



UMCS

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Dziedzina: Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Dyscyplina: Nauki biologiczne

Natalia Kopik

nr albumu: 242771

**Wyspecjalizowane rybosomy u sporulującej
laseczki siennej *Bacillus subtilis*
(Specialized ribosomes in sporulating *Bacillus subtilis*)**

Rozprawa doktorska przygotowywana pod kierunkiem naukowym
dr hab. Agaty Starosty

w Instytucie Nauk Biologicznych

LUBLIN, 2023

Badania wykonywane w ramach niniejszej pracy doktorskiej były finansowane z grantu
FIRST TEAM, Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej, POIR.04.04.00-00-3E9C/17-00

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	6
Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim	7
Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim	10
I. Wstęp	13
I.1. Właściwości oraz zastosowanie <i>Bacillus subtilis</i>	13
I.2. Przebieg procesu sporulacji u <i>B. subtilis</i>	17
I.2.1. Sporulacja jako odpowiedź komórki bakteryjnej na warunki stresowe ..	17
I.2.2. Kinazy histydynowe aktywujące <i>phosphorelay</i>	19
I.2.3. Gęstość populacji jako induktor sporulacji	25
I.2.4. Składniki <i>phosphorelay</i> i ich regulacja	27
I.2.5. Regulon Spo0A, głównego czynnika transkrypcyjnego procesu sporulacji	32
I.2.6. Przebudowa chromosomu	34
I.2.7. Tworzenie asymetrycznie położonej septy	37
I.2.8. Aktywacja sporulacyjnego czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla prespory, σ_F , oraz jego regulon	40
I.2.9. Translokacja chromosomu bakteryjnego przez SpoIII _E z komórki macierzystej do prespory	44
I.2.10. Kaskada sporulacyjnych czynników σ	48
I.2.11. Aktywacja charakterystycznego dla komórki macierzystej czynnika transkrypcyjnego σ_E oraz jego regulon	50
I.2.12. Pochłonięcie prespory przez komórkę macierzystą	54

I.2.13. Aktywacja charakterystycznego dla prespory późnego czynnika transkrypcyjnego, σ_G , oraz jego regulon	59
I.2.14. Aktywacja charakterystycznego dla komórki macierzystej późnego czynnika transkrypcyjnego, σ_K , oraz jego regulon	61
I.2.15. Synteza kory i płaszczka spor	65
I.3. Germinacja spor	72
I.4. Hipoteza wyspecjalizowanych rybosomów	73
I.4.1. Historyczny przegląd teorii dotyczących rybosomów	76
I.4.2. Działanie toksyny MazF u <i>E. coli</i> jako kontrowersyjny przykład istnienia wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii	81
I.4.3. Mikroheterogeniczność operonów rRNA jako potencjalne źródło wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii – przykłady	88
I.4.4. Białka rybosomalne jako potencjalne źródło wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii	95
I.5. Wybrane paralogi białek rybosomalnych: RpmEB, RpsNB i RpmGC	98
I.5.1. Operon Zur	98
I.5.2. RpmEB jako paralog RpmE (L31)	101
I.5.3. RpsNB jako paralog RpsB (S14)	104
I.5.4. RpmGC jako paralog RpmGA i RpmGB (L33)	106
II. Hipoteza i cel pracy	108
III. Materiały i metody	110
III.1. Materiał biologiczny	110
III.2. Odczynniki	110
III.2.1. Podłoża komercyjne	110
III.2.2. Zestawy komercyjne	111

III.2.3. Antybiotyki	111
III.2.4. Aminokwasy	112
III.2.5. Pozostałe odczynniki	112
III.3. Roztwory wykorzystywane do wykonania pożywek	114
III.4. Podłoża niekomercyjne	115
III.5. Roztwory wykorzystywane w procedurze RIBO-seq i RNA-seq	116
III.6. Metody	117
III.6.1. Hodowla szczepów <i>Bacillus subtilis</i>	117
III.6.2. Metoda dyfuzji płytkowej (ang. <i>disc diffusion test</i>)	117
III.6.3. Oznaczenie ilości tworzonego biofilmu	118
III.6.4. Test mobilności (ang. <i>swimming motility assay</i>)	119
III.6.5. Indukcja sporulacji u <i>Bacillus subtilis</i>	119
III.6.6. Sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) i profilowanie rybosomów (RIBO-seq)	119
III.6.7. Obserwacje procesu sporulacji pod mikroskopem konfokalnym	124
III.6.8. Test wydajności germinacji (ang. <i>germination frequency assay</i>)	126
III.6.9. Krzywa wzrostu dla germinujących komórek <i>Bacillus subtilis</i>	126
III.6.10. Obserwacje procesu germinacji pod mikroskopem konfokalnym	127
III.7. Analiza statystyczna	127
III.7.1. Pomiar długości komórek bakteryjnych i spor szczepów <i>B. subtilis</i> oraz intensywności fluorescencji GFP-RpsB i OPP-Alexa	128
III.7.2. Stworzenie wykresów średniego natężenia fluorescencji	128
III.8. Analiza bioinformatyczna	128
IV. Wyniki	129

IV.1. Charakterystyka fenotypowa szczepów <i>B. subtilis</i> WT i 3KO	129
IV.1.1. Krzywe wzrostu szczepów <i>B. subtilis</i> WT i 3KO	129
IV.1.2. Wpływ wybranych związków chemicznych na wzrost i rozwój szczepów	129
IV.1.3. Oznaczenie ilości tworzonego biofilmu przez szczepy <i>B. subtilis</i> WT, 3KO i BGSC	131
IV.1.4. Test mobilności szczepów <i>B. subtilis</i> WT i 3KO	132
IV.2. Analiza danych RNA-seq i RIBO-seq	133
IV.2.1. Uzyskanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania RNA-seq i RIBO-seq..	133
IV.2.2. Ilościowa i jakościowa analiza bibliotek cDNA	137
IV.2.3. Bioinformatyczna analiza danych RNA-seq i RIBO-seq	139
IV.2.4. Analiza RNA-seq i RIBO-seq czynników transkrypcyjnych σ^H , Spo0A, σ^F , σ^E , σ^G i σ^K	142
IV.2.5. Analiza RNA-seq i RIBO-seq białek związanych z procesem sporulacji ..	143
IV.2.6. Ekspresja białek rybosomalnych w trakcie trwania procesu sporulacji .	146
IV.2.7. Różnice w ekspresji genów pomiędzy szczepami <i>B. subtilis</i> WT i 3KO ..	154
IV.3. Obserwacje procesu sporulacji pod mikroskopem konfokalnym	160
IV.4. Porównanie germinacji spor szczepów <i>B. subtilis</i> WT i 3KO	168
V. Dyskusja	178
VI. Podsumowanie i wnioski	205
Bibliografia	206
Spis tabel	246
Spis rycin	248
Aneks (naukowe <i>Curriculum vitae</i>)	255

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

APS	am monium per oxodisulfat, nadsiarczanu amonu
ATP	adenosine tri phosphate, adenozyno-5'-trifosforan
DAPI	4',6- di amidino-2- phenyl indole, 4',6-diamidyno-2-fenyloindol
DNA	deoxyribo nucleic acid, kwas deoksyrybonuklinowy
EDTA	ethylenedi amino tetra acetic acid, kwas etylenodiaminotetraoctowy
GMP-PNP	guanosine 5' -[β , γ -imido] tri phosphate trisodium salt hydrate, hydrat soli trisodowej 5'-[β , γ -imido]trifosforanu guanozyny
Mbp	mega base pair , milion par zasad
MCE	mixed cellulose esters , mieszane estry celulozy
MNaza	micrococcal nucle ase, nukleaza mikrokokowa
OPP	O-propargyl-pu romycin, O-propargilopuromycyna
PBS	phosphate-buffered saline , sól fizjologiczna buforowana fosforanami
RIBO-seq	ribo sosome profiling, profilowanie rybosomów
RNA	ribo nucleic acid, kwas rybonukleinowy
RNA-seq	RNA-sequencing , sekwencjonowanie RNA
SDS	sodium dodecyl-sulfate , dodecylosiarczan sodu
T4 PNK	T4 Polynucleotide Kinase , kinaza polinukleotydowa faga T4
TEMED	N,N,N',N'- tetra methylethylenedi ami ne, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy
Tris	tris (hydroxymethyl)amino-methane, trishydroksometyloaminometan

Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim

Bacillus subtilis (laseczka sienna) jest bardzo dobrze zbadaną bakterią Gram-dodatnią i często stosowanym organizmem modelowym. Jest szeroko rozpowszechniony w naturze, a jego głównym miejscem bytowania jest gleba. Cechą charakterystyczną *B. subtilis* jest zdolność do tworzenia endospor, wysoce odpornych form przetrwalnych, umożliwiających przeczekać niekorzystnych warunków środowiskowych. Powstają one w wyniku ściśle koordynowanego przez komórkę, wielogodzinnego procesu zwanego sporulacją, inicjowanego głównie przez głód aminokwasowy oraz odpowiednią gęstość hodowli.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie potrójnego delecyjnego mutantu $\Delta rpmEB\Delta rpmGC\Delta rpsNB$ *B. subtilis* (określanego w niniejszej pracy jako szczep 3KO) w kontekście przeprowadzania przez niego procesu sporulacji, w celu przeanalizowania roli, jaką wyspecjalizowane rybosomy mogą odgrywać podczas tego procesu.

Wyspecjalizowane rybosomy to hipotetyczne subpopulacje rybosomów, które mają różnić się od siebie strukturalnie i funkcjonalnie, a tym samym wpływać na wynik translacji, np. poprzez preferencyjne wiązanie się z konkretnym podzbiorem transkryptów. W ten sposób rybosom zyskuje dodatkową rolę, stając się aktywnym elementem w zarządzaniu przepływem informacji genetycznej, co dodaje nowy poziom w regulacji ekspresji genów. Dowodów potwierdzających istnienie wyspecjalizowanych rybosomów przybywa, jednak hipoteza ta wciąż pozostaje zagadnieniem kontrowersyjnym, głównie przez trudności w udowodnieniu ich odmiennej funkcjonalności. Jest ona badana i weryfikowana zarówno w komórkach eukariotycznych, jak i prokariotycznych.

W pierwszej kolejności dokonano charakterystyki fenotypowej badanych szczepów: WT i 3KO *B. subtilis*. Oba szczepy wykazywały podobny wzrost zarówno w pożywkach bogatych w składniki odżywcze (LB, CH), jak również w ubogich (BMM), na co wskazują ich krzywe wzrostu. Nie różniły się one również wrażliwością na wybrane związki chemiczne, w tym lizozym, antybiotyki (ampicylina, kwas fusydowy, spektynomycyna, tiostrepton), detergenty (SDS, Tween-20) i sole (Na_2SO_4 , $MnSO_4$, $ZnCl_2$). Ponadto stwierdzono brak różnic w tworzeniu biofilmu, przy czym oba szczepy tworzyły silnie rozbudowane i trwałe biofilmy. Dla dodatkowej weryfikacji poprawności wyników użyto dodatkowego szczepu *B. subtilis* BGSC, który wytwarzał o wiele słabsze i nietrwałe struktury. Zaobserwowano za to różnicę

w mobilności szczepów, przy czym 3KO wykazywał znacząco mniejszą mobilność w pożywce półpłynnej o zawartości agaru $\leq 0,33\%$.

Następnie zbadano przebieg procesu sporulacji szczepów *B. subtilis* 3KO i WT poprzez sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) i profilowanie rybosomów (RIBO-seq) oraz obserwacje mikroskopowe. Proces monitorowano przez siedem godzin od indukcji sporulacji, pobierając próbki co godzinę. Różnica w wydajności translacji została wykryta tylko w siódmej godzinie procesu dla 65 genów, w tym dla 38 genów poziom translacji był wyższy w szczepie WT, zaś dla 27 genów był on wyższy w szczepie 3KO. Spośród 65 zidentyfikowanych genów największą grupę o znanej funkcji stanowiły geny związane z tworzeniem płaszcza, zewnętrznej powłoki ochraniającej sporę (15 genów), z czego większość dotyczyła najbardziej zewnętrznej warstwy, zwianej skorupą (11 genów) i niemal wszystkie (13 genów) wykazywały wydajniejszą translację w szczepie WT. Drugą najliczniejszą grupą genów, były ogólne białka stresu (6 genów) i wszystkie wykazywały wydajniejszą translację w szczepie 3KO. Genami o największej różnicy w wydajności translacji (od 7,5 do 5,5) były *yurS* (białko sporulacyjne o nieznannej funkcji), *ylqC* (domniemane białko wiążące RNA), *gyrA* (podjednostka A gyrazy DNA), *yloS* (pirofosfokinaza tiaminy) oraz *mazF* (toksyna, powodująca programową śmierć komórki) i wszystkie wykazywały wydajniejszą translację w szczepie WT.

Do obserwacji mikroskopowych użyto barwników SynaptoRed w celu wizualizacji błon komórkowych; DAPI w celu wizualizacji chromosomu bakteryjnego oraz OPP-Alexa w celu wizualizacji miejsc aktywnej translacji, a także markera molekularnego GFP w fuzji z białkiem rybosomalnym RpsB w celu detekcji lokalizacji rybosomów. W wyniku obserwacji mikroskopowej wykryto subpopulację komórek szczepu 3KO w szóstej godzinie po indukcji sporulacji, która cechowała się mniej wydajną translacją.

Wykryto istotną statystycznie różnicę w wydajności germinacji spor. Średnia wydajność germinacji spor szczepu WT wynosiła $61,5\% \pm 2,98$, zaś dla spor szczepu 3KO była niemal dwukrotnie mniejsza i wynosiła $30,2\% \pm 12,78$. Różnica ta została również potwierdzona w krzywych wzrostu hodowli zapoczątkowanych ze spor.

Z powodu zaobserwowania wyraźnych różnic w germinacji spor, przeprowadzono obserwacje mikroskopowe również dla tego procesu. Obserwacji poddano dojrzałe,

całonocne spory przed i po inkubacji w wysokiej temperaturze 90°C przez 40 minut, a także po 30, 60, 90, 120 i 180 minutach od indukcji germinacji. Analiza zdjęć mikroskopowych ujawniła, że po poddaniu spor działaniu wysokiej temperatury, gwałtownie spadał odsetek spor szczepu 3KO, które wykazywały fluorescencję GFP-RpsB. Pomiar intensywności fluorescencji również potwierdził istotną statystycznie różnicę pomiędzy sporami szczepów 3KO i WT dla wszystkich zbadanych punktów czasowych, za wyjątkiem pierwszego z nich, który odpowiadał momentowi sprzed inkubacji w wysokiej temperaturze. Wskazuje to, że spory szczepu 3KO są wrażliwe na działanie wysokiej temperatury, która może powodować denaturację białek w ich rdzeniu, w tym białek RpsB. Jednocześnie procent spor wykazujących niebieską fluorescencję DAPI przed i w momencie indukcji germinacji różnił się pomiędzy szczepami i był niemal o połowę niższy dla szczepu WT, jednak w kolejnych badanych punktach czasowych był do siebie zbliżony w obu szczepach i wykazywał tendencję wzrostową. Może być to spowodowane różnicą w przepuszczalności spor, przy czym spory 3KO byłyby bardziej przepuszczalne dla barwnika DAPI. Zrównanie się odsetek spor szczepu 3KO i WT w wykazywaniu fluorescencji DAPI po 30 minutach od indukcji germinacji może mieć uzasadnienie w rozpoczęciu tego procesu, ponieważ germinujące spory posiadają podobną przepuszczalność, jak te zabite przez wysoką temperaturę (Black & Gerhardt, 1962; Mtimet i in., 2017; Trunet i in., 2019). Tłumaczy to również tendencję wzrostową w odsetku spor wykazujących fluorescencję DAPI wraz z postępem germinacji.

W wyniku obserwacji mikroskopowych w intensywności fluorescencji OPP-Alexa, która reprezentuje aktywnie przeprowadzaną translację, wykryto, że spory szczepu 3KO wykazują statystycznie istotnie niższy poziom translacji w 30 minutach oraz w 2 godzinie od indukcji germinacji. Ponadto generalnie widać tendencję wzrostową w intensywności fluorescencji OPP-Alexa wraz z postępem germinacji. Wykryto również różnicę w długości spor pomiędzy szczepami, która po 60 minutach od indukcji germinacji staje się istotna statystycznie. Aspekt długości spor powiązano z różnicą w poziomie translacji, reprezentowaną przez fluorescencję OPP-Alexa.

Słowa kluczowe: translacja, rybosom, sporulacja, germinacja, *Bacillus subtilis*

Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim

Bacillus subtilis is a very well-studied Gram-positive bacterium and a frequently used model organism. It is widely distributed in nature and its main habitat is the soil. A characteristic feature of *B. subtilis* is the ability to form endospores, highly resistant spore forms that allow it to wait out unfavorable environmental conditions. They are formed as a result of a process closely coordinated by the cell, called sporulation, initiated mainly by an amino acid starvation and an appropriate culture density.

The aim of this study was to characterize the triple deletion mutant $\Delta rpmEB\Delta rpmGC\Delta rpsNB$ of *B. subtilis* (herein referred to as the 3KO strain) in the context of its sporulation process, in order to analyze the role that specialized ribosomes may play during this process.

Specialized ribosomes are hypothetical subpopulations of ribosomes that are supposed to differ structurally and functionally from each other and thus influence the outcome of translation, e.g. by preferentially binding to a specific subset of transcripts. Therefore, the ribosome gains an additional role, becoming an active element in managing the flow of genetic information, which adds a new level to the regulation of gene expression. The number of evidence confirming the existence of specialized ribosomes is increasing, but this hypothesis remains a controversial issue, mainly due to the difficulties in proving their different functionality. It is tested and verified in both eukaryotic and prokaryotic cells.

Firstly, the phenotypic characterization of the tested strains: WT and 3KO of *B. subtilis* was performed. Both strains showed similar growth in both nutrient-rich (LB, CH) and poor (BMM) media as indicated by their growth curves. They also did not differ in sensitivity to selected chemical compounds, including lysozyme, antibiotics (ampicillin, fusidic acid, spectinomycin, thiostrepton), detergents (SDS, Tween-20) and salts (Na_2SO_4 , $MnSO_4$, $ZnCl_2$). In addition, no differences in biofilm formation were found, since both strains forming highly developed and durable biofilms. For additional verification of the correctness of the results, an additional strain of *B. subtilis*, BGSC, was used, which produced much weaker and unstable structures. Nonetheless, a difference in the mobility

of the strains was observed, with 3KO showing significantly lower mobility in semi-liquid medium with an agar content of $\leq 0.33\%$.

Then, the process of the sporulation of *B. subtilis* 3KO and WT strains was investigated by RNA sequencing (RNA-seq) and ribosome profiling (RIBO-seq) as well as microscopic observations. The process was monitored for seven hours after sporulation induction, with hourly sampling. The difference in translation efficiency was detected only in the seventh hour of the process, for 65 genes, of which 38 genes had a higher level of translation in the WT strain, and for 27 genes it was higher in the 3KO strain. Among the 65 identified genes, the largest group with a known function were genes related to the formation of the coat, the outer layer protecting the spore (15 genes), most of which concerned the outermost layer, called the crust (11 genes) and almost all (13 genes) showed more efficient translation in WT strain. The second largest group of genes were general stress proteins (6 genes) and all showed more efficient translation in the 3KO strain. The genes with the greatest difference in translation efficiency (from 7.5 to 5.5) were *yurS* (sporulation protein of unknown function), *ylqC* (putative RNA-binding protein), *gyrA* (DNA gyrase A subunit), *yloS* (thiamine pyrophosphokinase) and *mazF* (a toxin that causes programmed cell death) and all showed more efficient translation in the WT strain.

The following dyes were used for microscopic observations: SynaptoRed to visualize cell membranes; DAPI to visualize the bacterial chromosome and OPP-Alexa to visualize active translation sites. Also, the molecular marker GFP fused to the ribosomal protein RpsB was used to detect the location of ribosomes. Microscopic observation revealed a subpopulation of 3KO strain cells of the six hours after induction of sporulation that were less efficient in translation.

A statistically significant difference in spore germination efficiency was detected. The average efficiency of spore germination of the WT strain was $61.5\% \pm 2.98$, while for the spores of the 3KO strain was almost twice lower and amounted to $30.2\% \pm 12.78$. This difference was also confirmed in culture growth curves initiated from spores.

Due to the observation of significant differences in spore germination, microscopic observations were also carried out for this process. Mature, overnight spores were observed before and after incubation at a high temperature of 90°C for 40 minutes, and at

30, 60, 90, 120 and 180 minutes after germination induction. Analysis of microscopic images revealed, that after exposing the spores to high temperature, the percentage of 3KO spores, that expressed GFP-RpsB fluorescence, decreased dramatically. The measurement of fluorescence intensity also confirmed a statistically significant difference between the 3KO and WT spores for all time points examined, except for the first one, which corresponded to the moment before incubation at high temperature. This indicates that 3KO spores are sensitive to high temperatures, which can denature proteins in their core, including RpsB. At the same time, the spores percentage expressing blue DAPI fluorescence before and at the time of induction of germination differed between the strains and was almost half as low for the WT strain, but at subsequent time points it was similar in both strains and showed an upward trend. This may be due to the difference in spore permeability, with 3KO spores being more permeable to the DAPI dye. Equating the spores percentage of the 3KO and WT strains expressing DAPI fluorescence at 30 minutes after germination induction may be due to the germination initiation, since germinating spores have a similar permeability to those killed by heat (Black & Gerhardt, 1962; Mtimet et al., 2017; Trunet et al., 2019). This also explains the increasing trend in the percentage of spores expressing DAPI fluorescence with the progress of germination.

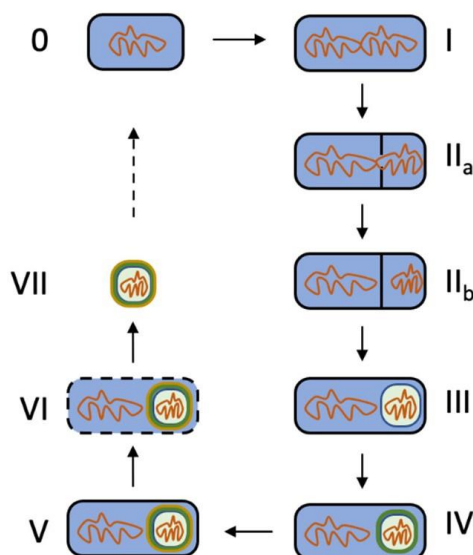
As a result of microscopic observations of the OPP-Alexa fluorescence intensity, which represents active translation, spores of the 3KO strain were found to show statistically significantly lower levels of translation at 30 minutes and 2 hours after germination induction. In addition, there is generally an upward trend in OPP-Alexa fluorescence intensity as germination progresses. A difference in the length of spores between the strains was also detected, which becomes statistically significant 60 minutes after germination induction. The correlation between the spore length and the difference in translation level, represented by OPP-Alexa fluorescence, is observed.

Key words: translation, ribosome, sporulation, germination, *Bacillus subtilis*

I. Wstęp

1. Właściwości oraz zastosowanie *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (laseczka sienna) jest Gram-dodatnią i katalazododatnią bakterią, szeroko rozpowszechnioną w naturze (Turnbull, 1996). Jej głównym miejscem bytowania jest gleba, ale komórki *B. subtilis* izolowane są też z roślin (Errington & van der Aa, 2020; Jooste i in., 2019; War Nongkhaw & Joshi, 2014), wód słodkich i słonych, przewodu pokarmowego zwierząt czy psującej się żywności (Okamoto i in., 2012; Paul i in., 2021; Pietraszek & Walczak, 2014; Rahman i in., 2020). Laseczka sienna jest fakultatywnym anaerobem (Kunst i in., 1997; Nakano & Zuber, 1998; G. Sun i in., 1996), preferującym wzrost w warunkach tlenowych, ale posiadającym zdolność do wykorzystania azotanu jako akceptora elektronów w warunkach beztlenowych oraz do przeprowadzania fermentacji, gdy obecne są glukoza i pirogronian (Clements i in., 2002; Härtig & Jahn, 2012; Hoffmann i in., 2020). Jako przedstawiciel rodzaju *Bacillus*, *B. subtilis* ma kształt laseczki o długość 2–3 μm i średnicy 0,7–0,8 μm (De Vos i in., 2009), a także posiada zdolność do tworzenia endospor, wysoce odpornych form przetrwalnych, umożliwiających przeczekać niekorzystnych warunków środowiskowych.



Rycina 1.1. Schemat morfologicznych zmian zachodzących podczas procesu sporulacji u *B. subtilis* (Qin i in., 2022)

Endospory, jak nazwa wskazuje, powstają wewnątrzkomórkowo, a ich wysoka odporność jest wynikiem ich budowy oraz specjalnego składu chemicznego (De Vos i in.,

2009). Są wynikiem procesu sporulacji, który trwa około 7 godzin w temperaturze 37°C (Hilbert & Piggot, 2004). Do głównych cech morfologicznych tego procesu należy kolejno: przebudowa chromosomów w tzw. włókno osiowe (etap I); podział asymetryczny, który dzieli komórkę na mniejszy przedział prespory (ang. *forespore*) i większy komórki macierzystej (etap II); pochłonięcie prespory przez komórkę macierzystą (etap III); dojrzewanie rozwijającej się prespory (etapy IV-V); i wreszcie uwolnienie dojrzałej spory poprzez lizę komórki macierzystej (etap VI) (**Ryc. 1.1**) (Fujita & Losick, 2005). Określanie kolejnych stadiów cyframi rzymskimi jest pozostałością konwencji wprowadzonej przez Rytera, który to określał kolejne etapy morfologiczne sporulacji za pomocą mikroskopii elektronowej (Ryter, 1965). Mutanty sporulacyjne są oznaczane przez etap w procesie, w którym są blokowane (np. mutanty *spoil* tworzą asymetryczne septy, ale nie udaje im się całkowicie przeprowadzić pochłonięcia prespory) (Hilbert & Piggot, 2004).

Laseczka sienna jest uważana za najlepiej zbadaną bakterię Gram-dodatnią, a tym samym często stosowany organizm modelowy (Kunst i in., 1997). Szeroko badany szczep *B. subtilis* 168 jest auksotrofem tryptofanu wyizolowanym w latach pięćdziesiątych (Zeigler, 2011). Był jedną z pierwszych bakterii, które zostały w pełni zsekwencjonowane, ujawniając chromosom o wielkości 4,2 Mbp, zawierający około 4100 genów (Kunst i in., 1997). *B. subtilis* został wykorzystany do badania zjawisk fazy post-wykładniczej, takich jak sporulacja, tworzenie biofilmu czy kompetencja, czyli zdolności do pobierania egzogenego DNA (Mohsin i in., 2021; Solomon & Grossman, 1996).

Gatunki *Bacillus* są wykorzystywane w wielu procesach medycznych, farmaceutycznych, rolniczych i przemysłowych. *B. subtilis* jest jedną z najszerzej eksploatowanych fabryk komórkowych do produkcji enzymów, białek heterologicznych, dodatków do żywności, witamin, antybiotyków, aminokwasów i insektycydów (Gu i in., 2018; Schallmeyer i in., 2004; Su i in., 2020). Jest też szeroko stosowany na rynku jako probiotyk i suplement diety (Hong i in., 2008; Shahcheraghi i in., 2015). Atutami *B. subtilis* w tej materii są właściwości fizjologiczne i elastyczny metabolizm, co umożliwia prowadzenie hodowli na mało wymagających, a przez to tanich, podłożach. Koszty procesu zmniejsza również morfologia laseczki siennej – posiadanie pojedynczej błony komórkowej ułatwia wydzielanie białka i upraszcza jego dalszą obróbkę. Ponadto bakteria ta szybko rośnie, a jej cykl fermentacyjny jest stosunkowo krótki (48 godzin w porównaniu do

180 godzin u *Saccharomyces cerevisiae*). Dostępność systemów ekspresyjnych o dobrej stabilności genetycznej oraz brak silnej preferencji kodonów to kolejne zalety *B. subtilis*. Ostatnią, jednak niezmiernie ważną, jest uznanie ją za bezpieczną przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) oraz Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) (Su i in., 2020).

Zdecydowana większość gatunków *Bacillus* to nieszkodliwe saprofity, ale zdarzają się wśród nich fakultatywne patogeny ludzi i zwierząt gospodarskich, jak np. *B. cereus*, który powoduje zatrucia pokarmowe (Turnbull, 1996). O wiele większym zagrożeniem jest *B. anthracis*, czynnik wywołujący wąglika, w związku z czym był on stosowany w bioterroryzmie. Jest jedynym obligatoryjnym patogenem *Bacillus* u kręgowców. Z kolei *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* i *B. thuringiensis* są patogenami określonych grup owadów i znalazły zastosowanie jako aktywne składniki insektycydów.

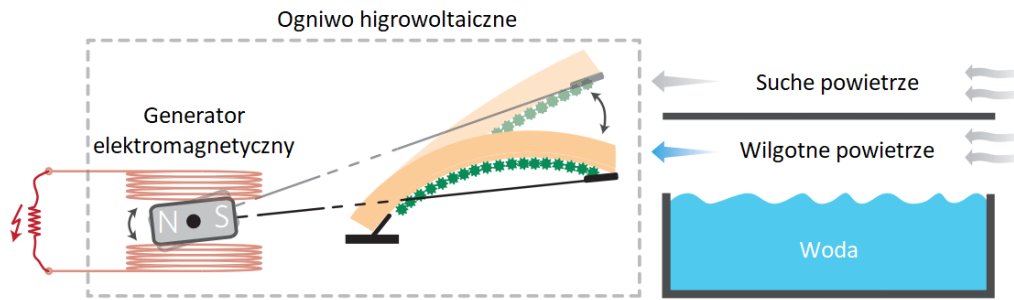
Ponieważ spory są odporne na ciepło, promieniowanie, środki dezynfekujące i wysuszenie, trudno je wyeliminować z materiałów medycznych i farmaceutycznych i są częstą przyczyną zakażeń. Żeby z nimi walczyć, spory niektórych niegroźnych gatunków *Bacillus* są wykorzystywane jako standardy w testach, np. *B. subtilis* subsp. *globigii* jest szeroko stosowany do walidacji alternatywnych procedur sterylizacji i odymiania (Turnbull, 1996; Yung & Ponce, 2008).

Spory zyskały również ciekawe zastosowania dzięki tzw. technice prezentacji powierzchniowej na sporach *B. subtilis* (ang. *B. subtilis* spore surface display, BSSD) (Lin i in., 2020; Mohsin i in., 2021; H. Wang i in., 2017). Technika prezentacji powierzchniowej na sporach jest jednym z unikalnych narzędzi w dziedzinie biologii molekularnej. Prowadzi ona do wytworzenia obcego białka na powierzchni spor za pomocą wektorów fuzyjnych, które wykorzystują dwa geny. Jedno koduje białko kotwiczące, czyli białko otoczki spory, zaś drugie dotyczy białka docelowego. Tak wyrażane egzogenne białka wykazują większą stabilność i odporność oraz można je łatwo oczyścić. Obecnie technika ta jest szeroko stosowana w biodegradacji, biokatalizie, biosensorach, do produkcji farmaceutyków, enzymów przemysłowych, biopestycydów i innych białek funkcjonalnych (G. Zhang i in., 2019). Ponieważ białka prezentowane na powierzchni spor mają wyjątkową odporność na trudne warunki, mogą płynnie przechodzić przez barierę żołądkowo-jelitową. Ta unikalna

cecha spor czyni je doskonałymi nośnikami dla szczepionek lub leków podawanych doustnie (Koopman i in., 2022).

Jako saprofity, gatunki *Bacillus* są dobrze znane w przemyśle spożywczym jako uciążliwe organizmy powodujące psucie żywności, jednocześnie jednak niektóre z nich odgrywają ważną rolę w naturalnej lub sztucznej degradacji produktów odpadowych (Mohsin i in., 2021; Turnbull, 1996).

B. subtilis budzi również zainteresowanie w bioinżynierii jako źródło żywych, funkcjonalnych materiałów (Isticato & Ricca, 2014; Mohsin i in., 2021). Wykorzystując jego zdolność do tworzenia biofilmu, wyprodukowano żywy klej (C. Zhang i in., 2019). Badacze mają nadzieję, że w przyszłości będzie możliwa m.in. produkcja inteligentnych klejów zaopatrzonych w bioczuJNIKI do wykrywania sygnałów uszkodzenia, np. na skutek rdzy, które wyzwalająby ekspresję i wydzielanie klejów naprawczych. Innym przykładem są hydrożelowe plastry zawierające spory *B. subtilis* o szczepie zdolnym do wytwarzania antybiotyków w celu zwalczania potencjalnych infekcji (Lufton i in., 2018). Wykorzystanie spor jest dodatkowym atutem, ponieważ są one odporne na ekstremalne warunki, które występują w trakcie produkcji żywych materiałów (González i in., 2020). Po ustaniu szkodliwych warunków, spory kiełkują, a komórki wegetatywne pełnią swoją funkcję. Jeżeli trudne warunki ponownie się pojawią, komórki przekształcają się w spory i cykl się powtarza. Kolejnym przykładem są generatory prądu, np. generator higrowoltaiczny, który zdalnie generuje energię elektryczną z parowania stojącej wody za pomocą spor *B. subtilis* (X. Chen i in., 2014). Wykorzystuje on fakt, że spory reagują na zmiany wilgotności poprzez pęcznienie lub kurczenie się. Generator składa się z warstwy lateksu pokrytej sporami, na którą na zmianę nakierowuje się wilgotne lub suche powietrze. To powoduje wahadłowe ruchy warstwy lateksu, na przemian jej odginanie się i powrót do poprzedniego kształtu, spowodowane pęcznieniem i kurczeniem się spor. Tym samym tworzy się higromorf, przedmiot, który pod wpływem wilgotności otoczenia zmienia swój kształt. Podłączony do niego magnes, którym higromorf obraca, generuje przepływ prądu o mocy 0,7 μ W, generowany z 3 mg spor (**Ryc. 1.2**).

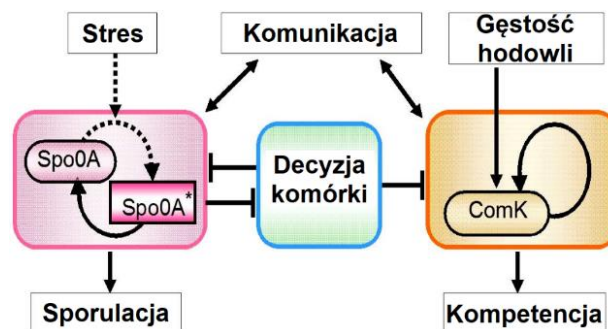


Rycina 1.2. Schemat działania generatora higrowoltaicznego wykorzystującego spory *B. subtilis* (X. Chen i in., 2014) - zmodyfikowane

2. Przebieg procesu sporulacji u *B. subtilis*

2.1. Sporulacja jako odpowiedź komórki bakteryjnej na warunki stresowe

W warunkach niedoboru składników odżywczych *B. subtilis* zaprzestaje wzrostu i inicjuje w odpowiedzi reakcje zwiększające różnorodność metaboliczną. Odpowiedzi te obejmują indukcję ruchliwości i chemotaksji w celu poszukiwania nowych źródeł pożywienia, produkcję antybiotyków, aby zniszczyć drobnoustroje konkurujące o tę samą niszę ekologiczną, a także wydzielanie enzymów hydrolitycznych do trawienia zewnątrzkomórkowych białek i polisacharydów (Kunst i in., 1997; Schultz i in., 2009). Jeśli te odpowiedzi nie przywrócą wzrostu, pojedyncza komórka musi zdecydować czy zainicjować proces kompetencji czy sporulacji (**Ryc. 1.3**). Obecnie wiadomo, że decyzja komórki następuje po starannym rozpoznaniu, zaawansowanej komunikacji komórka-komórka przy użyciu różnych feromonów peptydowych (czynników autokrynych) oraz skomplikowanym przetwarzaniu informacji w celu oceny gęstości kolonii i zbiorowego postępu w kierunku sporulacji lub kompetencji. Sporulacja jest zatem końcowym wynikiem serii kroków, które można opisać jako decyzje komórkowe dotyczące najlepszego radzenia sobie ze stresem (Schultz i in., 2009).



Rycina 1.3. Uproszczony schemat podejmowania decyzji o rozpoczęciu procesu sporulacji lub kompetencji u *B. subtilis* (Schultz i in., 2013) - zmodyfikowane

Niedobór składników odżywczych jest jednym z najistotniejszych czynników środowiskowych odpowiedzialnych za rozpoczęcie procesu sporulacji. Laboratoryjnie jest on osiągnięty poprzez przeniesienie rosnącej kultury z bogatej pożywki wzrostowej na ubogą (De Vos i in., 2009). Chociaż sporulacja jest indukowana przez głód, nie jest inicjowana natychmiast. Reakcje umożliwiające dalszy wzrost tak długo, jak to możliwe, są preferowaną alternatywą dla sporulacji, która jest ostateczną adaptacyjną reakcją na niedobór składników odżywczych (Reder i in., 2012).

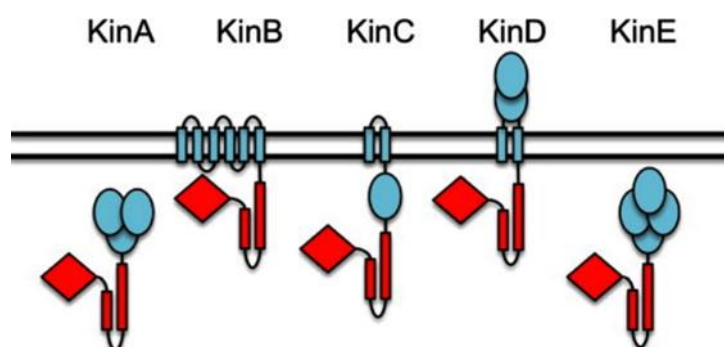
Uważa się, że *B. subtilis* wyczuwa głód, mierząc wewnątrzkomórkowe stężenie kluczowych metabolitów, takich jak ATP, GTP czy naładowane aminokwasami tRNA potrzebne do syntezy białek (López & Kolter, 2010). Za wyczuwanie głodu odpowiada m.in. regulator transkrypcji CodY, który monitoruje wewnątrzkomórkowe poziomy GTP (Handke i in., 2008; López & Kolter, 2010; Ratnayake-Lecamwasam i in., 2001). W nadmiarze składników odżywczych, GTP jest wytwarzany na wysokich poziomach, wiąże wówczas i aktywuje represor CodY, który blokuje ekspresję genów związanych z indukcją sporulacji, takich jak *spo0A*, *kinB-kapB*, *rapA-phrA*, *rapC-phrC*, *rapE-phrE* (Molle, Nakaura, i in., 2003). Tym samym wyczerpanie puli GTP podczas głodu powoduje inaktywację CodY i umożliwia transkrypcję powyższych genów.

Spadek poziomu energii wewnątrzkomórkowej spowodowany niedoborem składników odżywczych wpływa również na syntezę aminokwasów niezbędnych do budowy białek. W tych warunkach, nienaładowane aminokwasami tRNA wiążą się z rybosomem, co zatrzymuje translację. W konsekwencji energia w postaci GTP, przeznaczona do syntezy białek, jest przekierowywana do tworzenia drugorzędno przekazanego, tetra- lub pentaosforanu guanozyny [(p)ppGpp], zwanego również alarmonem (López & Kolter, 2010). Synteza alarmonu jest katalizowana przez RelA, białko związane z rybosomami, które przenosi grupę pirofosforylową z ATP lub GTP na 3'OH rybozy nukleotydów GTP lub GDP, tworząc aktywną postać alarmonu. Reguluje on głównie dwa kluczowe szlaki: syntezę nukleotydów purynowych oraz biogenezę rybosomów i translację, co jest związane z wywoływaniem tzw. odpowiedzi ścisłej (ang. *stringent response*), która jest reakcją bakterii na niekorzystne warunki środowiska (Yang i in., 2020). Wykazano, że podczas odpowiedzi ścisłej następuje wzrost ekspresji genów związanych z indukcją sporulacji, takich jak *kinA*, *kinB-kapB*, *kinD*, *kinE*, *spo0*, *spo0A*, *sigH*, *rapA-phrA*,

rapB, *rapE-phrE*, i *spo0E*, zaś hamowana jest ekspresja m.in. *kinC*, *abrB* i *ynzD* (Leyn i in., 2013; Tojo i in., 2013).

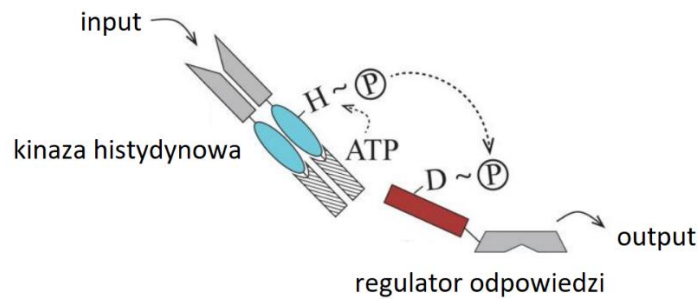
2.2. Kinazy histydynowe aktywujące *phosphorelay*

Sugerowano, że *B. subtilis* wykrywa niedobór składników odżywczych oraz inne sygnały środowiskowe za pomocą cytoplazmatycznych kinaz A i E oraz integralnych błonowych B, C i D (**Ryc. 1.4**). Kinazy histydynowe działają poprzez autofosforylację konserwatywnej reszty histydyny przy użyciu ATP, a następnie przeniesienie powstałego wysokoenergetycznego fosforanu na konserwatywną resztę asparaginianu regulatora odpowiedzi (Davidson i in., 2018; Winnen i in., 2013) (**Ryc. 1.5**). Regulator odpowiedzi działa najczęściej jako czynnik transkrypcyjny, który moduluje ekspresję docelowych genów w odpowiedzi na swój stan fosforylacji. Autofosforylacja KinA, KinB, KinC i KinD jest pierwszym krokiem w wieloetapowym transferze grupy fosforanowej (ang. *phosphorelay*)¹, który kontroluje różne zachowania *B. subtilis*, m.in. sporulację.



Rycina 1.4. Schemat budowy kinaz histydynowych KinA, KinB, KinC, KinD oraz KinE. Potencjalne domeny sygnału wejściowego, tzw. domeny PAS (owale) oraz helisy transbłonowe (prostokąty) zaznaczono na niebiesko. Domeny enzymatyczne (romby) i regulatorowe (prostokąty) podlegające fosforylacji i przeniesieniu grupy fosforylowej zaznaczono na czerwono (R. Wu i in., 2013)

¹ Ponieważ nie istnieje polski odpowiednik dla tego terminu, który specyficznie określa dokładnie szlak transferu grupy fosforanowej, prowadzący od KinA-D i potencjalnie KinE do czynnika transkrypcji, Spo0A, w niniejszej pracy będzie stosowane jego angielskie określenie, tj. *phosphorelay*.



Rycina 1.5. Schemat działania kinaz histydynowych (Davidson i in., 2018) - zmodyfikowane

KinA oraz w mniejszym stopniu KinB to kinazy odpowiedzialne za sporulację (Narula i in., 2016). Jak wspomniano wcześniej, jednoczesny spadek stężenia GTP i wzrost ATP reguluje w górę transkrypcję obu genów, *kinB* i *kinA* (Tojo i in., 2013). Co ciekawe, czynnik wywołujący autofosforylację KinA do tej pory pozostaje nieznaną (Narula i in., 2016). Sugerowano, że KinA bezpośrednio wiąże się z NAD⁺ i wyczuwa stężenia NAD⁺/NADH (Kolodkin-Gal i in., 2013), ale zostało to zakwestionowane przez późniejsze badania (Kiehler i in., 2017). Pierwotnie uważano, że KinA może być regulowana przez ligandy wewnątrzkomórkowe związane z głodem, które po rozpoznaniu przez KinA indukowałyby jej autofosforylację i rozpoczynałyby *phosphorelay*, prowadzący finalnie do ufosforylowania ważnego regulatora transkrypcji, Spo0A. Jednak kolejne odkrycia, głównie związane z budową i właściwością domen KinA, doprowadziły do podważenia tej hipotezy i zaproponowania alternatywnego modelu, w którym to sukcesywnie wzrastające stężenie KinA przy jej stałej aktywności prowadzi do otrzymania progowego stężenia Spo0A~P, odpowiadającego za indukcję sporulacji (Kiehler i in., 2017; Narula i in., 2016). W przypadku stabilnych białek, szybkość wzrostu określa szybkość rozcieńczania białka, ponieważ wolno rosnące komórki mają mniejszą objętość, a degradacja białka zachodzi w nieznacznym stopniu. Podczas niedoboru składników odżywczych wzrost komórek jest zahamowany, co powoduje względny wzrost stężenia kinazy. Tym samym, to nie wewnątrzkomórkowe ligandy związane z głodem byłyby czynnikiem wywołującym sporulację, ale wydłużony czas pomiędzy kolejnymi cyklami komórkowymi świadczyłby o zaistnieniu niedoboru składników odżywczych. W efekcie, tylko komórki rosnące wolniej od określonej szybkości osiągałyby progową aktywność Spo0A~P niezbędną do sporulacji, zaś spowolnienie wzrostu wpływałoby raczej na stężenie niż na aktywność KinA.

Drugą najważniejszą kinazą odpowiadającą za indukcję sporulacji jest KinB. Ponieważ KinB nie posiada zewnętrznej domeny, która często działa jako czujnik dla specyficznego

liganda, podejrzewano, że KinB prawdopodobnie nie wyczuwa cząsteczki sygnałowej bezpośrednio (Dartois i in., 1996). I faktycznie, wykryto, że KinB jest aktywowany po związaniu ze wspólnie transkrybowaną lipoproteiną KapB zakotwiczoną po zewnętrznej stronie błony komórkowej (Dartois i in., 1997). Jednak dokładny sygnał, który wyzwała tworzenie kompleksu KinB-KapB, pozostaje do wyjaśnienia (López & Kolter, 2010). Wykryto też, że inne integralne białko błonowe, KbaA, również powoduje aktywację KinB (Dartois i in., 1996; W. Liu i in., 2018).

Zaproponowano, że KinB miałby być aktywowany w przypadku zaburzenia oddychania przez nieznaną przełącznik redoks, który wykrywałby upośledzony transport elektronów spowodowany takimi stresami środowiskowymi, jak niski poziom tlenu czy wysoki poziom żelaza (Kolodkin-Gal i in., 2013). Oprócz indukcji sporulacji, KinB wraz z KinC odpowiada za ruch ślizgowy poprzez umiarkowanie zwiększenie stężenia Spo0A~P (Grau i in., 2015). Co ciekawe, w celu indukcji ruchu ślizgowego przez KinB, do jego aktywacji wymagane jest wysokie stężenie jonów potasowych, jednocześnie jednak jony te są całkowicie nieistotne dla zainicjowania procesu sporulacji.

KinC wykrywa utratę kationów potasu z cytoplazmy, np. w wyniku uszkodzenia błony komórkowej lub indukowaną przez surfaktynę – lipoproteinę wnikającą w membranę i tworzącą pory selektywne dla jonów potasu (López, Fischbach, i in., 2009; López, Vlamakis, i in., 2009b; Shemesh i in., 2010). W związku z tym, w przeciwieństwie do KinB, potas stanowi inhibitor dla KinC, która jest aktywna dopiero przy jego niskich stężeniach. Wytłumaczeniem tego pozornego paradoksu dla KinB i KinC jest to, że obie te kinazy inicjują ruch ślizgowy w różnych momentach wzrostu kolonii, co jest związane z różnym stężeniem wewnątrzkomórkowego potasu (**Ryc. 1.6**) (Grau i in., 2015). KinB jest kinazą pierwszego działania, podczas gdy KinC pozostaje nieaktywna. W miarę postępu ruchu ślizgowego następuje spadek wewnątrzkomórkowego stężenia potasu w komórkach wewnętrznej części dysku ślizgowego. W takich warunkach fizjologicznych KinB i KinC stają się odpowiednio nieaktywne i aktywne wewnątrz dysku ślizgowego, podczas gdy KinB pozostaje aktywny na obrzeżach kolonii.



Rycina 1.6. Czasoprzestrzenne rozdzielanie aktywacji kinaz KinB i KinC podczas indukcji ruchu ślizgowego u *B. subtilis* (Grau i in., 2015) - zmodyfikowane

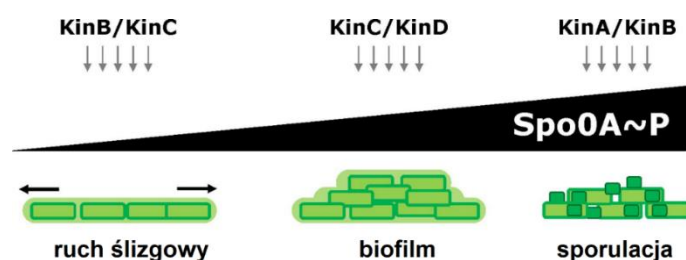
KinC, tak jak KinD, umiarkowanie podwyższa stężenie Spo0A~P do poziomu, który wywołuje indukcję produkcji biofilmu, ale jest niewystarczające dla zainicjowania sporulacji (Aguilar i in., 2010; Y. Chen i in., 2012; Z. Chen i in., 2022). Co ciekawe, zarówno KinC, jak i KinD, mogą powodować defosforylację Spo0F~P, a w konsekwencji zmniejszać stężenie Spo0A~P, przy wysokim stężeniu KinA. Tym samym działają one dodatkowo jako regulatory szlaku *phosphorelay*, dbając o to, aby komórka *B. subtilis* miała czas wykorzystać inne mechanizmy radzenia sobie z niekorzystnymi warunkami wzrostu, nim wybierze ostatecznie proces sporulacji. Co również ciekawe, w przypadku braku pośrednich białek szlaku *phosphorelay*, tj. Spo0F lub Spo0B, KinC jest w stanie, jako jedyna z pięciu kinaz, bezpośrednio fosforylować końcowe białko Spo0A (LeDeaux & Grossman, 1995; Shank i in., 2011).

Przewiduje się, że KinD jako jedyny z pięciu kinaz ma znaczący segment pozacytoplazmatyczny, w związku z czym może reagować na małowcząsteczkowe ligandy, które gromadzą się lub są wyczerpywane w środowisku zewnątrzkomórkowym (R. Wu i in., 2013). Badania wskazały, że pirogronian, propionian i/lub maślan mogą łączyć się z KinD, ale nie potwierdziły, że są to ligandy fizjologiczne. Inne badania wykazały, że KinD jest osmosensorem i powoduje fosforylację Spo0A przy wysokim ciśnieniu osmotycznym (Rubinstein i in., 2012). Doniesiono również, że aktywność KinD jest aktywowana przez lipoproteinę Med, zakotwiczoną po zewnętrznej stronie błony komórkowej (Banse i in., 2011). Med została pierwotnie zidentyfikowana jako pozytywny regulator genu kompetencji *comK*, ale wykryto, że również operony kanibalizmu *sdp* i *skf* znajdują się pod jej pozytywną kontrolą. Zjawisko kanibalizmu u *B. subtilis* to jeden ze sposobów radzenia sobie ze stresem wywołanym niedoborem składników odżywczych. Komórki, w których poziom Spo0A~P wzrasta na skutek głodu, wytwarzają i eksportują bakteriobójcze produkty

powyższych operonów, aby zablokować siostrzane komórki przed wejściem na drogę sporulacji i spowodować ich lizę (Ellermeier i in., 2006; González-Pastor i in., 2003; López, Vlamakis, i in., 2009a). Komórki, które wykazują kanibalizm opóźniają w ten sposób swój proces sporulacji dzięki zyskaniu składników odżywczych uwalnianych przez martwe komórki. Opóźnienie sporulacji jest korzystne, ponieważ jest to energochłonny i od pewnego momentu nieodwracalny proces, który wymaga do ukończenia kilku godzin. Jeśli w tym okresie składniki odżywcze stałyby się ponownie ogólnodostępne, komórki zaangażowane w sporulację byłoby w niekorzystnej sytuacji w stosunku do komórek, które są w stanie szybko wznowić wzrost.

KinE jest homologiem o sekwencji bliskiej pozostałym czterem kinazom, pod względem budowy najbardziej przypomina KinA (**Ryc. 1.4**) (R. Wu i in., 2013). Tak jak KinA, znajduje się pod pozytywną kontrolą czynnika transkrypcyjnego σ^H (Britton i in., 2002), w przeciwieństwie do pozostałych kinaz, za których ekspresję odpowiada σ^A . Jest najmniej poznana kinazą spośród powyższych (R. Wu i in., 2013). Oczyszczona KinE wydaje się przeprowadzać fosforylację Spo0F na podobnym poziomie co KinC i KinD (M. Jiang, Shao, i in., 2000). Do tej pory, nie udało się określić fenotypu mutantu $\Delta kinE$ (McLoon, Kolodkin-Gal, i in., 2011; Serra i in., 2014; Shank i in., 2011).

Podsumowując, kinazy histydynowe zaangażowane w *phosphorelay* można pogrupować w pary w zależności od indukowanego zachowania w odpowiedzi na warunki stresowe (**Ryc. 1.7**). KinA i KinB odpowiadają za rozpoczęcie procesu sporulacji, przy czym główną kinazą w tym duecie jest KinA. KinB i KinC regulują ruch ślizgowy, przy czym ważniejszą kinazą jest KinB. KinC i KinD odpowiadają za tworzenie biofilmu. Co ciekawe wszystkie trzy wymienione procesy wymagają charakterystycznego stężenia Spo0A~P: najniższego dla ruchu ślizgowego, średniego dla tworzenia biofilmu i najwyższego dla sporulacji (**Ryc. 1.7**) (Fujita i in., 2005).



Rycina 1.7. Schemat zależności stężenia Spo0A~P od podjętych zachowań adaptacyjnych u *B. subtilis* (Kovács, 2016) - zmodyfikowane

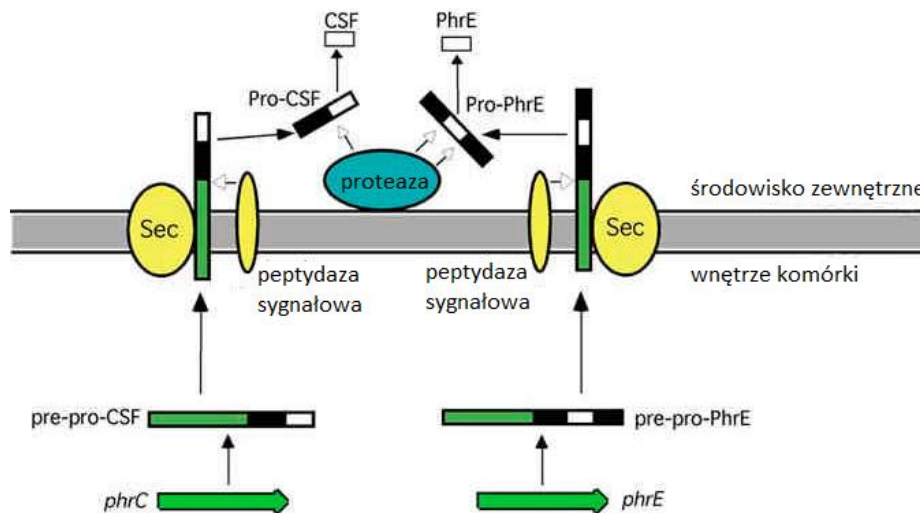
Kinazy histydynowe biorące udział w *phosphorelay* są również regulowane negatywnie. Działanie KinA oraz KinB jest blokowane przez antykinazę Sda (46 aa), która jest wyrażana w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, zapobiegając sporulacji, jeśli replikacja chromosomu jest upośledzona (Cunningham & Burkholder, 2009; Ruvolo i in., 2006; Whitten i in., 2007). Sda łączy się z odpowiednią kinazą i blokuje jej autofosforylację (Ishii & Eguchi, 2021), zaś sama podlega negatywnej regulacji poprzez degradację protezą ClpXP. Antykinazą KinA jest również białko Kipl (240 aa), którego ekspresja wydaje się być związana z niską dostępnością azotu oraz z dostępnością źródeł węgla (L. Wang i in., 1997). Tym samym białko Kipl prawdopodobnie odgrywa rolę w blokowaniu sporulacji w środowisku bogatym w składniki odżywcze (Mitrophanov & Groisman, 2008). Kipl jest z kolei wiązane i blokowane przez KipA, z którym jest wspólnie wyrażane (Jacques i in., 2011). Generalnie antykinazy działają jako istotne punkty kontrolne zapobiegające zarodnikowaniu w warunkach, w których tempo wzrostu jest niskie pomimo obecności składników odżywczych, na przykład w przypadku uszkodzeń chromosomu, w niskich temperaturach lub w obecności czynników stresowych, takich jak antybiotyki i etanol (Narula i in., 2016). Regulacja, szczególnie KinA i KinB, ma zatem kluczowe znaczenie dla zapewnienia, że bakterie przechodzą do nieodwracalnych etapów sporulacji tylko w warunkach poważnego niedoboru składników odżywczych (Winnen i in., 2013).

Mniej znanymi inhibitorami kinaz histydynowych biorących udział w *phosphorelay* są produkty genów *sivA*, *sivB* i *sivC* (ang. *sporulation-inhibitory vegetative gene*, pl. wegetatywny gen hamujący sporulację), które znajdują się pod pozytywną kontrolą Spo0A~P, tym samym tworząc pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego (Garti-levi i in., 2013). Jak nazwa wskazuje, są one wyrażane podczas wzrostu wegetatywnego, gdy dostępne są składniki odżywcze. SivA i SivB hamują aktywność KinA, podczas gdy SivC działa na KinB oraz KinC. Ponadto SivC bierze udział w ruchu ślizgowym i tworzeniu biofilmu, zaś spekuluje się, że SivC może działać w celu hamowania sporulacji w komórkach, które mają stać się ruchliwe, ponieważ pierwotnie stwierdzono, że *sivC* jest członkiem regulonu σD , który obejmuje geny wymagane do składania wici, ruchliwości i chemotaksji. Problematyczna jest jednak kolokalizacja tych białek, ponieważ SivA i SivB są białkami zewnątrzkomórkowymi, podczas gdy KinA jest kinazą cytoplazmatyczną.

2.3. Gęstość populacji jako induktor sporulacji

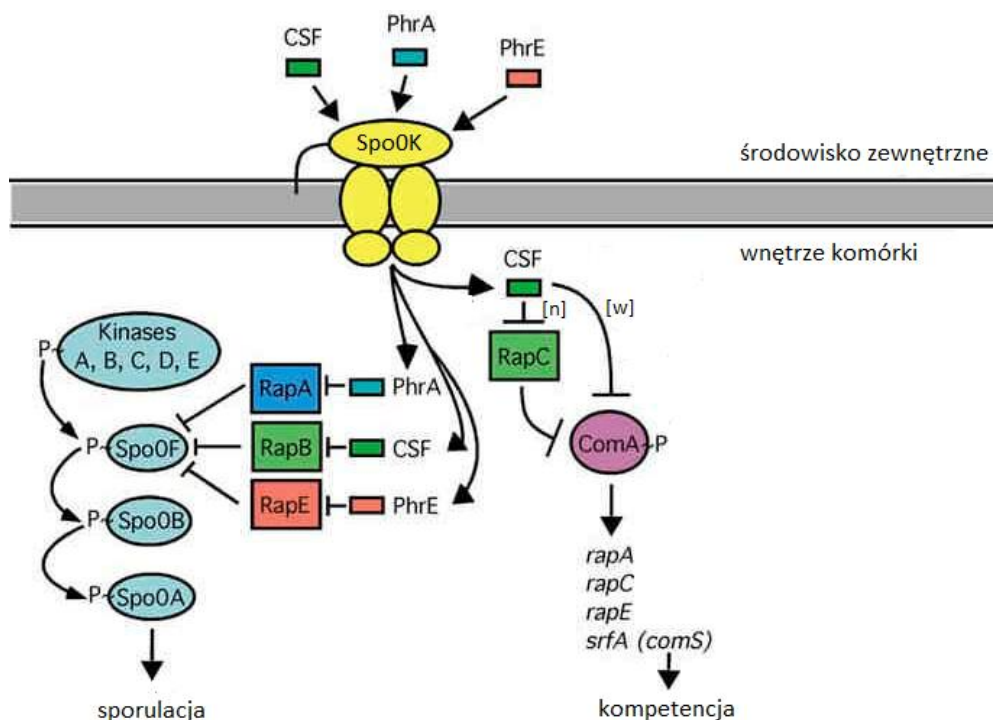
Oprócz niedoboru składników odżywczych, również odpowiednia gęstość hodowli ma kluczowe znaczenie dla indukcji procesu sporulacji. Jak zaobserwowano, głodzone komórki bakteryjne w hodowli o niskiej gęstości nie przeprowadzają sporulacji wydajnie (Grossman & Losick, 1988).

Gęstość populacji jest monitorowana poprzez system *quorum-sensing* (Miller & Bassler, 2001). Jak wspomniano na początku podrozdziału 1.2, *B. subtilis* używa go do wyboru pomiędzy inicjacją kompetencji lub sporulacji, i wykorzystuje w tym celu autoinduktory. Są nimi m.in. przedstawiciele rodziny Phr. Dla procesu sporulacji najważniejsze białka z tej rodziny to: peptyd CSF (znany również jako PhrC), PhrA, PhrE, PhrH i PhrI (Gallegos-Monterrosa & Kovács, 2023; Pottahil & Lazazzera, 2003; Solomon i in., 1996). Geny *phrC*, *phrE* i *phrI* znajdują się pod pozytywną kontrolą czynników transkrypcyjnych σ_A oraz σ_H , zaś za ekspresję *phrA* i *phrH* odpowiada wyłącznie σ_A (McQuade i in., 2001; Mirouze i in., 2011). Geny *phr* są sprzężone z genami *rap* i ulegają wspólnej transkrypcji, zazwyczaj tworząc pary, np. *phrA-rapA*. Jest to ściśle związane z funkcją peptydów Phr, które wiążąc się z odpowiednimi fosfatazami Rap powodują ich inhibicję.



Rycina 1.8. Schemat powstawania peptydów sygnałowych CSF oraz PhrE (Pottahil & Lazazzera, 2003) - zmodyfikowane. Zielone strzałki oznaczają geny. Zielona część sekwencji aminokwasowej pre-pro-CSF oraz pre-pro-PhrE reprezentuje sekwencję sygnałową, czarna – część wyciętą podczas dojrzewania białek, zaś biała – dojrzały pentapeptyd. Strzałki z białymi grotami wskazują miejsca cięcia peptydaz, które usuwają sekwencje sygnałowe.

Phr powstają jako nieaktywne pro-białka o długości ok. 40 aminokwasów i są wydzielane zewnątrzkomórkowo przez szlak eksportu zależny od Sec (S. Stephenson i in., 2003), gdzie ulegają proteolitycznemu cięciu do aktywnych penta- lub heksapeptydów (Lanigan-Gerdes i in., 2007) (**Ryc. 1.8**). Stopniowo gromadzą się w środowisku wraz ze wzrostem gęstości komórek i po przekroczeniu stężenia progowego są importowane do wnętrza komórek *B. subtilis* przez Opp (znana również jako Spo0K), należącą do rodziny transporterów ABC (**Ryc. 1.9**). Wewnątrz komórki, już jako aktywne peptydy, Phr unieczynniają odpowiednie fosfatazy Rap, co zapobiega defosforylacji Spo0F i w konsekwencji umożliwia aktywację regulatora transkrypcji Spo0A (M. Jiang, Grau, i in., 2000). Tak więc, gdy wymienione wyżej autoinduktory osiągają poziom progowy, który reprezentuje odpowiednią gęstość komórek, ich wysokie stężenia wewnątrzkomórkowe prowadzą do wzrostu ufosforylowanej, aktywnej formy Spo0A, a tym samym do indukcji sporulacji (Miller & Bassler, 2001). Co ciekawe, CSF jako jedyny wiąże się i blokuje różne białka Rap. Oprócz dwóch fosfataz związanych ze sporulacją (RapB i RapJ), przy niskich stężeniach CSF działa również na RapC umożliwiając fosforylację czynnika transkrypcyjnego ComA, który odpowiada za ekspresję genów związanych z kompetencją (Pottahil & Lazazzera, 2003).



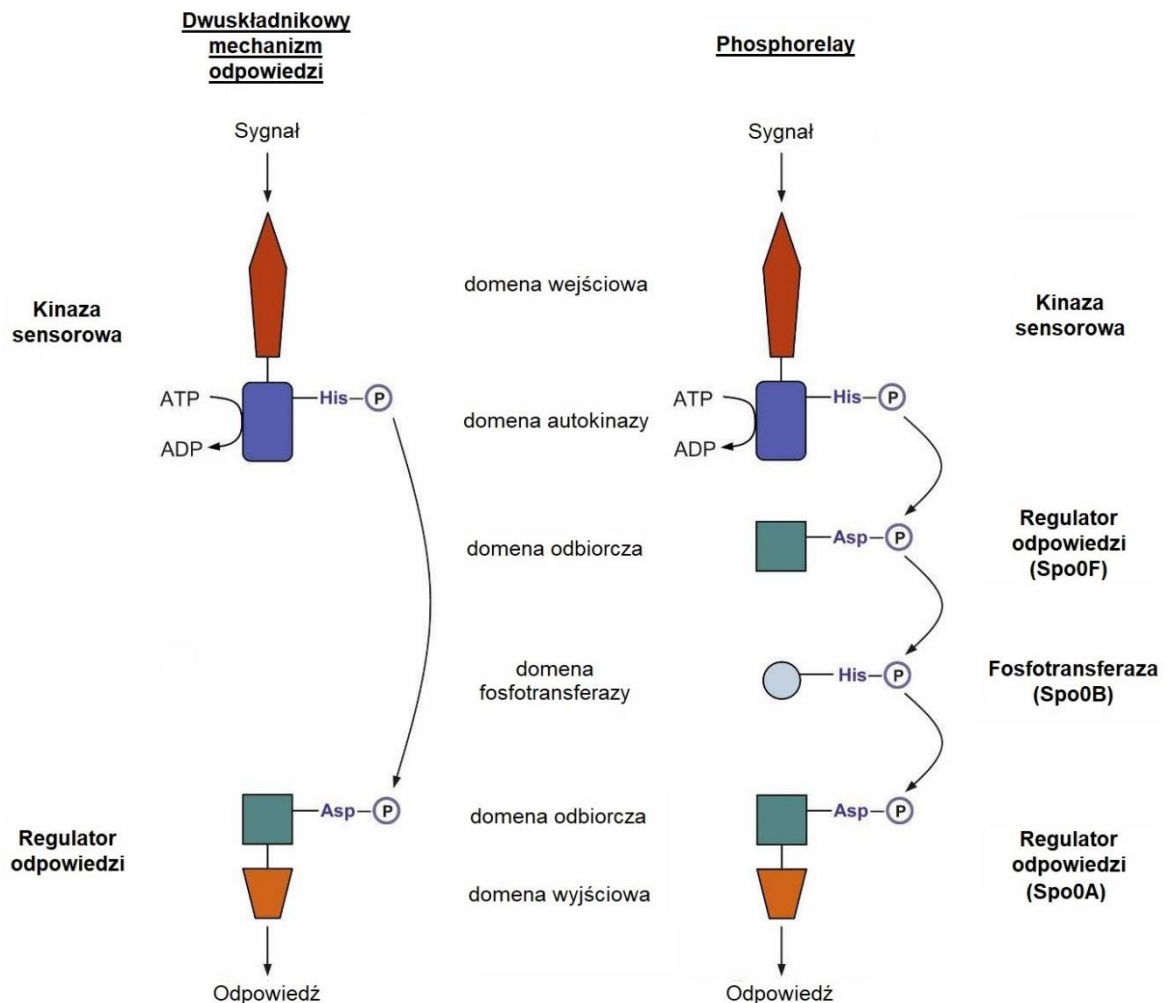
Rycina 1.9. Schemat działania autoinduktorów CSF, PhrA i PhrE (Pottahil & Lazazzera, 2003) - zmodyfikowane. [n] – niskie stężenie CSF; [w] – wysokie stężenie CSF.

2.4. Składniki *phosphorelay* i ich regulacja

Kluczowym białkiem indukującym proces sporulacji jest Spo0A, regulator transkrypcyjny, który może służyć jako represor lub aktywator transkrypcji, w zależności od genu docelowego (Burbulys i in., 1991; Sonenshein, 2000). Jak wspomniano wyżej, jest on fosforylowany na drodze wieloetapowego transferu grupy fosforanowej, który jest ważną odmianą dwuskładnikowego mechanizmu bodziec-reakcja, stosowanego do kontrolowania reakcji środowiskowych u bakterii (**Ryc. 1.10**). Systemy dwuskładnikowe składają się z kinazy histydynowej reagującej na ligand sygnałowy i dwudomenowego regulatora odpowiedzi, który jest zwykle czynnikiem transkrypcyjnym (K. Stephenson & Hoch, 2002; Zapf i in., 2000). W *phosphorelay* różnicą jest to, iż grupa fosforylowa jest przenoszona z reszty histydynowej kinazy na resztę asparaginianową jednodomenowego regulatora odpowiedzi (Spo0F), który nie ma domeny wyjściowej wiążącej DNA. Grupa fosforylowa jest następnie przenoszona na asparaginian w domenie odbiorczej regulatora odpowiedzi (Spo0A) przez fosfotransferazę (Spo0B), unikalny związek pośredni, który zostaje przejściowo fosforylowany na histydynie i służy jako fosfodonor dla regulatora odpowiedzi. *Phosphorelay* zapewnia wyższy poziom regulacji niż podstawowe systemy dwuskładnikowe, zapewniając więcej punktów kontrolnych dla wprowadzania zarówno sygnałów dodatnich, jak i ujemnych.

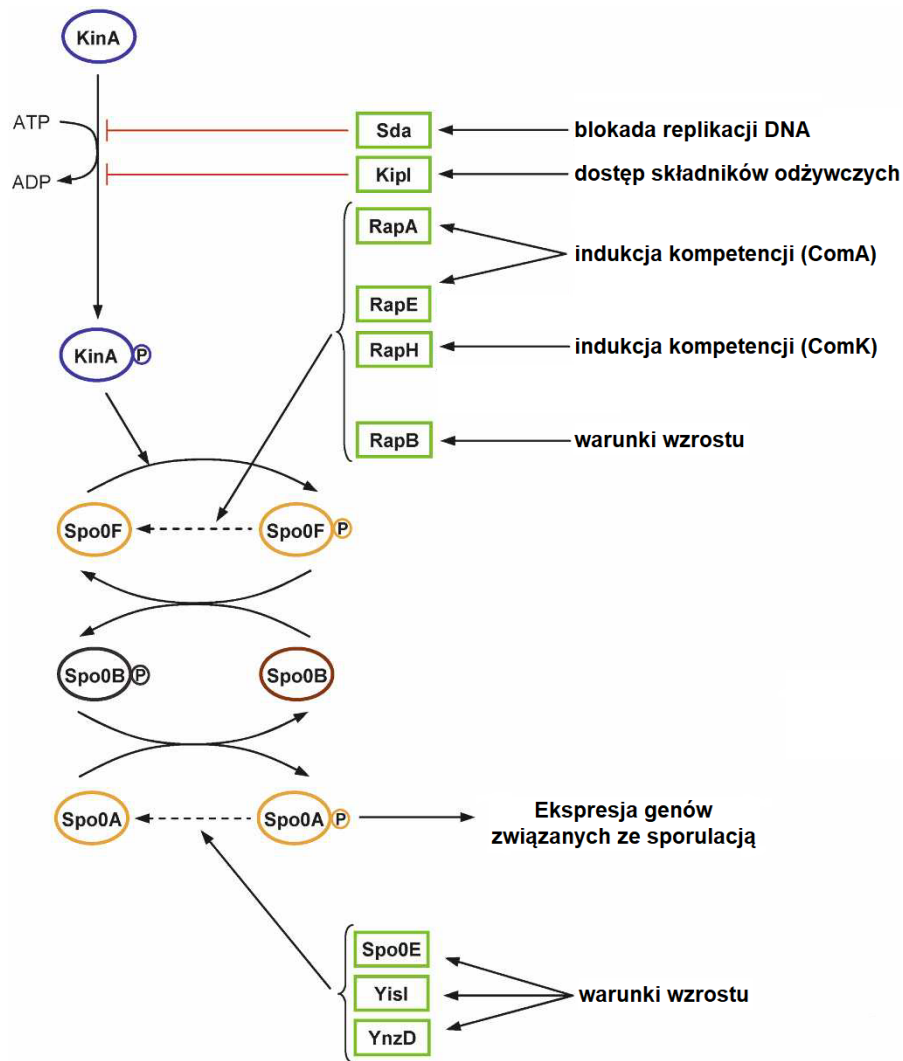
W przypadku Spo0A, transdukcja sygnału rozpoczyna się autofosforylacją KinA-E, które przekazują swoje sygnały na Spo0F. Spo0F przyjmuje rolę drugorzędowego przekaźnika i może służyć jako punkt akumulacji dla różnych wejść stresowych (**Ryc. 1.9**). Kinazy tworzą acylofosforan na reszcie Asp-54 w Spo0F, tym samym czyniąc go substratem dla fosfotransferazy Spo0B, która przyjmuje fosforan na swoją resztę His-30 (Tzeng i in., 1998), aby następnie przekazać go na Asp-54 lub Asp-10 w Spo0A (Burbulys i in., 1991) (**Ryc. 1.10**). Reakcja fosfotransferu między Spo0F, Spo0A i Spo0B jest odwracalna, a Spo0F i Spo0A oddziałują przejściowo z tym samym miejscem Spo0B (Zapf i in., 2000). Co ciekawe, Spo0B jest białkiem jednodomenowym, występuje jako homodimer i nie zmienia swojej konformacji przestrzennej po utworzeniu kompleksu, co sugeruje, że posiada ono sztywną strukturę z wbudowaną architekturą odpowiednią do przejściowych interakcji zarówno ze Spo0F, jak i Spo0A. C-końcowa domena Spo0B jest bardzo podobna do domen kinaz histydynowych wiążących ATP, chociaż nie wykazuje takiej właściwości (Varughese i in.,

2006; R. Wu i in., 2013). W związku z tym Spo0B utraciło zdolność do autofosforylacji, ale zachowało zdolność do tworzenia kompleksu fosfotransferowego z domeną odbiorczą swoich partnerów, Spo0F i Spo0A (Szurmant & Hoch, 2010). *Phosphorelay* sporulacji można zatem wyobrazić sobie jako dwa indywidualne dwuskładnikowe systemy odpowiedzi ułożone w tandemie (**Ryc. 1.10**).



Rycina 1.10. Schemat szlaku *phosphorelay* w porównaniu do dwuskładnikowego mechanizmu odpowiedzi (Mitrophanov & Groisman, 2008) - zmodyfikowane. Domena autokinazy składa się z subdomeny fosfotransferazy i subdomeny wiążącej ATP (Varughese i in., 2006)

Jednocześnie z transferem grupy fosforylowej wymagane są systemy defosforylacji, potrzebne do dokładnej interpretacji sygnałów (**Ryc. 1.11**). W *phosphorelay* rolę tę pełnią fosfatazy fosforanu aspartylu (Perego, 2001). Jak wspomniano przy okazji omawiania wpływu gęstości hodowli na indukcję sporulacji, Spo0F~P jest deaktywowany przez działanie białek z rodziny Rap (RapA, RapB, RapE, RapH, RapI, RapJ, RapP) (**Ryc. 1.9, 1.11**) (Gallegos-Monterrosa & Kovács, 2023). Ich ekspresja jest indukowana w różny sposób przez



Rycina 1.11. Schemat regulacji *phosphorelay* poprzez fosfatazy (Mitrophanov & Groisman, 2008) - zmodyfikowane

procesy fizjologiczne alternatywne do sporulacji, np. rozwój kompetencji sprzyja ekspresji RapA i RapE, ponieważ znajdują się one pod pozytywną kontrolą ComA, zaś warunki wzrostu wegetatywnego indukują RapB (Comella & Grossman, 2005; Perego, 2001). RapH jest o tyle ciekawą fosfatazą, że działa zarówno na Spo0F~P, jak i na ComA~P, a więc blokuje sporulację oraz kompetencję jednocześnie, co ma kluczowe znaczenie dla komórki (Mirouze i in., 2011; Smits i in., 2007). Ponieważ transkrypcja RapH jest indukowana przez ComK, czynnik transkrypcyjny późnej kompetencji, białko działa na etapie, w którym kompetencja jest już dobrze zainicjowana. Tym samym RapH zapobiega inicjacji sporulacji w kompetentnych komórkach, jak również przyczynia się do wyjścia ze stanu kompetentnego. RapI odpowiada za poziomy transfer genów i wycięcie transpozonu ICEBs1, ale jednocześnie zmniejsza wydajność procesu sporulacji (Parashar, Jeffrey, i in.,

2013; Singh i in., 2013). RapP to przykład fosfatazy, która jest kodowana na plazmidzie (Omer Bendori i in., 2015; Parashar, Konkol, i in., 2013; Verdugo-Fuentes i in., 2020). Co ciekawe, RapP stracił możliwość bycia regulowanym przez PhrP z powodu wystąpienia pojedynczej mutacji w swoim genie, tym samym działa jako konstytutywny represor swoich celów, czyli powoduje bezpośrednią defosforylację Spo0F~P oraz pośrednio lub bezpośrednio inaktywuje ComA, przez co silnie reguluje proces tworzenia biofilmu, a także sporulację i kompetencję. Zaobserwowano jednak, że w pewnych warunkach PhrH powoduje supresję RapP *in vivo*, ale nie *in vitro*. Sugeruje się, że PhrH może podlegać modyfikacji potranslacyjnej *in vivo*, która umożliwi bezpośrednią inhibicję RapP lub, że PhrH zwiększa ekspresję peptydu, który dopiero bezpośrednio wiąże się z RapP.

Konsekwencją defosforylacji Spo0F~P jest nie tylko uniemożliwienie przeniesienia fosforanu na Spo0B i dalej na Spo0A, ale dodatkowo odwrócenie przepływu fosforanu przez układ *phosphorelay*, prowadząc do defosforylacji istniejącego wcześniej Spo0A~P.

Z kolei Spo0A podlega dezaktywacji przez fosfatazy Spo0E (85aa), YnzD (57aa) i Yisl (56aa) (Perego, 2001). Dwa ostatnie białka są wysoce homologiczne do Spo0E i wyraźnie brakuje w ich sekwencji ok. 25 aminokwasowej sekwencji C-końcowej obecnej w pierwszej fosfatazie. Profile ekspresji genów *spo0E*, *yisl* i *ynzD* różnią się od siebie, co oznacza, że inne czynniki indukują ich transkrypcję, jednak generalnie są one przeciwne do tych, inicjujących sporulację. *YnzD*, tak jak gen *rapB*, ulegają ekspresji w warunkach sprzyjających wzrostowi wegetatywnemu, zaś indukcja transkrypcji *yisl* i *spo0E* jest zauważalna podczas fazy przejściowej między fazą wzrostu logarytmicznego a stacjonarnego.

Transkrypcja *spo0E* zachodzi z trzech różnych miejsc promotorowych, z których dwa są oddzielone od siebie tylko trzema zasadami nukleotydowymi (Reder i in., 2012). Pierwszy promotor wydaje się być stale aktywny podczas wzrostu, natomiast drugi promotor jest rozpoznawany przez polimerazę RNA zawierającą czynnik transkrypcyjny σA i może być blokowany przez AbrB. Trzeci promotor znajduje się pod pozytywną kontrolą alternatywnego czynnika transkrypcyjnego σB , który reaguje na stres środowiskowy i metaboliczny, indukując tzw. ogólną odpowiedź na stres (ang. *general stress response*, GSR) (Rodriguez Ayala i in., 2020). GSR jest szybką, krótkotrwałą i odwracalną reakcją, pojawia się 5–15 minut od indukcji stresora. Tym samym, dzięki spowolnieniu fosforylacji Spo0A poprzez Spo0E komórka ma czas zastosować inne, mniej ekstremalne reakcje adaptacyjne,

takie jak GSR, zanim wybierze sporulację, aby poradzić sobie z niekorzystnymi warunkami środowiska. Do stresorów aktywujących GSR należą: wysoka i niska temperatura, wysokie stężenie soli, etanol, antybiotyki, niedobór glukozy, fosforanów i tlenu, inhibitory zmniejszające stężenie ATP oraz światło niebieskie. W istocie, niektóre z tych stresorów (m.in. niska temperatura, wysokie stężenie soli i etanol) zostały zgłoszone jako czynniki zmniejszające wydajność sporulacji.

Negatywne regulatory *phosphorelay* są kontrolowane przez FtsH, metaloproteazę zakotwiczoną w błonie komórkowej w taki sposób, że oba jej końce są eksponowane w cytoplazmie (Le & Schumann, 2009). Część C-końcowa zawiera blok zaangażowany w wiązanie i hydrolizę ATP oraz miejsce wiązania dla Zn^{2+} . Celem FtsH są fosfatazy RapA, RapB, RapE i Spo0E, przy czym C-koniec Spo0E jest niezbędny do jego degradacji - YnzD i YisI nie są rozkładane przez FtsH ze względu na skróconą o ok. 25 aa część C-końcową. Spo0M, inny regulator sporulacji, również jest degradowany przez FtsH (Thi Nguyen & Schumann, 2012).

Podsumowując, *phosphorelay* zapewnia mechanizm zbierania sygnału z kilku kinaz białkowych i zapewnia wiele poziomów kontroli, zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i posttranslacyjnym aby zapobiec nierozważnej indukcji sporulacji. Spo0A~P jest zaś kluczowym pośrednikiem łączącym sygnały środowiskowe, metaboliczne i cyklu komórkowego z aktywacją maszynerii transkrypcyjnej wymaganej do sporulacji.

Jak już zasugerowano, nie wszystkie komórki bakteryjne wybierają sporulację, jako sposób na przetrwanie niesprzyjających warunków środowiskowych: bakterie mogą stać się bardziej mobilne czy aktywować w sobie kanibalizm lub kompetencję. Tym samym nawet hodowla genetycznie identycznych komórek bakteryjnych hodowanych w jednorodnym środowisku (np. w płynnych pożywkach w dobrze mieszanych kolbach) jest heterogeniczna i składa się z różnych subpopulacji komórek (Dubnau & Losick, 2006). W warunkach promujących sporulację można wyróżnić dwie subpopulacje: komórek sporulujących i nie sporulujących. Jeśli warunki środowiskowe zmieniają się na korzystne, komórki niezarodnikujące powrócą do swojej normalnej aktywności. Dlatego uważa się, że heterogenność jest korzystną właściwością pozwalającą populacji uniknąć zaangażowania w nieodwracalną i energochłonną sporulację w środowiskach, w których trudne warunki mogą się łatwo odwrócić. Fosfatazy z rodzin Rap i Spo0E, które regulują *phosphorelay*, są niezbędne do heterogeniczności komórek związanych z Spo0A, ponieważ delekcje genów

rapA i *spo0E* niemal całkowicie znoszą heterogeniczność populacji *B. subtilis* (Veening i in., 2005).

2.5. Regulon Spo0A, głównego czynnika transkrypcyjnego procesu sporulacji

Spo0A może być transkrybowany z dwóch promotorów (Devi i in., 2015). Kiedy poziom składników odżywczych w środowisku jest wysoki, Spo0A jest wyrażane ze stosunkowo słabego, konstytutywnego promotora Pv (ang. *vegetative promoter*, pl. promotor wegetatywny), kontrolowanego przez czynnik transkrypcyjny σ^A . Kiedy komórki wchodzi w fazę stacjonarną, aktywność czynnika σ^H nieznacznie wzrasta, co prowadzi do ekspresji Spo0A z silniejszego promotora Ps (ang. *sporulation-specific promoter*, pl. promotor sporulacyjny), znajdującego się ok 150 pb poniżej Pv (Chibazakura i in., 1991). Odpowiednio wysoki poziom Spo0A blokuje transkrypcję genu *abrB*, który koduje regulator transkrypcji AbrB, odpowiadający m.in. za inhibicję ekspresji czynnika σ^H czy KinA. Spadek stężenia AbrB prowadzi więc do derepresji *sigH*. W rezultacie zwiększona aktywność czynnika σ^H stymuluje ekspresję genów dla KinA, Spo0F i Spo0A, powodując dalszy wzrost Spo0A. Jednocześnie Spo0A~P tworzy ujemną pętlę zwrotną, poprzez represję genów *spo0A*, *kinA* oraz *kinC*, zaś w przypadku *spo0F* najpierw następuje stymulacja ekspresji tego genu, zaś przy wysokim stężeniu Spo0A~P jego inhibicja (Fujita & Sadaie, 1998). Co ciekawe, Spo0A nie reguluje ekspresji *spo0B*, w związku z czym stężenie Spo0B pozostaje stałe podczas inicjacji sporulacji (Sen i in., 2011; Tiwari i in., 2011).

Transkrypcja Spo0A z promotora Ps może być zablokowana przez białko Soj, które z kolei znajduje się pod negatywną kontrolą Spo0J (Quisel & Grossman, 2000). Soj to ATPaza, zaangażowana m.in. w regulację inicjacji replikacji DNA (Scholefield i in., 2011). W zależności od formy, dimeru lub monomeru, odpowiednio aktywuje lub hamuje ten proces poprzez wpływ na DnaA, białko rozpoznające i wiążące się z miejscem początku replikacji, tym samym Soj działa jako przełącznik molekularny. Spo0J inaktywuje Soj poprzez stymulowanie jej właściwości hydrolizy ATP, dzięki czemu ATPaza przechodzi z dimeru do monomeru. Soj hamuje translację również kilku innych genów związanych ze sporulacją, m.in. *spollA*, *spollE* i *spollG* (Quisel & Grossman, 2000).

Podobnie jak inne regulatory odpowiedzi, Spo0A jest aktywowany przez fosforylację reszty aspartylowej znajdującej się w N-końcowej części białka. Fosforylacja Spo0A

stymuluje dimeryzację białka oraz zdolność do wiązania się z rozpoznawaną przez niego sekwencją w DNA, znaną jako kasetka OA, poprzez domenę wiążącą DNA, która znajduje się w C-końcowej części białka (De Jong i in., 2010; Fujita & Losick, 2005). Konsensusowe miejsce wiązania dla Spo0A~P to dwunastonukleotydowa sekwencja 5'-TTTGTCGAAAAA-3' (Molle, Fujita, i in., 2003).

