynników SensiFAST Probe No-ROX kit (Meridian Bioscience). Wydajność reakcji multipleksowej sprawdzono poprzez przygotowanie reakcji ze zmiennym stężeniem matrycy (rozcieńczenie gDNA: 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Każdą reakcję przygotowano w 3 powtórzeniach. Na tej podstawie przygotowano krzywą kalibracyjną reakcji, która posłużyła do obliczenia wydajności reakcji. W tym celu wykorzystano narzędzie online „qPCR Efficiency Calculator” (<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>; dostęp 10.11.2021r.). Szczegóły wydajności reakcji multipleksowej umieszczono w tabeli:

Sonda	Wydajność	Współczynnik amplifikacji
sigA-FAM	100,85%	2,01
GerAA-Tet	97,42%	1,97
GerAB-TexasRed	101,19%	2,01
GerAC-Cy5	99,29%	1,99

Zoptymalizowana multipleksowa reakcja qPCR zachodziła według następujących parametrów: 95°C 2min, 40x[95°C 10s, 50°C 50s]; 100nM każdej z sond (premix 5µM), 300nM starterów GerAB-F/R, GerAC-F/R, sigA-up/dn (premix 10µM), 300nM startera GerAA-F (roztwór roboczy 10µM), 500nM startera GerAA-R (roztwór roboczy 10µM), 5-krotnie rozcieńczony cDNA i odczynniki z SensiFAST Probe No-ROX kit (Meridia Bioscience) według zaleceń producenta. Każda reakcja została wykonana w 3 powtórzeniach. Kontrolę dla całego doświadczenia stanowiła reakcja bez matrycy (NTC – *no template control*).

Analiza danych

Analizę danych rozpoczęto od ustalenia liczby cząsteczek cDNA w reakcji qPCR. W tym celu przeprowadzono 5 reakcji qPCR z seryjnie rozcieńczonym DNA genomowym (*B. subtilis* 168), każda w 3 powtórzeniach. Uzyskane wartości Ct (ang. *Cycle threshold*) uśredniono dla każdego rozcieńczenia. Oszacowanie ilości cDNA w reakcji dokonano na podstawie wielkości genomu *B. subtilis* 168 i pomiarów spektrofotometrycznych stężenia DNA w użytym preparacie DNA genomowego. Uzyskane ilości gDNA w reakcjach poddano transformacji logarytmicznej (LOG10) i użyto do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Wartości \log_{10} (ilość cząsteczek DNA w reakcji) i uzyskane wartości Ct w danej reakcji wykorzystano w obliczeniach regresji liniowej do wyznaczania ilości cząsteczek w reakcjach z RNA.

Reakcje qPCR dla genów operonu *gerA* z cDNA, jako matrycą, przepisanych z RNA wyizolowanym w danym punkcie czasowym przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Dla każdego punktu czasowego i szczepu uzyskane wartości Ct uśredniono. Te wartości, razem z wartościami z krzywej kalibracyjnej, wykorzystano do policzenia regresji liniowej (wyliczenie logarytmu dziesiętnego ilości cząsteczek cDNA w danej reakcji z użyciem danych dla krzywych kalibracyjnych). Następnie przeprowadzono transformację odwrotną do logarytmowania (10 do potęgi wartość uzyskana z regresji liniowej).

Normalizacja danych

Normalizacja danych została dokonana względem wyników dla *sigA*. Najpierw obliczono średnią geometryczną z ilości cząsteczek cDNA *sigA* wyliczonych we wszystkich reakcjach qPCR przeprowadzonych w danym doświadczeniu. Dla każdego punktu czasowego i szczepu wyliczoną liczbę cząsteczek cDNA *sigA* podzielono przez średnią geometryczną *sigA*. Uzyskana wartość była normalizatorem dla każdej reakcji. Dla każdego z badanych genów wyliczona ilość cząsteczek cDNA była dzielona przez normalizator dla danego punktu czasowego i szczepu. Uzyskane w ten sposób ilości cząsteczek cDNA badanych genów były znormalizowane względem ekspresji genu *sigA*. Znormalizowane ilości cząsteczek cDNA badanych genów przedstawiono w postaci wykresów słupkowych.

6.9 Analizy bioinformatyczne

Analizy bioinformatyczne były prowadzone na sekwencjach aminokwasowych białek A receptora GerA pobranych z bazy danych UniProt (Bateman et al., 2021) <https://www.uniprot.org/> (dostęp: 20.01.2021r.).

Zestawienia sekwencji zostały wykonane przy pomocy programu MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) (Madeira et al., 2019) <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/> (dostęp 20.01.2021r.).

Sekwencja aminokwasowa białka A została przeanalizowana za pomocą serwerów PredictProtein (Bernhofer et al., 2021) <https://predictprotein.org/> (dostęp: 21.01.2021r.), ConSurf (Armon et al., 2001; Ashkenazy et al., 2016; Celniker et al., 2013; Glaser et al., 2003) <https://consurf.tau.ac.il/> (dostęp: 21.01.2021r.) i SNAP2 (Bromberg & Rost, 2007; Hecht et al., 2015) <https://rostlab.org/services/snap2web/> (dostęp 21.01.2021r.).

Serwer PredictProtein, na podstawie zdeponowanej sekwencji aminokwasowej, umożliwia przewidywanie struktury drugorzędowej (m.in. występowanie helis transbłonowych, beta-beczek, regionów globularnych lub nieustrukturyzowanych, określanie dostępności struktury dla rozpuszczalnika, obecność mostków dwusiarczkowych) oraz pozwala na wyodrębnienie potencjalnych interakcji pomiędzy resztami aminokwasowymi wewnątrz białka, w kontakcie z innym białkiem lub z kwasami nukleinowymi.

Serwer ConSurf wskazuje konserwowanie reszt aminokwasowych na podstawie filogenetycznych relacji pomiędzy zdeponowaną sekwencją a sekwencjami homologicznymi w ogólnie dostępnych bazach danych. Stopień pokrewieństwa ewolucyjnego obliczany jest na podstawie metod statystyki bayesowskiej (*Bayesian method*) i metody największej wiarygodności (*maximum likelihood method*). Reszty o silnej konserwacji ewolucyjnej są wskazywane jako istotne funkcjonalnie dla danego białka.

Serwer SNAP2 umożliwia przewidywanie efektów funkcjonalnych przy mutacjach białka. Program opiera się na sieci neuronowej, która rozróżnia istotny efekt mutacji od wariantów neutralnych/niesynonimicznych SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Oprócz obszernej analizy różnorodnych wariantów sekwencji, SNAP2 bierze po uwagę ewolucyjny kontekst sekwencji uzyskany z wygenerowanego zestawienia sekwencji

homologicznych. Na tej podstawie dostępne są również przewidywania struktury drugorzędowej i dostępności rozpuszczalnika do reszt.

7. Bibliografia

- Abdelqader A., Irshaid R., Al-Fataftah A.R. (2013). Effects of dietary probiotic inclusion on performance, eggshell quality, cecal microflora composition, and tibia traits of laying hens in the late phase of production. *Trop Anim Health Prod*, 45, 1017–1024.
- Altenbuchner, J. (2016). Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5421–5427.
- Amon J. D., Artzi L. & Rudner D.Z. (2021). Genetic evidence for signal transduction within the *Bacillus subtilis* GerA germinant receptor. *Journal of Bacteriology*.
- Anagnostopoulos C. & Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 81(5), 741–746.
- Armon A., Graur, D. & Ben-Tal N. (2001). ConSurf: An algorithmic tool for the identification of functional regions in proteins by surface mapping of phylogenetic information. *Journal of Molecular Biology*, 307(1), 447–463.
- Artzi L., Alon A., Brock K.P., Green A.G., Tam A., Ramírez-Guadiana F.H., Marks D., Kruse A. & Rudner D.Z. (2021). Dormant spores sense amino acids through the B subunits of their germination receptors. *Nature Communications*, 12(1), 6842.
- Ashkenazy H., Abadi S., Martz E., Chay O., Mayrose I., Pupko T. & Ben-Tal N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W344–W350.
- Ashkenazy H., Erez E., Martz E., Pupko T. & Ben-Tal N. (2010). ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2).
- Aslankoochi E., Rezaei M., Vervoort Y. et al. (2015). Glycerol production by fermenting yeast cells is essential for optimal bread dough fermentation. *PLoS ONE*, 10, e0119364.
- Aspholm M., Borch-Pedersen K., O’Sullivan K., Fjellheim S., Aardal I.H.B., Granum P.E., & Lindbäck T. (2019). Importance of Individual Germination Receptor Subunits in the Cooperative Function between GerA and Ynd. *Journal of Bacteriology*, 201(21).
- Atluri S., Ragkousi K., Cortezzo D.E., & Setlow P. (2006). Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 28–36.
- Bateman A., Martin M.J., Orchard S., Magrane M., Agivetova R., Ahmad S., Alpi E., Bowler-Barnett E. H., Britto R., Bursteinas B., Bye-A-Jee H., Coetzee R., Cukura A., Silva A. Da, Denny P., Dogan T., Ebenezer T.G., Fan J., Castro L.G., ... Zhang, J. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489.
- Ben-Yehuda S., Fujita M., Liu X.S., Gorbatyuk B., Skoko D., Yan J., Marko J. F., Liu J.S., Eichenberger P., Rudner D.Z. & Losick R. (2005). Defining a centromere-like element in *Bacillus subtilis* by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. *Molecular Cell*, 17(6), 773–782.
- Ben-Yehuda S. & Losick, R. (2002). Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytotkinetic protein FtsZ. *Cell*, 109(2), 257–266.