Wykryto 121 genów, które są pod bezpośrednią kontrolą Spo0A, przy czym dla 40 genów Spo0A działa jako aktywator, zaś dla 81 jako represor (w tym nad genami kodującymi składniki maszyneryi replikacji DNA, biosyntezę wici i chemotaksję). Geny znajdujące się pod bezpośrednią kontrolą Spo0A można dodatkowo podzielić na nisko- i wysokoprogowe (Fujita i in., 2005). Niskoprogowe geny są aktywowane lub represjonowane już przy niższym stężeniu Spo0A~P, co jest związane z tym, iż Spo0A~P wykazuje wyższe powinowactwo do ich sekwencji regulatorowych niż w przypadku genów wysokoprogowych. Do genów niskoprogowych należą m.in. geny odpowiadające za kanibalizm czy tworzenie biofilmu, zaś wysokoprogowe są związane ze sporulacją. Co ciekawe, dla prawidłowego przebiegu sporulacji wymagany jest stopniowy wzrost stężenia Spo0A~P, umożliwiający sekwencyjną regulację najpierw genów niskoprogowych, a dopiero później wysokoprogowych. Mutanty, które mogły nagle zwiększyć stężenie Spo0A~P do wartości progowej dla sporulacji, nie sporulowały wydajnie, ponieważ w ich przypadku geny nisko- i wysokoprogowe ulegały regulacji w tym samym momencie (Fujita i in., 2005). Prowadzi to do wniosku, że dla prawidłowego przebiegu sporulacji nie tylko wymagane jest odpowiednio wysokie stężenie Spo0A~P, ale również jego stopniowy wzrost.

Jednocześnie nad ponad 500 genami, co stanowi ponad 10% genomu, Spo0A ma kontrolę pośrednią, m.in. poprzez kontrolę ekspresji innych regulatorów transkrypcji, jak np. AbrB. Wśród genów aktywowanych przez Spo0A~P są te zaangażowane w przebudowę siostrzanych chromosomów we włókno osiowe (Ben-Yehuda i in., 2003b; Pogliano i in., 2002) oraz w tworzenie asymetrycznie zlokalizowanej septy, która dzieli rozwijającą się komórkę na mały przedział prespory i duży przedział komórki macierzystej (Ben-Yehuda & Losick, 2002; Levin & Losick, 1996). Spo0A~P jest również odpowiedzialny za aktywację genów, które prowadzą do pojawienia się swoistych dla komórki białek regulatorowych σ F

i σE , które działają odpowiednio w presporze i komórce macierzystej (Molle, Fujita, i in., 2003).

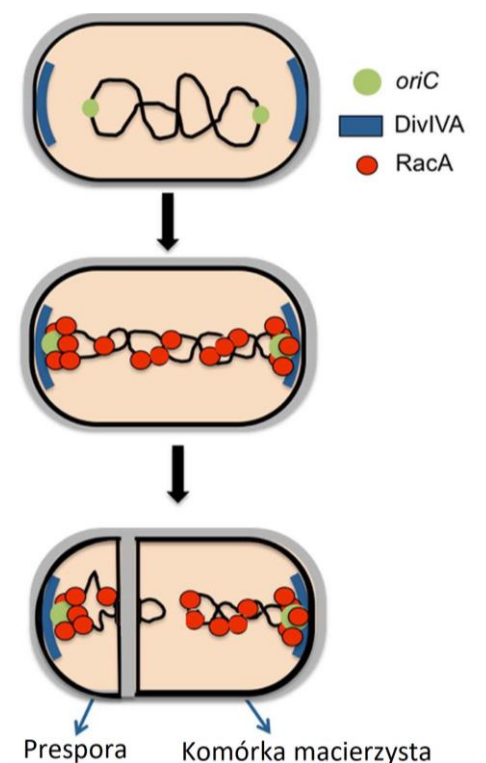
Mimo iż Spo0A jest uznawane na białko charakterystyczne dla etapu inicjacji sporulacji, Spo0A~P nadal funkcjonuje po utworzeniu polarnej septy: gromadzi się na wysokim poziomie w komórce macierzystej, gdzie kieruje transkrypcją genów (Fujita & Losick, 2003). Eksperymenty wykazały, że zarówno sztuczne wzbogacenie prespory w Spo0A~P, jak i sztuczne wzbogacenie komórki macierzystej w inhibitor Spo0A~P, blokuje sporulację. Tym samym Spo0A~P, po utworzeniu polarnej septy, staje się czynnikiem transkrypcyjnym specyficznym dla komórki macierzystej, wymaganym dla prawidłowego przebiegu dalszych etapów sporulacji, przede wszystkim dla ekspresji σE . Selektywne gromadzenie się Spo0A~P w komórce macierzystej może być spowodowane nierównomiernym rozłożeniem materiału genetycznego pomiędzy powstałe przedziały komórkowe. Zaraz po utworzeniu septy, tylko jedna trzecia chromosomu przeznaczonego dla spory, znajduje się w jej wnętrzu. Dwie trzecie pozostaje w komórce macierzystej i musi być przetransportowane do wnętrza prespory przez translokazę DNA, SpoIIIE. Skutkuje to okresem przejściowej asymetrii genetycznej trwającej około 15 minut. Tym samym komórka macierzysta posiada przez ten czas zduplikowaną część genów, w tym wszystkich składników *phosphorelay* za wyjątkiem *spoOF*, zaś prespora jest ich pozbawiona.

2.6. Przebudowa chromosomu

Oddzielenie chromosomów potomnych następuje przed podziałem komórki prawie we wszystkich organizmach (Pogliano i in., 2002). Proces sporulacji jest pod tym względem wyjątkowy, ponieważ względna kolejność podziału i segregacji chromosomów jest odwrócona, mianowicie podział komórkowy rozpoczyna się przed ukończeniem segregacji chromosomów.

Rozchodzenie się chromosomów potomnych podczas sporulacji polega na migracji nowo zduplikowanych miejsc startu replikacji (*oriC*) w kierunku przeciwnych biegunów komórki (**Ryc. 1.12**) (Ben-Yehuda i in., 2003b). W konsekwencji powstają dwa chromosomy potomne, skondensowane w wydłużoną, serpentynową strukturę znaną jako włókno osiowe, biegnące wzdłuż komórki bakteryjnej. Jest to pierwszy morfologiczny przejaw rozpoczęcia procesu sporulacji i tradycyjnie uznaje się jako etap I tworzenia spory (Hilbert &

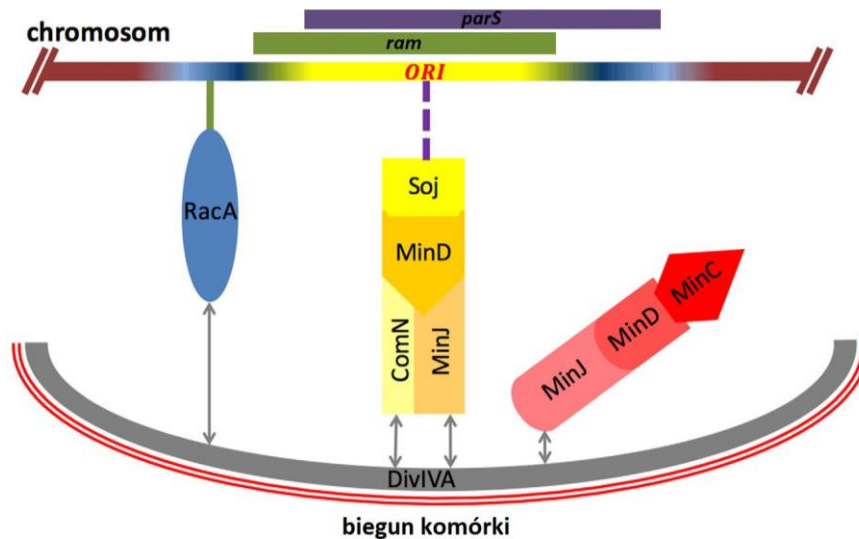
Piggot, 2004). Następnie tworzona jest asymetrycznie zlokalizowana septa, która dzieli sporulującą komórkę na presporę i komórkę macierzystą (Ben-Yehuda i in., 2003b). Jak opisano wyżej, synteza septy przed przeprowadzeniem rozdzielania chromosomów potomnych, sprawia iż, tylko jedna trzecia chromosomu przeznaczonych dla spory znajduje się w odpowiednim przedziale komórkowym. Pozostała część jest przenoszona do wnętrza prespory przez translokazę DNA, SpoIIIE.



Rycina 1.12. Schemat tworzenia się włókna osiowego i rozchodzenia się chromosomów potomnych podczas sporulacji (Schumacher i in., 2016) - zmodyfikowane

Białka zaangażowane w proces rozchodzenia się chromosomów potomnych do biegunów komórki to przede wszystkim DivIVA, RacA oraz Soj i Spo0J. DivIVA wiąże się z fosfolipidami błony komórkowej i gromadzi się w obszarach błony o zwiększonej krzywiznie ujemnej, czyli wklęsłej, w związku z czym jest zlokalizowany przy biegunach komórki (**Ryc. 1.13**) (Hammond i in., 2021; Lenarcic i in., 2009; van Baarle i in., 2013). DivIVA pełni rolę rusztowania i rekrutuje inne białka, np. sekwestruje inhibitor podziału MinCD, zapobiegając w ten sposób asymetrycznemu podziałowi podczas wzrostu. RacA to białko, które rozpoznaje palindromową sekwencję TGACGCCGGCGTCA, nazywaną motywem *ram*, i wiąże się wzdłuż całego chromosomu, z preferencją w regionie miejsca *oriC* (Ben-Yehuda i in., 2003b, 2005; Schumacher i in., 2016). Ponadto zagęszcza nukleoid i pomaga w jego

przebudowie we włókno osiowe, a także zakotwicza chromosomy na przeciwległych biegunach komórki, wiążąc się bezpośrednio z DivIVA. Ekspresja RacA zachodzi tylko podczas sporulacji, wówczas wewnątrzkomórkowe poziomy tego białka wzrastają do około 3000 cząsteczek na komórkę (około 3 μM) (Ben-Yehuda i in., 2003b, 2005; Carniol i in., 2005; Schumacher i in., 2016).

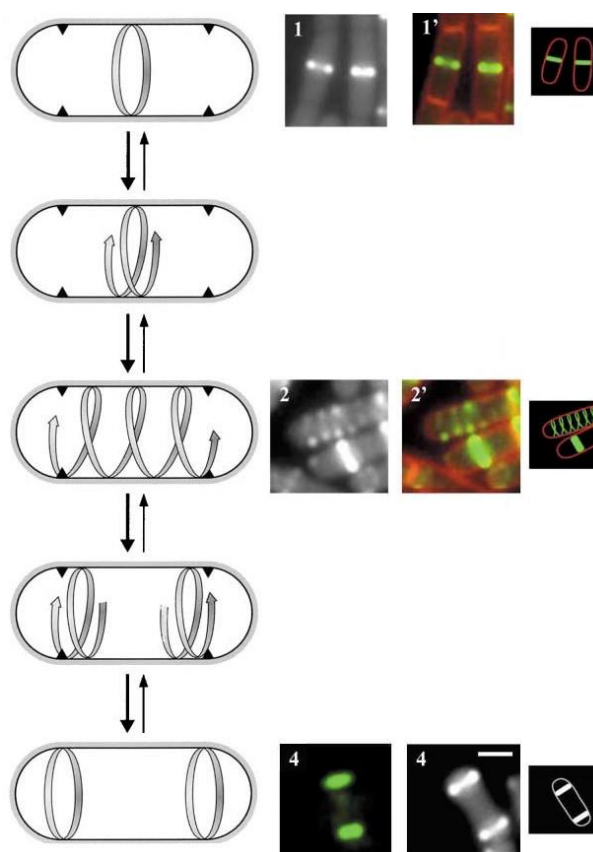


Rycina 1.13. Schemat zakotwiczenia regionu *oriC* chromosomu na biegunie komórkowym podczas sporulacji (Kloosterman i in., 2016) - zmodyfikowane. Dla uproszczenia pominięto Spo0J, wiąże się on bezpośrednio z miejscami *parS* na chromosomie i reguluje aktywność Soj.

Można powiedzieć, że Soj oraz Spo0J tworzą niezależny od RacA mechanizm segregacji rybosomów, w którym uczestniczą również białka Min oraz ComN (**Ryc. 1.13**) (Kloosterman i in., 2016). Spo0J jest białkiem wiążącym DNA w dziesięciu *loci*, określanych jako *parS*, przy czym osiem znajduje się w pobliżu regionu *oriC* chromosomu (Ben-Yehuda i in., 2005; Breier & Grossman, 2007; Roberts i in., 2022; L. J. Wu & Errington, 2003). W obecności białka Soj, cząsteczki Spo0J ulegają kondensacji, tworząc na nukleoidzie skupiska, uczestniczące w segregacji chromosomów. MinJ prawdopodobnie działa pośrednio, łącząc MinD z DivIVA (Kloosterman i in., 2016). ComN umożliwia związanie Soj przez MinD, a tym samym właściwe pozycjonowanie nukleoidu. Brak ComN w kompleksie skutkuje związaniem i aktywowaniem przez MinD inhibitora podziału komórki MinC, który zapobiega gromadzeniu się w pobliżu maszyny podziałowej opartej na FtsZ (Gregory i in., 2008; Lutkenhaus, 2007; Rowlett & Margolin, 2015). Co ciekawe, ComN ma również inną funkcję, mianowicie reguluje posttranskrypcyjnie operon *comE*, związany z późną kompetencją (Ogura & Tanaka, 2009).

2.7. Tworzenie asymetrycznie położonej septy

W podziale komórkowym uczestniczy homolog tubuliny i GTPaza, FtsZ, który polimeryzuje wzdłuż krótkiej osi komórki, w miejscu przyszłego podziału, w strukturę podobną do pierścienia, zwaną pierścieniem Z (Ben-Yehuda & Losick, 2002; Khanna i in., 2021). Pierścień Z służy jako rusztowanie, na którym gromadzi się około tuzina innych białek, tworząc dojrzałą maszynę podziału komórkowego zwaną „divisomem”. Jednym z niezbędnych białek rekrutowanych na wczesnym etapie tworzenia septy jest FtsA, homolog aktyny i ATPaza, który wiąże FtsZ do błony komórkowej. Pierścień Z zwykle znajduje się pośrodku rosnącej komórki, ale po uformowaniu się włókna osiowego jest spychany ze środka komórki w kierunku jej biegunów w formie spiralnych włókien za co prawdopodobnie odpowiada białko RefZ (**Ryc. 1.14**) (Ben-Yehuda & Losick, 2002; Margolin, 2002; Wagner-Herman i in., 2012).



Rycina 1.14. Schemat przesuwania się pierścienia Z ze środka komórki do jej biegunów (Ben-Yehuda & Losick, 2002) - zmodyfikowane

RefZ jest wyrażane na początku sporulacji, ma domenę wiążącą DNA i dlatego proponuje się, że działa, wykorzystując strukturę i organizację replikowanych chromosomów (Wagner-

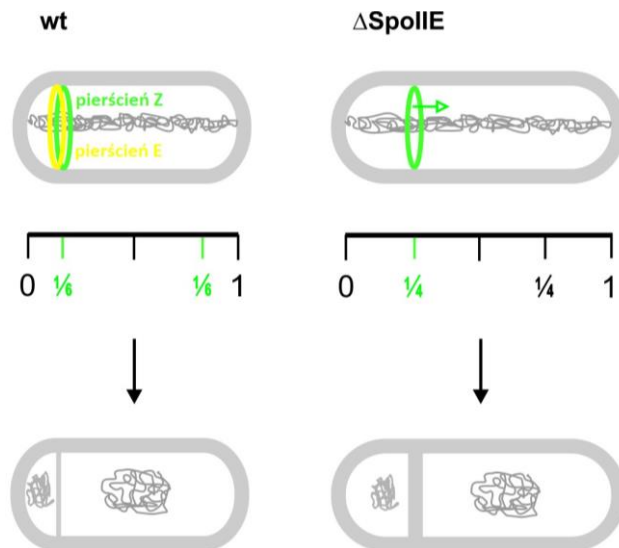
Herman i in., 2012). Wraz z FtsZ i FtsA, spirale zawierają również dwa inne białka wczesnego podziału, EzrA i ZapA, które są odpowiednio negatywnym i pozytywnym regulatorem formowania pierścienia Z (Adams & Errington, 2009; Cleverley i in., 2014; Pacheco-Gómez i in., 2013). Konsekwencją jest pojawienie się dwóch pierścieni Z w pobliżu obu biegunów komórkowych, z czego jeden następnie zanika, a drugi służy do utworzenia septy. Za degradację jednego z pierścieni odpowiadają białka SpoIID, SpoIIM i SpoIIP, które na późniejszym etapie sporulacji są również wymagane do procesu pochłonięcia prespory przez komórkę macierzystą (Eichenberger i in., 2001), a także MciZ, blokujący GTPazową aktywność FtsZ (Handler i in., 2008). Wszystkie są wyrażane przez specyficzny dla komórki macierzystej czynnik σ_E , który jest aktywowany dopiero po ukończeniu tworzenia septy.

Asymetryczny podział komórki wymaga tego samego zestawu białek, który jest wykorzystywany podczas podziału wegetatywnego (Barák i in., 2019). Oprócz białek wczesnego podziału, białka późnego podziału, takie jak DivIB, DivIC, FtsL, FtsW i PBP (ang. *penicillin binding proteins*, pl. białka wiążące penicylinę) są również składnikami mechanizmu asymetrycznego podziału komórkowego.

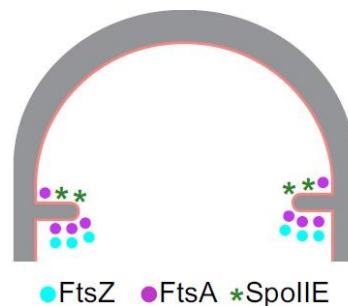
Asymetryczna septa tworzy w około 1/6 długości komórki od jednego z jej biegunów (Barák i in., 2019). Komórki wegetatywne i zarodnikujące różnią się nie tylko położeniem miejsca podziału, ale także grubością sept, które wynoszą odpowiednio około 80 nm i 25 nm (Khanna i in., 2021). Cieńsza przegroda polarna prawdopodobnie ma ważne konsekwencje fizjologiczne podczas sporulacji (Khanna i in., 2020). Po pierwsze, proponuje się, aby wiele kompleksów białkowych przechodziło przez przegrodę, obejmując obie błony przegrody podczas sporulacji (np. kompleksy SpoIIIE i SpoIIQ-SpoIIIA), co może być ułatwione przez krótszą odległość między błonami przegrodowymi. Po drugie, cieńsza przegroda polarna może być bardziej elastyczna, co pozwala jej na zginanie i rozciąganie podczas kolejnego etapu morfologicznego, czyli pochłaniania prespory przez komórkę macierzystą.

Innym wyróżnikiem asymetrycznie zlokalizować septy jest obecność integralnego białka błonowego specyficznego dla sporulacji, SpoIIIE. SpoIIIE ma trzy domeny: N-końcową domenę z 10 segmentami transbłonowymi (region I), domenę centralną, która promuje oligomeryzację SpoIIIE i jego interakcję z FtsZ (region II) oraz domenę C-końcową fosfatazy, która bierze udział w aktywacji specyficznego dla prespory czynnika transkrypcyjnego σ_F

po utworzeniu przegrody (region III) (Carniol i in., 2005). Pierścień Z związany z SpoII_E, określa się jako tzw. pierścień E (Ben-Yehuda & Losick, 2002). Brak SpoII_E nie tylko zmniejsza efektywność tworzenia asymetrycznej septy, ale także powoduje przesunięcie miejsca jej syntezy z 1/6 długości komórki na 1/4, z jednoczesną utratą precyzji (**Ryc. 1.15**) (Barák & Muchová, 2018). Ponadto mutant z delecją *spoII_E* tworzy przegrodę o grubości przypominającej przegrodę wegetatywną.



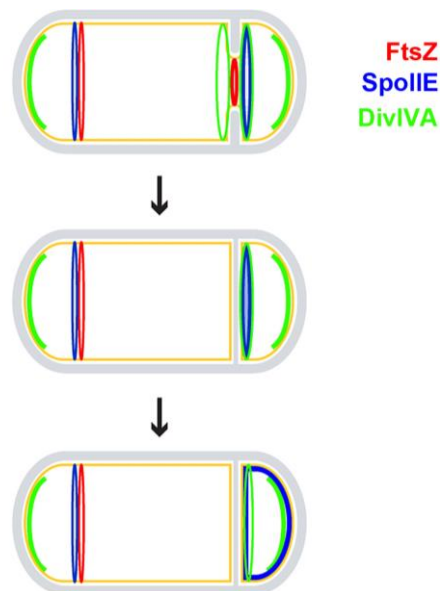
Rycina 1.15. Schemat przedstawiający skutki braku białka SpoII_E w komórce *B. subtilis* podczas sporulacji (Barák & Muchová, 2018)



Rycina 1.16. Schemat asymetrycznego rozłożenia białek FtsZA i SpoII_E podczas powstawania septy sporulacyjnej (Khanna i in., 2021)

Rozwijająca się septa cechuje się nie tylko asymetrią położenia, ale również maszyny podziałowej, ponieważ włókna FtsA_Z są obecne tylko po stronie komórki macierzystej, zaś SpoII_E lokalizuje się wyłącznie po stronie prespory (**Ryc. 1.16**) (Khanna i in., 2021). Ponadto, DivIVA jest również wymagany dla prawidłowego tworzenia asymetrycznej septy w sposób niezależny od MinCD i RacA (Eswaramoorthy i in., 2014). Pierścień FtsZ kurczy się i wyczuwając wgłębienie błony, DivIVA lokalizuje się po obu stronach powstającej septy, a następnie sekwestruje SpoII_E do przegrody (**Ryc. 1.17**). Zaobserwowano, że DivIVA

początkowo znajduje się po obu stronach septy, ale preferencyjnie utrzymuje się po stronie prespory po zakończeniu formowania septy. W przeciwieństwie do tego, SpoIIIE preferencyjnie lokalizuje się po stronie prespory przez cały proces tworzenia się przegrody. Ostatecznie SpoIIIE zostaje uwolniony z septy i równomiernie zlokalizowany w błonie otaczającej presporę. Zaobserwowano, że brak DivIVA, po spełnieniu swojej roli w kotwiczeniu chromosomu na biegunach, powodował poważny defekt asymetrycznej septy z powodu niezdolności komórek do przemieszczenia FtsZ i SpoIIIE z pozycji środkowej do polarnej. W rezultacie komórki zatrzymane na tym etapie sporulacji, w przeciwieństwie do innych mutacji podziałowych, o których donoszono, że powodują defekt asymetrycznego podziału, przedwcześnie aktywują czynnik transkrypcyjny σ^F sposób niespecyficzny dla przedziału.

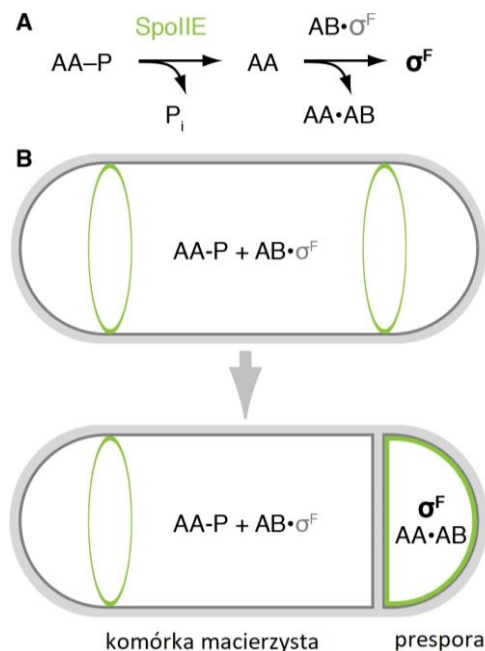


Rycina 1.17. Schemat asymetrycznego rozłożenia białek DivIVA i SpoIIIE podczas powstawania septy sporulacyjnej (Eswaramoorthy i in., 2014)

2.8. Aktywacja sporulacyjnego czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla prespory, σ^F , oraz jego regulon

SpoIIIE odgrywa również inną, kluczową rolę w procesie sporulacji, mianowicie uczestniczy w szlaku prowadzącym do aktywacji σ^F , wczesnego czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla prespory (Carniol i in., 2005). Dzięki swojej domenie fosfatazy, SpoIIIE powoduje konwersję z nieaktywnej fosfoproteiny SpoIIAA^{~P} do jej aktywnej, zdefosforylowanej postaci SpoIIAA. SpoIIAA, jako czynnik anty-anty- σ , reaguje z kolei z zależnym od ATP kompleksem σ^F i anty- σ , SpoIIAB, powodując uwolnienie czynnika

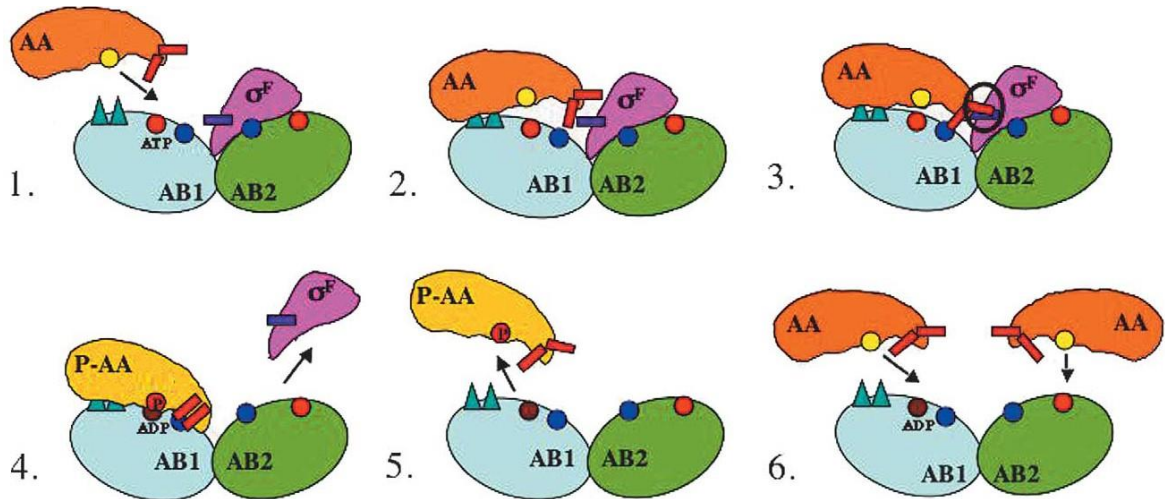
transkrypcyjnego z jego inhibitorem (**Ryc. 1.18A**). Dokładniej, SpoIIAB-ATP łączy się z σ^F jako dimer, zaś SpoIIAA oddziałuje z cząsteczką SpoIIAB niezwiązaną z σ^F i indukuje uwolnienie σ^F z drugiej cząsteczki SpoIIAB (**Ryc. 1.19**) (Ho i in., 2003). Jednocześnie, ponieważ SpoIIAB-ATP jest kinazą serynową, fosforyluje on SpoIIAA na reszcie Ser-58 (Clarkson i in., 2004; Hilbert & Piggot, 2004; Masuda i in., 2004). Jeżeli po uwolnieniu SpoIIAA~P, do SpoIIAB-ADP zdąży dołączyć się kolejna cząsteczka SpoIIAA, to powoduje to zablokowanie SpoAB. Tym samym, działanie SpoIIIE jest stale wymagane dla zachowania aktywności SpoAA, zaś SpoIIAB-ATP hamuje σ^F zarówno bezpośrednio, jako czynnik anty- σ , jak i pośrednio, poprzez inaktywację czynnika anty-anty- σ . Wszystkie te trzy białka są zgrupowane w operon *spoIIAA-spoIIAB-sigF* i wspólnie transkrybowane przez alternatywny czynnik transkrypcyjny σ^H indukowany przez SpoOA (Hilbert & Piggot, 2004; Kumar i in., 2004).



Rycina 1.18. Szlak aktywacji σ^F oraz lokalizacja jego składników w komórce przedpodziałowej oraz po asymetrycznym podziale (Bradshaw & Losick, 2015) - zmodyfikowane. A. Szlak aktywacji σ^F . B. Lokalizacja SpoIIAA, SpoIIAB oraz σ^F w komórce przedpodziałowej oraz po asymetrycznym podziale

Co ciekawe, σ^F jest wyrażany jeszcze przed asymetrycznym podziałem razem ze SpoIIAB, co sprawia, że jest nieaktywny zarówno w komórce przedpodziałowej, jak i w komórce macierzystej (**Ryc. 1.18B**) (Dworkin & Losick, 2001). Mimo że kluczowy dla procesu sporulacji, mechanizm zapewniający specyficzną aktywację σ^F tylko w presporze i dopiero po zakończeniu asymetrycznego podziału, nie jest jeszcze w pełni poznany (Barák i in., 2019; Bradshaw & Losick, 2015). Ponieważ SpoIIIE preferencyjnie lokalizuje się w sepcie po

stronie mniejszego przedziału, zaproponowano, że już to może być wystarczające dla selektywnej aktywacji σ^F (Barák i in., 2019). Drugi model sugeruje, że różnice objętości między komórką macierzystą a presporą prowadzą do wyższej aktywności specyficznej SpoIIIE (Iber i in., 2006). Wszystkie te hipotezy częściowo łączy w sobie trzeci model.



Rycina 1.19. Schemat wiązania SpoIIAA do kompleksu SpoIIAB- σ^F skutkujący uwolnieniem σ^F oraz zablokowaniem SpoIIAB (Masuda i in., 2004) - zmodyfikowane

SpoIIIE jest niestabilny proteolitycznie i ulega degradacji przez proteazę FtsH, za co odpowiada N-koniec SpoIIIE (Bradshaw & Losick, 2015). Wykryto, że okres półtrwania SpoIIIE w obecności FtsH wynosi 7 minut, przy czym asymetryczny podział trwa około 1 godziny. Ponieważ FtsH jest również obecne w presporze musi istnieć dodatkowy mechanizm zabezpieczający SpoIIIE przed degradacją ze strony FtsH. Tym mechanizmem jest oligomeryzacja, której sprzyja wzrastające stężenie SpoIIIE po uwolnieniu do małej objętościowo prespory. Mianowicie, podczas sporulacji SpoIIIE najpierw gromadzi się w „divisomie”, zwęża się wraz z pierścieniem Z, a następnie jest uwalniany do prespory po zakończeniu cytokinezy (**Ryc. 1.20**). Sugeruje to, że „divisom” konkuruje z biegunem o wiązanie SpoIIIE i że SpoIIIE nie może swobodnie się z nim związać, dopóki „divisom” nie zostanie zdemontowany. Tym samym „divisom” sekwestruje i zapobiega przedwczesnej, tj. przed zakończeniem kompartmentacji, asocjacji SpoIIIE na biegunie komórkowym. W oligomeryzacji bierze udział N-koniec SpoIIIE, chociaż w wyższym miejscu niż miejsce wykrywane przez FtsH w celu proteolizy (345-358 wobec 11-37). Podsumowując, oligomeryzacja SpoIIIE sprzyja wychwytywaniu na biegunie, ochronie przed proteolizą i aktywacji jako fosfataza.



Rycina 1.20. Schemat zmiany lokalizacji SpoIIIE z „divisomu” na biegun komórki, która jest związana oligomeryzacją cząsteczki (Bradshaw & Losick, 2015). Czerwonym kolorem zaznaczono N-koniec symbolicznej cząsteczki SpoIIIE, który odpowiada za proteolizę SpoIIIE przez FtsH.

σ^F indukuje około 50 genów (Steil i in., 2005; S. T. Wang i in., 2006), w tym:

- *rsfA* i *lonB*, które kodują regulatory transkrypcji genów zależnych od σ^F (S. T. Wang i in., 2006; L. J. Wu & Errington, 2000);
- *spolIR*, który jest represjonowany przez RsfA, a koduje białko sygnałowe wymagane do aktywacji σ^E w komórce macierzystej;
- *spolIIG*, w celu pojawienia się kolejnego czynnika transkrypcyjnego (σ^G) w presporze;
- *spolIQ*, wymagany do ekspresji *spolIIG* i do pochłonięcia prespory przez komórkę macierzystą;
- *spolIVB* i *bofC*, regulatory specyficznego dla późnej komórki macierzystej czynnika σ^K (Dworkin & Losick, 2001; Hilbert & Piggot, 2004).

Ciekawą funkcję spełnia regulator transkrypcji RsfA (De Hoon i in., 2010). Gdy RsfA działa jako aktywator, σ^F i RsfA tworzą spójną pętlę sprzężenia zwrotnego, co skutkuje opóźnioną i/lub wydłużoną kinetyką ekspresji pewnych genów. Zaś gdy RsfA działa jako represor, σ^F i RsfA tworzą niespójną pętlę sprzężenia zwrotnego, wytwarzając krótki impuls ekspresji.

Kilka genów w regulonie σ^F ma również funkcje dotyczące ochrony lub kiełkowania spor, na przykład:

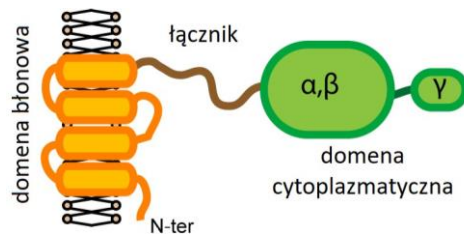
- katalaza kodowana przez *katX* bierze udział w ochronie spor przed nadtleniem wodoru;
- gen *mutTA* koduje 8-okso-dGTPazę, odpowiadającą za ochronę i naprawę DNA oraz obrót RNA;

- geny *sspN* i *tlp*, które kodują białka SASP (ang. *small acid-soluble spore protein*), ochraniające chromosom przed uszkodzeniami;
- *gerD* jest wymagany do skutecznego kiełkowania spor w odpowiedzi na l-alaninę i mieszaninę glukozy, fruktozy, l-asparaginy i KCl;
- *gpr* koduje proteazę zaangażowaną w degradację białek SASP podczas kiełkowania spor (Steil i in., 2005).

Zakończenie tworzenia septy morfologicznie określa moment rozpoczęcie etapu II procesu sporulacji (Hilbert & Piggot, 2004).

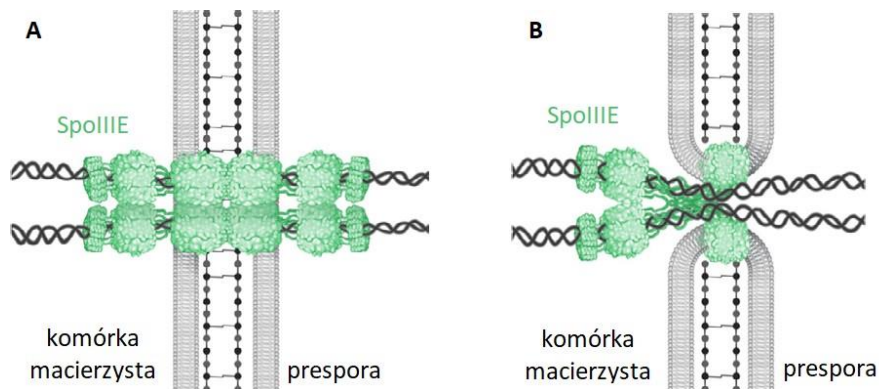
2.9. Translokacja chromosomu bakteryjnego przez SpoIIIE z komórki macierzystej do prespory

SpoIIIE należy do rodziny translokaz DNA, które biorą udział w pompowaniu DNA przez błony i jest wyrażany konstytutywnie (Ben-Yehuda i in., 2003a; Fiche i in., 2013; Sharp & Pogliano, 2002). Składa się z N-końcowej, integralnej domeny błonowej, mało konserwatywnego, nieustrukturyzowanego łącznika oraz C-końcowej domeny cytoplazmatycznej, określanej również motoryczną, która zawiera miejsce wiązania ATP i tworzy duży centralny kanał, przez który przechodzi dwuniciowe DNA (**Ryc. 1.21**). N-końcowa część SpoIIIE jest wymagana do lokalizacji białka w centralnym punkcie septy. Domena C-końcowa składa się z trzech oddzielnych subdomen α , β i γ . Aktywny kompleks SpoIIIE jest heksametrem, w którym podjednostki $\alpha\beta$ układają się w pierścień, zawierający ATPazę, i tworzą duży centralny kanał o średnicy ok 3 nm, przez który przechodzi dwuniciowy DNA (Cattoni i in., 2014; Fiche i in., 2013). Domena motoryczna jest zdolna do poruszania się wzdłuż DNA i, dzięki subdomenie γ , wyszukuje silnie skośne oktameryczne motywy (SRS, ang. *SpoIIIE recognition sequence*), co umożliwia kierunkową translokację chromosomu (Besprozvannaya i in., 2014; Fiche i in., 2013). Co ciekawe, supresorowe, pojedyncze mutacje zmiany sensu w domenie łącznika lub motorycznej całkowicie lub częściowo ratują mutant, w którym usunięto subdomenę γ , ale tylko pod względem przeprowadzania procesu sporulacji, a nie wzrostu wegetatywnego (Bose i in., 2016). Translokacja chromosomów jest procesem energochłonnym, szacuje się, że wymaga około 1,5 miliona cząsteczek ATP (Khanna i in., 2020).



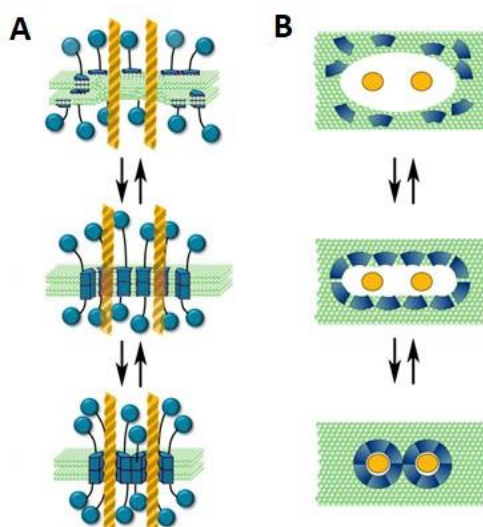
Rycina 1.21. Schemat budowy monomeru SpoIIIE u *B. subtilis* (Fiche i in., 2013) - zmodyfikowane

Mechanizm translokacji DNA przez septę nie jest do końca poznany. Zaproponowano dwa modele: kanału oraz poru wodnego (**Ryc. 1.22**). Głównymi różnicami między nimi są lokalizacja heksamerów SpoIIIE (po jednej lub po obu stronach septy) oraz sposób tworzenia kanału/pora.



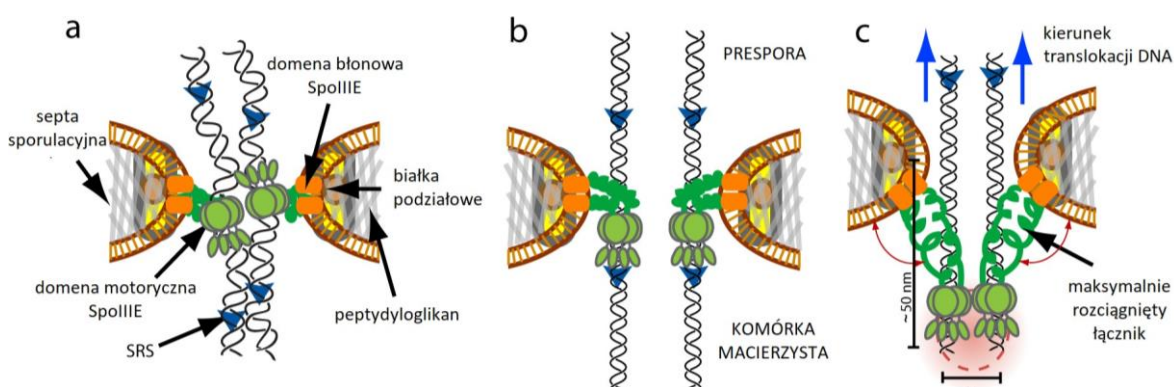
Rycina 1.22. Dwa modele translokacji DNA przez SpoIIIE (Mohamed i in., 2021) - zmodyfikowane. A. Model kanału. B. Model pora wodnego.

W modelu kanału septa zamyka się, powodując uwięzienie chromosomu (Burton i in., 2007; Fleming i in., 2010; J. Y. Shin i in., 2015). Następnie wokół uwięzionego chromosomu gromadzą się SpoIIIE (**Ryc. 1.23**). W modelu tym istotne jest, iż heksamery SpoIIIE znajdują się po obu stronach septy oraz że łącząc się, tworzą w przegrodzie kanały przewodzące DNA.

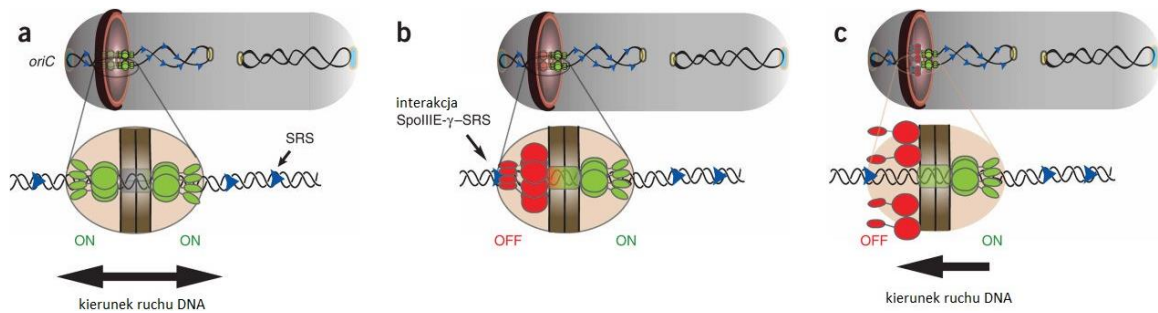


Rycina 1.23. Schemat tworzenia się proponowanego kanału przewodzącego DNA przez kompleksy SpoIIIE (Fleming i in., 2010) - zmodyfikowane. A - widok z boku, B – widok z góry.

W modelu pora wodnego, kompleksy SpoIIIE są zrekrutowane na krawędziach zamykającej się septy (**Ryc. 1.24**) (Becker & Pogliano, 2007; Fiche i in., 2013; Ptacin i in., 2008). W momencie napotkania DNA, uniemożliwiają fuzję przegrody. Składanie aktywnych jednokierunkowych kompleksów SpoIIIE następuje po obu stronach septy, jednakże interakcje w presporze, w których pośredniczy SpoIIIE- γ z SRS o niedozwolonym kierunku, prowadzą do inaktywacji i dysocjacji kompleksu znajdującego się w tym przedziale, co ostatecznie decyduje o kierunku transferu chromosomu z komórki macierzystej do prespory (**Ryc. 1.25**). W konsekwencji, w modelu pora wodnego, heksamery SpoIIIE znajdują się jedynie po stronie komórki macierzystej.



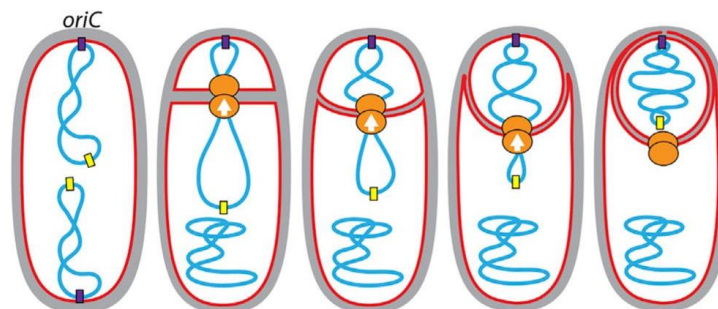
Rycina 1.24. Schemat tworzenia się proponowanego pora wodnego przewodzącego DNA przez kompleksy SpoIIIE (Fiche i in., 2013) - zmodyfikowane



Rycina 1.25. Schemat dysocjacji kompleksu SpoIIIE w presporze pod wpływem interakcji z SRS o niedozwolonym kierunku (Ptacin i in., 2008) - zmodyfikowane

Brak jednoznacznych dowodów na poparcie konkretnego modelu sprawia, że debata wokół nich pozostaje otwarta (Mohamed et al., 2021). Podobnie, istnieją różne hipotezy dotyczące wpływu SRS na mechanizm działania SpoIIIE (Besprozvannaya i in., 2013; Besprozvannaya & Burton, 2014; Cattoni i in., 2013; Chara i in., 2018; Ptacin i in., 2008).

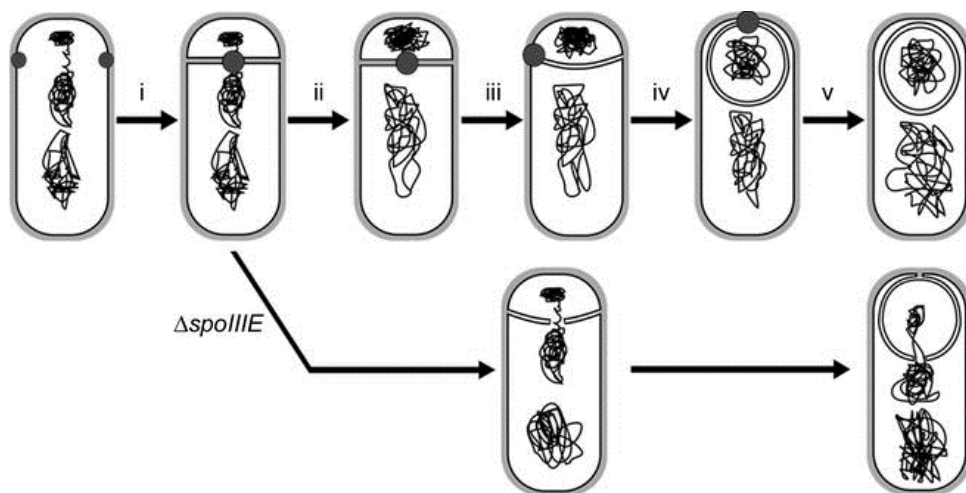
Translokacja chromosomu z komórki macierzystej odgrywa również fizyczną rolę w nadawaniu kształtu presporze, ponieważ import coraz większych ilości DNA oraz przeciwnionów wymaganych do zneutralizowania jego ujemnego ładunku generuje podwyższone ciśnienie osmotyczne, co powoduje pęcznienie prespory, zwiększenie jej rozmiaru i nadanie owalnego kształtu (**Ryc. 1.26**) (Khanna i in., 2020; Lopez-Garrido i in., 2018).



Rycina 1.26. Schemat translokacji chromosomu oraz pochłonięcia prespory przez komórkę macierzystą (Lopez-Garrido i in., 2018). Odpowiednimi kolorami oznaczono błony (czerwony), peptydoglikan (szary), chromosomy (niebieski), początek (fioletowy) i koniec replikacji (żółty) oraz SpoIIIE (pomarańczowy).

SpoIIIE jest wymagany nie tylko do translokacji uwięzionego chromosomu prespory przez septy sporulacyjną, ale również do kompartmentalizacji specyficznej dla komórki ekspresji genów i do fuzji błony po pochłonięciu prespory przez komórkę macierzystą (N. J. L. Liu i in., 2006; Mohamed i in., 2021; Sharp & Pogliano, 2003). SpoIIIE pośredniczy w kompartmentalizacji za pomocą dwóch różnych mechanizmów: zgrupowanie SpoIIIE w

punkcie środkowym septy najpierw zapewnia tymczasową barierę dyfuzyjną podczas translokacji DNA, a następnie pośredniczy w zakończeniu fuzji błony po podziale, aby zapewnić trwałą barierę dyfuzyjną. W dalszej kolejności SpoIIIE wędruje wzdłuż septy podczas pochłaniania, gdzie również pośredniczy w rozdzielaniu błony cytoplazmatycznej komórki macierzystej i zewnętrznej błony prespory, uwalniając w ten sposób presporę do cytoplazmy komórki macierzystej (**Ryc. 1.27**). Co ważne, wykazano, że zdolność SpoIIIE do wykonywania każdej ze swoich funkcji zależy krytycznie od jego prawidłowej lokalizacji (w sepcie w celu translokacji DNA i kompartmentalizacji, na biegunie w celu fuzji błony pochłaniającej) (N. J. L. Liu i in., 2006). Ponadto, są one niezależne od siebie, ponieważ mutacja w miejscu wiązania ATP w domenie cytoplazmatycznej SpoIIIE całkowicie znosi translokację DNA, podczas gdy tylko nieznacznie wpływa na fuzję błonową (Sharp & Pogliano, 2003).

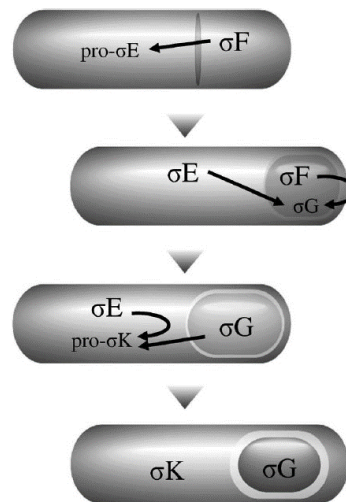


Rycina 1.27. Schemat zmiany lokalizacji SpoIIIE w zależności od etapu procesu sporulacji (N. J. L. Liu i in., 2006). Czarne kółka oznaczają lokalizację SpoIIIE. W mutancie $\Delta spoIIIE$ septa pozostaje otwarta, umożliwiając dyfuzję zawartości cytoplazmatycznej między komórkami potomnymi, co sugeruje blokadę fuzji błon po cytokinezie.

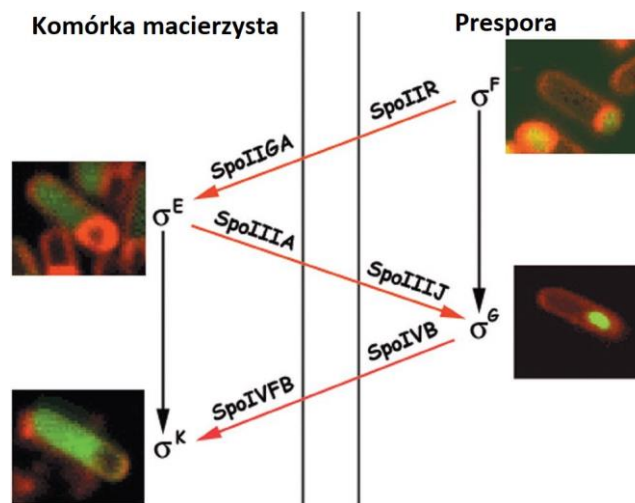
2.10. Kaskada sporulacyjnych czynników σ

W wyniku asymetrycznego podziału i translokacji chromosomu z komórki macierzystej do prespory powstają dwie komórki o nierównych objętościach, ale identycznych genomach (De Hoon et al., 2010; Hilbert & Piggot, 2004). Mimo to programy ekspresji genów w obu komórkach są odmienne, co jest spowodowane aktywacją jedynie konkretnych i charakterystycznych dla danej komórki czynników σ polimerazy RNA: σF , a następnie σG w presporze oraz σE , a następnie σK w komórce macierzystej (**Ryc. 1.28**)

(Hilbert & Piggot, 2004). Poszczególne czynniki σ kierują polimerazę RNA do transkrypcji określonych genów, które są odpowiedzialne za ustalenie bardzo różnych losów prespory i komórki macierzystej. Podczas sekwencyjnych etapów sporulacji komórka macierzysta i prespora komunikują się ze sobą, wysyłając i interpretując sygnały biochemiczne, aby zapewnić koordynację ich programów genetycznych (**Ryc. 1.29**) (Diez i in., 2012; Hilbert & Piggot, 2004). Kompartmentacja ekspresji genów w każdym typie komórek jest połączona z morfogenezą, przy czym σF i σE stają się aktywne po podziale asymetrycznym, a σG i σK stają się aktywne po pochłonięciu prespory przez komórkę macierzystą.



Rycina 1.28. Schemat kaskady sporulacyjnych czynników σ (Watabe, 2013)

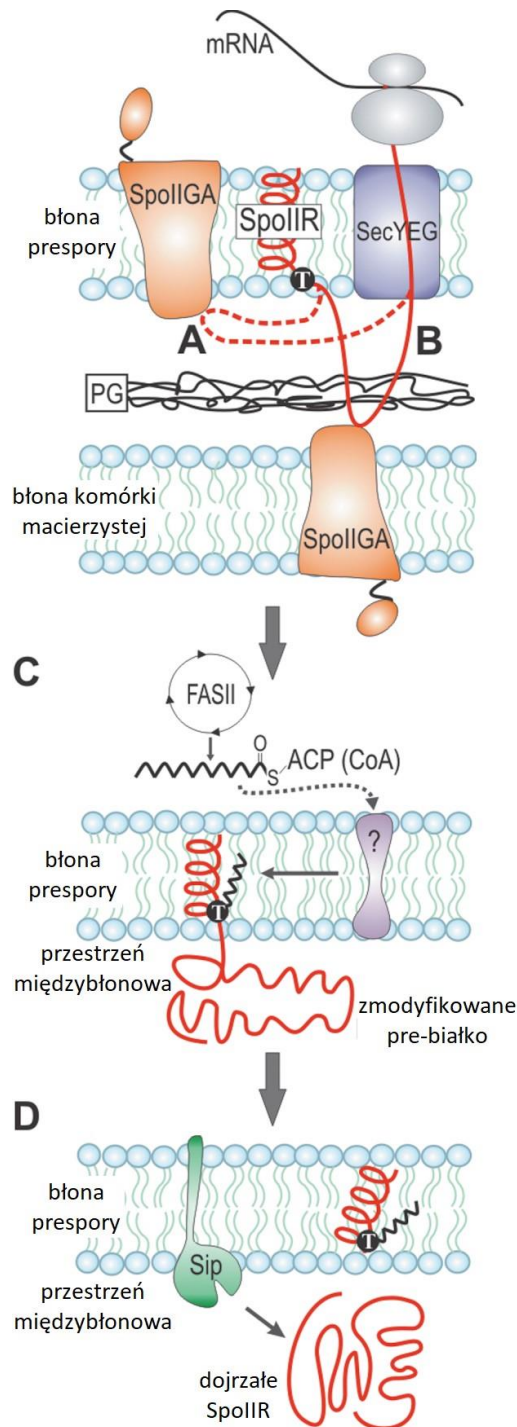


Rycina 1.29. Schemat wzajemnej komunikacji prespory i komórki macierzystej w celu koordynacji poszczególnych etapów sporulacji (Hilbert & Piggot, 2004) - zmodyfikowane

2.11. Aktywacja charakterystycznego dla komórki macierzystej czynnika transkrypcyjnego σE oraz jego regulon

Gen dla σE , sporulacyjnego czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla komórki macierzystej, znajduje się w operonie *spoIIGA-sigE*, który wymaga głównego czynnika transkrypcyjnego σA i znajduje się pod pozytywną kontrolą Spo0A (Kumar & Moran, 2008; Seredick & Spiegelman, 2007). Podobnie jak w przypadku σF , oba produkty tych genów znajdują się w komórce przedpodziałowej, jak i w obu przedziałach po asymetrycznym podziale, ale aktywacja σE zachodzi tylko w jednym z nich. Jednak w przeciwieństwie do σF , który jest syntetyzowany w stanie aktywnym i utrzymywany w stanie nieaktywnym przez czynnik anty- σ , σE jest syntetyzowany w stanie nieaktywnym i aktywowany przez rozszczepienie proteolityczne, do czego wymagany jest sygnał z prespory (Hilbert & Piggot, 2004). Tym sygnałem jest aktywacja SpoIIIGA przez SpoIIIR, międzykomórkowego białka sygnalizacyjnego.

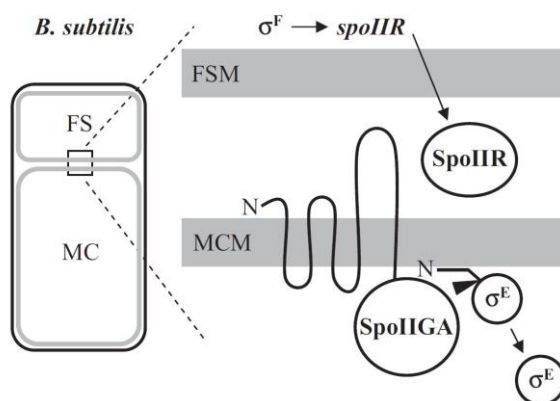
SpoIIIR jest wyrażany w presporze na skutek działania aktywowanego czynnika transkrypcyjnego σF . Ze względu na obecność przypuszczalnej sekwencji sygnałowej typu Sec, uważa się, że SpoIIIR jest eksportowany do przestrzeni międzybłonowej septy (**Ryc. 1.30**) (Diez i in., 2012). Zaobserwowano, że SpoIIIGA, białko związane w dużej ilości z błoną przegrody po stronie komórki macierzystej kolokalizuje ze SpoIIIR, ale nie jest przez niego aktywowany dopóki SpoIIIR zawiera sekwencję sygnałową. Proponuje się, że przetwarzanie (usunięcie sekwencji sygnałowej) i, co za tym idzie, późniejsze uwalnianie SpoIIIR do przestrzeni międzybłonowej septy, w celu wywołania aktywacji SpoIIIGA, zależy od syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych w presporze, a także acetylacji konserwatywnej Thr-27 na SpoIIIR, która umożliwia rozszczepienie sekwencji sygnałowej (Diez i in., 2012). Tym samym, główną funkcją SpoIIIR jest powiązanie programu transkrypcji w presporze z programem transkrypcji w komórce macierzystej, pozwalając σE stać się aktywnym dopiero po aktywacji σF .



Rycina 1.30. Schemat eksportu SpoIIIR z prespory do przestrzeni międzybłonowej septy (Diez i in., 2012) - zmodyfikowane. Po translokacji przez kanał Sec, prebiałko SpoIIIR (przerywana czerwona linia) wchodzi w interakcję ze SpoIIIGA znajdującym się w błonie prespory (A) lub komórki macierzystej (B). Wkrótce po całkowitej translokacji białka, niezidentyfikowana acylotransferaza acyluje Thr-27 SpoIIIR (C). Z acylowanego pre-białka usuwana jest sekwencja sygnałowa np. dzięki peptydazie sygnałowej I (Sip), która katalizuje przetwarzanie SpoIIIR do jego dojrzałej postaci (D). PG - peptydoglikan.

Mechanizm prowadzący do aktywacji SpoIIIGA tylko po stronie komórki macierzystej, chociaż białko to znajduje się po obu stronach septy, nadal pozostaje niejasny. Możliwe, że

ponieważ SpoIIR jest wytwarzany w małych ilościach, cząsteczki SpoGA muszą konkurować ze sobą o dostęp do ograniczonej ilości substratu (Chary i in., 2010). Na skutek ciągłej i silnej ekspresji *spoIIIG* w komórce macierzystej, napędzanej przez obecność Spo0A, ilość białka SpoIIIGA zlokalizowanej w błonie komórki macierzystej znacznie przekracza ilość SpoIIIGA zlokalizowanej w błonie prespory, co sprawiałoby, że komórka macierzysta wygrywa tę konkurencję (Chary i in., 2010; Fujita & Losick, 2003). Inna, niewykluczająca się hipoteza, wykorzystuje opisaną wyżej obserwację, że synteza *de novo* kwasów tłuszczowych jest wymagana do aktywacji SpoIIR (Diez i in., 2012), ale zwraca uwagę, że synteza ta jest ograniczona do komórki macierzystej, również z powodu wymogu obecności Spo0A (Chary i in., 2010; Pedrido i in., 2013). Tym samym, SpoIIR związany jedynie ze SpoIIIGA zlokalizowanym w błonie komórki macierzystej miałby możliwość być acetylowany, a tym samym rozszczepiony proteolitycznie. Ponadto, zaproponowano, że σ^E może być aktywnie degradowany w presporze, np. przez CsfB (Chary i in., 2010; Fujita & Losick, 2002; Serrano i in., 2015).



Rycina 1.31. Schemat aktywacji σ^E przez proteolityczne rozszczepienie sekwencji N-końcowej przez SpoIIIGA (Imamura i in., 2008). FS – prespory; MC – komórka macierzysta; FSM – błona prespory; MCM – błona komórki macierzystej.

SpoIIIGA jest proteazą asparaginianową, która przekształca nieaktywny pro- σ^E w aktywny σ^E poprzez proteolityczne usunięcie N-końcowego fragmentu o długości 27 aa (Diez i in., 2012; Imamura i in., 2008). SpoIIIGA tworzy nieaktywne dimery lub oligomery, a oddziaływanie SpoIIR z N-końcową domeną SpoIIIGA po jednej stronie błony powoduje zmianę konformacyjną, która umożliwia tworzenie aktywnego dimeru proteazy asparaginianowej w domenie C-końcowej po drugiej stronie błony, gdzie rozszczepia pro- σ^E (Imamura i in., 2008). Pro- σ^E jest również zlokalizowane w błonie komórki macierzystej,

za co odpowiada N-koniec, a więc jego proteolityczne odcięcie powoduje nie tylko jego aktywację, ale również uwolnienie do cytozolu komórki (**Ryc. 1. 31**).

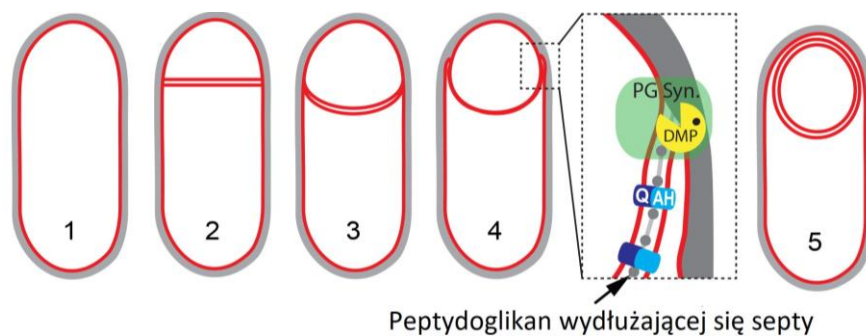
Co ciekawe, σE jest aktywowany w ciągu 4 minut od transkrypcji *spoIIIR* w presporze (Chary i in., 2010), co jest istotne, ponieważ geny pod kontrolą σE odpowiadają m.in. za zablokowanie tworzenia się septy na drugim biegunie komórki macierzystej. Należą do nich *mciZ*, który koduje białko wiążące się z FtsZ oraz blokujące jego polimeryzację (Handler i in., 2008), a także *spoIIID*, *spoIIIM* i *spoIIP*, które kodują białka degradujące peptydoglikan rozwijającej się przegrody (Eichenberger i in., 2001).

σE odpowiada za transkrypcję około 270 genów, czyniąc regulon σE najliczniejszym spośród regulonów sporulacyjnych czynników σ specyficznych dla danego przedziału (Eichenberger i in., 2004; Steil i in., 2005). σE powoduje ekspresję regulatorów transkrypcji SpoIIID i GerR. Dla 10 spośród 270 genów obecności SpoIIID jest obligatoryjnie wymagana, są to m.in. te zaangażowane w pojawienie się σK . Zarówno SpoIIID, jak i GerR tworzą pętle sprzężenia zwrotnego z σE , jednakże, podczas gdy SpoIIID aktywuje niektóre geny zależne od σE i hamuje inne, GerR wydaje się działać jedynie jako represor. Co ciekawe, oba regulatory działają również z czynnikiem σK , przy czym GerR pełni wówczas wyłącznie rolę aktywatora transkrypcji (Himes i in., 2010).

Oprócz zablokowania tworzenia się drugiej septy, σE umożliwia kontynuowanie sporulacyjnej kaskady czynników σ , poprzez ekspresję białek biorących udział w szlaku syntezy i aktywacji σG i σK (Eichenberger i in., 2003, 2004). Ponadto, odpowiada za transkrypcję genów wymaganych do przeprowadzenia procesu pochłonięcia prespory przez komórkę macierzystą. Duża grupa genów kontrolowanych przez σE jest niezbędna do syntezy i połączenia dwóch skomplikowanych struktur, które chronią zarodnik przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi: kory i płaszcz. Wreszcie, σE umożliwia utrzymanie dostatecznego poziomu aktywności metabolicznej pozwalającej na progresję procesu sporulacji w warunkach ograniczonej dostępności składników pokarmowych. Różne szlaki wykorzystywane do osiągnięcia tego celu w dużej mierze zależą od środowiska, w którym zachodzi proces sporulacji. Można tu wyróżnić geny zaangażowane w metabolizm lipidów, degradację białek, a także transport. Prawdopodobnie geny te nie są charakterystyczne dla procesu sporulacji i mogą być transkrybowane w warunkach np. wegetatywnych z dodatkowych promotorów, niekontrolowanych przez σE .

2.12. Pochłonięcie prespory przez komórkę macierzystą

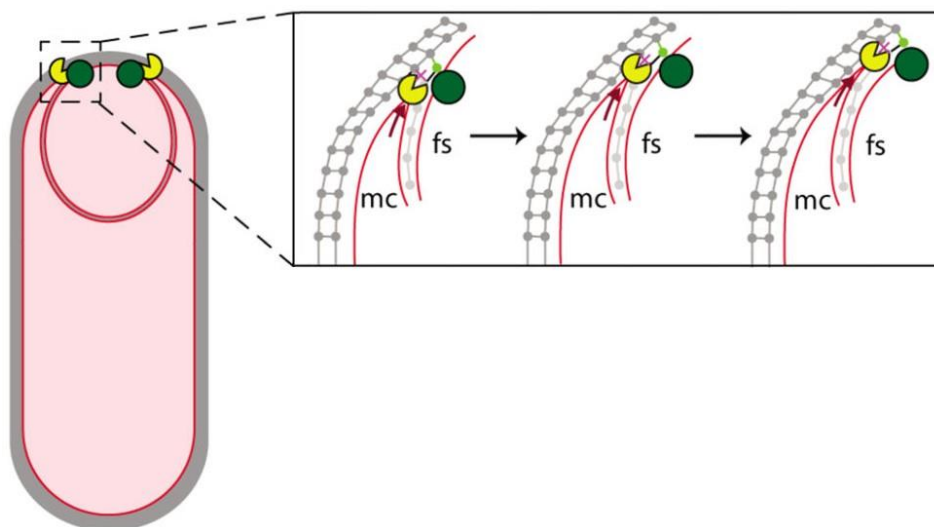
Po asymetrycznym podziale i ukończonej translokacji chromosomu kolejnym etapem morfologicznym sporulacji jest pochłonięcie prespory przez komórkę macierzystą (De Hoon i in., 2010; Hilbert & Piggot, 2004). Proces ten jest analogiczny do eukariotycznej fagocytozy i diametralnie zmienia wzajemne położenie obu komórek, z leżących obok siebie do istnienia komórki w komórce, co jest cechą charakterystyczną tworzenia endospor (Khanna i in., 2020; Rudner & Losick, 2001). Jednakże, w przeciwieństwie do fagocytozy, podczas pochłonięcia obecna jest ściana komórkowa z peptydoglikanu, co stanowi barierę dla migracji błon. Dlatego też pochłanianie jest napędzane przez białka komórki macierzystej, które ułatwiają migrację błony wokół prespory poprzez enzymatyczne usuwanie peptydoglikanu. Tym samym septa staje się cieńsza (z około 23 nm do około 18 nm), a dzięki temu bardziej elastyczna (Khanna i in., 2019, 2020). W wyniku postępującej translokacji chromosomu, prespora wybrzusza się do komórki macierzystej, zaś błony septy migrują wokół prespory, otaczając ją (**Ryc. 1.32**) (Khanna i in., 2020; Lopez-Garrido i in., 2018). Kiedy krawędzie migrującej septy spotkają się na końcu prespory, łączą się, uwalniając ją do cytoplazmy komórki macierzystej, jako swobodnie pływający protoplast otoczony dwiema błonami o przeciwnej polaryzacji, wewnętrzną pochodzącą od prespory i zewnętrzną pozyskaną z komórki macierzystej w wyniku pochłonięcia (De Hoon i in., 2010; Hilbert & Piggot, 2004). Podczas pochłonięcia powierzchnia komórki macierzystej zwiększa się o około $2 \mu\text{m}^2$, co stanowi 25% jej początkowej wartości (Ojkic i in., 2016), zaś prespora podwaja swoją wielkość (Khanna i in., 2020; Lopez-Garrido i in., 2018).



Rycina 1.32. Schemat pochłaniania prespory przez komórkę macierzystą (Ojkic i in., 2016) - zmodyfikowane. PG Syn – syntaza peptydoglikanu; DMP – kompleks SpoIID, SpoIIM i SpoIIP; Q – SpoIIQ; AH – SpoIIAH.

Jak wspomniano, obecność peptydoglikanu w sepcie utrudnia zajęcie pochłaniania prespory, dlatego kluczowym aspektem jest jego degradacja, za co odpowiada kompleks

białek komórki macierzystej złożony ze SpoIID, SpoIIM i SpoIIP, określane jako DMP (Chastanet & Losick, 2007; Khanna i in., 2020). SpoIID, SpoIIM i SpoIIP są białkami transbłonowymi kodowanymi w oddzielnych jednostkach transkrypcyjnych pod kontrolą σE . Białka te początkowo lokalizują się pośrodku septy, a następnie przemieszczają się do przednich krawędzi migrującej błony komórki macierzystej, gdzie pozostają aż do zakończenia pochłonięcia. Najpierw SpoIIM rekrutuje SpoIIP, a następnie SpoIIP rekrutuje SpoIID, zaś wiązanie SpoIIM do septy jest osiągnięte poprzez dwa mechanizmy (Chastanet & Losick, 2007; Khanna i in., 2020). Jeden z nich wymaga białka SpoIIB, który jest wyrażany jeszcze przed asymetrycznym podziałem, zaś drugi białek SpoIVFA i SpoIVFB, które są wytwarzane w komórce macierzystej i rekrutowane do przegrody przez kompleks SpoIIQ-SpoIIAH (Aung i in., 2007; Doan i in., 2005).

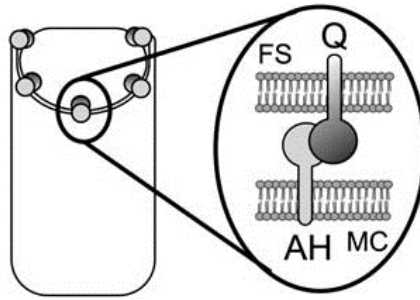


Rycina 1.33. Schemat skoordynowanej syntezy i degradacji peptydoglikanu, umożliwiający migrację przednich krawędzi błony komórki macierzystej w celu pochłonięcia prespory (Khanna i in., 2020). Nowy peptydoglikan (jasnozielony) jest produkowany przez odpowiednie syntazy (ciemnozielone), które po stronie prespory śledzą przednią krawędź błony pochłaniającej, zaś po stronie komórki macierzystej wiązania między starym peptydoglikanem przegrody (jasnoszary) i bocznym peptydoglikanem (ciemnoszary) są hydrolyzowane przez DMP (żółty), zapewniając miejsce na migrację błony.

Prawidłowe skoordynowanie działań prespory i komórki macierzystej jest dobrze widoczne podczas procesu pochłaniania. Za aktywność enzymatyczną kompleksu DMP odpowiadają SpoIID i SpoIIP, które wykazują uzupełniające się działania (Khanna i in., 2020; Morlot i in., 2010). SpoIIP jest endopeptydazą oraz amidazą i umożliwia działanie SpoIID, które jest transglikozylazą, z kolei SpoIID wzmacnia działanie SpoIIP. Jak dotąd żadna aktywność enzymatyczna nie została powiązana ze SpoIIM, tak więc możliwe, że jego

główną funkcją jest służenie jako rusztowanie do składania DMP. Jednakże, nie tylko degradacja po stronie komórki macierzystej, ale i synteza peptydoglikanu po stronie prespory, oraz właściwie skoordynowanie obu tych procesów są niezbędne do pochłonięcia prespory przez komórkę macierzystą (Khanna i in., 2020; Meyer i in., 2010; Ojkic i in., 2016). Dokładniej, synteza peptydoglikanu jest wymagana dla migracji przednich krawędzi błony w kierunku wierzchołka prespory (**Ryc. 1.33**), zaś bez niej jedynym ruchem jest wgłębianie się prespory w komórkę macierzystą w wyniku degradacji peptydoglikanu, jednakże w takim przypadku nigdy nie dochodzi do fuzji błony nad presporą. Istnieje ścisły związek między syntezą peptydoglikanu a kompleksem DMP, który przejawia się również w tym, że przy zablokowanej syntezie, lokalizacja DMP na przedniej krawędzi błony pochłaniającej jest upośledzona, co sugeruje, że nowo zsyntetyzowany peptydoglikan stabilizuje DMP w prawidłowym położeniu.

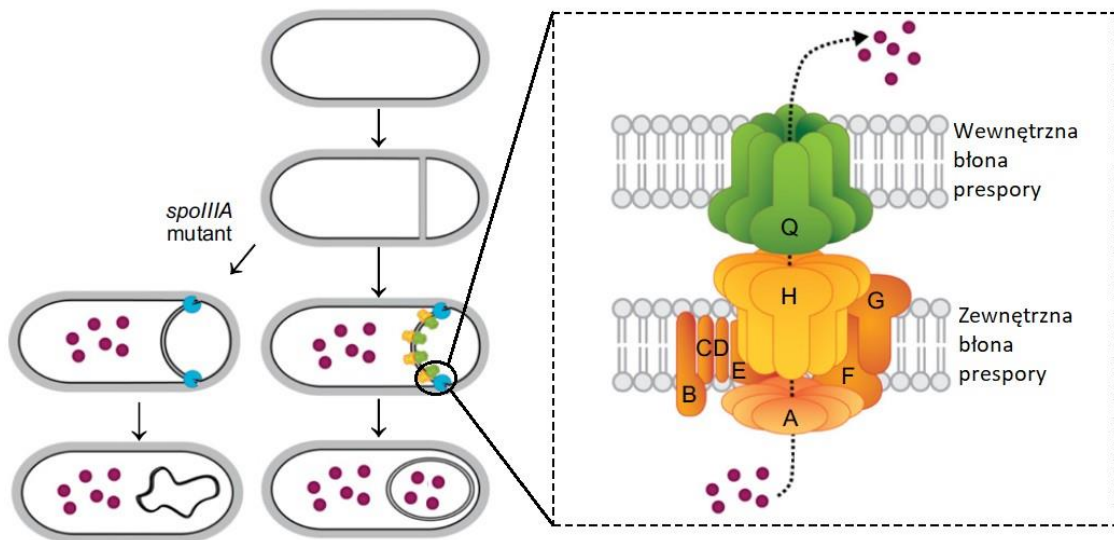
Istotną rolę w pochłanianiu odgrywa również kompleks SpoIIQ-SpoIIIAH (Broder & Pogliano, 2006). SpoIIQ jest białkiem charakterystycznym dla prespory, wytwarzanym pod kontrolą σF (Steil i in., 2005; S. T. Wang i in., 2006), zaś SpoIIIAH jest kodowany przez ostatni gen operonu *spoIIIA*, który zawiera osiem genów, od *spoIIIAA* do *spoIIIAH*, i jest transkrybowany w komórce macierzystej z dwóch promotorów zależnych od σE (Guillot & Moran, 2007). SpoIIQ i SpoIIIAH są integralnymi białkami błonowymi, które lokalizują się po przeciwnych stronach przegrody polarnej, odpowiednio w presporze i błonie komórki macierzyste, i śledzą migrującą błonę, tworząc ogniska rozmieszczone w pochłoniętym już obszarze (**Ryc. 1.34**) (Blaylock i in., 2004; Rubio & Pogliano, 2004). Te dwa białka oddziałują poprzez swoje domeny pozacytoplazmatyczne, tworząc mostki białkowe w poprzek przegrody (Khanna i in., 2020). W związku z tym lokalizacja obu białek jest częściowo współzależna. Po złożeniu kompleksy SpoIIQ-SpoIIIAH są stabilne i nie dyfundują poprzecznie w błonach, w związku z czym proponuje się, że mogą służyć jako mechanizm zapadkowy do mocowania błony komórki macierzystej do prespory, zapobiegając w ten sposób ruchowi wstecznemu błony pochłaniającej (Broder & Pogliano, 2006; Fredlund i in., 2013).



Rycina 1.34. Schemat interakcji SpoIIQ zlokalizowanego w presporze ze SpoIIAH zlokalizowanym w komórce macierzystej (Broder & Pogliano, 2006). Q – SpoIIQ; AH – SpoIIAH; FS – prespora; MC – komórka macierzysta.

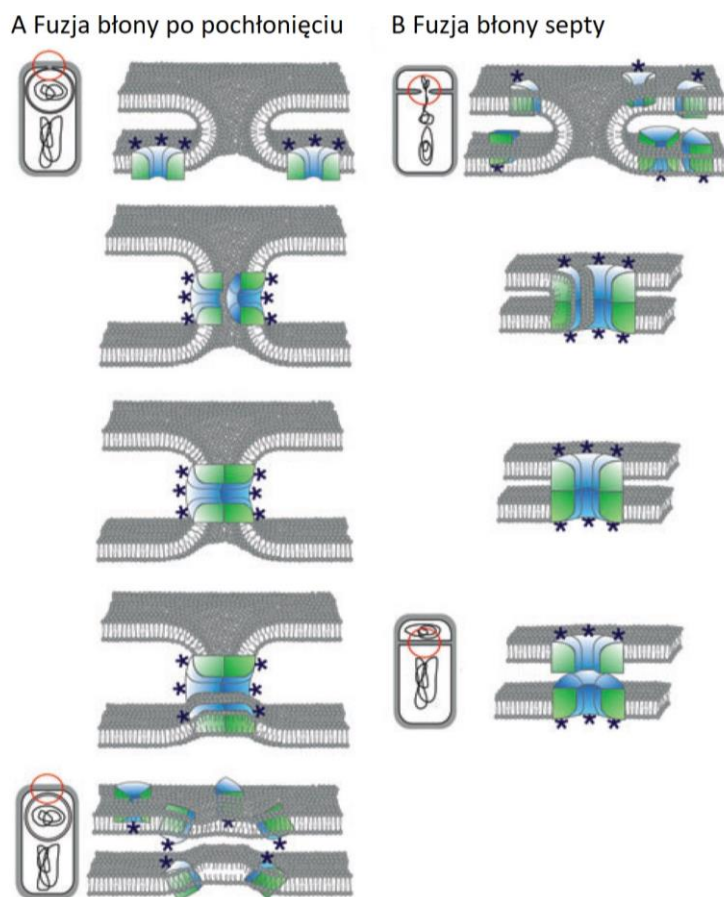
Oba białka są również wymagane do aktywacji późnych czynników σ , czyli σ_G i σ_K . Kompleks SpoIIQ-SpoIIAH rekrutuje inne białka po stronie komórki macierzystej przegrody, wśród nich są pozostałe białka kodowane w operonie *spoIIA*, od SpoIIAA do SpoIIAG (Zeytuni i in., 2017). Niektóre z nich są homologiczne do składników bakteryjnego układu wydzielniczego, w przypadku dwóch wykazano, że *in vitro* tworzą homomultimeryczne pierścienie, zaś SpoIIAA wydaje się być ATPazą (Doan i in., 2009; Khanna i in., 2020; Meisner i in., 2012; Morlot & Rodrigues, 2018). Dlatego zaproponowano, że białka SpoIIA-H w komórce macierzystej, razem z SpoIIQ w presporze, tworzą kanały łączące obie komórki (**Ryc. 1.35**). Jednakże okazało się, że białka te są również wymagane do ogólnej ekspresji genów, np. dla późnych genów zażądanych przez σ_F , a nie tylko dla aktywacji σ_G , jak było to pierwotnie sugerowane (Camp & Losick, 2009; Khanna i in., 2020). W związku z tym proponuje się, że kanały służą do odżywiania prespory przez komórkę macierzystą, aby, dostarczając prekursorów metabolicznych, utrzymać ekspresję genów w odizolowanej od środowiska zewnętrznego komórce. Jednakże, co istotne, takich kanałów nie zaobserwowano jeszcze bezpośrednio, są one jedynie przewidywane, tak samo jak nieznanne są cząsteczki, które miałyby być nimi transportowane (Khanna i in., 2020). Ostatnio doniesiono, że taką cząsteczką mogłaby być arginina (Riley, Lopez-Garrido, i in., 2021).

Zaobserwowano, że kanały SpoIIA-H-SpoIIQ są również wymagane do utrzymania integralności strukturalnej prespory po pochłonięciu (Doan i in., 2009). W przypadku braku białek SpoIIA-H i SpoIIQ, prespora wydaje się kurczyć i/lub zapadać (**Ryc. 1.35**), co tłumaczy się brakiem osmolitów i/lub utratą potencjału metabolicznego. Sugeruje się, że rola SpoIIA-H w utrzymaniu integralności prespor jest raczej enzymatyczna niż strukturalna.



Rycina 1.35. Schemat zaproponowanego kanału tworzonego przez kompleks SpoIIQ po stronie prespory i SpoIIIAA-SpoIIAH po stronie komórki macierzystej (Crawshaw i in., 2014) - zmodyfikowane. Rzeczywista stechiometria białek w kompleksie jest nieznana. A – SpoIIIAA; B – SpoIIAB; C – SpoIIAC; D – SpoIIAD; E – SpoIIAE; F – SpoIIAF; G – SpoIIAG; H – SpoIIAH; Q – SpoIIQ. Fioletowe kropki oznaczają nieznaną cząsteczkę transportowaną z komórki macierzystej do prespory. Na niebiesko zaznaczono kompleks SpoIID-SpoIIM-SpoIIP.

Kiedy krawędzie migrującej septy spotkają się na wierzchołku prespory, ulegają fuzji, aby uwolnić do cytoplazmy komórki macierzystej presporę, jako swobodnie pływający protoplast. W ten proces zaangażowane są dwa białka: specyficzne dla komórki macierzystej białko FisB (Doan i in., 2013) i wspomniana już translokaza SpoIIIE (Fleming i in., 2010; N. J. L. Liu i in., 2006; Sharp & Pogliano, 2003). Proponuje się, że mechanizm działania SpoIIIE podczas pochłaniania polega na lokalizacji dwóch kompleksów SpoIIIE na przednich krawędziach błony pochłaniającej komórki macierzystej (**Ryc. 1.36**). Interakcja domen zewnątrzkomórkowych powodowałaby utworzenie kanału przecinającego błonę, który następnie ulegałby demontażowi co sprzyjałoby remodelowaniu i fuzji błony. Mechanizm działania podczas fuzji błony komórki macierzystej po pochłonięciu prespory byłby analogiczną odwrotnością rozdzielania błony podczas asymetrycznego podziału, ponieważ podczas podziału zbliżają się do siebie cytoplazmatyczne powierzchnie błony, zaś podczas pochłaniania zbliżają się do siebie zewnątrzkomórkowe powierzchnie błony.

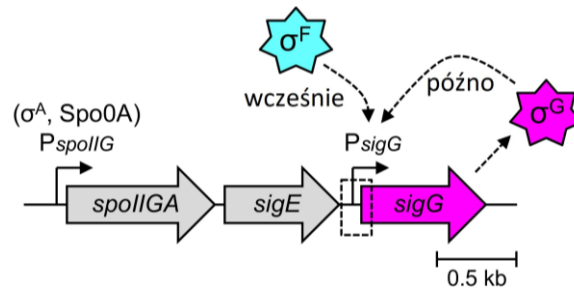


Rycina 1.36. Schemat proponowanego działania SpoIIE w celu fuzji błony komórki macierzystej podczas pochłonięcia prespory (N. J. L. Liu i in., 2006). Domeny cytoplazmatyczne SpoIIE oznaczono gwiazdkami.

Etap III definiuje się jako zakończenie pochłonięcia, a prespora istnieje teraz jako owalny, swobodnie unoszący się w komórce macierzystej protoplast, otoczony dwiema błonami (Hilbert & Piggot, 2004).

2.13. Aktywacja charakterystycznego dla prespory późnego czynnika transkrypcyjnego, σ_G , oraz jego regulon

Po pochłonięciu σ_G zastępuje σ_F w koordynowaniu ekspresji genów w presporze. Co ciekawe, σ_G może być transkrybowany z dwóch promotorów, z własnego znajdującego się tuż przed genem *sigG* lub ze znajdującego się wyżej, obejmującego geny *spolIGA-sigE*, ale z tego transkryptu nie jest wytwarzane żadne wykrywalne białko σ_G , najprawdopodobniej z powodu przewidywanej szpilki RNA w regionie międzygenowym (**Ryc. 1.37**) (Evans i in., 2004; Hilbert & Piggot, 2004). Ekspresja σ_G z własnego promotora jest zależna od σ_F , a także autoregulowana pozytywnym sprzężeniem zwrotnym (Hilbert & Piggot, 2004; Mearls i in., 2018).



Rycina 1.37. Schemat regulacji transkrypcji σ G (Mearls i in., 2018) - zmodyfikowane

Dezaktywacja σ F jest słabo poznana, ale obejmuje małe białko Fin, które wiąże się z polimerazą RNA w tym samym miejscu co σ F, tym samym blokując transkrypcję regulonu σ F (Wang Erickson i in., 2017). Samo białko Fin jest transkrybowane pod kontrolą zarówno σ F, jak i σ G (Camp i in., 2011)

Wciąż pozostaje niejasne w jaki sposób aktywność σ G jest opóźniona do momentu zakończenia wczesnej fazy ekspresji genów kierowanej przez σ F (Mearls i in., 2018). σ G jest wykrywany dopiero po około godzinie względem innych białek pod kontrolą σ F, ponadto wydaje się wymagać zakończenia procesu pochlania (Regan i in., 2012) oraz obecności kanałów SpoIIQ-SpoIIAH (Meisner i in., 2008). Tak więc tradycyjnie, uważa się, że transkrypcja *sigG* przez σ F jest opóźniona i wymaga specyficznego międzykomórkowego sygnału pochodzącego z komórki macierzystej (Evans i in., 2004).

Jednym z białek zaangażowanych w kontrolowanie wczesnej aktywności σ G jest czynnik anty- σ , CsfB (zwany także Gin), który jest wyrażany pod kontrolą σ F we wczesnych stadiach sporulacji i jest silnym antagonistą σ G (Chary i in., 2007; Karmazyn-Campelli i in., 2008; Rhayat i in., 2009; Serrano i in., 2015). Jednakże o ile CsfB hamuje transkrypcję genów zależnych od σ G, brak CsfB nie wywołuje wcześniejszej aktywacji σ G (Serrano i in., 2011). Ponadto, jak wspomniano wcześniej, hipotetyczne kanały SpoIIA-H-SpoIIQ nie wydają się transportować czynnika selektywnie aktywującego σ G, a raczej umożliwiają ogólne odżywianie prespory po pochlónięciu i odseparowaniu jej przez komórkę macierzystą (Camp & Losick, 2009). Zaproponowano również, że transkrypcja i translacja σ G są tłumione przez cechy jego własnych sekwencji regulatorowych i kodujących (Mearls i in., 2018). Tym samym najnowszy pogląd odrzuca istnienie konkretnego aktywatora σ G i sugeruje, iż ekspresja σ G przez σ F nie jest opóźniona, a raczej mało wydajna. Jednakże po przekroczeniu progu granicznego, następuje znaczny wzrost stężenia σ G na skutek pozytywnej pętli sprzężenia zwrotnego.

Czynnik sigma specyficzny dla późnej prespory, σ_G , reguluje około 100 genów (Steil i in., 2005; S. T. Wang i in., 2006), tworząc spójne i niespójne pętle sprzężenia zwrotnego z regulatorem transkrypcyjnym, SpoVT (De Hoon i in., 2010). Geny transkrybowane pod kontrolą σ_G można podzielić na co najmniej trzy grupy: zaangażowane w kontynuowanie procesu sporulacji, ochronę spory przed uszkodzeniem DNA oraz przygotowanie jej do kiełkowania (Hilbert & Piggot, 2004; Steil i in., 2005). Geny ważne dla sporulacji obejmują:

- wspomniane *sigG* i *spoVT*;
- operon *spoVA*, który jest wymagany do wychwytu kwasu dipikolinowego (DPA) z komórki macierzystej do prespory;
- *spoIVB*, kodujący peptydazę serynową, która przekazuje sygnał z prespory do komórki macierzystej, aby aktywować σ_K ;
- *bofC*, regulator dojrzewania pro- σ_K .

Geny kiełkowania obejmują:

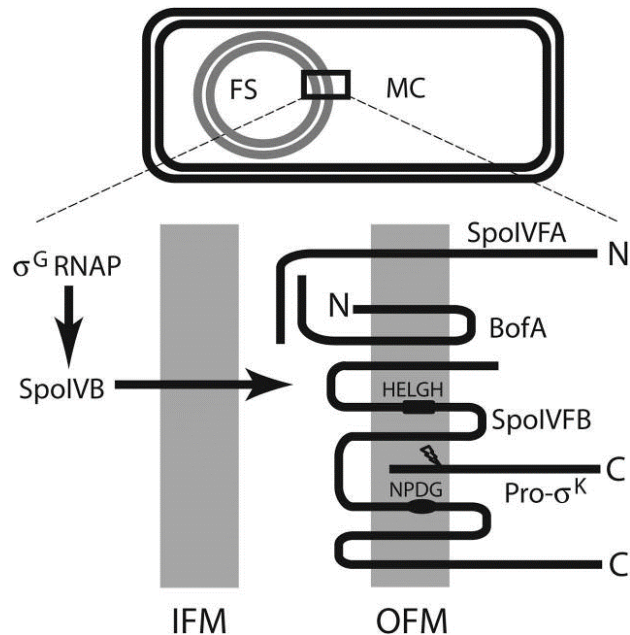
- operon *gerA*, zaangażowany w kiełkowanie w odpowiedzi na alaninę;
- homologiczne operony *gerB* i *gerK*, zaangażowane w kiełkowanie w odpowiedzi mieszaninę l-asparaginy, glukozy, fruktozy i KCl);
- *pdaA*, który jest wymagany do tworzenia unikalnego składnika peptydoglikanu kory spor;
- *sleB*, kodujący enzym lityczny płaszczka.

Geny chroniące przed uszkodzeniem DNA obejmują *spIB*, *yqfS*, a także geny *ssp*, które kodują SASP, dominujące białka znajdujące się w rdzeniu spor (Hilbert & Piggot, 2004; P. Setlow, 2007; Steil i in., 2005). Niektóre z SASP wiążą DNA w zarodniku i pomagają chronić go przed działaniem ciepła, promieniowania UV, wysuszeniem i innymi uszkodzającymi warunkami, a także zapewniają źródło aminokwasów podczas kiełkowania.

2.14. Aktywacja charakterystycznego dla komórki macierzystej późnego czynnika transkrypcyjnego, σ_G , oraz jego regulon

Ekspresja *sigK*, genu kodującego ostatni czynnik sigma w kaskadzie sporulacji, zależy zarówno od σ_E , jak i SpoIIID (De Hoon i in., 2010). Regulacja σ_K jest podobna do regulacji σ_E , ponieważ σ_K jest syntetyzowany jako nieaktywny, związany z błoną prekursor, pro- σ_K ,

który jest przetwarzany do postaci aktywnej po otrzymaniu sygnału z prespory. Jednak ich mechanizmy regulacji są bardzo różne (Hilbert & Piggot, 2004).



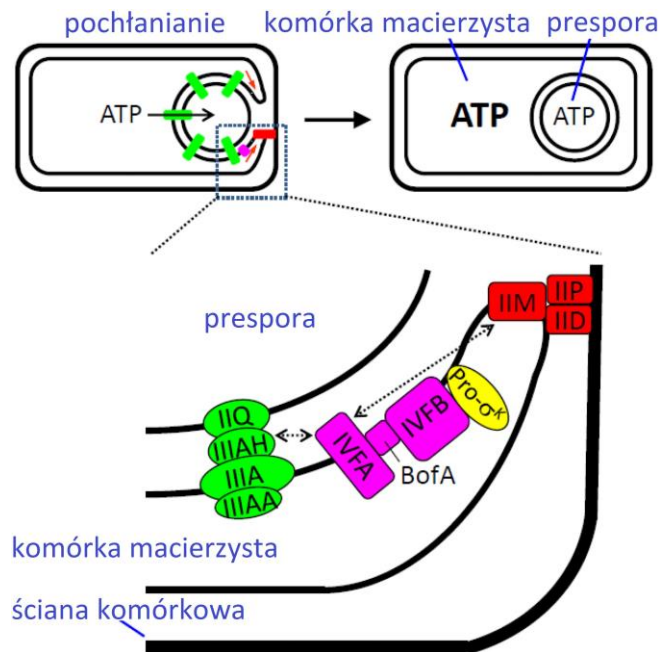
Rycina 1.38. Schemat lokalizacji białek, biorących udział w szlaku aktywacji σ^K (R. Zhou & Kroos, 2004). FS – prespora; MC – komórka macierzysta; RNAP – polimeraza RNA; IFM – wewnętrzna błona prespory; OFM – zewnętrzna błona prespory. Zaznaczono sekwencje HELGH i NPDG SpoIVFB, które są krytyczne dla proteolizy pro- σ^K .

Rozszczepienia pro- σ^K dokonuje wewnątrz błonowa metaloproteaza SpoIVFB, która jest syntetyzowana w komórce macierzystej podczas procesu pochlania (Rudner i in., 2002; Y. T. N. Yu & Kroos, 2000; R. Zhou i in., 2009). Jednak SpoIVFB jest utrzymywany w stanie nieaktywnym przez tworzenie trójskładnikowego kompleksu z dwoma innymi regulatorowymi białkami błonowymi, SpoIVFA i BofA (**Ryc. 1.38**) (Green & Cutting, 2000; Rudner & Losick, 2002; G. Sun i in., 2021). W przypadku braku SpoIVFA, BofA i SpoIVFB tworzy niestabilny kompleks i nie jest w stanie prawidłowo zlokalizować się w zewnętrznej błonie prespory. W związku z tym stwierdzono, że SpoIVFA odgrywa kluczową rolę w składaniu kompleksu, służąc jako platforma, zaś BofA bezpośrednio hamuje SpoIVFB (R. Zhou & Kroos, 2004). Za aktywację SpoIVFB odpowiada SpoIVB, który jest syntetyzowany wyłącznie w presporze, początkowo na bardzo niskich poziomach pod kontrolą σ^F , a następnie, po zakończeniu pochlania, na znacznie wyższych poziomach pod kontrolą σ^G i stymulacją SpoVT (Dong & Cutting, 2003; P. R. Wakeley i in., 2000). SpoIVB jest autoproteolityczną endopeptydazą serynową i podlega dwóm poziomom proteolizy, własnej w celu aktywacji, a następnie przeprowadzanej przez inne proteazy w celu

deaktywacji. Autoproteoliza SpoIVB jest blokowana w przestrzeni międzybłonowej przez białko BofC, którego ekspresja jest kontrolowana zarówno przez σ_F , jak i σ_G , przy czym podczas późnej sporulacji transkrypcja genu *bofC* przy udziale σ_G jest negatywnie regulowana przez SpoVT (P. Wakeley i in., 2000). Tym samym, działanie BofC stanowi punkt kontrolny zapobiegający przedwczesnej aktywacji σ_K . Dzięki autoproteolizie, SpoIVB uwalnia się z wewnętrznej błony prespory do przestrzeni międzybłonowej, gdzie rozszczepia C-koniec SpoIVFA (Campo & Rudner, 2006; Rudner & Losick, 2002; P. R. Wakeley i in., 2000). Druga proteaza serynowa, CtpB, jest także głównie wydzielana z prespory do przestrzeni międzybłonowej i służy do precyzyjnego dostrojenia czasu aktywacji σ_K oraz jako mechanizm zapasowy, również zapewniający C-końcowe cięcie SpoIVFA (Campo & Rudner, 2006, 2007; Pan i in., 2003) i możliwe że BofA (R. Zhou & Kroos, 2005). Ostatecznie, przy udziale ATP aktywowany SpoIVFB rozszczepia 20 aminokwasowy fragment pro- σ_K i tym samym uwalnia aktywny σ_K z zewnętrznej błony prespory do komórki macierzystej (Rudner & Losick, 2002; R. Zhou i in., 2009).

Co ciekawe, doniesiono, że kanały odżywcze SpoIIIA-H-SpoIIQ są wymagane dla prawidłowej lokalizacji SpoIVFA, a tym samym jego kompleksu ze SpoIVFB i BofA (**Ryc. 1.39**) (Doan i in., 2005; X. Jiang i in., 2005). Ponadto doniesiono, że białka odpowiadające za pochłanianie prespory oraz kanały odżywcze są wymagane do aktywacji nie tylko σ_G w przedsporce, ale również σ_K w komórce macierzystej. Zaproponowano, że ta kolokalizacja może być związana z zależnością SpoIVFB od ATP. Mianowicie eksport ATP przez kanały odżywcze do prespory i/lub aktywność ATPazy SpoIIIAA może skutkować stosunkowo niskim stężeniem ATP w pobliżu kanałów, zapewniając, że pobliski SpoIVFB pozostaje nieaktywny nawet przy braku hamowania przez BofA (Konovalova i in., 2014; Kroos & Akiyama, 2013). Po zakończeniu pochłaniania kanały przechodzą reorganizację i niektóre składniki ulegają degradacji (Chiba i in., 2007), być może umożliwiając wzrost stężenia ATP w komórce macierzystej, przynajmniej w pobliżu najbardziej zewnętrznej błony otaczającej presporę, co pozwalałoby na związanie ATP przez SpoIVFB i gotowość enzymu do działania (Konovalova i in., 2014; Kroos & Akiyama, 2013). W ten sposób aktywacja SpoIVFB byłaby połączona nie tylko z zależną od działania kanału odżywczego aktywacją σ_G w presporze, prowadzącą do wydzielania proteaz SpoIVB i CtpB, które celują w SpoIVFA i BofA, ale także do zakończenia pochłonięcia i degradacji tych kanałów, co skutkowałoby wzrostem ATP w

komórce macierzystej wykrywanym przez SpoIVFB. Ponieważ regulon σ^K dotyczy przede wszystkim produkcji białek płaszcza spor, które gromadzą się na ich powierzchni, punkt kontrolny, sprawdzający zakończenia pochłaniania poprzez zniszczenie kanałów, wydaje się pożądany (Doan & Rudner, 2007; Kroos & Akiyama, 2013).



Rycina 1.39. Kolokalizacja kanałów SpoIIIA-H-SpoIIQ z kompleksem SpoIVFA-SpoIVFB-BofA (Kroos & Akiyama, 2013) - zmodyfikowane

Sam gen *sigK* również jest niezwykle ciekawy, ponieważ powstaje on z połączenia dwóch innych genów, *spoIIIC* oraz *spoIVCB* (Hilbert & Piggot, 2004; Kimura i in., 2010). Mianowicie, podczas sporulacji w komórce macierzystej dochodzi od rearanżacji chromosomu, w wyniku której 48 kb fragment pomiędzy genami zostaje wycięty. Ponieważ komórka macierzysta lizuje na koniec procesu sporulacji, zmiana w nukleoidzie nie jest przekazywana komórkom potomnym. Wydaje się, że SpoIVCA jest białkiem odpowiedzialnym za usuwanie fragmentu DNA, ponieważ wykazuje znaczne podobieństwo do rodziny miejscowo specyficznych rekombinaz, wiąże się z miejscem obróbki *in vitro* i jest jedynym białkiem specyficznym dla sporulacji wymaganym do wycięcia *in vivo*. Transkrypcja zarówno genu *spoIVCA*, jak i *sigK* jest ograniczona do komórki macierzystej, ponieważ jest inicjowana z promotora zależnego od σ^E i wymagającego SpoIIID. Taka rearanżacja nukleoidu mogłaby być potencjalnie nowym mechanizmem kompartmentalizacji ekspresji genów, jednak obecność nienaruszonych genów *spoIIIC* oraz *spoIVCB* podczas sporulacji nie ma wpływu na postęp procesu sporulacji i rozwój spor.

σ_K reguluje około 150 genów, w tym GerE, ostateczny czynnik transkrypcyjny specyficzny dla komórki macierzystej w kaskadzie (De Hoon i in., 2010). Podobnie jak SpoIIID, GerE może działać jako aktywator lub jako represor transkrypcji, dzieląc geny zależne od σ_K na trzy grupy:

- regulowane wyłącznie przez σ_K ulegają ekspresji przez cały okres późnej sporulacji;
- tłumione przez GerE ulegają ekspresji wcześniej po aktywacji σ_K ;
- wzmacniane przez GerE są ekspresjonowane później (Hilbert & Piggot, 2004).

Regulon σ_K bierze udział w końcowych etapach dojrzewania spory, a więc obejmuje geny związane z biosyntezą kory i płaszczu, uwalnianiem spory poprzez lizę komórki macierzystej, kiełkowaniem oraz gen strukturalny samego σ_K , prowadzący do pętli autokatalitycznej (Dong & Cutting, 2003; Hilbert & Piggot, 2004; Steil i in., 2005).

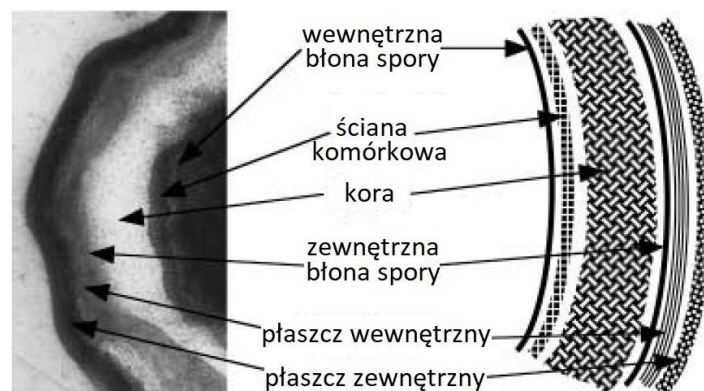
2.15. Synteza kory i płaszczu spory

Ekstremalna odporność spory wynika z wielu czynników, w tym:

- niskiej zawartości wody i wysokiego poziomu kwasu dipikolinowego (DPA) oraz związanych z nim kationów dwuwartościowych, głównie Ca^{2+} , w rdzeniu, co chroni sporę przed wpływem ciepła i wysychania;
- ochrona DNA poprzez jego wysycenie specyficzną dla spory grupą białek wiążących DNA, SASP, które chronią DNA przed ciepłem, wysychaniem, genotoksycznymi związkami chemicznymi i promieniowaniem;
- naprawa uszkodzeń DNA podczas germinacji spowodowanych promieniowaniem;
- względna nieprzepuszczalność wewnętrznej błony spory dla hydrofilowych substancji chemicznych;
- wielowarstwowy płaszcz, który ogranicza dostęp enzymów i związków chemicznych do wnętrza spory (Jones i in., 2005; Sanchez-Salas i in., 2011; P. Setlow, 2014).

Po zakończeniu pochłonięcia wokół rdzenia spory montowana jest seria struktur ochronnych (De Hoon i in., 2010). Synteza pierwotnej ściany komórkowej zarodka i kory, charakterystycznej formy peptydoglikanu, pomiędzy błonami otaczającymi presporę jest

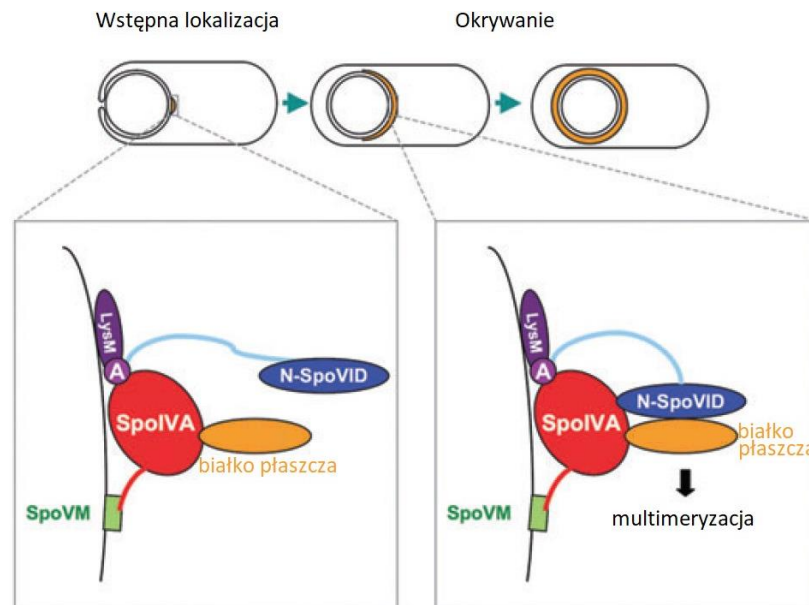
definiowana jako etap IV (Hilbert & Piggot, 2004). Jednocześnie w komórce macierzystej syntezowanych jest ponad 80 pojedynczych białek płaszczu, aby otoczyć presporę wielowarstwową strukturą, ze skorupą jako najbardziej zewnętrzną warstwą (Freitas i in., 2020). Osadzanie przez komórkę macierzystą białkowego płaszczu wokół prespory określa się jako etap V (Hilbert & Piggot, 2004). Etapy IV i V nie zachodzą sekwencyjnie, a raczej jednocześnie, zaś rozpoczęcie tworzenia płaszczu poprzedza powstawanie kory (Ebmeier i in., 2012; Riley, Schwarz, i in., 2021). Etap VI to dojrzewanie, kiedy zarodek uzyskuje pełną odporność, w tym na promieniowanie UV i wysoką temperaturę, chociaż nie występują żadne oczywiste zmiany morfologiczne. Etap VII oznacza lizę komórki macierzystej, która uwalnia dojrzałą sporę do środowiska (Hilbert & Piggot, 2004).



Rycina 1.40. Przekrój przez sporę *B. subtilis* (Popham, 2002) - zmodyfikowane

U *B. subtilis* najbardziej zewnętrzną warstwą spory jest białkowy płaszcz, który chroni i pośredniczy w interakcji z abiotycznymi i biotycznymi powierzchniami, a także z germinantami, specyficznymi induktorami germinacji (Freitas i in., 2020). Jest łatwo odróżnialny od kory, ponieważ cechuje się wysoką gęstością elektronową (**Ryc. 1.40**) (Driks & Eichenberger, 2016). Płaszcz różni się znacznie wielkością między gatunkami, w *B. subtilis*, gdzie jest on stosunkowo gruby, nie przekracza 200 nm szerokości. Również liczba warstw płaszczu oraz obecność lub brak wyrostków wystających z jego powierzchni różnią się w zależności od gatunku (Driks & Eichenberger, 2016; H. Kim i in., 2006). U *B. subtilis*, występują cztery warstwy, z czego jedna, najbardziej wewnętrzna, nie jest już rozróżnialna pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym, ale to na niej gromadzi się reszta płaszczu i zawiera ona kilka białek wymaganych do zainicjowania jego składania, tj. SpoIVA, SpoVM i SpoVID (**Ryc. 1.41**) (Driks & Eichenberger, 2016; McKenney & Eichenberger, 2012; K. H. Wang i in., 2009). Skorupę, najbardziej zewnętrzną warstwę płaszczu, wykryto stosunkowo

niedawno, ponieważ jej uwidocznienie wymaga zastosowania barwnika, czerwieni rutenowej (McKenney i in., 2010). Można również wyróżnić płaszcz wewnętrzny i ciemniejszy płaszcz zewnętrzny (**Ryc. 1.40**) (Costa i in., 2007; Laaberki & Dworkin, 2008; Little & Driks, 2001).



Rycina 1.41. Schemat interakcji białek wymaganych do zainicjowania składania płaszczu (K. H. Wang i in., 2009) - zmodyfikowane. W białku SpoVID wyszczególniono domeny LysM oraz A, znajdujące się na C-końcu.

Chociaż istnieje ponad 80 białek płaszczu, wykazano, że tylko niewielka ich liczba, białka morfogenetyczne, jest niezbędna do jego złożenia (McKenney & Eichenberger, 2012). Montaż każdej z czterech warstwy płaszczu zależy od jednego głównego białka morfogenetycznego: SpoIVA zakotwicza płaszcz na powierzchni spory, SafA odpowiada za odpowiednie złożenie płaszczu wewnętrznego, CotE zewnętrznego, zaś CotZ skorupy. Aby zainicjować tworzenie płaszczu, najpierw następuje wstępna lokalizacja białek SpoIVA i SpoVM na biegunie prespory, od którego rozpoczęło się pochłanianie (K. H. Wang i in., 2009). Proponuje się, że SpoVM jest w stanie wykryć dodatnią krzywiznę błony i dlatego preferencyjnie lokalizuje się na wypukłej zewnętrznej błonie prespory (Driks & Eichenberger, 2016). SpoIVA jest ATPazą, która wykorzystuje hydrolizę ATP do własnej polimeryzacji w stabilne włókna otaczające presporę (Castaing i in., 2013; Ramamurthi & Losick, 2008). Do rozpoczęcia okrywania prespory płaszczem wymagane jest dołączenie do SpoIVA i SpoVM trzeciego białka, SpoVID, którego N-koniec jest wymagany do polimeryzacji

białek płaszczu, a C-koniec służy do interakcji ze SpoIVA (**Ryc. 1.41**) (Driks & Eichenberger, 2016; K. H. Wang i in., 2009).

Płaszcz sporu chroni je przed szerokim zakresem uszkodzeń, w tym trawieniem przez drapieżne drobnoustroje i działaniem różnych związków chemicznych (Driks & Eichenberger, 2016; Ghosh i in., 2008). Jest szczególnie ważny w zapobieganiu dostępowi egzogennych enzymów litycznych, takich jak lizozym, do kory, znajdującej się pod warstwami płaszczu, i ściany komórkowej pod korą, ponieważ hydroliza tych elementów może powodować lizę sporu (Ghosh i in., 2008; Klobutcher i in., 2006). Mechanizmy tych właściwości odpornościowych pozostają niejasne, ale prawdopodobnie przynajmniej w znacznym stopniu warstwy płaszczu działają jako fizyczna bariera, biernie wykluczająca cząsteczki toksyczne (Driks & Eichenberger, 2016). Płaszcz nie jest jednak całkowicie nieprzepuszczalny, ponieważ umożliwia przejście cząsteczek o masie <5 kDa do warstw wewnętrznych, w szczególności wewnętrznej błony spory, gdzie znajdują się receptory Ger, wykrywające obecność cząsteczek składników odżywczych, które wyzwalają kiełkowanie (Ghosh i in., 2008). Z tego powodu ochrona, szczególnie przed małymi toksycznymi cząsteczkami, wynikająca z prostej funkcji barierowej, byłaby niewystarczająca (Driks & Eichenberger, 2016). Drugą linią obrony są białka płaszczu, które mogą reagować z takimi związkami i unieczynniać je, zanim będą mogły uzyskać dostęp i uszkodzić bardziej wrażliwe cele znajdujące się dalej we wnętrzu spory (Driks & Eichenberger, 2016; Ghosh i in., 2008; Klobutcher i in., 2006). Płaszcz wydaje się zawierać enzymy, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalazy i lakazy, które mogą odpowiadać za odporność spory na nadtlenek wodoru i inne związki utleniające. Jest również możliwe, że porowatość płaszczu zwiększa jego efektywną powierzchnię (Driks & Eichenberger, 2016). Płaszcz ma za to ograniczony udział w odporności na wysokie temperatury, promieniowanie lub uszkodzenia mechaniczne (Carroll i in., 2008; Jones i in., 2005).

Składanie płaszczu to jeden z najbardziej rozbudowanych procesów składania struktur multibiałkowych (Driks & Eichenberger, 2016). 1-2% genomu *B. subtilis* koduje białka płaszczu, co przekłada się na to, że co najmniej 15% wszystkich białek syntezowanych podczas sporulacji to białka tej struktury. Do syntezy, złożenia i dojrzewania płaszczu potrzeba kilku godzin. Pierwszy etap zaczyna się niedługo po asymetrycznym podziale, ponieważ około połowa znanych białek płaszczu jest wytwarzana pod kontrolą σE . Wydaje

się również, że dojrzewanie płaszczka jest kontynuowane nawet po lizie komórek macierzystych, ponieważ sieciowanie białek płaszczka może trwać przez kilka dni (Abhyankar i in., 2015; Sanchez-Salas i in., 2011). Może się fałdować i rozwijać, dostosowując się w ten sposób do zmian objętości spor, które towarzyszą tworzeniu spor i kiełkowaniu (Driks & Eichenberger, 2016; Henriques & Moran, 2007; H. Kim i in., 2006).

Jednocześnie z tworzeniem płaszczka i kory, pochłonięta prespora jest odwadniana, co nadaje jej jasny wygląd pod mikroskopem kontrastowo-fazowym (Hilbert & Piggot, 2004). Stopień jasności spor jest skorelowany ze stopniem odwodnienia rdzenia, który zachodzi na skutek importu kwasu dipikolinowego z komórki macierzystej, gdzie jest syntezowany, do prespory w celu zastąpienia wody (Driks & Eichenberger, 2016). W konsekwencji, DPA stanowi około 10% suchej masy dojrzałej spory (B. Setlow i in., 2006). Przypuszcza się, że niska zawartość wody w rdzeniu skutkuje zmniejszoną ruchliwością molekularną białek rdzeniowych, a tym samym ich podwyższoną odpornością na stres termiczny (B. Setlow i in., 2006; P. Setlow, 2014). Obecność DPA zapewnia również odporność na wysychanie i nadtlenek wodoru, a także odpowiada za utrzymanie spory w stanie spoczynku.

SASP są syntetyzowane dopiero w późnej fazie sporulacji w rozwijającej się presporze. Są to białka o długość 60–75 aa, których geny są transkrybowane przez polimerazę RNA związaną z σ_G (P. Setlow, 2014). W dojrzałej sporze stanowią 3–5% wszystkich białek (Ki i in., 2008). Białka te mają niskie powinowactwo DNA, ale na skutek postępującego odwadniania rdzenia spory i jednoczesnego zwiększania poziomu kwasu dipikolinowego, SASP wysycają DNA, zmieniając jego konformację z B na strukturę pośrednią pomiędzy konformacją A i B, co powoduje zmianę fotochemii DNA (P. Setlow, 2014). Promieniowanie padające wówczas na DNA powoduje tworzenie się specyficznego dla spor fotoproduktu (SP, ang. *spore photoproduct*). Tworzy się on z taką samą wydajnością, jak inne niepożądane związki napromieniowania DNA w komórkach roślinnych, ale w przeciwieństwie do nich, jest względnie bezbłędny w naprawie. Naprawa DNA ma miejsce podczas kiełkowania spor i może zachodzić poprzez rekombinację, wycięcie nukleotydów, naprawę miejsc bezzasadowych i naprawę specyficzną dla SP. Dwie ostatnie formy naprawy DNA wykorzystują specyficzny dla spor enzym, liazę Spl. Ponadto podczas kiełkowania spor i aktywacji metabolizmu, kiedy dochodzi do ponownego uwodnienia rdzenia, może również dochodzić do oksydacyjnych

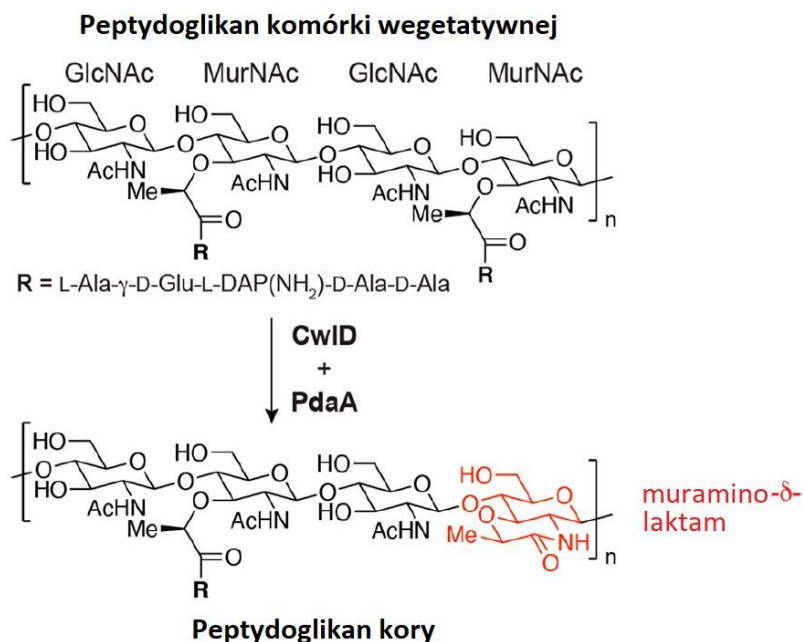
uszkodzeń DNA, które są przetwarzane przez specyficzną dla spor katalazę, KatX, czy endonukleazy apurynowe/apirymidynowe, Nfo i ExoA (Ibarra i in., 2008).

Podczas kiełkowania, białka SASP uwalniają DNA, umożliwiając transkrypcję, i ulegają proteolizie na skutek działania specyficznej dla nich endoproteazy, Gpr (P. Setlow, 2007). Następnie peptydazy degradują produkty rozszczepienia Gpr do aminokwasów, które wspierają syntezę *de novo* białek i metabolizm energetyczny na wczesnym etapie wzrostu spor. Gpr jest atypową proteazą kwasu asparaginowego wytwarzaną jako zymogen w późnym stadium sporulacji (Traag i in., 2013). Poprzez zdarzenie autorozszczepienia, N-koniec Gpr jest przetwarzany w celu aktywacji proteazy bezpośrednio przed uśpieniem spor. Z powodu niskiej zawartości wody w rdzeniu, Gpr nie rozszczepia swoich substratów, dopóki nie nastąpi ponowne uwodnienie wnętrza spory podczas kiełkowania.

Montaż kory, drugiej charakterystycznej dla spor osłony, jest zależny od udanej inicjacji składania płaszczu, dlatego morfogeneza obu struktur jest dokładnie skoordynowana podczas sporulacji, za co odpowiadają m.in. SpoVM oraz CmpA (Ebmeier i in., 2012; Krajčíková i in., 2021; Pereira i in., 2019). SpoVM uczestniczy w inicjacji składania płaszczu, a jednocześnie proponuje się, że miałoby odpowiadać za lokalizację CmpA wokół prespory, zaś CmpA wydaje się hamować inicjację tworzenia kory (Ebmeier i in., 2012). Oddysocjowanie SpoVM, oznaczające prawidłowe rozpoczęcie składania płaszczu, powodowałoby tym samym odłączenie również CmpA i umożliwienie rozpoczęcia syntezy kory.

Po zakończeniu pochłaniania dwa rodzaje peptydoglikanów są odkładane między wewnętrzną i zewnętrzną błoną otaczającą presporę. Powierzchnia wewnętrznej błony zarodników jest miejscem gromadzenia się cienkiej warstwy peptydoglikanu zwanej pierwotną ścianą komórkową zarodka, podobną pod względem składu do wegetatywnej ściany komórkowej (Henriques & Moran, 2000). Po wykiełkowaniu spor służy ona jako pierwotna ściana nowo utworzonej komórki wegetatywnej. Odgrywa ona również rolę w prawidłowym składaniu drugiej, grubszej i chemicznie odrębnej warstwy peptydoglikanu, czyli kory (Popham & Bernhards, 2015). Miejscem jej montażu jest zewnętrzna błona prespory (Henriques & Moran, 2007). Kora jest niezbędna do osiągnięcia i utrzymania stanu odwodnienia rdzenia oraz do mineralizacji spor, które to czynniki są kluczowe dla termoodporności spor (Atrih & Foster, 2001; Henriques & Moran, 2000, 2007). Kora

wpływa również na stan spoczynku spor. Czynniki, które niszczą warstwę peptydoglikanu, prowadzą do utraty odwodnienia rdzenia, co skutkuje stratą odporności spory na ekstremalne warunki (Popham & Bernhards, 2015).



Rycina 1.42. Schemat powstawania modyfikacji peptydoglikanu w korze spor (Tobin i in., 2023) - zmodyfikowane

Białka odpowiedzialne za syntezę kory są wytwarzane zarówno w presporze, jak i komórkach macierzystych (Popham & Bernhards, 2015). Podczas gdy niektóre z tych białek przyczyniają się również do syntezy wegetatywnej ściany komórkowej, inne są specyficzne tylko dla sporulacji. Są to m.in. białka z rodziny Mur i Dac, a także SpoVD, SpoVE czy SpoVB (Popham & Bernhards, 2015; Vasudevan i in., 2007). Szczególną modyfikacją odróżniającą peptydoglikan kory od ściany komórkowej jest obecność muramino- β -laktamu, który zmniejsza usieciowanie kory dziesięciokrotnie w porównaniu do ściany komórkowej (Meador-Parton & Popham, 2000; Popham & Bernhards, 2015; Tobin i in., 2023). Co ciekawe, nie nadaje on odporność sporze, za to pozwala na degradację kory, wymaganą do kiełkowania. Za tworzenie muramino- β -laktamu odpowiadają dwa białka, amidaza CwID i deacetylaza PdaA (Tobin i in., 2023). W celu modyfikacji peptydoglikanu, pierwszy działa CwID, który usuwa peptyd z kwasu N-acetylmuraminowego, a następnie PdaA katalizuje deacetylację i cyklizację produktu pośredniego do muramino- δ -laktamu (**Ryc. 1.42**). PdaA ulega ekspresji wyłącznie w presporze, pod kontrolą σ G (Fukushima i in., 2002), zaś CwID w obu typach komórek, za co odpowiadają σ E i σ G, chociaż do powstania prawidłowego

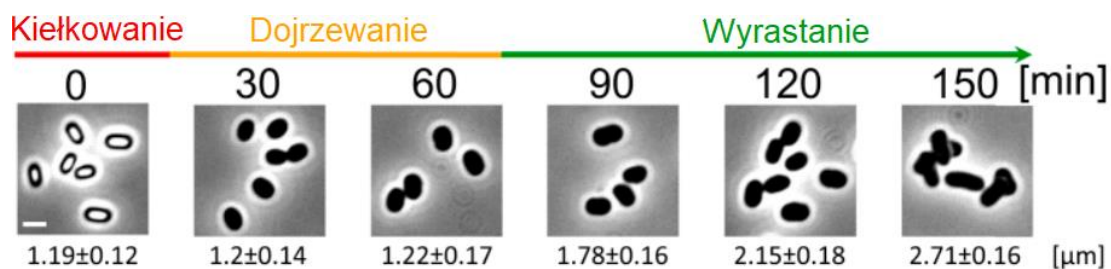
peptydoglikanu kory wymagana jest jedynie ekspresja w komórce macierzystej (Gilmore i in., 2004; Popham & Bernhards, 2015).

Aby spora mogła wykiełkować i wznowić metabolizm, peptydoglikan kory musi najpierw zostać zdegradowany przez działanie enzymów litycznych specyficznych dla kiełkowania (Popham & Bernhards, 2015). Enzymy te są już obecne, ale nieaktywne, w uśpionej sporze.

Najgłębiej położona jest wewnętrzna błona spory, która wykazuje pewne specyficzne właściwości związane z jej funkcją odpornościową (Cowan i in., 2004; Loison i in., 2013; P. Setlow, 2014). Lipidy są w niej w dużej mierze nieruchome, ma również znacznie wyższą lepkość niż błona plazmatyczna kiełkującej spory, a także jej przepuszczalność bierna dla małych cząsteczek, nawet takich jak metyloamina i woda, jest wyjątkowo niska. Wewnętrzna błona spor odgrywa kluczową rolę w inicjacji germinacji, ponieważ zawiera receptory składników odżywczych, które po związaniu się z germinantami, na ogół aminokwasami lub cukrami, rozpoczynają proces kiełkowania (Ibarra i in., 2008).

3. Germinacja spor

Proces odtworzenia komórki wegetatywnej z dojrzałej i uśpionej spory jest klasycznie podzielony na dwie główne następujące po sobie fazy (Sinai i in., 2015; B. Zhou i in., 2022). Pierwsza z nich to kiełkowanie (ang. *germination*), podczas którego zarodnik przechodzi rehydratację, uwalnianie kwasu dipikolinowego, hydrolizę kory i demontaż płaszczka. Fazie tej towarzyszy przejście od fazy jasnej, charakterystycznej dla spor, do fazy ciemnej, cechującą rozwijającą się komórkę, co można zaobserwować pod mikroskopem świetlnym (**Ryc. 1.43**). Drugi etap procesu to faza wyrastania (ang. *outgrowth*), w którym spora aktywuje syntezę makrocząsteczek, aby stać się komórką wegetatywną i opuszcza rozpadające się warstwy otaczające wcześniej sporę. Następuje wówczas wydłużenie się komórek. Zidentyfikowano również fazę pośrednią, określaną jako „okres dojrzewania”, w którym nie widać żadnych zmian morfologicznych (Segev i in., 2013; Sinai i in., 2015). Okres ten jest poświęcony reorganizacji molekularnej i różni się długością w zależności od początkowych zasobów molekularnych zawartych w sporze.



Rycina 1.43. Schemat sekwencji zdarzeń podczas germinacji spor przedstawiona na zdjęciach mikroskopowych z kontrastem fazowym (Sinai i in., 2015) - zmodyfikowane. Poniżej zdjęć przedstawiono średnią długość odradzających się spor. Pasek skali reprezentuje 1 μm.

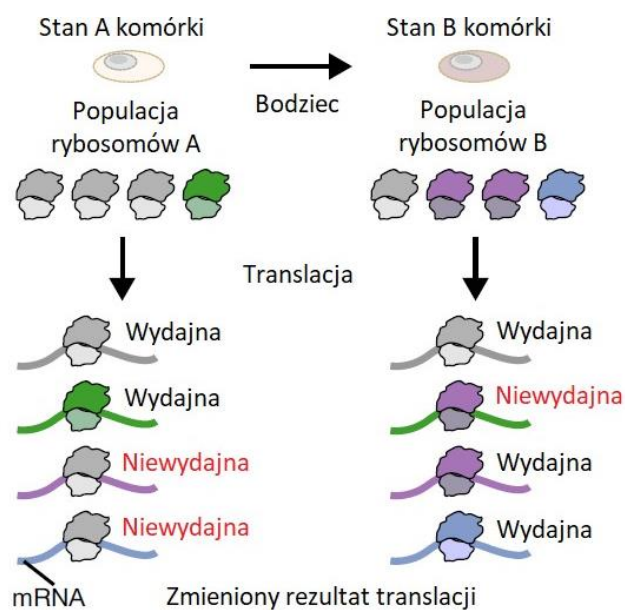
Co ciekawe, nowsze odkrycia wskazują, że translacja zachodzi i jest wymagana już podczas okresu kiełkowania, co jest sprzeczne z tradycyjnym postrzeganiem tego etapu, jako nieaktywnego metabolicznie (Sinai i in., 2015; B. Zhou i in., 2022). Co szczególnie interesujące, wśród syntezowanych wówczas czynników translacyjnych znajduje się RpmE, składnik dużej podjednostki rybosomu, białko kanoniczne względem badanego w tej pracy paralogu RpmEB. Doniesiono, że mutanty pozbawione genu *rpmE*, mimo prawidłowego przebiegu sporulacji, germinowały wolniej niż szczep dziki, co wskazuje na niedobór translacji podczas germinacji (Sinai i in., 2015).

4. Hipoteza wyspecjalizowanych rybosomów

Rybosom bakteryjny (70S) jest złożoną makrocząsteczką, zbudowaną z rybosomalnego RNA (rRNA) oraz białek, które tworzą małą (30S) i dużą (50S) podjednostkę (Akanuma i in., 2012). U *B. subtilis* mała podjednostka składa się z 16S rRNA o długości około 1500 nukleotydów oraz ponad 20 białek i możemy w jej budowie wyróżnić głowę, platformę i ciało, podczas gdy duża podjednostka jest zbudowana z 23S rRNA o długości około 2900 nukleotydów i 5S rRNA o długości 120 nukleotydów, a także ponad 30 białek. Każdy rybosom ma trzy miejsca wiązania transportującego RNA (tRNA), mianowicie miejsce A, które przyjmuje aminoacylowany tRNA; miejsce P, które wiąże tRNA z powstającym łańcuchem peptydowym oraz miejsce E, które wiąże wcześniej zdeacylowany tRNA przed opuszczeniem przez niego rybosomu. Mała podjednostka łączy się z matrycowym RNA (mRNA) i pętlą antykodonu związanego tRNA i bierze udział w zapewnieniu wierności translacji poprzez sprawdzanie poprawności parowania kodonu i antykodonu. Duża podjednostka wiąże się z ramionami akceptorowymi tRNA i katalizuje tworzenie wiązania peptydowego między aminokwasem przyłączonym do tRNA w miejscu A i powstającym łańcuchem peptydowym związanym z tRNA w miejscu P.

Podstawowa struktura i funkcje rybosomu zostały ustalone na bardzo wczesnym etapie ewolucji i najwyraźniej istniały już u ostatniego uniwersalnego wspólnego przodka (LUCA, ang. *last universal common ancestor*) wszystkich istniejących komórek (Fox, 2010; Makarova i in., 2001). Wskazuje na to zachowanie sekwencji rybosomalnego RNA (rRNA) i wielu białek rybosomalnych (r-białek), wraz z sekwencjami innych centralnych składników maszynierii translacyjnej, we wszystkich trzech superkrólestwach życia - Bakteriach, Archaeach i Eukarya. Co więcej, u bakterii i archeonów zauważalna jest konserwatywność organizacji genów kodujących rRNA i r-białka. Rzeczywiście, superoperon r-białek, który obejmuje geny dla różnych, ale zazwyczaj dużych zestawów białek rybosomalnych, jest najbardziej konserwatywną macierzą genów w genomach prokariotycznych. Biorąc pod uwagę, że rRNA i r-białka funkcjonują jako ściśle skoordynowany kompleks, a kolejność odpowiadających im genów w genomach prokariotycznych jest częściowo zachowana, ogólnie przyjmuje się, że geny białek rybosomalnych nie podlegają poziomowemu transferowi genów lub jest on rzadki. W związku z tym rRNA i, w mniejszym stopniu, sekwencje r-białka były rutynowo stosowane jako markery filogenetyczne (Guo, 2018; Makarova i in., 2001; D. L. Sun i in., 2013).

Rybosom jest często opisywany jako „maszyna molekularna”, ponieważ pełni on powszechnie konserwatywną rolę w katalizowaniu syntezy białek, która wymaga zaawansowanego poziomu precyzji i automatyzacji (Dinman, 2016; Xue & Barna, 2012). Analogia maszynowa wpłynęła na sposób konceptualizacji tego kompleksu molekularnego, czyniąc z rybosomu biernego uczestnika translacji. Tradycyjnie jest postrzegany jako niezmienna makrocząsteczka, która musi być wyposażona w ten sam, stały zestaw białek rybosomalnych i cząsteczek rRNA, aby precyzyjnie wykonać wszystkie etapy syntezy białek (Byrgazov i in., 2013). Koncepcja ta została dodatkowo utrwalona i wzmocniona przez określenie struktur rybosomu w rozdzielczości atomowej, co miało miejsce na początku tego tysiąclecia (Ban i in., 2000; Schluenzen i in., 2000; Wimberly i in., 2000). W związku ze stałym składem rybosomów, uważano, że nie mają one wewnętrznej zdolności regulacyjnej, zaś wydajność translacji jest determinowana albo za pośrednictwem dodatkowych regulatorów białkowych lub RNA, albo przez cechy właściwe dla mRNA (Byrgazov i in., 2013; Sauert i in., 2015).



Rycina 1.44. Schemat regulacji translacji przez wyspecjalizowane rybosomy (Gay i in., 2022) - zmodyfikowane

Obecnie, o ile heterogeniczność zarówno rybosomów eukariotycznych, jak i bakteryjnych, jest dobrze udokumentowana, o tyle aspekt funkcjonalności takich heterogenicznych makrocząsteczek jest trudniejszy do udowodnienia (Barna M i in., 2022; Emmott i in., 2019; Ferretti & Karbstein, 2019; Gay i in., 2022; Guo, 2018; Joo i in., 2022; Norris i in., 2021). Heterogeniczność w tym kontekście oznacza, że rybosomy różnią się składem rRNA, białkami lub modyfikacjami potranskrypcyjnymi/translacyjnymi obu zestawów składników (Ferretti & Karbstein, 2019). Funkcjonalna heterogeniczność rybosomów została zdefiniowana jako zmiany w składzie rybosomów, które wpływają na ich aktywność, zmieniając w ten sposób wynik translacji (**Ryc. 1.44**). Heterogeniczne rybosomy mogą modulować różne aspekty syntezy białek, takie jak preferencję inicjowania translacji niektórych mRNA, zmiany wierności skutkujące alternatywnym użyciem kodonów START lub STOP, szybkością zachodzenia poszczególnych etapów translacji, pauzę i terminację (Ferretti & Karbstein, 2019; Genuth & Barna, 2018). Rozdzielenie terminów „heterogeniczność” i „specjalizacja” jest istotne, ponieważ możliwe jest istnienie w komórce heterogenicznych populacji rybosomów, które nie różnią się funkcjonalnie. Co więcej, liczne przykłady pokazują, że dowody na heterogeniczność są w większości przypadków znacznie silniejsze niż dowody na specjalizację funkcjonalną, a jeszcze rzadsze są dowody na fizjologiczne role takiej specjalizacji (Ferretti & Karbstein, 2019).

4.1. Historyczny przegląd teorii dotyczących rybosomów

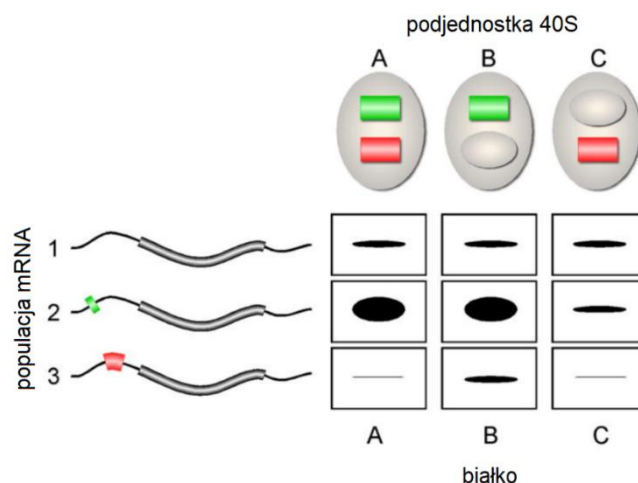
Co ciekawe, niemal natychmiast po odkryciu rybosomu kilku naukowców postulowało, że może istnieć różnorodność w składzie rybosomów (Genuth & Barna, 2018). Palade zauważył niewielkie różnice w wielkości i kształcie rybosomów i zasugerował, że może istnieć dalsza heterogeniczność, której nie można było zobaczyć przy ówczesnej rozdzielczości mikroskopii elektronowej (Palade, 1958). Prawdopodobnie największym orędownikiem heterogeniczności rybosomów w składzie i aktywności w tamtym czasie był Francis Crick, kiedy zaproponował śmiały model „jeden gen, jeden rybosom, jedno białko”, zgodnie z którymi każdy rybosom przenosi informację genetyczną wymaganą do zakodowania pojedynczego, konkretnego białka (Crick, 1958). Pogląd ten szybko został porzucony na skutek dalszych badań i przejawów istnienia cząsteczek mRNA. Badając zainfekowane fagiem komórki *E. coli*, wykryto, że rybosomy bakteryjne są zdolne do syntezy białek fagowych, co doprowadziło do wniosku, iż „rybosomy są niewyspecjalizowanymi strukturami, które syntetyzują białko podyktowane przez mRNA, które akurat zawierają” (Brenner i in., 1961). W ciągu trzech krótkich lat środowisko naukowe wahało się od najbardziej skrajnego poglądu na specjalizację rybosomów – gdzie każde białko jest tłumaczone przez inny typ rybosomu – do najbardziej skrajnego poglądu na jednorodność rybosomów – gdzie rybosomy są pasywnymi maszynami bez funkcji regulacyjnej (Genuth & Barna, 2018).

Kolejne doniesienia o heterogeniczności oraz powiązanej z nią specjalizacji rybosomów pojawiły się ponownie w latach 70' XX wieku i wiele z nich dotyczyło bakterii (Bickle i in., 1973; van Duin i in., 1972; van Duin & Kurland, 1970; Voynow & Kurland, 1971; Weber, 1972). W 1972 roku opisano zależną od tempa wzrostu zmienność składu białek w rybosomach *E. coli* (Deusser, 1972; Deusser & Wittmann, 1972; Milne i in., 1975). Mianowicie, wykryto różnice w ilości białek S6, S21 oraz L12 w zależności od tego, czy komórki bakteryjne rosły w bogatych czy ubogich pożywkach, co determinowało szybkość wzrostu hodowli.

Silne dowody dotyczące heterogeniczności rybosomów zaczęły też napływać z badań nad organizmami eukariotycznymi. W komórkach wegetatywnych i zarodnikach śluzowca *Dictyostelium discoideum* wykryto odrębne populacje rybosomów, charakteryzujące się odmiennym składem ilościowym i jakościowym białek rybosomalnych (Ramagopal & Ennis,

1981). Ponadto badania wskazały na wyższą stabilność rybosomów pochodzących z zarodników. Co ciekawe, transkrypty wszystkich białek rybosomalnych były dostępne w obu typach komórek, a więc prawdopodobnie musiało dochodzić do specyficznych regulacji posttranskrypcyjnych, które prowadziły do uzyskania tylko konkretnego zestawu białek.

W 2002 roku zaproponowano hipotezę filtra rybosomowego na modelu eukariotycznym (Mauro & Edelman, 2002). Kluczową obserwacją zapoczątkowującą hipotezę było odkrycie, że duża liczba mRNA zawiera segmenty, które są podobne lub komplementarne do sekwencji w obrębie 18S lub 28S rRNA. Ta obserwacja zasugerowała potencjalny mechanizm, dzięki któremu mRNA mogą oddziaływać bezpośrednio z podjednostkami rybosomu, np. przez parowanie zasad mRNA-rRNA między komplementarnymi sekwencjami nukleotydowymi. Łącząc to z doniesieniami o heterogeniczności rybosomów pod względem składu białkowego i sekwencji rRNA, zaproponowano, że strukturalnie odmienne populacje rybosomów mogą różnić się zdolnością do translacji określonych podzbiorów mRNA. Podzbiory mRNA mogą posiadać sekwencje, które ułatwiają lub utrudniają inicjację translacji, gdy wchodzi w interakcję z białkowym lub nukleinowym składnikiem rybosomów (**Ryc. 1.45**). Składnik ten może być opcjonalnym elementem rybosomu lub może ulegać modyfikacjom, w wyniku których nie zawsze jest dostępny. Skutkowałoby to różnicą w wydajności translacji konkretnego podzbioru cząsteczek mRNA w zależności od typu rybosomu, który przeprowadza proces.



Rycina 1.45. Schemat działania hipotetycznego filtra rybosomowego (Mauro & Edelman, 2007) - zmodyfikowane. Zielony element reprezentuje fragment mRNA, który ułatwia inicjację translacji, gdy wiąże się z zielonym miejscem wiązania w podjednostkach 40S, zaś czerwony element oznacza fragment mRNA, który może blokować inicjację translacji, gdy wiąże się z czerwonym miejscem wiązania podjednostki 40S. Ilość białka wyrażanego przez różne kombinacje par mRNA-podjednostka jest reprezentowana przez rozmiar czarnych prążków.

W 2007 roku, wzorując się na „kodzie histonowym”, zaproponowano istnienie „kodu rybosomowego” (Komili i in., 2007). Stan transkrypcji danego regionu chromatyny jest determinowany przez określone kombinacje białek histonowych, potranslacyjne modyfikacje histonów oraz modyfikacje DNA. Podobnie, różne kombinacje paralogów białek rybosomalnych, potranslacyjne modyfikacje białek rybosomalnych, różne formy rRNA i modyfikacje rRNA mogą umożliwiać skalibrowaną translację określonych mRNA. Tak jak w przypadku kodu histonowego, kod rybosomowy zapewniłby nowy poziom złożoności w regulacji ekspresji genów.

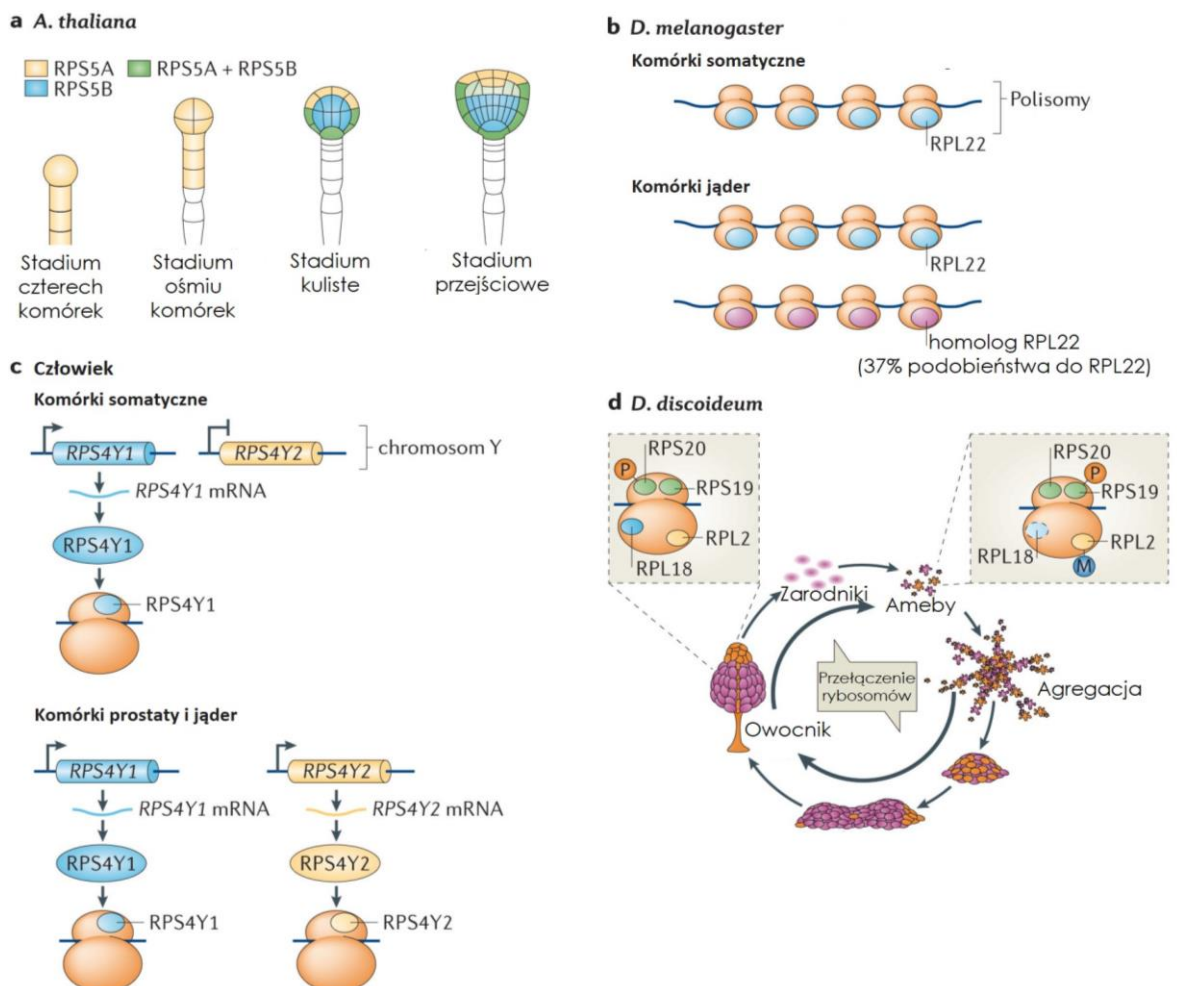
Istnienie wyspecjalizowanych rybosomów byłoby korzystne z wielu względów (Ferretti & Karbstein, 2019). W przeciwieństwie do indukcji transkrypcji, która często jest podobna do przełącznika, kontrola translacji za pośrednictwem różnych pul rybosomów działa bardziej jako modulator, ponieważ preferencje istnieją w kontinuum, a nie są binarne. Podczas gdy regulacja transkrypcji zachodzi w ciągu kilku minut, nadal wymaga zaangażowania maszynerii transkrypcyjnej, eksportu i translacji mRNA. Z drugiej strony zmiana potranslacyjna w białku rybosomalnym lub dodanie/usunięcie białka z rybosomu wymaga tylko jednego etapu. Dodatkowo, wyspecjalizowane rybosomy umożliwiają jednoczesną regulację w górę niektórych mRNA, podczas gdy inne są regulowane w dół. W przeciwieństwie do tego, indukcja transkrypcji pozwala jedynie na regulację w górę indukowanych genów. Ponadto, wygenerowanie puli wyspecjalizowanych rybosomów wymaga jedynie subtelnych dostosowań do już istniejących procesów. Wreszcie, ewolucja funkcjonalnej specjalizacji rybosomów mogła po prostu wykorzystać przypadkowe zdarzenia. Założenie, że wszystkie białka rybosomalne są prawidłowo włączone do rybosomów, nie jest oczywiste, ponieważ zadanie to komplikuje fakt, że składanie r-białek zachodzi równoległymi ścieżkami, wytwarzając dziesiątki prawidłowych półproduktów, a tym samym utrudniając kontrolę jakości włączenia poszczególnych białek (Davis i in., 2016; Gay i in., 2022; Mulder, 2011). Dopóki rybosomy pozostają więc funkcjonalne (a zatem nie ulegają degradacji), subpopulacje pozbawione poszczególnych białek mogły pierwotnie być po prostu nieuniknionymi produktami ubocznymi (Ferretti & Karbstein, 2019).

Źródłem heterogeniczności rybosomów mogą być więc:

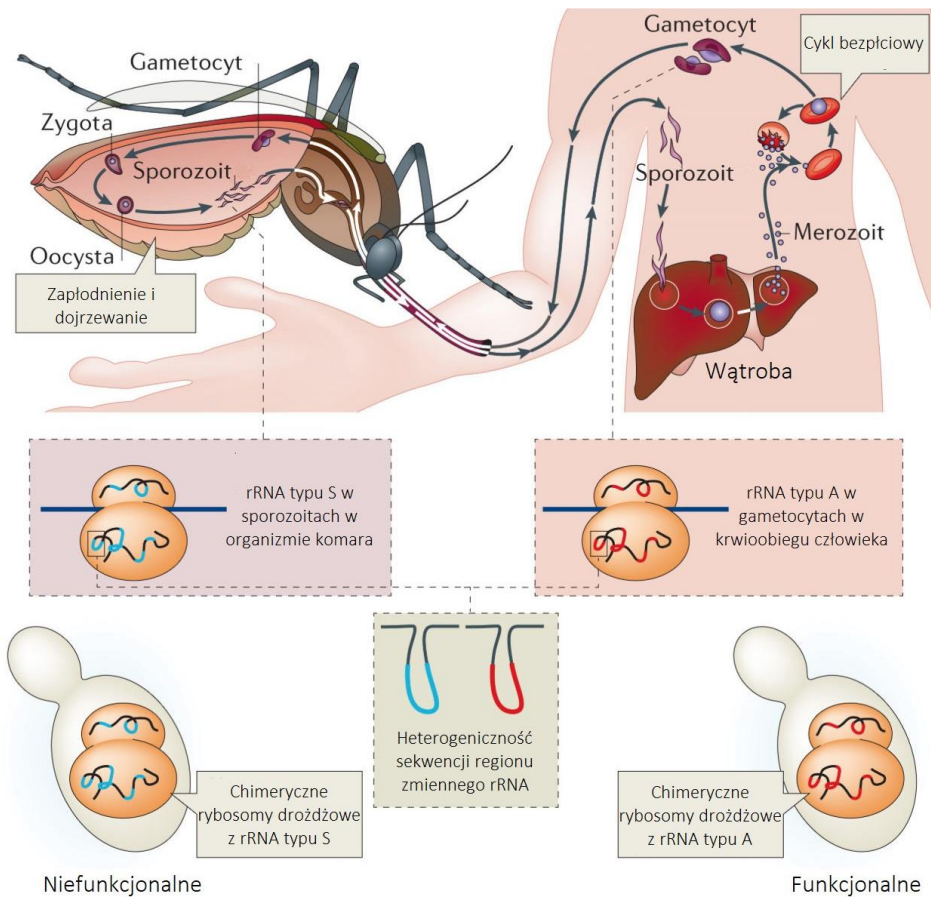
- różnice w składzie białek rybosomalnych, szczególnie, że około połowa z nich nie jest niezbędna dla funkcjonowania rybosomu (Byrgazov i in., 2013; Emmott i in., 2019);
- zastępowanie kanonicznych białek rybosomalnych przez ich odpowiednie paralogi (Byrgazov i in., 2013; Emmott i in., 2019);
- modyfikacje posttranslacyjne białek rybosomalnych, takie jak fosforylacja, metylacja, ubikwitynacja, acetylacja (Byrgazov i in., 2013; Simsek & Barna, 2017);
- modyfikacje posttranskrypcyjne rRNA, takie jak metylacja grupy 2-hydroksylowej rybozy, konwersja urydyny do pseudourydyny i metylacja zasad (Xue & Barna, 2012);
- obecność kopii operonów rRNA (*rrn*), które nieznacznie różnią się sekwencją (mikroheterogeniczność) (Byrgazov i in., 2013).

Heterogeniczność i specjalizacja rybosomów wydaje się być lepiej uargumentowana eukariontów niż prokariotów (Dinman, 2016; Genuth & Barna, 2018; Guo, 2018; Norris i in., 2021; Simsek & Barna, 2017). W organizmach eukariotycznych heterogeniczność rybosomów często jest związana z preferencyjną ekspresją różnych paralogów białek rybosomalnych w danych tkankach lub na określonych etapach cyklu rozwojowego. Poniżej przedstawiono tylko kilka często przytaczanych przykładów dla zobrazowania zagadnienia. U *Arabidopsis thaliana* białko rybosomalne S5A ulega ekspresji w szybko dzielących się komórkach na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, podczas gdy jego paralog, S5B, ulega ekspresji w komórkach różnicujących się (**Ryc. 1.46a**). U *Drosophila melanogaster* występuje heterogeniczność ekspresji białek rybosomalnych w gonadach (**Ryc. 1.46b**) (Hopes i in., 2022; Xue & Barna, 2012). Podobnie u ludzi, podczas gdy S4Y1 jest powszechnie wyrażany, S4Y2 jest ograniczony do jąder i prostaty (**Ryc. 1.46c**). We wspomnianym już śluzowcu *D. discoideum* wykryto ostatecznie trzy rodzaje heterogeniczności: odmienny skład ilościowy i jakościowy białek rybosomalnych, a także ich modyfikacje potranslacyjne (Rodríguez-Almonacid i in., 2023; Xue & Barna, 2012). Na przykład fosforylacja na S19 i metylacja na L2 są traczone, gdy *D. discoideum* agreguje z jednokomórkowej, wolnożyjącej ameby do wielokomórkowego owocnika, podczas gdy L20 ulega fosforylacji (**Ryc. 1.46d**).

L18 to przykład białka rybosomalnego, które występuje wyłącznie w rybosomach rozwijających się komórek, a nie w stadium ameby. Ciekawym przykładem heterogeniczności rybosomów, spowodowanej obecnością różnych cząsteczek rRNA w jej składzie, jest istnienie dwóch typów rybosomów podczas cyklu życiowego pierwotniaka *Plasmodium falciparum*, wywołującego malarię (McGee i in., 2023; Rodríguez-Almonacid i in., 2023; Xue & Barna, 2012). Jedna postać występuje głównie, gdy pasożyt jest w formie sporozoiu (typu S) u komara, podczas gdy druga forma występuje, gdy jest w formie gametocytu (typu A) w krwioobieg żywiciela po zakażeniu (**Ryc. 1.47**). Prawdopodobnie oba typy rybosomów pełnią różne funkcje, ponieważ u *S. cerevisiae* chimeryczny rybosom zawierający 25S rRNA *P. falciparum* typu A jest funkcjonalny, zaś podstawienie rRNA typu S jest śmiertelne.



Rycina 1.46. Przykłady heterogeniczności rybosomów u eukariontów (Xue & Barna, 2012) - zmodyfikowane

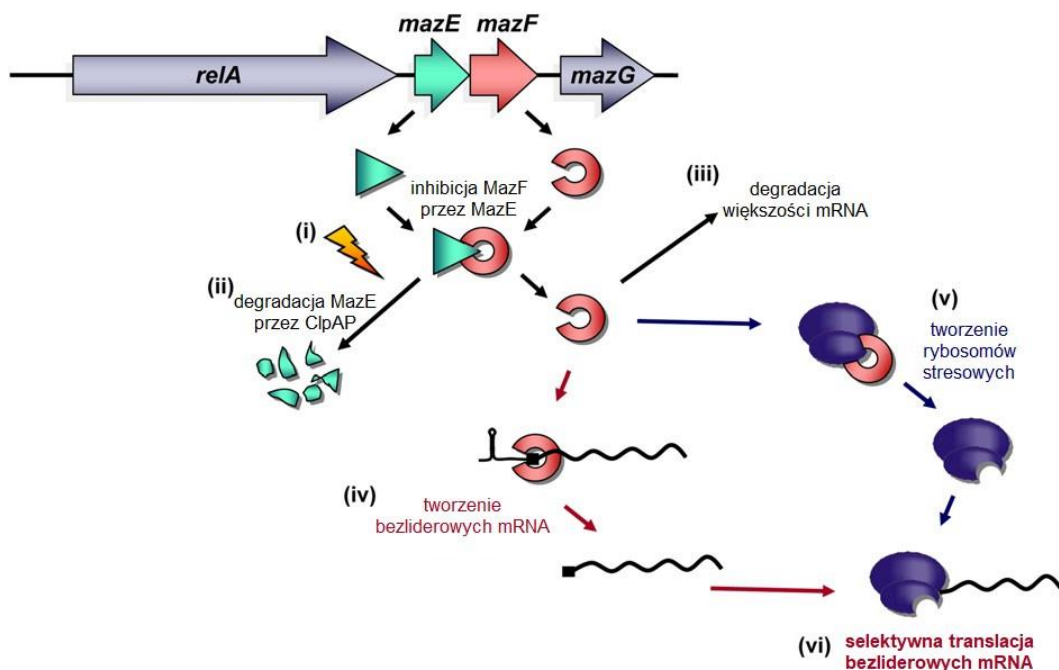


Rycina 1.47. Przykład heterogeniczności rybosomów wywołany przez obecność różnych rRNA na przykładzie *P. falciparum* (Xue & Barna, 2012) - zmodyfikowane

4.2. Działanie toksyny MazF u *E. coli* jako kontrowersyjny przykład istnienia wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii

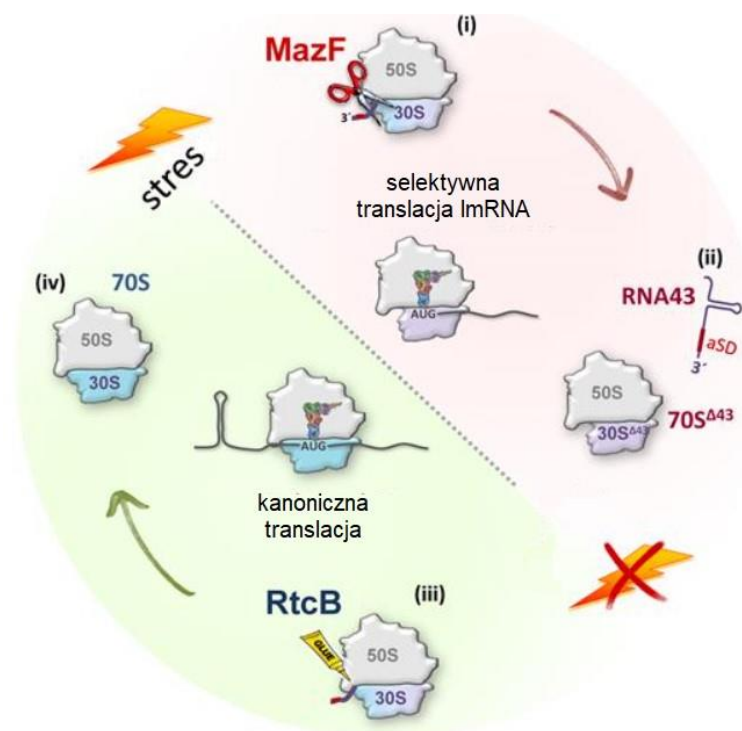
Czołowym przykładem istnienia wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii było działanie toksyny MazF u *E. coli* (Vesper i in., 2011). *mazEF* to przykład układu toksyna-antytoksyna, który jest elementem programowanej śmierci komórki u bakterii. Takie układy składają się ze współtranskrybowanej pary genów, które kodują dwa składniki: stabilną toksynę i niestabilną antytoksynę, która zakłóca śmiertelne działanie toksyny. U *E. coli* *mazEF* koduje labilną antytoksynę MazE i stabilną toksynę MazF. Tak długo, jak MazE i MazF są wspólnie wyrażane, MazE przeciwdziała toksycznej aktywności MazF (**Ryc. 1.48**). W warunkach stresowych ekspresja *mazEF* jest jednak zahamowana, co zapobiega syntezie *de novo* zarówno MazE, jak i MazF. Ponieważ MazE jest znacznie bardziej nietrwały niż MazF, komórkowa ilość MazE zmniejsza się szybciej niż w MazF, pozwalając MazF na swobodne działanie, ostatecznie powodując śmierć komórki. MazF jest specyficzną dla sekwencji endorybonukleazą, która preferencyjnie rozszczepia jednoniciowe mRNA w sekwencjach

ACA. Zaobserwowano, że indukcja układu mazEF prowadzi do zahamowania syntezy białek, co było zgodne z dotychczasową wiedzą, jednakże okazało się, że hamowanie to nie było całkowite (Amitai i in., 2009). Chociaż MazF doprowadził do zahamowania syntezy większości białek (około 90%), selektywnie umożliwił syntezę innych specyficznych białek (ok. 10%). Okazało się, że kryterium jest w dużej mierze waga białka, ponieważ większość białek o zahamowanej syntezie charakteryzowała się masą cząsteczkową powyżej 20 kDa, zaś większość białek o zwiększonej syntezie posiadało masę poniżej 20 kDa. Możliwość, iż białka poniżej 20 kDa to produkty rozpadu większych peptydów, została wykluczona eksperymentalnie. Spośród części białek o zwiększonej syntezie, sześć zaklasyfikowano jako biorące udział w śmierci komórki, zaś trzy jako pomagające komórce przetrwać. Co ciekawe, wszystkie białka o zwiększonej syntezie, które udało się zidentyfikować, posiadały w swoich transkryptach miejsce ACA, rozpoznawane przez toksynę MazF, a więc powinny być poddawane przez nią rozszczepieniu. Wpływ MazF na dwa przeciwstawne procesy, czyli zarówno na śmierć, jak i przeżycie komórki, miało mieć ewolucyjne uzasadnienie w tym, że indukcja MazF przyczynia się heterogeniczności populacji, w której większość komórek bakterii umiera, ale niewielka część może przeżyć i rozwinąć nową populację (Amitai i in., 2009).



Rycina 1.48. Schemat tworzenie bezliderowych mRNA oraz rybosomów stresowych przez MazF (Vesper i in., 2011) - zmodyfikowane

W kolejnej publikacji opisano mechanizm molekularny prowadzący do selektywnej translacji określonego zestawu mRNA po indukcji MazF w *E. coli* (Vesper i in., 2011). Stwierdzono, że ze względu na swoją aktywność endorybonukleolityczną, MazF niszczy miejsca ACA w lub blisko kodonu start AUG określonych mRNA. W ten sposób generowane są odpowiednio mRNA z krótkimi liderami i bez liderów (lmRNA, ang. *leaderless mRNA*). Co zaskakujące, rRNA 16S podjednostki rybosomu 30S okazało się kolejnym celem MazF. Toksyna rozszczepia tryplet ACA w 16S rRNA zlokalizowanym na końcu 5' helisy 45. Rozszczepienie to prowadzi do utraty 43 nukleotydów na końcu 3' 16S rRNA, w tym helisy 45 i sekwencji anty-Shine-Dalgarno (aSD). Ponieważ interakcja SD-aSD jest wymagana do inicjacji translacji w kanonicznych miejscach wiązania rybosomów, zaproponowano, że rozszczepienie 16S rRNA powoduje powstanie wyspecjalizowanej maszyny do syntezy białek, określonej jako „rybosom stresowy”, która selektywnie tłumaczy lmRNA generowane przez MazF (**Ryc. 1.48**). Ponieważ MazF jest wyzwalany w warunkach stresowych, tworzyłoby to nowy, dotychczas niescharakteryzowany mechanizm adaptacji do stresu u *E. coli*, który opiera się na generowaniu heterogenicznej populacji rybosomów, która umożliwia selektywną syntezę podzbioru białek.



Rycina 1.49. Model naprawy rybosomów stresowych poprzez działanie ligazy RtcB u *E. coli* (Temmel i in., 2017) - zmodyfikowane

Co ciekawe, wykryto nawet mechanizm odwracania heterogenności rybosomów stresowych poprzez działanie ligazy RtcB (Temmel i in., 2017). RtcB ratuje subpopulację heterogenicznych rybosomów przez ponowną ligację 16S rRNA, przywracając w ten sposób ich biegłość w translacji kanonicznych mRNA (**Ryc. 1.49**). Co ciekawe, wykryto, że transkrypcja *rtcB* jest zwiększona 4- lub 5-krotnie po indukcji *mazF*, transkrypt *rtcB* jest modulowany przez MazF i że tak powstałe lmrna ulega selektywnej translacji przez rybosomy stresowe, na co wskazuje obecność tego lmrna we frakcji polisomów (Temmel i in., 2017). Ten mechanizm sprzężenia zwrotnego umożliwia ściśle kontrolowaną syntezę enzymu RtcB w warunkach stresowych i w ten sposób zapewnia jego obecność podczas regeneracji po stresie, gdy ligaza jest wymagana do naprawy rybosomu. Zaobserwowano, że RtcB przyłączał odcięty wcześniej przez MazF 43-nukleotydowy fragment 16S rRNA *in vitro*, wykryto również wzrost stężenia tego fragmentu w komórkach z delecją *rtcB* (Temmel i in., 2017). Na koniec zbadano, że naprawione rybosomy są zdolne do translacji kanonicznych mRNA *in vivo*. Tym samym, działanie ligazy RtcB odpowiadało na pytanie o losy heterogenicznych rybosomów podczas regeneracji po stresie. Można sobie wyobrazić, że kiedy kanoniczne mRNA są ponownie transkrybowane, rybosomy stresowe stają się obciążeniem dla komórek i oczekuje się, że zostaną w taki, czy inny sposób odrzucone. Biorąc pod uwagę, że usunięcie zmodyfikowanych przez MazF rybosomów wymagałoby energochłonnej syntezy nowych makrocząsteczek, ich naprawa dzięki RtcB wydaje się być uzasadniona. Na podstawie obserwacji, iż odcięty 43-nukleotydowy fragment 16S rRNA pozostaje związany z podjednostką 30S podczas stresu, zaproponowano, że ligacja zachodzi najprawdopodobniej podczas procesu inicjacji translacji na kanonicznych mRNA transkrybowanych ponownie podczas fazy regeneracji po stresie (Temmel i in., 2017). W ten sposób interakcja SD-aSD mogłaby przyczyniać się do regulacji naprawy rybosomów na dwóch poziomach: po pierwsze, interakcja może zapewnić prawidłowy czas naprawy rybosomów, mianowicie dopiero po tym jak kanoniczne mRNA są ponownie syntetyzowane; po drugie, 43-nukleotydowy fragment 16S rRNA byłby prawidłowo umieszczony na rybosomie poprzez interakcję z sekwencją SD kanonicznego mRNA, aby ułatwić ponowną ligację przez RtcB.

Odkrycie istnienia wyspecjalizowanych rybosomów u *E. coli* było wykorzystywane w dalszych badaniach. Podjęto próby zidentyfikowania transkryptów, które ulegają

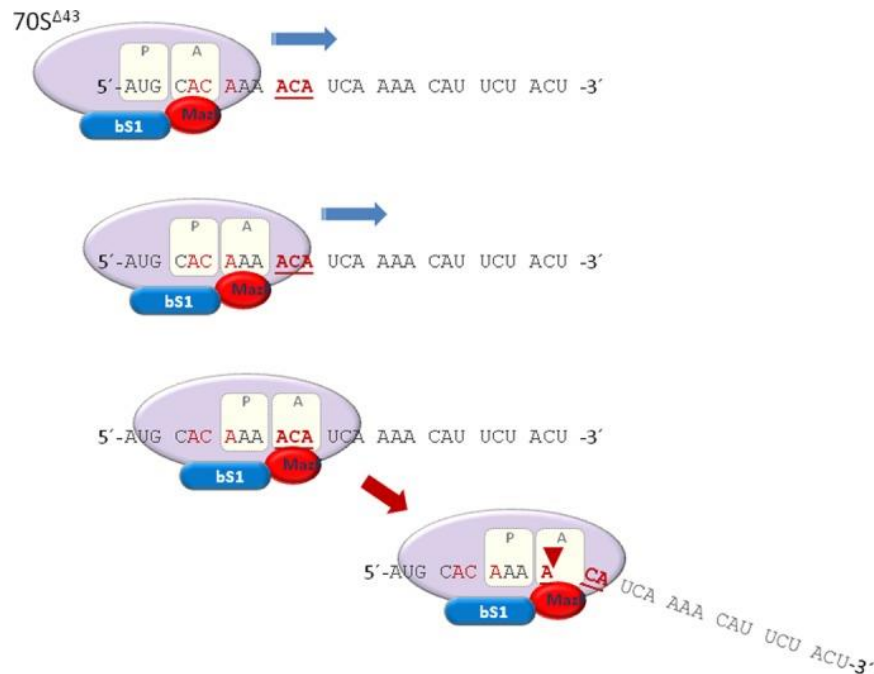
selektywnej translacji po nadekspresji *mazF* i określono je jako „regulon MazF” (Sauert i in., 2016). Zaobserwowano, że prawie połowa mRNA, których translacja jest zmniejszona po nadekspresji *mazF*, jest funkcjonalnie zaangażowana w ogólny metabolizm i dostarczanie energii, co jest zgodne z obserwacjami, że aktywacja toksyny MazF prowadzi do obniżenia metabolizmu komórkowego. Natomiast duża część mRNA, które wykazują zwiększone poziomy w polisomach po nadekspresji *mazF*, jest zaangażowana w strukturę komórkową. Odkrycia te były dość zaskakujące, ponieważ pokazały, że selektywna translacja dotyczy białek biorących udział we wszystkich procesach komórkowych i nie przyczynia się szczególnie do ogólnej odpowiedzi na stres. Ponadto, doniesiono, że rybosomy aktywne translacyjnie po indukcji toksyny MazF, to przede wszystkim rybosomy stresowe (90%), pozbawione 43-nukleotydowego fragmentu 16S rRNA, a także potwierdzono, że selektywna translacja nie dotyczy jedynie l-mRNA, ale również mRNA o skróconych przez MazF fragmentach 5' UTR, które zachowały sekwencję SD (Sauert i in., 2016).

Następnie zaktualizowano mechanizm powstawania l-mRNA poprzez działanie MazF (Oron-Gottesman i in., 2016). Zaobserwowano iż, MazF tnie mRNA w charakterystycznych sekwencjach ACA, jedynie jeśli znajdują się one w otwartej ramce odczytu (**Ryc. 1.50**). W zaproponowanym modelu MazF przyłącza się do rybosomalnego białka S1, ponieważ posiada ono sekwencję NNW, która stanowi część sekwencji NNWNN w EDF (ang. *extracellular death factor*, pl. zewnątrzkomórkowy czynnik śmierci). EDF to peptyd sygnałowy wymagany do aktywacji MazF, który bezpośrednio wypiera MazE z kompleksu z MazF (Belitsky i in., 2011; Kolodkin-Gal i in., 2007). Tym samym, poprzez związanie z białkiem S1, MazF staje się częścią rybosomu stresowego (Oron-Gottesman i in., 2016).

Autorzy modelu podkreślili, że zależne od otwartej ramki odczytu rozszczepiania sekwencji ACA przez MazF jest unikalne tylko dla toksyny związanej z rybosomem stresowym (Oron-Gottesman i in., 2016). MazF miało rozszczepiać cząsteczkę RNA w miejscu ACA bez wymogu otwartej ramki odczytu w przypadku:

- mRNA ulegającego translacji przez kanoniczne rybosomy, dzięki którym MazF działa jako interferaza RNA;
- usuwania 43 nukleotydów z 3' 16S rRNA, gdy znajduje się w rybosomie, wytwarzając w ten sposób rybosomy stresowe;

- cięcia miejsc ACA zlokalizowanych powyżej kodonów inicjacyjnych AUG, wytwarzając w ten sposób lmrRNA lub mRNA ze skróconymi fragmentami liderowymi.



Rycina 1.50. Schemat zależnego od otwartej ramki odczytu rozszczepiania mRNA przez MazF w rybosomie stresowym (Oron-Gottesman i in., 2016). Kiedy rybosom osiągnie ACA poza ramką (zaznaczone na czerwono), translacja nie jest przerywana, jednak kiedy dociera do ACA w ramce (zaznaczone pogrubioną i podkreśloną czerwioną czcionką), MazF rozszczepia mRNA i zapobiega translacji.

Ponieważ kodon ACA koduje treoninę, rybosom stresowy związany z MazF uniemożliwiałby tworzenie polipeptydów posiadających tę sekwencję w swoim transkrypcie. W istocie, zaobserwowano, że mRNA ulegające translacji w warunkach indukcji MazF, posiadają w swojej sekwencji kodującej alternatywne kodony dla treoniny, mianowicie ACC, ACU lub ACG (Nigam i in., 2020; Oron-Gottesman i in., 2016). Potwierdzono eksperymentalnie, że ekspresja białka GroEL, indukowana przez MazF w warunkach stresowych, była zmniejszona, gdy sekwencje ACA zostały sztucznie wprowadzone do otwartej ramki odczytu w genie *groEL* (Oron-Gottesman i in., 2016).

Jednak istnienie wyspecjalizowanych rybosomów u *E. coli* indukowane działaniem toksyny MazF, zostało zakwestionowane kilka lat później (Culviner & Laub, 2018). Używając innych technik niż w poprzednich badaniach, stwierdzono, że MazF rozszczepia większość transkryptów w wielu miejscach w ich regionach kodujących, tworząc bardzo niewiele

nienaruszonych lmrna pełnej długości. Wykorzystując profilowanie rybosomów, stwierdzono, że MazF całkowicie hamuje translację swoich celów, bez widocznej preferencyjnej translacji genów odpowiedzi na stres (Culviner & Laub, 2018). Ponadto stwierdzono, że MazF nie wytwarza znacznej puli wyspecjalizowanych rybosomów, w szczególności pozbawionych regionu aSD. Zauważono za to, że MazF rozszczepia kilka miejsc w prekursorach rRNA i w transkryptach wielu białek rybosomalnych. Stwierdzono, że indukcja MazF szybko i prawie całkowicie hamuje biogenezę rybosomów, bez znaczącego wpływu na pulę dojrzałych rybosomów (Culviner & Laub, 2018; Mets i in., 2017). Co istotne, zaproponowano, że powodem wysnucia błędnych wniosków z poprzednich badań były zastosowane techniki laboratoryjne, czyli testy wydłużania starterów czy ograniczenie analizy sekwencji RNA do końców 5' transkryptów, które odpowiednio ignorowały część zdarzeń molekularnych lub okazały się nie być metodami ilościowymi (Buskirk, 2018; Culviner & Laub, 2018).

Tymczasem kontynuując badania nad rybosomami stresowymi, określono, że przy tworzeniu lmrna lub mRNA ze skróconymi fragmentami liderowymi najbardziej optymalna odległość sekwencji ACA dla rozszczepiania MazF wynosi do 100 nukleotydów od kodonu AUG (Nigam i in., 2019c). Publikacja ta również spotkała się z krytyką nie w jednym, ale w dwóch niezależnych komentarzach (Kaldalu i in., 2019; Nigam i in., 2019b, 2019a; Wade & Laub, 2019). W jednym z nich zwrócono uwagę na brak analizy statystycznej, która po wykonaniu wskazywała na brak różnic pomiędzy badanymi grupami białek (Kaldalu i in., 2019; Nigam i in., 2019a). W tym samym roku opublikowano artykuł krytykujący model, według którego MazF rozszczepia sekwencję ACA jedynie w ramce odczytu, a także ogólnie selektywną translację indukowaną MazF i tworzenie stresowych rybosomów (Mets i in., 2019). W tym kontekście zastanawiające jest, że oddzielny artykuł naukowy mający wykazać, że MazF wiąże się z S1 poprzez sekwencję NNW i że mutacja W → A w tej sekwencji zapobiega wiązaniu MazF z S1, wspomniany w 2016 jako wysłany do publikacji (Oron-Gottesman i in., 2016), ostatecznie najprawdopodobniej nie został opublikowany.

Historia publikacji na temat indukowanego toksyną MazF tworzenia rybosomów stresowych i podzbioru mRNA, ulegającemu selektywnej translacji, jest bardzo interesującym przykładem tego, jak, wydawałoby się, dobrze ugruntowane doniesienia naukowe, stanowiące podstawę dla kolejnych, licznych badań, mogą zostać

zakwestionowane i podważone. Indukowane stresem tworzenie subpopulacji rybosomów i mRNA oraz ich selektywna translacja, a także stosunkowo prosty powrót do kanonicznej translacji po ustaniu stresu stanowiły idealny argument na poparcie hipotezy wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii.

4.3. Mikroheterogeniczność operonów rRNA jako potencjalne źródło wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii - przykłady

Liczba kopii operonów rRNA na genom bakteryjny waha się od 1 do nawet 15 (Klappenbach i in., 2000). Na przykład bakterie chorobotwórcze *Rickettsia prowazekii* i *Mycoplasma pneumoniae* mają jeden operon rRNA, podczas gdy bakterie jelitowe *E. coli* i *Salmonella enterica* serotyp *Typhimurium* mają po siedem kopii na genom. Największą znaną liczbę operonów rRNA na genom można znaleźć wśród bakterii tworzących spory, wyizolowanych z gleby: *Bacillus subtilis* i *Clostridium paradoxum* posiadają odpowiednio 10 i 15 kopii. Nasuwa się pytanie o powód istnienia tak wielu kopii operonów rRNA. Według jednej z hipotez, organizmy posiadające wiele operonów *rrn* są w stanie rosnąć szybciej niż te, które posiadają jeden lub dwa operony (Nanamiya i in., 2010). Usunięcie jednego operonu rRNA w *E. coli* lub *B. subtilis* nie wywołuje większego wpływu na tempo wzrostu lub fizjologię komórki, jednak zredukowanie ich liczby do pojedynczej kopii spowalnia wzrost *B. subtilis* średnio trzykrotnie (Nanamiya i in., 2010). Co więcej, w takich mutantach często dochodzi do mutacji supresorowych, które przywracają wzrost zbliżony do szczepu dzikiego poprzez duplikację jedyne go posiadanego operonu (Tanaka i in., 2013). Według innej hipotezy wiele prokariotów wyewoluowało kopie operonów rRNA, aby poradzić sobie z różnymi warunkami środowiskowymi, co sugeruje możliwość istnienia funkcjonalnego zróżnicowania między nimi. Mutanty *B. subtilis* posiadające tylko jedną kopię danego operonu są znacznie wrażliwsze na antybiotyki hamujące polimerazę RNA (Tanaka i in., 2013).