- Ben-Yehuda S., Rudner D.Z. & Losick, R. (2003a). RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science*, 299(5606), 532–536.
- Ben-Yehuda S., Rudner D.Z. & Losick R. (2003b). Assembly of the SpoIIIE DNA translocase depends on chromosome trapping in *Bacillus subtilis*. *Current Biology*, 13(24), 2196–2200.
- Berkhout J., Teusink B. & Bruggeman, F. J. (2013). Gene network requirements for regulation of metabolic gene expression to a desired state. *Scientific Reports* 2013 3:1, 3(1), 1–10.
- Bernhofer M., Dallago C., Karl T., Satagopam V., Heinzinger M., Littmann M., Olenyi T., Qiu J., Schütze K., Yachdav G., Ashkenazy H., Ben-Tal N., Bromberg Y., Goldberg T., Kajan L., O’Donoghue S., Sander C., Schaffnerhans A., Schlessinger A., ... Rost B. (2021). PredictProtein - Predicting Protein Structure and Function for 29 Years. *Nucleic Acids Research*.
- Beskrovnaya P., Sexton D. L., Golmohammadzadeh M., Hashimi A. & Tocheva E. I. (2021). Structural, metabolic and evolutionary comparison of bacterial endospore and exospore formation. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Bischofs I. (2020). Sporenbildung bei *Bacillus subtilis*: Masse oder Klasse? In *BioSpektrum* (Vol. 26, Issue 6, pp. 606–608). Springer Spektrum.
- Black E. P., Koziol-Dube K., Guan D., Wei J., Setlow B., Cortezzo D.E., Hoover D.G. & Setlow P. (2005). Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5879–5887.
- Blinker S., Vreede J., Setlow P. & Brul S. (2021). Predicting the structure and dynamics of membrane protein GerAB from *Bacillus subtilis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3793.
- Breedijk R.M.P., Wen J., Krishnaswami V., Bernas T., Manders E.M.M., Setlow P., Vischer N.O.E. & Brul, S. (2020). A live-cell super-resolution technique demonstrated by imaging germinosomes in wild-type bacterial spores. *Scientific Reports*, 10(1).
- Bressuire-Isoard C., Broussolle V. & Carlin F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: Evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 42, Issue 5, pp. 614–626). Oxford University Press.
- Bromberg Y. & Rost B. (2007). SNAP: Predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Research*, 35(11), 3823–3835.
- Budde I., Steil L., Scharf C., Völker U. & Bremer E. (2006). Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: A combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology*, 152(3), 831–853.
- Burbulys D., Trach K., Hoch J. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 64, 545–552.
- Burby P. & Simmons L. (2017). CRISPR/Cas9 Editing of the *Bacillus subtilis* Genome. *BIO-PROTOCOL*, 7(8).
- Burkholder P.R. & Giles N.H. (1947). Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *American Journal of Botany*, 34(6), 345–348.
- Bylund J.E., Haines M.A., Piggot P.J. & Higgins M.L. (1993). Axial filament formation in *Bacillus subtilis*: Induction of nucleoids of increasing length after addition of chloramphenicol to exponential-phase cultures approaching stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 175(7), 1886–1890.

- Cabrera-Hernandez A., Sanchez-Salas J. L., Paidhungat M. & Setlow P. (1999). Regulation of four genes encoding small, acid-soluble spore proteins in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 232(1), 1–10.
- Camp A. H. & Losick R. (2009). A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 23(8), 1014–1024.
- Celniker G., Nimrod G., Ashkenazy H., Glaser F., Martz E., Mayrose I., Pupko T. & Ben-Tal N. (2013). ConSurf: Using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function. *Israel Journal of Chemistry* (Vol. 53, Issues 3–4, pp. 199–206).
- Chander M., Setlow B. & Setlow P. (1998). The enzymatic activity of phosphoglycerate mutase from gram-positive endospore-forming bacteria requires Mn^{2+} and is pH sensitive. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(8), 759–767.
- Chary V.K., Xenopoulos P. & Piggot P. J. (2006). Blocking chromosome translocation during sporulation of *Bacillus subtilis* can result in prespore-specific activation of σ_G that is independent of σ_E and of engulfment. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7267–7273.
- Cho W. II & Chung M.S. (2020). *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology* (Vol. 29, Issue 11, pp. 1447–1461). The Korean Society of Food Science and Technology.
- Choi W. & Kim S.S. (2020). Outbreaks, germination, and inactivation of *Bacillus cereus* in food products: A review. *Journal of Food Protection* (Vol. 83, Issue 9, pp. 1480–1487). International Association for Food Protection.
- Colas de la Noue A., Natali F., Fekraoui F., Gervais P., Martinez N., Perrier-Cornet J.M., & Peters J. (2020). The molecular dynamics of bacterial spore and the role of calcium dipicolinate in core properties at the sub-nanosecond time-scale. *Scientific Reports*, 10(1).
- Corfe B.M., Moir A., Popham D. & Setlow P. (1994). Analysis of the expression and regulation of the *gerB* spore germination operon of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*, 140(11), 3079–3083.
- Cowan A.E., Koppel D.E., Setlow B. & Setlow P. (2003). A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: Implications for spore dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4209–4214.
- Cowan A.E., Olivastro E.M., Koppel D.E., Loshon C.A., Setlow B. & Setlow P. (2004). Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7733–7738.
- Cui W., Han L., Suo F., Liu Z., Zhou L. & Zhou Z. (2018). Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 34, Issue 10). Springer Netherlands.
- D’Amelio E., Gentile B., Lista F. & D’Amelio R. (2015). Historical evolution of human anthrax from occupational disease to potentially global threat as bioweapon. *Environment International* (Vol. 85, pp. 133–146). Elsevier Ltd.
- Danilova I. & Sharipova M. (2020). The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11, p. 1782). Frontiers Media S.A.
- Dar D. & Sorek R. (2018). Extensive reshaping of bacterial operons by programmed mRNA decay. *PLoS Genetics*, 14(4), 1–19.

- De Daruvar A., Collado-Vides J. & Valencia A. (2002). Analysis of the cellular functions of *Escherichia coli* operons and their conservation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Evolution*, 55(2), 211–221.
- de Francesco M.D., Jacobs J.Z., Nunes F., Serrano M., Mckenney P.T., Chua M.H., Henriques A.O. & Eichenberger P. (2012). Physical interaction between coat morphogenetic proteins SpoVID and CotE is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 4941–4950.
- Decker A.R. & Ramamurthi K.S. (2017). Cell death pathway that monitors spore morphogenesis. *Trends in Microbiology*, 25(8), 637–647.
- Deng Y., Sun M. & Shaevitz J.W. (2011). Direct measurement of cell wall stress stiffening and turgor pressure in live bacterial cells. *Physical Review Letters*, 107(15).
- Doan T., Coleman J., Marquis K.A., Meeske A.J., Burton B.M., Karatekin E. & Rudner D.Z. (2013). FisB mediates membrane fission during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 27(3), 322–334.
- Dong H., Zahng D. (2014). Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species. *Microb Cell Fact*, 13, 63.
- Dubnau D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. In *Microbiological Reviews* (Vol. 55, Issue 3, pp. 395–424). American Society for Microbiology (ASM).
- Dunne W.M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166.
- Dworkin J. (2014). Protein Targeting during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Microbiology Spectrum*, 2(1).
- Eichenberger P., Fujita M., Jensen S.T., Conlon E.M., Rudner D.Z., Wang S.T., Ferguson C., Haga K., Sato T., Liu J.S. & Losick R. (2004). The Program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology*, 2(10), e328.
- Eijlander R.T., Abee T. & Kuipers O.P. (2011). Bacterial spores in food: How phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior. *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 180–186).
- Errington J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews* (Vol. 57, Issue 1, pp. 1–33).
- Feavers I.M., Foulkes J., Setlow B., Sun D., Nicholson W., Setlow P. & Moir A. (1990). The regulation of transcription of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 4(2), 275–282.
- Feavers I.M., Miles J.S. & Moir A. (1985). The nucleotide sequence of a spore germination gene (*gerA*) of *Bacillus subtilis* 168. *Gene*, 38(1–3), 95–102.
- Fernandes C.G., Moran C.P. & Henriques A.O. (2018). Autoregulation of SafA assembly through recruitment of a protein cross-linking enzyme. *Journal of Bacteriology*, 200(14).
- Fitz-James P.C. (1960). Participation of the cytoplasmic membrane in the growth and spore formation of bacilli. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 8, 507–528.
- Friedline A.W., Zachariah M.M., Johnson K., Thomas K.J., Middaugh A.N., Garimella R., Powell D. R., Vaishampayan P.A. & Rice C.V. (2014). Water behavior in bacterial spores by deuterium NMR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(30), 8945–8955.