Większość operonów rRNA (*rrn*) w komórkach bakteryjnych składa się z trzech genów rRNA, które kodują 16S, 23S i 5S rRNA w tej kolejności (Nanamiya i in., 2010). Genom *E. coli* K-12 koduje siedem operonów rRNA (*rrnA* - *rrnE*, *rrnG* i *rrnH*) (Kurylo i in., 2018). Produkty genów kodowane przez te operony wyróżniają się zmiennością sekwencji w 23 pozycjach w 16S rRNA, 35 pozycjach w 23S rRNA i 4 pozycjach w 5S rRNA. Wykryto, że *rrnH* ulega względnej silniejszej ekspresji w odpowiedzi na ograniczenie składników odżywczych oraz,

że ekspresja czynnika RpoS, głównego regulatora ogólnej odpowiedzi na stres, wzrasta wówczas na skutek regulacji potranskrypcyjnej (Kurylo i in., 2018). Rybosomy zawierające 16S rRNA pochodzący z *rrnH* wpływały na ekspresję transkrypcyjną i translacyjną spójnych zestawów genów, w tym genów odpowiedzi na stres regulowanych przez czynnik RpoS. Oprócz tego zaobserwowano, że takie rybosomy wiążą białko nierybosomalne, dehydrogenazę aldehydowo-alkoholową (AdhE), a także RelE i RelA, białka odpowiedzi na stres, w pobliżu regionu różnic w sekwencji w domenie głowy małej podjednostki. W związku z tym zaproponowano, że AdhE, RelE i RelA funkcjonalnie oddziałują z aktywnymi translacyjnie rybosomami w sposób zależny od sekwencji rRNA, aby w różny sposób wpływać na poziom białka RpoS i ekspresję genów odpowiedzi na stres, a także tworzenie biofilmu i ruchliwość komórek. Ponadto wykryto, że rybosomy zawierające 16S z *rrnH* były bardziej odporne na antybiotyki z grupy tetracyklin (Kurylo i in., 2018). Tetracykliny blokują akomodację tRNA w miejscu A rybosomu podczas etapu wydłużania translacji przez wiązanie się z helisą 34 domeny głowy małej podjednostki. Ponieważ 16S z *rrnH* wyróżnia się dziesięcioma wariantami nukleotydów w domenie głowy, z których dziewięć skupia się w regionie helisy 33, odkrycie to sugeruje, że mogą one allosterycznie zmieniać wiązanie antybiotyku z h34. W istocie, potwierdzono, iż odporność na tetracyklinę wynika, przynajmniej częściowo, z fizycznych zmian w rybosomie, które są spowodowane przez różnice w sekwencji rRNA, ponieważ wejście aminoacylo-tRNA do rybosomów zawierających 16S z *rrnH* było stosunkowo odporne na tetracyklinę (Kurylo i in., 2018).

Streptomyces coelicolor to Gram-dodatnia bakteria, która zawiera w swoim genomie sześć operonów rRNA, ulegających zróżnicowanej ekspresji podczas cyklu życiowego (H. L. Kim i in., 2007, 2008). Zaobserwowano, że gdy komórki rozwijają się od kiełkowania do sporulacji, względna ilość cząsteczek rRNA dużej podjednostki pochodząca z trzech operonów *rrnA*, *rrnD* i *rrnE* stopniowo zmniejsza się z około 85% do około 60%, podczas gdy dystrybucja cząsteczek rRNA z dwóch innych operonów *rrnB* i *rrnF* oraz operonu *rrnC* stopniowo wzrasta od około 10% do około 20%. Tym samym w *S. coelicolor* istnieją subpopulacje rybosomów, których zawartość procentowa zmienia się w trakcie cyklu życiowego, jednak na ten moment nie zostało to powiązane z ich różnicami funkcjonalnymi.

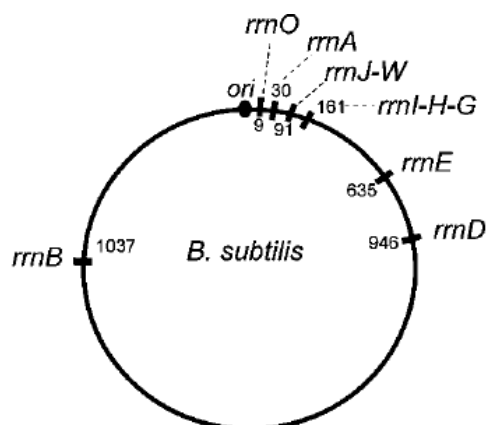
Innym przykładem heterogeniczności rRNA jest halofilowy archeon *Haloarcula marismortui*, który zawiera trzy operony *rrn*, oznaczone jako *rrnA*, *rrnB* i *rrnC* (López-López

i in., 2007). Operony A i C są praktycznie identyczne, podczas gdy operon B wykazuje dużą rozbieżność w sekwencji nukleotydów, posiadając do 135 polimorfizmów nukleotydów wśród wszystkich trzech genów rRNA. Wykazano, że obecność tej heterogeniczności może być adaptacją do zmiennych warunków środowiskowych w naturalnym środowisku. Potwierdzono, że stężenie soli nie wpływa na ekspresję operonów *rrn* w tym organizmie, za to czynnikiem różnicującym jest temperatura. *rrnB* wykazywał poziom ekspresji czterokrotnie wyższy w temperaturze 50°C i trzykrotnie niższy w temperaturze 15°C niż pozostałe oba operony łącznie (López-López i in., 2007). Ponadto przewidywana drugorzędowa struktura genów rRNA pochodzących z poszczególnych operonów wskazuje, że mają one odmienną stabilność w różnych temperaturach. Również doświadczalnie udowodniono, że zmutowany szczep pozbawiony operonu B rósł wolniej w wysokich temperaturach (López-López i in., 2007). Oprócz roli adaptacyjnej, poszczególnym operonom rRNA nie udało się przypisać żadnej specyficzności funkcjonalnej, ponieważ nie różnicują wyniku translacji.

Morska bakteria chorobotwórcza, *Vibrio vulnificus*, posiada 9 operonów *rrn*, z czego największą mikroheterogenicznością cechuje się *rrnI* (Leppek & Barna, 2019; Song i in., 2019). Co ciekawe, rRNA z *rrnI* stanowi około 10% wszystkich rRNA w komórkach typu dzikiego i jego stężenie nie zmienia się w warunkach stresowych. Zidentyfikowano geny, których ekspresja jest selektywnie regulowana przez rybosomy posiadające pełen zestaw trzech rRNA z operonu *rrnI* (I-rybosomy). Delecja tego operonu powodowała m.in. spadek stężenia domniemanego białka szoku cieplnego, HspA, o 80%, bez zmian na poziomie mRNA (Leppek & Barna, 2019; Song i in., 2019). Wykazano, że niski poziom białka HspA w szczepach $\Delta rrnI$ sprawia, że komórki te są bardziej podatne na szok termiczny. Inny zestaw genów zależnych od *rrnI* dotyczył białek biorących udział w metabolizmie węgla. W istocie, szczepy z delecją *rrnI* słabo rosły w pożywce minimalnej zawierającej glicerol. Podsumowując, rybosomy zawierające rRNA z *rrnI* wydają się preferować translację mRNA, które są ważne dla szybkiej odpowiedzi na zmiany temperatury lub dostępności składników odżywczych, aby przetrwać. Ponadto po wstrzyknięciu bakterii *V. vulnificus* pozbawionych I-rybosomów do organizmów myszy, wykryto wyższą przeżywalność ssaków, co sugeruje, iż I-rybosomy są również związane z wirulencją (Leppek & Barna, 2019; Song i in., 2019). Nie jest znany mechanizm rozpoznawania docelowych mRNA przez I-rybosomy, choć

badania wykazały, że nie jest on zależny od sekwencji SD. Co ciekawe, operon *rrnI* różni się jedynie 2–3 nukleotydami w każdym z genów na 16S i 23S rRNA (Leppek & Barna, 2019; Song i in., 2019).

Genom *B. subtilis* zawiera dziesięć operonów rRNA (*rrnO*, *A*, *J*, *W*, *I*, *H*, *G*, *E*, *D* oraz *B*), przy czym *rrnJ–rrnW* i *rrnI–rrnH–rrnG* są zebrane w klastry (Nanamiya i in., 2010). Operony *rrnO* i *rrnA* są zlokalizowane w pobliżu miejsca startu replikacji (odpowiednio około 9 kb i 30 kb od miejsca startu), podczas gdy operony *rrnD* i *rrnB* znajdują się w odległości około 950 kb i 1000 kb (**Ryc. 1.51**). Dwa promotory konsensusowe (P1 i P2) zależne od głównego czynnika transkrypcyjnego σA zostały znalezione w regionach regulatorowych wszystkich operonów rRNA, z wyjątkiem *rrnE*, który posiada trzy promotory (P1, P2 i P3) (Nanamiya & Kawamuray, 2010).



Rycina 1.51. Lokalizacja operonów *rrn* w genomie *B. subtilis* (Nanamiya i in., 2010). Liczby przy każdym operonie *rrn* wskazują odległość w kbp od miejsca początku replikacji.

Mikroheterogeniczność identyfikowano w dziewięciu miejscach w genach 16S rRNA, ośmiu w 23S oraz ośmiu w 5S (**Ryc. 1.52**) (Nanamiya i in., 2010). Warto zauważyć, że największą heterogenicznością charakteryzuje się gen 5S w operonie *rrnD*.

16S rRNA

	70	75	231	271	285	465	475	561	656											
<i>rmO</i>	---	G	---	A	---	A	---	C	---	G	---	G	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmA</i>	---	G	---	G	---	A	---	C	---	G	---	A	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmJ</i>	---	G	---	A	---	G	---	U	---	A	---	G	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmW</i>	---	G	---	A	---	A	---	C	---	A	---	A	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmI</i>	---	G	---	A	---	A	---	U	---	A	---	A	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmH</i>	---	G	---	A	---	A	---	C	---	A	---	A	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmG</i>	---	G	---	A	---	A	---	C	---	A	---	A	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmE</i>	---	A	---	A	---	A	---	U	---	A	---	A	---	U	---	G	---	A	---	A
<i>rmD</i>	---	G	---	A	---	A	---	C	---	A	---	A	---	U	---	G	---	G	---	G
<i>rmB</i>	---	G	---	G	---	A	---	C	---	A	---	A	---	C	---	U	---	G	---	G

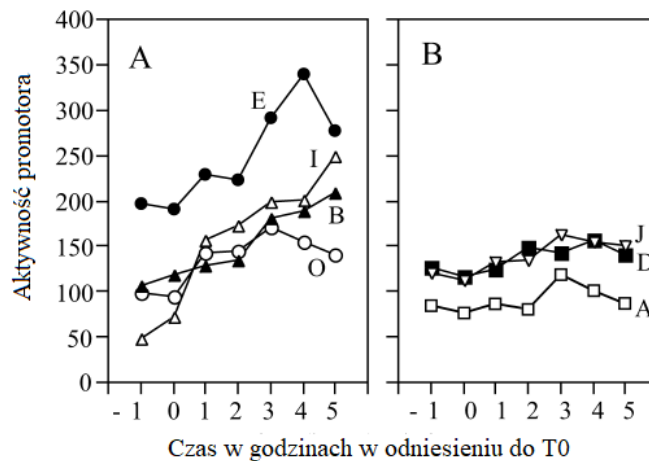
23S rRNA

	267	327	640	2180	2563	2883	2918	2927								
<i>rmO</i>	---	C	---	G	---	U	---	C	---	G	---	G	---	A	---	U
<i>rmA</i>	---	U	---	G	---	C	---	C	---	A	---	G	---	A	---	C
<i>rmJ</i>	---	U	---	G	---	C	---	C	---	G	---	G	---	A	---	U
<i>rmW</i>	---	C	---	G	---	C	---	U	---	G	---	G	---	A	---	U
<i>rmI</i>	---	U	---	G	---	U	---	C	---	G	---	G	---	A	---	U
<i>rmH</i>	---	U	---	G	---	U	---	C	---	G	---	G	---	A	---	U
<i>rmG</i>	---	U	---	G	---	U	---	C	---	G	---	G	---	A	---	U
<i>rmE</i>	---	U	---	G	---	C	---	C	---	G	---	G	---	A	---	U
<i>rmD</i>	---	U	---	A	---	C	---	C	---	G	---	G	---	G	---	U
<i>rmB</i>	---	C	---	A	---	C	---	C	---	G	---	A	---	A	---	U

5S rRNA

	2	8	13	39	107	114						
<i>rmO</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmA</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmJ</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmW</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmI</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmH</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmG</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmE</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A
<i>rmD</i>	---	C	---	AU	---	G	---	G	---	AU	---	G
<i>rmB</i>	---	U	---	GC	---	A	---	A	---	GC	---	A

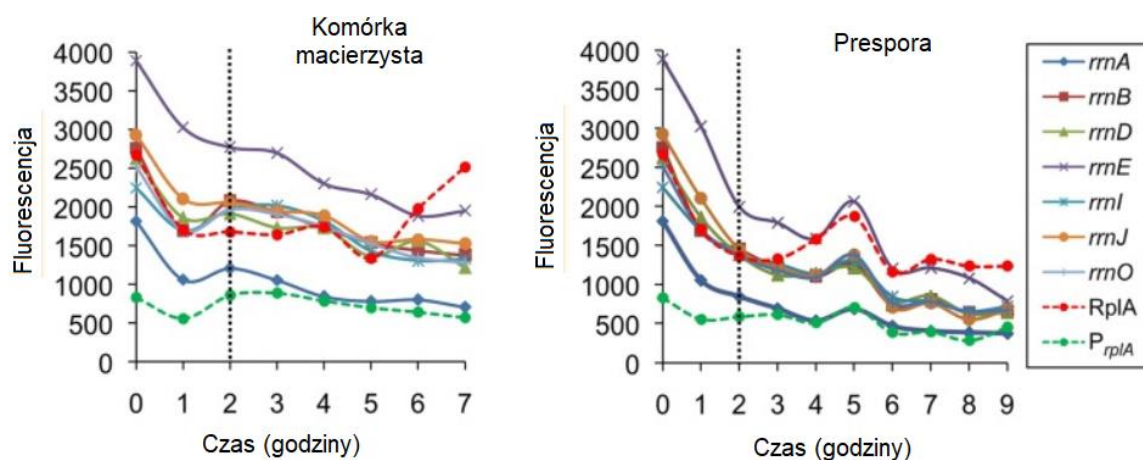
Rycina 1.52. Heterogeniczność sekwencji 16S, 23S i 5S rRNA między różnymi operonami *rrn* w *B. subtilis* (Nanamiya i in., 2010). Liczby pokazane powyżej dopasowań to pozycje w sekwencji rRNA, w których stwierdzono różnice.



Rycina 1.53. Ekspresja poszczególnych operonów *rrn* podczas sporulacji (Koga i in., 2006) - zmodyfikowane. A – operony *rrn*, których ekspresja wzrasta podczas sporulacji; B – operony *rrn*, których ekspresja nie zmienia się podczas sporulacji.

Co ciekawe, zaobserwowano, że u *B. subtilis* transkrypcja operonów *rrnO*, *rrnE*, *rrnB* i *rrnI* jest wzmocniona podczas wczesnej fazy sporulacji, w przeciwieństwie do operonów *rrnA*, *rrnJ* i *rrnD*, które były konstytutywnie transkrybowane z niewielkimi różnicami między fazami wegetatywną i sporulacji (Ryc. 1.53) (Koga i in., 2006). Operon *rrnE* był najbardziej aktywnie transkrybowany zarówno w fazie wegetatywnej, jak i sporulacji, podczas gdy najniższa transkrypcja została zaobserwowana dla operonu *rrnI* podczas wzrostu wegetatywnego, ale znacznie zwiększała się na początku sporulacji i dalej w trakcie trwania

procesu, stając się drugim po *rrnE* najsilniej transkrybowanym operonem. Sugeruje to, iż każdy operon *rrn* jest różnie regulowany na poziomie transkrypcji w trakcie sporulacji.



Rycina 1.54. Ekspresja poszczególnych operonów w komórce macierzystej i presporze (Rosenberg i in., 2012) - zmodyfikowane. RplA – białko rybosomalne L1

Jednakże późniejsze badania, które oddzielnie badały ekspresję *rrn* w komórce macierzystej i w presporze pokazały, że ekspresja poszczególnych operonów przechodzi podobne zmiany, ponieważ po jednej godzinie po indukcji sporulacji transkrypcja wszystkich operonów *rrn* była znacząco obniżona (**Ryc. 1.54**) (Rosenberg i in., 2012). Jednak w badaniu tym zaobserwowano inną ciekawą zależność, mianowicie zaraz po utworzeniu asymetrycznej septy, w komórce macierzystej wykryto wzrost aktywności wszystkich *rrn*, przypadający na dwie godziny po indukcji sporulacji, po którym nastąpił stały spadek. W przeciwieństwie do tego, ostry wzrost aktywności *rrn* wykryto w sporze dopiero pięć godzin po indukcji sporulacji (Rosenberg i in., 2012). Co więcej, zwiększona ekspresja obserwowana w presporze pięć godzin po indukcji sporulacji nie ograniczała się do kompleksu rybosomalnego, ale przejawiała się również w stosunku do dodatkowych składników translacyjnych. Ta skoordynowana ekspresja wydaje się być regulowanym procesem mającym na celu wyposażenie spory w wystarczającą zdolność translacyjną do zakończenia jego dojrzewania oraz przyszłego kiełkowania. Zaproponowano, że za zwiększoną ekspresję w presporze odpowiada czynnik transkrypcyjny σG (Rosenberg i in., 2012).

W tym samym badaniu operony *rrn* podzielono na trzy grupy w zależności od siły ekspresji: wysokie - *rrnE*, średnie - *rrnB*, *rrnD*, *rrnI*, *rrnJ*, *rrnO* i niskie - *rrnA* (Rosenberg i in., 2012). Najsilniejsza ekspresja *rrnE* jest prawdopodobnie spowodowane obecnością w tym

operonie aż trzech promotorów w porównaniu do dwóch promotorów charakterystycznych dla pozostałych operonów.

Niektóre laboratoryjne szczepy *B. subtilis* zawierają tylko dziewięć operonów *rrn* z powodu spontanicznych delecji w obrębie *rrnW*, *rrnH* lub *rrnG* (Nanamiya i in., 2010). Sugeruje to, że te operony są zbędne dla wzrostu *B. subtilis* w obecności innych *rrn*.

W celu zbadania funkcji poszczególnych operonów rRNA, skonstruowano siedem zmutowanych szczepów, z których każdy zawierał pojedynczy operon *rrn* (*rrnA*, *rrnB*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnI*, *rrnJ* lub *rrnO*) w swoim genomie (Nanamiya i in., 2010). Wszystkie mutanty rosły wolniej niż szczep typu dzikiego, jednak co ciekawe, czasy podwojenia zmutowanych szczepów były różne i wynosiły od 57 minut do 80 minut w zależności od zachowanego operonu, w porównaniu do 23 minut dla szczepu dzikiego (Nanamiya i in., 2010). Powiązано to z faktem, iż każdy ze zmutowanych szczepów zawierał niższy poziom rybosomów 70S niż ten występujący w komórkach typu dzikiego. Zawartość rybosomów stanowiła zaledwie 20–35% zawartości tych makromolekuł w szczepie dzikim i również zależała od posiadanego operonu. Zaproponowano, że może być to przynajmniej częściowo zależne od lokalizacji operonu w genomie, ponieważ lokalizacja operonu wiąże się z ilością jego kopii podczas wykładniczej fazy wzrostu. Wiele widełek replikacyjnych znajduje się w chromosomalnym DNA w komórkach rosnących logarytmicznie, a zatem liczba kopii *rrnO* i *rrnA*, z których oba znajdują się w pobliżu początku replikacji, jest stosunkowo wyższa niż liczba kopii *rrnB* i *rrnD*, które są oddalone od miejsca początku replikacji (**Ryc. 1.51**) (Nanamiya & Kawamura, 2010). W istocie, wraz ze wzrostem odległości między początkiem replikacji DNA a lokalizacją operonu rRNA w genomie, zmniejszył się poziom rybosomów 70S (Nanamiya i in., 2010).

Co ciekawe, oprócz różnicy we wzroście mutantów o pojedynczych operonach *rrn*, zaobserwowano u nich również znaczny spadek wydajności sporulacji, który również był zróżnicowany w zależności od posiadanego operonu. Obecność operonu *rrnE* skutkowała największą liczbą spor, jednak liczba ta była i tak o dwa rzędy wielkości niższa niż uzyskana dla szczepu typu dzikiego (Nanamiya i in., 2010). Ilości spor otrzymanych z mutantów posiadających *rrnI* lub *rrnB* były odpowiednio o pięć i sześć rzędów wielkości niższe niż uzyskane dla typu dzikiego, zaś liczba spor wytwarzanych przez szczep wyposażony w *rrnD* była poniżej granicy wykrywalności. Zmutowane komórki, z wyjątkiem komórek

posiadających *rrnE*, nie były zdolne do tworzenia spor, ponieważ zostały zablokowane we wczesnym stadium sporulacji i nie tworzyły asymetrycznej przegrody. Ponadto wszystkie zmutowane szczepy były w stanie rozwinąć kompetencję, chociaż z opóźnieniem i niższą częstotliwością niż szczep typu dzikiego (Nanamiya i in., 2010). Co ciekawe, zaobserwowano również, że ekspresja *spo0A* z promotora *Ps*, który jest rozpoznawany przez czynnik σ^H , była prawie nie wykrywalna w szczepie posiadającym *rrnO* (Nanamiya i in., 2010)

4.4. Białka rybosomalne jako potencjalne źródło wyspecjalizowanych rybosomów u bakterii

U *Mycobacterium smegmatis* zbadano alternatywne rybosomy zawierające paralog białka S18, który w przeciwieństwie do swojego kanonicznego odpowiednika, nie zawiera motywów bogatych w cysteinę (C-), służących do wiązania jonów Zn^{2+} (Y. X. Chen i in., 2020). Zaobserwowano, że kanoniczne rybosomy są mniej kompetentne w tworzeniu polisomów w warunkach niedoboru cynku. Wykryto również względny defekt w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego przez alternatywne rybosomy. Co ciekawe, zauważono, że najsilniejsza selektywność translacji dotyczy dwóch genów związanych z homeostazą żelaza, przy czym ich transkrypty były wzbogacone w alternatywnych rybosomach (Y. X. Chen i in., 2020). Obserwacja to skłoniła badaczy do przyjrzenia się roli alternatywnych rybosomów w warunkach niedoboru żelaza. W istocie, mutant pozbawiony operonu kodującego paralog białka S18 wykazywał poważny defekt wzrostu, kiedy był hodowany w pożywce zawierającej chelator metali (Y. X. Chen i in., 2020). Co ciekawe, suplementacja cynkiem doprowadziła tylko do częściowej poprawy, ale defekt wzrostu można było w pełni uzupełnić jedynie poprzez dostarczenie usuniętego operonu lub żelaza.

Ekstremalnie wysoką specjalizację rybosomów zauważono u *Flavobacterium johnsoniae*. W tym organizmie rybosomy pozbawione białka rybosomalnego S21, kodowanego przez gen *rpsU*, precyzyjnie zwiększają biosyntezę tego konkretnego białka z odpowiedniego transkryptu, co tworzy obwód autoregulacji, umożliwiający S21 nadzorowanie własnej produkcji (McNutt i in., 2023). Co ciekawe, rybosomy *Bacteroidia* nie rozpoznają sekwencji Shine-Dalgarno (SD), mimo że zawierają anty-SD (aSD) na 16S rRNA (Jha i in., 2021). Hamowanie parowania SD-aSD jest spowodowane sekwestracją ogona 3' 16S rRNA w kieszeni utworzonej przez S21, S18 i S6 w obrębie platformy 30S. W

związku z tym, brak białka S21 stymuluje inicjację translacji cząsteczek mRNA zawierających sekwencję SD (McNutt i in., 2023). Co ciekawe, u wielu Flavobacteriales gen kodujący S21, *rpsU*, jako jedyny, zawiera właśnie pełną sekwencję SD. Zatem selektywność translacji przez rybosomy pozbawione S21, wydaje się być ograniczona wyłącznie do autoregulacji genu *rpsU*.

Białko S21 jest źródłem heterogeniczności i specjalizacji rybosomów również u *Francisella tularensis*, Gram-ujemnej bakterii będącej fakultatywnym, wewnątrzkomórkowym patogenem człowieka (Trautmann & Ramsey, 2022). Pomimo stosunkowo małego genomu (<2 Mbp), zawiera on trzy paralogi białka rybosomalnego, S21. Jest to jedyne źródło heterogeniczności rybosomów u tego organizmu, ponieważ, pomimo iż operon rRNA występuje w trzech kopiach, wszystkie są identyczne pod względem sekwencji. Wykazano, że rybosomy w *F. tularensis* są heterogeniczne pod względem zawartości S21 i mogą włączać dowolny z trzech paralogów S21 do aktywnie translujących rybosomów, przy czym S21-2 występuje najobficiej spośród nich, a ekspresja S21-1 jest wyraźnie niższa od pozostałych paralogów (Trautmann & Ramsey, 2022). Zaobserwowano, że brak S21-2 spowodował znaczące zmiany w proteomie, niezwiązane ze zmianami w transkryptomie, m.in. zmniejszenie ekspresji białek związanych z wirulencją. Defekt ten są w stanie likwidować pozostałe paralogi, S21-3 całkowicie, zaś S21-1 częściowo, za co może odpowiadać niższa zawartość tego paralogu w komórce w stosunku do pozostałych. Co ciekawe, S21-1 jest z kolei w stanie przywrócić prawidłowe tempo wzrostu *F. tularensis*, czego nie jest w stanie zrobić S21-3. Za to utrata zdolności do przeżycia wewnątrz makrofagów człowieka była ściśle związana z brakiem S21-2 i żaden z pozostałych paralogów nie był w stanie jej przywrócić. Podsumowując, ponieważ S21 bierze udział w inicjacji translacji, zaproponowano model, w którym S21-2 wpływa na ekspresję genów poprzez modulowanie inicjacji translacji dla określonych mRNA, związanych z wirulencją i wzrostem wewnątrz komórki gospodarza (Trautmann & Ramsey, 2022).

U *E. coli* również wykazano heterogeniczność rybosomów spowodowaną składnikami białkowymi. W tej bakterii występują po dwa paralogi dla białek L31 i L36, odpowiednio L31A i L31B oraz L36A i L36B (Lilleorg i in., 2019; Makarova i in., 2001). Wykazano, że w fazie wykładniczej większość rybosomów zawiera białka L31A i L36A, podczas gdy w fazie stacjonarnej L31B i L36B są dominującymi paralogami. Ponadto w kolejnym badaniu

zaobserwowano, iż rybosomy z L31A nadawały przewagę wzrostu w niższych temperaturach i skuteczniej utrzymywały ramkę odczytu translacji niż rybosomy z L31B, co sprawia, że można je zaklasyfikować jako rybosomy wyspecjalizowane (Lilleorg i in., 2020).

U bakterii występują również przykłady posttranslacyjnej modyfikacji białek rybosomalnych. W *E. coli* porównawcza analiza proteomiczna wykazała, że sześć r-białek jest metylowanych (S11, L3, L11, L12, L16 i L33), trzy r-białek jest acetylowanych (S5, S18 i L12), a białko S12 jest metylotiolowane (Nesterchuk i in., 2011). Kilka białek rybosomalnych jest różnie acetylowanych lub fosforylowanych podczas wykładniczej lub stacjonarnej fazy wzrostu (Joo i in., 2022; B. J. Yu i in., 2008). W szczególności acetylacja L12 w *E. coli* zmienia się wraz ze wzrostem komórek i zmniejszaniem składników odżywczych, powodując zwiększenie stabilności regionu rybosomu, nazywanego łodygą, pod wpływem stresu (Gordiyenko i in., 2008). Jednak nie powiązано tych modyfikacji z funkcjonalną selektywnością rybosomów.

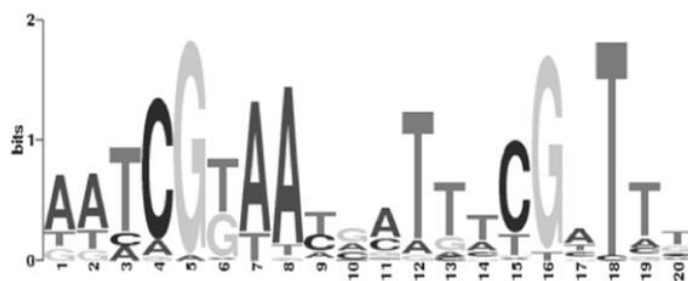
U *B. subtilis* większość genów kodujących białka rybosomalne znajduje się w dużym klastrze genów S10-spc- α , który grupuje 25 genów r-białek (Akanuma i in., 2012). Spośród 57 genów kodujących białka rybosomalne, z powodzeniem uzyskano indywidualne mutanty delecyjne 22 r-białek: L1, L9, L15, L11, L22, L23, L25.2, L28, L29, L31.1, L31.2, L32, L33.1, L33.2, L34, L35, L36, S1, S6, S14.2, S20 i S21, co wskazuje na to, że nie są to białka niezbędne dla wzrostu komórek *B. subtilis* (Akanuma i in., 2012). Zaskakujące jest to, że część z nich (L1, L15, L22, L23 i L29) jest zachowana we wszystkich trzech domenach życia, a mimo to okazały się nie być wymagane dla wzrostu *B. subtilis*. Wiele spośród pomysłnie wyeliminowanych genów kodowało mniejsze białka rybosomalne o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa (L28, L29, L31.1, L31.2, L32, L33.1, L33.2, L34, L35, L36, S20 i S21).

Genom szczepu 168 *B. subtilis* koduje pięć zduplikowanych par białek rybosomalnych (Barbe i in., 2009; Gabriel & Helmann, 2009). Zazwyczaj jedna postać zawiera fragment wiążący metal, którym jest cynk. W tym celu fragment ten zawiera cysteiny, w niektórych przypadkach histydyny, podczas gdy w drugiej postaci te reszty chelatujące metale są całkowicie lub częściowo zastąpione.

5. Wybrane paralogi białek rybosomalnych: RpmEB, RpsNB, RpmGC

5.1. Operon Zur

RpmEB (88 aa), RpmGC oraz RpsNB (89 aa) to paralogi białek rybosomalnych odpowiednio L31, L33 oraz S14 (J. H. Shin & Helmann, 2016). Zastępują one kanoniczne białka w warunkach niedoboru cynku (Akanuma i in., 2006). Ich operony są represjonowane przez Zur (ang. *zinc uptake regulator*, pl. regulator wychwytu cynku) (**Ryc. 1.55, 1.56**), reprezentujący dużą klasę bakteryjnych czynników transkrypcyjnych, których zdolność wiązania się do DNA jest regulowana przez odwracalne wiązanie jonów metali (J. W. Lee & Helmann, 2007; Panina i in., 2003).



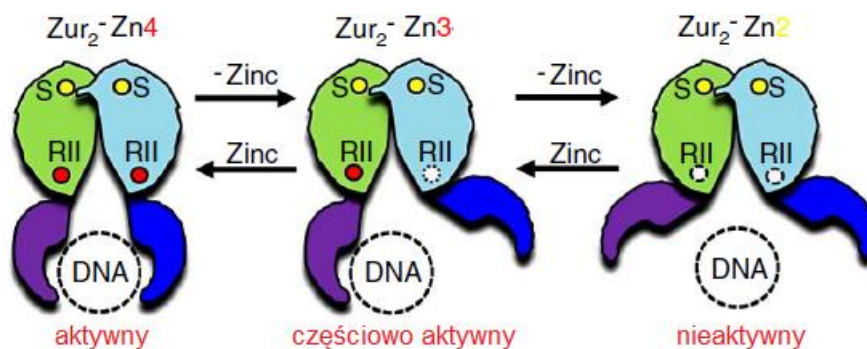
Rycina 1.55. Konsensusowa palindromowa sekwencja DNA wykrywana przez Zur (Prestel i in., 2015)

```
          **          **
AATCGTAATGATTTTCGATTT
adcA AATCGTTATCATTTCGATTT
foIEB AATCGTAATAATTACTATTT
yciC AATCGTAACAATTACGTTTT
rpsNB AATCGTAACAATTTTCGATTT
rpmEB AATCGTAATAATTACGTTTT
yrpE AATCGTAATGTTTTTCGATTT
rpmGC AAACGTAATCATTACGTTTT
```

Rycina 1.56. Dopasowanie konsensusowej sekwencji rozpoznawanej przez Zur z sekwencją promotorową wybranych genów represjonowanych przez Zur, w tym *rpsNB*, *rpmEB* i *rpmGC* (Prestel i in., 2015). Nukleotydy różniące się od sekwencji konsensusowej zaznaczono pogrubieniem. Gwiazdki oznaczają miejsca krytyczne dla wiązania Zur.

Zur występuje w postaci dimeru i wymaga strukturalnego jonu Zn^{2+} do fałdowania i dimeryzacji (Ma i in., 2011). Gdy poziomy cynku są wystarczające, Zn^{2+} jest dodatkowo związany z miejscem regulatorowym w obrębie każdego monomeru. Taka metaloproteina jest w pełni aktywnym represorem i oznacza się ją jako $Zur_2:Zn_4$. Zur ulega ekspresji na stosunkowo jednolitym poziomie w całym zakresie warunków wzrostu, a jego aktywność

jest regulowana przez odwracalne wiązanie jonów Zn^{2+} z regulacyjnym miejscem wiązania (J. H. Shin & Helmann, 2016). Gdy komórki przechodzą od wystarczającej ilości cynku do niedoboru, Zur przechodzi najpierw do niepełnego dimeru $Zur_2:Zn_3$, a na koniec do nieaktywnej formy spoczynkowej $Zur_2:Zn_2$, z Zn^{2+} związanym tylko w miejscach strukturalnych (**Ryc. 1.57**) (Ma i in., 2011).



Rycina 1.57. Schemat działania Zur w zależności od związanego cynku (J. H. Shin & Helmann, 2016) - zmodyfikowane

Operony pod kontrolą Zur ulegają derepresji w trzech różnych falach (J. H. Shin & Helmann, 2016). Pierwszy obejmuje RpmEB i RpmGC, które mobilizują cynk z rybosomu do cytoplazmy w celu jego redystrybucji oraz ZinT, który pobudza komórkę do importu Zn^{2+} . Drugi dotyczy transportera ZnuACB o wysokim powinowactwie do cynku i metalochaperonu YciC. Gdy poziom Zn^{2+} nadal spada dochodzi do derepresji RpsNB i FolE3, co umożliwia odpowiednio składanie rybosomów *de novo* i syntezę kwasu foliowego. Zastąpienie enzymów zależnych od jednego jonu alternatywnym enzymem zależnym od innego metalu lub kofaktora niemetalicznego jest szeroko konserwatywnym mechanizmem ułatwiającym adaptację do warunków wzrostu w środowisku z ograniczonym dostępem do wymaganego metalu (J. H. Shin & Helmann, 2016). Podsumowując, kolejność odpowiedzi adaptacyjnej na spadek poziomu cynku u *B. subtilis* to mobilizacja z białek rybosomalnych, wzmożone pobieranie cynku z otoczenia (ZnuABC) i wreszcie zastępowanie białek zależnych od cynku (np. RpmE, FolE) paralogami niewymagającymi tego pierwiastka (RpmEB, FolE3) (Chandrangsu i in., 2019).

Cynk, jako pierwiastek śladowy, jest niezbędnym kofaktorem dla około 4–10% wszystkich białek, zarówno do aktywności katalitycznej, jak również do strukturalnego fałdowania w interakcjach białko-białko i białko-DNA, ale jednocześnie jest toksyczny, jeśli występuje w nadmiarze (Chandrangsu i in., 2019; L. J. Lee i in., 2005; Natori i in., 2007). Pula

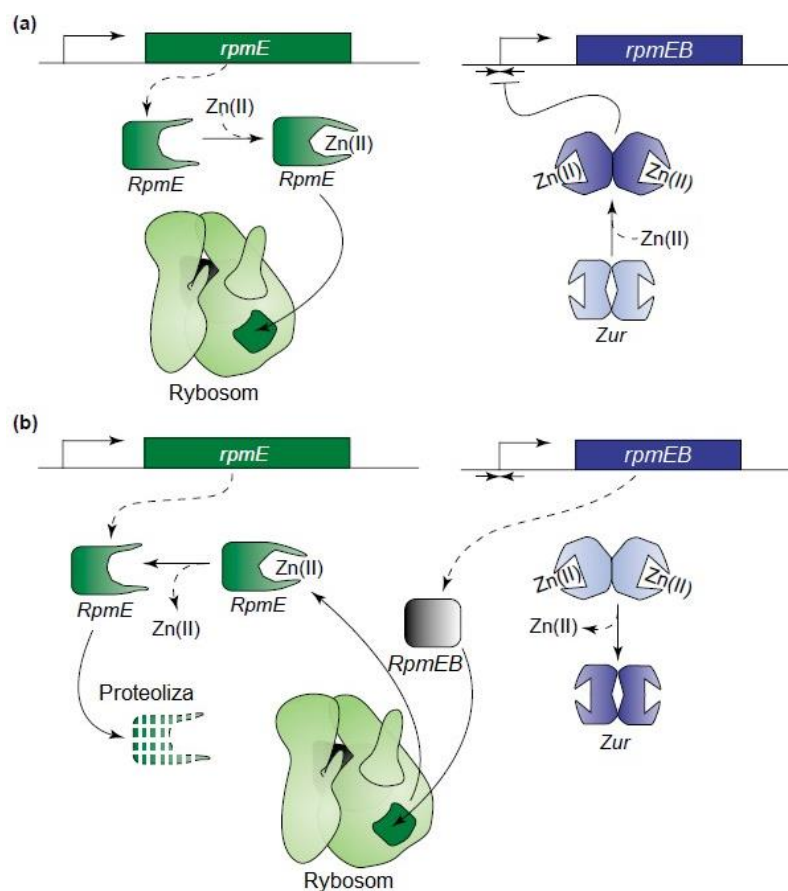
wewnątrzkomórkowego cynku musi być regulowana i dzieje się to m.in. poprzez sekwestrację. Określono, że *B. subtilis* zawiera średnio około 2,5 atomu cynku na rybosom i że prawdopodobnie jest to dolna granica, ponieważ luźno związane białka rybosomalne, takie jak L31, są łatwo tracone podczas oczyszczania (Gabriel & Helmann, 2009). W istocie, nowsze doniesienie zwiększyły tę liczbę do około 5,6 atomu cynku na rybosom, gdy komórki rosną w bogatej pożywce LB (Chandrangsu i in., 2019). Ponieważ rybosomy są najliczniejszym kompleksem makrocząsteczkowym ($2-6 \times 10^4$ na komórkę w zależności od tempa wzrostu), stanowią one znaczący rezerwuuar cynku (Gabriel & Helmann, 2009). Rzeczywiście, obliczono, że cynk związany z rybosomami (0,19 mM) stanowi około 20% całkowitego cynku komórkowego (0,88 mM) przy stężeniu rybosomów równym $2,5 \times 10^4$ na komórkę (Chandrangsu i in., 2019). W szczepach pozbawionych białek rybosomalnych wiążących Zn, czyli RpmE, RpmGA i RpmGB, całkowity cynk komórkowy i cynk związany z rybosomami zmniejsza się odpowiednio do 0,73 mM i 0,12 mM. Zgodnie z oczekiwaniami oszacowana zawartość Zn na rybosom w szczepach pozbawionych L31 i L33 zmniejsza się średnio o 2 atomy (Chandrangsu i in., 2019). Zatem mobilizacja cynku z rybosomu może potencjalnie redystrybuować około 5×10^4 atomów cynku na komórkę (w zależności od całkowitej zawartości rybosomu na komórkę na początku niedoboru cynku), co stanowi znaczną pulę Zn potrzebną do podtrzymania wzrostu. Mobilizacja tak zmagazynowanego cynku może zapewnić znaczną przewagę wzrostu w warunkach niedoboru Zn.

Rybosomalne białka wiążące cynk są zazwyczaj małymi polipeptydami o długości blisko 50 aminokwasów, które chelatują Zn^{2+} poprzez dwa motywy Cys – X – X – Cys, przy czym X to dowolny aminokwas, a cysteina może być zastąpiona niekiedy histydyną (J. H. Shin & Helmann, 2016). Zaproponowano, że duplikacja formy białka zawierającej motyw wiązania cynku (C+) wystąpiła przed rozejściem się głównych linii bakteryjnych (Nanamiya & Kawamuray, 2010). Następnie motyw wiązania cynku został utracony w jednym genie po duplikacji, dając formę C-, a następnie forma C+ została utracona w niektórych liniach. Zgadza się to z obserwacjami, że większość bakterii należących do typu Firmicutes zawiera tylko formę C- białka L31. Również duplikacje S14 znajdują się w genomach różnych bakterii Gram-dodatnich, podczas gdy w genomach niektórych proteobakterii, takich jak *E. coli* jest obecna tylko forma C- białka S14. Jeśli zaproponowana hipoteza o pochodzeniu form C- jest prawdziwa, mogłoby to oznaczać, że zarówno białko L31, jak i białko S14 w *B. subtilis* są w

trakcie ewolucji, aby całkowicie zastąpić potrzebę posiadania form C+ w genomie (Nanamiya & Kawamuray, 2010). Formy C- białek rybosomalnych zawierają dodatkowe fragmenty polipeptydowe, których nie ma w formach C+, na przykład RpsNB jest dłuższy o 28 reszt aminokwasowych względem RpsN, a białko S14 u *E. coli* o 40 aminokwasów. W istocie, potwierdzono, że sekwencja wydłużająca polipeptyd jest niezbędna dla funkcjonowania RpsNB, jako białka zastępczego wobec RpsN (Natori et al., 2007).

5.2. RpmEB jako paralog RpmE (L31)

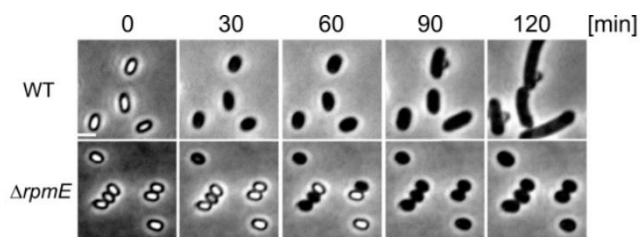
L31 znajduje się na powierzchni rybosomu, jest odstępiony i luźno z nim związany (Gabriel & Helmann, 2009). RpmE wykrywano w rybosomach w fazie wzrostu logarytmicznego i było ono zastępowane przez RpmEB w fazie stacjonarnej (Nanamiya i in., 2004). Dzięki temu, że RpmEB silniej wiąże się z rybosomem, RpmEB wypiera RpmE z dojrzałej makrocząsteczki (**Ryc. 1.58**) (Akanuma i in., 2006). RpmE jest niestabilny w warunkach niedoboru Zn^{2+} , dlatego postuluje się, że może ulegać proteolizie jednocześnie uwalniając związany cynk w celu jego redystrybucji (Nanamiya i in., 2004).



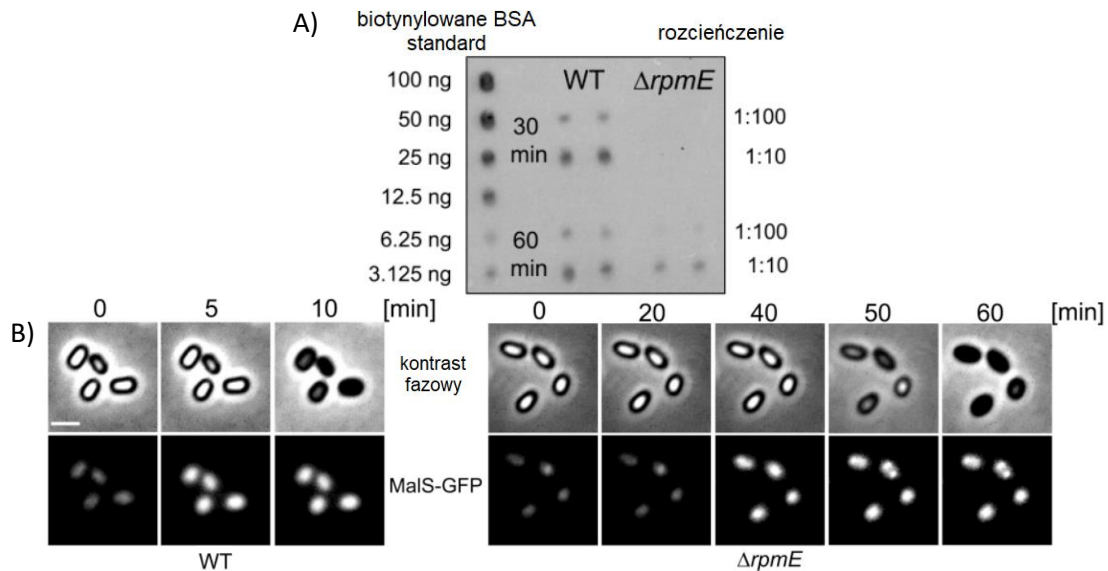
Rycina 1.58. Schemat regulacji genu *rpmEB* przez Zur w warunkach a) dostępu cynku, b) niedoboru cynku (Moore & Helmann, 2005) - zmodyfikowane

Gen *rpmEB* posiada trzy miejsca startu transkrypcji, dwa z nich są indukowane przez alternatywny czynnik transkrypcyjny σ_B , ale są to słabe promotory (Nanamiya i in., 2004). Trzeci jest transkrybowany przy udziale głównego czynnika transkrypcyjnego σ_A , przy czym to właśnie on jest tłumiony przez Zur w warunkach dostępu cynku.

Co ciekawe, delekcja *rpmEB* nie wykazała żadnego negatywnego wpływu na kompetencję lub sporulację (Nanamiya & Kawamuray, 2010), za to brak *rpmE* skutkuje znacząco opóźnioną germinacją spor (**Ryc. 1.59**) (Sinai i in., 2015). Jest to prawdopodobnie związane z wyraźnie opóźnioną translacją, którą w WT można wykryć już po 5 minutach od indukcji germinacji, zaś w mutancie $\Delta rpmE$ dopiero po 40 minutach (**Ryc. 1.60**).



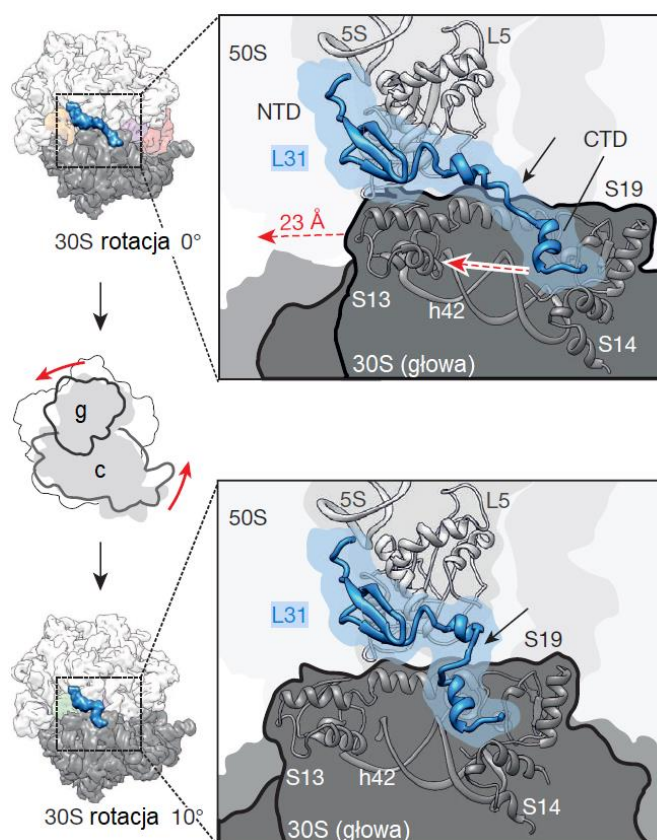
Rycina 1.59. Opóźnienie germinacji spor u mutantu $\Delta rpmE$ w porównaniu do szczepu dzikiego (WT) (Sinai i in., 2015). Spory są widoczne jako jasne obiekty, a rozwijające się z nich komórki wegetatywne jako czarne.



Rycina 1.60. Opóźnienie w rozpoczęciu translacji białek podczas germinacji spor mutantu $\Delta rpmE$ w porównaniu do spor szczepu dzikiego (WT) (Sinai i in., 2015) - zmodyfikowane. A) Analiza typu dot blot próbek białka wyekstrahowanych ze spor 30 i 60 minut po indukcji germinacji wykonana w dwóch powtórzeniach. Próbki rozcieńczono (1:100 i 1:10) i nakroplono na membranę, którą następnie sondowano przeciwciałami antybiotynowymi. Uzyskany sygnał porównano ze znanymi ilościami biotynylowanej albuminy surowicy bydłowej. B) Zdjęcia mikroskopii poklatkowej syntezy białka MaIS-GFP w czasie rzeczywistym podczas germinacji spor. Białko MaIS zostało wybrane jako reprezentatywne, ponieważ jest jednym z najwcześniej syntetyzowanych białek w germinujących sporach.

Interesujące jest doniesienie, że badanie obliczeniowe oparte o kinetyczny model ekspresji genów wykryło, iż transkrypcja *rpmEB* przy udziale alternatywnego czynnika transkrypcyjnego σB może występować podczas germinacji i wzrostu spor (Vohradsky i in., 2021), chociaż w badaniach eksperymentalnych nie zaobserwowano znaczących zmian w ekspresji RpmEB podczas germinacji i wzrostu spor (Swarge i in., 2020).

Gen *rpmE* znajduje się poza klastrem S10-*spc- α* , a więc ulega transkrypcji niezależnie od pozostałych białek rybosomalnych (Eymann i in., 2002) U niektórych organizmów cechujących się małym genomem L31 nie występuje (Galperin i in., 2021). Regulacja ekspresji RpmE zachodzi na drodze autorepresji (Eckert & Weinberg, 2020). Oznacza to, że przy nadmiarze białka RpmE, wiąże się ono do sekwencji liderowej mRNA własnego transkryptu, tym samym blokując jego translację. Ponadto, ekspresja RpmE jest negatywnie regulowana podczas odpowiedzi ścisłej (Eymann i in., 2002).



Rycina 1.61. Schemat zmiany konformacji RpmE podczas obrotu głowy 30S u *E. coli* (Fischer i in., 2015) - zmodyfikowane. 5S - 5S rRNA; h42 – 42-helisa 16S rRNA; NTD – N-końcowa domena L31; g – głowa podjednostki 30S; c – ciało podjednostki 30S.

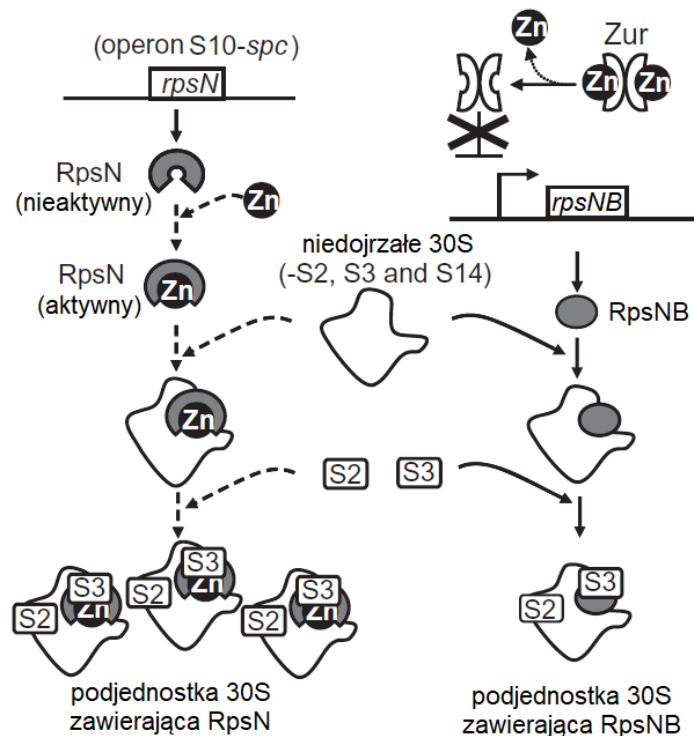
L31 prawdopodobnie jest częścią pomostu między małymi i dużymi podjednostkami i oddziałuje z 5S rRNA, 16S rRNA i białkami rybosomalnymi L5, S13, S14 i S19 (**Ryc. 1.61**)

(Eckert & Weinberg, 2020; Fischer i in., 2015; Q. Liu & Fredrick, 2016). Zdolność domeny głowy 30S do obracania się podczas etapu rozpoznawania kodonu przez kompleks aminoacylo-tRNA-EF-Tu-GTP jest dostosowywana poprzez zmiany w elastycznej strukturze L31 i jej interakcje międzycząsteczkowe.

5.3. RpsNB jako paralog RpsB (S14)

W przeciwieństwie do białek L31 i L33, S14 jest niezbędny i jest wymagany na wczesnym etapie biogenezy rybosomów (Gabriel & Helmann, 2009; J. H. Shin & Helmann, 2016). Zmutowane szczepy pozbawione *rpsNB* mogą nadal rosnąć przy poważnych ograniczeniach cynku, ale ich niezdolność do syntezy nowych rybosomów skutkuje wzrostem liniowym, a nie wykładniczym, zgodnie z przewidywaniem, że każda nowa komórka potomna dziedziczy tylko połowę rybosomów swojego rodzica. S14 jest wymagane do składania małej podjednostki rybosomu, jego brak upośledza włączanie białek S2 i S3 do podjednostki 30S i skutkuje wadliwymi podjednostkami 30S, które nie mogą skutecznie łączyć się z 50S (Natori i in., 2007). Ponadto S14 jest częścią środowiska peptydowego centrum transferazy peptydylowej, które bierze udział w istotnym procesie wydłużania peptydu w związku z czym jest też zaangażowane w odporność na antybiotyki (Brochier i in., 2000).

W przeciwieństwie do L31, RpsNB nie wypiera RpsN z dojrzałych rybosomów, ale stanowi składnik makrocząsteczki składanej *de novo* w warunkach niedoboru cynku (**Ryc. 1.62**) (Natori i in., 2007). Jest to związane z tym, że S14 jest zlokalizowane głęboko wewnątrz rybosomu (Gabriel & Helmann, 2009), więc wymiana białka w dojrzałej makrocząsteczce wymagałaby chwilowego odłączenia również innych polipeptydów. Tym samym RpsNB nie uwalnia bezpośrednio RpsN z rybosomów w celu redystrybucji cynku wewnątrz komórki (Nanamiya & Kawamuray, 2010). Na uwagę zasługuje jednak fakt, że doniesiono, iż S14 został zakwalifikowany do sporej grupy białek wymienialnych, co zbadano na rybosomach fazy stacjonarnej u *E. coli* (Cate, 2010; Pulk i in., 2010). Aktywność translacyjna rybosomów wyposażonych w RpsNB wydaje się porównywalna z rybosomami zawierającymi RpsN, jednak RpsNB jest mniej skutecznie inkorporowany do rybosomu niż białko kanoniczne (Natori et al., 2007).



Rycina 1.62. Schemat powstawania podjednostek rybosomów 30S zawierających RpsN oraz podjednostek 30S zawierających RpsNB (Natori i in., 2007) - zmodyfikowane. Przerywana linia oznacza szlak w przypadku obecności cynku w komórce. Podjednostek 30S wyposażonych w RpsN jest więcej niż tych posiadających RpsNB, ponieważ RpsNB jest inkorporowane do małej podjednostki tylko podczas jej syntezy *de novo*, ponadto RpsN ma wyższe powinowactwo do 30S niż RpsNB.

Transkrypt *rpsNB* jest bardzo stabilny, jego czas półtrwania w komórce *B. subtilis* wynosi ponad 15 minut (Hambraeus i in., 2003). Ekspresja RpsNB jest dodatkowo negatywnie regulowana przez białko YlxR, które należy do białek związanych ze strukturą chromatyny bakteryjnej (NAP, ang. *nucleoid-associated proteins*) (Dillon & Dorman, 2010; Ogura i in., 2020; Ogura & Kanesaki, 2018). NAP pełnią funkcję podobną do eukariotycznych histonów, wpływają na transkrypcję, rekombinację, kondensację, rearanżację i stabilność chromosomu. NAP mają zdolność wiązania DNA, która jest specyficzna lub niezależna od sekwencji, rozpoznają też lokalną strukturę DNA. YlxR jest indukowane obecnością glukozy i reguluje transkrypcję ponad 400 genów, w tym geny metaboliczne zaangażowane w syntezę 12 aminokwasów i 4 nukleotydów (Ogura & Kanesaki, 2018).

Gen na główne białko S14 u *B. subtilis*, czyli *rpsN*, znajduje się wewnątrz operonu S10-spc- α , który koduje większość białek rybososomalnych (Eymann i in., 2002). Co ciekawe, ekspresja RpsN jest negatywnie regulowana podczas odpowiedzi ścisłej (Eymann i in.,

2002), ale zwiększa się dwukrotnie po indukcji niską temperaturą (15°C) (Beckering i in., 2002).

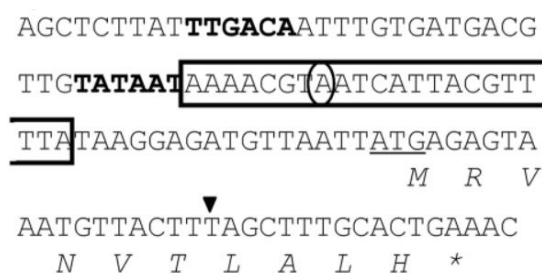
Co ciekawe, próby zastąpienia RpsN u *B. subtilis* przez egzogeny odpowiednik RpsNB pochodzący z *E. coli* (S14Ec) lub *Synechococcus elongatus* (S14Se) skutkowały wprowadzeniem chimerycznych rybosomów 70S, ale znacznie mniejszą wydajnością translacji oraz sporulacji, prawdopodobnie na skutek trudności w wiązaniu S2 i S3 do małej podjednostki (Akanuma i in., 2021). Zmiana strukturalna miejsc sąsiadujących z S14, spowodowana wprowadzeniem egzogenego, dłuższego S14, może również wpływać na aktywność elongacji translacji. Wydajność sporulacji w zmutowanych komórkach zmniejszyła się dwukrotnie, były one również poważnie upośledzone w tworzeniu spor odpornych na ciepło (Akanuma i in., 2021). Zaobserwowano defekt w stadium inicjacji sporulacji, ponieważ mutanty nie tworzyły asymetrycznej septy. Wykryto, że mutowane komórki cechowały się opóźnionym i niewystarczającym wzrostem stężenia Spo0A. Prawidłowy fenotyp został przywrócony poprzez delecję *spo0E* całkowicie u mutantu z S14Ec i częściowo u mutantu z S14Se (Akanuma i in., 2021).

5.4. RpmGC jako paralog RpmGA i RpmGB (L33)

Gen *rpmGC* jest pseudogenem, zawierającym mutację przesunięcia ramki odczytu (**Ryc. 1.63**). Naprawa tej mutacji powoduje tworzenie funkcjonalnego białka, które tłumi fenotyp słabszego wzrostu podwójnych mutantów $\Delta rpmGA\Delta rpmGB$, jednak nie zapewnia przewagi adaptacyjnej w warunkach niedoboru cynku, w przeciwieństwie do RpmEB i RpsNB (Gabriel & Helmann, 2009). Pojedyncze mutanty $\Delta rpmGA$ oraz $\Delta rpmGB$ nie wykazują słabszego wzrostu, prawdopodobnie z powodu zastąpienia funkcji brakującego białka przez drugą formę, szczególnie, że oba białka zawierają sekwencję wiążącą cynk (Nanamiya & Kawamuray, 2010).

Co ciekawe, zaobserwowano, że zmniejszona ekspresja białka RpmGB skutkowałą upośledzoną sporulacją, jednak wyłącznie kiedy była ona przeprowadzana w wysokiej temperaturze (47°C) (Ohashi i in., 2003). Ponadto ekspresja tego genu wzrastała na początku procesu sporulacji (1,5 godziny po indukcji sporulacji, przed utworzeniem asymetrycznej septy). Gen *rpmGB* znajduje się w operonie *sigH-rpmGB-secE* (Geissler et al.,

2023), a więc, tak jak czynnik transkrypcyjny σ^H , jest represjonowany przez AbrB podczas fazy wzrostu logarytmicznego.



Rycina 1.63. Region promotora *rpmGC* (Gabriel & Helmann, 2009). Regiony -35 i -10 są pogrubione, operator Zur jest przedstawiony w ramce, a miejsce startu transkrypcji jest zakreślone. Kodon inicjujący jest podkreślony, a miejsce mutacji przesunięcia ramki zaznaczono wypełnionym trójkątem. Transkrypt tworzy skrócony produkt, który kończy się cztery aminokwasy w dół od mutacji przesunięcia ramki odczytu.

Co ciekawe, zaobserwowano, że zmniejszona ekspresja białka RpmGB skutkowałą upośledzoną sporulacją, jednak wyłącznie kiedy była ona przeprowadzana w wysokiej temperaturze (47°C) (Ohashi i in., 2003). Ponadto ekspresja tego genu wzrastała na początku procesu sporulacji (1,5 godziny po indukcji sporulacji, przed utworzeniem asymetrycznej septy). Gen *rpmGB* znajduje się w operonie *sigH-rpmGB-secE* (Geissler et al., 2023), a więc, tak jak czynnik transkrypcyjny σ^H , jest represjonowany przez AbrB podczas fazy wzrostu logarytmicznego.

L33 należy do białek późno włączanych do podjednostki 50S (Jomaa i in., 2014) i znajduje się na powierzchni rybosomu (Chandrangu i in., 2019), dzięki czemu możliwa byłaby wymiana poszczególnych form tego białka na inne w dojrzałych już rybosomach. Co ciekawe, nie wykryto, aby ekspresja L33 była regulowana w odpowiedzi ścisłej, w przeciwieństwie do innych białek związanych z translacją (Eymann i in., 2002). U niektórych organizmów cechujących się małym genomem L33 nie występuje (Galperin i in., 2021).

II. Hipoteza i cel pracy

Hipoteza wyspecjalizowanych rybosomów, zakłada istnienie w komórce subpopulacji rybosomów różniących się strukturalnie i funkcjonalnie. Wpływając na wynik translacji, np. poprzez preferencyjne wiązanie się z konkretnym podzbiorem transkryptów, rybosom zyskuje dodatkową rolę, stając się aktywnym elementem w zarządzaniu przepływem informacji genetycznej, co dodaje nowy poziom w regulacji ekspresji genów. Dowodów potwierdzających istnienie wyspecjalizowanych rybosomów przybywa, jednak hipoteza ta wciąż pozostaje zagadnieniem kontrowersyjnym, głównie przez trudności w wykryciu ich specyficznej funkcjonalności.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie potrójnego delecyjnego mutantu $\Delta rpmEB\Delta rpmGC\Delta rpsNB$ *Bacillus subtilis* (określanego w niniejszej pracy jako szczep 3KO) w kontekście przeprowadzania przez niego procesu sporulacji, w celu przeanalizowania roli, jaką wyspecjalizowane rybosomy mogą odgrywać podczas tego procesu. *B. subtilis* został wybrany jako model badawczy ze względu na dobrze poznany genom oraz posiadaną zdolność do produkcji endospor, przy czym jest bakterią bezpieczną. Sam proces powstawania spor jest bardzo dobrze poznany, ściśle kontrolowany przez komórkę oraz stosunkowo łatwo i względnie synchronicznie indukowany w warunkach laboratoryjnych.

Cel główny zrealizowano poprzez cele szczegółowe:

1. Analiza różnic fenotypowych między szczepem 3KO a szczepem kontrolnym *B. subtilis* 168 (określanym w niniejszej pracy jako szczep WT), w tym:
 - a. Badanie krzywej wzrostu obu szczepów w pożywkach bogatych w składniki odżywcze (LB i CH) oraz ubogich (BMM);
 - b. Badanie wpływu wybranych związków chemicznych, w tym antybiotyków, detergentów i soli, na wzrost i rozwój szczepów;
 - c. Badanie zdolności szczepów do tworzenia biofilmu;
 - d. Badanie mobilności szczepów.
2. Porównanie przebiegu procesu sporulacji przeprowadzanych przez oba szczepy *B. subtilis*, na co składało się:
 - a. Przeprowadzenie i analiza sekwencjonowania transkryptomów (RNA-seq) i translatomów (RIBO-seq) obu szczepów, pobranych w

momencie indukcji sporulacji oraz co godzinę przez siedem godzin trwania procesu;

- b. Przeprowadzenie i analiza obserwacji mikroskopowych komórek obu szczepów, w momencie indukcji sporulacji oraz co godzinę przez siedem godzin trwania procesu, wyznakowanych barwnikiem SynaptoRed w celu monitorowania przebiegu procesu; DAPI w celu lokalizacji chromosomu bakteryjnego; GFP w celu lokalizacji rybosomów; OPP-Alexa w celu lokalizacji miejsc aktywnej translacji.

W trakcie pracy, na podstawie uzyskanych wyników, dodano dodatkowy cel, jakim było:

3. Porównanie przebiegu procesu germinacji przeprowadzanych przez oba szczepy *B. subtilis*, na co składało się:
 - a. Badanie wydajności germinacji spor wytworzonych przez szczepy 3KO i WT;
 - b. Badanie krzywej wzrostu germinujących spor wytworzonych przez oba szczepy;
 - c. Przeprowadzenie i analiza obserwacji mikroskopowych komórek obu szczepów, przed inkubacją w wysokiej temperaturze, w momencie indukcji germinacji oraz w wybranych punktach czasowych procesu (co 30 minut przez pierwsze dwie godziny trwania procesu germinacji oraz na trzy godziny po indukcji germinacji).

III. Materiały i metody

1. Materiał biologiczny

Do badań użyto trzy szczepy bakteryjne z gatunku *Bacillus subtilis*. Szczep dziki *B. subtilis* 168CA pochodzi z kolekcji doktora Henrik'a Strahl von Schulten z Centrum Biologii Komórek Bakteryjnych Uniwersytetu w Newcastle, Wielka Brytania. Stanowił kontrolę we wszystkich eksperymentach i w dalszej części rozprawy jest określany skrótem WT. Jego potrójny delecyjny mutant $\Delta rpmEB\Delta rpmGC\Delta rpsNB$, w którym wszystkie trzy geny zastąpiono kasetami odporności odpowiednio na kanamycynę, erytromycynę oraz chloramfenikol, w dalszej części rozprawy jest określany skrótem 3KO i pochodzi z kolekcji doktor habilitowanej Agaty Starosty z Pracowni Translatomiki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, Polska. Jako dodatkową kontrolę w eksperymencie na oznaczenie ilości tworzonego biofilmu (podrozdział III.6.3) użyto laboratoryjnego szczepu *B. subtilis* 168 z Bacillus Genetic Stock Center, USA. W dalszej części rozprawy jest on określany skrótem BGSC.

Do obserwacji mikroskopowych (podrozdziały III.6.7 oraz III.6.10) użyto mutantów szczepów WT i 3KO, w których gen *rpsB*, kodujący białko rybosomalne S2, jest w fuzji z sekwencją na zielone białko fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*), w celu wizualizacji lokalizacji rybosomów. W dalszej części rozprawy są one określane skrótem odpowiednio WT-GFP oraz 3KO-GFP. Pochodzą z kolekcji doktor habilitowanej Agaty Starosty z Pracowni Translatomiki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, Polska.

2. Odczynniki

2.1. Podłoża komercyjne

Agar odżywczy (podłoże komercyjne, kompletna pożywka stała, Sigma-Aldrich)

- proszek Lab-Lemco 0,1% (w/v)
- ekstrakt drożdżowy 0,2% (w/v)
- pepton 0,5% (w/v)
- NaCl 0,5% (w/v)
- agar 1,5% (w/v)

pH = 7,2 – 7,6

Agar z purpurą bromokrezolową, ang. purple agar (podłoże komercyjne, kompletna pożywka stała, Sigma-Aldrich)

- agar 1,5% (w/v)
- purpura bromowo-krezolowa 0,0015% (w/v)
- enzymatyczny hydrolizat kazeiny 1% (w/v)
- glukoza 1% (w/v)
- NaCl 0,5% (w/v)
- ekstrakt drożdżowy 0,15% (w/v)

pH = 7,0 – 7,2

LB Broth (podłoże komercyjne, kompletna pożywka płynna, Sigma-Aldrich)

- NaCl 0,5% (w/v)
- trypton 1% (w/v)
- ekstrakt drożdżowy 0,5% (w/v)

pH = 6,8 – 7,2

2.2. Zestawy komercyjne

RNA Clean & Concentrate -25 kit	Zymo Research, USA
MICROBExpress Bacterial mRNA Purification	Invitrogen, USA
Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina	New England Biolabs, USA
DNA Clean & Concentrate -5 kit	Zymo Research, USA
Click-iT Plus OPP Alexa Fluor 488 Protein Synthesis Assay Kit	Invitrogen, USA

2.3. Antybiotyki

spektynomycyna	Sigma-Aldrich
ampicylina	Polfa
kwasy fusydowy	Sigma-Aldrich
tiostrepton	EMD Millipore
chloramfenikol	MP Biomedicals
kanamycyna	TOKU-E
erytromycyna	TOKU-E

2.4. Aminokwasy

kwasy L-glutaminowy	Sigma-Aldrich
L-alanina	GERBU Biotechnik
L-asparagina	Sigma-Aldrich
tryptofan	Sigma-Aldrich

2.5. Pozostałe odczynniki

$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$	Sigma-Aldrich
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma-Aldrich
10X TBE (powder)	Invitrogen
Al_2O_3	Chempur
APS	Sigma-Aldrich
ATP	New England Biolabs
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 99,8%	POCH
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Sigma-Aldrich
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
CH_3COOH	Sigma-Aldrich
CH_3COOK	POCH
CH_3COONa	Sigma-Aldrich
DAPI	Thermo Scientific
EDTA	Fisher Scientific
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
fiolet krystaliczny	Sigma-Aldrich
Gel Loading Dye, Blue, 6X	New England Biolabs

Gel solution 40 (19:1)	Rotiphorese
- wodny roztwór podstawowy akryloamidu i bisakryloamidu	
GMP-PNP	Sigma-Aldrich
H ₂ O traktowana DEPC	Ambion
HCHO	Sigma-Aldrich
hydrolizat kazeiny	Thermo Scientific
KCl	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
labZAP	A&A Biotechnology
lizozym	Thermo Scientific
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich
MNaza	New England Biolabs
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	Sigma-Aldrich
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	Sigma-Aldrich
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich
Na ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Sigma-Aldrich
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich
NH ₂ CONH ₂	lach:ner
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
NH ₄ NO ₃	Sigma-Aldrich
Quick-Load pBR322 DNA-Mspl Digest	New England Biolabs
rekombinowana DNAza I, wolna od Rnaz	Roche

SDS	Sigma-Aldrich
SYBR Gold	Life Technologies
SynaptoRed C2	Sigma-Aldrich
T4 PNK; bufor reakcyjny	New England Biolabs
TBE-Urea Sample Buffer (2X)	Invitrogen
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	AlfaAesar
TRITON X-100	Acros Organics
Tween-20	Sigma-Aldrich
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich
β-merkaptoetanol	Acros Organics

3. Roztwory wykorzystywane do wykonania pożywek

Wszystkie podłoża i roztwory sterylizowano w autoklawie mikrofalowym w temperaturze 135°C pod ciśnieniem 3,6 bara przez 60-80 sekund w zależności od objętości. Podłoża i roztwory wymagające innych warunków sterylizacji zaznaczono w dalszej części rozdziału.

Roztwór A

- FeCl₃ * 6 H₂O 0,098% (w/v)
- MgCl₂ * 6 H₂O 0,83% (w/v)
- MnCl₂ * 4 H₂O 1,979% (w/v)

Roztwór B

- NH₄Cl 5,35% (w/v)
- Na₂SO₄ 1,06% (w/v)
- KH₂PO₄ 0,68% (w/v)
- NH₄NO₃ 0,97% (w/v)

pH = 7

Roztwór A+B

- roztwór A 0,1% (v/v)
- roztwór B 1% (v/v)

Roztwór G

- hydrolizat kazeiny 1,067% (w/v)
- kwas L-glutaminowy 0,391% (w/v)
- L-alanina 0,133% (w/v)
- L-asparagina 0,148% (w/v)
- KH_2PO_4 0,145% (w/v)
- NH_4Cl 0,056% (w/v)
- Na_2SO_4 0,011% (w/v)
- NH_4NO_3 0,01% (w/v)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,001‰ (w/v)

pH = 7

4. Podłoża niekomercyjne

Podłoże CH

- roztwór G 100 mL
- 0,05 M MnSO_4 0,2 mL
- 0,1 M CaCl_2 0,1 mL
- 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,04 mL
- 8 mg/ml tryptofan 0,25 mL

Podłoże AB

- roztwór A+B 90 mL
- 5% (w/v) kwas L-glutaminowy 4 mL
- 0,1 M CaCl_2 1 mL
- 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 4 mL
- 8 mg/ml tryptofan 0,25 mL

Podłoże BMM

- Tris 50 mM
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 8 mM
- KCl 27 mM

- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 7 mM
 - CaCl_2 2 mM
 - $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 μM
 - MnSO_4 10 μM
 - kwas L-glutaminowy 4,5 mM
- pH = 7,5

Pożywka LBG

- LB 100 mL
- 0,05 M MnSO_4 0,2 mL
- 50% (v/v) $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ 2 mL
- 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 mL

5. Roztwory wykorzystywane w procedurze RIBO-seq i RNA-seq

Roztwory sterylizowano poprzez filtrację, stosując filtry strzykawkowe (Membrane Solutions) o średnicy porów 0,22 μm .

Roztwór lizujący

- Tris (pH = 7,6) 20 mM
- $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 10 mM
- CH_3COOK 150 mM
- TRITON X-100 0,4% (v/v)
- β -merkaptoetanol 6 mM
- CaCl_2 5 mM
- chloramfenikol 1 mM
- GMP-PNP 2 mM
- DNaza I 100 U/mL

Bufor do izolacji RNA z żelu poliakrylamidowego

- EDTA 5 Mm
- CH_3COONa (pH = 5) 10 mM

Bufor alkaliczny do fragmentacji mRNA

- 0,1 M NaHCO_3 220 μL
- 0,1 M Na_2CO_3 30 μL
- 0,5 M EDTA 1 μL

6. Metody

6.1. Hodowla szczepów *Bacillus subtilis*

Aby uzyskać hodowle bakteryjne, każdorazowo 10, 25 lub 50 ml pożywki LB inokulowano wybranym szczepem *B. subtilis*, a następnie hodowano w 30°C z wytrząsaniem przez noc. Następnego dnia kultury rozcieńczano do gęstości optycznej (OD_{600}) równej 0,1 w pożywce zależnej od eksperymentu (jeżeli nie określono inaczej pożywką tą było LB) w celu uzyskania hodowli dziennej. W przypadku hodowli nocnych szczepu 3KO, podłoża zawierały dodatkowo chloramfenikol, erytromycynę i kanamycynę o stężeniach odpowiednio 5 µg/mL, 1,5 µg/mL i 5 µg/mL.

W celu wyznaczenia krzywej wzrostu, nocne hodowle szczepów *B. subtilis* rozcieńczano i hodowano w 37°C z wytrząsaniem na podłożach LB oraz CH (Sharpe i in., 1998), które są bogate w składniki odżywcze, a także na ubogim podłożu BMM (Stulke i in., 1993) i co 40 minut wykonywano pomiary gęstości optycznej hodowli z wykorzystaniem spektrofotometru (NanoDrop One C, Thermo Scientific, USA). Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu.

6.2. Metoda dyfuzji płytkowej (ang. *disc diffusion test*)

Aby zbadać wpływ wybranych związków chemicznych na wzrost i rozwój szczepów *B. subtilis* zastosowano metodę dyfuzji płytkowej. W tym celu, kiedy hodowle dzienne osiągnęły $OD_{600} = 0,5$, pożywkę LB, zmieszaną z agarem odżywczym lub agarem z purpurą bromokrezolową w stosunku objętościowym 1:1, inokulowano do 0,1% (v/v) zawiesiną bakteryjną, wylewano na płytki Petriego i pozostawiano do zastygnięcia. Na sterylne bibułowe krążki nanoszono po 10 µl następujących roztworów:

- spektynomycyny o stężeniach:
20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL, 625 µg/mL,
1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 100mg/mL;
- ampicyliny o stężeniach:
6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL;
- tiostreptonu o stężeniach:
1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10 µg/mL, 312,5 µg/mL, 625 µg/mL,
1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL;

- kwasu fusydowego o stężeniach:
10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 312,5 µg/mL, 625 µg/mL,
1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL;
- SDS o stężeniach:
4%, 6%, 8%, 10%, 12%;
- lizozymu o stężeniach:
625 µg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL;
- ZnCl₂ o stężeniach:
25 mg/mL, 50 mg/mL, 0,1 g/mL, 0,2 g/mL, 0,4 g/mL;
- MnSO₄ * 4 H₂O o stężeniach:
43,75 mg/mL, 87,5 mg/mL, 175 mg/mL, 350 mg/mL, 0,7 g/mL;
- Na₂SO₄ o stężeniach:
12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL;
- Tween o stężeniach:
5%, 10%, 15%, 20%, 25%.

Krażki po wyschnięciu nanoszono na zastygnięte płytki z zainokulowaną pożywką stałą. Każda płytka posiadała kontrolę – krążek nasączony 10 µl roztworu kanamycyny o stężeniu 50 mg/mL. Płytki inkubowano w 30°C przez 24 godziny po czym mierzono średnicę obszaru inhibicji i/lub obserwowano różnice w zabarwieniu pożywki. Doświadczenie przeprowadzono dwukrotnie w dwóch powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i wariantu.

6.3. Oznaczenie ilości tworzonego biofilmu

W celu oznaczenia ilości tworzonego przez szczepy *B. subtilis* biofilmu, hodowle dzienne po osiągnięciu fazy stacjonarnej rozcieńczano 1:100 w pożywce LB lub w LBGM (Y. Chen i in., 2015), a następnie wprowadzano do probówek szklanych i inkubowano przez 3 dni lub wprowadzano do probówek plastikowych i inkubowano przez 5 dni w 30°C w warunkach stacjonarnych. Po tym czasie hodowle delikatnie zlewano. Pozostały na ściankach probówek biofilm trzykrotnie przepłukiwano wodą dejonizowaną w celu usunięcia resztek hodowli, a następnie biofilm barwiono 0,1% roztworem fioletu krystalicznego przez 10 minut. Po tym czasie wybarwiony biofilm ponownie przepłukano trzykrotnie wodą dejonizowaną dla usunięcia nadmiaru barwnika. Na zakończenie dodano

30% kwas octowy w celu ekstrakcji fioletu krystalicznego i dokonywano pomiaru OD₅₆₀ otrzymanych roztworów za pomocą spektrofotometru. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie w pięciu powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i wariantu.

6.4. Test mobilności (ang. *swimming motility assay*)

W celu określenia ruchliwości szczepów *B. subtilis*, 1 µl hodowli dziennej o OD₆₀₀ = 4 wkluwano na płytki Petriego w półpłynne podłoże LB zawierające 0,22%, 0,25%, 0,3%, 0,33% lub 0,35% agaru. Płytki inkubowano w 30°C przez 24 godziny, po czym obserwowano różnice w migracji komórek, mierząc średnicę obszaru zajmowanego przez bakterie. Doświadczenie przeprowadzono dwukrotnie w dwóch powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i wariantu.

6.5. Indukcja sporulacji u *Bacillus subtilis*

Szczepy *B. subtilis* hodowano przez noc w pożywce LB w 30°C z wytrząsaniem, a następnie rozcieńczano w pożywce LB do OD₆₀₀ = 0,1 i hodowano w 37°C z wytrząsaniem. W celu zaindukowania sporulacji, kiedy hodowle osiągały OD₆₀₀ = 0,7 – 0,8, wymieniano pożywkę CH na ocieplone do 37°C sporulacyjne podłoże AB za pomocą filtrowania lub wirowania (Sterlini & Mandelstam, 1969). Filtrowanie stosowano, jeżeli w dalszej kolejności przeprowadzano eksperyment sekwencjonowania RNA oraz profilowania rybosomów (podrozdział III.6.6) lub obserwacje mikroskopowe procesu sporulacji (podrozdział III.6.7). Hodowle przepuszczano wówczas przez szklaną aparaturę do filtrowania (511-0265, VWR Collection, Belgia), a zgromadzone na membranowym filtrze MCE komórki wprowadzano do pożywki AB. W pozostałych przypadkach, to jest dla określenia wydajności germinacji (podrozdział III.6.8), krzywej wzrostu dla germinujących spor (podrozdział III.6.9) oraz obserwacji procesu germinacji pod mikroskopem konfokalnym (podrozdział III.6.10), aby usunąć podłoże CH używano wirowania przez 10 minut w 37°C przy 2 000 x g (Centrifuge 5702 R, Eppendorf, Niemcy). W celu zwiększenia wydajności indukcji sporulacji, 3% objętości hodowli rosnącej w pożywce CH przenoszono do ocieplonego podłoża AB przed wymianą pożywki.

6.6. Sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) i profilowanie rybosomów (RIBO-seq)

Procedurę RNA-seq i RIBO-seq przeprowadzono w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych zgodnie z opublikowanym protokołem (Kopik i in., 2021). Jedno powtórzenie zostało wykonane w Laboratorium Ekspresji Genów w ECOTECH-

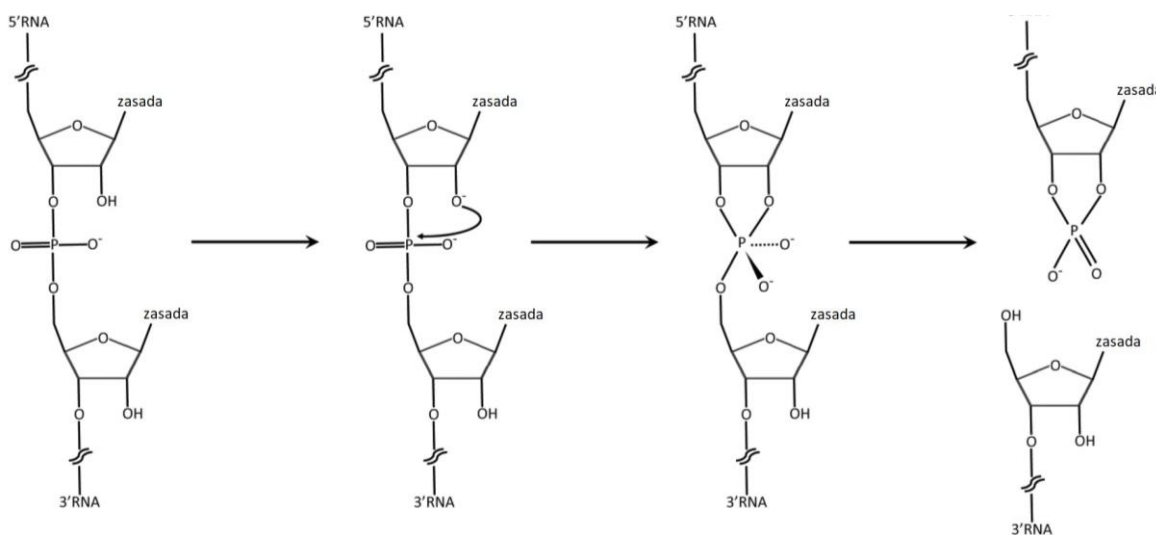
COMPLEX UMCS w Lublinie i uczestniczyłam w jego przeprowadzeniu, zaś drugie powtórzenie wykonano w Pracowni Translatomiki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie przez dr Olgę Iwańską i mgr Marię Kovalenko, członkinie zespołu dr hab. Agaty Starosty.

Hodowle badanych szczepów *B. subtilis* zbierano przed indukcją sporulacji (T0), a także co godzinę przez siedem godzin trwania procesu sporulacji (T1-T7). Przed zebraniem hodowle traktowano chloramfenikolem o stężeniu końcowym 100 µg/mL w celu zatrzymania translacji. Komórki zbierano poprzez filtrację i błyskawicznie zamrażano w ciekłym azocie.

Zamrożone osady komórek bakteryjnych rozcierano w schłodzonym ciekłym azotem mózdzierzu, w obecności tlenku glinu i świeżo przygotowanego, schłodzonego na lodzie buforu lizującego. Otrzymane lizaty wirowano przez 5 minut w 4°C przy obrotach 20 000 x g (MPW-150R, MPW MED. INSTRUMENTS, Polska). Klarowne lizaty dzielono w taki sposób, że 0,5 mg RNA z każdej próbki przeznaczony był na profilowanie rybosomów, zaś pozostałą ilość wykorzystywano na sekwencjonowanie RNA. Jeżeli zawartość RNA w próbce wynosiła poniżej 1 mg RNA, wówczas na profilowanie rybosomów przeznaczano 0,25 mg RNA. Stężenie RNA w próbce określano za pomocą spektrofotometru (NanoDrop One C, Thermo Scientific, USA) mierząc absorbancję światła UV dla trzech długości fali: 230, 260 i 280 nm wobec buforu lizującego jako próby ślepej.

Próbki przeznaczone na RNA-seq oczyszczano za pomocą zestawu RNA Clean & Concentrate -25, postępując zgodnie z protokołem producenta, z wyjątkiem jednej modyfikacji: używano etanolu w objętości 4,5-krotnie większej niż objętość próbki, zamiast objętości równej objętości próbki. Ponieważ wyizolowane RNA bakteryjne zawiera głównie rybosomalne RNA (>90%), deplecja tej frakcji jest pożądana, aby sekwencjonowanie mogło dotyczyć przede wszystkim informacyjnej części transkryptomu (O'Neil i in., 2013). Dlatego, w celu deplecji cząsteczek rRNA próbki poddawano działaniu zestawu MICROBExpress Bacterial mRNA Purification (Ambion, Life Technologies) zgodnie z protokołem producenta i ponownie oczyszczono zestawem RNA Clean & Concentrate -25. Oczyszczone mRNA poddano fragmentacji z wykorzystaniem buforu alkalicznego, dodając go w stosunku objętościowym 1:1 i inkubując w 95°C przez 25 minut. W warunkach zasadowych grupa hydroksylowa na atomie węgla 2' rybozy ulega deprotonacji, a ujemnie naładowany atom

tlenu przeprowadza nukleofilowy atak na sąsiedni fosforan (**Ryc. 3.1**) (Lemire i in., 2016). Otrzymany 2',3'-cykliczny fosforan jest dalej hydrolizowany do 3' fosforanu, skutkując powstaniem fragmentów RNA lub wolnych rybonukleotydów, w zależności od stopnia degradacji, z 5'-OH i 3'-fosforanami.



Rycina 3.1. Schemat fragmentacji RNA w warunkach alkalicznych (Lemire i in., 2016) - zmodyfikowane

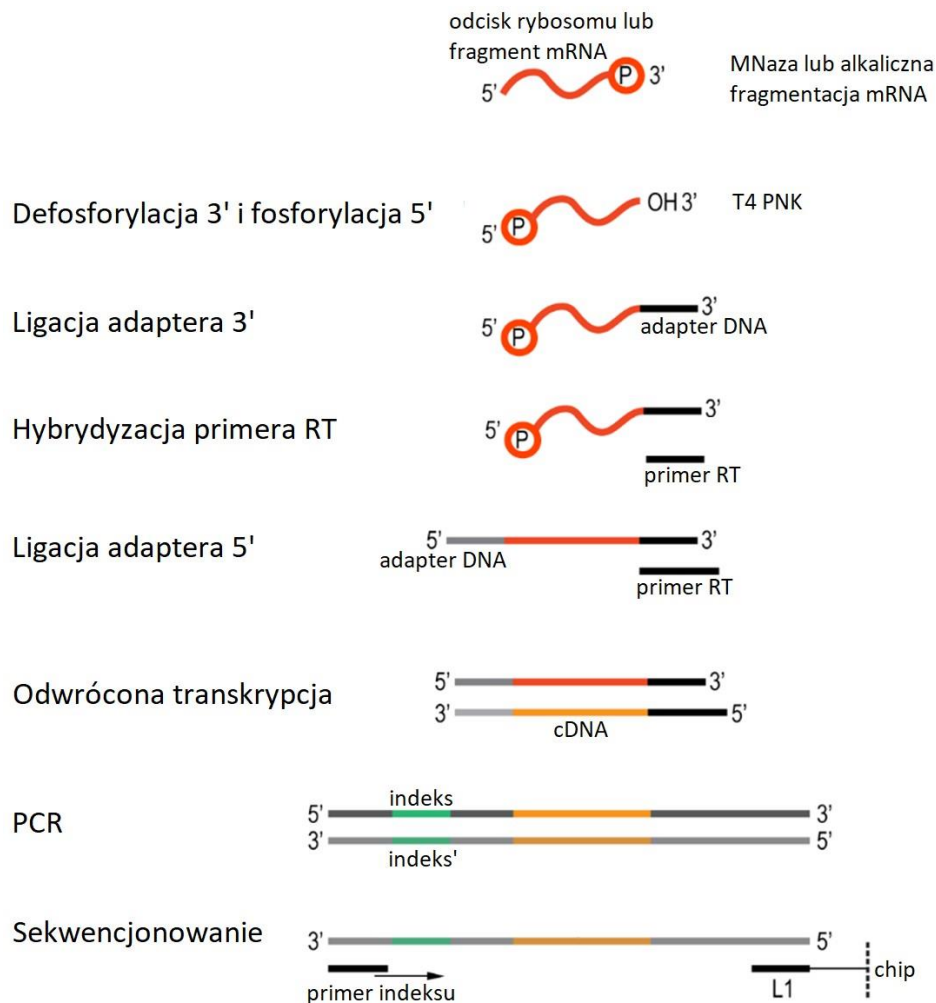
Aby zakończyć reakcję fragmentacji RNA, dodawano 3 M octanu sodu o pH 5,5 do końcowego stężenia 0,1 M, a następnie ponownie oczyszczano z wykorzystaniem zestawu RNA Clean & Concentrate -25. Tak przygotowane mRNA poddawano defosforylacji końców 3' oraz kolejnym procesom, których procedura jest wspólna z protokołem dla profilowania rybosomów i zostaną omówione w dalszej części rozdziału.

Próbki przeznaczone na RIBO-seq trawiono z wykorzystaniem nukleazy mikrokokowej (MNaza) o stężeniu końcowym 712,5 U/1 mg RNA przez 45 minut w 25°C w warunkach wytrząsania, a następnie oczyszczano za pomocą zestawu RNA Clean & Concentrate -25. W celu dokonania selekcji długości uzyskanych odcisków rybosomów (ang. *ribosomal footprints*) strawione RNA poddawano elektroforezie w 15% żelu poliakrylamidowym (PAGE) z dodatkiem 8 M mocznika, w buforze TBE (90 mM Tris, 90 mM kwas borowy, 2 mM EDTA), przy napięciu 180 V. Przed nałożeniem próbek, w celu ogrzania żelu, uruchamiano na 15 min elektroforezę wstępną (ang. *pre-run*) przy tym samym napięciu 180 V. Po zakończeniu elektroforezy, żel wybarwiano barwnikiem SYBR Gold w celu wizualizacji RNA, a następnie sterylną igłą wycinano fragmenty, zawierające odcinki mRNA o długości w zakresie 26 – 32 nukleotydów. Fragmenty żelu inkubowano z wytrząsaniem w 10°C przez

noc w buforze do izolacji RNA z żelu poliakrylamidowego. Wyizolowane RNA oczyszczano za pomocą zestawu RNA Clean & Concentrate, a następnie poddawano defosforylacji końców 3'.

W wyniku zabiegów molekularnych (fragmentacja oraz trawienie MNazą), zarówno pofragmentowane odcinki mRNA przeznaczone na RNA-seq, jak również odciski rybosomów przeznaczone na RIBO-seq, posiadają odwrotnie zlokalizowane grupy OH i fosforanową na zakończeniach swoich cząsteczek niż ma to miejsce naturalnie w kwasach nukleinowych, tzn. na końcu 5' występuje grupa OH, a na 3' końcu wolny fosforan. W związku z tym, przed tworzeniem bibliotek cDNA wymagana jest fosforylacja końców, aby poszczególne odczynniki, takie jak adaptory 3' i 5', wykorzystywane w kolejnych etapach, mogły związać się prawidłowo. Pierwszym krokiem jest defosforylacja końców 3' z wykorzystaniem T4 PNK o stężeniu końcowym 0,5 U/ μ L. T4 PNK jest enzymem bifunkcyjnym i posiada zarówno właściwości 3'-fosfatazy, jak również 5'-kinazy, dla której substratem i donorem fosforanu jest ATP (L. K. Wang i in., 2002). Dlatego, po 1,5 godzinnej inkubacji w 37°C do mieszaniny reakcyjnej dodawano 3 μ L 1 mM ATP i kontynuowano inkubację przez godzinę w celu fosforylacji końców 5', a następnie RNA oczyszczano zestawem RNA Clean & Concentrate -25 i użyto do przygotowania bibliotek cDNA.

Biblioteki cDNA przygotowano z wykorzystaniem zestawu Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs). Procedura jest wieloetapowa i rozpoczyna się ligacją adaptera 3', następnie hybrydowany jest primer RT, umożliwiający przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji (**Ryc. 3.2**). Taki kompleks poddaje się następnie ligacji do adaptera 5' i dopiero po tym etapie przeprowadza odwrotną transkrypcję, dzięki której powstaje cząsteczka cDNA oflankowana sekwencjami adapterowymi. Ostatnim krokiem przed sekwencjonowaniem jest dodanie indeksów, pozwalających na późniejszą identyfikację biblioteki, i namnożenie cząsteczek cDNA za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).



Rycina 3.2. Schemat przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania RNA-seq i RIBO-seq (Kopik i in., 2021) - zmodyfikowane

Biblioteki wykonano postępując zgodnie z protokołem producenta za wyjątkiem następujących różnic:

- po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej 3' Ligation Reaction Buffer (2X) oraz 3' Ligation Enzyme, inkubację przeprowadzono w 37°C przez 2,5 godziny, zamiast w 25°C przez 1 godzinę;
- hybryzację primera do odwrotnej transkrypcji przeprowadzono według zmodyfikowanego programu: 5 minut w 75°C, 30 minut w 37°C, ∞ w 4°C, zamiast 5 minut w 75°C, 15 minut w 37°C, 15 minut w 25°C, ∞ w 4°C;
- ligację adaptera 5' SR przeprowadzono w 37°C przez 2,5 godziny, zamiast w 25°C przez 1 godzinę.

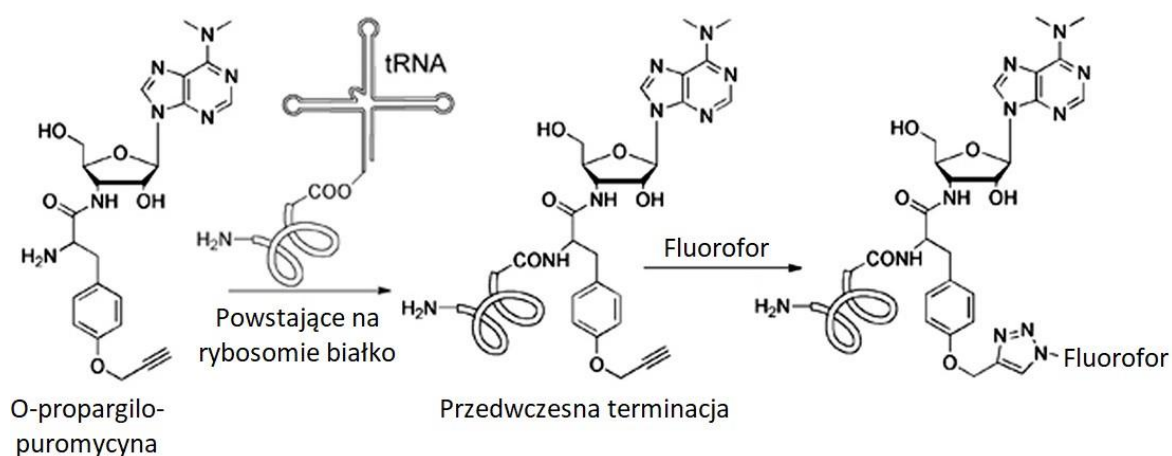
Biblioteki cDNA poddawano elektroforezie PAGE w 6% żelu poliakrylamidowym w buforze TBE. Przed nałożeniem próbek, w celu ogrzania żelu, uruchamiano elektroforezę

wstępną (ang. *pre-run*) na 10 min przy napięciu 180 V. Właściwą elektroforezę przeprowadzano przy napięciu początkowo 120 V, a następnie, po wejściu próbek w żel, podwyższano napięcie do 180 V. Po zakończeniu elektroforezy, żel wybarwiano barwnikiem SYBR Gold, a następnie wycinano fragmenty, zawierające odcinki cDNA o długości w zakresie 135–180 nt dla RNA-seq oraz 135–170 nt dla RIBO-seq. Fragmenty żelu inkubowano z wytrząsaniem w 10°C przez noc w wodzie traktowanej DEPC w celu ekstrakcji cDNA. Wyekstrahowane biblioteki oczyszczano za pomocą zestawu DNA Clean & Concentrate -5. Sekwencjonowanie 50 par zasad z jednego końca cząsteczki (ang. *single-end sequencing*) zostało wykonane na urządzeniu Illumina NextSeq500 przez Genomed S.A. (Warszawa, Polska) w przypadku pierwszego powtórzenia lub przez Laboratorium Specjalistyczne Genomiki CeNT (Warszawa, Polska) w przypadku drugiego powtórzenia.

6.7. Obserwacje procesu sporulacji pod mikroskopem konfokalnym

W celu monitorowania procesu sporulacji, hodowle badanych szczepów *B. subtilis* obserwowano pod mikroskopem konfokalnym. Próbkę z hodowli pobierano przed indukcją sporulacji (T0), a także co godzinę przez siedem godzin trwania procesu sporulacji (T1-T7). Komórki szczepów WT-GFP oraz 3KO-GFP inkubowano przez 3 minuty z barwnikiem SynaptoRed (stężenie końcowe 10 µg/mL) dla uwidocznienia błon komórkowych oraz DAPI (stężenie końcowe 5 µg/mL) dla uwidocznienia bakteryjnego DNA. Ponadto szczepy WT-GFP oraz 3KO-GFP były wyznakowane GFP na C-końcu białka rybosomalnego S2 w celu detekcji lokalizacji rybosomów. W celu wizualizacji procesu translacji *in vivo*, komórki szczepów WT oraz 3KO barwiono O-propargilo-puromycyną (OPP) przy użyciu zestawu Click-iT Plus OPP Alexa Fluor 488 Protein Synthesis Assay Kit (Invitrogen), postępując zgodnie z protokołem producenta. Zasada działania zestawu polega na tym, że po dodaniu OPP do pożywki, jest ono pobierane przez komórkę, w której następnie dochodzi do inkorporacji OPP do nowo syntezowanych polipeptydów (J. Liu i in., 2012). Jako strukturalny analog aminoacylo-tRNA, OPP jest zdolne do wejścia do miejsca A rybosomu i utworzenia kowalencyjnego wiązania z końcem karboksylowym powstającego polipeptydu, co powoduje przedwczesną terminację translacji i uwolnienie łańcucha peptydowego (**Ryc. 3.3**). Na koniec OPP jest chemoselektywnie wyznakowane fluorescencyjnym barwnikiem Alexa Fluor, co umożliwia wykrycie zmodyfikowanych białek za pomocą analizy obrazowej. Ponieważ barwnik ten wykazuje fluorescencję o zbliżonej długości fali co GFP,

przy barwieniu OPP-Alexa nie można było użyć szczepów WT-GFP oraz 3KO-GFP, dlatego użyto szczepów niewyznakowanych GFP.



Rycina 3.3. Schemat działania OPP (J. Liu i in., 2012) - zmodyfikowane

Barwienie komórek bakteryjnych *B. subtilis* zestawem Click-iT Plus OPP Alexa Fluor 488 Protein Synthesis Assay Kit przeprowadzano w następujący sposób. 200 μ L zawiesiny komórkowej, pobieranej z hodowli w odpowiednich punktach czasowych (T0-T7), inkubowano z Click-iT OPP o końcowym stężeniu 13 μ M przez 20 minut w 37°C z wytrząsaniem. Następnie komórki utrwalano, zawieszając w 100 μ L 3,7% formaldehydu w roztworze PBS o pH 7,2-7,6 i inkubując przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Roztwór formaldehydu usuwano, a utrwalone komórki permeabilizowano z wykorzystaniem roztworu 0,5% Triton X-100 w PBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przemywano roztworem PBS i zawieszano w roztworze reakcyjnym (Click-iT® Plus OPP reaction cocktail), przygotowanym według protokołu producenta, i inkubowano 20 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, w celu związania OPP przez fluorochrom Alexa 488. Na koniec przepłukano komórki roztworem Click-iT Reaction Rinse Buffer i zawieszono w PBS.

Wybarwione komórki immobilizowano na szkiełku podstawowym pokrytym świeżo przygotowaną cienką warstwą 1% agarozy i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty wykorzystywano do obserwacji mikroskopowych przy użyciu mikroskopu konfokalnego przeprowadzonych wraz dr Małgorzatą Lichocką w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie w dwóch powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu.

Obserwacje wykonywano za pomocą mikroskopu konfokalnego zbudowanego na bazie odwróconego mikroskopu Eclipse TE2000-E (Nikon) z głowicą konfokalną C1 (Nikon). W obserwacjach wykorzystano obiektyw CFI Plan Apochromat 100X Oil (N.A. 1.40). Do analizy lokalizacji subkomórkowej białek tagowanych GFP lub Alexa Fluor 488 używano lasera szafirowego o długości fali 488 nm, zwierciadła dichroicznego 505 oraz filtra emisyjnego 515/30. W przypadku barwienia DAPI obrazowanie wykonano z użyciem lasera diodowego o długości fali 408 nm, zwierciadła dichroicznego 455 i filtra emisyjnego 450/35. Komórki barwione SynaptoRed C2 obserwowano wykorzystując laser gazowy helowo-neonowy (He-Ne) o długości fali 543 nm, zwierciadło dichroiczne 565 i filtr emisyjny 605/75 nm. Obróbki zdjęć dokonywano w programie Fiji.

6.8. Test wydajności germinacji (ang. *germination frequency assay*)

W celu zbadania wydajności germinacji szczepów *B. subtilis*, zaindukowano proces sporulacji tak, jak to opisano w sekcji III. 5. 5. *Indukcja sporulacji u Bacillus subtilis*. Komórki bakteryjne pozostawiano w pożywce AB w 37°C w warunkach wytrząsania przez noc, aby spory dojrzały. Następnego dnia hodowle rozcieńczano do $OD_{600} = 1,5$ w objętości 500 μ L. Połowę tak przygotowanej zawiesiny bakteryjnej inkubowano przez 40 minut w 90°C i traktowano jako próbę badaną, zaś drugą połowę, niepodgrzewaną do temperatury 90°C, pozostawiono jako kontrolę. Następnie, zarówno dla prób kontrolnych, jak i badawczych, wykonano szereg rozcieńczeń (od 10^{-1} do 10^{-7}) w 96-dołkowych płytkach, a wybrane rozcieńczenia (od 10^{-4} do 10^{-6}) wysiano na płytkach Petriego z agarem odżywcym i inkubowano przez 24 godziny w 30°C. Po tym czasie zaobserwowane kolonie zliczano i obliczano procentową wydajność germinacji dzieląc liczbę kolonii uzyskanych ze spor poddanych inkubacji w wysokiej temperaturze przez liczbę kolonii uzyskanych ze spor niepoddanych inkubacji i mnożąc przez 100%. Eksperyment przeprowadzono pięciokrotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu.

6.9. Krzywa wzrostu dla germinujących spor *Bacillus subtilis*

W celu wyznaczenia krzywej wzrostu dla germinujących spor *B. subtilis*, początkowo eksperyment przeprowadzano podobnie jak dla określenia wydajności germinacji, tj. komórki bakteryjne pozostawiano w pożywce AB w 37°C w warunkach wytrząsania przez noc, a następnie hodowle rozcieńczano do $OD_{600} = 1,5$ w objętości 30 mL. Połowę tak przygotowanej zawiesiny spor inkubowano przez 40 minut w 90°C i traktowano jako próbę

badawczą, zaś drugą połowę pozostawiono jako kontrolę. Z tak traktowanych zawiesin spor rozpoczęto następnie hodowlę od $OD_{600} = 0,1$, przeprowadzając ją w 100 mL pożywki LB. Co 40 minut wykonywano pomiar OD_{600} hodowli z wykorzystaniem spektrofotometru. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu.

6.10. Obserwacje procesu germinacji pod mikroskopem konfokalnym

W celu monitorowania procesu germinacji, sporulację i germinację przeprowadzono analogicznie, jak opisano w sekcji *III.5.9. Krzywa wzrostu dla germinujących spor Bacillus subtilis*. Próbkę pobierano przed inkubacją dojrzałych, całonocnych spor w wysokiej temperaturze (T-1); w momencie rozpoczęcia hodowli z tak potraktowanych spor, co traktuje się w niniejszej rozprawie jako indukcja germinacji (T0); a także co 30 minut przez pierwsze dwie godziny trwania procesu germinacji (T1-T4) oraz na trzy godziny po indukcji germinacji (T6). Pobrane próbki poddawano obserwacji pod mikroskopem konfokalnym w sposób analogiczny, jak to opisano w sekcji *III.5.7. Obserwacje procesu sporulacji pod mikroskopem konfokalnym*. Eksperyment przeprowadzono jednokrotnie w dwóch powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu.

7. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnia z powtórzeń z uwzględnieniem odchylenia standardowego. Sprawdzenie normalności rozkładu zmiennych w badanych grupach wykonano za pomocą testu normalności Shapiro–Wilka. Do zbadania różnic pomiędzy dwiema grupami zastosowano test t-Studenta, a w przypadku niespełnienia warunków do jego użycia – test U Manna–Whitneya. Porównanie trzech grup wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA wraz z testem HSD Tukeya. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$, wskazujący na istnienie istotnych statystycznie różnic lub zależności. Jeśli nie zaznaczono inaczej, otrzymane wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (\pm SD). Badania statystyczne przeprowadzono z użyciem oprogramowania komputerowego Statistica 13 (StatSoft, Polska).

7.1. Pomiar długości komórek bakteryjnych i spor szczepów *B. subtilis* oraz intensywności fluorescencji GFP-RpsB i OPP-Alexa

Na podstawie zdjęć uzyskanych spod mikroskopu konfokalnego (*III.6.7. Obserwacje procesu sporulacji pod mikroskopem konfokalnym* oraz *III.6.10. Obserwacje procesu germinacji pod mikroskopem konfokalnym*) dokonano pomiaru długości komórek bakteryjnych i spor oraz intensywności fluorescencji GFP-RpsB i OPP-Alexa. Pomiary wykonywano programem Fiji (Schindelin i in., 2012) na 300 komórkach bakteryjnych lub na 50 sporach dla każdego szczepu i punktu czasowego.

7.2. Stworzenie wykresów średniego natężenia fluorescencji

Wykresy średniego natężenia fluorescencji OPP lub GFP w komórce wykonano, dzieląc każdą komórkę bakteryjną na 50 odcinków, a następnie dla każdego odcinka obliczano średnie natężenie fluorescencji i przedstawiano jako reprezentację komórki w danym punkcie czasowym.

8. Analiza bioinformatyczna

Bioinformatyczna analiza danych została wykonana przy informatycznym wsparciu mgr Przemysława Latocha, członka grupy badawczej doktor habilitowanej Agaty Starosty, Pracownia Translatomiki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, Polska. Dane zostały przefiltrowane z adapterów oraz odczytów niskiej jakości przez firmy dokonujące sekwencjonowania. Z otrzymanych danych za pomocą programu Bowtie2 usunięto odczyty rRNA i tRNA (Langmead & Salzberg, 2012). Tak przefiltrowane odczyty poddano kontroli jakości przy użyciu programu FastQC (Andrews, 2020) i zmapowano za pomocą programu STAR (Dobin i in., 2013) do referencyjnego genomu *Bacillus subtilis* 168. Liczbę odczytów znormalizowano, wykorzystując metodę TPM (ang. *transcript per milion*). Podobieństwo powtórzeń eksperymentu RNA-seq i RIBO-seq sprawdzono, obliczając współczynnik korelacji r-Pearsona. Wykresy PCA oraz mapy ciepła tworzone przy użyciu aplikacji DEBrowser v1.26.3 (Kucukural i in., 2019). Różnice w ekspresji genów badano z wykorzystaniem programu DESeq2 (Love i in., 2014), a różnice w translacji za pomocą programu Riborex (Li i in., 2017). Ich istotność statystyczną sprawdzano testem Walda, a za poziom istotności przyjęto $p < 0,01$.

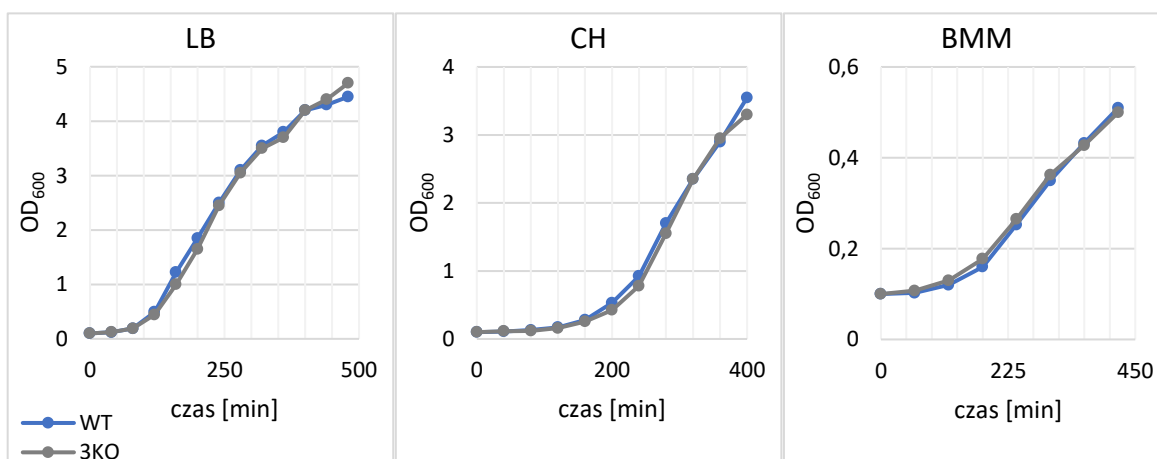
IV. Wyniki

1. Charakterystyka fenotypowa szczepów *B. subtilis* WT i 3KO

1.1. Krzywe wzrostu szczepów *B. subtilis* WT i 3KO

Pierwszy etap eksperymentów dotyczył badań przesiewowych przeprowadzanych dla szczepów *B. subtilis* WT i 3KO w celu wykrycia różnic fenotypowych.

Pierwszym krokiem było wyznaczenie krzywych wzrostowych dla szczepu kontrolnego (WT) oraz szczepu badanego (3KO). Porównanie krzywych wykazało, że oba szczepy rosną podobnie we wszystkich zbadanych pożywkach, tj. LB, CH oraz BMM (**Ryc. 4.1**).



Rycina 4.1. Krzywe wzrostu dla szczepu kontrolnego (WT) oraz szczepu badanego (3KO) w pożywkach LB, CH i BMM.

1.2. Wpływ wybranych związków chemicznych na wzrost i rozwój szczepów

Następnie zbadano wpływ wybranych związków chemicznych, w tym antybiotyków, detergentów i soli, na wzrost i rozwój szczepów. Metoda dyfuzji dyskowej nie wykryła różnic pomiędzy szczepem kontrolnym a badanym dla żadnego z przebadanych związków chemicznych (**Tab. 4.1**). Różnice w średnicy obszaru inhibicji wzrostu pomiędzy szczepami plasowały się w granicy błędów wyznaczonej przez kontrolę (dysk nasączony 50 µg/mL kanamycyną), tj. 1 mm. Zakwaszenie podłoża, wskazujące na metabolizowanie węglowodanów, wykryte za pomocą zastosowania agaru z purpurą bromokrezolową, zaobserwowano dla obu szczepów, kiedy badano Tween-20 o stężeniu co najmniej 10%.

Tabela 4.1. Stężenia oraz średnica obszaru inhibicji wzrostu dla wybranych związków chemicznych wykryte metodą dyfuzji płytkowej. „-” oznacza brak obszaru inhibicji. Pogrubieniem zaznaczono różnice między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO).

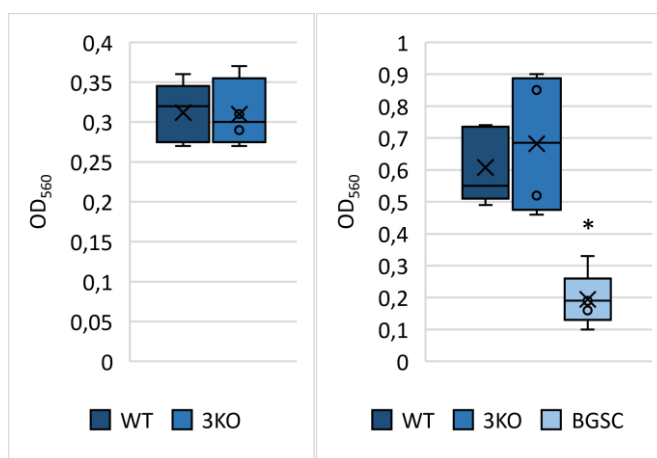
związek chemiczny	stężenie	Płytki z agarem		Płytki z agarem i purpurą bromokrezolową	
		średnica WT	średnica 3KO	średnica WT	średnica 3KO
ampicylina	25 µg/mL	9 mm	9 mm	8 mm	8 mm
	50 µg/mL	12 mm	12 mm	10 mm	10 mm
	100 µg/mL	15 mm	15 mm	13 mm	13 mm
kwas fusydowy	5 µg/mL	8 mm	8 mm	7 mm	7 mm
	10 µg/mL	12 mm	12 mm	14 mm	14 mm
	15 µg/mL	14 mm	14 mm	16 mm	16 mm
spektynomycyna	2,5 mg/mL	12 mm	12 mm	10 mm	10 mm
	5 mg/mL	14 mm	14 mm	12,5 mm	12,5 mm
	100 mg/mL	24 mm	24 mm	25 mm	25 mm
tiosrepton	5 µg/mL	11 mm	11 mm	9 mm	9 mm
	7,5 µg/mL	13 mm	13 mm	11 mm	12 mm
	10 µg/mL	14 mm	14 mm	12,5 mm	13,5 mm
lizozym	1,25 mg/mL	8 mm	8 mm	-	-
	2,5 mg/mL	9 mm	9 mm	-	-
	10 mg/mL	11 mm	11 mm	9 mm	8,5 mm
SDS	4%	12,5 mm	13 mm	11,5 mm	12 mm
	6%	13 mm	14 mm	12,5 mm	12,5 mm
	8%	14 mm	14,5 mm	13,5 mm	13 mm
Tween-20	5%	-	-	-	-
	15%	-	-	-	-
	25%	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	12,5 mg/mL	-	-	-	-
	50 mg/mL	-	-	-	-
	200 mg/mL	-	-	-	-
MnSO ₄	43,75 mg/mL	11 mm	11 mm	9 mm	9 mm
	87,5 mg/mL	13 mm	12,5 mm	10 mm	10 mm
	175 mg/mL	14 mm	14 mm	12 mm	12 mm
ZnCl ₂	25 mg/mL	10 mm	10 mm	10 mm	10,5 mm
	50 mg/mL	13 mm	12,5 mm	11 mm	11,5 mm
	100 mg/mL	19 mm	19 mm	16 mm	17,5 mm

1.3. Oznaczenie ilości tworzonego biofilmu przez szczepy *B. subtilis* WT, 3KO i BGSC

W dalszej kolejności zbadano zdolność szczepów *B. subtilis* WT i 3KO do tworzenia biofilmu. W porównaniu do pożywki LB, zastosowanie pożywki LBGM znacząco zwiększyło ilość tworzonego biofilmu dla obu szczepów oraz poprawiło porównywalność wyników, dlatego zdecydowano się wykorzystywać pożywkę LBGM do inkubacji w warunkach stacjonarnych. W żadnym wariancie eksperymentu (inkubacja przez trzy dni w szklanych probówkach oraz inkubacja przez pięć dni w plastikowych falkonach) nie zaobserwowano różnic w ilości tworzonego biofilmu pomiędzy szczepami WT oraz 3KO (**Tab. 4.2, Ryc. 4.2**). Pożywki w obu przypadkach pozostały klarowne, a obecność komórek bakteryjnych była wyraźnie ograniczona niemal całkowicie do obszaru biofilmu, tworzonego na powierzchni pożywki (**Ryc. 4.3**).

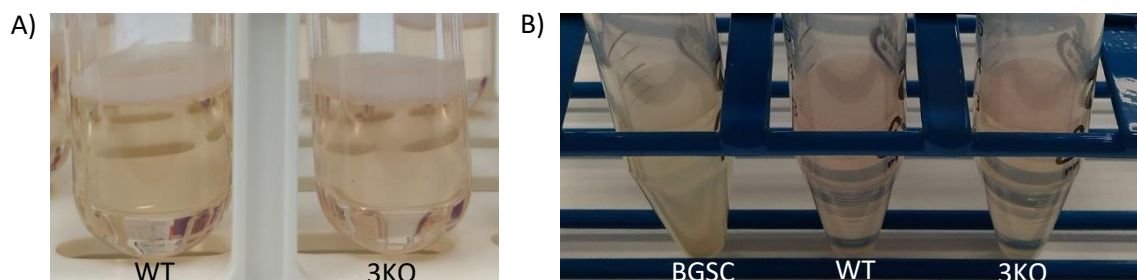
Tabela 4.2. Wartości OD₅₆₀ biofilmów utworzonych przez szczepy *B. subtilis*: kontrolny (WT), badany (3KO) oraz BGSC. Różnice istotne statystycznie oznaczono poprzez „*” (p-value < 0,05).

Inkubacja przez trzy dni w szklanych probówkach:	
	średnie OD ₅₆₀
WT	0,31 ± 0,037
3KO	0,31 ± 0,043
Inkubacja przez pięć dni w plastikowych falkonach:	
	średnie OD ₅₆₀
WT	0,61 ± 0,118
3KO	0,68 ± 0,224
BGSC	0,19 ± 0,084*



Rycina 4.2. Histogram tworzenia biofilmu przez szczepy *B. subtilis*: kontrolny (WT), badany (3KO) oraz BGSC. A) Inkubacja przez trzy dni w szklanych probówkach. B) Inkubacja przez pięć dni w plastikowych falkonach. Różnice istotne statystycznie oznaczono poprzez „*” (p-value < 0,05).

Dla dodatkowej weryfikacji poprawności wyników użyto dodatkowego szczepu *B. subtilis* BGSC, który jako udomowiony szczep laboratoryjny, powinien cechować się niską zdolnością do tworzenia biofilmu (McLoon, Guttenplan, i in., 2011), co zostało potwierdzone eksperymentalnie (**Tab. 4.2, Ryc. 4.2**). Hodowla szczepu *B. subtilis* BGSC cechowała się znacząco słabiej rozwiniętym biofilmem, który łatwo odrywał się i opadał na dno oraz zmętnieniem pożywki (**Ryc. 4.3**).



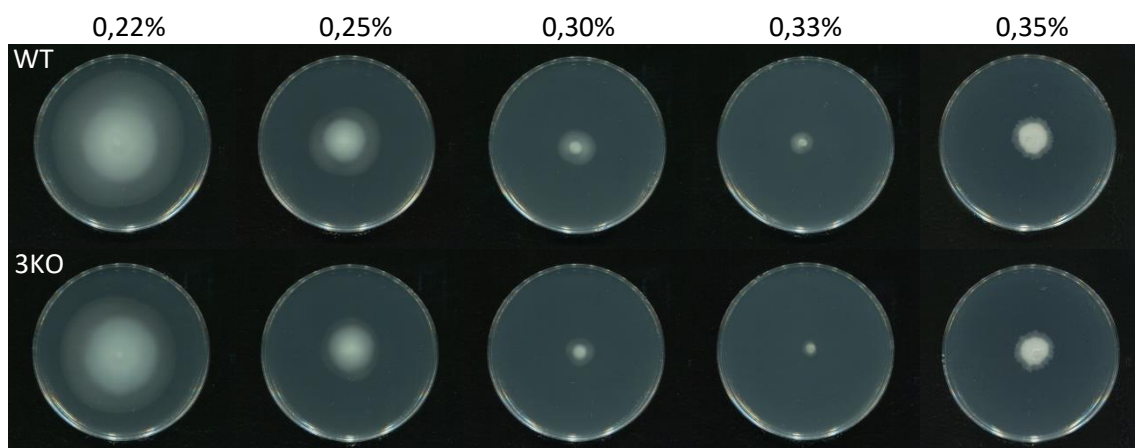
Rycina 4.3. Tworzenia biofilmu przez szczepy *B. subtilis*: kontrolny (WT), badany (3KO) oraz BGSC. A) Inkubacja przez trzy dni w szklanych probówkach. B) Inkubacja przez pięć dni w plastikowych falkonach.

1.4. Test mobilności szczepów *B. subtilis* WT i 3KO

Kolejnym aspektem fenotypowym, który został zbadany, była mobilność szczepów *B. subtilis* WT i 3KO. Wykryto istotne statystycznie różnice w mobilności obu przebadanych szczepów, jeżeli pożywka zawierała $\leq 0,33\%$ agaru, przy czym szczep 3KO wykazał znacząco mniejszą mobilność (test U Manna–Whitneya; $U = 0$; $p < 0,05$) (**Tab. 4.3, Ryc. 4.4**).

Tabela 4.3. Średnice hodowli szczepów *B. subtilis*: kontrolny (WT) i badany (3KO) wyrażone w cm. ns – nieistotne statystycznie (test U Manna–Whitneya; $U = 2$; $p > 0,05$)

	Zawartość procentowa agaru w półpłynnej pożywce LB				
	0,22%	0,25%	0,30%	0,33%	0,35%
WT	6,83 ± 0,189	3,75 ± 0,058	1,85 ± 0,058	1,10	2,50 ± 0,196
3KO	5,93 ± 0,096	3,20 ± 0,082	1,48 ± 0,050	0,88 ± 0,050	2,17 ± 0,191
różnica w średnicy	0,90	0,55	0,37	0,22	ns



Rycina 4.4. Mobilność szczepów *B. subtilis*: kontrolny (WT) i badany (3KO) na płytkach Petriego z półpłynnym podłożem LB zawierającym 0,22%, 0,25%, 0,30%, 0,33% lub 0,35% agar

2. Analiza danych RNA-seq i RIBO-seq

2.1. Uzyskanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania RNA-seq i RIBO-seq

Przeprowadzenie hodowli bakteryjnych, zebranie osadu komórkowego, izolacja RNA, jego oczyszczanie oraz skonstruowanie bibliotek cDNA zostało wykonane w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych, przy czym bezpośrednio uczestniczyłam w realizacji jednego z nich. Wyniki pojedynczego powtórzenia, zrealizowanego z moim udziałem, przedstawiono poniżej.

Generalnie, klarowne lizaty pozyskiwane ze 100 mL hodowli poszczególnych szczepów *B. subtilis* zawierały średnio 1–4 mg całkowitego RNA, przy czym ilość RNA spadała w miarę postępu sporulacji (**Tab. 4.4**).

Tabela 4.4. Stężenie i zawartość całkowitego RNA w poszczególnych lizatach hodowli szczepów *B. subtilis*: kontrolny (WT) i badany (3KO)

Szczep	Punkt czasowy zebrania próbki	Stężenie RNA [ng/μL]	Zawartość RNA [mg]	A260/A280	A260/A230
WT	T0	5845	3,2	1,57	0,83
	T1	8385	4,6	1,62	0,83
	T2	3568	2,0	1,42	0,60
	T3	2645	1,5	1,27	0,48
	T4	3525	1,9	1,38	0,56
	T5	3717	2,0	1,37	0,61
	T6	1653	0,9	1,11	0,43
3KO	T0	7013	3,9	1,61	0,89

	T1	6275	3,5	1,58	0,79
	T2	2416	1,3	1,40	0,61
	T3	3439	1,9	1,42	0,65
	T4	3690	2,0	1,39	0,59
	T5	2967	1,6	1,35	0,61
	T6	2394	1,3	1,26	0,56
	T7	2989	1,6	0,9	0,35

Jak opisano w rozdziale „Materiały i metody”, klarowne lizaty podzielono na dwa zestawy próbek, jeden przeznaczony na RNA-seq, zaś drugi na RIBO-seq. Próbkę przeznaczoną na RNA-seq po oczyszczeniu zawierały średnio 261 µg RNA, a ich jakość (mierzona stosunkiem A260/A280 oraz A260/A230) uległa znacznej poprawie (**Tab. 4.5**).

Tabela 4.5. Stężenie i zawartość całkowitego RNA po oczyszczaniu w poszczególnych próbkach przeznaczonych na RNA-seq

Szczep	Punkt czasowy zebrania próbki	Stężenie RNA [ng/µL]	Zawartość RNA [µg]	A260/A280	A260/A230
WT	T0	10274,1	513,7	2,14	2,35
	T1	5671,3	283,6	2,14	2,24
	T2	3441,9	172,1	2,13	2,22
	T3	3206,6	160,3	2,13	2,17
	T4	5599,7	280,0	2,15	2,29
	T5	6562,2	328,1	2,08	2,31
	T6	757	37,9	2,01	1,95
	T7	480	24,0	1,9	1,51
3KO	T0	8279,1	414,0	2,12	2,08
	T1	10118,3	505,9	2,12	2,33
	T2	3150,0	157,5	2,12	2,30
	T3	2573,9	128,7	2,13	2,34
	T4	5861,1	293,1	2,14	2,28
	T5	4865,3	243,3	2,13	2,29
	T6	2073,1	103,7	2,12	2,33
	T7	1495,5	74,8	2,02	1,99

8 µg RNA każdej próbki przeznaczonej na RNA-seq poddano deplecji rRNA, tak jak to opisano w rozdziale „Materiały i metody”, uzyskując średnio 3,7 µg RNA, które uznaje się za oczyszczone mRNA (**Tab. 4.6**). Tym samym usuwano średnio 46% zanieczyszczeń, które

stanowi rRNA. Następnie przeprowadzono fragmentację mRNA, tak jak to opisano w rozdziale „Materiały i metody”.

Tabela 4.6. Stężenie i zawartość mRNA po deplecji rRNA dla poszczególnych próbek przeznaczonych na RNA-seq

Szczep	Punkt czasowy zebrania próbki	Stężenie RNA [ng/μL]	Zawartość RNA [μg]	A260/A280	A260/A230
WT	T0	62,7	3,1	1,99	1,75
	T1	78,8	3,9	1,98	1,81
	T2	55,0	2,8	1,97	0,68
	T3	66,1	3,3	2,00	1,69
	T4	93,7	4,7	1,97	1,69
	T5	68,3	3,4	1,99	2,33
	T6	85,0	4,2	1,97	2,00
3KO	T0	60,9	3	2,04	2,26
	T1	59,3	2,9	2,00	2,16
	T2	74,1	3,7	1,01	2,29
	T3	135,7	6,8	2,03	2,29
	T4	87,0	4,3	2,04	2,27
	T5	82,5	4,1	2,02	2,08
	T6	55,8	2,7	1,99	1,88
	T7	86,1	4,3	1,97	1,95

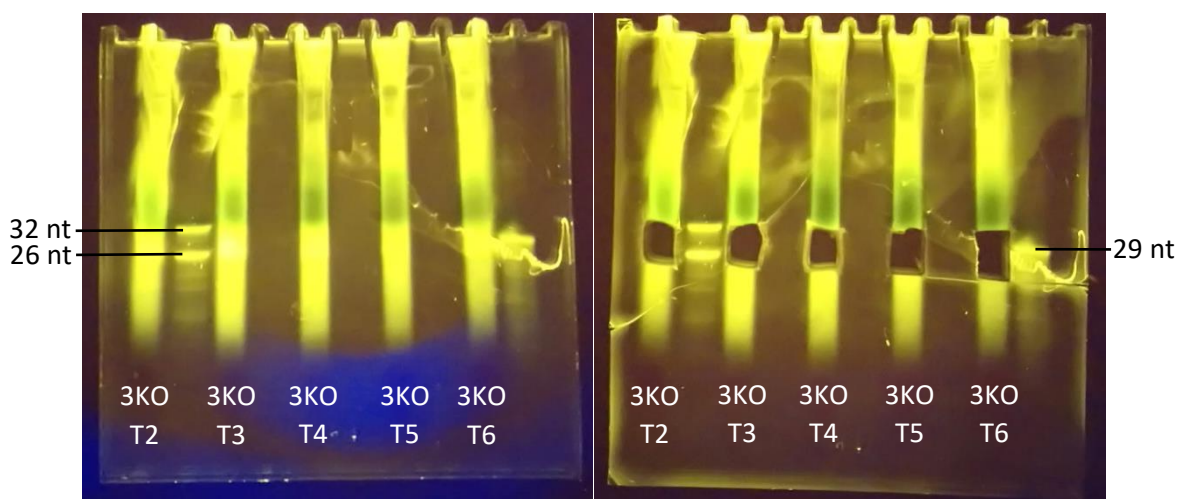
Próbki przeznaczone na RIBO-seq, po trawieniu MNazą i oczyszczeniu, zawierały średnio 43 μg RNA, a ich jakość również uległa poprawie (**Tab. 4.7**).

Tabela 4.7. Stężenie i zawartość całkowitego RNA po trawieniu nukleazą i oczyszczaniu w poszczególnych próbkach przeznaczonych na RIBO-seq

Szczep	Punkt czasowy zebrania próbki	Stężenie RNA [ng/μL]	Zawartość RNA [μg]	A260/A280	A260/A230
WT	T0	1015	50,8	2,12	1,84
	T1	715	35,8	2,10	1,64
	T2	833,2	41,7	2,09	2,05
	T3	927,3	46,4	2,10	0,94
	T4	847,2	42,4	2,10	2,00
	T5	983,6	49,2	2,09	2,16
	T6	206	10,3	2,13	1,00
	T7	156	7,8	2,04	1,67

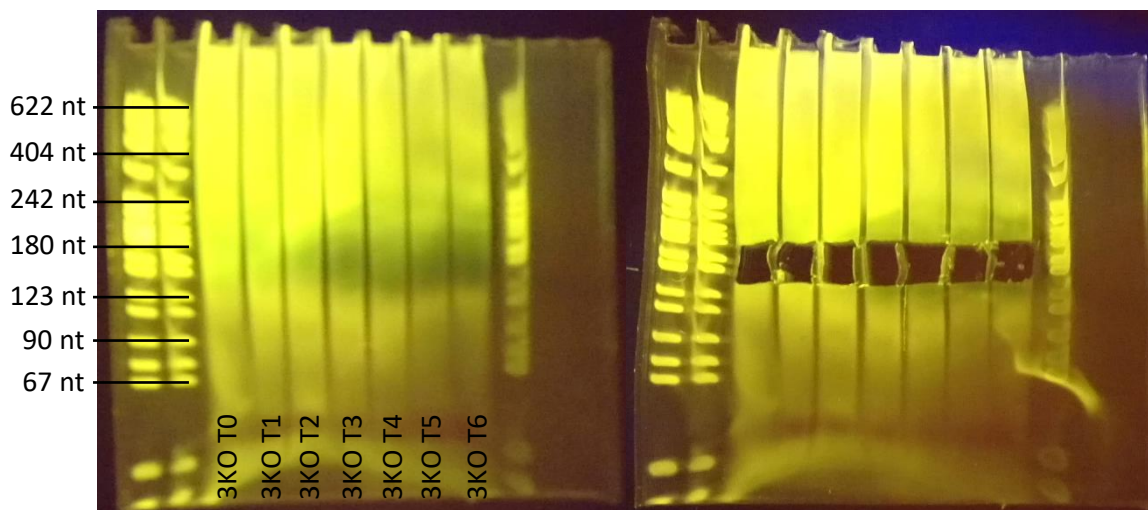
3KO	T0	1180,2	59,0	2,11	2,18
	T1	1157,4	57,9	2,10	2,19
	T2	658,1	32,9	2,09	1,52
	T3	752,1	37,6	2,08	2,20
	T4	885,1	44,3	2,11	1,69
	T5	750	37,5	2,09	2,15
	T6	716,9	35,8	2,10	1,71
	T7	646,9	32,3	2,11	2,26

Strawione nukleazą i oczyszczone próbki przeznaczone na RIBO-seq poddano następnie selekcji długości z wykorzystaniem elektroforezy na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym, wycinając fragmenty żelu pomiędzy 32 nt a 26 nt (**Ryc. 4.5**).

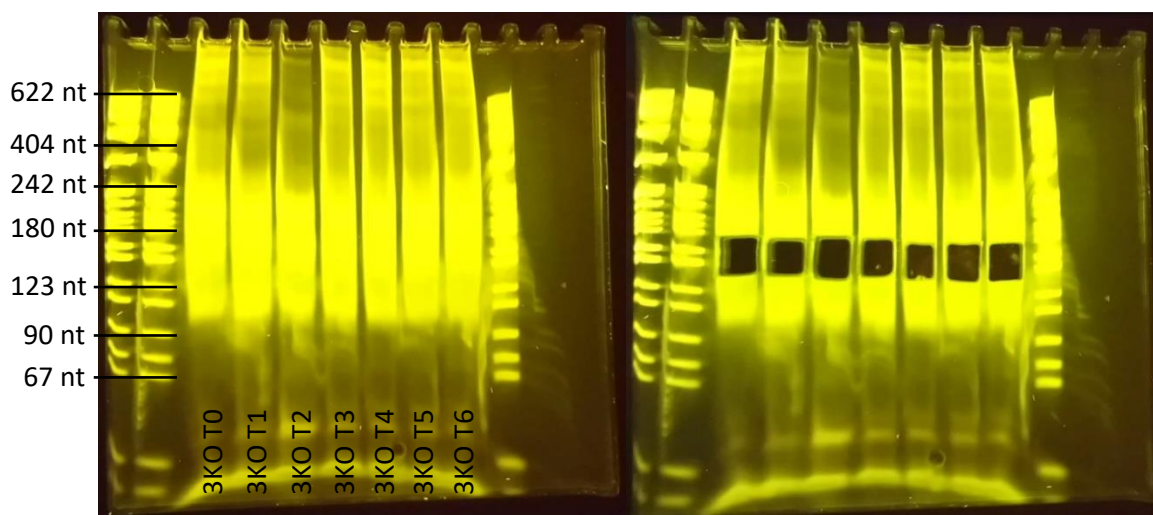


Rycina 4.5. Zdjęcia reprezentatywnego 15% denaturującego żelu poliakrylamidowego przed i po wycięciu fragmentów żelu w celu izolacji odcisków rybosomów.

Zarówno pofragmentowane i oczyszczone mRNA przeznaczone na RNA-seq, jak również wyizolowane odciski rybosomów przeznaczone na RIBO-seq, poddano refosforylacji końców, a następnie wykonano na ich podstawie biblioteki cDNA, tak jak to opisano w rozdziale „Materiały i metody”. W dalszej kolejności dokonano selekcji długości otrzymanych bibliotek poprzez przeprowadzenie elektroforezy na 6% natywnym żelu poliakrylamidowym i wycięcie fragmentów żelu pomiędzy 135 nt a 180 nt dla próbek przeznaczonych na RNA-seq (**Ryc. 4.6**) lub pomiędzy 135 nt a 170 nt dla próbek przeznaczonych na RIBO-seq (**Ryc. 4.7**).



Rycina 4.6. Zdjęcia reprezentatywnego 6% natywnego żelu poliakrylamidowego przed i po wycięciu fragmentów żelu w celu izolacji bibliotek cDNA przeznaczonych na RNA-seq. Jako drabinkę DNA zastosowano pBR322 DNA-MspI Digest.

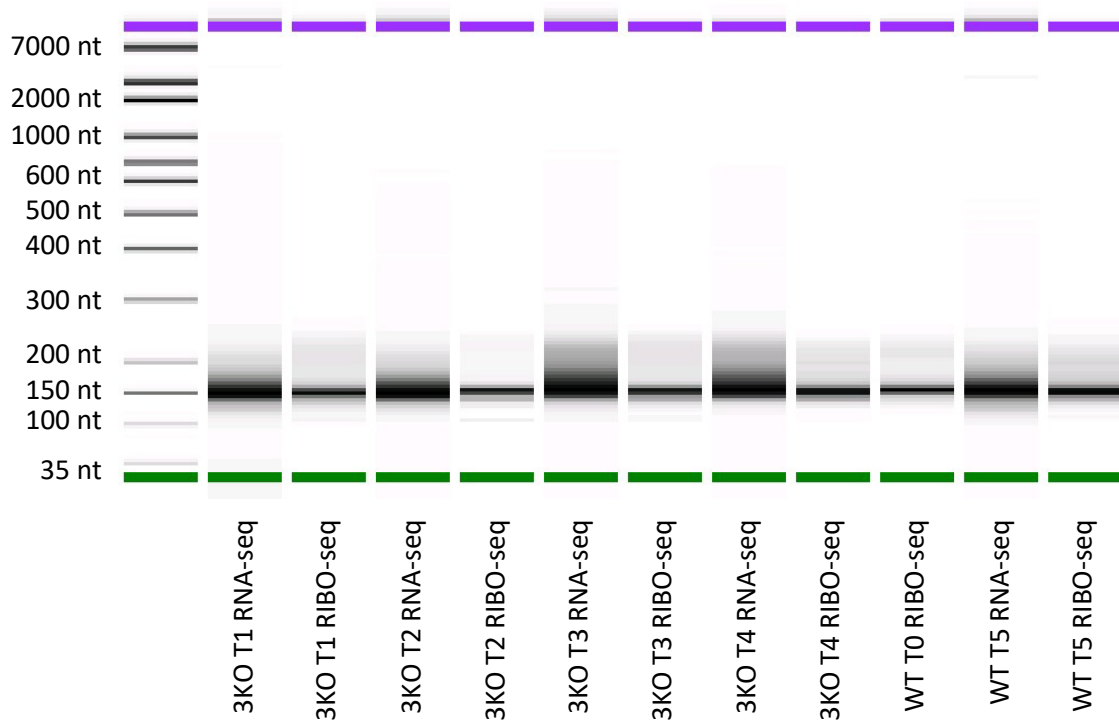


Rycina 4.7. Zdjęcia reprezentatywnego 6% natywnego żelu poliakrylamidowego przed i po wycięciu fragmentów żelu w celu izolacji bibliotek cDNA przeznaczonych na RIBO-seq. Jako drabinkę DNA zastosowano pBR322 DNA-MspI Digest.

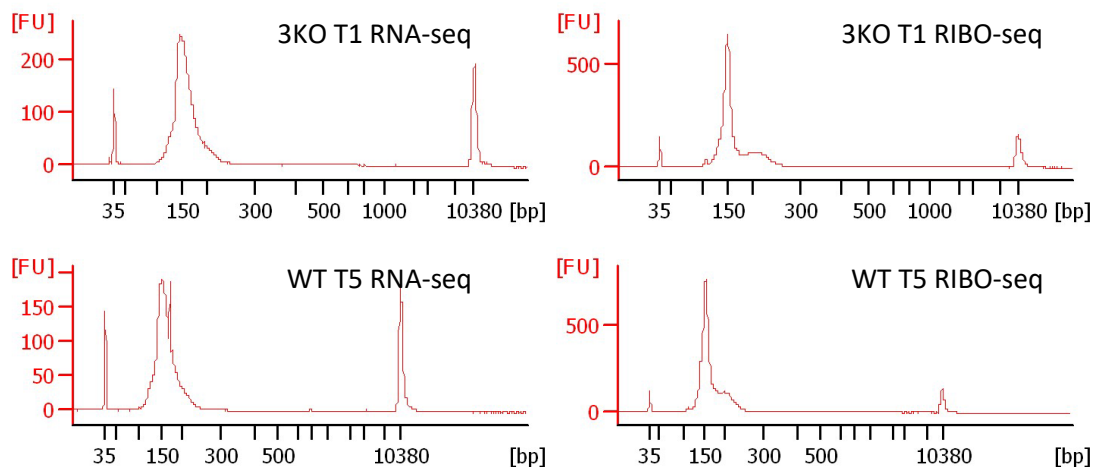
2.2. Ilościowa i jakościowa analiza bibliotek cDNA

Wstępne sprawdzenie jakości i ilości bibliotek cDNA wykonała firma przeprowadzająca sekwencjonowanie, wykorzystując w tym celu bioanalyzer Agilent 2100. Biblioteki wykazały dobrą jakość, o czym świadczy wygląd wirtualnych żeli (**Ryc. 4.8**) oraz elektroferogramów (**Ryc. 4.9**). Prążki na wirtualnych żelach oraz piki na elektroferogramach, które reprezentują biblioteki dla RIBO-seq są węższe w porównaniu do tych reprezentujących biblioteki dla RNA-seq. Analiza elektroferogramów wskazuje na to, że biblioteki mają około 150 nt długości, co zgadza się z oczekiwanym rozmiarem

bibliotek, biorąc pod uwagę, że adaptery i indeksy (ang. *barcode*) używane do przygotowania biblioteki mają długość 119 nt, zaś wstawki 29–30 nt dla RIBO-seq lub 25–50 nt w przypadku RNA-seq. Określona średnia ilość DNA na bibliotekę wynosi 32 ng, co zapewnia wystarczającą ilość materiału genetycznego potrzebnego do sekwencjonowania nowej generacji.



Rycina 4.8. Zdjęcie reprezentatywnego wirtualnego żelu bibliotek cDNA przeznaczonych na RNA-seq oraz RIBO-seq

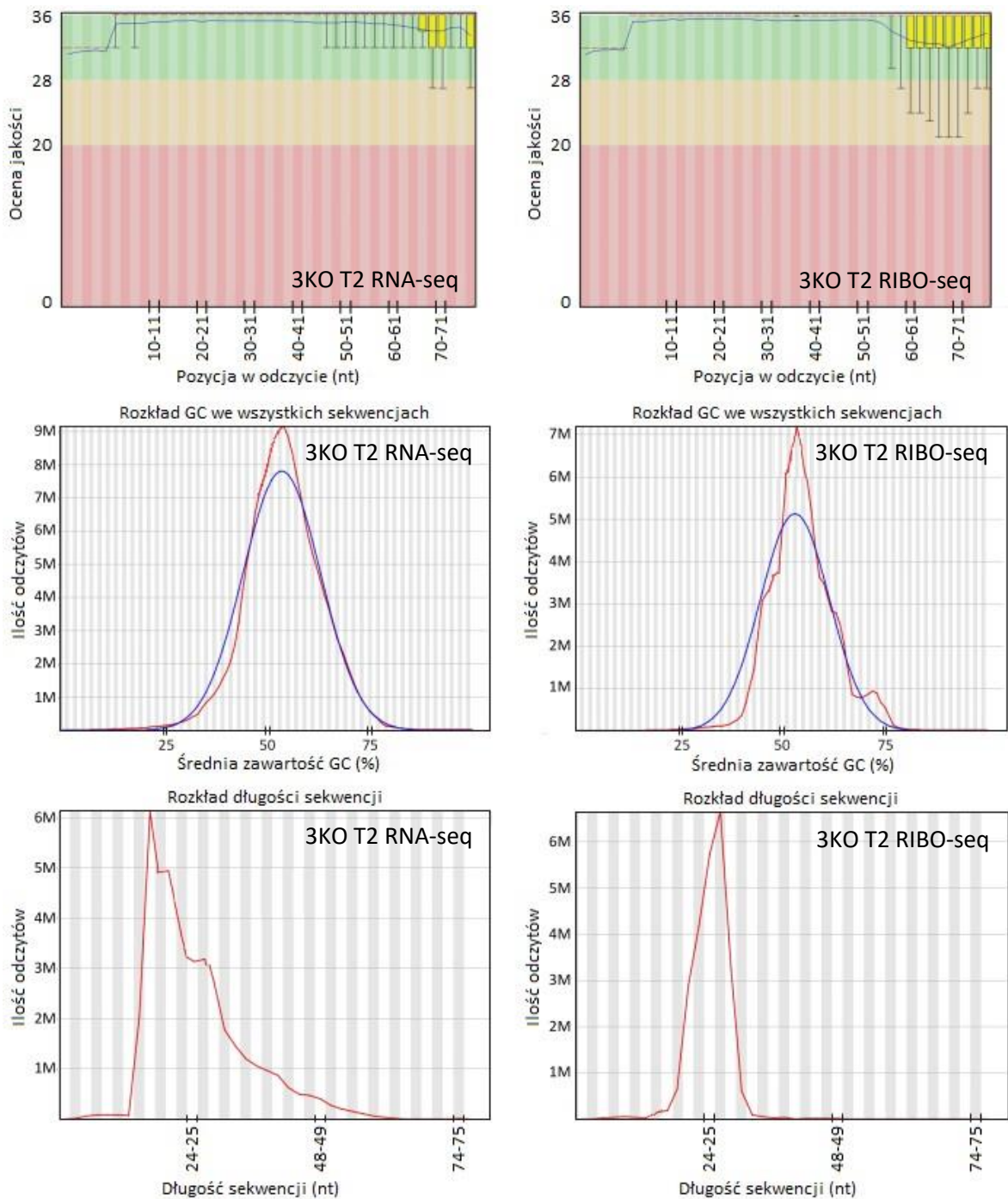


Rycina 4.9. Zdjęcia wybranych elektroferogramów bibliotek cDNA przeznaczonych na RNA-seq oraz RIBO-seq

2.3. Bioinformatyczna analiza danych RNA-seq i RIBO-seq

Po przejściu kontroli jakości, biblioteki zostały poddane sekwencjonowaniu 50 par zasad, z jednego końca cząsteczki, na urządzeniu NextSeq500 Illumina, które wykonał Genomed S.A. przy parametrach: 10 bibliotek na kanał oraz minimum 350 mln odczytów na kanał. Sekwencjonowanie dało 30–57 milionów odczytów na próbkę dla bibliotek RNA-seq i 30–50 milionów odczytów na próbkę dla bibliotek RIBO-seq. Po usunięciu adapterów (ang. *trimming*) oraz sekwencji o słabej jakości, ilość odczytów zmniejszyła się do 24–47 mln odczytów na próbkę dla próbek RNA-seq i 25–50 mln odczytów na próbkę dla próbek RIBO-seq. Mapowanie, przeprowadzone programem STAR, skutkowało 2,4–9,6 milionem unikalnie zmapowanych odczytów na próbkę dla próbek RNA-seq (co stanowi 8–16,8% ogólnej liczby odczytów) oraz 2,3–10,4 milionów dla próbek RIBO-seq (7,7–22,1%).

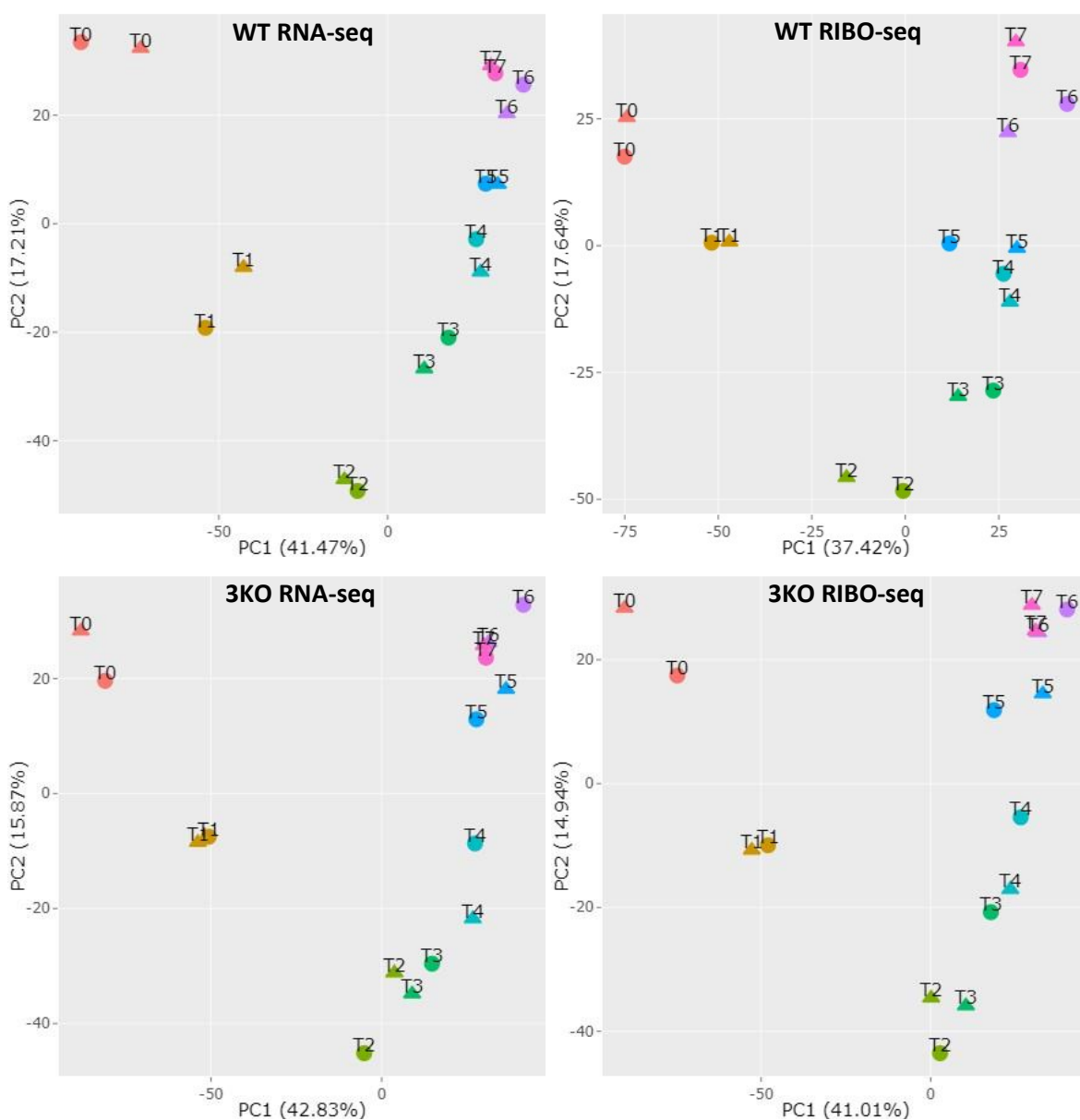
Uzyskane dane poddano kontroli jakości programem FastQC. Sekwencje o długości będącej przedmiotem zainteresowania, wynoszącej <32 nt dla RIBO-seq i <50 nt dla RNA-seq, wykazywały bardzo dobrą jakość (**Ryc. 4.10**). Zawartość procentowa par GC była zgodna z rozkładem teoretycznym. Dodatkowy pik przy 72% na wykresie rozkładu GC dla biblioteki RIBO-seq może potencjalnie wskazywać na zanieczyszczenie rRNA, które można usunąć podczas analizy bioinformatycznej za pomocą filtracji rRNA (Cui i in., 2019; Gerashchenko & Gladyshev, 2017; Verbruggen & Menschaert, 2019). Rozkład długości sekwencji jest wąski dla bibliotek RIBO-seq, z pikiem przy 26-27 nt, podczas gdy rozkład długości dla bibliotek RNA-seq jest szerszy i waha się od 15 do 50 nt.



Rycina 4.10. Zdjęcia wykresów (jakości, zawartości par GC oraz rozkładu długości sekwencji) wykonanych programem FastQC dla reprezentatywnych bibliotek

Ponieważ powtórzenia biologiczne wykonano w różnych miejscach, przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA), w celu sprawdzenia czy dane z obu powtórzeń są ze sobą prawidłowo skorelowane. Wykres PCA wykazał silną tendencję danych do porządkowania się względem postępu w procesie sporulacji, z wyraźnym wyodrębnieniem pierwszych trzech godzin sporulacji (**Ryc. 4.11**). Jednocześnie wykres PCA w znaczącym stopniu pokazał podobieństwo duplikatów. Potwierdził je również współczynnik korelacji

Pearsona, który dla każdego duplikatu wykazał silną korelację, z medianą wynoszącą $r = 0,93$ (Tab. 4.8).



Rycina 4.11. Schematy wykresów PCA dla obu powtórzeń RNA-seq i RIBO-seq

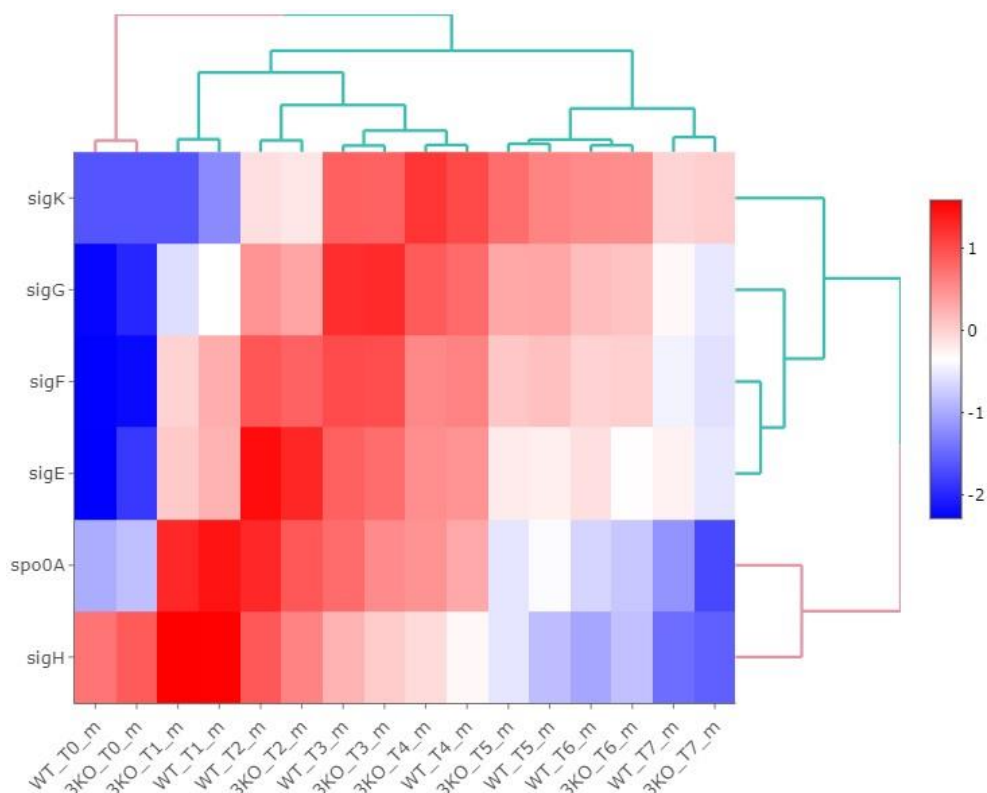
Tabela 4.8. Wyniki testu współczynnika korelacji Pearsona dla poszczególnych powtórzeń. $p < 2.2 * 10^{-16}$

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
WT RNA-seq	0,92	0,98	0,89	0,94	0,93	0,91	0,82	0,98
WT RIBO-seq	0,87	0,95	0,85	0,89	0,90	0,73	0,83	0,98
3KO RNA-seq	0,94	0,98	0,98	0,96	0,92	0,90	0,97	0,95
3KO RIBO-seq	0,90	0,97	0,96	0,97	0,93	0,91	0,95	0,95

2.4. Analiza RNA-seq i RIBO-seq czynników transkrypcyjnych σ H, Spo0A, σ F, σ E, σ G i σ K

Analizując wyniki RNA-seq w pierwszej kolejności zbadano ekspresję głównych czynników transkrypcyjnych związanych z procesem sporulacji, czyli σ H, Spo0A, σ F, σ E, σ G oraz σ K. Stworzona w tym celu ze znormalizowanych odczytów mapa ciepła pokazuje zgodne z oczekiwaniami grupowanie czynników (**Ryc. 4.12**). σ H oraz Spo0A, jako czynniki wczesnej fazy stacjonarnej, znajdują się w oddzielnej grupie niż sporulacyjne czynniki transkrypcyjne σ F, σ E, σ G oraz σ K. Widać również, że ekspresja σ H kończy się wcześniej niż Spo0A, która ma miejsce jeszcze w czwartej godzinie po indukcji sporulacji. Można także zauważyć tendencję do hierarchizowania sporulacyjnych czynników transkrypcyjnych względem czasu pobrania próbki, a tym samym postępu procesu sporulacji. σ F i σ E zgrupowane są razem, następnie σ G oraz σ K, jako ostatni.

Mapa ciepła wyraźnie grupuje oba szczepy w te same punkty czasowe (**Ryc. 4.12**). Pokazuje tym samym brak różnic między szczepami WT i 3KO pod względem ekspresji czynników σ H, Spo0A, σ F, σ E, σ G oraz σ K na poziomie transkrypcji.



Rycina 4.12. Mapa ciepła ekspresji czynników transkrypcyjnych związanych z procesem sporulacji, czyli σ H, Spo0A, σ F, σ E, σ G oraz σ K na poziomie transkrypcji

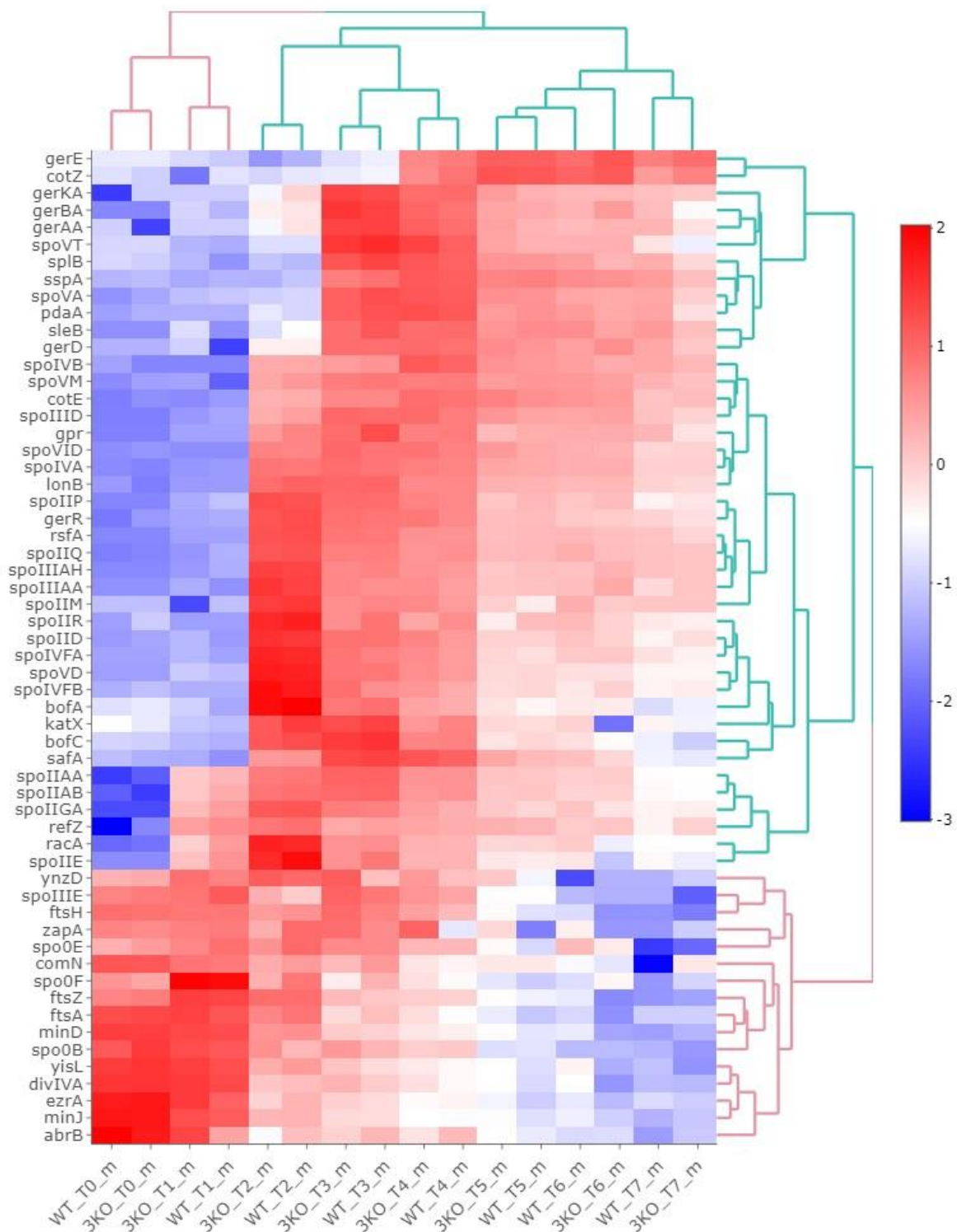
2.5. Analiza RNA-seq i RIBO-seq białek związanych z procesem sporulacji

W dalszej kolejności zbadano ekspresję głównych 60 białek związanych z procesem sporulacji, tworząc w tym celu mapę ciepła obu szczepów dla wszystkich punktów czasowych (**Ryc. 4.13**). Podobnie jak poprzednio, generalnie widać na niej tendencję do prawidłowego grupowania odczytów pochodzących z dwóch różnych szczepów w te same punkty czasowe. Ponadto geny uporządkowane są w następujące grupy:

- te wykazujące wysoką ekspresję w fazie logarytmicznej (T0) i w pierwszej godzinie trwania procesu sporulacji (T1). Charakteryzują się one jednocześnie wyraźnie niską ekspresją w końcowych godzinach procesu (T5-T7);
- te wykazujące wysoką ekspresję w środkowych etapach procesu sporulacji, głównie w drugiej godzinie od indukcji procesu (T2). Cechują się one również niskim poziomem transkrypcji w T0 i T1, przy czym można zauważyć wyróżnioną podgrupę pośrednią, której transkrypcja jest już aktywowana w T1. Cała grupa charakteryzuje się także spadkiem ekspresji w końcowych godzinach procesu (T5-T7);
- te wykazujące wysoką ekspresję w trzeciej godzinie procesu sporulacji (T3). Ich ekspresja we wcześniejszych godzinach (T0-T2) jest na niskim poziomie. Również wykazują spadek transkrypcji w końcowych godzinach procesu (T5-T7) lecz w mniejszym stopniu niż poprzednia grupa;
- te, których transkrypcja jest indukowana w czwartej godzinie procesu sporulacji (T4), przy czym ich ekspresja jest najwyższa w piątej godzinie (T5).

Oprócz genów, mapa ciepła wykazała tendencję do grupowania punktów czasowych w następujący sposób:

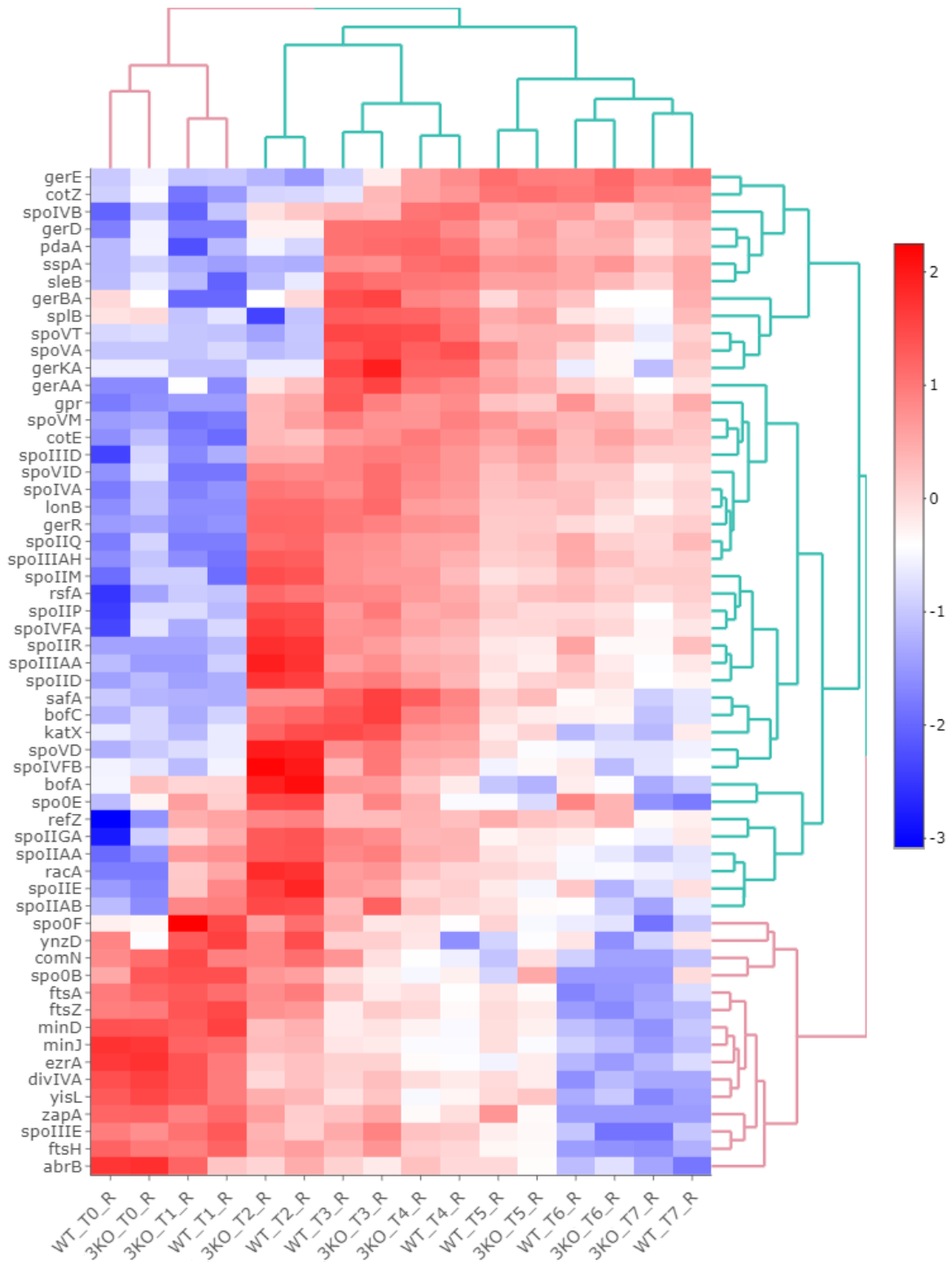
- moment indukcji sporulacji (T0) oraz jedna godzina po tym zdarzeniu (T1);
- środkowe godziny procesu sporulacji: druga (T2), trzecia (T3) i czwarta (T4);
- końcowe godziny procesu sporulacji: piąta (T5), szósta (T6) i siódma (T7).



Rycina 4.13. Mapa ciepła ekspresji białek związanych z procesem sporulacji na poziomie transkrypcji

Mapa ciepła ekspresji na poziomie translacji (**Ryc. 4.14**), a więc stworzona na podstawie odczytów RIBO-seq, dla tych samych 60 białek jest bardzo zbliżona do mapy ciepła transkrypcji (**Ryc. 4.13**). Wyraźniej niż poprzednio (**Ryc. 4.13**), szczepy są prawidłowo sparowane w te same punkty czasowe (**Ryc. 4.14**). Porządkowanie punktów czasowych w

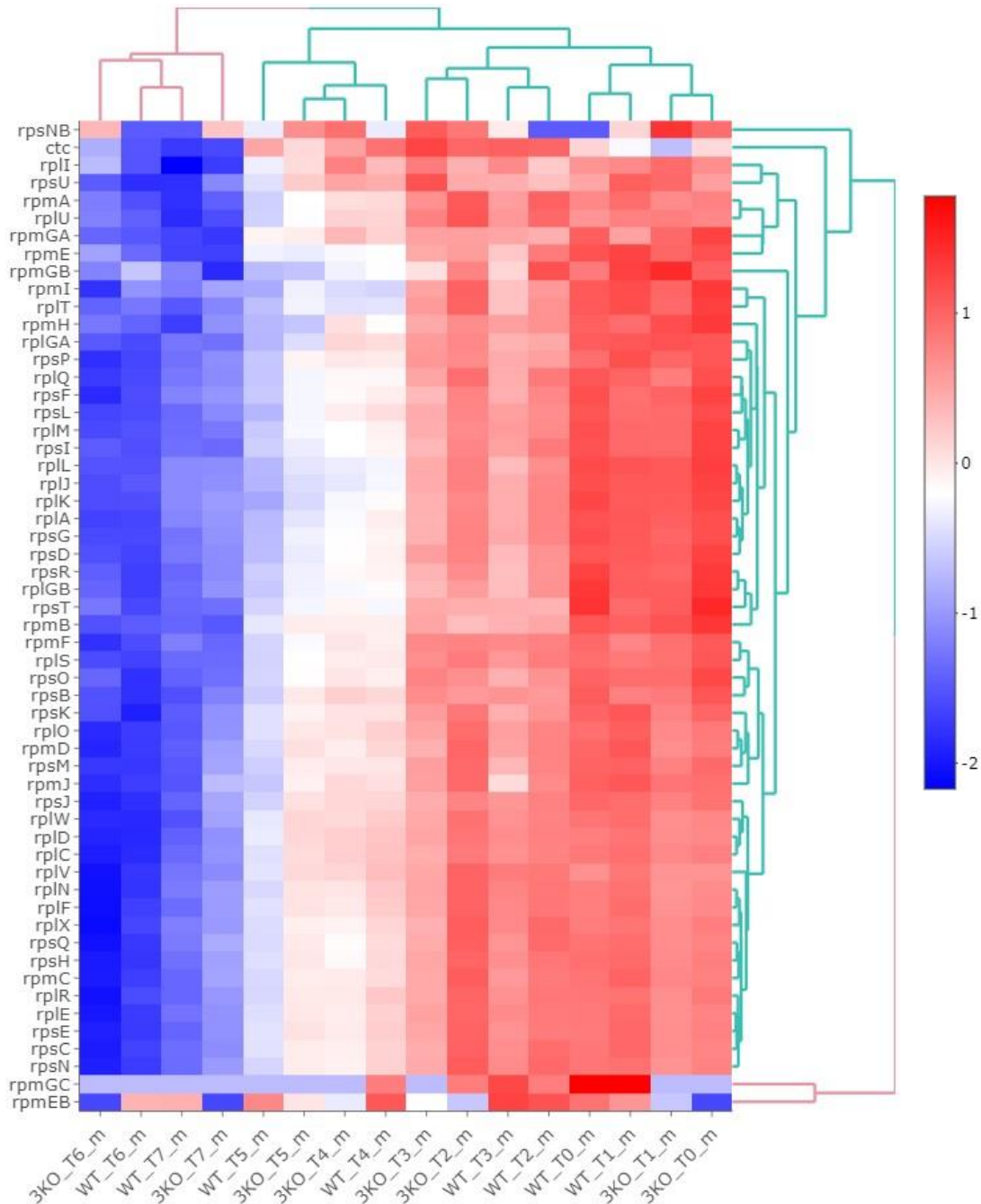
trzy przedziały: T0-T1, T2-T4 oraz T5-T7 również jest zachowane. Grupowanie genów jest w przybliżeniu podobne, z niewielkimi zmianami.



Rycina 4.14. Mapa ciepła ekspresji białek związanych z procesem sporulacji na poziomie translacji

2.6. Ekspresja białek rybosomalnych w trakcie trwania procesu sporulacji

Aby przyjrzeć się aspektowi biosyntezy rybosomów w trakcie procesu sporulacji, stworzono mapę ciepła ekspresji 55 białek rybosomalnych na poziomie transkrypcji (**Ryc. 4.15**).