- Fujita M., González-Pastor J.E. & Losick R. (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1357–1368.
- Fujita M., Losick R. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev*, 19, 2236–2244.
- Fukushima T., Yamamoto H., Atrih A., Foster S.J. & Sekiguchi J. (2002). A polysaccharide deacetylase gene (*pdaA*) is required for germination and for production of muramic δ -lactam residues in the spore cortex of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(21), 6007–6015.
- Ghosh S., Korza G., Maciejewski M. & Setlow P. (2015). Analysis of metabolism in dormant spores of *Bacillus* species by ³¹P nuclear magnetic resonance analysis of low-molecular-weight compounds. *Journal of Bacteriology*, 197(5), 992–1001.
- Glaser F., Pupko T., Paz I., Bell R.E., Bechor-Shental D., Martz E. & Ben-Tal N. (2003). ConSurf: Identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics*, 19(1), 163–164.
- Gray D.A., Dugar G., Gamba P., Strahl H., Jonker M.J. & Hamoen L.W. (2019). Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature Communications*, 10(1).
- Grela A., Jamrózek I., Hubisz M., Iwanicki A., Hinc K., Kaźmierkiewicz R. & Obuchowski, M. (2018). Positions 299 and 302 of the GerAA subunit are important for function of the GerA spore germination receptor in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, 13(6).
- Griffiths K.K., Zhang J., Cowan A.E., Yu J. & Setlow P. (2011). Germination proteins in the inner membrane of dormant *Bacillus subtilis* spores colocalize in a discrete cluster. *Molecular Microbiology*, 81(4), 1061–1077.
- Gupta R.S. (2000). The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 26, Issue 2, pp. 111–131). CRC Press LLC.
- Han J.H., Batey S., Nickson A.A., Teichmann S.A. & Clarke J. (2007). The folding and evolution of multidomain proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:4, 8(4), 319–330.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
- Hashmi I., Paul C., Al-Dourobi A., Sandoz F., Deschamps P., Junier T., Junier P. & Bindschedler S. (2019). Comparison of the plant growth-promotion performance of a consortium of *Bacilli* inoculated as endospores or as vegetative cells. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(11).
- Hecht M., Bromberg Y. & Rost B. (2015). Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics*, 16 Suppl 8
- Helmann J.D., Wu M.F.W., Kobel P.A., Gamo F.J., Wilson M., Morshedi M.M., Navre M. & Paddon C. (2001). Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7318–7328.
- Henriques A.O. & Moran C.P. (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 61, pp. 555–588).
- Hernández-González I.L., Moreno-Hagelsieb G. & Olmedo-Álvarez G. (2018). Environmentally-driven gene content convergence and the *Bacillus* phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–15.

- Hindle A.A. & Hall E.A.H. (1999). Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst*, *124*(11), 1599–1604.
- Höfler C., Heckmann J., Fritsch A., Popp P., Gebhard S., Fritz G. & Mascher T. (2016). Cannibalism stress response in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (United Kingdom)*, *162*(1), 164–176.
- Holtmann G., Brigulla M., Steil L., Schütz A., Barnekow K., Völker U. & Bremer E. (2004). RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *Journal of Bacteriology*, *186*(18), 6150–6158.
- Hong H.A., Khaneja R., Tam N.M.K., Cazzato A., Tan S., Urdaci M., Brisson A., Gasbarrini A., Barnes I. & Cutting S.M. (2009). *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in Microbiology*, *160*(2), 134–143.
- Huang P., Pleasance E.D., Maydan J.S., Hunt-Newbury R., O’Neil N.J., Mah A., Baillie D.L., Marra M.A., Moerman D.G. & Jones S.J.M. (2007). Identification and analysis of internal promoters in *Caenorhabditis elegans* operons. *Genome Research*, *17*(10), 1478.
- Huang S.S., Chen D., Pelczar P.L., Vepachedu V.R., Setlow P. & Li Y.Q. (2007). Levels of Ca²⁺-dipicolinic acid in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic Raman tweezers. *Journal of Bacteriology*, *189*(13), 4681–4687.
- Hudson K.D., Corfe B.M., Kemp E.H., Feavers I.M., Coote P.J. & Moir A. (2001). Localization of GerAA and GerAC germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore. *Journal of Bacteriology*, *183*(14), 4317–4322.
- Huvet M. & Stumpf M.P.H. (2014). Overlapping genes: A window on gene evolvability. *BMC Genomics*, *15*(1).
- Igarashi T. & Setlow P. (2005). Interaction between individual protein components of the GerA and GerB nutrient receptors that trigger germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, *187*(7), 2513–2518.
- Iinskaya O.N., Ulyanova V.V., Yarullina D.R. & Gataullin I.G. (2017). Secretome of intestinal bacilli: A natural guard against pathologies. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue SEP, p. 1666). Frontiers Media S.A.
- Illades-Aguilar B. & Setlow, P. (1994). Autoprocessing of the protease that degrades small, acid-soluble proteins of spores of *Bacillus* species is triggered by low pH, dehydration, and dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, *176*(22), 7032–7037.
- Imamura D., Kuwana R., Takamatsu H. & Watabe K. (2010). Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *Journal of Bacteriology*, *192*(2), 518–524.
- Inanami T., Terada T.P. & Sasai M. (2014). Folding pathway of a multidomain protein depends on its topology of domain connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(45), 15969–15974.
- Itaya M., Kondo K. & Tanaka T. (1989). A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res*, *17*.
- Jacob F. & Monod J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, *3*(3), 318–356.
- Kaieda S., Setlow B., Setlow P. & Halle B. (2013). Mobility of core water in *Bacillus subtilis* spores by 2H NMR. *Biophysical Journal*, *105*(9), 2016–2023.

- Karp P. D., Billington R., Caspi R., Fulcher C.A., Latendresse M., Kothari A., Keseler I.M., Krummenacker M., Midford P.E., Ong Q., Ong W.K., Paley S.M. & Subhraveti P. (2019). The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1085–1093.
- Kawata T., Inoue T. & Takagi A. (1963). Electron microscopy of spore formation and germination in *Bacillus subtilis*. *Japanese Journal of Microbiology*, 7(1), 23–41.
- Keijsers B.J.F., Ter Beek A., Rauwerda H., Schuren F., Montijn R., Van Der Spek H. & Brul, S. (2007). Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3624–3634.
- Khanna K., Lopez-Garrido J., Zhao Z., Watanabe R., Yuan Y., Sugie J., Pogliano K. & Villa E. (2019). The molecular architecture of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *ELife*, 8.
- Ki S.L., Bumbaca D., Kosman J., Setlow P. & Jędrzejewski M.J. (2008). Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2806–2811.
- Kim E.Y., Tyndall E.R., Huang K.C., Tian F. & Ramamurthi K.S. (2017). Dash-and-recruit mechanism drives membrane curvature recognition by the small bacterial protein SpoVM. *Cell Systems*, 5(5), 518–526.e3.
- Knudsen S.M., Cermak N., Delgado F.F., Setlow B., Setlow P. & Manalis S.R. (2016). Water and small-molecule permeation of dormant *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 168–177.
- Kobayashi H., Akitomi J., Fujii N., Kobayashi K., Altaf-Ul-Amin M., Kurokawa K., Ogasawara N. & Kanaya S. (2007). The entire organization of transcription units on the *Bacillus subtilis* genome. *BMC Genomics*, 8.
- Kobayashi K., Ehrlich S.D., Albertini A., Amati G., Andersen K.K., Arnaud M., Asai K., Ashikaga S., Aymerich S., Bessières P., Boland F., Brignell S.C., Bron S., Bunai K., Chapuis J., Christiansen L.C., Danchin A., Débarbouillé M., Dervyn E., ... Ogasawara N. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4678–4683.
- Kobayashi K. & Ikemoto Y. (2019). Biofilm-associated toxin and extracellular protease cooperatively suppress competitors in *Bacillus subtilis* biofilms. *PLoS Genetics*, 15(10).
- Koch R. (1876). The etiology of anthrax, based on the life history of. *Beitrage Zur Biologie Der Pflanzen*, 2(2), 277–310.
- Korza G. & Setlow P. (2013). Topology and accessibility of germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore inner membrane. *Journal of Bacteriology*, 195(7), 1484–1491.
- Kovács Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* (Vol. 27, Issue 8, pp. 724–725). Elsevier Ltd.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., ... Danchin A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256.
- Laue M., Han H.M., Dittmann C. & Setlow P. (2018). Intracellular membranes of bacterial endospores are reservoirs for spore core membrane expansion during spore germination. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12.
- Li G.W., Oh E. & Weissman J.S. (2012). The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature*, 484(7395), 538–541.

- Li Y., Jin K., Perez-Valdespino A., Federkiewicz K., Davis A., Maciejewski M.W., Setlow P. & Hao B. (2019). Structural and functional analyses of the N-terminal domain of the A subunit of a *Bacillus megaterium* spore germinant receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 166(23), 11470–11479.
- Li Y., Setlow B., Setlow P. & Hao B. (2010). Crystal Structure of the GerBC Component of a *Bacillus subtilis* Spore Germinant Receptor. *Journal of Molecular Biology*, 402(1), 8–16.
- Li Z., Siepmann F.B., Rojas Tovar L.E., Chen X. & Gänzle M.G. (2020). Effect of copy number of the spoVA2mob operon, sourdough and reutericyclin on rosy bread spoilage caused by *Bacillus spp.* *Food Microbiology*, 91.
- Liu K., Chen X. & Kaiser C.M. (2019). Energetic dependencies dictate folding mechanism in a complex protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(51), 25641–25648.
- Liutkute M., Samatova E. & Rodnina M.V. (2020). Cotranslational folding of proteins on the ribosome. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 97, 10(1), 97.
- Loison P., Hosny N.A., Gervais P., Champion D., Kuimova M.K. & Perrier-Cornet J.M. (2013). Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), 2436–2443.
- Lopez-Garrido J., Ojkic N., Khanna K., Wagner F.R., Villa E., Endres R.G. & Pogliano K. (2018). Chromosome translocation inflates *Bacillus* forespores and impacts cellular morphology. *Cell*, 172(4), 758-770.e14.
- Losick R. (1986). Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, 20(1), 625–669.
- Ma Y., Shen W., Chen X. et al. (2016). Significantly enhancing recombinant alkaline amylase production in *Bacillus subtilis* by integration of a novel mutagenesis-screening strategy with systems-level fermentation optimization. *J Biol Eng*, 10, 13.
- Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D. & Lopez R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641.
- Mckenney P.T., Driks A. & Eichenberger P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 33–44).
- Mohamed A., Chan H., Luhur J., Bauda E., Gallet B., Morlot C., Cole L., Awad M., Crawford S., Lyras D., Rudner D.Z. & Rodrigues C.D.A. (2021). Chromosome segregation and peptidoglycan remodeling are coordinated at a highly stabilized septal pore to maintain bacterial spore development. *Developmental Cell*, 56(1), 36-51.e5.
- Moir A. (2003). Bacterial spore germination and protein mobility. *Trends in Microbiology* (Vol. 11, Issue 10, pp. 452–454). Elsevier Ltd.
- Moir A. (2006). How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 526–530.
- Moir A. & Cooper G. (2015). Spore Germination. *Microbiology Spectrum*, 3(6).
- Moir A. & Smith D.A. (1990). The genetics of bacterial spore germination. *Annual Review of Microbiology* (Vol. 44, pp. 531–553). Annual Reviews Inc.

- Molle V., Fujita M., Jensen S.T., Eichenberger P., González-Pastor J.E., Liu J.S. & Losick R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1683–1701.
- Mongkoltharuk W., Cooper G.R., Mawer, J.S.P., Allan R.N. & Moir A. (2011). Effect of amino acid substitutions in the GerAA protein on the function of the alanine-responsive germinant receptor of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2268–2275.
- Mutlu A., Kaspar, C. Becker N. & Bischofs I.B. (2020). A spore quality–quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. *ISME Journal*, 14(11), 2703–2714.
- Mutlu A., Trauth S., Ziesack M., Nagler K., Bergeest J.P., Rohr K., Becker N., Höfer T. & Bischofs I.B. (2018). Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity–quality tradeoff. *Nature Communications*, 9(1).
- Nakano M.M. & Zuber P. (1998). Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology* (Vol. 52, pp. 165–190). Annu Rev Microbiol.
- Nichols D.S., Nichols P.D. & McMeekin T.A. (1995). Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and sea-ice. *Science Progress*, 78(4), 311–347.
- Nijland R., Burgess J.G., Errington J. & Veening J.W. (2010). Transformation of environmental *Bacillus subtilis* isolates by transiently inducing genetic competence. *PLoS ONE*, 5(3), 1–7.
- NOVOZYMES — Driven by research and scientists. (2001). *Nature*, 409(6817), 268–268.
- Ohye D.F. & Murrell W.G. (1962). Formation and structure of the spore of *Bacillus coagulans*. *The Journal of Cell Biology*, 14, 111–123.
- Ojkic N., López-Garrido J., Pogliano K. & Endres R.G. (2016). Cell-wall remodeling drives engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *ELife*, 5(November 2016).
- Olmos J., Acosta M., Mendoza G et al. (2020). *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Arch Microbiol*, 202, 427–435.
- Paidhungat M., Ragkousi K. & Setlow P. (2001). Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. *Journal of Bacteriology*, 183(16), 4886–4893.
- Paidhungat M. & Setlow P. (2000). Role of Ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2513–2519.
- Paidhungat M. & Setlow P. (2001). Localization of a germinant receptor protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3982–3990.
- Pelczar P.L., Igarashi T., Setlow B. & Setlow P. (2007). Role of GerD in germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 1090–1098.
- Peters J.M., Silvis M.R., Zhao D., Hawkins J.S., Gross C.A. & Qi L.S. (2015). Bacterial CRISPR: Accomplishments and prospects. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 27, pp. 121–126). Elsevier Ltd.
- Piggot P.J. & Hilbert D.W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586.
- Plomp M., Carroll A.M., Setlow P. & Malkin A.J. (2014). Architecture and assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *PLoS ONE*, 9(9).