Rycina 4.15. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie transkrypcji

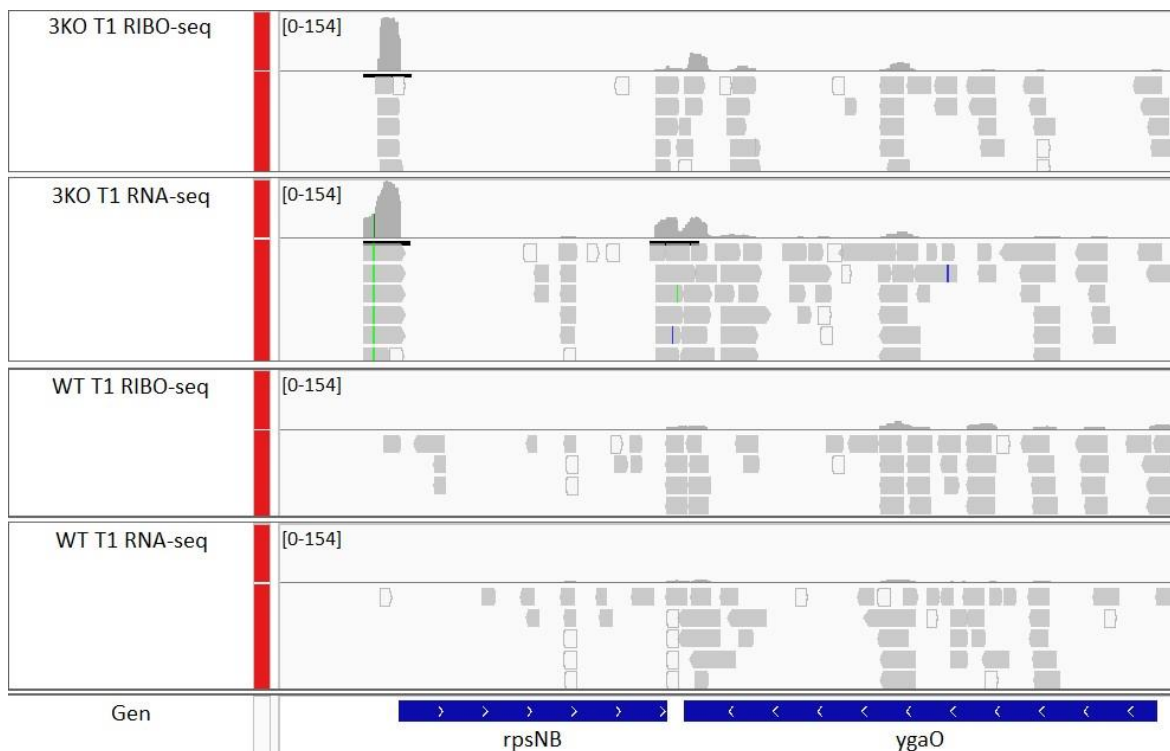
W przeciwieństwie do poprzednio stworzonych map ciepła (**Ryc. 4.12-14**), powstały wykres nie pokazuje prawidłowego parowania szczepów w te same punkty czasowe (**Ryc. 4.15**). Transkrypcja białek rybosomalnych wydaje się wykazywać większe podobieństwo

pomiędzy następującymi po sobie godzinami w obrębie tego samego szczepu, np. para 3KO T0 i 3KO T1.

Trzy geny istotnie różnią się od pozostałych, przedstawionych na mapie ciepła: *rpsNB*, *rpmGC* i *rpmEB*. Lokalizują się one skrajnie od siebie, ujawniając znaczące różnice w swoich wzorcach ekspresji. *rpmGC* i *rpmEB* wydają się generalnie charakteryzować niską transkrypcją przez wszystkie punkty czasowe w szczepie 3KO. W przypadku szczepu WT *rpmGC* wykazuje dość silną transkrypcję do czwartej godziny sporulacji, zaś *rpmEB* przez cały czas trwania procesu. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż transkrypcja dla genu *rpsNB* została uwidoczniła przez mapę ciepła dla wszystkich punktów czasowych w szczepie 3KO oraz dla punktów T1, T3 i T4 w szczepie WT.

O ile wzór ekspresji na poziomie transkrypcji dla genów *rpmEB* i *rpmGC* był zgodny z faktem, iż w szczepie 3KO geny te są usunięte, o tyle w przypadku *rpsNB* był on zaskakujący. Z tego powodu sprawdzono ilość znormalizowanych odczytów RNA-seq, a także sprawdzono rozmieszczenie zmapowanych odczytów w programie IGV. W przypadku wszystkich trzech genów, liczba ich znormalizowanych odczytów plasowała się mocno poniżej średniej w każdym punkcie czasowym. Gen *rpsNB* charakteryzował się największą ilością znormalizowanych odczytów w punkcie czasowym T1, dlatego wybrano ten punkt jako reprezentację dla wizualizacji mapowania odczytów dla tego genu.

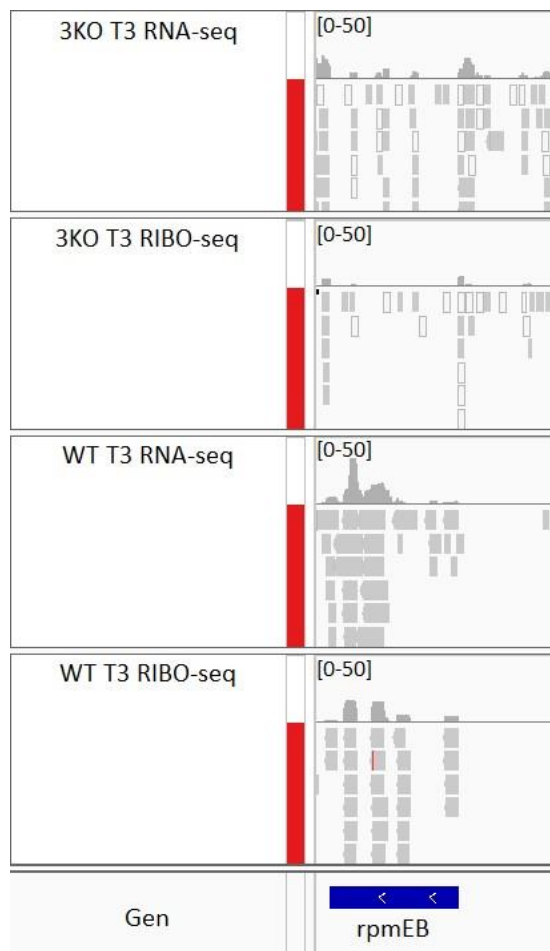
Wizualizacja zmapowanych do *rpsNB* odczytów RNA-seq i RIBO-seq pokazuje, że ich lokalizacja jest ograniczona do początku genu (**Ryc. 4.16**). Oznacza to, że w szczepie 3KO, pomimo istnienia puli odczytów mapujących się do genu *rpsNB*, nie powstaje funkcjonalne białko, co jest zgodne z oczekiwaniami.



Rycina 4.16. Wizualizacja zmapowanych odczytów RNA-seq i RIBO-seq do genu *rpsNB* w szczepie WT i 3KO w pierwszej godzinie po indukcji sporulacji (T1)

Gen *rpmEB* charakteryzował się największą ilością znormalizowanych odczytów w punkcie czasowym T3, dlatego wybrano ten punkt jako reprezentację dla wizualizacji mapowania odczytów dla tego genu.

W przeciwieństwie do poprzedniej ryciny, wizualizacja zmapowanych do *rpmEB* odczytów RNA-seq i RIBO-seq w szczepie WT pokazuje, że ich lokalizacja z różną częstotliwością dotyczy całego genu (**Ryc. 4.17**). Oznacza to, że w szczepie WT najprawdopodobniej powstaje funkcjonalne białko. Za to w szczepie 3KO duża ilość sekwencji jest oznaczona białym kolorem, co oznacza, że mapują się one do wielu miejsc w genomie i nie można ich jednoznacznie przyporządkować do konkretnego genu. Ponadto odczyty te są bardzo krótkie i nie spełniają kryteriów długości, w związku z czym można je odrzucić z analizy. Podsumowując, gen *rpmEB* jest przykładem genu o niskiej ekspresji w szczepie WT i braku ekspresji w szczepie 3KO, co jest zgodne z oczekiwaniami.

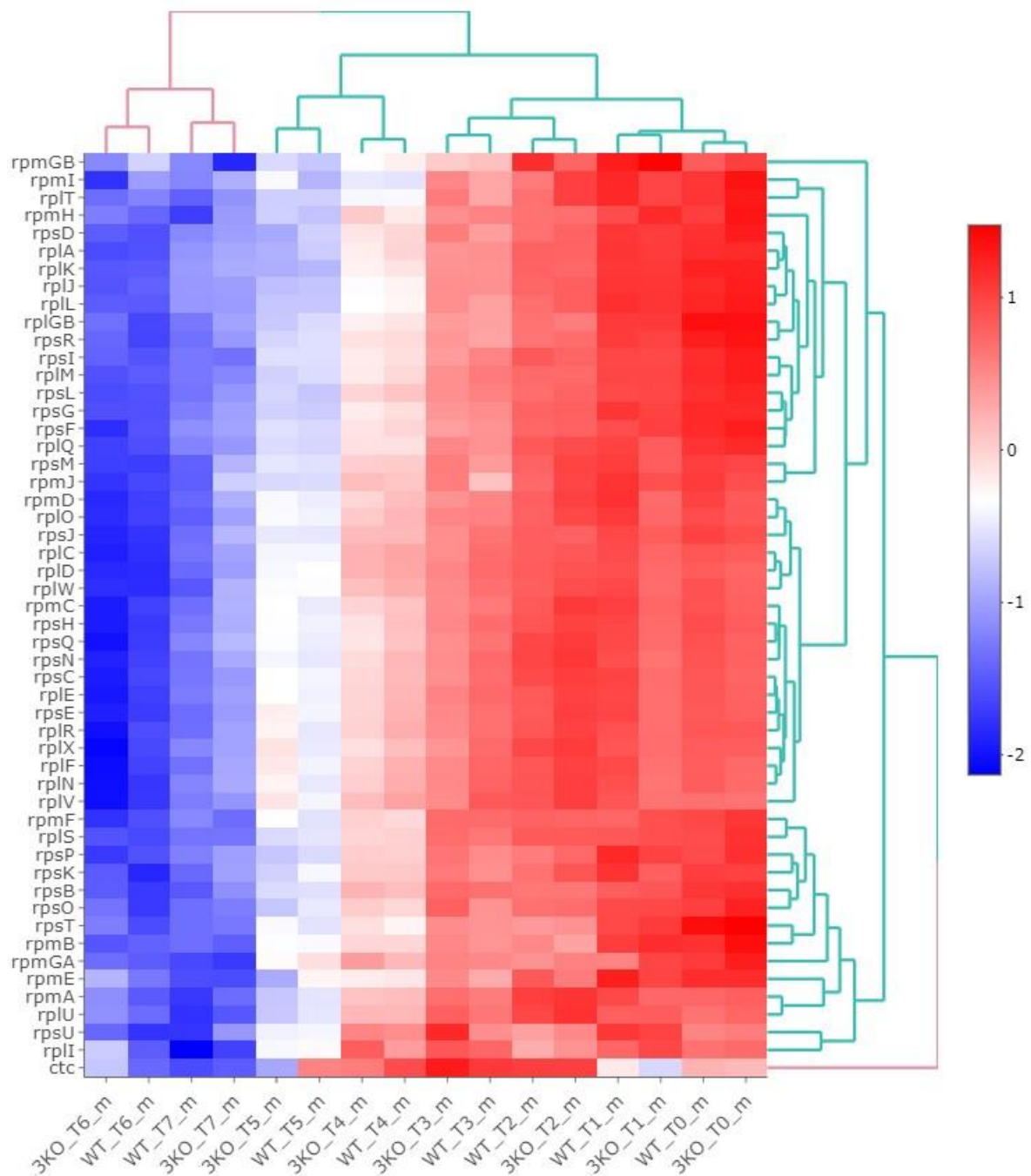


Rycina 4.17. Wizualizacja zmapowanych odczytów RNA-seq i RIBO-seq do genu *rpmEB* w szczepie WT i 3KO w trzeciej godzinie po indukcji sporulacji (T3)

Ponieważ ekspresja RpmEB, RpmGC oraz RpsNB jest celowo zablokowana w szczepie 3KO, stworzono ponownie mapę ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie transkrypcji, wykluczając tym razem z analizy wszystkie trzy powyższe geny.

Po wyłączeniu z analizy RpmEB, RpmGC oraz RpsNB prawidłowe grupowanie nie było już zaburzone przez białka, których geny zostały celowo usunięte w jednym z porównywanych szczepów, czyli 3KO (**Ryc. 4.18**). Tym samym, szczepy są prawidłowo sparowane w te same punkty czasowe. Porządkowanie punktów czasowych w trzy przedziały wygląda w tym przypadku inaczej niż w poprzednich mapach ciepła (**Ryc. 4.13-15**) i wskazuje na to, że transkrypcja białek rybosomalnych stopniowo spada (**Ryc. 4.18**). Wzór ekspresji wszystkich przebadanych białek jest tym razem podobny, jedynym wyjątkiem jest gen *ctc*. Koduje on fakultatywne białko rybosomalne L25, które jest jednocześnie ogólnym białkiem stresu i umożliwia wówczas prawidłową translację (Schmalisch i in., 2002). Jest to szczególnie istotne w sporulacji, ponieważ jego delekcja

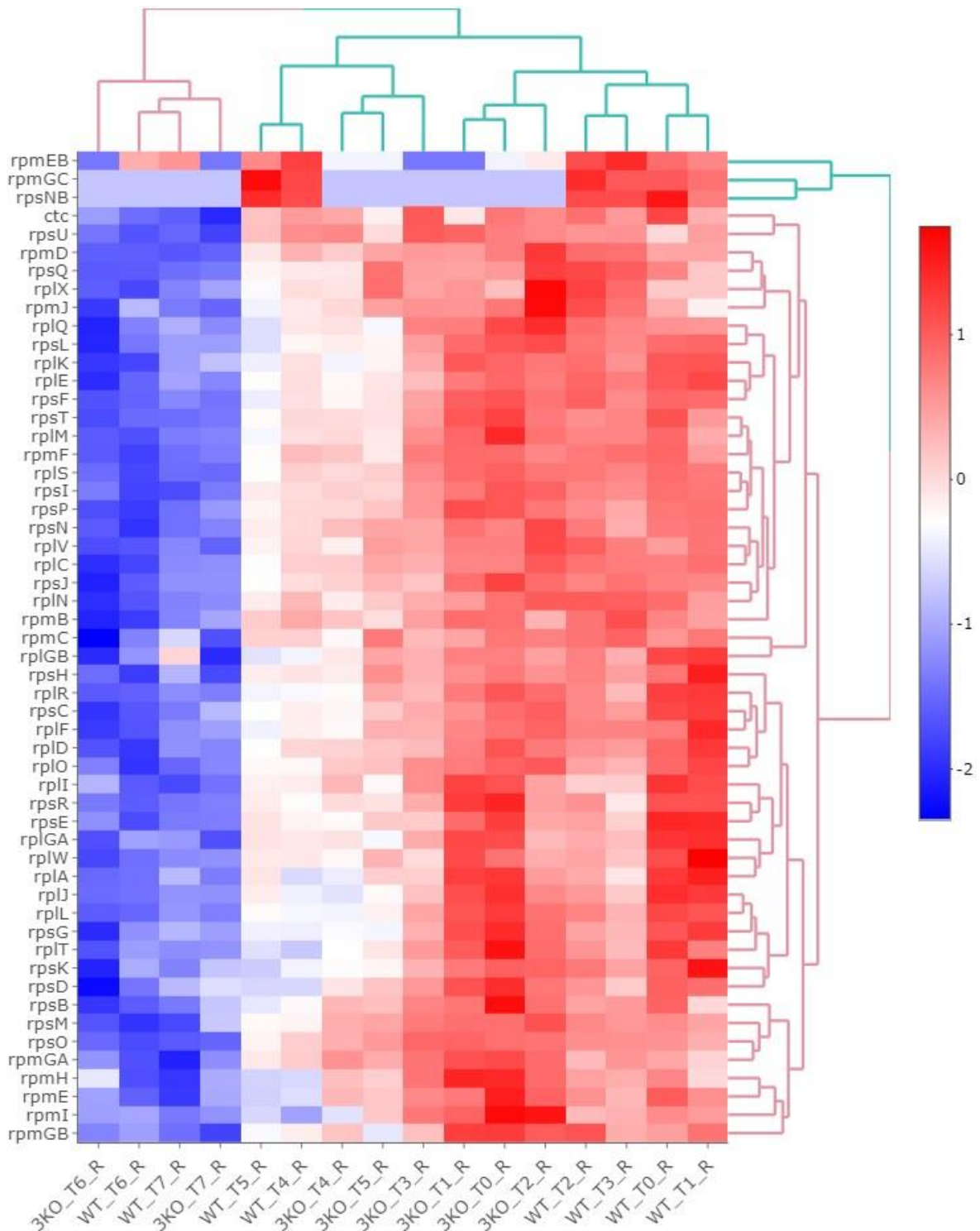
powoduje zaburzenie prawidłowego przebiegu procesu. Tym samym szczyt jego ekspresji, przypadający na środkowe godziny sporulacji (T2-5) jest zgodny z przewidywaniami.



Rycina 4.18. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie transkrypcji z wyłączeniem genów *rpmEB*, *rpmGC* oraz *rpsNB*

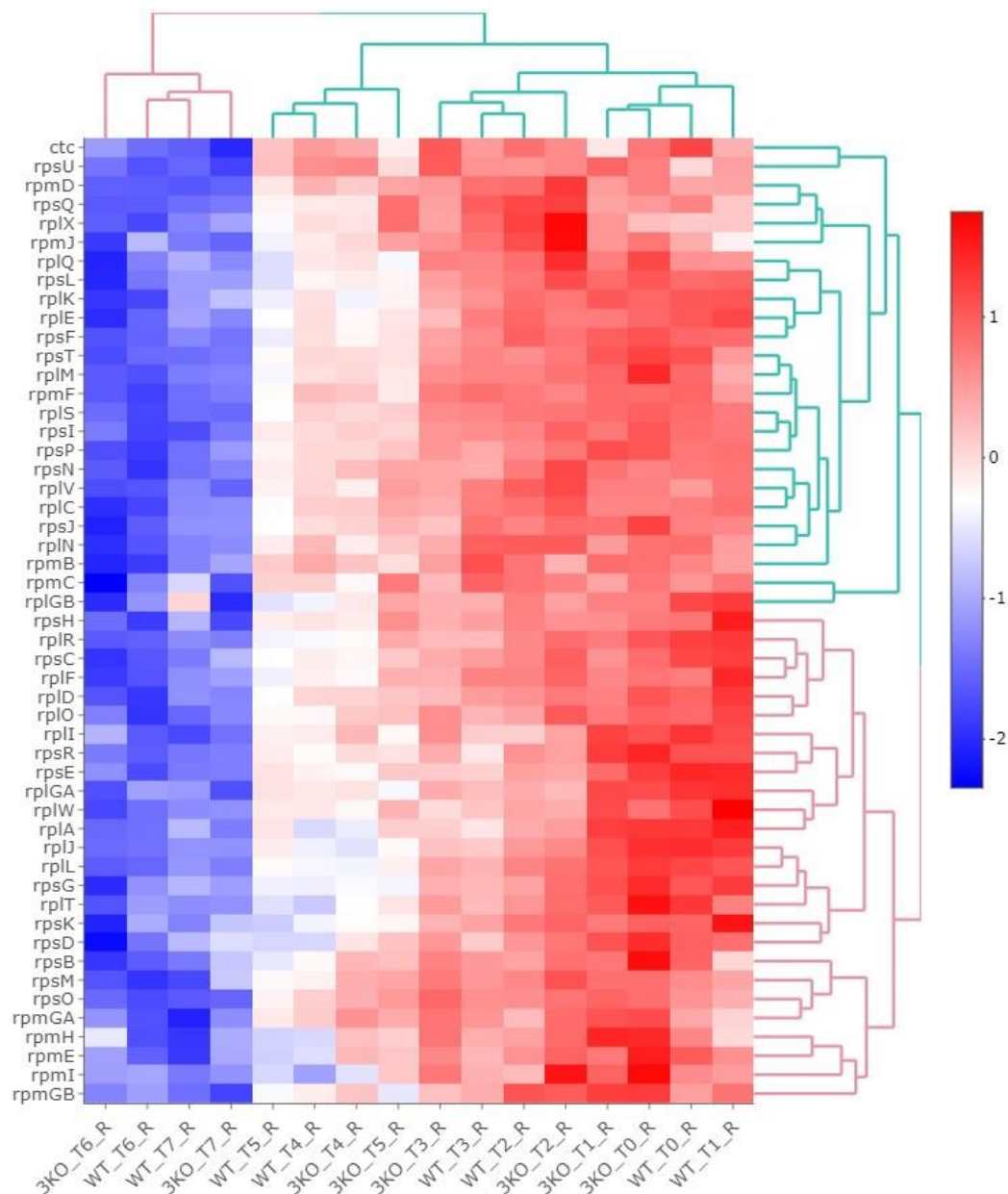
Mapa ciepła ekspresji na poziomie translacji (**Ryc. 4.19**), a więc stworzona na podstawie odczytów RIBO-seq, dla tych samych 55 białek rybosomalnych, pokazuje podobny wzór do mapy ciepła transkrypcji (**Ryc. 4.18**), tzn. translacja wszystkich białek stopniowo zmniejsza się wraz z postępem sporulacji. Podobnie jak na mapie ciepła

transkrypcji (**Ryc. 4.15**), powstały wykres nie pokazuje prawidłowego parowania szczepów w te same punkty czasowe (**Ryc. 4.19**). Zamiast tego grupuje dany szczep w następujące po sobie punkty czasowe, np. 3KO T0, 3KO T1 i 3KO T2. Tylko ostatnie dwie godziny procesu sporulacji (T6-T7) są połączone razem w grupę, zawierającą zarówno szczep WT, jak i 3KO.



Rycina 4.19. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie translacji

Geny *rpmEB*, *rpmGC* i *rpsNB* są wyraźnie oddzielone od reszty (**Ryc. 4.19**). RpmEB, podobnie jak w przypadku transkrypcji (**Ryc. 4.15**), wykazuje translację przez cały czas trwania sporulacji w szczepie WT i jej brak w szczepie 3KO (**Ryc. 4.19**). Wzór ekspresji RpmGC na poziomie translacji jest zbliżony do tego na poziomie transkrypcji i jest wykrywalny do piątej godziny po indukcji sporulacji (T5) w szczepie WT. Tak samo mapa ciepła pokazuje ekspresję na poziomie translacji RpsNB, tym samym jest ona jednak sprzeczna z jego wzorem ekspresji na poziomie transkrypcji. Jest to prawdopodobnie spowodowane bardzo małą ilością znormalizowanych odczytów, co sprawia, że ich fluktuacje wydają się bardziej skrajne.



Rycina 4.20. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie translacji z wyłączeniem genów *rpmEB*, *rpmGC* i *rpsNB*

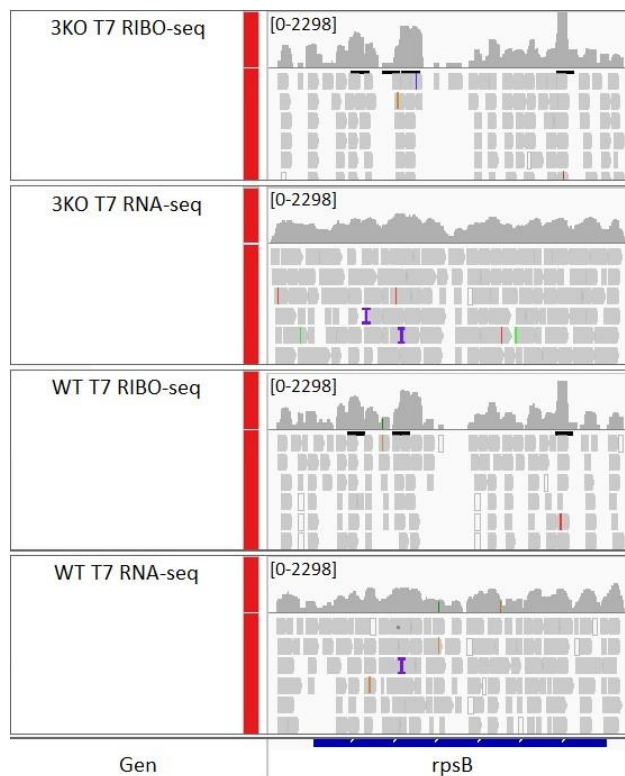
Wyłączenie z analizy RpmEB, RpmGC oraz RpsNB zmienia jedynie grupowanie próbek (**Ryc. 4.20**). Mapa ciepła łączy wówczas oba szczepy w dwugodzinne przedziały, np. WT T0, WT T1, 3KO T0, 3KO T1. Wzór ekspresji na poziomie translacji białek rybosomalnych jest podobny do wzoru ekspresji na poziomie transkrypcji (**Ryc. 4.18**), czyli maleje wraz z postępem procesu sporulacji dla wszystkich r-białek.

Aby sprawdzić czy ekspresja przedstawionych na mapie ciepła (**Ryc. 4.17**) białek rybosomalnych zanika całkowicie w ostatnich dwóch godzinach sporulacji (T6-T7), sprawdzono ilość znormalizowanych odczytów RNA-seq, a także sprawdzono rozmieszczenie zmapowanych odczytów w programie IGV. Generalnie, mimo spadku ilości znormalizowanych odczytów RNA-seq dla r-białek, przekraczały one wartości średnie w każdym punkcie czasowym. Dla lepszej czytelności wyników, w tabeli zawarto jedynie te geny białek rybosomalnych, których odczyty RNA-seq nie przekroczyły średniej w którymkolwiek punkcie czasowym (**Tab. 4.9**).

Tabela 4.9. Wykaz zbadanych genów białek rybosomalnych, których znormalizowane odczyty RNA-seq nie przekroczyły średniej. Krzyżykiem zaznaczono nieprzekroczenie średniej. Gen *spoIIE* zastosowano jako przykład genu, którego ekspresja w konkretnym punkcie czasowym jest istotna dla prawidłowego przebiegu sporulacji.

Gen	3KO T0	3KO T1	3KO T2	3KO T3	3KO T4	3KO T5	3KO T6	3KO T7	WT T0	WT T1	WT T2	WT T3	WT T4	WT T5	WT T6	WT T7
<i>rplGB</i>								✗								
<i>rplI</i>								✗			✗				✗	✗
<i>rpmGA</i>								✗								
<i>rpmGB</i>				✗	✗	✗	✗	✗				✗	✗	✗	✗	✗
<i>rpmJ</i>																✗
<i>rpsD</i>								✗								✗
<i>rpsF</i>																✗
<i>rpsT</i>								✗								✗
<i>spoIIE</i>	✗	✗		✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		✗	✗	✗	✗	✗

Zmapowane odczyty RNA-seq i RIBO-seq widać również w programie IGV, służącym do wizualizacji uzyskanych sekwencji. Dla lepszej czytelności wyników, na rycinie przedstawiono tylko jeden gen, *rpsB*, jako reprezentację (**Ryc. 4.21**).



Rycina 4.21. Wizualizacja zmapowanych odczytów RNA-seq i RIBO-seq do genu *rpsB* w szczepie WT i 3KO w siódmej godzinie po indukcji sporulacji (T7)

Poczynione analizy wskazują, że mimo iż ekspresja genów białek rybosomalnych znacząco spada w trakcie procesu sporulacji, wciąż zachodzi nawet siedem godzin od indukcji sporulacji, chociaż na znacznie niższym poziomie.

2.7. Różnice w ekspresji genów pomiędzy szczepami *B. subtilis* WT i 3KO

Różnica w ekspresji genów na poziomie transkrypcji między szczepem 3KO i WT, zbadana programem DESeq przez mgr Przemysława Latocha, bioinformatyka i członka grupy badawczej dr hab. Agaty Starosty, została wykryta dla 4 genów w fazie logarytmicznej (T0), a także odpowiednio 6, 11, 4, 4, 2, 2 i aż 182 genów dla każdej mijającej godziny trwania procesu sporulacji (T1-T7) (**Tab. 4.10**). Dla lepszej czytelności wyników, w przypadku punktu czasowego T7, w tabeli zawarto jedynie geny, które wykazały ponad 2-krotną różnicę w ekspresji. Różnicę przedstawiono jako stosunek znormalizowanych odczytów RNA-seq szczepu 3KO do znormalizowanych odczytów RNA-seq szczepu WT.

Spośród 182 genów wykazujących różnicę w ekspresji genów na poziomie transkrypcji w punkcie czasowym T7, 67 charakteryzowało się wyższą ekspresją w szczepie

WT, zaś 115 w szczepie 3KO. Geny *ytiB*, *luxS* oraz *yqjN* charakteryzowały się największą różnicą w ekspresji oraz były wykrywane niemal w każdym punkcie czasowym.

Tabela 4.10. Wykaz genów, które wykazały różnicę w ekspresji na poziomie transkrypcji między szczepem badanym (3KO) a kontrolnym (WT) na podstawie analizy RNA-seq. Różnicę przedstawiono jako stosunek znormalizowanych odczytów RNA-seq szczepu 3KO do znormalizowanych odczytów RNA-seq szczepu WT, co oznacza, że wartości >1 wskazują na nadekspresję w komórkach szczepu 3KO (zaznaczone na czerwono), zaś wartości <1 w komórkach szczepu WT (zaznaczone na zielono).

Punkt czasowy	Gen	Krotność różnicy w translacji	Wartość p (test Walda)	Skorygowana wartość p
T0	<i>ytiB</i>	24,2	$6,53 * 10^{-41}$	$2,88 * 10^{-37}$
	<i>luxS</i>	14,2	$8,79 * 10^{-34}$	$1,94 * 10^{-30}$
	<i>yqjN</i>	5,5	$2,59 * 10^{-18}$	$3,81 * 10^{-15}$
	<i>rpmEB</i>	0,005	$2,02 * 10^{-7}$	$2,23 * 10^{-4}$
T1	<i>ytiB</i>	17,1	$3,61 * 10^{-37}$	$1,28 * 10^{-33}$
	<i>luxS</i>	9,6	$6,44 * 10^{-29}$	$1,14 * 10^{-25}$
	<i>yqjN</i>	5,8	$5,30 * 10^{-14}$	$6,27 * 10^{-11}$
	<i>argB</i>	0,3	$1,53 * 10^{-5}$	$7,78 * 10^{-3}$
	<i>yqjL</i>	0,1	$1,32 * 10^{-9}$	$1,17 * 10^{-6}$
	<i>rpmEB</i>	0,03	$8,16 * 10^{-6}$	$4,83 * 10^{-3}$
T2	<i>ytiB</i>	18,6	$3,74 * 10^{-66}$	$1,65 * 10^{-62}$
	<i>luxS</i>	10,8	$8,60 * 10^{-47}$	$1,90 * 10^{-43}$
	<i>yqjN</i>	6,8	$6,93 * 10^{-22}$	$1,02 * 10^{-18}$
	<i>yngl</i>	2,2	$1,35 * 10^{-6}$	$7,45 * 10^{-4}$
	<i>sacT</i>	0,5	$1,18 * 10^{-5}$	$4,74 * 10^{-3}$
	<i>ywcl</i>	0,4	$8,77 * 10^{-6}$	$3,87 * 10^{-3}$
	<i>ydjM</i>	0,3	$2,97 * 10^{-8}$	$2,28 * 10^{-5}$
	<i>yhdX</i>	0,3	$4,73 * 10^{-6}$	$2,32 * 10^{-3}$
	<i>yozc</i>	0,2	$4,92 * 10^{-7}$	$3,10 * 10^{-4}$
	<i>yqjL</i>	0,1	$5,25 * 10^{-11}$	$5,79 * 10^{-8}$
	<i>rpmEB</i>	0,01	$3,09 * 10^{-8}$	$2,28 * 10^{-5}$
T3	<i>ytiB</i>	20,4	$9,29 * 10^{-12}$	$4,10 * 10^{-8}$
	<i>luxS</i>	10,7	$1,71 * 10^{-9}$	$2,51 * 10^{-6}$
	<i>yozc</i>	0,1	$1,26 * 10^{-6}$	$1,39 * 10^{-3}$
	<i>rpmEB</i>	0,02	$9,99 * 10^{-10}$	$2,20 * 10^{-6}$
T4	<i>ytiB</i>	20,2	$2,46 * 10^{-10}$	$5,42 * 10^{-7}$
	<i>luxS</i>	17,5	$2,10 * 10^{-16}$	$9,27 * 10^{-13}$
	<i>yqjN</i>	7,4	$3,61 * 10^{-7}$	$5,32 * 10^{-4}$
	<i>rpmEB</i>	0,02	$4,05 * 10^{-6}$	$4,47 * 10^{-3}$

T5	<i>ytiB</i>	14,2	$7,65 * 10^{-15}$	$3,37 * 10^{-11}$
	<i>luxS</i>	10,9	$2,58 * 10^{-14}$	$5,69 * 10^{-11}$
T6	<i>ytiB</i>	12,9	$4,38 * 10^{-6}$	$9,83 * 10^{-3}$
	<i>luxS</i>	11,0	$6,13 * 10^{-6}$	$9,84 * 10^{-3}$
T7	<i>ytiB</i>	18,5	$1,10 * 10^{-23}$	$7,25 * 10^{-21}$
	<i>luxS</i>	15,4	$4,18 * 10^{-26}$	$5,53 * 10^{-23}$
	<i>gpsB</i>	3,5	$7,18 * 10^{-6}$	$1,29 * 10^{-4}$
	<i>purD</i>	3,4	$3,69 * 10^{-4}$	$3,44 * 10^{-3}$
	<i>rnpB</i>	3,4	$1,80 * 10^{-10}$	$3,97 * 10^{-8}$
	<i>yuzE</i>	3,2	$3,40 * 10^{-4}$	$3,19 * 10^{-3}$
	<i>bsrA</i>	3,0	$1,95 * 10^{-4}$	$2,13 * 10^{-3}$
	<i>dapF</i>	2,9	$2,78 * 10^{-7}$	$1,05 * 10^{-5}$
	<i>cotZ</i>	2,7	$3,05 * 10^{-16}$	$1,01 * 10^{-13}$
	<i>fisB</i>	2,7	$1,17 * 10^{-5}$	$1,99 * 10^{-4}$
	<i>cotW</i>	2,7	$2,38 * 10^{-16}$	$1,01 * 10^{-13}$
	<i>ytcC</i>	2,4	$4,69 * 10^{-8}$	$2,82 * 10^{-6}$
	<i>purQ</i>	2,4	$1,08 * 10^{-4}$	$1,33 * 10^{-3}$
	<i>ywrJ</i>	2,4	$1,33 * 10^{-6}$	$3,44 * 10^{-5}$
	<i>purL</i>	2,4	$1,95 * 10^{-6}$	$4,70 * 10^{-5}$
	<i>yabG</i>	2,3	$1,26 * 10^{-9}$	$1,67 * 10^{-7}$
	<i>ylbE</i>	2,3	$1,09 * 10^{-5}$	$1,88 * 10^{-4}$
	<i>purF</i>	2,3	$3,91 * 10^{-4}$	$3,59 * 10^{-3}$
	<i>yubC</i>	2,2	$3,07 * 10^{-6}$	$6,55 * 10^{-5}$
	<i>cgeC</i>	2,2	$1,14 * 10^{-8}$	$9,41 * 10^{-7}$
	<i>purB</i>	2,2	$2,78 * 10^{-5}$	$3,95 * 10^{-4}$
	<i>spsB</i>	2,2	$4,50 * 10^{-10}$	$7,45 * 10^{-8}$
	<i>purA</i>	2,2	$9,02 * 10^{-8}$	$4,59 * 10^{-6}$
	<i>asd</i>	2,2	$9,02 * 10^{-10}$	$1,33 * 10^{-7}$
	<i>ytIR</i>	2,2	$3,89 * 10^{-4}$	$3,59 * 10^{-3}$
	<i>cgeD</i>	2,2	$9,02 * 10^{-6}$	$1,57 * 10^{-4}$
	<i>yycQ</i>	2,2	$1,43 * 10^{-4}$	$1,69 * 10^{-3}$
	<i>cotY</i>	2,1	$2,64 * 10^{-10}$	$5,00 * 10^{-8}$
	<i>ctaA</i>	2,1	$1,02 * 10^{-3}$	$7,71 * 10^{-3}$
	<i>spoVFA</i>	2,1	$4,49 * 10^{-9}$	$4,35 * 10^{-7}$
<i>spoVIF</i>	2,1	$1,84 * 10^{-9}$	$2,03 * 10^{-7}$	
<i>ispH</i>	2,1	$2,04 * 10^{-5}$	$3,10 * 10^{-4}$	
<i>yqcl</i>	2,1	$1,24 * 10^{-4}$	$1,49 * 10^{-3}$	
<i>cotV</i>	2,1	$1,62 * 10^{-7}$	$6,93 * 10^{-6}$	
<i>yodH</i>	2,1	$2,29 * 10^{-7}$	$9,21 * 10^{-6}$	

<i>cotX</i>	2,1	$4,60 * 10^{-9}$	$4,35 * 10^{-7}$
<i>yqfQ</i>	2,1	$1,45 * 10^{-7}$	$6,64 * 10^{-6}$
<i>spsE</i>	2,1	$1,73 * 10^{-8}$	$1,20 * 10^{-6}$
<i>rplW</i>	2,1	$1,50 * 10^{-7}$	$6,64 * 10^{-6}$
<i>infA</i>	2,1	$2,71 * 10^{-5}$	$3,90 * 10^{-4}$
<i>spsL</i>	2,1	$8,02 * 10^{-8}$	$4,42 * 10^{-6}$
<i>rpsM</i>	2,1	$5,06 * 10^{-6}$	$9,57 * 10^{-5}$
<i>adk</i>	2,1	$6,19 * 10^{-6}$	$1,14 * 10^{-4}$
<i>secY</i>	2,0	$8,31 * 10^{-6}$	$1,47 * 10^{-4}$
<i>yfnE</i>	2,0	$1,07 * 10^{-7}$	$5,26 * 10^{-6}$
<i>spsD</i>	2,0	$3,75 * 10^{-8}$	$2,37 * 10^{-6}$
<i>yhco</i>	2,0	$8,98 * 10^{-8}$	$4,59 * 10^{-6}$
<i>yobW</i>	2,0	$2,70 * 10^{-5}$	$3,90 * 10^{-4}$
<i>ylbD</i>	2,0	$1,90 * 10^{-6}$	$4,65 * 10^{-5}$
<i>spsG</i>	2,0	$7,39 * 10^{-8}$	$4,25 * 10^{-6}$
<i>ymfD</i>	0,5	$1,56 * 10^{-4}$	$1,75 * 10^{-3}$
<i>yrzQ</i>	0,5	$1,44 * 10^{-5}$	$2,32 * 10^{-4}$
<i>yusG</i>	0,5	$1,18 * 10^{-3}$	$8,72 * 10^{-3}$
<i>yrrD</i>	0,5	$1,07 * 10^{-6}$	$3,08 * 10^{-5}$
<i>tcyA</i>	0,5	$5,22 * 10^{-4}$	$4,60 * 10^{-3}$
<i>spoVAF</i>	0,5	$4,93 * 10^{-5}$	$6,28 * 10^{-4}$
<i>ylaJ</i>	0,5	$5,42 * 10^{-4}$	$4,72 * 10^{-3}$
<i>yhca</i>	0,5	$1,72 * 10^{-5}$	$2,69 * 10^{-4}$
<i>sspA</i>	0,5	$1,33 * 10^{-8}$	$1,03 * 10^{-6}$
<i>yugJ</i>	0,4	$8,04 * 10^{-4}$	$6,45 * 10^{-3}$
<i>ybfB</i>	0,4	$2,62 * 10^{-6}$	$5,88 * 10^{-5}$
<i>csfG</i>	0,4	$6,29 * 10^{-7}$	$2,15 * 10^{-5}$
<i>yhbJ</i>	0,4	$3,65 * 10^{-5}$	$4,93 * 10^{-4}$
<i>glnQ</i>	0,4	$6,87 * 10^{-4}$	$5,55 * 10^{-3}$
<i>yuzA</i>	0,4	$1,65 * 10^{-6}$	$4,13 * 10^{-5}$
<i>lytH</i>	0,4	$3,91 * 10^{-5}$	$5,22 * 10^{-4}$
<i>sspD</i>	0,4	$6,31 * 10^{-7}$	$2,15 * 10^{-5}$
<i>yhcb</i>	0,4	$4,82 * 10^{-5}$	$6,20 * 10^{-4}$
<i>spoVAEA</i>	0,4	$2,35 * 10^{-4}$	$2,48 * 10^{-3}$
<i>ypeB</i>	0,4	$3,40 * 10^{-6}$	$6,93 * 10^{-5}$
<i>sspB</i>	0,4	$1,10 * 10^{-8}$	$9,41 * 10^{-7}$
<i>tepA</i>	0,4	$6,08 * 10^{-4}$	$5,13 * 10^{-3}$
<i>glcU</i>	0,4	$2,38 * 10^{-4}$	$2,48 * 10^{-3}$
<i>glnH</i>	0,4	$7,68 * 10^{-7}$	$2,41 * 10^{-5}$

<i>sspN</i>	0,4	$3,36 * 10^{-6}$	$6,93 * 10^{-5}$
<i>spoVAD</i>	0,4	$1,12 * 10^{-6}$	$3,15 * 10^{-5}$
<i>yveA</i>	0,4	$3,48 * 10^{-6}$	$6,99 * 10^{-5}$
<i>ywcl</i>	0,4	$9,23 * 10^{-7}$	$2,78 * 10^{-5}$
<i>yfkD</i>	0,4	$1,47 * 10^{-5}$	$2,34 * 10^{-4}$
<i>pdaA</i>	0,4	$2,87 * 10^{-5}$	$4,00 * 10^{-4}$
<i>gdh</i>	0,4	$4,05 * 10^{-6}$	$8,00 * 10^{-5}$
<i>spoVAC</i>	0,4	$2,96 * 10^{-6}$	$6,42 * 10^{-5}$
<i>yitF</i>	0,4	$1,49 * 10^{-4}$	$1,70 * 10^{-3}$
<i>yzkP</i>	0,3	$1,70 * 10^{-9}$	$2,03 * 10^{-7}$
<i>sspF</i>	0,3	$1,70 * 10^{-15}$	$4,50 * 10^{-13}$
<i>gpr</i>	0,3	$7,81 * 10^{-7}$	$2,41 * 10^{-5}$
<i>treP</i>	0,3	$3,17 * 10^{-4}$	$3,04 * 10^{-3}$
<i>yteA</i>	0,3	$2,14 * 10^{-7}$	$8,84 * 10^{-6}$
<i>ythB</i>	0,3	$3,12 * 10^{-4}$	$3,02 * 10^{-3}$
<i>spoVAEB</i>	0,3	$2,22 * 10^{-6}$	$5,16 * 10^{-5}$
<i>sleB</i>	0,3	$1,82 * 10^{-8}$	$1,21 * 10^{-6}$
<i>spoVAB</i>	0,3	$2,56 * 10^{-5}$	$3,76 * 10^{-4}$
<i>yfiG</i>	0,2	$6,49 * 10^{-7}$	$2,15 * 10^{-5}$

Z kolei różnica w translacji, zbadana programem Riborex również przez mgr Przemysława Latocha, została wykryta jedynie dla 65 genów w punkcie czasowym T7, czyli po siedmiu godzinach od indukcji procesu sporulacji (**Tab. 4.11**). Dla 38 genów poziom translacji był wyższy w szczepie kontrolnym WT, zaś dla 27 genów był on wyższy w szczepie badanym 3KO.

Tabela 4.11. Wykaz genów, które wykazały różnicę w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO). Różnicę w translacji przedstawiono w stosunku do translacji szczepu dzikiego (WT), co oznacza, że wartości >1 wskazują na translację wydajniejszą w komórkach szczepu dzikiego (WT) (zaznaczono na czerwono), zaś wartości <1 w komórkach szczepu badanego (3KO) (zaznaczono na zielono).

Gen	Krotność różnicy w translacji	Wartość p (test Walda)	Skorygowana wartość p
<i>yurS</i>	7,5	$1,29 * 10^{-14}$	$1,11 * 10^{-11}$
<i>ylqC</i>	6,8	$3,19 * 10^{-7}$	$5,00 * 10^{-5}$
<i>gyrA</i>	5,7	$7,76 * 10^{-10}$	$2,68 * 10^{-7}$
<i>yloS</i>	5,6	$1,71 * 10^{-6}$	$1,55 * 10^{-4}$
<i>mazF</i>	5,5	$4,02 * 10^{-5}$	$2,09 * 10^{-3}$
<i>cotW</i>	5,4	$1,86 * 10^{-17}$	$3,20 * 10^{-14}$

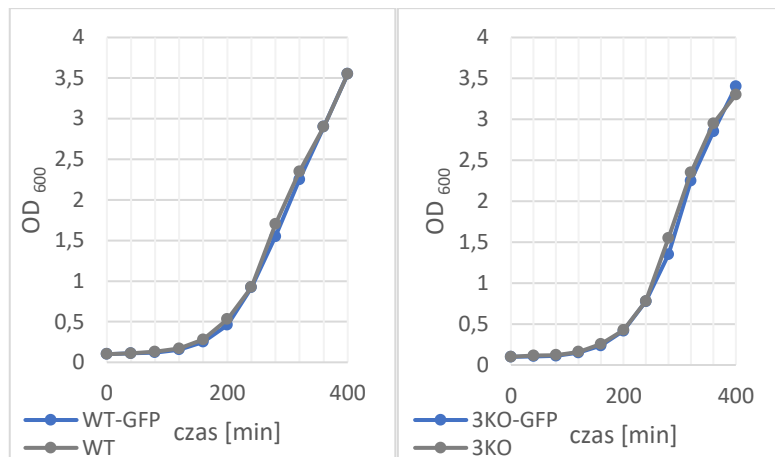
<i>ybzG</i>	5,3	$5,03 * 10^{-7}$	$6,89 * 10^{-5}$
<i>fadR</i>	5,2	$8,11 * 10^{-5}$	$3,33 * 10^{-3}$
<i>cgeB</i>	5,0	$3,68 * 10^{-13}$	$2,12 * 10^{-10}$
<i>yycQ</i>	5,0	$1,01 * 10^{-6}$	$1,16 * 10^{-4}$
<i>cotP</i>	4,3	$1,19 * 10^{-4}$	$4,36 * 10^{-3}$
<i>ylxM</i>	4,3	$3,09 * 10^{-4}$	$7,96 * 10^{-3}$
<i>pbpA</i>	4,2	$8,46 * 10^{-5}$	$3,40 * 10^{-3}$
<i>yocA</i>	4,1	$2,23 * 10^{-4}$	$6,53 * 10^{-3}$
<i>ytiB</i>	4,0	$1,92 * 10^{-4}$	$5,90 * 10^{-3}$
<i>gpsB</i>	4,0	$2,42 * 10^{-4}$	$6,84 * 10^{-3}$
<i>fisB</i>	3,9	$6,86 * 10^{-5}$	$2,89 * 10^{-3}$
<i>spsF</i>	3,7	$9,40 * 10^{-10}$	$2,70 * 10^{-7}$
<i>spsL</i>	3,3	$3,67 * 10^{-9}$	$7,91 * 10^{-7}$
<i>cgeD</i>	3,3	$3,06 * 10^{-6}$	$2,64 * 10^{-4}$
<i>secY</i>	3,1	$6,22 * 10^{-6}$	$4,88 * 10^{-4}$
<i>map</i>	3,1	$1,97 * 10^{-5}$	$1,21 * 10^{-3}$
<i>purL</i>	3,1	$4,58 * 10^{-5}$	$2,14 * 10^{-3}$
<i>ylbE</i>	3,0	$2,70 * 10^{-4}$	$7,27 * 10^{-3}$
<i>yvyG</i>	3,0	$3,32 * 10^{-4}$	$8,41 * 10^{-3}$
<i>spsG</i>	2,9	$1,58 * 10^{-6}$	$1,55 * 10^{-4}$
<i>spsB</i>	2,7	$6,92 * 10^{-8}$	$1,19 * 10^{-5}$
<i>cotV</i>	2,7	$7,36 * 10^{-6}$	$5,52 * 10^{-4}$
<i>rpmC</i>	2,7	$5,52 * 10^{-5}$	$2,38 * 10^{-3}$
<i>ribH</i>	2,7	$1,32 * 10^{-4}$	$4,65 * 10^{-3}$
<i>cgeC</i>	2,6	$3,66 * 10^{-6}$	$3,00 * 10^{-4}$
<i>ytcC</i>	2,6	$1,50 * 10^{-5}$	$9,98 * 10^{-4}$
<i>atpC</i>	2,6	$1,23 * 10^{-4}$	$4,42 * 10^{-3}$
<i>amyX</i>	2,6	$1,62 * 10^{-4}$	$5,38 * 10^{-3}$
<i>yheD</i>	2,3	$4,37 * 10^{-5}$	$2,14 * 10^{-3}$
<i>cotR</i>	2,2	$1,39 * 10^{-4}$	$4,69 * 10^{-3}$
<i>yfnF</i>	2,1	$2,51 * 10^{-4}$	$6,97 * 10^{-3}$
<i>cotY</i>	2,0	$3,94 * 10^{-4}$	$9,57 * 10^{-3}$
<i>cgeA</i>	0,5	$1,67 * 10^{-4}$	$5,42 * 10^{-3}$
<i>ywsB</i>	0,5	$2,74 * 10^{-4}$	$7,27 * 10^{-3}$
<i>ykvP</i>	0,4	$5,19 * 10^{-7}$	$6,89 * 10^{-5}$
<i>secG</i>	0,4	$3,44 * 10^{-5}$	$1,98 * 10^{-3}$
<i>rpmE</i>	0,4	$4,06 * 10^{-5}$	$2,09 * 10^{-3}$
<i>ykzI</i>	0,4	$4,56 * 10^{-5}$	$2,14 * 10^{-3}$
<i>yczM</i>	0,4	$4,92 * 10^{-5}$	$2,23 * 10^{-3}$

<i>sspB</i>	0,4	$9,03 * 10^{-5}$	$3,49 * 10^{-3}$
<i>yjcZ</i>	0,4	$9,12 * 10^{-5}$	$3,49 * 10^{-3}$
<i>rpsI</i>	0,4	$1,35 * 10^{-4}$	$4,67 * 10^{-3}$
<i>ptsH</i>	0,4	$2,74 * 10^{-4}$	$7,27 * 10^{-3}$
<i>cysK</i>	0,4	$3,78 * 10^{-4}$	$9,46 * 10^{-3}$
<i>yueG</i>	0,4	$3,89 * 10^{-4}$	$9,57 * 10^{-3}$
<i>ykzV</i>	0,3	$1,10 * 10^{-8}$	$2,10 * 10^{-6}$
<i>sscA</i>	0,3	$1,08 * 10^{-6}$	$1,17 * 10^{-4}$
<i>ymxH</i>	0,3	$1,62 * 10^{-6}$	$1,55 * 10^{-4}$
<i>sspF</i>	0,3	$1,05 * 10^{-5}$	$7,52 * 10^{-4}$
<i>phrI</i>	0,3	$1,87 * 10^{-4}$	$5,87 * 10^{-3}$
<i>yosA</i>	0,2	$1,09 * 10^{-10}$	$4,71 * 10^{-8}$
<i>ywzA</i>	0,2	$1,93 * 10^{-9}$	$4,75 * 10^{-7}$
<i>yvgN</i>	0,2	$1,19 * 10^{-5}$	$8,24 * 10^{-4}$
<i>ybgB</i>	0,2	$1,79 * 10^{-5}$	$1,15 * 10^{-3}$
<i>glpP dependent leader</i>	0,2	$2,98 * 10^{-5}$	$1,77 * 10^{-3}$
<i>yheF</i>	0,2	$3,95 * 10^{-5}$	$2,09 * 10^{-3}$
<i>phrF</i>	0,2	$4,13 * 10^{-5}$	$2,09 * 10^{-3}$
<i>treP</i>	0,2	$5,31 * 10^{-5}$	$2,35 * 10^{-3}$
<i>yhdA</i>	0,2	$1,10 * 10^{-4}$	$4,11 * 10^{-3}$

3. Obserwacje procesu sporulacji pod mikroskopem konfokalnym

Do obserwacji mikroskopowych użyto barwników SynaptoRed w celu wizualizacji postępu procesu sporulacji, wykorzystując fakt, iż barwi on błony komórkowe; DAPI w celu wizualizacji chromosomu oraz OPP-Alexa w celu wizualizacji miejsc aktywnej translacji, a także markera molekularnego GFP w fuzji z białkiem rybosomalnym RpsB w celu detekcji lokalizacji rybosomów. Aby sprawdzić czy modyfikacja genetyczna, której rezultatem była fuzja białka RpsB z GFP niesie ze sobą niepożądane skutki, np. wpływając w sposób uboczny na wzrost i rozwój komórek bakteryjnych, wykonano krzywe wzrostu dla szczepów WT, WT-GFP, 3KO i 3KO-GFP (**Ryc. 4.22**).

Porównanie krzywych wykazało, że szczepy WT-GFP i 3KO-GFP rosną podobnie do swoich odpowiedników pozbawionych modyfikacji genetycznej znakującej białko rybosomalne RpsB. Tym samym, zdecydowano się zastosować szczepy WT-GFP i 3KO-GFP, jako reprezentacja szczepów WT i 3KO, do lokalizacji rybosomów pod mikroskopem konfokalnym.



Rycina 4.22. Krzywe wzrostu porównujące szczepy WT i WT-GFP oraz 3KO i 3KO-GFP hodowane w pożywce CH

Ponieważ fluorochrom Alexa Fluor 488 charakteryzuje się emisją światła o długości fali zbliżonej z GFP (Savchuk i in., 2019), uniemożliwiało to zastosowanie szczepów WT-GFP i 3KO-GFP przy barwieniu OPP-Alexa. Ponadto przyżyciowego barwnika SynaptoRed nie można było zastosować dla utrwalonych podczas barwienia OPP-Alexa komórek. Tym samym, do obserwacji mikroskopowych zdecydowano się użyć szczepów *B. subtilis* WT-GFP oraz 3KO-GFP w przypadku barwienia SynaptoRed i DAPI lub szczepów WT oraz 3KO w przypadku barwienia OPP-Alexa i DAPI.

Sporulujące komórki szczepu WT *Bacillus subtilis*, obserwowane pod mikroskopem konfokalnym, wykazały cechy morfologiczne typowe dla prawidłowego przebiegu procesu sporulacji (Errington, 2003; Lopez-Garrido i in., 2018). W fazie logarytmicznej komórki miały kształt laseczki o średniej długości 3,2 μm (Tab. 4.12). Na początku procesu sporulacji (T1) ich długość zmniejszyła się do 2,1 μm bez innych widocznych zmian morfologicznych (Ryc. 4.23). Po dwóch godzinach od indukcji sporulacji (T2) komórki zwiększyły swoją długość do 2,7 μm i utworzyły asymetryczną przegrodę, która oddzielała półkulistą presporę od komórki macierzystej, co wyznacza II etap sporulacji. Według literatury, w tym momencie chromosomy są już przebudowane w wydłużone włókno osiowe, przy czym około 1/3 części chromosomu przeznaczanego dla spory, znajduje się w jej wnętrzu, zaś około 2/3 chromosomu aktywnie przemieszcza się z komórki macierzystej do przedziału prespory przy udziale translokazy SpoIIIE (Errington, 2003; Lopez-Garrido i in., 2018).

Tabela 4.12. Średnie długości komórek *B. subtilis*: kontrolny (WT) i badany (3KO) w fazie logarytmicznej (T0), a także po jednej (T1) i dwóch godzinach od indukcji sporulacji (T2) wyrażone w μm

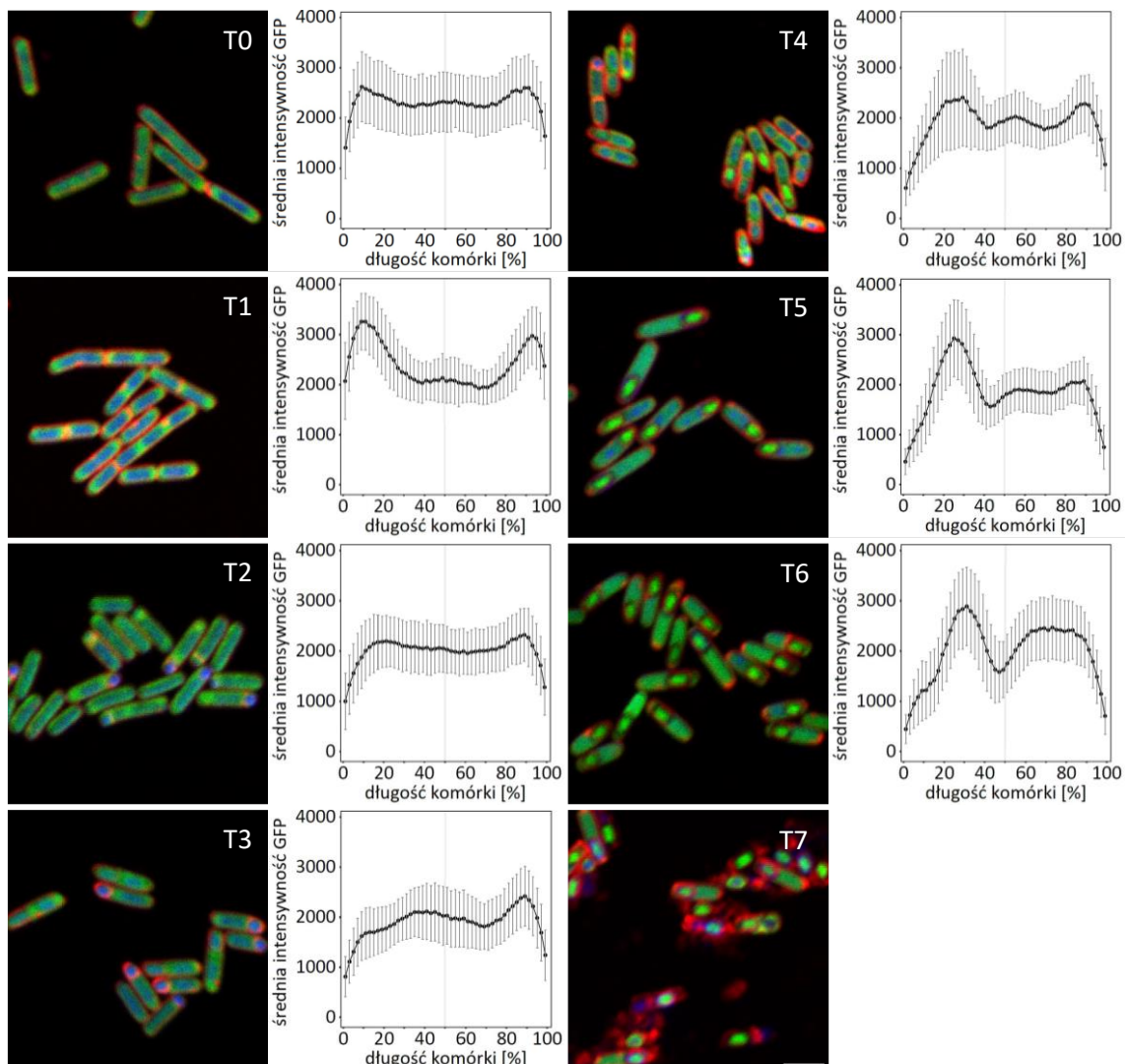
	T0	T1	T2
WT	$3,16 \pm 0,791$	$2,13 \pm 0,506$	$2,66 \pm 0,477$
3KO	$3,14 \pm 0,755$	$2,15 \pm 0,538$	$2,68 \pm 0,550$

Począwszy od trzeciej godziny sporulacji (T3) można było zaobserwować etap III, czyli proces pochłaniania prespory przez komórkę macierzystą (**Ryc. 4.23**). Ściana komórkowa septy ulega wówczas przekształceniom (Khanna i in., 2019), a krawędzie błon komórki macierzystej migrują wokół cytozolu prespory w procesie podobnym do fagocytozy (Lopez-Garrido i in., 2018). Kiedy przednie krawędzie migrującej błony spotykają się na wierzchołku prespory, łączą się, uwalniając ją do cytoplazmy komórki macierzystej. W konsekwencji prespora jest całkowicie zamknięta w cytoplazmie komórki macierzystej i oddzielona od niej dwiema błonami o przeciwnej topologii (Lopez-Garrido i in., 2018).

Po pięciu godzinach sporulacji (T5), prespora była zlokalizowana nieco dalej od krawędzi komórki macierzystej, z powodu syntezy wokół niej kory oraz płaszczka (odpowiednio etapy IV i V) (**Ryc. 4.23**). VI etap sporulacji, czyli dojrzewanie spor, jest na zdjęciach mikroskopowych trudny do odróżnienia od poprzednich etapów, ponieważ zmiany morfologiczne nie są widoczne. Jednak siedem godzin po indukcji sporulacji (T7) można było zaobserwować pierwsze uwolnione spory oraz wybarwione na czerwono przez SynaptoRed pozostałości ścian komórkowych, co przypada na etap VII, w którym zachodzi liza komórki macierzystej.

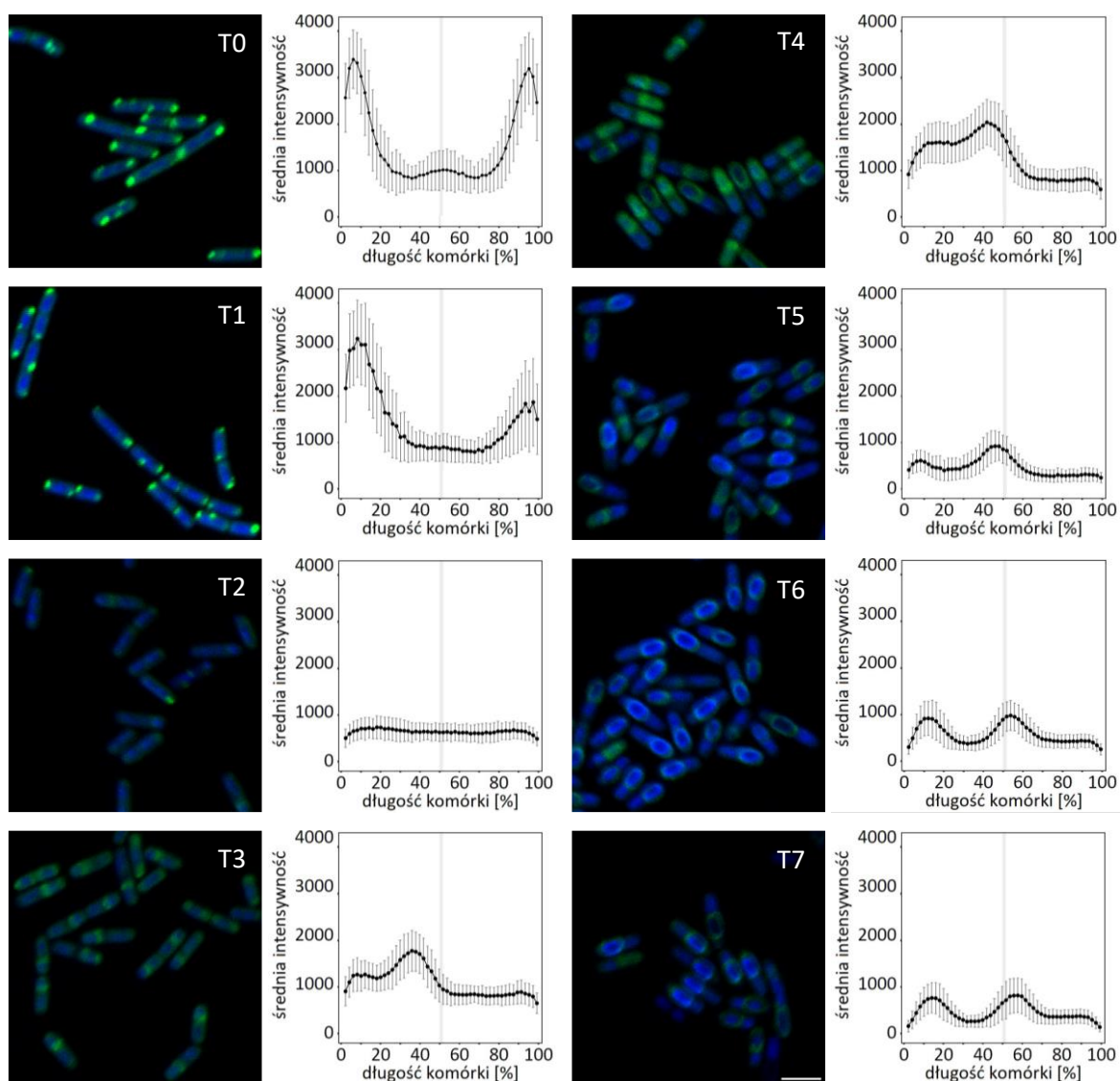
Fluorescencja RpsB-GFP, która wskazuje lokalizację rybosomów, była wykrywana na całej długości komórek szczepu WT *B. subtilis* podczas wzrostu logarytmicznego (T0) ze słabo wyróżniającymi się skupiskami na obu biegunach komórki (**Ryc. 4.23**). W pierwszej godzinie sporulacji (T1), akumulacja sygnału GFP na biegunach komórki gwałtownie wzrastała i była wyraźnie widoczna na zdjęciach mikroskopowych, co może być spowodowane skróceniem się komórek, przypadającym na ten właśnie czas (**Tab. 4.12**) i/lub tworzeniem włókna osiowego. W drugiej i trzeciej godzinie sporulacji (T2-T3) w presporach można było zaobserwować akumulację fluorescencji DAPI, która wizualizuje lokalizację bakteryjnego DNA, co koresponduje z przypadającą na ten czas translokacją DNA do wnętrza prespory. Fluorescencja GFP w presporach jest wówczas ograniczona do

obrzeży tego kompartmentu, zaś w komórce macierzystej jest dość równomierna na całej długości z akumulacją na przeciwległym biegunie. Generalnie obserwowano negatywną korelację sygnału GFP z DAPI, która polegała na tym, że miejsca cechujące się silną fluorescencją GFP charakteryzowały się jednocześnie słabą fluorescencją DAPI i odwrotnie. W czwartej godzinie sporulacji (T4) można było zaobserwować pierwsze komórki zawierające w pełni pochłonięte prespory, które rozpoczęły syntezę płaszczka i kory, o czym świadczy odsunięcie owalnej prespory od ściany komórki macierzystej. W komórkach na tym stadium zaawansowania sporulacji, fluorescencja GFP w presporze jest bardzo intensywna i przewyższa tę w komórce macierzystej. W kolejnych godzinach sporulacji, wzrasta ilość komórek o takim wzorze fluorescencji GFP.



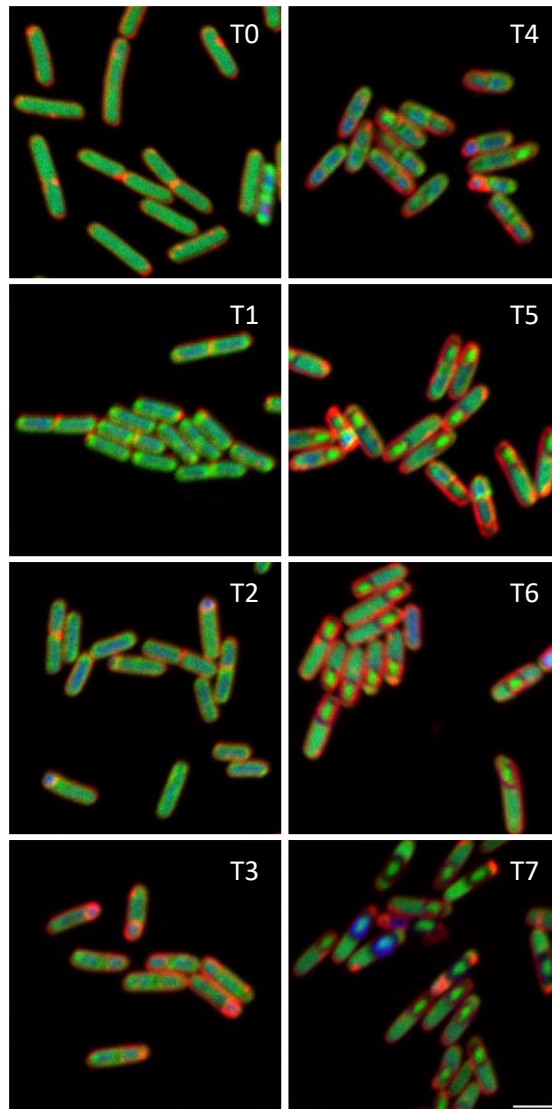
Rycina 4.23. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu WT *B. subtilis* przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i SynaptoRed oraz wyznakowane RpsB-GFP wraz z korespondującymi z nimi wykresami średniego natężenia fluorescencji RpsB-GFP w komórce. Pasek skali odpowiada 2 μm .

Fluorescencja barwnika Alexa, który uwidacznia świeżo syntezowane peptydy znakowane OPP, była wykrywana na całej długości komórek szczepu WT *B. subtilis* podczas wzrostu logarytmicznego (T0), przy czym tworzyła wyraźnie widoczne dwa skupiska na przeciwnych biegunach komórki (**Ryc. 4.24**). Poza tymi skupiskami dominowała fluorescencja barwnika DAPI. Na początku procesu sporulacji oba skupiska intensywnej translacji pojedynczo zanikały, najpierw jedno z nich w pierwszej godzinie sporulacji (T1), a następnie drugie w drugiej godzinie (T2). Generalnie obserwowano negatywną korelację sygnału OPP-Alexa z DAPI, która polegała na tym, że miejsca cechujące się silną fluorescencją OPP-Alexa charakteryzowały się jednocześnie słabą fluorescencją DAPI i odwrotnie. W trzeciej godzinie po indukcji sporulacji (T3) skupisko intensywnej fluorescencji OPP-Alexa pojawia się w pobliżu asymetrycznie zlokalizowanej septy, a także śledzi ją w jej wędrówce wokół prespory podczas procesu pochłaniania. Można również zaobserwować, że intensywność fluorescencji OPP-Alexa jest wówczas często wyższa w presporze niż w komórce macierzystej, co jest prawdopodobnie spowodowane mniejszą objętością prespory. W czwartej godzinie sporulacji (T4) można było zaobserwować pierwsze komórki, w których sygnał OPP-Alexa ograniczał się do otaczania prespory, która jest już w pełni pochłonięta przez komórkę macierzystą i prawdopodobnie rozpoczęła tworzenie płaszczka i kory, o czym świadczy odsunięcie jej od brzegu komórki macierzystej. W kolejnych godzinach sporulacji (T5-T6) wzrastała ilość komórek, w których fluorescencja OPP-Alexa coraz bardziej ograniczała się do otoczki wokół prespory. W siódmej godzinie sporulacji (T7) można zaobserwować spadek intensywności fluorescencji OPP-Alexa wokół prespory w porównaniu do poprzedniej godziny, co prawdopodobnie oznacza kończenie składania płaszczka i kory.



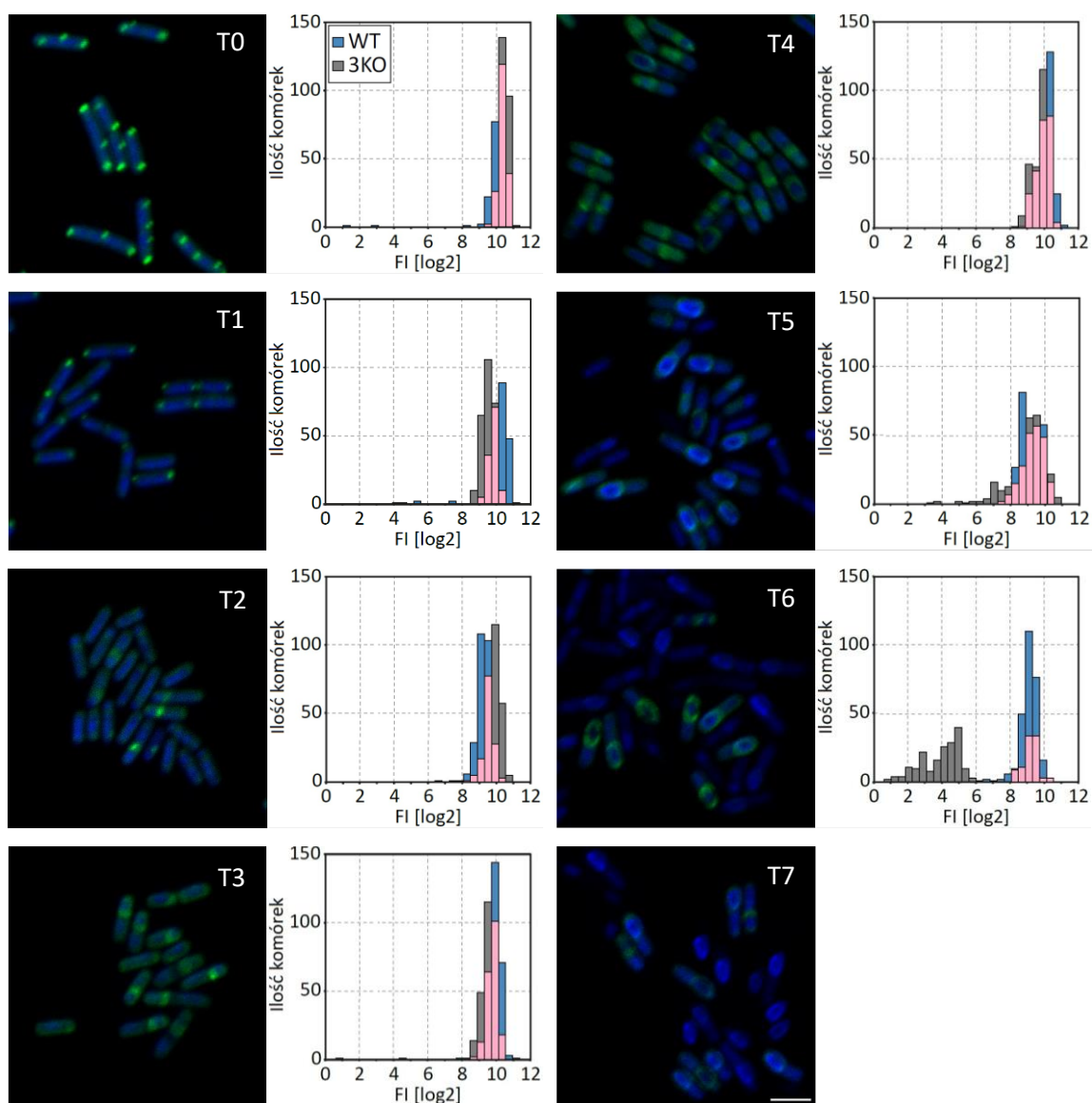
Rycina 4.24. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu WT *B. subtilis* przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i OPP-Alexa oraz korespondujące z nimi wykresy średniego natężenia fluorescencji OPP w komórce. Pasek skali odpowiada 2 μm .

Kształt i wielkość komórek szczepu 3KO *B. subtilis* nie różniły się od szczepu dzikiego, podobnie jak przebieg sporulacji i wzór fluorescencji GFP (Tab. 4.12, Ryc. 4.25). Wydaje się jednak, że w siódmej godzinie sporulacji w przypadku szczepu 3KO rzadziej jest obserwowana liza komórek macierzystych w porównaniu ze szczepem WT.



Rycina 4.25. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu 3KO *B. subtilis* przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i SynaptoRed oraz wyznakowane RpsB-GFP. Pasek skali odpowiada 2 μm .

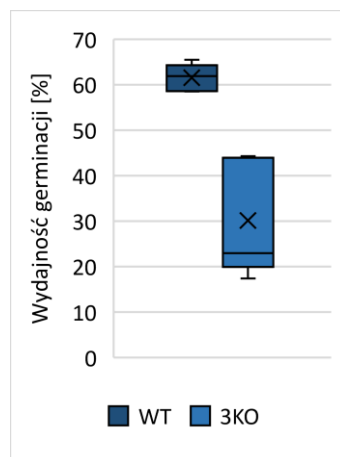
Intensywność emisji OPP-Alexa w komórkach WT i 3KO, we wszystkich punktach czasowych za wyjątkiem szóstej godziny sporulacji (T6), była zbliżona do siebie, chociaż nie pokrywała się całkowicie (**Ryc. 4.26**). W szóstej godzinie sporulacji wykryto obecność subpopulacji komórek 3KO, która cechowała się znacznie mniejszą intensywnością emisji OPP-Alexa. Wskazuje to, że istnieje subpopulacja komórek 3KO, która w końcowej fazie sporulacji przeprowadza translację znacznie mniej wydajnie. Ponadto można zauważyć, że ogólna intensywność emisji OPP-Alexa wahała się na tym samym poziomie przez większość punktów czasowych, ale uległa zmniejszeniu w piątej godzinie sporulacji (T5) zarówno dla komórek WT, jak i 3KO.



Rycina 4.26. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu 3KO *B. subtilis* przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i OPP-Alexa oraz korespondujące z nimi histogramy przedstawiające porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji OPP-Alexa w obu szczepach. Kolorem różowym zaznaczono obszar wspólny dla obu szczepów. Pasek skali odpowiada 2 μm.

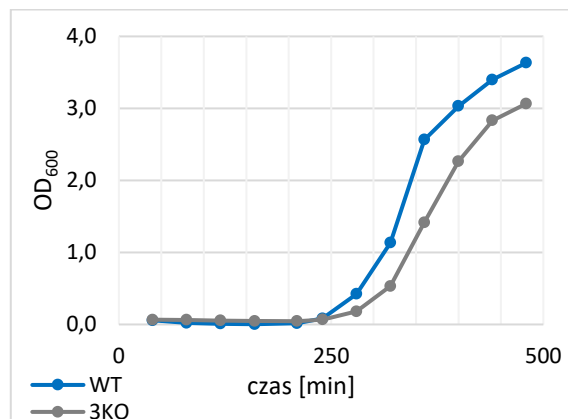
4. Porównanie germinacji spor szczepów *B. subtilis* WT i 3KO

Wykryto istotne statystycznie różnice w germinacji spor obu przebadanych szczepów, przy czym spory szczepu 3KO wykazały znacząco mniejszą wydajność germinacji (test U Manna–Whitneya; $U = 0$; $p < 0,05$) (**Ryc. 4.27**). Średnia wydajność germinacji spor szczepu WT wynosiła $61,5\% \pm 2,98$, zaś dla spor szczepu 3KO była niemal dwukrotnie mniejsza i wynosiła $30,2\% \pm 12,78$.



Rycina 4.27. Histogram wydajności germinacji spor uzyskanych ze szczepów *B. subtilis*: kontrolnego (WT) i badanego (3KO)

Różnice w germinacji potwierdziły również krzywe wzrostu dla spor (**Ryc. 4.28**). Dla obu szczepów gęstość optyczna początkowo nieznacznie malała, co jest spowodowane morfologicznymi zmianami w płaszczu i korze (Sella i in., 2014). Po 210 minutach OD_{600} ponownie wzrastało, przy czym gęstość optyczna dla szczepu 3KO była wyraźnie niższa względem szczepu WT. Tendencja ta utrzymywała się przez wszystkie kolejne punkty czasowe.

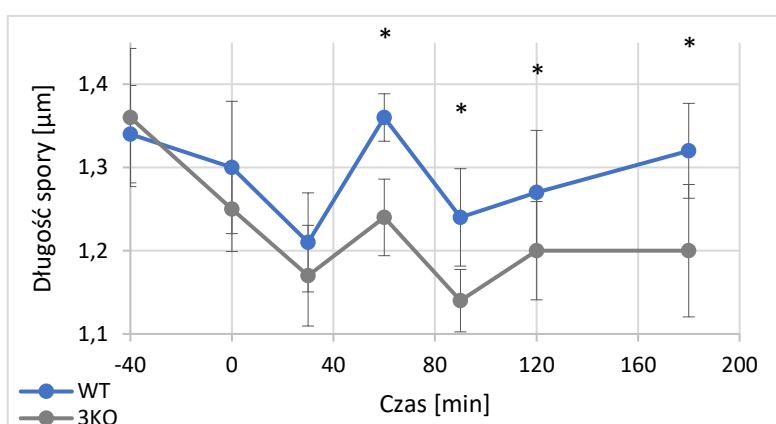


Rycina 4.28. Krzywa wzrostu dla spor uzyskanych ze szczepów *B. subtilis*: kontrolnego (WT) i badanego (3KO)

Z powodu zaobserwowania wyraźnych różnic w germinacji spor, przeprowadzono obserwacje mikroskopowe również dla tego procesu. Obserwacji poddano dojrzałe, całonocne spory przed (T-1) i po (T0) inkubacji w wysokiej temperaturze 90°C przez 40 minut, a także po 30, 60, 90, 120 i 180 minutach od indukcji germinacji (T1-T4, T6). Za moment indukcji germinacji uznaje się w niniejszej pracy moment założenia hodowli w pożywce LB z dojrzałych, całonocnych spor, potraktowanych działaniem wysokiej temperatury.

Tabela 4.13. Średnie długości spor *B. subtilis*: kontrolny (WT) i badany (3KO) w trakcie trwania procesu germinacji wyrażone w μm . Różnice istotne statystycznie oznaczono poprzez „*” (p-value < 0,05).

Punkt czasowy	T-1	T0	T1	T2	T3	T4	T6
Czas od indukcji germinacji [min]	- 40	0	30	60	90	120	180
WT	1,34 ± 0,117	1,30 ± 0,159	1,21 ± 0,119	1,36 ± 0,147	1,24 ± 0,117	1,27 ± 0,149	1,32 ± 0,114
3KO	1,36 ± 0,166	1,25 ± 0,102	1,17 ± 0,121	1,24 ± 0,092	1,14 ± 0,075	1,20 ± 0,118	1,20 ± 0,159
Istotność statystyczna				*	*	*	*



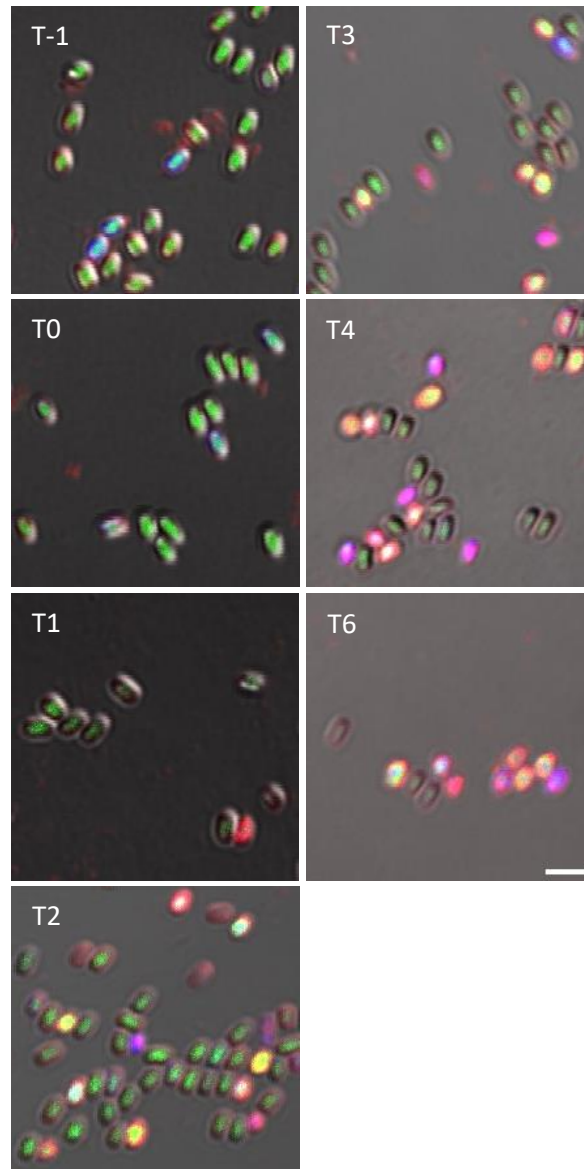
Rycina 4.29. Wykres zmian długości spor *B. subtilis*: kontrolny (WT) i badany (3KO) w trakcie trwania procesu germinacji. Różnice istotne statystycznie oznaczono poprzez „*” (p-value < 0,05).

Na podstawie zdjęć wykonanych pod mikroskopem konfokalnym dokonano pomiaru długości spor szczepów WT i 3KO (Tab. 4.13). Spory szczepu 3KO cechowały się średnio mniejszą długością niż spory szczepu WT, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie przed (T0) ani po 30 minutach od indukcji germinacji (T1). Spory obu szczepów cechowały się podobnym wzorem zmian w długości, tj. naprzemiennym spadkiem i wzrostem tej wartości przez pierwsze dwie godziny od indukcji germinacji (T1-T4) (Ryc. 4.29). Jednakże począwszy od 60 minut od indukcji germinacji różnica w długości spor pomiędzy szczepami

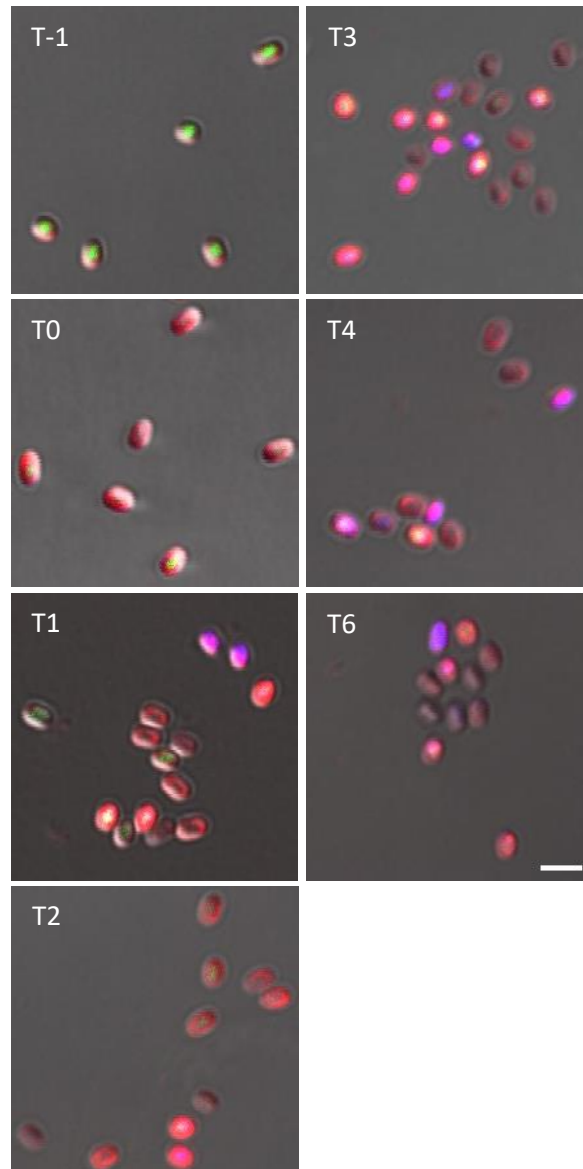
jest już istotna statystycznie. Ponadto, wydaje się, że spory szczepu 3KO nie zwiększają swojej długości w trzeciej godzinie po indukcji germinacji (T6) w przeciwieństwie do spor szczepu WT.

W celu obserwacji mikroskopowych procesu germinacji, spory były wybarwiane barwnikiem SynaptoRed w celu wizualizacji błon komórkowych, DAPI w celu wizualizacji chromosomu oraz OPP-Alexa w celu wizualizacji miejsc aktywnej translacji, a także markera molekularnego GFP w fuzji z białkiem rybosomalnym RpsB w celu detekcji lokalizacji rybosomów, analogicznie jak w przypadku obserwacji mikroskopowych procesu sporulacji. Tak jak poprzednio, szczepy WT-GFP i 3KO-GFP użyto jako reprezentacja szczepów WT i 3KO do lokalizacji rybosomów pod mikroskopem konfokalnym. Tym samym, do obserwacji mikroskopowych szczepy WT-GFP oraz 3KO-GFP barwiono SynaptoRed i DAPI, zaś szczepy WT oraz 3KO barwiono OPP-Alexa i DAPI.