- Plomp M., Leighton T.J., Wheeler K.E., Hill H.D. & Malkin A.J. (2007). In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9644–9649.
- Popham D.L. & Bernhards C.B. (2015). Spore Peptidoglycan. *Microbiology Spectrum*, 3(6).
- Popham D.L., Helin J., Costello C.E. & Setlow, P. (1996a). Analysis of the peptidoglycan structure of *Bacillus subtilis* endospores. *Journal of Bacteriology*, 178(22), 6451–6458.
- Popham D.L., Helin J., Costello C.E. & Setlow P. (1996b). Muramic lactam in peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15405–15410.
- Powell J.F. & Strange R.E. (1953). Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. *The Biochemical Journal*, 54(2), 205–209.
- Quax T.E.F., Wolf Y.I., Koehorst J.J., Wurtzel O., van der Oost R., Ran W., Blombach F., Makarova K.S., Brouns S.J.J., Forster A.C., Wagner E.G.H., Sorek,R., Koonin E.V. & van der Oost J. (2013). Differential translation tunes uneven production of operon-encoded proteins. *Cell Reports*, 4(5), 938–944.
- Rahmer R., Heravi K.M. & Altenbuchner J. (2015). Construction of a super-competent *Bacillus subtilis* 168 using the PmtIA-comKS inducible cassette. *Frontiers in Microbiology*, 6(Dec), 1–11.
- Ramirez-Peralta A., Stewart K.A.V., Thomas S.K., Setlow B., Chen Z., Li Y.Q. & Setlow P. (2012). Effects of the SpoVT regulatory protein on the germination and germination protein levels of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3417–3425.
- Rao C.V., Glekas G.D. & Ordal G.W. (2008). The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends in Microbiology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 480–487).
- Rattray J.E., Chakraborty A., Li C., Elizondo G., John N., Wong M., Radović J.R., Oldenburg T.B.P. & Hubert C.R.J. (2020). Sensitive quantification of dipicolinic acid from bacterial endospores in soils and sediments. *Environmental Microbiology*.
- Riley E.P., Lopez-Garrido J., Sugie J., Liu R.B. & Pogliano K. (2021). Metabolic differentiation and intercellular nurturing underpin bacterial endospore formation. *Science Advances*, 7(4).
- Riley E.P., Schwarz C., Derman A.I. & Lopez-Garrido J. (2021). Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microbial Cell*, 8(1), 1–16.
- Rogozin I.B., Makarova K.S., Murvai J., Czabarka E., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Szekely L.A. & Koonin E.V. (2002). Connected gene neighborhoods in prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 30(10), 2212–2223.
- Ross C. & Abel-Santos E. (2010). The Ger receptor family from sporulating bacteria. *Current Issues in Molecular Biology*, 12(3), 147–158.
- Sanchez-Salas J.L., Setlow B., Zhang P., Li Y.Q. & Setlow P. (2011). Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6746–6754.
- Sayer C.V., Barat B. & Popham D.L. (2019). Identification of L-Valine-initiated germination-active genes in *Bacillus subtilis* using Tn-seq. *PLoS ONE*, 14(6), 1–20.

- Schallmeyer M., Singh A. & Ward O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus species* for industrial production. In *Canadian Journal of Microbiology* (Vol. 50, Issue 1, pp. 1–17). NRC Research Press Ottawa, Canada.
- Schroeder J.W. & Simmons L.A. (2013). Complete Genome Sequence of *Bacillus subtilis* Strain PY79. *Genome Announcements*, 1(6), 1085–1098.
- Schultz D., Wolynes P.G., Jacob E. Ben & Onuchic J.N. (2009). Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21027–21034.
- Schumann W. (2016). Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress and Chaperones* (Vol. 21, Issue 6, pp. 959–968). Cell Stress and Chaperones.
- Sesto N., Wurtzel O., Archambaud C., Sorek R. & Cossart P. (2013). The excludon: A new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 75–82.
- Setlow B., Cowan A.E. & Setlow P. (2003). Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 637–648.
- Setlow B., Wahome P.G. & Setlow P. (2008). Release of small molecules during germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4759–4763.
- Setlow P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 550–556.
- Setlow P. (2005). The bacterial spore: nature's survival package. *Culture*, 26(2), 1–4.
- Setlow P. (2008). Dormant spores receive an unexpected wake-up call. *Cell*, 135(3), 410–412.
- Setlow P. (2014). Spore resistance properties. *Microbiology Spectrum*, 2(5).
- Shah I.M., Laaberki M.H., Popham D.L. & Dworkin J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell*, 135(3), 486–496.
- Shugart L.R. (2005). *Bacillus cereus*. *Encyclopedia of Toxicology*, 2(3), 203–203.
- Sinai L., Rosenberg A., Smith Y., Segev E. & Ben-Yehuda S. (2015). The molecular timeline of a reviving bacterial spore. *Molecular Cell*, 57(4), 695–707.
- Singh R., Kumar M., Mittal A. & Mehta P.K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* (Vol. 6, Issue 2, pp. 1–15). Springer Verlag.
- Singh R.P., Setlow B. & Setlow P. (1977). Levels of small molecules and enzymes in the mother cell compartment and forespore of sporulating *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 130(3), 1130–1138.
- Sonenshein A. L. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, Figure 1, 561–566.
- Soule M.H. (1932). Identity of *Bacillus subtilis*, Cohn 1872. *Journal of Infectious Diseases*, 51(2), 191–215.
- Souza V.L., Lopes N., Zacaroni O. et al (2017). Lactation performance and diet digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores. *Livestock Science*, 200, 35–39.
- Spizizen J. (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(10), 1072–1078.

- Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857.
- Stewart K.A.V. & Setlow, P. (2013). Numbers of individual nutrient germinant receptors and other germination proteins in spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 195(16), 3575–3582.
- Su Y., Liu C., Fang H. & Zhang D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 19, Issue 1, pp. 1–12). BioMed Central Ltd.
- Sunde E.P., Setlow P., Hederstedt L. & Halle B. (2009). The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46), 19334–19339.
- Swarge B., Abhyankar W., Jonker M., Hoefsloot H., Kramer G., Setlow P., Brul S. & de Koning L.J. (2020). Integrative analysis of proteome and transcriptome dynamics during *Bacillus subtilis* spore revival. *MSphere*, 5(4).
- Takahashi I. (1963). Transducing phages for *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 31, 211–217.
- Tan I.S. & Ramamurthi K.S. (2013). Membrane remodeling: FisB will do in a pinch. *Current Biology*, 23(6), R251–R253.
- Taylor M.J. & Thorne C.B. (1963). Transduction of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* by each of two phages. *Journal of Bacteriology*, 86, 452–461.
- Traag B.A., Pugliese A., Setlow B., Setlow P. & Losick R. (2013). A conserved ClpP-like protease involved in spore outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 90(1), 160–166.
- Tunyasuvunakool K., Adler J., Wu Z., Green T., Zielinski M., Židek A., Bridgland A., Cowie A., Meyer C., Laydon A., Velankar S., Kleywegt G.J., Bateman A., Evans R., Pritzel A., Figurnov M., Ronneberger O., Bates R., Kohl S.A.A., ... Hassabis D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* 2021, 1–9.
- Vepachedu V.R. & Setlow P. (2007). Role of SpoVA proteins in release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by dodecylamine or lysozyme. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1565–1572.
- Vishnoi M., Narula J., Devi S.N., Dao H.A., Igoshin O.A. & Fujita M. (2013). Triggering sporulation in *Bacillus subtilis* with artificial two-component systems reveals the importance of proper Spo0A activation dynamics. *Molecular Microbiology*, 90(1), 181–194.
- Vlamakis H, Chai Y., Beaugregard P. et al. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 157–168.
- Walker L., Boddington C., Jenkins D., Wang Y., Grønlund J.T., Hulsmans J., Kumar S., Patel D., Moore J.D., Carter A., Samavedam S., Bonomo G., Hersh D.S., Coruzzi G.M., Burroughs N.J. & Gifford M.L. (2017). Changes in gene expression in space and time orchestrate environmentally mediated shaping of root architecture. *The Plant Cell*, 29(10), 2393–2412.
- Wang A. & Ash G.J. (2015). Whole genome phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). *Scientific Reports*, 5, 1–14.

- Wang Y., Yue X.J., Yuan S.F., Hong Y., Hu W.F. & Li Y.Z. (2021). Internal promoters and their effects on the transcription of operon genes for epothilone production in *Myxococcus xanthus*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 919.
- Warriner K. & Waites W.M. (1999). Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose:ribose. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 97–102.
- Westbrook A.W., Moo-Young M., Perry C. (2016). Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 82, 4876.
- Wollman A.J.M., Muchová K., Chromiková Z., Wilkinson A.J., Barák I. & Leake M.C. (2020). Single-molecule optical microscopy of protein dynamics and computational analysis of images to determine cell structure development in differentiating *Bacillus subtilis*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1474–1486.
- Wu L.J. & Errington J. (1997). Septal localization of the SpoIIIE chromosome partitioning protein in *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal*, 16(8), 2161–2169.
- Yasbin R.E. & Young F.E. (1974). Transduction in *Bacillus subtilis* by Bacteriophage SPP1. *Journal of Virology*, 14(6).
- Yasuda Y., Sakae Y. & Tochikubo K. (1996). Immunological detection of the GerA spore germination proteins in the spore integuments of *Bacillus subtilis* using scanning electron microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 139(2–3), 235–238.
- Yasuda Y. & Tochikubo K. (1985). Germination-initiation and inhibitory activities of L- and D-Alanine analogues for *Bacillus subtilis* spores modification of methyl group of l- and d-Alanine. *Microbiology and Immunology*, 29(3), 229–241.
- Yi X., Liu J., Faeder J.R. & Setlow P. (2011). Synergism between different germinant receptors in the germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 4664–4671.
- Young I.E. & Fitz-James P.C. (1959). Chemical and morphological studies of bacterial spore formation: The formation of spores in *Bacillus cereus*. *Journal of Cell Biology*, 6(3), 467–482.
- Youngman P.J., Perkins J.B. & Losick R. (1983). Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8 I), 2305–2309.
- Yuan G. & Wong S.L. (1995). Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the sigma A-like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE). *Journal of Bacteriology*, 177(19), 5427–5433.
- Zeigler D.R., Prágai Z., Rodriguez S., Chevreux B., Muffler A., Albert T., Bai R., Wyss M. & Perkins J.B. (2008). The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 6983–6995.
- Zhang X., Al-Dossary A., Hussain M., Setlow P. & Li J. (2020). Applications of *Bacillus subtilis* spores in biotechnology and advanced materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(17).
- Zheng L., Abhyankar W., Ouwering N., Dekker H.L., Van Veen H., Van Der Wel N.N., Roseboom W., De Koning L.J., Brul S. & De Koster C.G. (2016). *Bacillus subtilis* spore inner membrane proteome. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 585–594.
- Zhu B. & Stülke J. (2018). SubtiWiki in 2018: From genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D743–D748.