Analizując zdjęcia wykonane pod mikroskopem konfokalnym, zaobserwowano różnicę w wybarwieniu spor, która utrzymywała się przez wszystkie zbadane punkty czasowe (T0-T6) za wyjątkiem stanu sprzed inkubacji w wysokiej temperaturze (T-1). Generalnie, spory szczepu WT wydają się wyraźnie częściej charakteryzować zielonym wybarwieniem (**Ryc. 4.30**), zaś szczepu 3KO czerwonym (**Ryc. 4.31**).

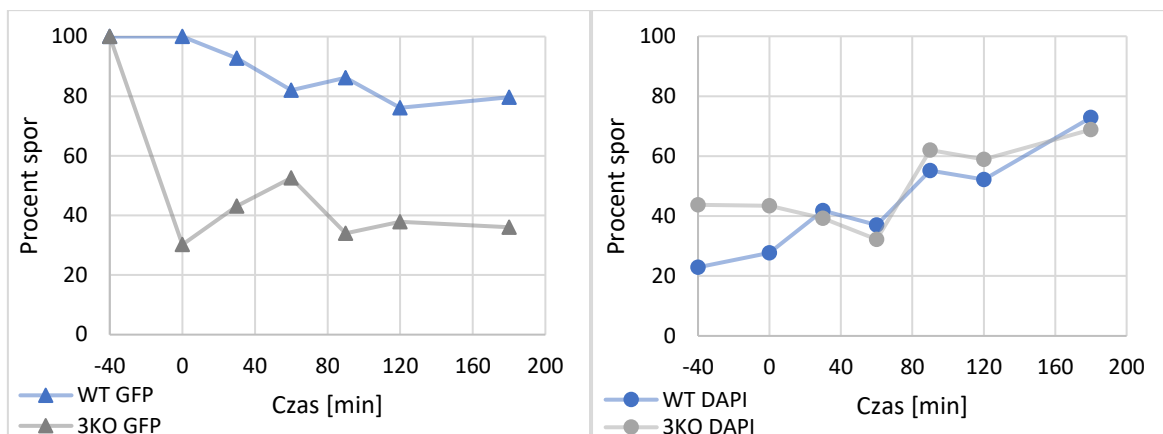


Rycina 4.30. Zdjęcia mikroskopowe spor szczepu WT *B. subtilis* przed inkubacją w wysokiej temperaturze (T-1), a także przed (T0) i w trakcie trwania procesu germinacji (T1-T6), wybarwione DAPI, GFP i SynptoRed. Pasek skali odpowiada 2 μm .



Rycina 4.31. Zdjęcia mikroskopowe spor szczepu 3KO *B. subtilis* przed inkubacją w wysokiej temperaturze (T-1), a także przed (T0) i w trakcie trwania procesu germinacji (T1-T6), wybarwione DAPI, GFP i SynaptoRed. Pasek skali odpowiada 2 μ m.

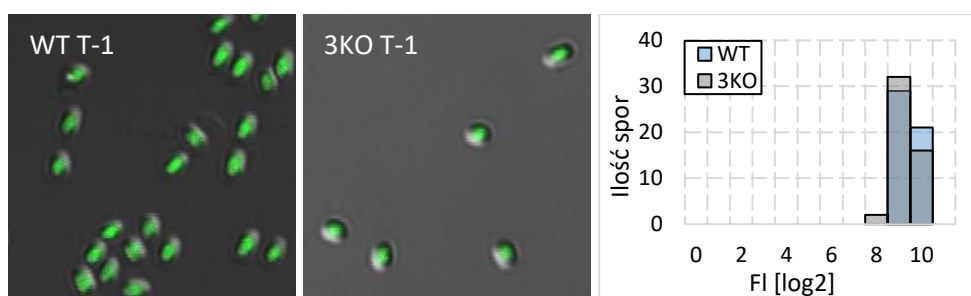
W celu sprawdzenia, czy powodem zaobserwowanej różnicy jest słabszy sygnał GFP spor szczepu 3KO, przeanalizowano zdjęcia mikroskopowe, wykluczając kanał światła czerwonego i niebieskiego i zliczono spory wykazujące zieloną fluorescencję. Następnie postąpiono analogicznie dla zliczenia spor wykazujących niebieską fluorescencję.



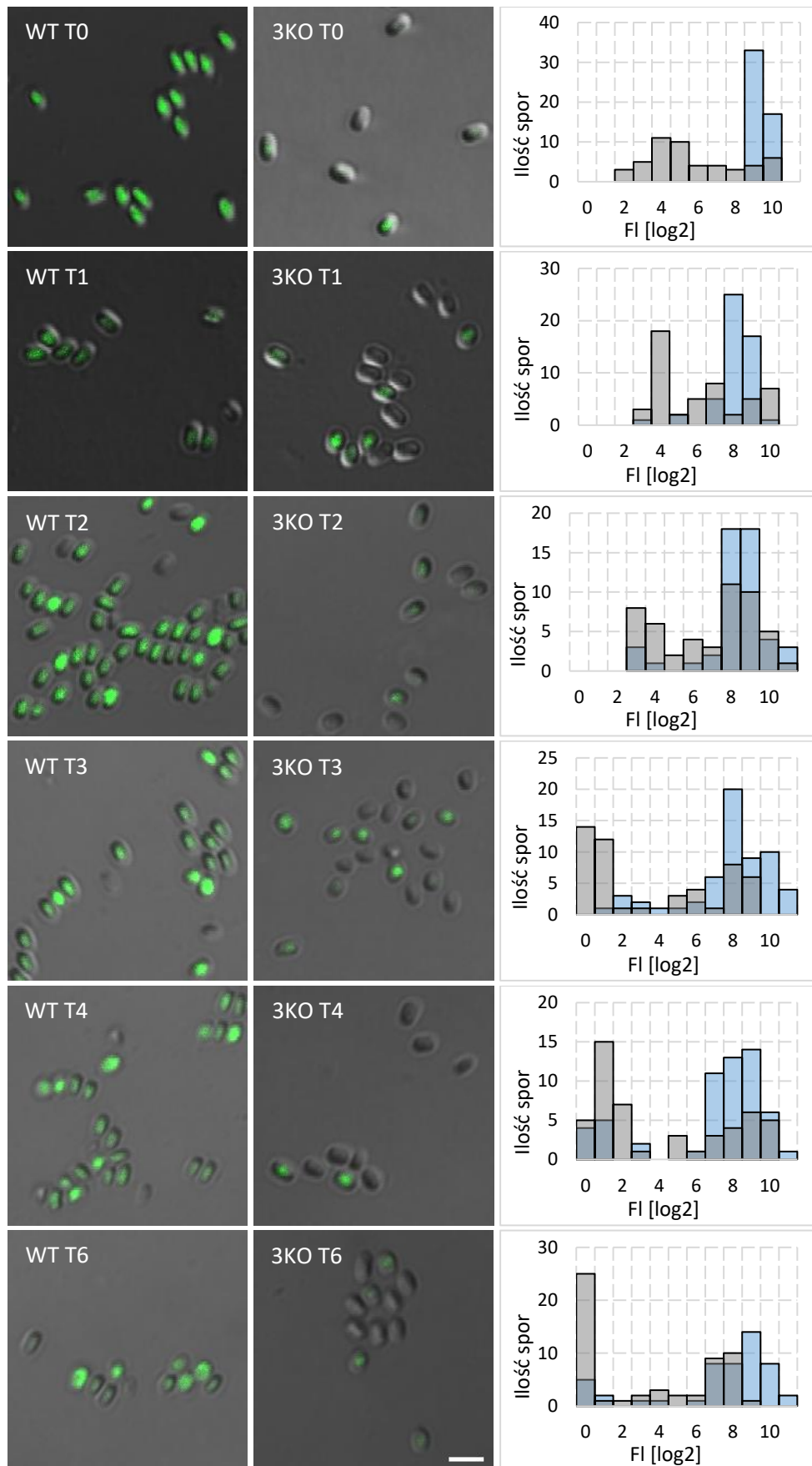
Rycina 4.32. Procent spor wykazujący zieloną fluorescencję, spowodowaną obecnością RpsB-GFP oraz procent spor wykazujący niebieską fluorescencję, wywołaną barwieniem DAPI

Stwierdzono znaczącą różnicę w procencie spor wykazujących zieloną fluorescencję. 100% spor obu szczepów wykazywało zieloną fluorescencję przed 40-minutową inkubacją w wysokiej temperaturze (T-1) (Ryc. 4.32). Następnie, w przypadku szczepu WT procent spor wykazujących zieloną fluorescencję utrzymywał się w przedziale od 76% do 100%, zaś dla szczepu 3KO gwałtownie spadł do 30% i nie przekroczył 52%. Jednocześnie procent spor wykazujących niebieską fluorescencję przed i w momencie indukcji germinacji różnił się pomiędzy szczepami i był niemal o połowę niższy dla szczepu WT, jednak w kolejnych badanych punktach czasowych był do siebie zbliżony w obu szczepach i wykazywał tendencję wzrostową.

Aby zwiększyć obiektywność otrzymanego wyniku, dokonano pomiarów intensywności sygnału fluorescencji RpsB-GFP za pomocą programu Fiji (Ryc. 4.33, 4.34). Potwierdziły one, że w punktach czasowych T0-T6 sygnał RpsB-GFP, reprezentujący rybosomy, pochodzący ze spor szczepu WT charakteryzuje się wyższą intensywnością niż ze spor szczepu 3KO oraz że różnice te są istotne statystycznie (Ryc. 4.34, Tab. 4.14), przy jednoczesnym braku różnic w punkcie T-1 (Ryc. 4.33, Tab. 4.14).



Rycina 4.33. Histogramy przedstawiające porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji RpsB-GFP w sporach szczepów WT i 3KO dla punktu czasowego T-1

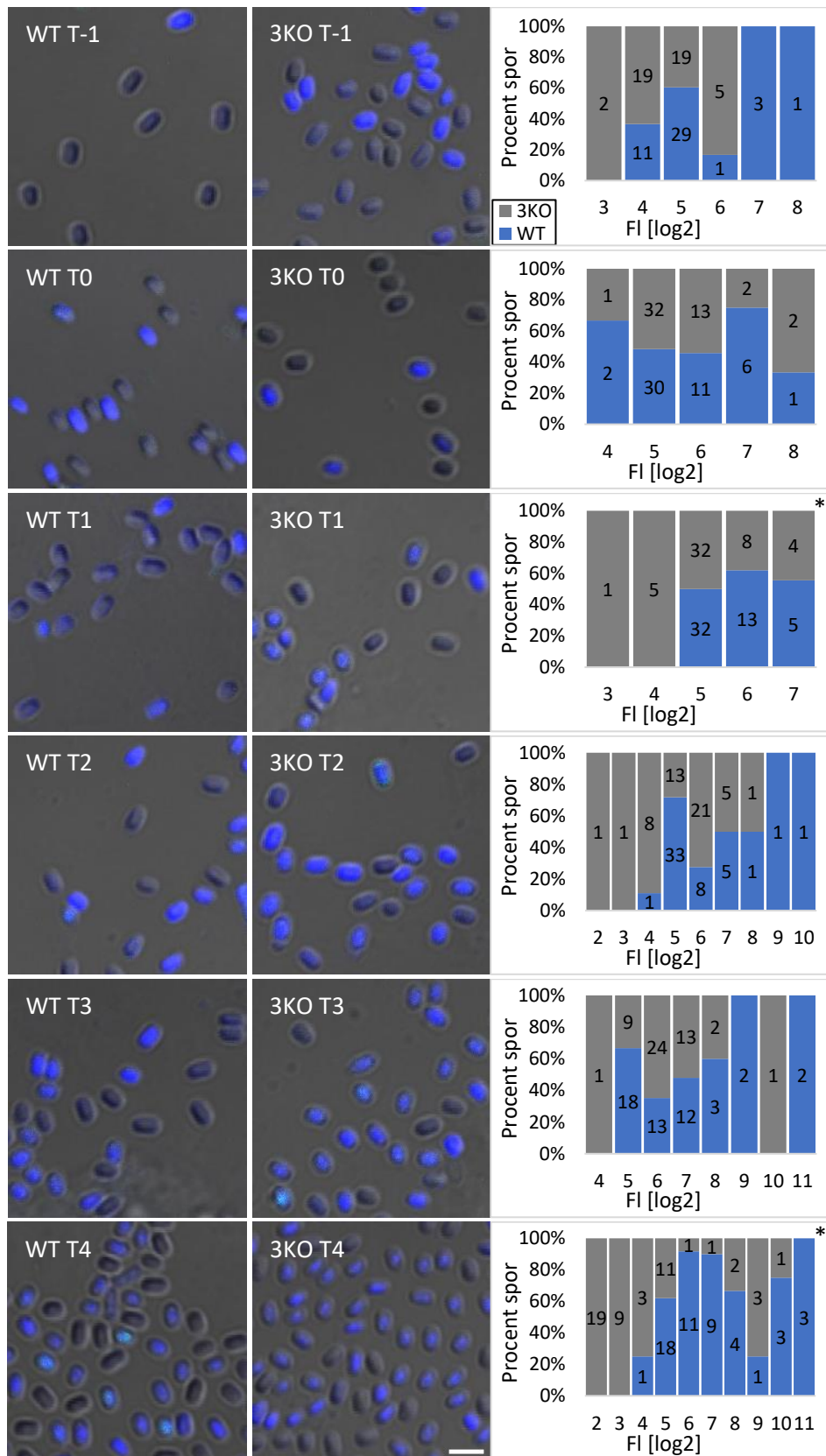


Rycina 4.34. Histogramy przedstawiające porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji RpsB-GFP w sporach szczepów WT i 3KO dla punktów czasowych T0-T6

Tabela 4.14. Wyniki testu U Manna–Whitneya dla intensywności fluorescencji RpsB-GFP w sporach szczepów WT i 3KO

Punkt czasowy	U	Z	p	Mediana dla WT	Mediana dla 3KO
T-1	różnica nieistotna statystycznie		> 0,05	685,356	605,676
T0	289	-6,62	$3,5 * 10^{-11}$	339,438	7,847
T1	698	-3,92	$9,0 * 10^{-5}$	255,814	3,244
T2	855	-2,72	$6,5 * 10^{-3}$	300,041	2,537
T3	529	-5,75	$8,9 * 10^{-9}$	359,066	222,077
T4	931	-3,08	$2,1 * 10^{-3}$	275,476	73,780
T6	492	-5,74	$9,5 * 10^{-9}$	660,464	24,774

W przypadku barwienia OPP-Alexa, charakterystyczna dla tej metody zielona fluorescencja jest właściwie niewidoczna, zarówno w sporach szczepu WT, jak i 3KO, jednak była ona wykrywana przez program Fiji na bardzo niskich poziomach (**Ryc. 4.35**).



Rycina 4.35. Zdjęcia mikroskopowe spor szczepu WT oraz 3KO *B. subtilis* przed (T0) i w trakcie trwania procesu germinacji (T1-T4), wybarwione DAPI i OPP-Alexa wraz z odpowiadającymi im wykresami przedstawiającymi porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji OPP-Alexa. Pasek skali odpowiada 2 μ m. Różnice istotne statystycznie oznaczono poprzez „*” (p-value < 0,05).

Wykryto różnice istotne statystycznie w intensywności fluorescencji OPP-Alexa, która reprezentuje aktywnie przeprowadzaną translację, pomiędzy sporami szczepów WT i 3KO dla dwóch punktów czasowych, które odpowiadają 30 minutom oraz 2 godzinom od indukcji germinacji (**Tab. 4.15**). Ponadto generalnie widać tendencję wzrostową w intensywności fluorescencji OPP-Alexa wraz z postępowaniem germinacji.

Tabela 4.15. Wyniki testu U Manna–Whitneya dla intensywności fluorescencji OPP-Alexa w szczepach WT i 3KO

Punkt czasowy	U	Z	p	Mediana dla WT	Mediana dla 3KO
T-1	różnica nieistotna statystycznie		> 0,05	26,365	24,990
T0	różnica nieistotna statystycznie		> 0,05	40,655	42,865
T1	866	-2,64	$8,2 * 10^{-3}$	39,355	33,946
T2	różnica nieistotna statystycznie		> 0,05	37,496	48,662
T3	różnica nieistotna statystycznie		> 0,05	72,451	71,104
T4	397	-5,877	$4,2 * 10^{-9}$	62,954	7,994

V. Dyskusja

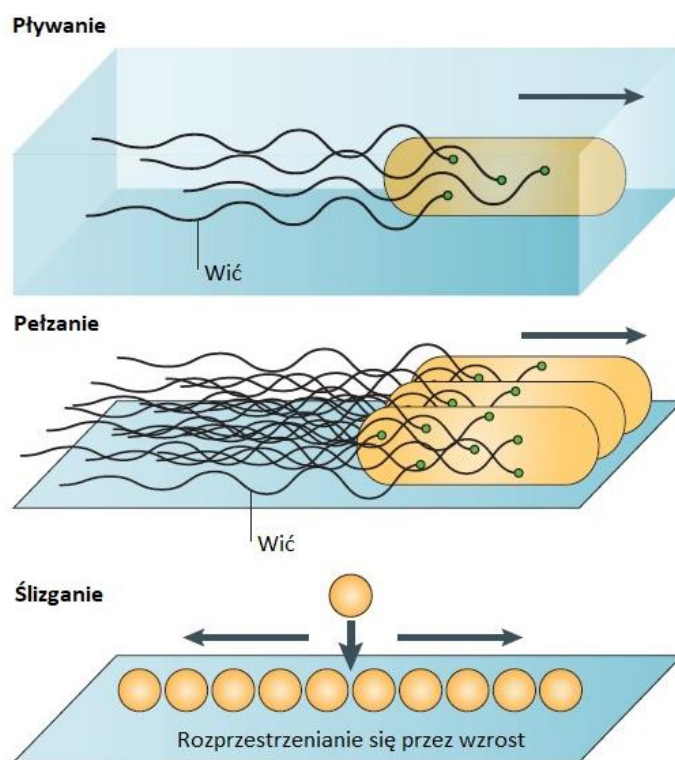
Krzywa wzrostu szczepu badanego 3KO *Bacillus subtilis* nie odbiegała od krzywej wzrostu szczepu kontrolnego WT *B. subtilis* we wszystkich zbadanych pożywkach, a więc zarówno w mediach bogatych w składniki odżywcze (LB, CH), jak również w ubogich (BMM) (**Ryc. 4.1**). Szczep 3KO jest pozbawiony trzech białek potencjalnie związanych z radzeniem sobie z niedoborem cynku (RpmEB, RpmGC i RpsNB). Mimo to, brak różnicy we wzroście szczepu 3KO w pożywce BMM, która nie posiada dedykowanego źródła cynku, nie jest niepokojący. W literaturze zwrócono uwagę, że ponieważ bakterie mają niezwykle skuteczne systemy pobierania tego pierwiastka, są w stanie dobrze rosnąć w pożywkach, do których nie dodano cynku, prawdopodobnie z powodu śladowego zanieczyszczenia nim innych odczynników (Gabriel & Helmann, 2009). Większość badań nad niedoborem cynku wykorzystywała silne chelatory jonów metali w celu ograniczenia tego pierwiastka (Gaballa i in., 2002; Gaballa & Helmann, 1998; Gabriel & Helmann, 2009; J. H. Shin & Helmann, 2016). Niestety, to podejście wprowadza dodatkowe komplikacje, ponieważ chelatory często nakładają ograniczenia na wiele wymaganych przez komórki jonów metali (Gabriel & Helmann, 2009). Raportowano o wydajnym wzroście delecyjnych mutantów *B. subtilis* nawet po wielokrotnym przepasazowaniu komórek bakterii w minimalnych pożywkach niezawierających cynku, do wykonania których używano odczynników o najwyższej dostępnej czystości i potraktowanych Chelexem w celu zmniejszenia ilości zanieczyszczeń metalami śladowymi (Gabriel & Helmann, 2009). Prawidłowa delecja genów *rpmEB*, *rpmGC* oraz *rpsNB* w szczepie 3KO, wykorzystywanym w niniejszej pracy, została potwierdzona reakcjami PCR stwierdzającymi brak wymienionych wyżej genów oraz obecność właściwych kaset odporności o odpowiednich wielkościach, a także sekwencjonowaniem. Ponadto, w przypadku każdego eksperymentu hodowle nocne szczepu 3KO zawierały w swoich pożywkach wszystkie trzy antybiotyki selekcyjne w odpowiednich stężeniach.

Szczep 3KO nie wykazał różnic względem WT we wzroście ani rozwoju po traktowaniu szerokim zakresem związków chemicznych, takich jak antybiotyki, detergenty i sole (**Tab. 4.1**). Stosowanie stałego stężenia kanamycyny jako kontroli, zapewniało monitorowanie poprawności przeprowadzania metody dyfuzji płytkowej.

Ponieważ główny czynnik transkrypcyjny procesu sporulacji, Spo0A, wpływa również na inne zachowania komórek *B. subtilis* (Fujita i in., 2005; Kovács, 2016; Schultz i in., 2009), jak to opisano we Wstępie, zdecydowano się zbadać zdolność do tworzenia biofilmu zmutowanego szczepu. Szczep 3KO nie różnił się od szczepu WT pod względem wytwarzanego biofilmu, za to szczep BGSC znacząco odbiegał od dwóch pozostałych (**Tab. 4.2, Ryc. 4.2, Ryc. 4.3**). Jak zwrócono uwagę w literaturze, nieudomowione szczepy *B. subtilis* mają zdolność ruchu pełzającego po powierzchni i tworzenia biofilmu, za to wiele szczepów laboratoryjnych straciło te umiejętności na skutek mutacji i utraty wymaganych plazmidów i tworzy jedynie cienkie biofilmy (Branda i in., 2001; Hayes & Patrick, 2022; Hughes & Kearns, 2017; Kearns i in., 2003; Kearns & Losick, 2003; Lombardía i in., 2006; McLoon, Guttenplan, i in., 2011; Patrick & Kearns, 2009). Zwrócono również uwagę, że nie wszystkie szczepy oznaczone jako „168” są takie same, a ich właściwości mogą różnić się w zależności od kolekcji, z których pochodzą (McLoon, Guttenplan, i in., 2011). Taka sytuacja ma miejsce w niniejszej pracy, kiedy to szczep BGSC, jako udomowiony, cechował się charakterystyczną słabą zdolnością do tworzenia biofilmu, który powstawał jako cienka i nietrwała błonka na powierzchni stojącej pożywki płynnej (**Ryc. 4.3**). W przeciwieństwie do niego, szczep WT, również określany jako 168, tworzył rozbudowany i trwały biofilm, co świadczy o tym, że jest to szczep nieudomowiony. Brak różnic między nim a 3KO wskazuje na to, że jednoczesny brak trzech genów *rpmEB*, *rpmGC* oraz *rpsNB* nie wpływa na tą zdolność komórek bakteryjnych.

Innym zachowaniem *B. subtilis*, związanym z odpowiednim poziomem czynnika transkrypcyjnego Spo0A jest ruch ślizgowy (Fujita i in., 2005; Grau i in., 2015; Kovács, 2016), jak to opisano we Wstępie, dlatego jako kolejną cechę fenotypową, zbadano mobilność szczepów 3KO i WT. Szczep 3KO wykazał zmniejszoną mobilność w porównaniu do WT w półpłynnym podłożu LB o stężeniu agaru $\leq 0,33\%$, przy czym wraz ze zmniejszaniem się stężenia agaru w podłożu, zwiększała się różnica w mobilności pomiędzy szczepami (**Tab. 4.3**). Jednocześnie różnice w mobilności w podłożu półpłynnym o stężeniu agaru wynoszącym 0,35% były nieistotne statystycznie. *B. subtilis* ma zdolność do trzech różnych rodzajów ruchu zwanych pływaniami (ang. *swimming*), pełzaniem (ang. *swarming*) i ślizganiem (ang. *sliding*) (**Ryc. 5.1**) (Hughes & Kearns, 2017; Losick, 2020). Generalnie stężenie agaru poniżej 0,3% w pożywce półpłynnej umożliwia wykrycie ruchu pływającego

komórek bakteryjnych, zaś powyżej 0,3% ruchu pełzającego, chociaż specyficzne warunki są zależne od gatunku (Kearns, 2010). Na podstawie morfologii kolonii obserwowanych na płytkach Petriego można zauważyć, że w badanych warunkach komórki *B. subtilis* rosnące na półpłynnej pożywce LB o stężeniu agaru wynoszącym 0,33% poruszały się ruchem pływającym wewnątrz medium, zaś w przypadku stężenia 0,35% poruszały się ruchem pełzającym po jej powierzchni. Na podstawie otrzymanych wyników można więc wywnioskować, iż szczep 3KO wykazuje słabsze zdolności do ruchu pływającego w porównaniu do szczepu WT, zaś nie wykazuje różnic w ruchu pełzającym.



Rycina 5.1. Schemat trzech rodzajów ruchu *B. subtilis*: pływanie, pełzanie i ślizganie (Kearns, 2010) - zmodyfikowane

Wyjaśnienie tej różnicy nie jest oczywiste, ponieważ nie wykryto różnic w poziomie translacji w fazie logarytmicznej (T0) zbadanej metodą RIBO-seq. Zaobserwowano jedynie różnicę w ekspresji na poziomie transkrypcji dla czterech genów: *ytiB*, *luxS*, *yqjN*, *rpmEB*, z czego trzy pierwsze były nadekspresjonowane w 3KO, zaś ostatni w WT (**Tab. 5.1**).

Tabela 5.1. Mapa ciepła ekspresji genów wykazujących różnice na poziomie transkrypcji w fazie logarytmicznej (T0) między szczepem badanym (3KO) a kontrolnym (WT). Różnicę przedstawiono w jako stosunek znormalizowanej liczby odczytów RNA-seq szczepu 3KO do znormalizowanej liczby odczytów RNA-seq szczepu WT, co oznacza, że wartości >1 wskazują na wyższą transkrypcję w komórkach szczepu 3KO, zaś wartości <1 w komórkach szczepu WT. Gen *rpsB* dodano jako przykład genu nie wykazującego różnicy.

Gen	WT T0 1p	WT_T0 2p	3KO T0 1p	3KO T0 2p	Krotność różnicy	Wartość p (test Walda)	Skorygowana wartość p
<i>ytiB</i>					24,2	$6,53 * 10^{-41}$	$2,88 * 10^{-37}$
<i>luxS</i>					14,2	$8,79 * 10^{-34}$	$1,94 * 10^{-30}$
<i>yqjN</i>					5,5	$2,59 * 10^{-18}$	$3,81 * 10^{-15}$
<i>rpmEB</i>					0,005	$2,02 * 10^{-07}$	$2,23 * 10^{-4}$
<i>rpsB</i>					1,0	0,96	1

Różnica w ekspresji *rpmEB* na poziomie transkrypcji jest łatwa do wytłumaczenia, jako, że szczep 3KO nie posiada tego genu. Ponadto brak różnicy obserwowany na mapie ciepła przy jednoczesnym jej wykryciu w teście statystycznym wskazuje na to, że jest ona istotna statystycznie oraz że szczep WT, w fazie logarytmicznej ($OD_{600} = 0,7-0,8$), włącza ekspresję tego genu na bardzo niskim poziomie (**Tab. 5.1**). W przeciwieństwie do *rpmEB*, *rpsB*, który również nie wykazuje różnic pomiędzy szczepami według mapy ciepła, nie wykazuje ich również w teście statystycznym.

ytiB to gen słabo poznany, prawdopodobnie koduje enzym, który jest podobny pod względem sekwencji aminokwasowej do anhidrazy węglanowej (Strop i in., 2001). Znajduje się w operonie *ytiB-luxS* pod kontrolą alternatywnego czynnika σB (Arrieta-Ortiz i in., 2015; Nicolas i in., 2012).

Najbardziej obiecującym genem, który mógłby pomóc wytłumaczyć wykrytą różnicę w mobilności szczepów WT i 3KO, jest *luxS*. Koduje on liazę S-rybozylohomocysteiny, która jest zaangażowana w wykrywanie kworum (ang. *quorum sensing*), poprzez syntezowanie uniwersalnego autoinduktora, AI-2, furanozylo-boran-diesteru (Duanis-Assaf i in., 2016; Hullo i in., 2007; Lombardía i in., 2006; Xavier & Bassler, 2003). Wykryto iż LuxS jest wymagany do tworzenia biofilmu, a także do ruchu ślizgowego nieudomowionych szczepów *B. subtilis* (Duanis-Assaf i in., 2016; Lombardía i in., 2006). Mimo iż LuxS nie wpływa na rozwój spor, jego transkrypcja jest negatywnie regulowana przez Spo0A. W literaturze donoszono również, że ekspresja *luxS* stale wzrasta podczas logarytmicznego

wzrostu, aż do swojego maksimum osiąganego na godzinę przed początkiem fazy stacjonarnej, a następnie maleje (Lombardía i in., 2006). Otrzymane z RNA-seq dane wskazują na 14-krotnie większą ilość znormalizowanych odczytów w szczepie 3KO w T0, co oznacza, że w szczepie tym znacząco przekroczona jest ekspresja genu *luxS* charakterystyczna dla szczepu WT. Możliwe, że jest to spowodowane dostępnością cynku, ponieważ LuxS działa jako homodimer, który zawiera dwa miejsca wiązania Zn^{2+} (Hilgers & Ludwig, 2001; Ruzheinikov i in., 2001). Kuszająca byłaby spekulacja, że szczep 3KO *B. subtilis*, który na skutek delecji genów *rpmEB*, *rpmGC* i *rpsNB* posiada potencjalnie zaburzoną redystrybucję cynku, wykrywa nieprawidłowości w działaniu białka LuxS, spowodowane niewystarczającą ilością tego pierwiastka śladowego, i promuje indukcję jego ekspresji, jako sposób poradzenia sobie z niedoborem aktywności LuxS. Jednak enzymów, używających Zn jako kofaktora, jest wiele w organizmie bakteryjnym, dlatego nasuwa się pytanie dlaczego akurat to białko byłoby nadekspresjonowane.

Wymóg LuxS dla zdolności do ruchu ślizgowego niekoniecznie tłumaczy zmniejszoną mobilność szczepu 3KO, wykrytą w niniejszej pracy. Różnica w mobilności dotyczy ruchu pływającego, który jest uznawany za regulowany przeciwnie do ruchu ślizgowego i biofilmu, które z kolei, według literatury, wydają się być przejawami tego samego zjawiska, ponieważ korzystają z tych samych związków chemicznych, np. surfaktyny (Hughes & Kearns, 2017; Losick, 2020). Ponieważ ruchy pływający i ślizgający mają różną mechanikę, wymagają różnych genów, do ich wykonywania.

Znacznie zwiększona w szczepie WT transkrypcja genu *ytiB* (24-krotna) może być związana z kolokalizacją w operonie z genem *luxS* lub nieodkrytą funkcją tego genu. W literaturze transkrypt *luxS* określa się jako monocistronowy (Hullo i in., 2007; Lombardía i in., 2006), a więc możliwa jest ta druga opcja, dlatego ciekawe jest jaką rolę naukowcy przyporządkują YtiB w przyszłości.

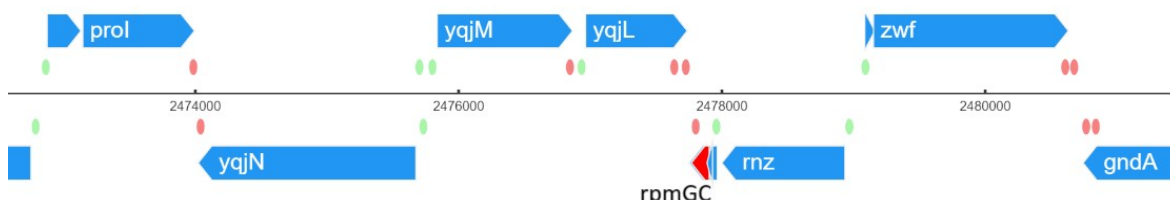
Jednak najbardziej prawdopodobne jest, iż duża ilość transkryptów dla genów *luxS* i *ytiB*, zaobserwowanych dla wszystkich zbadanych w niniejszej pracy punktów czasowych, to artefakty spowodowane modyfikacjami genetycznymi. W *B. subtilis* w bezpośrednim sąsiedztwie operonu *ytiB-luxS* znajduje się gen *rpmEB* (**Ryc. 5.2**), który w szczepie 3KO, został zastąpiony kasetą oporności na kanamycynę. Istnieje prawdopodobieństwo, że na skutek manipulacji genetycznych przed operonem *ytiB-luxS* powstało silne miejsce

indukujące transkrypcję, co powoduje kilkunastokrotne zwiększenie ilości uzyskanych odczytów RNA-seq.



Rycina 5.2. Schemat lokalizacji genu *rpmEB* w *Bacillus subtilis* (Pedreira i in., 2022)

Podobnie mało wiadomo o genie *yqjN*. Jego funkcja może być związana z degradacją aminokwasów, a sekwencja wskazuje na to, że do jego translacji może być wymagany czynnik EF-P ze względu na obecność kilku kolejnych reszt proliny (Doerfel i in., 2013; Nicolas i in., 2012; Pedreira i in., 2022). Również jego nadekspresja może być wytłumaczona lokalizacją na chromosomie bakteryjnym, ponieważ znajduje się on poniżej genu *rpmGC*, który w szczepie 3KO został zastąpiony kasetą oporności na erytromycynę (**Ryc. 5.3**). Co ciekawe, dla genu *yqjL*, który znajduje się pomiędzy nimi wykryto niższą ekspresję w szczepie 3KO niż w szczepie WT w punktach czasowych T1 i T2, co może być związane z jego odwrotną orientacją na chromosomie (**Tab. 4.10**).



Rycina 5.3. Schemat lokalizacji genu *rpmGC* w *Bacillus subtilis* (Pedreira i in., 2022)

Bardzo prawdopodobne jest, że ani RNA-seq, ani RIBO-seq nie dostarczają informacji, wymaganych do wyjaśnienia różnic w mobilności szczepów 3KO i WT, ponieważ zbieranie prób do sekwencjonowań odbywało się w innych warunkach niż przeprowadzanie testu na mobilność. Wprawdzie różnicę wykryto dla ruchu pływającego, a hodowle wykorzystane do sekwencjonowania przeprowadzono w płynnej pożywce, ale energicznie mieszanej, a nie w półpłynnej i inkubowanej stacjonarnie, jak to miało miejsce w teście na mobilność. Dlatego też wyniki sekwencjonowania transkryptomu *B. subtilis* fazy logarytmicznej (T0), a także innych punktów czasowych (T1-T6), dostarczają tylko ogólnej informacji, iż różnice w transkrypcji dotyczą znikomej i raczej stałej ilości genów.

Do obserwacji mikroskopowych, zarówno sporulacji, jak i germinacji, użyto barwników SynaptoRed w celu wizualizacji błon komórkowych; DAPI w celu wizualizacji chromosomu oraz OPP-Alexa w celu wizualizacji miejsc aktywnej translacji, a także markera molekularnego GFP w fuzji z białkiem rybosomalnym RpsB w celu detekcji lokalizacji rybosomów. Zastosowano szczep *B. subtilis* WT-GFP oraz 3KO-GFP w przypadku barwienia SynaptoRed i DAPI lub szczepów WT oraz 3KO w przypadku barwienia OPP-Alexa i DAPI, ze względu na nakładające się fale emisji GFP oraz OPP-Alexa. Szczepy WT-GFP i 3KO-GFP nie wykazały różnic we wzroście w porównaniu do szczepów WT i 3KO, dlatego zastosowano je jako swoje wzajemne odpowiedniki (**Ryc. 4.22**). Stosowanie fuzji białka rybosomalnego RpsB z zielonym białkiem fluorescencji jest powszechnie wykorzystywane w celu detekcji rybosomów (Hunt i in., 2006; Lewis i in., 2000).

Obserwacje mikroskopowe procesu sporulacji wskazują, że szczepy WT i 3KO przeprowadzają go stosunkowo synchronicznie (**Ryc. 4.23-26**). Zaobserwowano różnicę w siódmej godzinie procesu sporulacji, która polegała na rzadszym wykrywaniu oznak lizy komórki macierzystej w przypadku szczepu 3KO (**Ryc. 4.25**) w porównaniu ze szczepem WT (**Ryc. 4.23**). Różnicy tej nie zaobserwowano podczas barwienia OPP-Alexa i DAPI, co może być spowodowane wielokrotnym płukaniem komórek podczas przeprowadzania procedury (**Ryc. 4.24 i 4.26**). Wzory fluorescencji RpsB-GFP i OPP-Alexa nie są identyczne, ale pokazują podobne tendencje zmian w fazie logarytmicznej (T₀) oraz przez pierwsze dwie godziny procesu sporulacji (T₁-T₂), przy czym sygnał OPP-Alexa cechuje się precyzyjniejszą lokalizacją, co zgadza się z przewidywaniami (**Ryc. 4.23 i 4.24**). Ponadto generalnie przez cały obserwowany okres, fluorescencja GFP, tak jak OPP-Alexa, wykazywała negatywną korelację z DAPI, która polegała na tym, że miejsca cechujące się silną fluorescencją GFP/OPP-Alexa charakteryzowały się jednocześnie słabą fluorescencją DAPI i odwrotnie, co wskazuje na fizyczne rozdzielenie chromosomu bakteryjnego od rybosomów i produktów translacji i koresponduje z najnowszym odkryciem, że transkrypcja i translacja u *B. subtilis* są od siebie bardziej rozdzielone niż przypuszczano do tej pory, wniosując na podstawie przebiegu tych procesów u *E. coli* (Johnson i in., 2020; B. Wang & Artsimovitch, 2021; York, 2020). W kolejnych godzinach sporulacji (T₃-T₇) fluorescencja OPP-Alexa kolokalizuje z asymetrycznie położoną septą, towarzysząc jej w wędrówce wokół prespory podczas procesu pochłaniania, a następnie ściśle otacza presporę w trakcie syntezy płaszczka i kory.

Ponieważ barwienie OPP-Alexa uwidacznia świeżo syntezowane peptydy, zgadza się to z przebiegiem procesu sporulacji, który wymaga biosyntezy wielu białek sporulacyjnych, m.in. związanych z tworzeniem tzw. kanałów odżywczych oraz składaniem warstw ochronnych przyszłej spory, co opisano szczegółowo we Wstępie. Ciekawe obserwacje poczyniono względem prespor, które zakończyły proces sporulacji i rozpoczęły tworzenie płaszczka i kory, o czym świadczy odsunięcie prespory od brzegu komórki macierzystej. Zaobserwowano w nich intensywną fluorescencję GFP z jednoczesną niską fluorescencją DAPI lub niską fluorescencją OPP-Alexa z jednoczesną wyraźną fluorescencją DAPI, w zależności od barwienia. Możliwe, że OPP i Alexa miały utrudniony dostęp do prespory w takim stadium rozwoju i dlatego fluorescencja wewnątrz niej jest słabo wykrywalna, przeczy temu jednak obecność barwnika DAPI. Drugą ewentualnością jest to, iż znacząco niska fluorescencja OPP-Alexa reprezentuje stan faktyczny, czyli niski poziom translacji wewnątrz prespory od IV etapu sporulacji. Sama niekonsekwencja w intensywności fluorescencji DAPI w zależności od barwienia jest za to prawdopodobnie spowodowana tym że barwienie SynaptoRed i DAPI odbywało się przyżyciowo, zaś w przypadku barwienia OPP-Alexa i DAPI komórki były utrwalane. DAPI łatwiej wnika do martwych komórek (Wallberg i in., 2016), dlatego możliwe jest wybarwienie prespory pochłoniętej przez komórkę macierzystą i o rozpoczętej syntezie płaszczka i kory, jeśli poddano je utrwaleniu, ale to samo stężenie DAPI może być niewystarczające do pokonania takiej ilości warstw w warunkach przyżyciowych.

Analiza sekwencjonowania transkryptomów oraz translatomów szczepów WT i 3KO wykazała, że ekspresja czynników transkrypcyjnych związanych z procesem sporulacji, czyli σ_H , Spo0A, σ_F , σ_E , σ_G oraz σ_K jest zgodna z przewidywaniami i charakterystyczna dla kolejnych etapów sporulacji. Co istotne, nie wykazała różnic pomiędzy szczepami na poziomie transkrypcji ani translacji. Na podstawie tych wyników można wysnuć wniosek, że oba szczepy przechodzą przez kolejne etapy procesu sporulacji względnie synchronicznie. Potwierdza to również analiza RNA-seq i RIBO-seq 60 białek związanych z procesem sporulacji (**Ryc. 4.13-14**) oraz obserwacje mikroskopowe (**Ryc. 4.23-26**).

Mapa ciepła, będąca rezultatem analizy transkryptomu 60 białek związanych z procesem sporulacji (**Ryc. 4.13**), pokazała tendencję do porządkowania punktów czasowych w trzy grupy: moment indukcji sporulacji (T0) oraz jedna godzina po tym

zdarzeniu (T1), środkowe godziny procesu sporulacji: druga (T2), trzecia (T3) i czwarta (T4) oraz końcowe godziny procesu sporulacji: piąta (T5), szósta (T6) i siódma (T7). Koresponduje to z wykrytymi wzorami ekspresji czynników transkrypcyjnych σ_H , Spo0A, σ_F , σ_E , σ_G oraz σ_K (**Ryc. 4.12**), a także obserwacjami mikroskopowymi (**Ryc. 4.23-26**). W trakcie pierwszej godziny po indukcji sporulacji komórka bakteryjna, wykorzystując często spory zakres białek fazy wegetatywnej, dokonuje kondensacji chromosomów do włókna osiowego (Breier & Grossman, 2007; Kloosterman i in., 2016; van Baarle i in., 2013) oraz rozpoczyna syntezę asymetrycznie zlokalizowanej septy (Barák i in., 2019; Khanna i in., 2021). Zdjęcia mikroskopowe z drugiej godziny po indukcji sporulacji pokazują, że większość komórek zawiera już świeżo zsyntetyzowaną septę (**Ryc. 4.23-26**), o czym świadczy jej prosty kształt (**Ryc. 1.1**). Uwypukla się ona w kierunku komórki macierzystej w trzeciej godzinie sporulacji, sprawiając że prespora przybiera kształt owalu, prawdopodobnie na skutek transportu do mniejszej komórki chromosomu prespory oraz modyfikacji peptydoglikanu septy (Khanna i in., 2020; Lopez-Garrido i in., 2018; Ojkic i in., 2016), co zostało omówione we Wstępie. Tym samym, na podstawie obserwacji mikroskopowych, można wywnioskować, że od godziny drugiej do czwartej zachodzi etap pochłaniania prespory przez komórkę macierzystą na skutek działania przypominającego fagocytozę (Khanna i in., 2020; Rudner & Losick, 2001). W kolejnych trzech godzinach można zaobserwować, że prespora była zlokalizowana nieco dalej od krawędzi komórki macierzystej, co prawdopodobnie wiąże się z jej dojrzewaniem, czyli m.in. składaniem wokół niej kory oraz płaszczka. Tym samym trzy grupy genów mogą w pewnym zakresie odpowiadać trzem znaczącym zmianom morfologicznym: asymetrycznemu podziałowi, pochłonięciu i dojrzewaniu prespory. Szczegółowa analiza mapy ciepła ekspresji genów na poziomie transkrypcji dla 60 białek związanych z procesem sporulacji zdaje się to potwierdzać (**Ryc. 4.13**).

Wśród białek wykazujących ekspresję już w fazie logarytmicznej (T0) na szczególną uwagę zasługuje AbrB (**Ryc. 4.13**). To przykład białka, którego transkrypcja ma miejsce głównie w fazie wzrostu i jest ona wówczas na wysokim poziomie, a następnie ulega zmniejszeniu wraz z inicjacją i postępem sporulacji (Fujita & Sadaie, 1998; Olson i in., 2014; Pedreira i in., 2022; Perego i in., 1988).

Do białek wykazujących wysoką ekspresję w fazie logarytmicznej (T0) oraz w pierwszej godzinie (T1) trwania sporulacji należą Spo0E, Spo0B, Spo0F, YnzD, YisL, FtsH, które odpowiadają za regulację *phosphorelay*, FtsA, FtsZ, EzrA, ZapA, które są związane z tworzeniem septy, ComN, MinD, MinJ, DivIVA, które biorą udział w związaniu chromosomów bakteryjnych tworzących włókno osiowe do biegunów komórki, a także SpoIIIE transportujący DNA spory do odpowiedniego przedziału (**Ryc. 4.13**). Ich ekspresja zanika w czwartej (T4) i piątej (T5) godzinie po indukcji sporulacji. Jest to zgodne z oczekiwaniami, ponieważ zdecydowana większość tychże białek pełni również funkcje spoza procesu tworzenia spor. *Phosphorelay* zarządza również innymi niż sporulacja zachowaniami *B. subtilis*, typu biofilm, ruch ślizgowy czy kanibalizm (Banse i in., 2011; Fujita i in., 2005; Kovács, 2016). FtsA, FtsZ, EzrA i ZapA to białka budujące kompleks zwany divisomem, odpowiadający na podział komórki, również ten symetryczny (Adams & Errington, 2009; Barák i in., 2019; den Blaauwen i in., 2017). MinD, MinJ czy DivIVA to z kolei stosunkowo uniwersalne białka kotwiczące do błony komórkowej (Bramkamp & van Baarle, 2009; Hammond i in., 2021; Kloosterman i in., 2016). Ponadto generalnie transkrypcja wszystkich tych białek zależy od głównego czynnika transkrypcji σ A (Pedreira i in., 2022). Z literaturą zgadza się również fakt, że SpoIIIE jest wyrażany konstytutywnie (Sharp & Pogliano, 2002).

Na mapie ciepła wyróżnia się zgrupowanie genów *spolIAA*, *spolIAB*, *spolIE*, *racA*, *refZ* i *spolIGA* (**Ryc. 4.13**). Na jej podstawie można wysnuć wniosek, że transkrypcja tychże genów jest włączana w pierwszej godzinie po indukcji procesu sporulacji (T1). Jest to zgodne z oczekiwaniami. SpoIIAA, SpoIIAB i SpoIIIE są transkrybowane już przed asymetrycznym podziałem i biorą udział w szlaku aktywacji σ F (Bradshaw & Losick, 2015; Dworkin & Losick, 2001; Hilbert & Piggot, 2004). SpoIIIE związana jest również z tworzeniem septy (Barák i in., 2019; Barák & Muchová, 2018; Khanna i in., 2021), tak jak RefZ (Ben-Yehuda & Losick, 2002; Margolin, 2002; Wagner-Herman i in., 2012), zaś SpoIIIGA z aktywacją czynnika σ E (Diez i in., 2012; Hilbert & Piggot, 2004; Imamura i in., 2008) i tym samym poprzedza go w ekspresji. RacA to z kolei białko wiążące się do chromosomów bakteryjnych, biorąc udział w kondensowaniu materiału genetycznego we włókno osiowe (Ben-Yehuda i in., 2003b; Carniol i in., 2005; Schumacher i in., 2016). Transkrypcja wszystkich tych białek jest

aktywowana przez Spo0A (Pedreira i in., 2022), co tłumaczy ich wzór ekspresji, rozpoczynający się gwałtownie w T1.

Białka znajdujące się pod kontrolą czynników σF i σE nie są wyraźnie rozdzielone na mapie ciepła i wydają się tworzyć jedną grupę (**Ryc. 4.13**). Może być to spowodowane faktem, że indukcja σE , wywołana pośrednio przez σF poprzez ekspresję SpoII_R, musi zajść stosunkowo szybko, ponieważ σE aktywuje transkrypcję białek, które m.in. zapobiegają tworzeniu drugiej septy w obrębie komórki macierzystej (Chary i in., 2010; Eichenberger i in., 2001; Handler i in., 2008). Odpowiadają za to SpoII_M SpoII_D i SpoII_P, przedstawione na mapie ciepła. Geny kodujące te białka są na niej zgrupowane razem ze *spoIIIAA*, *spoIIIAH*, *spoIIQ*, odpowiadającymi za tworzenie proponowanych kanałów odżywczych oraz *spoIVFA*, *spoIVFB*, *bofA*, których produkty związane są z aktywacją σK . Wszystkie te trzy kompleksy kolokalizują ze sobą podczas procesu pochłaniania (**Ryc. 1.39**). W grupie tej, widocznej na mapie ciepła, znajdują się również *rsfA* i *lonB*, kodujące regulatory transkrypcji genów zależnych od σF oraz *gerR* i *spoIIID*, działające analogicznie dla σE . Jak wspomniano we Wstępie, σF odpowiada również za ekspresję genów związanych z ochroną lub kiełkowaniem zarodników, dlatego w grupie tej znajdują się też *katX*, który koduje katalazę chroniącą spory przed nadtleniem, *gpr*, którego produktem jest proteaza zaangażowaną w degradację białek SASP podczas kiełkowania spor. Nie mniej ważna jest obecność w tej grupie *spoIVA*, *spoVM* i *spoVID*, których ekspresja jest wymagana do zainicjowania składania płaszczka (**Ryc. 1.41**) oraz *spoVD*, związany z korą. Mimo iż te ostatnie geny są funkcjonalnie związane z ostatnimi etapami sporulacji, to ich ekspresja jest indukowana przez tzw. wczesny czynnik sporulacji komórki macierzystej, czyli σE (Pedreira i in., 2022). Tym samym połączenie powyższych genów w jedną grupę na mapie ciepła (**Ryc. 4.13**) nie odbiega od przewidywań.

Geny *gerA*, *gerB*, *gerK*, *spoVT*, *spoVA*, *sspA*, *splB*, *pdaA* i *sleB* tworzą kolejną grupę na mapie ciepła i wykazują wysoką ekspresję w T3 i T4 (**Ryc. 4.13**). Jest to zgodne z oczekiwaniami, ponieważ ich transkrypcja zależy od czynnika σG , którego szczyt ekspresji przypada na trzecią godzinę po indukcji sporulacji (**Ryc. 4.12**) (De Hoon i in., 2010; Hilbert & Piggot, 2004; P. Setlow, 2007; Steil i in., 2005; Tobin i in., 2023). Geny te są związane odpowiednio z tworzeniem receptorów odżywczych umożliwiających germinację spor, regulacją transkrypcji zależną od σG , syntezą kwasu dipikolinowego, wypełniającego rdzeń spory,

ochroną DNA spor, syntezą unikalnego składnika peptydoglikanu kory, a także kodują enzym lityczny płaszczka.

Na uwagę zasługuje również, wyróżniona przez mapę ciepła jako podgrupa, para genów, *cotZ* oraz *gerE* (**Ryc. 4.13**). *CotZ* to przykład białka, którego ekspresja należy do jednych z najpóźniejszych (T5 i T6). Jest to zgodne z oczekiwaniami, ponieważ zależy ona od ostatniego w kaskadzie sporulacyjnego czynnika transkrypcyjnego, σ_K , oraz aktywatorów *GerR* i *GerE*, a jego funkcją jest składanie najbardziej zewnętrznej warstwy spory, jaką jest skorupa.

Jak wskazano w Wynikach, różnica w ekspresji genów na poziomie transkrypcji została wykryta dla odpowiednio 4, 6, 11, 4, 4, 2, 2 i 182 genów w poszczególnych punktach czasowych (T0-T7), reprezentujących postęp trwania sporulacji (**Tab. 4.10**). Spośród 182 genów wykazujących różnicę w punkcie czasowym T7, 67 charakteryzowało się wyższą ekspresją w szczepie WT i prawie dwa razy więcej, bo 115, w szczepie 3KO. Jednakże dla identyfikacji roli wyspecjalizowanych rybosomów główne znaczenie odgrywa sekwencjonowanie rybosomów, które wykrywa różnice w translacji, uwzględniając odpowiednio poziom mRNA (Li i in., 2017). Spośród genów *ytiB*, *luxS* oraz *yqjN*, które charakteryzowały się zarówno największą różnicą w ekspresji na poziomie transkrypcji, jak również były wykrywane niemal w każdym punkcie czasowym, jedynie gen *ytiB* wykazywał również różnicę w poziomie translacji, jednak miała ona charakter odwrotny. Podczas analizy transkryptów, *ytiB* wykazywał wyższy poziom odczytów w szczepie 3KO (**Tab. 4.10**), zaś analiza translatomu wskazała, że jego translacja zachodziła wydajniej w szczepie WT (**Tab. 4.11**).

Jak pokazano w Wynikach, różnicę w translacji między szczepami WT i 3KO wykryto jedynie w siódmej godzinie po indukcji sporulacji (T7). Spośród 65 zidentyfikowanych genów największą grupę o znanej funkcji stanowiły geny związane z tworzeniem płaszczka, zewnętrznej powłoki ochraniającej sporę (15 genów) (**Tab. 5.2**). Co interesujące, spośród tych genów aż 11 dotyczy najbardziej zewnętrznej warstwy płaszczka, czyli skorupy. Ponadto, jedynie w przypadku dwóch genów wydajność translacji jest większa w szczepie 3KO, we wszystkich pozostałych przypadkach wydajność translacji jest większa w szczepie WT. Produkty genów tej grupy są generalnie dobrze poznane, a literatura naukowa, która ich dotyczy jest obszerna.

Tabela 5.2. Wykaz genów związanych z tworzeniem płaszczu, w tym skorupy, które wykazały różnicę w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO). Różnicę w translacji przedstawiono w stosunku do translacji szczepu dzikiego (WT), co oznacza, że wartości >1 wskazują na translację wydajniejszą w komórkach szczepu dzikiego (WT) (zaznaczono na czerwono), zaś wartości <1 w komórkach szczepu badanego (3KO) (zaznaczono na zielono).

Gen	Krotność różnicy w translacji	Skorygowana wartość p testu Walda	Funkcja
<i>cotW</i>	5,4	$3,20 * 10^{-14}$	związana ze skorupą
<i>cgeB</i>	5,0	$2,12 * 10^{-10}$	
<i>spsF</i>	3,7	$2,70 * 10^{-7}$	
<i>spsL</i>	3,3	$7,91 * 10^{-7}$	
<i>cgeD</i>	3,3	$2,64 * 10^{-4}$	
<i>spsG</i>	2,9	$1,55 * 10^{-4}$	
<i>cotV</i>	2,7	$5,52 * 10^{-4}$	
<i>spsB</i>	2,7	$1,19 * 10^{-5}$	
<i>cgeC</i>	2,6	$3,00 * 10^{-4}$	
<i>cotY</i>	2,0	$9,57 * 10^{-3}$	
<i>cgeA</i>	0,5	$5,42 * 10^{-3}$	
<i>cotP</i>	4,3	$4,36 * 10^{-3}$	związana z płaszczem
<i>yheD</i>	2,3	$2,14 * 10^{-3}$	
<i>cotR</i>	2,2	$4,69 * 10^{-3}$	
<i>sscA</i>	0,3	$1,17 * 10^{-4}$	

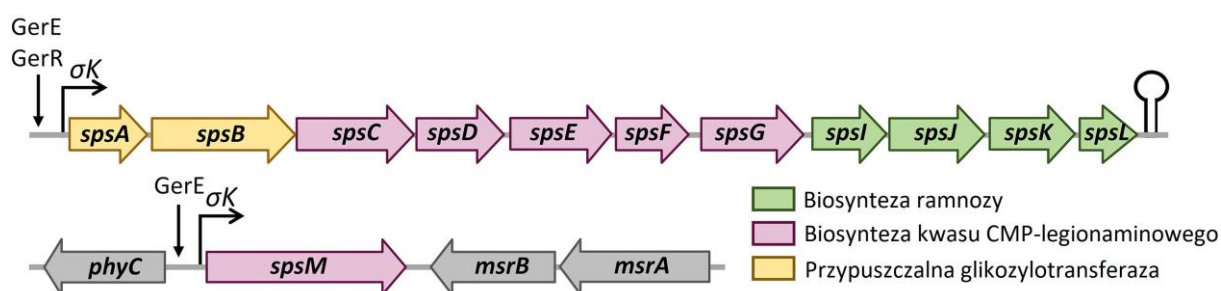
Generalnie, białka kodowane przez *cotVW*, *sps* i *cgeAB* wpływają na strukturę skorupy spor, względną hydrofobowość powierzchni i zakotwiczenie warstwy polisacharydowej (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019).

CotW, *CotV* i *CotY* to białka skorupy (McKenney i in., 2010). Ich geny znajdują się w operonie *cotVWXYZ* i są transkrybowane jako policistronowe mRNA na późnym etapie sporulacji w komórkach macierzystych. Operon ten ma trzy promotory P_{cotVWX} , P_{cotX} i P_{cotYZ} , które są najpierw pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego σE i pozytywną regulacją SpoIID, a następnie czynnika σK i pozytywną regulacją GerE (Eichenberger i in., 2004; Imamura i in., 2011; Mäder i in., 2002; Steil i in., 2005; J. Zhang i in., 1994). Najsilniej ekspresjonowanym białkiem w późnych stadiach sporulacji jest *CotY*, następnie *CotW* i *CotV* (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019). Zgadza się to z doniesieniami, że *CotY* jest najbardziej obfitym białkiem w skorupie, a *CotV* w dalszej kolejności, ale stwierdzono iż *CotW* jest słabo rozmieszczone szczególnie w niedojrzałych sporach, gdzie może być nawet nieobecne

(Bartels i in., 2019). Dlatego wydaje się, że CotW jest włączany do skorupy późno. Pierwotnie stwierdzono, że jednoczesny brak trzech białek CotXYZ uniemożliwia prawidłową lokalizację białka CotW w skorupie (McKenney i in., 2010), ale późniejsze doniesienia mówiły, iż pojedyncze delecje nie wpływają na prawidłową lokalizację CotW (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019), a nawet, że w sześciokrotnym delecyjnym mutancie *cgeA-cotVWXYZ*, całkowicie pozbawionym skorupy, lokalizacja ektopowo wyrażanego CotW jest niezmieniona (Bartels i in., 2019). Stwierdzono za to, że nieco zaburza ją brak białek płaszcza zewnętrznego, CotH, CotB i YwrJ, w związku z tym zaproponowano, że CotW leży dokładnie na granicy płaszcza zewnętrznego i skorupy. Mutant z delecją genu *cotW* lub *cotV* wykazuje nierównomierne rozmieszczenie warstw polisacharydu skorupy (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019). $\Delta cotV$ daje łagodniejszy fenotyp, z nieco cieńszą skorupą całkowicie otaczającą sporę, podczas gdy $\Delta cotW$ posiada zdeorganizowaną skorupę, która odziera się od reszty płaszcza zewnętrznego i nie otacza spory całkowicie. Ponadto CotW odgrywa rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej skorupy w kolejnych dniach po lizie komórki macierzystej, zapewniając, że CgeA, inny składnik tej warstwy, pozostanie związany z powierzchnią spor. CotW, CotV oraz CotY wykazują zdolność do samoorganizowania się w uporządkowane struktury, przy czym kompleks CotW-CotV tworzy włókna, a CotY multimery ułożone w warstwy (S. Jiang i in., 2015). CotY jest białkiem bogatym w cysteinę (zawiera 15 reszt Cys), co sprzyja sieciowaniu dwusiarczkowemu (S. Jiang i in., 2015; Ursem i in., 2021). Brak CotY zmniejsza hydrofilowość spor do około 61%, brak CotV 59%, zaś brak CotW aż do 17% względem szczepu dzikiego (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019). Wiadomo również, że CotV i CotY są białkami o ujemnym ładunku, ponadto CotV ma również wysoki udział hydrofobowych reszt aminokwasowych (Krajčíková i in., 2017).

Z kolei SpsB, SpsG, SpsF oraz SpsL należą do rodziny białek Sps (ang. *spore polysaccharide synthesis*, pl. syntezy polisacharydu spor) (Arrieta-Ortiz i in., 2015). Ich geny znajdują się w operonie *spsA-spsB-spsC-spsD-spsE-spsF-spsG-spsI-spsJ-spsK-spsL*, jednym z najdłuższych transkrybowanych w komórce macierzyńskiej (**Ryc. 5.4**) (Presecan i in., 1997). Za jego ekspresję odpowiada czynnik transkrypcyjny σ_K oraz GerE i GerR, jako regulatory pozytywne (Cangiano i in., 2014; Eichenberger i in., 2004). Ponadto hipotetyzowano, że w operonie nad *spsG* znajduje się wewnętrzny promotor dla σ_E (Eichenberger i in., 2004),

jednak zostało to wykluczone w późniejszych eksperymentach (Cangiano i in., 2014). SpsB jest przewidywaną glikozylotransferazą; SpsL bierze udział w biosyntezie ramnozy, węglowodanu, stanowiącego składnik skorupy; SpsG w biosyntezie kwasu CMP-legionaminowego; zaś SpsF jest odpowiedzialny za transport tego kwasu na powierzchnię spor (Dubois i in., 2020). Kwas legionaminowy jest wymagany do złożenia skorupy, a jego brak powoduje, że spory są bardziej hydrofobowe i mniej ujemnie naładowane, co przekłada się na ich właściwości adhezyjne. Jednocześnie zaobserwowano, że zarówno brak wszystkich genów z rodziny *sps*, jak również brak *spsA*, nie zmienia odporności na lizozym (Cangiano i in., 2014). W obu przypadkach stwierdzono za to nieco wolniejszą i mniej wydajną germinację spor, przy czym defekt ten obserwowano tylko we wczesnych punktach czasowych, do 10 minut od rozpoczęcia kiełkowania. Ponadto brak SpsA powodował wzrost hydrofobowości, zaś brak wszystkich białek z rodziny Sps skutkowało tworzeniem się skupisk spor, prawdopodobnie na skutek dalszego wzrostu hydrofobowości, a przez to właściwości adhezyjnych. Sugerowano, że SpsB jest zlokalizowany w płaszczu zewnętrznym.



Rycina 5.4. Schemat lokalizacji genów *sps* w chromosomie bakteryjnym *B. subtilis* oraz ich funkcji (Dubois i in., 2020) - zmodyfikowane

CotP jest białkiem płaszczu wewnętrznego, jego gen znajduje się w operonie *ydgB-ydgA-cotP* i jest pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego σ_K oraz GerE jako represora (McKenney & Eichenberger, 2012). Z kolei CotR jest termostabilnym białkiem płaszczu zewnętrznego i pełni funkcję enzymu lipolitycznego, odpowiadając za hydrolizę lizofosfolipidów (Kato i in., 2010). Donoszono, że delekcja genu *cotR* nie ma wpływu na odporność na lizozym i wysoką temperaturę oraz germinację (Kato i in., 2010; Little & Driks, 2001). Jednak brak innego enzymu lipolitycznego płaszczu, LipC, powoduje wadliwe kiełkowanie spor (Masayama i in., 2007). Zaproponowano, że LipC modyfikuje lipidy błony zewnętrznej podczas sporulacji w celu poprawy przepuszczalności germinantów, czyli

związków indukujących germinację (Masayama i in., 2010). Jednak CotR bezpośrednio nie jest aktywowany przez germinanty, takie jak Ca^{2+} , DPA lub Ca-DPA (Kato i in., 2010). Jego fizjologiczna rola pozostaje niejasna, chociaż stwierdzono iż enzymatyczne właściwości CotR są hamowane obecnością Mg^{2+} , co jest wyjątkową właściwością. Gen *cotR* wymaga do transkrypcji czynnika σK (Little & Driks, 2001).

Białka CgeABCD odpowiadają za dojrzewanie najbardziej zewnętrznej warstwy spory, prawdopodobnie poprzez glikozylację białek skorupy (Bartels i in., 2019; Roels & Losick, 1995). Udowodniono, że CgeA jest jej składnikiem (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019). Geny *cge* znajdują się w operonach *cgeAB* i *cgeCDE* pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego σK i GerE jako aktywatora (Steil i in., 2005). Operon *cgeAB* jest niezbędny do tworzenia skorupy, zaś *cgeCDE* bierze udział w syntezie polisacharydów (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019). Uściślając, mutant ΔcgeB jest całkowicie pozbawiony skorupy, zaś u mutantu ΔcgeA wydaje się być ona luźniej przymocowana do powierzchni spor niż w szczepie dzikim. Ponadto mutanty te nie mają warstwy polisacharydu (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019), w przeciwieństwie do mutantu delecyjnego ΔcgeD , który posiada rozbudowaną jego warstwę (Shuster, Khemmani, Nakaya, i in., 2019). CgeA jest białkiem o ujemnym ładunku i wysokim udziale hydrofobowych reszt aminokwasowych (Krajčiková i in., 2017), co przekłada się na właściwości spor. Mutanty delecyjne ΔcgeA i ΔcgeB wykazują silne fenotypy o zmniejszonej hydrofilowości spor do odpowiednio 3% i 6% względem szczepu dzikiego (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019); ΔcgeD słaby, do 76%; a ΔcgeCA nie wykazuje zmian (Shuster, Khemmani, Nakaya, i in., 2019). W innym badaniu stwierdzono za to, że ΔcgeD wydawał się gorzej ulegać adhezji, a potrójny mutant ΔcgeCDE nie różni się od szczepu dzikiego (Bartels i in., 2019). Brak genu *cgeA* powoduje agregację spor (Imamura i in., 2010; Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019). Funkcja CgeB jest nieznaną, chociaż białko to zawiera przypuszczalną domenę glikozylotransferazy (Bartels i in., 2019; Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019), zaś jego brak powoduje akumulację nieznanego cukru, podobnie jak w przypadku braku wszystkich białek SpsA-L (Bartels i in., 2019). CgeD również wykazuje znaczące podobieństwo sekwencji do glikozylotransferaz (Bartels i in., 2019; Roels & Losick, 1995). Ciekawe jest, iż CgeD jest paralogiem SpsA, oba to domniemane glikozylotransferazy, ale wykazują one odwrotne fenotypy pod względem hydrofobowości spor. CgeA jest prawdopodobnie najrzadziej występującym spośród wszystkich białek

skorupy (Bartels i in., 2019). Wydaje się, że niedojrzałe spory zawierają go więcej, a następnie, wraz z dojrzewaniem spory, jego ilość maleje lub zanika całkowicie, co wskazuje na rolę CgeA we wczesnym rozwoju skorupy. Proponuje się CgeA jako centrum glikozylacji skorupy, które odgrywa rolę w koordynowaniu tego procesu.

YheD to białko płaszczu wiążące ATP (Driks & Eichenberger, 2016). Jego gen znajduje się w operonie *yheC-yheD*, który jest pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego σE i SpoIIID jako aktywatora (Eichenberger i in., 2004; McKenney & Eichenberger, 2012). Białko YheD jest zlokalizowane w podstawnej warstwie płaszczu wewnętrznego (Driks & Eichenberger, 2016; Van Ooij i in., 2004).

SscA jest zaangażowany w składanie płaszczu, m. in. włączenia CotB, CotG i CotH (Kodama i in., 2011). Transkrypt *sscA* należy do 46 najliczniej występujących w uśpionych sporach (Korza i in., 2019). Znajduje się pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego σK i GerE jako aktywatora (Kodama i in., 2011). Brak SscA powoduje mniej wydajną germinację spor, prawdopodobnie pośrednio, na skutek zaburzenia we włączeniu CotH do płaszczu, które to białko jest wymagane do kiełkowania. Sekwencja *sscA* jest podobna do *yjzZ*, genu, który w niniejszej pracy, również wykazał wydajniejszą translację w szczepie badanym 3KO w porównaniu do szczepu kontrolnego WT (**Tab. 4.11**).

Drugą najliczniejszą grupą genów, które w niniejszej pracy wykazały różnicę w translacji były białka stresu (**Tab. 5.3**). Na uwagę zasługuje fakt, iż wszystkie ulegały wydajniejszej translacji w szczepie 3KO niż w szczepie WT.

Tabela 5.3. Wykaz genów ogólnych białek stresu, które wykazały różnicę w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO). Różnicę w translacji przedstawiono w stosunku do translacji szczepu dzikiego (WT), co oznacza, że wartości >1 wskazują na translację wydajniejszą w komórkach szczepu dzikiego (WT), zaś wartości <1 w komórkach szczepu badanego (3KO) (zaznaczono na zielono).

Gen	Krotność różnicy w translacji	Skorygowana wartość p testu Walda	Funkcja
<i>ywsB</i>	0,5	$7,27 * 10^{-3}$	ogólne białka stresu
<i>ykzI</i>	0,4	$2,14 * 10^{-3}$	
<i>ywzA</i>	0,2	$1,93 * 10^{-9}$	
<i>yvgN</i>	0,2	$8,24 * 10^{-4}$	
<i>ybgB</i>	0,2	$1,15 * 10^{-3}$	
<i>yhdA</i>	0,2	$4,11 * 10^{-3}$	

YvgN, *YwzA*, *YkzI* i *YwsB* zostały określone jako ogólne białka stresu na podstawie swojej ekspresji, zależnej od alternatywnego czynnika transkrypcyjnego odpowiedzi na stres, σ_B (Höper i in., 2005; Petersohn i in., 2001). Wiadomo o nich mniej niż o białkach poprzedniej grupy.

YvgN to reduktaza glioksalu i ogólne białko stresu, katalizuje zależną od NADPH reakcję przekształcenia substratu do alkoholu (Höper i in., 2005; Lei i in., 2009; Sakai i in., 2001). Sugeruje się, że może odgrywać rolę w detoksykacji bakterii, poprzez odtruwanie różnych aldehydów pochodzących ze stresu bakteryjnego, w tym aldehydu DL-glicerynowego, metyloglioksalu i dihydroksyacetonu, które mogą powstawać w ekstremalnych warunkach. Ponadto doniesiono, iż brak białka *YvgN* powoduje defekt w sporulacji (Thomaides i in., 2007).

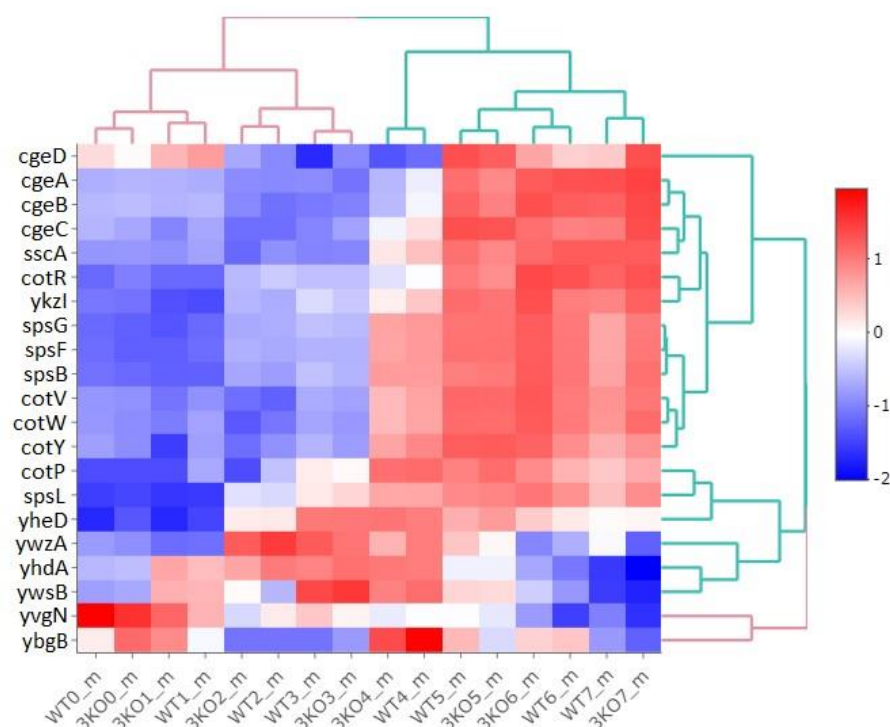
Promotor genu *ywzA* jest indukowany etanolem oraz w niewielkim stopniu wysoką temperaturą (Yeak i in., 2023). Proponowaną funkcją *YwsB* jest przetrwanie stresu spowodowanego etanolem i zasoleniem (Gamba i in., 2015). Na podstawie danych informatycznych, przewiduje się, że *ywzA* oraz *ywsB* może być ekspresjonowany podczas germinacji (Vohradsky i in., 2021)

YbgB to małe białko hydrofobowe (Cao i in., 2003), o domniemanych funkcjach odpornościowych przeciwko toksycznym peptydom (Butcher & Helmann, 2006; Eiamphungporn & Helmann, 2008; Mascher i in., 2007). Jego gen znajduje się pod transkrypcyjną kontrolą alternatywnego czynnika σ_Y , który jest związany z reagowaniem

na stres środowiskowy oraz inicjowaniem transkrypcji genów niezbędnych do przystosowania się do stresu (Cao i in., 2003; Mendez i in., 2012). σ^Y odgrywa rolę w produkcji i odporności na antybiotyki, a w budowie swojego operonu przypomina operon kanibalizmu *skf*, wspomniany we Wstępie (Mendez i in., 2012). Co ciekawe, brak σ^Y powoduje opóźnioną sporulację (Mendez i in., 2012).

YhdA to termostabilna oksydoreduktaza FMN zależna od NADPH, zapewniająca ochronę przed stresem oksydacyjnym (Deller i in., 2006). Udowodniono, że YhdA przeciwdziała cytotoksycznemu i genotoksycznemu działaniu wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych induktorów rodników tlenowych, w tym powstających podczas redukcji sześciowartościowego chromu (Valenzuela-García i in., 2020). Jego gen znajduje się w operonie *yhcY-yhcZ-yhdA*, który jest pod kontrolą LiaR, regulatora transkrypcji odpowiedzi na stres (Jordan i in., 2006; Mascher i in., 2003; Valenzuela-García i in., 2020; Wolf i in., 2010). Doniesiono, że transkrypcja *yhdA* jest indukowana szokiem niskiej temperatury (Deller i in., 2006).

Podsumowując, można zauważyć, że generalnie produkty powyższej grupy genów nie są uznawane za białka ściśle związane ze sporulacją, a ich transkrypcja w siódmej godzinie sporulacji jest ogólnie niska, w przeciwieństwie do grupy genów związanych z płaszczem, w tym ze skorupą (**Ryc. 5.5**). Można więc przypuszczać, że wydajniejsza translacja tych transkryptów jest przejawem zaburzeń, mających miejsce w komórkach szczepu 3KO w siódmej godzinie trwania procesu sporulacji. Warto również zauważyć, że mapa ciepła pogrupowała odczyty według prawidłowych punktów czasowych, wskazując na to, że poziomy transkrypcji tych genów nie różniły się pomiędzy szczepami WT i 3KO, dodatkowo potwierdzając, że różnica dotyczy jedynie poziomu translacji.



Rycina 5.5. Mapa ciepła transkrypcji genów, wykazujących różnicę w translacji, do których przyporządkowaną funkcją związaną z płaszczem spor lub ogólnym stresem

Największą różnicę w wydajności translacji wykazywały geny *yurS*, *ylqC*, *gyrA*, *yloS*, *mazF* i wszystkie one ulegały wydajniejszej translacji w szczepie WT w porównaniu do szczepu 3KO (Tab. 5.4). Cechują się one dość zróżnicowaną funkcją, ale można zauważyć, że trzy spośród nich kodują białka, których rola jest związana z kwasami nukleinowymi, chociaż wiedza na temat *yurS* i *ylqC* jest niewielka i/lub nieugruntowana.

Tabela 5.4. Wykaz genów, które wykazały największe różnice w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO). Różnicę w translacji przedstawiono w stosunku do translacji szczepu dzikiego (WT), co oznacza, że wartości >1 wskazują na translację wydajniejszą w komórkach szczepu dzikiego (WT) (zaznaczono na czerwono), zaś wartości <1 w komórkach szczepu badanego (3KO).

Gen	Krotność różnicy w translacji	Skorygowana wartość p	Funkcja
<i>yurS</i>	7,5	$1,11 * 10^{-11}$	białko sporulacyjne o nieznannej funkcji
<i>ylqC</i>	6,8	$5,00 * 10^{-5}$	domniemane białko wiążące RNA
<i>gyrA</i>	5,7	$2,68 * 10^{-7}$	gyraza DNA
<i>yloS</i>	5,6	$1,55 * 10^{-4}$	pirofosfokinaza tiaminy
<i>mazF</i>	5,5	$2,09 * 10^{-3}$	toksyna, programowana śmierć komórki

yurS znajduje się w operonie *spsG-yurS*, który jest pod kontrolą czynnika translacyjnego σ K i GerE jako aktywatora (Bagyan i in., 1998). Donoszono, że delekcja *yurS*

nie powoduje różnic w przebiegu procesu sporulacji ani germinacji spor. SspG należy do rodziny białek SASP, odpowiadających za ochronę DNA, znajdującego się w rdzeniu zarodników. Ekspresja YurS w siódmej godzinie sporulacji ma więc uzasadnienie, jednak jego funkcja nie jest znana.

Przypuszcza się, że YlqC to białko wiążące RNA (Wicke i in., 2023), ponieważ składa się ono wyłącznie z tzw. domeny KH, która znana jest ze swojej zdolności do rozpoznawania kwasów nukleinowych (Valverde i in., 2008). Moduły KH znajdują się w wielu białkach, które biorą udział w różnych procesach biologicznych, w tym splicingu, regulacji transkrypcji i kontroli translacji. KH mogą wiązać szeroką gamę motywów sekwencji. Za tą specyficzną prawdopodobnie odpowiadają sekwencja aminokwasów i dokładna struktura rozpoznawanego motywu, które nie są jednak znane dla YlqC. Kilka ostatnich badań wykazało, że YlqC może wiązać się z małymi regulatorowymi RNA (sRNA), mRNA i tRNA, jednak pula konkretnych ligandów różni się w zależności od organizmu (Olejniczak i in., 2022). Generalnie, wpływ białek z domeną KH może być zarówno negatywny, jak i pozytywny, dla ekspresji danego genu, i w przypadku YlqC pozostaje w dużej mierze nieznaną. Najlepiej scharakteryzowaną rolą fizjologiczną, w jaką zaangażowany jest YlqC, jest wydłużanie komórek u *Streptococcus pneumoniae*. Koresponduje to z faktem, że wiąże on mRNA, kodujące białka podziału komórkowego, w tym FtsA, które jest regulowane negatywnie. Wykryto, że w mutantach delecyjnych $\Delta ylqC$ ilość FtsA jest większa przy niezmiennym poziomie transkryptu, w porównaniu do szczepu dzikiego (Zheng i in., 2017). Wskazówek dotyczących fizjologicznej roli białek YlqC, naukowcy doszukują się również w położeniu jego genu (Olejniczak i in., 2022). *ylqC* jest silnie konserwatywna z *rpsP*, kodującym białko rybosomalne S16, jak również *rimM*, kodującym czynnik dojrzewania 16S rRNA i *trmD*, kodującym metylotransferazę tRNA. Co ciekawe, zwrócono uwagę, że gen innego białka, zawierającego domenę KH, *jag* znajduje się w operonie ze *spolIII*, kodującym translokazę, niezbędną dla aktywności σ^G w stadium III, która bierze udział w składaniu kompleksu SpoIIAH-SpoIIQ (Serrano i in., 2003), a także *rpmH*, kodującym białko rybosomalne L34 i *rnpA*, odpowiadający za dojrzewanie tRNA (Pedreira i in., 2022). Faktycznie, stanowi to interesujące pole dla przyszłych badań.

gyrA koduje podjednostkę A enzymu gyrazy DNA (Arjes i in., 2022). Enzym ten odpowiada za hamowanie inicjacji replikacji DNA, poprzez zmniejszenie powiązania białka

DnaA z *oriC* (Samadpour & Merrih, 2018). Zaprzeszanie kolejnych rund replikacji jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu procesu sporulacji (Scholefield i in., 2011), dlatego ekspresja *gyrA* jest uzasadniona.

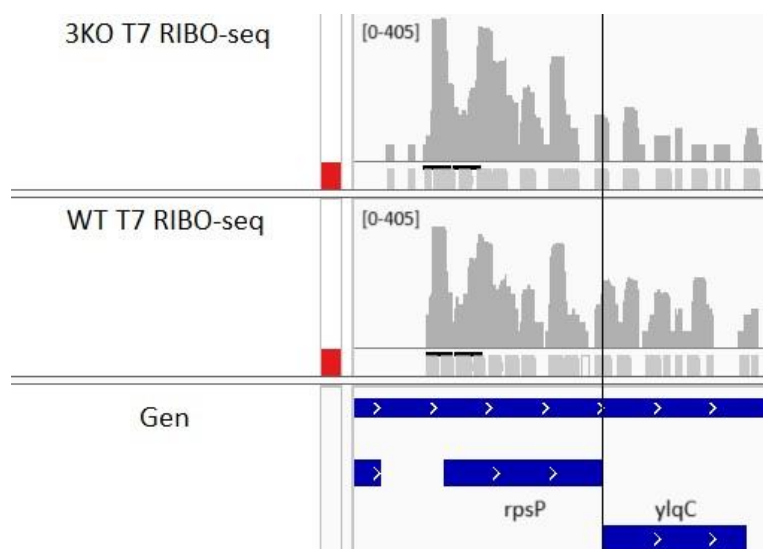
yloS koduje pirofosfokinazę tiaminy, czyli witaminy B1, która jest niezbędnym kofaktorem wielu ważnych enzymów w metabolizmie węglowodanów i aminokwasów (Melnick i in., 2004; Schyns i in., 2005). Znaczenie ekspresji *yloS* w siódmej godzinie sporulacji jest niejasne.

mazF koduje toksynę i jest elementem dwuskładnikowego układu toksyna-antytoksyna, bardzo dobrze scharakteryzowanym we Wstępie. W przeciwieństwie do MazF-ec *E. coli*, który specyficznie tnie sekwencje ACA, MazF-bs *B. subtilis* jest interferazą mRNA, która specyficznie tnie sekwencję o pięciu zasadach, UACAU (Park i in., 2011). Stwierdzono, że homologi MazF powszechnie występujące w bakteriach Gram-dodatnich są wysoce homologiczne z MazF-bs. Stwierdzono, że rozpoznawana przez MazF-bs sekwencja AUCAU jest nadreprezentowana w genach *B. subtilis* związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych i dlatego zasugerowano, że MazF-bs może brać udział w ich regulacji. Co interesujące z perspektywy procesu sporulacji, doniesiono, że MazF odpowiada za lizę komórek u bakterii *Myxococcus xanthus*, która jest obligatoryjna dla wytworzenia tzw. *myxospor* (Nariya & Inouye, 2008). Uzasadnione jest więc przypuszczenie, że ekspresja MazF u *B. subtilis* w siódmej godzinie sporulacji jest związana z lizą komórek macierzystych, umożliwiając uwolnienie endospor. Ponadto zwiększona wydajność translacji tego genu w szczepie WT koresponduje z obserwacjami mikroskopowymi, w których zaobserwowano częstsze oznaki lizy komórkowej właśnie w tym szczepie w porównaniu do szczepu 3KO (**Ryc. 4.23 i 4.25**).

Generalnie można zauważyć, że różnice w translacji bardzo często dotyczyły genów ekspresjonowanych w komórce macierzystej, pod kontrolą charakterystycznych dla tego przedziału czynników transkrypcyjnych, głównie σ_K , ale również σ_E . Otrzymane wyniki mogą reprezentować stan faktyczny. Inną możliwością jest to, że obserwowana tendencja może być spowodowana faktem, iż wraz z postępem sporulacji dostęp do wnętrza prespory jest coraz bardziej utrudniony. Tym samym istnieje ewentualność, iż analizowane odczyty były wzbogacone o transkrypty pochodzące z komórki macierzystej. Nie podważa to jednak otrzymanych wyników, a jedynie dopuszcza możliwość istnienia większej ilości genów

różniących się wydajnością translacji, które byłyby zależne od czynników transkrypcyjnych prespory, a które nie zostały wykryte w niniejszych badaniach.

Warto też zauważyć, że większość genów, wykazujących różnice w translacji, znajdowała się wewnątrz operonów (**Ryc. 5.6**). Może to wskazywać, że faktycznie dochodzi do preferencji translacji wybranych transkryptów.



Rycina 5.6. Wizualizacja zmapowanych odczytów RIBO-seq do genów *rpsP* i *yljC* w szczepie WT i 3KO w siódmej godzinie po indukcji sporulacji (T7) jako przykład genu, wykazującego różnicę w translacji (*yljC*), który znajduje się w operonie z genem nie wykazującym różnicy (*rpsP*)

W powyższym kontekście, wydaje się logiczne, aby wykryta w niniejszej pracy różnica w wydajności germinacji, prawdopodobnie spowodowana odmienną odpornością na wysoką temperaturę, była konsekwencją różnic w ekspresji genów, które zostały wykryte w siódmej godzinie sporulacji.

Różnica w wydajności germinacji została wykryta w wyniku testu, który polegał na zliczaniu kolonii wyhodowanych na stałym podłożu z całonocnych, dojrzałych spor, potraktowanych wysoką temperaturą. Test ten pozwolił określić, że średnia wydajność germinacji spor szczepu WT była około dwukrotnie większa niż szczepu 3KO (**Ryc. 4.27**). Różnica w wydajności germinacji została również potwierdzona w krzywych wzrostu płynnych hodowli, zapoczątkowanych z tak samo przygotowanych spor (**Ryc. 4.28**). Konsekwencją zaobserwowania różnic w wydajności germinacji spor było przeprowadzenie obserwacji mikroskopowych również dla tego procesu.

W wyniku obserwacji mikroskopowych, wykryto znaczącą różnicę w intensywności fluorescencji, której źródłem było GFP w fuzji z RpsB (**Ryc. 4.33, 4.34; Tab. 4.14**). Różnica była istotna statystycznie dla wszystkich punktów czasowych za wyjątkiem T-1, który reprezentuje czas przed inkubacją spor w temperaturze 90°C przez 40 minut. W punkcie T-1 100% spor obu szczepów charakteryzowało się intensywnym sygnałem GFP, zaś w kolejnym punkcie odsetek ten gwałtownie zmalał w przypadku spor szczepu 3KO i do końca obserwacji był o około połowę mniejszy niż dla szczepu WT (**Ryc. 4.32**). Tym samym, bezpośrednim czynnikiem różnicującym spory obu szczepów okazało się być poddanie ich działaniu wysokiej temperatury. Na podstawie otrzymanych wyników można wysnuć wniosek, że subpopulacja spor szczepu 3KO wykazuje brak odporności na wysoką temperaturę, która powoduje denaturację białek w ich rdzeniu, co przejawia się zmniejszeniem fluorescencji GFP.