Zuberi A.R., Feavers I.M. & Moir A. (1985). Identification of three complementation units in the *gerA* spore germination locus of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 162(2), 756–762.

Zuberi A.R., Moir A. & Feavers I.M. (1987). The nucleotide sequence and gene organization of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis* 168. *Gene*, 51(1), 1–11.

8. Załączniki

Rycina S1. Zestawienie sekwencji aminokwasowych białek A bakterii przetrwalnikujących

AA_Bsub168	1	-----MEQTEFKEYI
AA_BsubW23	1	-----MEQTEFKEYI
AA_BthHD73	1	-----MFGLLSSKKSCKTN
AA_BthYBT-1518	1	-----
AA_BthHD-771	1	-----
AA_BamCC178	1	-----MAQSEFKEYI
AA_BcerQ1	1	---MEVKRQTS-----EKNNIQSKTKQEYKPSQNTIVHFTNDF
AA_BcerAH187	1	MSWWKSRDKQV-----KKNNIQSKTKQEYKPSQNTIVHFTNDF
AA_BantAmesAnce	1	-----
AA_BantAmes	1	-----
AA_BantSterne	1	-----
AA_BlichATCC145	1	-----MTQSEFKEHI
AA_Bmega	1	-----MLDSKFQPNA
AA_Bpumi	1	-----MNQTPKLEHL
AA_BhaloC-125	1	-----
AA_Cbot	1	-----MRDKL
AA_LbacsphC3-41	1	MQGF---LAFVIFPLIFKLFNGLILEKKNNGKIDMKEYTNQKEVDQPSSQETVASLTGDF
consensus	1	1
AA_Bsub168	11	HDN[ALVLPK]KEND[DLVKNKKM]ANG-L-VFY[IFSE]T[DENK]SEA[KTLLKD]----
AA_BsubW23	11	HDN[ALVLPK]KEND[DLVKNKKM]SNG-L-VFY[IFSE]N[QKKVAES]KTLLKD----
AA_BthHD73	14	TKT[CS]TPEF[QTMK]SSDFVSYN[LKDE-TLCLF]FYK[SVE]ALI[KQFI]TP[KKES]--
AA_BthYBT-1518	1	-----MKLLMDDFSD
AA_BthHD-771	1	-----MKLLMDDFSD
AA_BamCC178	11	HVN[ALVLPK]VEQND[DLVQNKKM]PNG-L-VFY[MLSE]N[DEDK]KEA[ETLLQ]----
AA_BcerQ1	36	ASN[ELIKQQ]GHNS[DVFRFKFN]GRTDI-QAGI[VEVDG]SDKEI[DKHIMKLLMDDFSD]
AA_BcerAH187	39	ASN[ELIKQQ]GHNS[DVFRFKFN]GRTDI-QAGI[VEVDG]SDKEI[DKHIMKLLMDDFSD]
AA_BantAmesAnce	1	-----MKLLMDDFSD
AA_BantAmes	1	-----MKLLMDDFSD
AA_BantSterne	1	-----MKLLMDDFSD
AA_BlichATCC145	11	HEN[AM]LPH[EHND]DLIQ[NKKM]KNG-I-IFY[FYFKD]N[DDKK]QKA[AKL]VSD----
AA_Bmega	11	DYT[QTFLDLV]GQNT[DVGSKKLW]SPT-K-YICI[YLQG]VDGEK[DNLTQ]EVV[ETKAK]-
AA_Bpumi	11	YDN[SV]LPLQ[KEMDD]LVH[HKKT]PHG-Q-VVY[VIKE]N[EKME]QTF[KL]LQ[Q]----
AA_BhaloC-125	1	-----LVD-----RKR--
AA_Cbot	6	DDK[KP]L[LDK]NAPDKFNV[KIN]GKGNNIKITL[VYDKD]IDRNI[NDY]L[KPL]LHV[E]
AA_LbacsphC3-41	58	IKDFER[IKQE]GHNWD[AHFREFH]GNTHI-RAAI[VYLEG]ADKGO[EEHI]LTSV[MRFSD]
consensus	61	61 * * * * *
AA_Bsub168	65	-----[EETLLD]QV[KKRLDQ]DA-RPVETA[AKTIES]LNGCAVFIN--GLDKAYI
AA_BsubW23	65	-----[EETLLD]QV[KKRLDQ]DA-RPVETA[EKTVEE]LSGNCAVFIN--GLDKAYI
AA_BthHD73	71	-----[EQIQNIS]DLCLN[ITS]EDI[ITSPS]D[FREK]LGGYLLIRKNDNSNPQYA
AA_BthYBT-1518	11	EYKNESSYVE[GT]VSKEYI[KNKVLT]SEVAEVHY[KDL]IPK[LIG]STALLID--GLADVFI
AA_BthHD-771	11	EYKNETSYVE[GT]VSKEYI[KNKVLT]SEVAEVHY[KDL]IPK[LIG]STALLID--GLADVFI
AA_BamCC178	65	-----[EDTL]LDTV[KR]LDKIDA-RPVFTS[KEAVIS]LIRGKCAVFIN--GLDSVYI
AA_BcerQ1	95	EYKNESSYVE[GT]VSKEYI[KNKVLT]SEVAEVHY[KDL]IPK[LIG]STALLID--GLADVFI
AA_BcerAH187	98	EYKNESSYVE[GT]VSKEYI[KNKVLT]SEVAEVHY[KDL]IPK[LIG]STALLID--GLADVFI
AA_BantAmesAnce	11	EYKNESSYVE[GT]VSKEYI[KNKVLT]SEVAEVHY[KDL]IPK[LIG]STALLID--GLADVFI
AA_BantAmes	11	EYKNESSYVE[GT]VSKEYI[KNKVLT]SEVAEVHY[KDL]IPK[LIG]STALLID--GLADVFI
AA_BantSterne	11	EYKNESSYVE[GT]VSKEYI[KNKVLT]SEVAEVHY[KDL]IPK[LIG]STALLID--GLADVFI
AA_BlichATCC145	65	-----[DSSYS]LEDVRLRNKUNA-EPVTA[KDAINA]FKGKCLLLIN--GLNTVFA
AA_Bmega	68	-----[SETQ]LDD[IDS]FSV[KD]KEVYTYKQA[ISS]FFKQPLLEIS--ESTAYS
AA_Bpumi	65	-----[HTSL]TKK[ESNLSM]TT-RSVKTSE[ELVDA]FECHCVLLIN--CFQHAYI
AA_BhaloC-125	7	-----[LEWVV]VDHLAKHQAI[PD]IHK[LE]KEVEDE[LK]GFCVTK--HG--DSWF
AA_Cbot	66	SFTG----[KENT]EIL[EKY]-TCVDDTILKTDAE[ETDF]KKGSTAVFV[PP]--NSENTII
AA_LbacsphC3-41	117	TS--ATALT[ENGNM]QNL[KNNI]-P[IGD]VLEEST[MOG]EVSK[LIGY]TALFYD--G[PNALL]
consensus	121	121 * * * * *

AA_Bsub168 113 LITGK---KKTRSI TEPTSEKVVVRGPKVAEVEDIDTNIALRQRTSHPKLITKKMIGEN
AA_BsubW23 113 LSTGK---KKTRSIQEPTSEKVVVRGPKVAEVEDIDTNIALRQRTPHPKLITKKMIGKN
AA_BthHD73 121 LIRAESTVLGKRLYNTENEYSVITGPKTGFVENIDTNIHLLRRNIVTEQLIFKEIVTGSII
AA_BthYBT-1518 69 LGTIK---ANKRNV EEPVSEALVRGPRVGFTEVLSNTSLLRRHCADESLSLVKLPVGER
AA_BthHD-771 69 LGTIK---ANKRNV EEPVSEALVRGPRVGFTEVLSNTSLLRRHCADESLSLVKLPVGER
AA_BamCC178 113 LSTGK---REKRSVNEPTSEKVVVRGPKVAEVEDIDTNSALRQRTNHPKLTKKMIGEN
AA_BcerQ1 153 LGTIK---ANKRNV EEPVSEALVRGPRVGFTEVLSNTSLLRRHCADESLSLVKLPVGER
AA_BcerAH187 156 LGTIK---ANKRNV EEPVSEALVRGPRVGFTEVLSNTSLLRRHCADESLSLVKLPVGER
AA_BantAmesAnce 69 LGTIK---ANKRNV EEPVSEALVRGPRVGFTEVLSNTSLLRRHCADENLSLVLKLPVGER
AA_BantAmes 69 LGTIK---ANKRNV EEPVSEALVRGPRVGFTEVLSNTSLLRRHCADENLSLVLKLPVGER
AA_BantSterne 69 LGTIK---ANKRNV EEPVSEALVRGPRVGFTEVLSNTSLLRRHCADENLSLVLKLPVGER
AA_BlichATCC145 113 LPTAE---KKKRSI GEVNIENVVRGPKVAEVEDIDTNIALRQRPDKELIVEKLEIGKS
AA_Bmega 116 LNMGM---TKQRSI SEPTSEKVVVRGPKVAEVEDIDTNIALRQRTSEELVLEDEYIGNT
AA_Bpumi 113 LEFHG---TKKRSI GSTSEAVVRGPKVAEVEDIDTNIALRQRLKNPDKITVNMKIGEK
AA_BhaloC-125 53 LPIGDR-Q--SRDVTVPETEATVTCQRLAFENLQININLLRNTVRSKDLVTEQWELGTA
AA_Cbot 118 INTVK---KDYKPLPPEIESSIRGPKVAEFTESIESNLSVINRRIKDKNLRERFIVGER
AA_LbacsphC3-41 172 LCTIN---GKTRNIEEPISEAVVRGPRVGFTEVLSNTALLRQQGENQQLSIIQLKVGKR
consensus 181 * * * * *

AA_Bsub168 170 KLKPAATMYIEGKAKKSVIKVKARIKNIQLEDIQSGTIEELIEDNKYSFPFQIQNTER
AA_BsubW23 170 KLKSAATMYIEGKAKKSVIKVKARIKNIQLEDIQSGTIEELIEDNKYSFPFQIQNTER
AA_BthHD73 181 SKTKAVAYIEGTNEQFVNTAIRLEDIDFDVPEFTSTMIEQFTISNSNSFPFVILETER
AA_BthYBT-1518 126 AKKELVVAIKDLASTELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNYLSFPFQIQNTER
AA_BthHD-771 126 AKKELVVAIKDLASTELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNYLSFPFQIQNTER
AA_BamCC178 170 KLKPAATMYIIDDKADPSVSDVVKRISSEKMDDIQSGTIEELIEDNKYSFPFQIQNTER
AA_BcerQ1 210 AKKELVVAIKDLASTELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNYLSFPFQIQNTER
AA_BcerAH187 213 AKKELVVAIKDLASTELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNYLSFPFQIQNTER
AA_BantAmesAnce 126 AKKELVVAIKDLASTELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNYLSFPFQIQNTER
AA_BantAmes 126 AKKELVVAIKDLASTELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNYLSFPFQIQNTER
AA_BantSterne 126 AKKELVVAIKDLASTELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNYLSFPFQIQNTER
AA_BlichATCC145 170 KFKLATHLYIQGKADDSIKDLKKRKKKQDDIQDITGVIEELIEDNKYSFPFQIQNTER
AA_Bmega 173 KEHRTSIVHNKHCQTHINQVVEKLLDIPDNIQSGMIEEFIEEAPYSFPFQIQNTER
AA_Bpumi 170 KYTQVITMYIDGIVETSIEKVKKRLKQITIDDIQSGVIEELIEDNVYSFPFQIQNTER
AA_BhaloC-125 110 SPISICVAYIEGKAQAGTQQIKERIQAFDIEYIEGSSHLEQLNKRYSVFPFQLHTER
AA_Cbot 175 SQTEVATHLYIEDIADEKLVNKRIRERVNLKRDHKNAGYIEEYIENNSYIVFPQSFTTER
AA_LbacsphC3-41 229 VKKELVVAIKDLVDEPELVDEIKRIQKIDIDSVLESGYIEQLIEDNLSFPFQIQNTER
consensus 241 * * * *

AA_Bsub168 230 PDRVSSALFNCRVAIIVDSPPFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIASLRLRLRFMTAFV
AA_BsubW23 230 PDRVSSALYNGRVAIIVDSPPFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIASLRLRLRFMTAFV
AA_BthHD73 241 LDRVAFALNCEVLIITDGPYALSPTLLDFFISPEDYILPWIGSFFRIREFGAIF
AA_BthYBT-1518 186 PDRVSSALMEGRVAIIVDGPFFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIPGTLRLRLRFMTAFV
AA_BthHD-771 186 PDRVSSALMEGRVAIIVDGPFFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIPGTLRLRLRFMTAFV
AA_BamCC178 230 PDRVSSALFNCRVAIIVDNPFFALVVPASLGILMQSPEDYERWIASLRLRLRFMTAFV
AA_BcerQ1 270 PDRVSSALMEGRVAIIVDGPFFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIPGTLRLRLRFMTAFV
AA_BcerAH187 273 PDRVSSALMEGRVAIIVDGPFFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIPGTLRLRLRFMTAFV
AA_BantAmesAnce 186 PDRVSSALMEGRVAIIVDGPFFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIPGTLRLRLRFMTAFV
AA_BantAmes 186 PDRVSSALMEGRVAIIVDGPFFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIPGTLRLRLRFMTAFV
AA_BantSterne 186 PDRVSSALMEGRVAIIVDGPFFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIPGTLRLRLRFMTAFV
AA_BlichATCC145 230 PDRVSSALFNCRVAIIVDNPFFALVVPASFGMVQSPEDYERWIASLRLRLRFMTAFV
AA_Bmega 233 PDRVLAANRGRVAIIVDGPFFALVVPTEFDMIMKSPEDYERWIASLRLRLRFMTAFV
AA_Bpumi 230 PDRVSSALNCRVAIIVDHSPPFVLIAPVTFMMLQSPEDYERWIASLRLRLRFMTAFV
AA_BhaloC-125 170 VDRVTAQLAGRIALFVDCNPFVLTAPHRIENLQSPEDYQMNWIMGSALRLRLRFMTAFV
AA_Cbot 235 PDVAVNIMEGKICILMEGSGQGGTVPAIEIEFFQIVEDYVQKFNLSVTRFFRVLAVVL
AA_LbacsphC3-41 289 PDRVYGALMEGRVAIIVDGPFFALVVPVTFMMLQSPEDYERWIASLRLRLRFMTAFV
consensus 301 * * * * *

```

AA_Bsub168           290  TLFSSSIYIALVVSFHQGLIPTALAVTISNRENVPFPPIFEALMEVTIELLREAGRLRP
AA_BsubW23          290  TLFSSSIYIALVVSFHQGLIPTALAVTISNRENVPFPPIFEALMEVTIELLREAGRLRP
AA_BthHD73          301  SLFSSAIYTAALTYHYQYIPADLLGHIIFSRANVPFPPIFEALFEITIELLREAGRLRP
AA_BthYBT-1518     246  SLFAPALYISFISFHPGLIPTKLAIISIIGSREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
AA_BthHD-771       246  SLFAPALYISFISFHPGLIPTKLAIISIIGSREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
AA_BamCC178        290  TLFSSSIYIALVVSFHQGLIPTSLAVTIAANRENVPFPPIFEALMEVTIELLREAGRLRP
AA_BcerQ1           330  SLFAPALYISFISFHPGLIPTKLAIISIIGSREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
AA_BcerAH187       333  SLFAPALYISFISFHPGLIPTKLAIISIIGSREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
AA_BantAmesAnce    246  SLFAPALYISFISFHPGLIPTKLAIISILGSREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
AA_BantAmes        246  SLFAPALYISFISFHPGLIPTKLAIISILGSREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
AA_BantSterne      246  SLFAPALYISFISFHPGLIPTKLAIISILGSREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
AA_BlichATCC145    290  TLFSSAFYISLVSFHQGMIPALAVTIAASRENVPFPPIFEALIMEVTIELLREAGRLRP
AA_Bmega            293  TLFSSAIYISLVSNQGLIPTELAIIAAARENVPFSPFEAVYMEVTIELLREAGRLRP
AA_Bpumi            290  TLFSSAIYIALVVSFHQGLIPTLAISISSRENVPFPPIFEALIMEVTIELLREAGRLRP
AA_BhaloC-125      230  GFVLTIPFYIAIVTTHYLVIPEDMLLAEASRSQVFPPTPMVEALMEVAIENLREAGRLRP
AA_Cbot             295  VLSLSIYIILVKNVVELIPDKLLQFIVQSRVGLALSVMELIVSMELIVEFLREGLRRLP
AA_LbacsphC3-41    349  TLFGPSMYIAFVSFHQGLIPTKLAIISMSISREGVFPFALIEALIMEVAIENLREAGRLRP
consensus           361  ..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*

```

```

AA_Bsub168           350  NPIGQITIGVGGVIGQAAVEANIVSSIVVIVVSVIALASFTVPOYGMGLSFRVLRFTISM
AA_BsubW23          350  NPIGQITIGVGGVIGQAAVEANIVSSIMVIVVSVIALASFTVPOYGMGLSFRVLRFTISM
AA_BthHD73          361  TKMGQITIGVGGVIGQAAVEAATSTILLIAVALSALASFTTPITVKMSSITRILRFPLI
AA_BthYBT-1518     306  KPIGPAMGIVGGIIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFTIPOYSVGTTRILRFVAM
AA_BthHD-771       306  KPIGPAMGIVGGIIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFTIPOYSVGTTRILRFVAM
AA_BamCC178        350  SPIGQITIGVGGVIGQAAVEANIVSSIVVIVVSVIALASFTVPOYGMGLSFRVLRFTISM
AA_BcerQ1           390  KPIGPAMGIVGGIIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFTIPOYSVGTTRILRFVAM
AA_BcerAH187       393  KPIGPAMGIVGGIIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFTIPOYSVGTTRILRFVAM
AA_BantAmesAnce    306  KPIGPAMGIVGGIIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFTIPOYSVGTTRILRFVAM
AA_BantAmes        306  KPIGPAMGIVGGIIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFTIPOYSVGTTRILRFVAM
AA_BantSterne      306  KPIGPAMGIVGGIIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFTIPOYSVGTTRILRFVAM
AA_BlichATCC145    350  NPIGQITIGVGGVIGQAAVEANIVSSVMVIIIVSVIALASFTVPOYGMGLSFRVLRFTISM
AA_Bmega            353  TPMGQITIGVGGVIGQAAVEAHIVSSVMVIIIVSVIAIASFTVPOYGMGLSFRILRFVSM
AA_Bpumi            350  NPIGQITIGVGGVIGQAAVEAQAHIVSSIMVIIIVSVIALASFTVPOYGMGLSFRVLRFTISM
AA_BhaloC-125      290  ERVGQITIGVGGVIGQAAVEAGTAGTSNILLIVVALSMLALVLVLPFQLSNSVRILRFPLI
AA_Cbot             355  SKIGQITIGVGGIIGDAAKSHIVSSTLLIVVSVTVALFLIPNEMSAIRILRFPLI
AA_LbacsphC3-41    409  KPIGPAMGIVGGVIGQAAVEAGIVSPIMVIVVAVTAISSFAIIPQYNAGTTRILRFVAM
consensus           421  ..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*

```

```

AA_Bsub168           410  FSAATLGLYGVILFVLYIHLLTRQTSFGSPYFSPNGFFSLKNTDSSIIRLPIKKNKPEV
AA_BsubW23          410  FSAATLGLYGVILFVLYIHLLTRQTSFGSPYFSPNGFFSLKNTADSIIRLPIKKNLKEA
AA_BthHD73          421  LLAAAFGLGLAVGFVFIHLHLKLSLGSPLYLLPLYPFRLGLGTAFGLRIPFSQTAQRPF
AA_BthYBT-1518     366  FCAAIFGLYGVILFLLCSHLYKLKLSFGVPYTSFAVPYRFSWPKDFMVRPLKIMRRRP
AA_BthHD-771       366  FCAAIFGLYGVILFLLCSHLYKLKLSFGVPYTSFAVPYRFSWPKDFMVRPLKIMRRRP
AA_BamCC178        410  FTAAAFGLYGMILFMLATYHLSQTSFGSPYFSPNGFFSLKNANDSIIRLPIKKNQKEA
AA_BcerQ1           450  FCAAIFGLYGVILFLLCSHLYKLKLSFGVPYTSFAVPYRFSWPKDFMVRPLKIMRRRP
AA_BcerAH187       453  FCAAIFGLYGVILFLLCSHLYKLKLSFGVPYTSFAVPYRFSWPKDFMVRPLKIMRRRP
AA_BantAmesAnce    366  FCAAIFGLYGVILFLLCSHLYKLKLSFGVPYTSFAVPYRFSWPKDFMVRPLKIMRRRP
AA_BantAmes        366  FCAAIFGLYGVILFLLCSHLYKLKLSFGVPYTSFAVPYRFSWPKDFMVRPLKIMRRRP
AA_BantSterne      366  FCAAIFGLYGVILFLLCSHLYKLKLSFGVPYTSFAVPYRFSWPKDFMVRPLKIMRRRP
AA_BlichATCC145    410  VAAAIFGLYGVILCMLAFHLAQTSFGSPYFNPVNHFFSLKHTDEAIRLPIKAREVNR
AA_Bmega            413  MIAAFGLYGVILFLLVLIHLTKLSFGSLAYFKPFFALNKKAWKDSYIRLPIKNSLQSK
AA_Bpumi            410  FAAAIFGLYGVILFVLYIHLTKLSFGSPYFSPDFVSYKNEDNSIIRLPIKKNQKGE
AA_BhaloC-125      349  FAAGVFGGLGVMIQMFVLYLCLLKHFEIIPYFSPQALLPERLLSAIRAPFQKMKRPF
AA_Cbot             415  FLTNALCIGVSIQGFIFLVELCSLDISMGVPYLO----FFKSDMKDTFMRAPLWKNKRPF
AA_LbacsphC3-41    469  FFAAFGLYGVILFLLFGLSHLYKLKLSFGVPYVSPTFVIRAGDWKDFMVRPLMMMKRRPF
consensus           481  .....*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*..*

```



```

AA_Bsub168      470 NNPNEPKT DST----ET-----
AA_BsubW23     470 NNPNEPKT DST----ET-----
AA_BthHD73     481 SFTRKSKWR YNPNKSKQ---KR--DGEN---E
AA_BthYBT-1518 426 KIHHTKKK IIRK-----R
AA_BthHD-771   426 KIHHTQKN IIRK-----R
AA_BamCC178    470 KNNEPENNS-----Q-----
AA_BcerQ1      510 KIHHTKKK IIRK-----R
AA_BcerAH187   513 KIHHTKKK IIRK-----R
AA_BantAmesAnce 426 KIHHTKKK IIRK-----R
AA_BantAmes    426 KIHHTKKK IIRK-----R
AA_BantSterne  426 KIHHTKKK IIRK-----R
AA_BlichATCC145 470 KNG--SKKSAR-----SD-----
AA_Bmega       473 NKA-----K-----
AA_Bpumi       470 RDG-----Q-----S-----
AA_BhaloC-125  409 G-----S-----
AA_Cbot        471 KALPNKNP IIRQ----KDFRKKFRGNDNG---K
AA_LbacsphC3-41 529 KLLQPKDS VRRK----GEIRGKENS SHDYQSKR
consensus      541 . . . . .

```

Sekwencje GerAA użyte w zestawieniu (w kolejności):

1. *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*
2. *Bacillus subtilis subsp. spizizenii str. W23*
3. *Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD73*
4. *Bacillus thuringiensis YBT-1518*
5. *Bacillus thuringiensis HD-771*
6. *Bacillus amyloliquefaciens CC178*
7. *Bacillus cereus Q1*
8. *Bacillus cereus AH187*
9. *Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor'*
10. *Bacillus anthracis str. Ames*
11. *Bacillus anthracis str. Sterne*
12. *Bacillus licheniformis DSM 13 = ATCC 14580*
13. *Bacillus megaterium*
14. *Bacillus pumilus*
15. *Bacillus halodurans C-125*
16. *Clostridium botulinum*
17. *Lysinibacillus sphaericus C3-41*