W przeciwieństwie do sygnału GFP, sygnał DAPI był wykrywany u około dwóch razy więcej spor szczepu 3KO niż WT w dwóch pierwszych punktach czasowych (T-1 i T0), a więc przed indukcją germinacji (**Ryc. 4.32**). W kolejnych punktach czasowych odsetek spor wykazujących fluorescencję wywołaną przez barwnik DAPI jest zbliżony do siebie pomiędzy szczepami i wykazuje tendencję wzrostową. Może być to spowodowane różnicą w przepuszczalności spor na ten związek, przy czym spory szczepu 3KO wykazywałyby wyższą przepuszczalność. Koresponduje to z faktem, iż spory mutantów, u których usunięto geny odpowiadające za tworzenie płaszczka, wykazywały wyższą przepuszczalność dla wody (Knudsen i in., 2016). Tłumaczyłoby to również obserwowaną tendencję wzrostową, ponieważ spory zwiększają swoją przepuszczalność wraz z postępem germinacji (Behravan i in., 2000; Black & Gerhardt, 1962; Bruno, 2015; Moir i in., 2002; Trunet i in., 2017). Zbliżony procent spor wykazujących fluorescencję DAPI od punktu czasowego T1, oznaczającego 30 minut od indukcji germinacji, także jest uzasadniony, ponieważ wykazano, że spory zabite wysoką temperaturą są przepuszczalne dla barwnika fluorescencyjnego na podobnym poziomie co germinujące zarodniki (Black & Gerhardt, 1962; Mtimet i in., 2017; Trunet i in., 2019). Ponadto warto zwrócić uwagę, że zmiany w długości spor (**Ryc. 4.29**) negatywnie korelują z odsetkiem spor wykazujących fluorescencję DAPI (**Ryc. 4.32**) w punktach czasowych od T1 do T4, tj. gdy długość spor zmniejsza się, to zwiększa się odsetek spor wykazujących tą fluorescencję. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że przy

niezmienionej zawartości chromosomu bakteryjnego, mniejsza objętość spor powoduje jego zagęszczenie i implikuje tym samym wyższy sygnał fluorescencji DAPI, który jest częściej wykrywany.

W literaturze zwraca się uwagę, że wiele efektów wykrywanych podczas szukania wyspecjalizowanych rybosomów może być spowodowanych zmniejszeniem ogólnej liczby rybosomów (Ferretti & Karbstein, 2019; Gay i in., 2022). W niniejszej pracy nie zaobserwowano różnicy w intensywności białka RpsB-GFP, które reprezentuje rybosom w komórkach wegetatywnych (**Ryc. 4.23 i 4.25**), jak i dojrzałych, całonocnych sporach (**Ryc. 4.33**).

Wzór ekspresji białek rybosomalnych w szczepie 3KO nie wydaje się odbiegać od szczepu WT (**Ryc. 4.18**) chociaż w siódmej godzinie sporulacji wykryto różnicę w poziomie transkrypcji dla genów *rpsM* i *rplW*, dla których była ona wyższa w szczepie 3KO oraz dla genu *rpsI*, dla którego była wyższa w szczepie WT (**Tab. 5.5**). *rpsM* koduje niezbędne białko rybosomalne S13, zaś *rplW* koduje L23 o niejasnej obligatoryjności i oba znajdują się w głównym operonie S10-spc- α , zaś gen *rpsI*, kodujący niezbędne białko S9, znajduje się w oddzielnym operonie z *rplM* (Akanuma i in., 2012; Kobayashi i in., 2003; Pedreira i in., 2022).

Wykryto zwiększoną translację białka RpmE w szczepie 3KO, który pozbawiony jest genu jego paralogi, czyli *rpmEB*, jednak nie zaobserwowano tego dla pozostałych usuniętych genów, czyli dla białek RpsN oraz RpmGA i RpmGB (**Tab. 5.5**). Zamiast tego w szczepie WT wykryto zwiększoną translację dla genu *rpmC*, który koduje białko rybosomalne L29.

Tabela 5.5. Wykaz genów białek rybosomalnych, które wykazały różnice w ekspresji genów między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO). Na czerwono zaznaczono wyższą transkrypcję/translację wykrytą dla szczepu 3KO, zaś na zielono dla szczepu WT.

Gen	Krotność różnicy	Skorygowana wartość p	Różnica w ekspresji genów na poziomie
<i>rpsM</i>	2,1	$6,64 * 10^{-6}$	transkrypcji
<i>rpsI</i>	2,5	$5,00 * 10^{-5}$	
<i>rpsM</i>	2,1	$9,57 * 10^{-5}$	
<i>rpmC</i>	2,7	$2,38 * 10^{-3}$	translacji
<i>rpmE</i>	2,5	$2,09 * 10^{-3}$	

Możliwe iż różnice ekspresji powyższych białek rybosomalnych w siódmej godzinie sporulacji są próbą rekompensaty braku białek RpmGC, RpmEB i RpsNB w szczepie 3KO.

W przypadku barwienia OPP-Alexa, które wykrywa aktywną translację, charakterystyczna dla tej metody zielona fluorescencja jest właściwie niewidoczna, zarówno w sporach szczepu WT, jak i 3KO (**Ryc. 4.35**). Była ona jednak wykrywana przez program Fiji na bardzo niskich poziomach i generalnie wykazywała tendencję wzrostową wraz z postępem germinacji (**Tab. 4.15**). Zgadza się to z faktem, iż translacja zachodzi już od pierwszej fazy germinacji, czyli kiełkowania, chociaż do niedawna uważano, że translacja ma miejsce dopiero w późniejszych etapach (Sinai i in., 2015; B. Zhou i in., 2022). Wykryta istotna statystycznie różnica w intensywności fluorescencji OPP-Alexa dla dwóch punktów czasowych, które odpowiadają 30 minutom (T1) oraz 2 godzinom od indukcji germinacji (T4), wskazują na statystycznie istotnie słabszą translację w sporach szczepu 3KO na tych etapach germinacji (**Tab. 4.15**). Może ona zapowiadać, obserwowaną w konsekwencji, mniej wydajną germinację spor (**Ryc. 4.27, 4.28**). Różnica w poziomie translacji wykryta po 30 minutach od indukcji germinacji może być powodem obserwowanej od 60 minuty statystycznie istotnej różnicy w długościach spor pomiędzy szczepami (**Tab. 4.13**). Również niemal niewykrywalny poziom translacji w sporach szczepu 3KO, przypadający na drugą godzinę od indukcji germinacji, może tłumaczyć zahamowanie wzrostu spor obserwowane po tej godzinie dla tego właśnie szczepu.

Podsumowując, niniejsze badania wykryły znaczące różnice w ekspresji genów w siódmej godzinie sporulacji (**Tab. 4.10 i 4.11**), które są prawdopodobnie spowodowane brakiem paralogów białek rybosomalnych RpmGC, RpmEB i RpsNB. Możliwe iż są one następstwem obniżonego poziomu translacji wykrytego już w szóstej godzinie sporulacji dla subpopulacji komórek szczepu 3KO (**Ryc. 4.26**). Konsekwencją zaburzeń ekspresji genów na końcowych etapach sporulacji wydaje się być znacznie zmniejszona wydajność germinacji spor szczepu 3KO (**Ryc. 4.27 i 4.28**). Najprawdopodobniej jest ona spowodowana wrażliwością spor szczepu 3KO na wysoką temperaturę, która wydaje się powodować denaturację białek rdzenia, w tym rybosomów (**Ryc. 4.32-34**).

Możliwe jest iż zmniejszona wydajność germinacji spor szczepu badanego 3KO jest spowodowana plejotropowym efektem różnic w translacji, spowodowanej brakiem subpopulacji rybosomów, zawierających paralogi białek L31, L33 i S21. Różnice w translacji

dotyczyły głównie białek związanych z najbardziej zewnętrzną powłoką spor, czyli płaszczem i jej szczególną warstwą, skorupą. Białka te znane są ze swojego wpływu na właściwości powierzchniowe spor, takie jak hydrofobowość i ładunek ujemny, które skutkują zmianami w adhezji i rozprzestrzenianiu się spor (Shuster, Khemmani, Abe, i in., 2019). Skorupa i, uogólniając, płaszcz nie są odpowiedzialne, według literatury, za odporność spor na wysoką temperaturę (P. Setlow, 2006), chociaż istnieją doniesienia, wiążące skład białkowy i strukturę płaszcz z odpornością na ten stresor (Abhyankar i in., 2015; Abhyankar i in., 2016; Sanchez-Salas i in., 2011).

W naturalnych warunkach, spory tworzą się i kiełkują w zdecydowanie bardziej zróżnicowanym środowisku niż w warunkach laboratoryjnych. Nawet w warunkach kontrolowanych i ujednoczonych, zarówno sporulacja, jak i germinacja spor nie zachodzi całkowicie równomiernie i jednocześnie (Chastanet i in., 2010; De Jong i in., 2010; Dubnau & Losick, 2006; Kong i in., 2014; P. Zhang i in., 2010; Y. Zhang i in., 2020). Ta heterogeniczność ma uzasadnienie biologiczne, m. in. w tym, że oba te procesy są nieodwracalne (Narula i in., 2012; Siebring i in., 2014). Szczególne znaczenie ma to w germinacji, kiedy to przedwczesne rozpoczęcie kiełkowania w otoczeniu, które nie zapewnia wystarczających warunków dla wzrostu, oznacza bezwzględną śmierć spory (Kong i in., 2014).

VI. Podsumowanie i wnioski

Na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników można sformułować następujące wnioski:

1. Potrójny mutant delecyjny 3KO ($\Delta rpmEB\Delta rpmGC\Delta rpsNB$) nie różnił się krzywą wzrostu od szczepu dzikiego WT we wszystkich zbadanych pożywkach, zarówno w mediach bogatych w składniki odżywcze (LB, CH), jak również w ubogich (BMM).
2. Szczep 3KO nie wykazywał różnic we wzroście ani rozwoju po traktowaniu szerokim zakresem związków chemicznych, m.in. lizozymem, antybiotykami (ampicylina, kwas fusydowy, spektynomycyna, tiostrepton), detergentami (SDS, Tween-20) i solami (Na_2SO_4 , $MnSO_4$, $ZnCl_2$).
3. Szczep 3KO oraz szczep WT tworzył silnie rozbudowany i trwały biofilm, w przeciwieństwie do udomowionego szczepu BGSC, który, zgodnie z przewidywaniami, tworzył cienki i łatwo rozpadający się biofilm. Tym samym jednoczesny brak trzech genów *rpmEB*, *rpmGC*, *rpsNB* nie wpływa na zdolność do tworzenia biofilmu u *B. subtilis*.
4. Szczep 3KO wykazywał słabsze zdolności do ruchu pływającego w porównaniu do szczepu WT, zaś nie wykazywał różnic w ruchu pełzającym.
5. Różnice w translacji między szczepami 3KO i WT wykryto jedynie w siódmej godzinie po indukcji sporulacji i dotyczyła ona 65 genów. Wydajniejsza translacja w szczepie WT dotyczyła głównie białek związanych z właściwościami płaszcza spor, zaś w szczepie 3KO dotyczyła ogólnych białek stresu.
6. Wykorzystując mikroskopię konfokalną i barwienie OPP-Alexa, wykrywające miejsca aktywnej translacji, wykryto subpopulację komórek szczepu 3KO w szóstej godzinie po indukcji sporulacji, która cechowała się mniej wydajną translacją.
7. Spory utworzone przez szczep 3KO charakteryzowały się znacząco słabszą wydajnością germinacji.
8. Spory szczepu 3KO wydają się być wrażliwe na działanie wysokiej temperatury, ponieważ po inkubacji w 90°C przez 40 minut zaobserwowano nagły spadek odsetek spor wykazujących fluorescencję RpsB-GFP, w przeciwieństwie do spor szczepu WT.

Bibliografia

- Abhyankar, W., Pandey, R., Ter Beek, A., Brul, S., de Koning, L. J., & de Koster, C. G. (2015). Reinforcement of *Bacillus subtilis* spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation. *Food Microbiology*, 45(PA). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.007>
- Abhyankar, W., Kamphorst, K., Swarge, B. N., van Veen, H., van der Wel, N. N., Brul, S., de Koster, C. G., & de Koning, L. J. (2016). The Influence of Sporulation Conditions on the Spore Coat Protein Composition of *Bacillus subtilis* Spores. *Frontiers in microbiology*, 7, 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01636>
- Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology* (T. 7, Numer 9). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198>
- Aguilar, C., Vlamakis, H., Guzman, A., Losick, R., & Kolter, R. (2010). KinD is a checkpoint protein linking spore formation to extracellular-matrix production in *Bacillus subtilis* biofilms. *mBio*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00035-10>
- Akanuma, G., Kawamura, F., Watanabe, S., Watanabe, M., Okawa, F., Natori, Y., Nanamiya, H., Asai, K., Chibazakura, T., Yoshikawa, H., Soma, A., Hishida, T., & Kato-Yamada, Y. (2021). Evolution of ribosomal protein s14 demonstrated by the reconstruction of chimeric ribosomes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 203(10). <https://doi.org/10.1128/JB.00599-20>
- Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Nomura, N., & Kawamura, F. (2006). Liberation of zinc-containing L31 (RpmE) from ribosomes by its paralogous gene product, YtiA, in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(7). <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2715-2720.2006>
- Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Yano, K., Suzuki, S., Omata, S., Ishizuka, M., Sekine, Y., & Kawamura, F. (2012). Inactivation of ribosomal protein genes in *Bacillus subtilis* reveals importance of each ribosomal protein for cell proliferation and cell differentiation. *Journal of Bacteriology*, 194(22). <https://doi.org/10.1128/JB.01544-12>
- Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., & Kulka, H. E. (2009). *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both „«death proteins»” and „«survival proteins»”. *PLoS Genetics*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000390>
- Andrews, S. (2020). Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. *W Soil* (T. 5, Numer 1).
- Arjes, H. A., Gui, H., Porter, R., Atolia, E., Peters, J. M., Gross, C., Kearns, D. B., & Huang, K. C. (2022). Fatty Acid Synthesis Knockdown Promotes Biofilm Wrinkling and Inhibits Sporulation in *Bacillus subtilis*. *mBio*, 13(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.01388-22>
- Arrieta-Ortiz, M. L., Hafemeister, C., Bate, A. R., Chu, T., Greenfield, A., Shuster, B., Barry, S. N., Gallitto, M., Liu, B., Kacmarczyk, T., Santoriello, F., Chen, J., Rodrigues, C. DA, Sato, T., Rudner, D. Z., Driks, A., Bonneau, R., & Eichenberger, P. (2015). An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Molecular Systems Biology*, 11(11). <https://doi.org/10.15252/msb.20156236>

- Atrih, A., & Foster, S. J. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01394.x>
- Aung, S., Shum, J., Abanes-De Mello, A., Broder, D. H., Fredlund-Gutierrez, J., Chiba, S., & Pogliano, K. (2007). Dual localization pathways for the engulfment proteins during *Bacillus subtilis* sporulation. *Molecular Microbiology*, *65*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05887.x>
- Bagyan, I., Setlow, B., & Setlow, P. (1998). New small, acid-soluble proteins unique to spores of *Bacillus subtilis*: Identification of the coding genes and regulation and function of two of these genes. *Journal of Bacteriology*, *180*(24). <https://doi.org/10.1128/jb.180.24.6704-6712.1998>
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, *289*(5481). <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>
- Banse, A. V., Hobbs, E. C., & Losick, R. (2011). Phosphorylation of Spo0A by the histidine kinase KinD requires the lipoprotein med in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *193*(15). <https://doi.org/10.1128/JB.05199-11>
- Barák, I., & Muchová, K. (2018). The positioning of the asymmetric septum during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, *13*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201979>
- Barák, I., Muchová, K., & Labajová, N. (2019). Asymmetric cell division during *Bacillus subtilis* sporulation. *W Future Microbiology* (T. 14, Numer 4, s. 353–363). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0338>
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Médigue, C., & Danchin, A. (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: The *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology*, *155*(6). <https://doi.org/10.1099/mic.0.027839-0>
- Barna M, Karbstein K, Tollervey D, Ruggero D, Brar G, Greer EL, & Dinman JD. (2022). The promises and pitfalls of specialized ribosomes. *W Molecular Cell* (T. 82, Numer 12, s. 2179–2184). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.035>
- Bartels, J., Blüher, A., López Castellanos, S., Richter, M., Günther, M., & Mascher, T. (2019). The *Bacillus subtilis* endospore crust: protein interaction network, architecture and glycosylation state of a potential glycoprotein layer. *Molecular Microbiology*, *112*(5). <https://doi.org/10.1111/mmi.14381>
- Becker, E. C., & Pogliano, K. (2007). Cell-specific SpoIIIE assembly and DNA translocation polarity are dictated by chromosome orientation. *Molecular Microbiology*, *66*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05992.x>
- Beckerling, C. L., Steil, L., Weber, M. H. W., Völker, U., & Marahiel, M. A. (2002). Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *184*(22). <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6395-6402.2002>

- Behravan, J., Chirakkal, H., Masson, A., & Moir, A. (2000). Mutations in the gerP locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect access of germinants to their targets in spores. *Journal of Bacteriology*, *182*(7). <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1987-1994.2000>
- Belitsky, M., Avshalom, H., Erental, A., Yelin, I., Kumar, S., London, N., Sperber, M., Schueler-Furman, O., & Engelberg-Kulka, H. (2011). The *Escherichia coli* Extracellular Death Factor EDF Induces the Endoribonucleolytic Activities of the Toxins MazF and ChpBK. *Molecular Cell*, *41*(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.023>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.023>
- Ben-Yehuda, S., & Losick, R. (2002). Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell*, *109*(2). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00698-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00698-0)
- Ben-Yehuda, S., Rudner, D. Z., & Losick, R. (2003a). Assembly of the SpoIIIE DNA Translocase Depends on Chromosome Trapping in *Bacillus subtilis*. *Current Biology*, *13*(24). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00912-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00912-6)
- Ben-Yehuda, S., Rudner, D. Z., & Losick, R. (2003b). RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science*, *299*(5606). <https://doi.org/10.1126/science.1079914>
- Besprozvannaya, M., & Burton, B. M. (2014). Do the same traffic rules apply? Directional chromosome segregation by SpoIIIE and FtsK. *W Molecular Microbiology* (T. 93, Numer 4). <https://doi.org/10.1111/mmi.12708>
- Besprozvannaya, M., Pivorunas, V. L., & Burton, B. M. (2014). Mechanistic study of classical translocation-dead SpoIIIE36 reveals the functional importance of the hinge within the SpoIIIE motor. *Journal of Bacteriology*, *196*(13). <https://doi.org/10.1128/JB.01725-14>
- Besprozvannaya, M., Pivorunas, V. L., Feldman, Z., & Burton, B. M. (2013). SpoIIIE protein achieves directional DNA translocation through allosteric regulation of ATPase activity by an accessory domain. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(40). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484055>
- Bickle, T. A., Howard, G. A., & Traut, R. R. (1973). Ribosome heterogeneity. The nonuniform distribution of specific ribosomal proteins among different functional classes of ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *248*(13), 4862–4864. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)43745-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)43745-9)
- Black, S. H., & Gerhardt, P. (1962). PERMEABILITY OF BACTERIAL SPORES III. *Journal of Bacteriology*, *83*(2). <https://doi.org/10.1128/jb.83.2.301-308.1962>
- Blaylock, B., Jiang, X., Rubio, A., Moran, C. P., & Pogliano, K. (2004). Zipper-like interaction between proteins in adjacent daughter cells mediates protein localization. *Genes and Development*, *18*(23). <https://doi.org/10.1101/gad.1252704>

- Bose, B., Reed, S. E., Besprozvannaya, M., & Burton, B. M. (2016). Missense mutations allow a sequence-blind mutant of SpoIIIE to successfully translocate chromosomes during sporulation. *PLoS ONE*, *11*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148365>
- Bradshaw, N., & Losick, R. (2015). Asymmetric division triggers cell-specific gene expression through coupled capture and stabilization of a phosphatase. *eLife*, *4*(OCTOBER2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.08145>
- Bramkamp, M., & van Baarle, S. (2009). Division site selection in rod-shaped bacteria. *W Current Opinion in Microbiology* (T. 12, Numer 6). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.10.002>
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.191384198>
- Breier, A. M., & Grossman, A. D. (2007). Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Molecular Microbiology*, *64*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05690.x>
- Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, *190*(4776). <https://doi.org/10.1038/190576a0>
- Britton, R. A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R., & Grossman, A. D. (2002). Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (Sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *184*(17). <https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4881-4890.2002>
- Brochier, C., Philippe, H., & Moreira, D. (2000). The evolutionary history of ribosomal protein RpS14: Horizontal gene transfer at the heart of the ribosome. *Trends in Genetics*, *16*(12). [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02142-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02142-9)
- Broder, D. H., & Pogliano, K. (2006). Forespore Engulfment Mediated by a Ratchet-Like Mechanism. *Cell*, *126*(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.053>
- Bruno, J. G. (2015). An acridine orange spore germination fluorescence microscopy versus spectral paradox. *Journal of Fluorescence*, *25*(1). <https://doi.org/10.1007/s10895-014-1498-5>
- Burbulys, D., Trach, K. A., & Hoch, J. A. (1991). Initiation of Sporulation in *B. subtilis* Is Controlled by a Multicomponent Phosphorelay. *W Cell* (T. 64).
- Burton, B. M., Marquis, K. A., Sullivan, N. L., Rapoport, T. A., & Rudner, D. Z. (2007). The ATPase SpoIIIE Transports DNA across Fused Septal Membranes during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell*, *131*(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.009>
- Buskirk, A. R. (2018). Toxins that Trash Translation. *W Molecular Cell* (T. 70, Numer 5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.027>
- Butcher, B. G., & Helmann, J. D. (2006). Identification of *Bacillus subtilis* σ^W -dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. *Molecular Microbiology*, *60*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05131.x>

- Byrgazov, K., Vesper, O., & Moll, I. (2013). Ribosome heterogeneity: Another level of complexity in bacterial translation regulation. *W Current Opinion in Microbiology* (T. 16, Numer 2).
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.009>
- 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).
<https://doi.org/10.1101/gad.1781709>
- Camp, A. H., Wang, A. F., & Losick, R. (2011). A small protein required for the switch from σ^F to σ^G during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 193(1).
<https://doi.org/10.1128/JB.00949-10>
- Campo, N., & Rudner, D. Z. (2006). A Branched Pathway Governing the Activation of a Developmental Transcription Factor by Regulated Intramembrane Proteolysis. *Molecular Cell*, 23(1). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.019>
- Campo, N., & Rudner, D. Z. (2007). SpoIVB and CtpB are both forespore signals in the activation of the sporulation transcription factor σ^K in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 189(16).
<https://doi.org/10.1128/JB.00399-07>
- Cangiano, G., Sirec, T., Panarella, C., Isticato, R., Baccigalupi, L., De Felice, M., & Ricca, E. (2014). The *sps* gene products affect the germination, hydrophobicity, and protein adsorption of *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23).
<https://doi.org/10.1128/AEM.02893-14>
- Cao, M., Salzberg, L., Tsai, C. S., Mascher, T., Bonilla, C., Wang, T., Ye, R. W., Márquez-Magaña, L., & Helmann, J. D. (2003). Regulation of the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function protein σ^Y and its target promoters. *Journal of Bacteriology*, 185(16).
<https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4883-4890.2003>
- Carniol, K., Ben-Yehuda, S., King, N., & Losick, R. (2005). Genetic dissection of the sporulation protein SpoIIIE and its role in asymmetric division in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(10). <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3511-3520.2005>
- Carroll, A. M., Plomp, M., Malkin, A. J., & Setlow, P. (2008). Protozoal digestion of coat-defective *Bacillus subtilis* spores produces „rinds” composed of insoluble coat protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01228-08>
- Castaing, J. P., Nagy, A., Anantharaman, V., Aravind, L., & Ramamurthi, K. S. (2013). ATP hydrolysis by a domain related to translation factor GTPases drives polymerization of a static bacterial morphogenetic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.1210554110>
- Cate, J. H. D. (2010). Some reassembly required: MicroCommentary. *W Molecular Microbiology* (T. 75, Numer 4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07017.x>
- Cattoni, D. I., Chara, O., Godefroy, C., Margeat, E., Trigueros, S., Milhiet, P. E., & Nöllmann, M. (2013). SpoIIIE mechanism of directional translocation involves target search coupled to sequence-dependent motor stimulation. *EMBO Reports*, 14(5).
<https://doi.org/10.1038/embor.2013.39>
- Cattoni, D. I., Thakur, S., Godefroy, C., Le Gall, A., Lai-Kee-Him, J., Milhiet, P. E., Bron, P., & Nöllmann, M. (2014). Structure and DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* SpoIIIE

- DNA translocase revealed by single-molecule and electron microscopies. *Nucleic Acids Research*, 42(4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1231>
- Chandrangsu, P., Huang, X., Gaballa, A., & Helmann, J. D. (2019). Bacillus subtilis FoIE is sustained by the ZagA zinc metallochaperone and the alarmone ZTP under conditions of zinc deficiency. *Molecular Microbiology*, 112(3). <https://doi.org/10.1111/mmi.14314>
- Chara, O., Borges, A., Milhiet, P. E., Nöllmann, M., & Cattoni, D. I. (2018). Sequence-dependent catalytic regulation of the SpoIIIE motor activity ensures directionality of DNA translocation. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23400-8>
- Chary, V. K., Xenopoulos, P., Eldar, A., & Piggot, P. J. (2010). Loss of compartmentalization of σ E activity need not prevent formation of spores by Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 192(21). <https://doi.org/10.1128/JB.00572-10>
- Chary, V. K., Xenopoulos, P., & Piggot, P. J. (2007). Expression of the σ F-directed csfB locus prevents premature appearance of σ G activity during sporulation of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 189(23). <https://doi.org/10.1128/JB.01265-07>
- Chastanet, A., & Losick, R. (2007). Engulfment during sporulation in Bacillus subtilis is governed by a multi-protein complex containing tandemly acting autolysins. *Molecular Microbiology*, 64(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05652.x>
- Chastanet, A., Vitkup, D., Yuan, G. C., Norman, T. M., Liu, J. S., & Losick, R. M. (2010). Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in Bacillus subtilis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18). <https://doi.org/10.1073/pnas.1002499107>
- Chen, X., Mahadevan, L., Driks, A., & Sahin, O. (2014). Bacillus spores as building blocks for stimuli-responsive materials and nanogenerators. *Nature Nanotechnology*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.290>
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J. H., & Losick, R. (2012). A Bacillus subtilis sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology*, 85(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08109.x>
- Chen, Y., Gozz, K., Yan, F., & Chai, Y. (2015). Acetic acid acts as a volatile signal to stimulate bacterial biofilm formation. *mBio*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00392-15>
- Chen, Y. X., Xu, Z. Y., Ge, X., Sanyal, S., Lu, Z. J., & Javid, B. (2020). Selective translation by alternative bacterial ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.2009607117>
- Chen, Z., Srivastava, P., Zarazúa-Osorio, B., Marathe, A., Fujita, M., & Igoshin, O. A. (2022). Bacillus subtilis Histidine Kinase KinC Activates Biofilm Formation by Controlling Heterogeneity of Single-Cell Responses. *mBio*, 13(1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01694-21>
- Chiba, S., Coleman, K., & Pogliano, K. (2007). Impact of membrane fusion and proteolysis on SpoIIQ dynamics and interaction with SpoIIAH. *Journal of Biological Chemistry*, 282(4). <https://doi.org/10.1074/jbc.M606056200>
- Chibazakura, T., Kawamura, F., & Takahashi, H. (1991). Differential regulation of spo0A transcription in Bacillus subtilis: Glucose represses promoter switching at the initiation of

- sporulation. *Journal of Bacteriology*, 173(8). <https://doi.org/10.1128/jb.173.8.2625-2632.1991>
- Clarkson, J., Campbell, I. D., & Yudkin, M. D. (2004). Efficient regulation of σ_F , the first sporulation-specific sigma factor in *B. subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 342(4), 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.090>
- Clements, L. D., Miller, B. S., & Streips, U. N. (2002). Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2). <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00108>
- Cleverley, R. M., Barrett, J. R., Baslé, A., Bui, N. K., Hewitt, L., Solovyova, A., Xu, Z. Q., Daniel, R. A., Dixon, N. E., Harry, E. J., Oakley, A. J., Vollmer, W., & Lewis, R. J. (2014). Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6421>
- Comella, N., & Grossman, A. D. (2005). Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: Characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 57(4), 1159–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04749.x>
- Costa, T., Serrano, M., Steil, L., Völker, U., Moran, C. P., & Henriques, A. O. (2007). The timing of cotE expression affects *Bacillus subtilis* spore coat morphology but not lysozyme resistance. *Journal of Bacteriology*, 189(6). <https://doi.org/10.1128/JB.01353-06>
- 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). <https://doi.org/10.1073/pnas.0306859101>
- Crawshaw, A. D., Serrano, M., Stanley, W. A., Henriques, A. O., & Salgado, P. S. (2014). A mother cell-to-forespore channel: Current understanding and future challenges. *W FEMS Microbiology Letters* (T. 358, Numer 2). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12554>
- Crick, F. H. C. (1958). On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol. XII*.
- Cui, H., Hu, H., Zeng, J., & Chen, T. (2019). DeepShape: Estimating isoform-level ribosome abundance and distribution with Ribo-seq data. *BMC Bioinformatics*, 20. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3244-0>
- Culviner, P. H., & Laub, M. T. (2018). Global Analysis of the *E. coli* Toxin MazF Reveals Widespread Cleavage of mRNA and the Inhibition of rRNA Maturation and Ribosome Biogenesis. *Molecular Cell*, 70(5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.026>
- Cunningham, K. A., & Burkholder, W. F. (2009). The histidine kinase inhibitor Sda binds near the site of autophosphorylation and may sterically hinder autophosphorylation and phosphotransfer to Spo0F. *Molecular Microbiology*, 71(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06554.x>
- Dartois, V., Djavakhishvili, T., & Hoch, J. A. (1996). Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178(4). <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1178-1186.1996>

- Dartois, V., Djavakhishvili, T., & Hoch, J. A. (1997). KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 26(5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6542024.x>
- Davidson, P., Eutsey, R., Redler, B., Hiller, N. L., Laub, M. T., & Durand, D. (2018). Flexibility and constraint: Evolutionary remodeling of the sporulation initiation pathway in Firmicutes. *PLoS Genetics*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007470>
- Davis, J. H., Tan, Y. Z., Carragher, B., Potter, C. S., Lyumkis, D., & Williamson, J. R. (2016). Modular Assembly of the Bacterial Large Ribosomal Subunit. *Cell*, 167(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.020>
- De Hoon, M. J. L., Eichenberger, P., & Vitkup, D. (2010). Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *W Current Biology* (T. 20, Numer 17). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.031>
- De Jong, I. G., Veening, J. W., & Kuipers, O. P. (2010). Heterochronic phosphorelay gene expression as a source of heterogeneity in *Bacillus subtilis* spore formation. *Journal of Bacteriology*, 192(8), 2053–2067. <https://doi.org/10.1128/JB.01484-09>
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology Volume Three The Firmicutes*. *W Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (T. 3).
- Deller, S., Sollner, S., Trenker-El-Toukhy, R., Jelesarov, I., Gübitz, G. M., & Macheroux, P. (2006). Characterization of a thermostable NADPH:FMN oxidoreductase from the mesophilic bacterium *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 45(23). <https://doi.org/10.1021/bi052478r>
- den Blaauwen, T., Hamoen, L. W., & Levin, P. A. (2017). The divisome at 25: the road ahead. *W Current Opinion in Microbiology* (T. 36). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.01.007>
- Deusser, E. (1972). Heterogeneity of ribosomal populations in *Escherichia coli* cells grown in different media. *MGG Molecular & General Genetics*, 119(3). <https://doi.org/10.1007/BF00333862>
- Deusser, E., & Wittmann, H. G. (1972). Biological sciences: Ribosomal proteins: Variation of the protein composition in *Escherichia coli* ribosomes as function of growth rate. *Nature*, 238(5362). <https://doi.org/10.1038/238269a0>
- Devi, S. N., Kiehler, B., Haggett, L., & Fujita, M. (2015). Evidence that autophosphorylation of the major sporulation kinase in *Bacillus subtilis* is able to occur in trans. *Journal of Bacteriology*, 197(16). <https://doi.org/10.1128/JB.00257-15>
- Diez, V., Schujman, G. E., Gueiros-Filho, F. J., & de Mendoza, D. (2012). Vectorial signalling mechanism required for cell-cell communication during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 83(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07929.x>
- Dillon, S. C., & Dorman, C. J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *W Nature Reviews Microbiology* (T. 8, Numer 3). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>
- Dinman, J. D. (2016). Pathways to Specialized Ribosomes: The Brussels Lecture. *W Journal of Molecular Biology* (T. 428, Numer 10). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.12.021>

- 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). <https://doi.org/10.1101/gad.209049.112>
- Doan, T., Marquis, K. A., & Rudner, D. Z. (2005). Subcellular localization of a sporulation membrane protein is achieved through a network of interactions along and across the septum. *Molecular Microbiology*, *55*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04501.x>
- Doan, T., Morlot, C., Meisner, J., Serrano, M., Henriques, A. O., Moran, C. P., & Rudner, D. Z. (2009). Novel secretion apparatus maintains spore integrity and developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics*, *5*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000566>
- Doan, T., & Rudner, D. Z. (2007). Perturbations to engulfment trigger a degradative response that prevents cell-cell signalling during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *64*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05677.x>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Doerfel, L. K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., & Rodnina, M. V. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science*, *339*(6115). <https://doi.org/10.1126/science.1229017>
- Dong, T. C., & Cutting, S. M. (2003). SpoIVB-mediated cleavage of SpoIVFA could provide the intercellular signal to activate processing of pro- σ K in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *49*(5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03651.x>
- Driks, A., & Eichenberger, P. (2016). *The Spore Coat*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS>
- Duanis-Assaf, D., Steinberg, D., Chai, Y., & Shemesh, M. (2016). The LuxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01517>
- Dubnau, D., & Losick, R. (2006). Bistability in bacteria. *W Molecular Microbiology* (T. 61, Numer 3, s. 564–572). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05249.x>
- Dubois, T., Krzewinski, F., Yamakawa, N., Lemy, C., Hamiot, A., Brunet, L., Lacoste, A. S., Knirel, Y., Guerardel, Y., & Faille, C. (2020). The *sps* genes encode an original legionaminic acid pathway required for crust assembly in *Bacillus subtilis*. *mBio*, *11*(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01153-20>
- Dworkin, J., & Losick, R. (2001). Differential gene expression governed by chromosomal spatial asymmetry. *Cell*, *107*(3). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00528-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00528-1)
- Ebmeier, S. E., Tan, I. S., Clapham, K. R., & Ramamurthi, K. S. (2012). Small proteins link coat and cortex assembly during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *84*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08052.x>
- Eckert, I., & Weinberg, Z. (2020). Discovery of 20 novel ribosomal leader candidates in bacteria and archaea. *BMC Microbiology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01823-6>

- Eiamphungporn, W., & Helmann, J. D. (2008). The *Bacillus subtilis* σ M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Molecular Microbiology*, *67*(4).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06090.x>
- Eichenberger, P., Fawcett, P., & Losick, R. (2001). A three-protein inhibitor of polar septation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *42*(5).
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02660.x>
- 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).
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020328>
- Eichenberger, P., Jensen, S. T., Conlon, E. M., Van Ooij, C., Silvaggi, J., González-Pastor, J. E., Fujita, M., Ben-Yehuda, S., Stragier, P., Liu, J. S., & Losick, R. (2003). The σ E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, *327*(5). [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00205-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00205-5)
- Ellermeier, C. D., Hobbs, E. C., Gonzalez-Pastor, J. E., & Losick, R. (2006). A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell*, *124*(3).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.041>
- Emmott, E., Jovanovic, M., & Slavov, N. (2019). Ribosome Stoichiometry: From Form to Function. *W Trends in Biochemical Sciences* (T. 44, Numer 2, s. 95–109). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.009>
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, *1*(2). <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
- Errington, J., & van der Aa, L. T. (2020). Microbe profile: *Bacillus subtilis*: Model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology (United Kingdom)*, *166*(5).
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>
- Eswaramoorthy, P., Winter, P. W., Wawrzusin, P., York, A. G., Shroff, H., & Ramamurthi, K. S. (2014). Asymmetric Division and Differential Gene Expression during a Bacterial Developmental Program Requires DivIVA. *PLoS Genetics*, *10*(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004526>
- Evans, L., Feucht, A., & Errington, J. (2004). Genetic analysis of the *Bacillus subtilis* sigG promoter, which controls the sporulation-specific transcription factor σ G. *Microbiology*, *150*(7).
<https://doi.org/10.1099/mic.0.26914-0>
- Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C., & Hecker, M. (2002). *Bacillus subtilis* functional genomics: Global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, *184*(9). <https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2500-2520.2002>
- Ferretti, M. B., & Karbstein, K. (2019). Does functional specialization of ribosomes really exist? *W RNA* (T. 25, Numer 5). <https://doi.org/10.1261/rna.069823.118>
- Fiche, J. B., Cattoni, D. I., Diekmann, N., Langerak, J. M., Clerte, C., Royer, C. A., Margeat, E., Doan, T., & Nöllmann, M. (2013). Recruitment, Assembly, and Molecular Architecture of the SpoIIIE DNA Pump Revealed by Superresolution Microscopy. *PLoS Biology*, *11*(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001557>

- Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., & Stark, H. (2015). Structure of the E. coli ribosome-EF-Tu complex at $\lt; 3 \text{ \AA}$ resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, *520*(7548). <https://doi.org/10.1038/nature14275>
- Fleming, T. C., Shin, J. Y., Lee, S. H., Becker, E., Huang, K. C., Bustamante, C., & Pogliano, K. (2010). Dynamic SpoIIIE assembly mediates septal membrane fission during Bacillus subtilis sporulation. *Genes and Development*, *24*(11). <https://doi.org/10.1101/gad.1925210>
- Fox, G. E. (2010). Origin and evolution of the ribosome. W *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (T. 2, Numer 9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003483>
- Fredlund, J., Broder, D., Fleming, T., Claussin, C., & Pogliano, K. (2013). The SpoIIQ landmark protein has different requirements for septal localization and immobilization. *Molecular Microbiology*, *89*(6). <https://doi.org/10.1111/mmi.12333>
- Freitas, C., Plannic, J., Isticato, R., Pelosi, A., Zilhão, R., Serrano, M., Baccigalupi, L., Ricca, E., Elsholz, A. K. W., Losick, R., & O. Henriques, A. (2020). A protein phosphorylation module patterns the Bacillus subtilis spore outer coat. *Molecular Microbiology*, *114*(6). <https://doi.org/10.1111/mmi.14562>
- 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). <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1357-1368.2005>
- Fujita, M., & Losick, R. (2002). An investigation into the compartmentalization of the sporulation transcription factor σ^E in Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*, *43*(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02732.x>
- Fujita, M., & Losick, R. (2003). The master regulator for entry into sporulation in Bacillus subtilis becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes and Development*, *17*(9). <https://doi.org/10.1101/gad.1078303>
- 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 and Development*, *19*(18). <https://doi.org/10.1101/gad.1335705>
- Fujita, M., & Sadaie, Y. (1998). Feedback Loops Involving Spo0A and AbrB in In Vitro Transcription of the Genes Involved in the Initiation of Sporulation in Bacillus subtilis. W *J. Biochem* (T. 124).
- 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). <https://doi.org/10.1128/JB.184.21.6007-6015.2002>
- Gaballa, A., & Helmann, J. D. (1998). Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *180*(22). <https://doi.org/10.1128/jb.180.22.5815-5821.1998>
- Gaballa, A., Wang, T., Ye, R. W., & Helmann, J. D. (2002). Functional analysis of the Bacillus subtilis Zur regulon. *Journal of Bacteriology*, *184*(23). <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6508-6514.2002>

- Gabriel, S. E., & Helmann, J. D. (2009). Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions. *Journal of Bacteriology*, *191*(19). <https://doi.org/10.1128/JB.00802-09>
- Gallegos-Monterrosa, R., & Kovács, Á. T. (2023). Phenotypic plasticity: The role of a phosphatase family Rap in the genetic regulation of *Bacilli*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.15060>
- Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Garushyants, S. K., Alvarez, R. V., & Koonina, E. V. (2021). Nonessential ribosomal proteins in bacteria and archaea identified using clusters of orthologous genes. *Journal of Bacteriology*, *203*(11). <https://doi.org/10.1128/JB.00058-21>
- Gamba, P., Jonker, M. J., & Hamoen, L. W. (2015). A Novel Feedback Loop That Controls Bimodal Expression of Genetic Competence. *PLoS Genetics*, *11*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005047>
- Garti-levi, S., Eswara, A., Smith, Y., Fujita, M., & Ben-Yehuda, S. (2013). Novel modulators controlling entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *195*(7). <https://doi.org/10.1128/JB.02160-12>
- Gay, D. M., Lund, A. H., & Jansson, M. D. (2022). Translational control through ribosome heterogeneity and functional specialization. *W Trends in Biochemical Sciences* (T. 47, Numer 1). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.07.001>
- Genuth, N. R., & Barna, M. (2018). The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *W Molecular Cell* (T. 71, Numer 3). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>
- Gerashchenko, M. V., & Gladyshev, V. N. (2017). Ribonuclease selection for ribosome profiling. *Nucleic Acids Research*, *45*(2), e6–e6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw822>
- Ghosh, S., Setlow, B., Wahome, P. G., Cowan, A. E., Plomp, M., Malkin, A. J., & Setlow, P. (2008). Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers. *Journal of Bacteriology*, *190*(20). <https://doi.org/10.1128/JB.00896-08>
- Gilmore, M. E., Bandyopadhyay, D., Dean, A. M., Linnstaedt, S. D., & Popham, D. L. (2004). Production of Muramic δ -Lactam in *Bacillus subtilis* Spore Peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, *186*(1). <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.80-89.2004>
- González, L. M., Mukhitov, N., & Voigt, C. A. (2020). Resilient living materials built by printing bacterial spores. *Nature Chemical Biology*, *16*(2). <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0412-5>
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., & Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, *301*(5632). <https://doi.org/10.1126/science.1086462>
- Gordiyenko, Y., Deroo, S., Zhou, M., Videler, H., & Robinson, C. V. (2008). Acetylation of L12 Increases Interactions in the *Escherichia coli* Ribosomal Stalk Complex. *Journal of Molecular Biology*, *380*(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.067>
- Grau, R. R., De Oña, P., Kunert, M., Leñini, C., Gallegos-Monterrosa, R., Mhatre, E., Vileta, D., Donato, V., Hölscher, T., Boland, W., Kuipers, O. P., & Kovács, Á. T. (2015). A duo of potassium-responsive histidine kinases govern the multicellular destiny of *Bacillus subtilis*. *mBio*, *6*(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00581-15>

- Green, D. H., & Cutting, S. M. (2000). Membrane Topology of the *Bacillus subtilis* Pro-K Processing Complex. *W JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (T. 182, Numer 2).
- Gregory, J. A., Becker, E. C., & Pogliano, K. (2008). *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes and Development*, 22(24). <https://doi.org/10.1101/gad.1732408>
- Grossman, A. D., & Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4369>
- Gu, Y., Xu, X., Wu, Y., Niu, T., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Liu, L. (2018). Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. *W Metabolic Engineering* (T. 50). <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.006>
- Guillot, C., & Moran, C. P. (2007). Essential internal promoter in the spoIIIA locus of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 189(20). <https://doi.org/10.1128/JB.00915-07>
- Guo, H. (2018). Specialized ribosomes and the control of translation. *W Biochemical Society Transactions* (T. 46, Numer 4). <https://doi.org/10.1042/BST20160426>
- Hambraeus, G., Von Wachenfeldt, C., & Hederstedt, L. (2003). Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(5). <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0883-6>
- Hammond, L. R., White, M. L., & Eswara, P. J. (2021). jvIVA la DivIVA! *W Journal of Bacteriology* (T. 201, Numer 21). <https://doi.org/10.1128/JB.00245-19>
- Handke, L. D., Shivers, R. P., & Sonenshein, A. L. (2008). Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *Journal of Bacteriology*, 190(3). <https://doi.org/10.1128/JB.01115-07>
- Handler, A. A., Lim, J. E., & Losick, R. (2008). Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 68(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06173.x>
- Härtig, E., & Jahn, D. (2012). Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. *W Advances in Microbial Physiology* (T. 61, s. 195–216). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00005-6>
- Hayes, E. I., & Patrick, J. E. (2022). yozG is needed for swarming in the undomesticated *Bacillus subtilis* strain NCIB 3610 . *Transactions of the Missouri Academy of Science*, 49(2022). <https://doi.org/10.30956/mas-50>
- Henriques, A. O., & Moran, C. P. (2000). Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods*, 20(1). <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0909>
- Henriques, A. O., & Moran, C. P. (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *W Annual Review of Microbiology* (T. 61). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>
- Hilbert, D. W., & Piggot, P. J. (2004). Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2). <https://doi.org/10.1128/mnbr.68.2.234-262.2004>

- Hilgers, M. T., & Ludwig, M. L. (2001). Crystal structure of the quorum-sensing protein LuxS reveals a catalytic metal site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.191223098>
- Himes, P., McBryant, S. J., & Kroos, L. (2010). Two regions of *Bacillus subtilis* transcription factor SpoIIID allow a monomer to bind DNA. *Journal of Bacteriology*, *192*(6). <https://doi.org/10.1128/JB.01506-09>
- Ho, M. S., Carniol, K., & Losick, R. (2003). Evidence in support of a docking model for the release of the transcription factor σ^F from the antisigma factor SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(23), 20898–20905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302305200>
- Hoffmann, M., Fernandez Cano Luna, D. S., Xiao, S., Stegemüller, L., Rief, K., Heravi, K. M., Lilge, L., Henkel, M., & Hausmann, R. (2020). Towards the Anaerobic Production of Surfactin Using *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.554903>
- Hong, H. A., Huang, J. M., Khaneja, R., Hiep, L. V., Urdaci, M. C., & Cutting, S. M. (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>
- Höper, D., Völker, U., & Hecker, M. (2005). Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *187*(8). <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2810-2826.2005>
- Hopes, T., Norris, K., Agapiou, M., McCarthy, C. G. P., Lewis, P. A., O'Connell, M. J., Fontana, J., & Aspden, J. L. (2022). Ribosome heterogeneity in *Drosophila melanogaster* gonads through paralog-switching. *Nucleic Acids Research*, *50*(4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkab606>
- Hughes, A. C., & Kearns, D. B. (2017). Swimming, Swarming and Sliding Motility in *Bacillus subtilis*. *W Bacillus : Cellular and Molecular Biology (Third edition)* . <https://doi.org/10.21775/9781910190579-14>
- Hullo, M. F., Auger, S., Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A., & Martin-Verstraete, I. (2007). Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *Journal of Bacteriology*, *189*(1). <https://doi.org/10.1128/JB.01273-06>
- Hunt, A., Rawlins, J. P., Thomaidis, H. B., & Errington, J. (2006). Functional analysis of 11 putative essential genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, *152*(10). <https://doi.org/10.1099/mic.0.29152-0>
- Ibarra, J. R., Orozco, A. D., Rojas, J. A., López, K., Setlow, P., Yasbin, R. E., & Pedraza-Reyes, M. (2008). Role of the Nfo and ExoA Apurinic/aprimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, *190*(6). <https://doi.org/10.1128/JB.01625-07>
- Iber, D., Clarkson, J., Yudkin, M. D., & Campbell, I. D. (2006). The mechanism of cell differentiation in *Bacillus subtilis*. *Nature*, *441*(7091). <https://doi.org/10.1038/nature04666>
- 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). <https://doi.org/10.1128/JB.01103-09>

- Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., & Watabe, K. (2011). Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, *193*(16). <https://doi.org/10.1128/JB.05310-11>
- Imamura, D., Zhou, R., Feig, M., & Kroos, L. (2008). Evidence that the *Bacillus subtilis* SpoIIIGA protein is a novel type of signal-transducing aspartic protease. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(22). <https://doi.org/10.1074/jbc.M708962200>
- Ishii, E., & Eguchi, Y. (2021). Diversity in sensing and signaling of bacterial sensor histidine kinases. *W Biomolecules* (T. 11, Numer 10). <https://doi.org/10.3390/biom11101524>
- Isticato, R., & Ricca, E. (2014). *Spore Surface Display*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Jacques, D. A., Langley, D. B., Hynson, R. M. G., Whitten, A. E., Kwan, A., Guss, J. M., & Trehwella, J. (2011). A novel structure of an antikinase and its inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, *405*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.047>
- Jha, V., Roy, B., Jahagirdar, D., McNutt, Z. A., Shatoff, E. A., Boleratz, B. L., Watkins, D. E., Bundschuh, R., Basu, K., Ortega, J., & Fredrick, K. (2021). Structural basis of sequestration of the anti-Shine-Dalgarno sequence in the Bacteroidetes ribosome. *Nucleic Acids Research*, *49*(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1195>
- Jiang, M., Grau, R., & Perego, M. (2000). Differential processing of propeptide inhibitors of rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *182*(2). <https://doi.org/10.1128/JB.182.2.303-310.2000>
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., & Hoch, J. A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *38*(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02148.x>
- Jiang, S., Wan, Q., Krajcikova, D., Tang, J., Tzokov, S. B., Barak, I., & Bullough, P. A. (2015). Diverse supramolecular structures formed by self-assembling proteins of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Microbiology*, *97*(2), 347–359. <https://doi.org/10.1111/mmi.13030>
- Jiang, X., Rubio, A., Chiba, S., & Pogliano, K. (2005). Engulfment-regulated proteolysis of SpoIIQ: Evidence that dual checkpoints control σ K activity. *Molecular Microbiology*, *58*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04811.x>
- Johnson, G. E., Lalanne, J. B., Peters, M. L., & Li, G. W. (2020). Functionally uncoupled transcription–translation in *Bacillus subtilis*. *Nature*, *585*(7823). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2638-5>
- Jomaa, A., Jain, N., Davis, J. H., Williamson, J. R., Britton, R. A., & Ortega, J. (2014). Functional domains of the 50S subunit mature late in the assembly process. *Nucleic Acids Research*, *42*(5). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1295>
- Jones, C. A., Padula, N. L., & Setlow, P. (2005). Effect of mechanical abrasion on the viability, disruption and germination of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02744.x>
- Joo, M., Yeom, J. H., Choi, Y., Jun, H., Song, W., Kim, H. L., Lee, K., & Shin, E. (2022). Specialised ribosomes as versatile regulators of gene expression. *W RNA Biology* (T. 19, Numer 1). <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2135299>

- Jooste, M., Roets, F., Midgley, G. F., Oberlander, K. C., & Dreyer, L. L. (2019). Nitrogen-fixing bacteria and Oxalis-evidence for a vertically inherited bacterial symbiosis. *BMC Plant Biology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2049-7>
- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J. D., & Mascher, T. (2006). Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: Identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *Journal of Bacteriology*, *188*(14). <https://doi.org/10.1128/JB.00310-06>
- Kaldalu, N., Maiväli, Ü., Hauryliuk, V., & Tenson, T. (2019). Reanalysis of proteomics results fails to detect mazf-mediated stress proteins. *W mBio* (T. 10, Numer 3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00949-19>
- Karmazyn-Campelli, C., Rhayat, L., Carballido-López, R., Duperrier, S., Frandsen, N., & Stragier, P. (2008). How the early sporulation sigma factor σ^F delays the switch to late development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *67*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06121.x>
- Kato, S., Yoshimura, T., Hemmi, H., & Moriyama, R. (2010). Biochemical analysis of a novel lipolytic enzyme YvdO from *Bacillus subtilis* 168. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *74*(4). <https://doi.org/10.1271/bbb.90704>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *W Nature Reviews Microbiology* (T. 8, Numer 9). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *49*(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x>
- Kearns, D. B., Nicolas, C., Vincent, B., Sørensen, S. Ø J., Sørensen, A. H., Hansen, L. H., Oregaard, G., Veal, D., Delavat, F., Mitri, S., Pelet, S., Van Der Meer, J. R., O'Reilly, M., Devine, K. M., Kearns, D. B., Chu, F., Rudner, R., Losick, R., Nye, T. M., ... Hughes, C. (2003). Swarming motility Fraser and Hughes 631. *Molecular Microbiology*, *37*(2).
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., & Pogliano, K. (2020). Shaping an Endospore: Architectural Transformations during *Bacillus subtilis* Sporulation. *W Annual Review of Microbiology* (T. 74, s. 361–386). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022520-074650>
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Sugie, J., Pogliano, K., & Villa, E. (2021). Asymmetric localization of the cell division machinery during *Bacillus subtilis* sporulation. *eLife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/eLife.62204>
- 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*. <https://doi.org/10.7554/eLife.45257>
- Ki, S. L., Bumbaca, D., Kosman, J., Setlow, P., & Jedrzejas, 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). <https://doi.org/10.1073/pnas.0708244105>

- Kiehler, B., Haggett, L., & Fujita, M. (2017). The PAS domains of the major sporulation kinase in *Bacillus subtilis* play a role in tetramer formation that is essential for the autokinase activity. *MicrobiologyOpen*, 6(4). <https://doi.org/10.1002/mbo3.481>
- Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D. C., Otte, M. M., Wang, R., Ferguson, C. C., Eichenberger, P., & Driks, A. (2006). The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology*, 59(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04968.x>
- Kim, H. L., Shin, E. K., Kim, H. M., Ryou, S. M., Kim, S., Cha, C. J., Bae, J., & Lee, K. (2007). Heterogeneous rRNAs are differentially expressed during the morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 275(1). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00872.x>
- Kim, H. L., Song, W. S., Kim, K., & Lee, K. (2008). Characterization of heterogeneous LSU rRNA profiles in *Streptomyces coelicolor* under different growth stages and conditions. *Current Microbiology*, 57(6). <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9238-1>
- Kimura, T., Amaya, Y., Kobayashi, K., Ogasawara, N., & Sato, T. (2010). Repression of sigK intervening (skin) element gene expression by the CI-like protein SknR and effect of SknR depletion on growth of *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Bacteriology*, 192(23). <https://doi.org/10.1128/JB.00625-10>
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., & Schmidt, T. M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000>
- Klobutcher, L. A., Ragkousi, K., & Setlow, P. (2006). The *Bacillus subtilis* spore coat provides „eat resistance” during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.0507121102>
- Kloosterman, T. G., Lenarcic, R., Willis, C. R., Roberts, D. M., Hamoen, L. W., Errington, J., & Wu, L. J. (2016). Complex polar machinery required for proper chromosome segregation in vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 101(2). <https://doi.org/10.1111/mmi.13393>
- 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). <https://doi.org/10.1128/JB.00435-15>
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Dé Barbouillé F, 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. www.pnas.org
- Kodama, T., Matsubayashi, T., Yanagihara, T., Komoto, H., Ara, K., Ozaki, K., Kuwana, R., Imamura, D., Takamatsu, H., Watabe, K., & Sekiguchi, J. (2011). A novel small protein of *Bacillus subtilis* involved in spore germination and spore coat assembly. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(6). <https://doi.org/10.1271/bbb.110029>
- Koga, K., Ikegami, A., Nakasone, K., Murayama, R., Akanuma, G., Natori, Y., Nanamiya, H., & Kawamura, F. (2006). Construction of *Bacillus subtilis* strains carrying the transcriptional

- bgaB fusion with the promoter region of each rrn operon and their differential transcription during spore development. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52(2).
<https://doi.org/10.2323/jgam.52.119>
- Kolodkin-Gal, I., Elsholz, A. K. W., Muth, C., Girguis, P. R., Kolter, R., & Losick, R. (2013). Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes and Development*, 27(8).
<https://doi.org/10.1101/gad.215244.113>
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., & Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science*, 318(5850). <https://doi.org/10.1126/science.1147248>
- Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., & Silver, P. A. (2007). Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell*, 131(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.037>
- Kong, L., Doona, C. J., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2014). Monitoring rates and heterogeneity of high-pressure germination of *Bacillus* spores by phase-contrast microscopy of individual spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.03043-13>
- Konovalova, A., SØgaard-Andersen, L., & Kroos, L. (2014). Regulated proteolysis in bacterial development. W *FEMS Microbiology Reviews* (T. 38, Numer 3).
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12050>
- Koopman, N., Remijas, L., Seppen, J., Setlow, P., & Brul, S. (2022). Mechanisms and Applications of Bacterial Sporulation and Germination in the Intestine. W *International Journal of Molecular Sciences* (T. 23, Numer 6). <https://doi.org/10.3390/ijms23063405>
- Kopik, N., Chrobak, O., Latoch, P., Kovalenko, M., & Starosta, A. L. (2021). RIBO-seq in Bacteria: a Sample Collection and Library Preparation Protocol for NGS Sequencing. *Journal of Visualized Experiments*, 2021(174). <https://doi.org/10.3791/62544>
- Korza, G., Camilleri, E., Green, J., Robinson, J., Nagler, K., Moeller, R., Caimano, M. J., & Setlow, P. (2019). Analysis of the mRNAs in spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 201(9).
<https://doi.org/10.1128/JB.00007-19>
- Kovács, Á. T. (2016). Bacterial differentiation via gradual activation of global regulators. W *Current Genetics* (T. 62, Numer 1). <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0524-8>
- Krajčíková, D., Bugárová, V., & Barák, I. (2021). Interactions of *Bacillus subtilis* basement spore coat layer proteins. *Microorganisms*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020285>
- Krajčíková, D., Forgáč, V., Szabo, A., & Barák, I. (2017). Exploring the interaction network of the *Bacillus subtilis* outer coat and crust proteins. *Microbiological Research*, 204.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.004>
- Kroos, L., & Akiyama, Y. (2013). Biochemical and structural insights into intramembrane metalloprotease mechanisms. W *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (T. 1828, Numer 12). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.032>
- Kucukural, A., Yukselen, O., Ozata, D. M., Moore, M. J., & Garber, M. (2019). DEBrowser: interactive differential expression analysis and visualization tool for count data. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5362-x>

- Kumar, A., & Moran, C. P. (2008). Promoter activation by repositioning of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*, *190*(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00096-08>
- Kumar, A., Starke, C. B., DeZalia, M., & Moran, C. P. (2004). Surfaces of Spo0A and RNA Polymerase Sigma Factor A That Interact at the spoII_G Promoter in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *186*(1). <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.200-206.2004>
- 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). <https://doi.org/10.1038/36786>
- Kurylo, C. M., Parks, M. M., Juette, M. F., Zinshteyn, B., Altman, R. B., Thibado, J. K., Vincent, C. T., & Blanchard, S. C. (2018). Endogenous rRNA Sequence Variation Can Regulate Stress Response Gene Expression and Phenotype. *Cell Reports*, *25*(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.093>
- Laaberki, M. H., & Dworkin, J. (2008). Role of spore coat proteins in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to *Caenorhabditis elegans* predation. *Journal of Bacteriology*, *190*(18). <https://doi.org/10.1128/JB.00623-08>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lanigan-Gerdes, S., Dooley, A. N., Faull, K. F., & Lazazzera, B. A. (2007). Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *65*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05869.x>
- Le, A. T. T., & Schumann, W. (2009). The SpoOE phosphatase of *Bacillus subtilis* is a substrate of the FtsH metalloprotease. *Microbiology*, *155*(4), 1122–1132. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024182-0>
- LeDeaux, J. R., & Grossman, A. D. (1995). Isolation and characterization of kinC, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *177*(1). <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.166-175.1995>
- Lee, J. W., & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the fur family of metalloregulators. *BioMetals*, *20*(3–4). <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9070-7>
- Lee, L. J., Barrett, J. A., & Poole, R. K. (2005). Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *Journal of Bacteriology*, *187*(3). <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1124-1134.2005>
- Lei, J., Zhou, Y. F., Li, L. F., & Su, X. D. (2009). Structural and biochemical analyses of YvgN and YtbE from *Bacillus subtilis*. *Protein Science*, *18*(8). <https://doi.org/10.1002/pro.178>
- Lemire, K. A., Rodriguez, Y. Y., & McIntosh, M. T. (2016). Alkaline hydrolysis to remove potentially infectious viral RNA contaminants from DNA. *Virology Journal*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0552-0>

- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D., & Hamoen, L. W. (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO Journal*, *28*(15). <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.129>
- Leppek, K., & Barna, M. (2019). An rRNA variant to deal with stress. *W Nature Microbiology* (T. 4, Numer 3). <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0396-7>
- Levin, P. A., & Losick, R. (1996). Transcription factor SpoOA switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, *10*(4). <https://doi.org/10.1101/gad.10.4.478>
- Lewis, P. J., Thaker, S. D., & Errington, J. (2000). Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal*, *19*(4). <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.710>
- Leyn, S. A., Kazanov, M. D., Sernova, N. V., Ermakova, E. O., Novichkov, P. S., & Rodionova, D. A. (2013). Genomic reconstruction of the transcriptional regulatory network in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *195*(11). <https://doi.org/10.1128/JB.00140-13>
- Li, W., Wang, W., Uren, P. J., Penalva, L. O. F., & Smith, A. D. (2017). Riborex: Fast and flexible identification of differential translation from Ribo-seq data. *Bioinformatics*, *33*(11). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx047>
- Lilleorg, S., Reier, K., Pulk, A., Liiv, A., Tammsalu, T., Peil, L., Cate, J. H. D., & Remme, J. (2019). Bacterial ribosome heterogeneity: Changes in ribosomal protein composition during transition into stationary growth phase. *Biochimie*, *156*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.013>
- Lilleorg, S., Reier, K., Volõnkin, P., Remme, J., & Liiv, A. (2020). Phenotypic effects of paralogous ribosomal proteins bL31A and bL31B in *E. coli*. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68582-2>
- Lin, P., Yuan, H., Du, J., Liu, K., Liu, H., & Wang, T. (2020). Progress in research and application development of surface display technology using *Bacillus subtilis* spores. *W Applied Microbiology and Biotechnology* (T. 104, Numer 6). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10348-x>
- Little, S., & Driks, A. (2001). Functional analysis of the *Bacillus subtilis* morphogenetic spore coat protein CotE. *Molecular Microbiology*, *42*(4). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02708.x>
- Liu, J., Xu, Y., Stoleru, D., & Salic, A. (2012). Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.1111561108>
- Liu, N. J. L., Dutton, R. J., & Pogliano, K. (2006). Evidence that the SpoIIIE DNA translocase participates in membrane fusion during cytokinesis and engulfment. *Molecular Microbiology*, *59*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05004.x>
- Liu, Q., & Fredrick, K. (2016). Intersubunit Bridges of the Bacterial Ribosome. *W Journal of Molecular Biology* (T. 428, Numer 10). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.009>
- Liu, W., He, Z., Gao, F., Yan, J., & Huang, X. (2018). Sensor kinase KinB and its pathway-associated key factors sense the signal of nutrition starvation in sporulation of *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen*, *7*(3). <https://doi.org/10.1002/mbo3.566>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.028>
- Lombardía, E., Rovetto, A. J., Arabolaza, A. L., & Grau, R. R. (2006). A LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *188*(12). <https://doi.org/10.1128/JB.00165-06>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.027>
- Losick, R. M. (2020). *Bacillus subtilis*: a bacterium for all seasons. W *Current Biology* (T. 30, Numer 19). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.083>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- López, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.0810940106>
- López, D., & Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. W *FEMS Microbiology Reviews* (T. 34, Numer 2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00199.x>
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009a). Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *74*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2009b). Paracrine signaling in a bacterium. *Genes and Development*, *23*(14). <https://doi.org/10.1101/gad.1813709>
- López-López, A., Benlloch, S., Bonfá, M., Rodríguez-Valera, F., & Mira, A. (2007). Intragenomic 16s rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to different temperatures. *Journal of Molecular Evolution*, *65*(6). <https://doi.org/10.1007/s00239-007-9047-3>
- Lufton, M., Bustan, O., Eylon, B. hen, Shtifman-Segal, E., Croitoru-Sadger, T., Shagan, A., Shabtay-Orbach, A., Corem-Salkmon, E., Berman, J., Nyska, A., & Mizrahi, B. (2018). Living Bacteria in Thermoresponsive Gel for Treating Fungal Infections. *Advanced Functional Materials*, *28*(40). <https://doi.org/10.1002/adfm.201801581>
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial minCDE system and spatial regulation of the z ring. W *Annual Review of Biochemistry* (T. 76). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142652>
- Ma, Z., Gabriel, S. E., & Helmann, J. D. (2011). Sequential binding and sensing of Zn(II) by *Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Research*, *39*(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr625>

- Mäder, U., Homuth, G., Scharf, C., Büttner, K., Bode, R., & Hecker, M. (2002). Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression modulated by amino acid availability. *Journal of Bacteriology*, *184*(15). <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4288-4295.2002>
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. A., & Koonin, E. V. (2001). Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome biology*, *2*(9).
- Margolin, W. (2002). Bacterial sporulation: FtsZ rings do the twist. *W Current Biology* (T. 12, Numer 11). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00882-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00882-5)
- Masayama, A., Kato, S., Terashima, T., Mølgaard, A., Hemmi, H., Yoshimura, T., & Moriyama, R. (2010). *Bacillus subtilis* spore coat protein LipC is a phospholipase B. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *74*(1). <https://doi.org/10.1271/bbb.90391>
- Masayama, A., Kuwana, R., Takamatsu, H., Hemmi, H., Yoshimura, T., Watabe, K., & Moriyama, R. (2007). A novel lipolytic enzyme, YcsK (LipC), located in the spore coat of *Bacillus subtilis*, is involved in spore germination. *Journal of Bacteriology*, *189*(6). <https://doi.org/10.1128/JB.01527-06>
- Mascher, T., Hachmann, A. B., & Helmann, J. D. (2007). Regulatory overlap and functional redundancy among *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function σ factors. *Journal of Bacteriology*, *189*(19). <https://doi.org/10.1128/JB.00904-07>
- Mascher, T., Margulis, N. G., Wang, T., Ye, R. W., & Helmann, J. D. (2003). Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: The regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular Microbiology*, *50*(5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03786.x>
- Masuda, S., Murakami, K. S., Wang, S., Anders Olson, C., Donigian, J., Leon, F., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2004). Crystal structures of the ADP and ATP bound forms of the *Bacillus* anti- σ factor SpoIIAB in complex with the anti-anti- σ SpoIIAA. *Journal of Molecular Biology*, *340*(5). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.040>
- Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.192442499>
- Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (2007). The ribosome filter redux. *W Cell Cycle* (T. 6, Numer 18). <https://doi.org/10.4161/cc.6.18.4739>
- McGee, J. P., Armache, J. P., & Lindner, S. E. (2023). Ribosome heterogeneity and specialization of *Plasmodium* parasites. *PLoS pathogens*, *19*(4), e1011267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011267>
- McKenney, P. T., Driks, A., Eskandarian, H. A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K. H., Gitai, Z., & Eichenberger, P. (2010). A Distance-Weighted Interaction Map Reveals a Previously Uncharacterized Layer of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Current Biology*, *20*(10). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.060>
- McKenney, P. T., & Eichenberger, P. (2012). Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *83*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07936.x>

- McLoon, A. L., Guttenplan, S. B., Kearns, D. B., Kolter, R., & Losick, R. (2011). Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *Journal of Bacteriology*, *193*(8). <https://doi.org/10.1128/JB.01542-10>
- McLoon, A. L., Kolodkin-Gal, I., Rubinstein, S. M., Kolter, R., & Losick, R. (2011). Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *193*(3), 679–685. <https://doi.org/10.1128/JB.01186-10>
- McNutt, Z. A., Roy, B., Gemler, B. T., Shatoff, E. A., Moon, K. M., Foster, L. J., Bundschuh, R., & Fredrick, K. (2023). Ribosomes lacking bS21 gain function to regulate protein synthesis in *Flavobacterium johnsoniae*. *Nucleic acids research*, *51*(4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkad047>
- McQuade, R. S., Comella, N., & Grossman, A. D. (2001). Control of a family of phosphatase regulatory genes (phr) by the alternate sigma factor sigma-H of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *183*(16). <https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4905-4909.2001>
- Meador-Parton, J., & Popham, D. L. (2000). Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation. *Journal of Bacteriology*, *182*(16). <https://doi.org/10.1128/JB.182.16.4491-4499.2000>
- Mearls, E. B., Jackter, J., Colquhoun, J. M., Farmer, V., Matthews, A. J., Murphy, L. S., Fenton, C., & Camp, A. H. (2018). Transcription and translation of the sigG gene is tuned for proper execution of the switch from early to late gene expression in the developing *Bacillus subtilis* spore. *PLoS Genetics*, *14*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007350>
- Meisner, J., Maehigashi, T., André, I., Dunham, C. M., & Moran, C. P. (2012). Structure of the basal components of a bacterial transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.1120113109>
- Meisner, J., Wang, X., Serrano, M., Henriques, A. O., & Moran, C. P. (2008). A channel connecting the mother cell and forespore during bacterial endospore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.0806301105>
- Melnick, J., Lis, E., Park, J. H., Kinsland, C., Mori, H., Baba, T., Perkins, J., Schyns, G., Vassieva, O., Osterman, A., & Begley, T. P. (2004). Identification of the two missing bacterial genes involved in thiamine salvage: Thiamine pyrophosphokinase and thiamine kinase. *Journal of Bacteriology*, *186*(11). <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3660-3662.2004>
- Mendez, R., Gutierrez, A., Reyes, J., & Márquez-Magaña, L. (2012). The extracytoplasmic function sigma factor SigY is important for efficient maintenance of the Sp β prophage that encodes sublancin in *Bacillus subtilis*. *DNA and Cell Biology*, *31*(6), 946–955. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1513>
- Mets, T., Kasvandik, S., Saarma, M., Maiväli, Ü., Tenson, T., & Kaldalu, N. (2019). Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR. *Biochimie*, *156*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.004>
- Mets, T., Lippus, M., Schryer, D., Liiv, A., Kasari, V., Paier, A., Maiväli, Ü., Remme, J., Tenson, T., & Kaldalu, N. (2017). Toxins MazF and MqsR cleave *Escherichia coli* rRNA precursors at multiple sites. *RNA Biology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259784>

- Meyer, P., Gutierrez, J., Pogliano, K., & Dworkin, J. (2010). Cell wall synthesis is necessary for membrane dynamics during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 76(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07155.x>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *W Annual Review of Microbiology* (T. 55). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Milne, A. N., Wai Nam Mak, W., & Tze Fei Wong, J. (1975). Variation of ribosomal proteins with bacterial growth rate. *Journal of Bacteriology*, 122(1). <https://doi.org/10.1128/jb.122.1.89-92.1975>
- Mirouze, N., Parashar, V., Baker, M. D., Dubnau, D. A., & Neiditch, M. B. (2011). An atypical Phr peptide regulates the developmental switch protein RapH. *Journal of Bacteriology*, 193(22). <https://doi.org/10.1128/JB.05860-11>
- Mitrophanov, A. Y., & Groisman, E. A. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *W Genes and Development* (T. 22, Numer 19). <https://doi.org/10.1101/gad.1700308>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.12.006>
- Mohsin, M. Z., Omer, R., Huang, J., Mohsin, A., Guo, M., Qian, J., & Zhuang, Y. (2021). Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. *W Synthetic and Systems Biotechnology* (T. 6, Numer 3). <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.07.002>
- Moir, A., Corfe, B. M., & Behravan, J. (2002). Spore germination. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, 59, 403–409.
- 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). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03818.x>
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., & Sonenshein, A. L. (2003). Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator codY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *Journal of Bacteriology*, 185(6). <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1911-1922.2003>
- Moore, C. M., & Helmann, J. D. (2005). Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *W Current Opinion in Microbiology* (T. 8, Numer 2). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.007>
- Morlot, C., & Rodrigues, C. D. A. (2018). The New Kid on the Block: A Specialized Secretion System during Bacterial Sporulation. *W Trends in Microbiology* (T. 26, Numer 8). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.001>
- Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K. A., Bernhardt, T. G., & Rudner, D. Z. (2010). A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 24(4). <https://doi.org/10.1101/gad.1878110>

- Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A. G., Venaille, L., Leguérinel, I., Coroller, L., & Couvert, O. (2017). Walking dead: Permeabilization of heat-treated *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 spores under growth-preventing conditions. *Food Microbiology*, *64*.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.013>
- Mulder, A. M. (2011). Visualizing Ribosome Biogenesis: Parallel Assembly Pathways for 30S Subunit. *Biophysical Journal*, *100*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.1967>
- Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a „strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). W *Annual Review of Microbiology* (T. 52). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.165>
- Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayama, R., Kosono, S., Kudo, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Park, S. M., Ochi, K., & Kawamura, F. (2004). Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *Molecular Microbiology*, *52*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03972.x>
- Nanamiya, H., & Kawamura, F. (2010). Towards an elucidation of the roles of the ribosome during different growth phases in *Bacillus subtilis*. W *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (T. 74, Numer 3). <https://doi.org/10.1271/bbb.90859>
- Nanamiya, H., Sato, M., Masuda, K., Sato, M., Wada, T., Suzuki, S., Natori, Y., Katano, M., Akanuma, G., & Kawamura, F. (2010). *Bacillus subtilis* mutants harbouring a single copy of the rRNA operon exhibit severe defects in growth and sporulation. *Microbiology*, *156*(10). <https://doi.org/10.1099/mic.0.035295-0>
- Nariya, H., & Inouye, M. (2008). MazF, an mRNA Interferase, Mediates Programmed Cell Death during Multicellular *Myxococcus* Development. *Cell*, *132*(1).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.044>
- Narula, J., Devi, S. N., Fujita, M., & Igoshin, O. A. (2012). Ultrasensitivity of the *Bacillus subtilis* sporulation decision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1213974109>
- Narula, J., Kuchina, A., Zhang, F., Fujita, M., Süel, G. M., & Igoshin, O. A. (2016). Slowdown of growth controls cellular differentiation. *Molecular Systems Biology*, *12*(5).
<https://doi.org/10.15252/msb.20156691>
- Natori, Y., Nanamiya, H., Akanuma, G., Kosono, S., Kudo, T., Ochi, K., & Kawamura, F. (2007). A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *63*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05513.x>
- Nesterchuk, M. V., Sergiev, P. V., & Dontsova, O. A. (2011). Posttranslational Modifications of Ribosomal Proteins in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, *3*(2).
<https://doi.org/10.32607/20758251-2011-3-2-22-33>
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E. L., Fogg, M. J., Fromion, V., Goelzer, A., ... Noirot, P. (2012). Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, *335*(6072). <https://doi.org/10.1126/science.1206848>
- Nigam, A., Oron-Gottesman, A., & Engelberg-Kulka, H. (2020). A Bias in the Reading of the Genetic Code of *Escherichia coli* is a Characteristic for Genes that Specify Stress-induced MazF-

- mediated Proteins . *Current Genomics*, 21(4).
<https://doi.org/10.2174/1389202921999200606215305>
- Nigam, A., Ziv, T., Oron-Gottesman, A., & Engelberg-Kulka, H. (2019a). Reply to Kaldalu et al., “Reanalysis of proteomics results fails to detect MazF-mediated stress proteins”. W *mBio* (T. 10, Numer 3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01068-19>
- Nigam, A., Ziv, T., Oron-Gottesman, A., & Engelberg-Kulka, H. (2019b). Reply to Wade and Laub, ‘Concerns about “Stress-induced MazF-mediated proteins in Escherichia coli”’. W *mBio* (T. 10, Numer 3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01063-19>
- Nigam, A., Ziv, T., Oron-Gottesman, A., & Engelberg-Kulka, H. (2019c). Stress-induced MazF-mediated proteins in Escherichia coli. *mBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00340-19>
- Norris, K., Hopes, T., & Aspden, J. L. (2021). Ribosome heterogeneity and specialization in development. W *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (T. 12, Numer 4).
<https://doi.org/10.1002/wrna.1644>
- Ogura, M., & Kanesaki, Y. (2018). Newly Identified Nucleoid-Associated-Like Protein YlxR Regulates Metabolic Gene Expression in Bacillus subtilis. *mSphere*, 3(5).
<https://doi.org/10.1128/msphere.00501-18>
- Ogura, M., Shindo, K., & Kanesaki, Y. (2020). Bacillus subtilis Nucleoid-Associated Protein YlxR Is Involved in Bimodal Expression of the Fructoselysine Utilization Operon (friBONMD-yurJ) Promoter. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02024>
- Ogura, M., & Tanaka, T. (2009). The Bacillus subtilis late competence operon comE is transcriptionally regulated by yutB and under post-transcription initiation control by comN (yrcD). *Journal of Bacteriology*, 191(3). <https://doi.org/10.1128/JB.01429-08>
- Ohashi, Y., Inaoka, T., Kasai, K., Ito, Y., Okamoto, S., Satsu, H., Tozawa, Y., Kawamura, F., & Ochi, K. (2003). Expression profiling of translation-associated genes in sporulating Bacillus subtilis and consequence of sporulation by gene inactivation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(10). <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2245>
- Ojkic, N., López-Garrido, J., Pogliano, K., & Endres, R. G. (2016). Cell-wall remodeling drives engulfment during Bacillus subtilis sporulation. *eLife*, 5(NOVEMBER2016).
<https://doi.org/10.7554/eLife.18657>
- Okamoto, K., Fujiya, M., Nata, T., Ueno, N., Inaba, Y., Ishikawa, C., Ito, T., Moriichi, K., Tanabe, H., Mizukami, Y., Chang, E. B., & Kohgo, Y. (2012). Competence and sporulation factor derived from Bacillus subtilis improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *International Journal of Colorectal Disease*, 27(8).
<https://doi.org/10.1007/s00384-012-1416-8>
- Olejniczak, M., Jiang, X., Basczok, M. M., & Storz, G. (2022). KH domain proteins: Another family of bacterial RNA matchmakers? W *Molecular Microbiology* (T. 117, Numer 1).
<https://doi.org/10.1111/mmi.14842>
- Olson, A. L., Tucker, A. T., Bobay, B. G., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., Thompson, R. J., & Cavanagh, J. (2014). Structure and DNA-binding traits of the transition state regulator abrB. *Structure*, 22(11). <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.08.018>

- Omer Bendori, S., Pollak, S., Hizi, D., & Eldar, A. (2015). The RapP-PhrP quorum-sensing system of *Bacillus subtilis* strain NCIB3610 affects biofilm formation through multiple targets, due to an atypical signal-insensitive allele of RapP. *Journal of Bacteriology*, *197*(3). <https://doi.org/10.1128/JB.02382-14>
- O'Neil, D., Glowatz, H., & Schlumpberge, M. (2013). Ribosomal RNA depletion for efficient use of RNA-seq capacity. *Current Protocols in Molecular Biology*, *SUPPL.103*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0419s103>
- Oron-Gottesman, A., Sauert, M., Moll, I., & Engelberg-Kulka, H. (2016). A stress-induced bias in the reading of the genetic code in *Escherichia coli*. *mBio*, *7*(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01855-16>
- Pacheco-Gómez, R., Cheng, X., Hicks, M. R., Smith, C. J. I., Roper, D. I., Addinall, S., Rodger, A., & Dafforn, T. R. (2013). Tetramerization of ZapA is required for FtsZ bundling. *Biochemical Journal*, *449*(3). <https://doi.org/10.1042/BJ20120140>
- Palade, G. E. (1958). Microsomes and ribonucleoprotein particles. W *Microsomal Particles and Protein Synthesis*.
- Pan, Q., Losick, R., & Rudner, D. Z. (2003). A second PDZ-containing serine protease contributes to activation of the sporulation transcription factor σ K in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *185*(20). <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6051-6056.2003>
- Panina, E. M., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: Enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.1733691100>
- Parashar, V., Jeffrey, P. D., & Neiditch, M. B. (2013). Conformational Change-Induced Repeat Domain Expansion Regulates Rap Phosphatase Quorum-Sensing Signal Receptors. *PLoS Biology*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001512>
- Parashar, V., Konkol, M. A., Kearns, D. B., & Neiditch, M. B. (2013). A plasmid-encoded phosphatase regulates *Bacillus subtilis* biofilm architecture, sporulation, and genetic competence. *Journal of Bacteriology*, *195*(10). <https://doi.org/10.1128/JB.02030-12>
- Park, J. H., Yamaguchi, Y., & Inouye, M. (2011). *Bacillus subtilis* MazF-bs (EndoA) is a UACAU-specific mRNA interferase. *FEBS Letters*, *585*(15). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.008>
- Patrick, J. E., & Kearns, D. B. (2009). Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *Journal of Bacteriology*, *191*(22). <https://doi.org/10.1128/JB.00905-09>
- Paul, S. I., Rahman, M. M., Salam, M. A., Khan, M. A. R., & Islam, M. T. (2021). Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas* septicemia in *Labeo rohita*. *Aquaculture*, *545*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737156>
- Pedreira, T., Efmann, C., & Stülke, J. (2022). The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkab943>

- Pedrido, M. E., de Oña, P., Ramirez, W., Leñini, C., Goñi, A., & Grau, R. (2013). Spo0A links de novo fatty acid synthesis to sporulation and biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *87*(2). <https://doi.org/10.1111/mmi.12102>
- Perego, M. (2001). A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *42*(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02611.x>
- Perego, M., Spiegelman, G. B., & Hoch, J. A. (1988). Structure of the gene for the transition state regulator, abrB: regulator synthesis is controlled by the spo0A sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *2*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1988.tb00079.x>
- Pereira, F. C., Nunes, F., Cruz, F., Fernandes, C., Isidro, A. L., Lousa, D., Soares, C. M., Moran, C. P., Henriques, A. O., & Serrano, M. (2019). A LysM Domain intervenes in sequential protein-protein and protein-peptidoglycan interactions important for spore coat assembly in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *201*(4). <https://doi.org/10.1128/JB.00642-18>
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., & Heckler, M. (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *183*(19). <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5617-5631.2001>
- Pietraszek, P., & Walczak, P. (2014). Charakterystyka i możliwości zastosowania bakterii z rodzaju *Bacillus* wyizolowanych z gleby. *Polish Journal of Agronomy*, *16*.
- Pogliano, J., Sharp, M. D., & Pogliano, K. (2002). Partitioning of chromosomal DNA during establishment of cellular asymmetry in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *184*(6). <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1743-1749.2002>
- Popham, D. L. (2002). Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: The inner wall of the lockbox. W *Cellular and Molecular Life Sciences* (T. 59, Numer 3). <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8435-5>
- Popham, D. L., & Bernhards, C. B. (2015). Spore Peptidoglycan. *Microbiology Spectrum*, *3*(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0005-2012>
- Pottahil, M., & Lazazzera, B. A. (UCLA). (2003). [Frontiers in Bioscience 8, d32-45, January 1, 2003] THE EXTRACELLULAR PHR PEPTIDE-RAP PHOSPHATASE SIGNALING CIRCUIT OF BACILLUS SUBTILIS Mridula Pottathil and Beth A. Lazazzera. *Peptides*, *8*.
- Presecan, E., Moszer, I., Boursier, L., Cruz Ramos, H., De La Fuente, V., Hullo, M. F., Lelong, C., Schleich, S., Sekowska, A., Song, B. H., Villani, G., Kunst, F., Danchin, A., & Glaser, P. (1997). The *Bacillus subtilis* genome from gerBC (311°) to licR (334°). *Microbiology*, *143*(10). <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3313>
- Prestel, E., Noiro, P., & Auger, S. (2015). Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* Zur-binding sites associated with a Zur box expands its known regulatory network. *BMC Microbiology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0345-4>
- Ptacin, J. L., Nollmann, M., Becker, E. C., Cozzarelli, N. R., Pogliano, K., & Bustamante, C. (2008). Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nature Structural and Molecular Biology*, *15*(5). <https://doi.org/10.1038/nsmb.1412>

- Pulk, A., Liiv, A., Peil, L., Maiväli, Ü., Nierhaus, K., & Remme, J. (2010). Ribosome reactivation by replacement of damaged proteins. *Molecular Microbiology*, *75*(4).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07002.x>
- Qin, Y., Angelini, L. L., & Chai, Y. (2022). Bacillus subtilis Cell Differentiation, Biofilm Formation and Environmental Prevalence. W *Microorganisms* (T. 10, Numer 6).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10061108>
- Quisel, J. D., & Grossman, A. D. (2000). Control of sporulation gene expression in Bacillus subtilis by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0j (ParB). *Journal of Bacteriology*, *182*(12). <https://doi.org/10.1128/JB.182.12.3446-3451.2000>
- Rahman, M. M., Paul, S. I., Akter, T., Tay, A. C. Y., Foysal, M. J., & Islam, M. T. (2020). Whole-Genome Sequence of Bacillus subtilis WS1A, a Promising Fish Probiotic Strain Isolated from Marine Sponge of the Bay of Bengal. *Microbiology Resource Announcements*, *9*(39).
<https://doi.org/10.1128/mra.00641-20>
- Ramagopal, S., & Ennis, H. L. (1981). Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of Dictyostelium discoideum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(5 1). <https://doi.org/10.1073/pnas.78.5.3083>
- Ramamurthi, K. S., & Losick, R. (2008). ATP-Driven Self-Assembly of a Morphogenetic Protein in Bacillus subtilis. *Molecular Cell*, *31*(3). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.030>
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K. W., & Sonenshein, A. L. (2001). Bacillus subtilis CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes and Development*, *15*(9). <https://doi.org/10.1101/gad.874201>
- Reder, A., Gerth, U., & Hecker, M. (2012). Integration of σ_B activity into the decision-making process of sporulation initiation in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *194*(5).
<https://doi.org/10.1128/JB.06490-11>
- Regan, G., Itaya, M., & Piggot, P. J. (2012). Coupling of σ_G Activation to Completion of Engulfment during Sporulation of Bacillus subtilis Survives Large Perturbations to DNA Translocation and Replication. *Journal of Bacteriology*, *194*(22), 6264–6271. <https://doi.org/10.1128/JB.01470-12>
- Rhayat, L., Duperrier, S., Carballido-López, R., Pellegrini, O., & Stragier, P. (2009). Genetic Dissection of an Inhibitor of the Sporulation Sigma Factor σ_G . *Journal of Molecular Biology*, *390*(5). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.073>
- 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).
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abd6385>
- Riley, E. P., Schwarz, C., Derman, A. I., & Lopez-Garrido, J. (2021). Milestones in Bacillus subtilis sporulation research. W *Microbial Cell* (T. 8, Numer 1).
<https://doi.org/10.15698/MIC2021.01.739>
- Roberts, D. M., Anchimiuk, A., Kloosterman, T. G., Murray, H., Wu, L. J., Gruber, S., & Errington, J. (2022). Chromosome remodelling by SMC/Condensin in B. subtilis is regulated by monomeric Soj/ParA during growth and sporulation. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, 119(41).
<https://doi.org/10.1073/pnas.2204042119>

- Rodriguez Ayala, F., Bartolini, M., & Grau, R. (2020). The Stress-Responsive Alternative Sigma Factor SigB of *Bacillus subtilis* and Its Relatives: An Old Friend With New Functions. W *Frontiers in Microbiology* (T. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01761>
- Rodríguez-Almonacid, C. C., Kellogg, M. K., Karamyshev, A. L., & Karamysheva, Z. N. (2023). Ribosome Specialization in Protozoa Parasites. W *International Journal of Molecular Sciences* (T. 24, Numer 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24087484>
- Roels, S., & Losick, R. (1995). Adjacent and Divergently Oriented Operons under the Control of the Sporulation Regulatory Protein GerE in *Bacillus subtilis*. W *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (T. 177, Numer 21).
- Rosenberg, A., Sinai, L., Smith, Y., & Ben-Yehuda, S. (2012). Dynamic expression of the translational machinery during *Bacillus subtilis* life cycle at a single cell level. *PLoS ONE*, 7(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041921>
- Rowlett, V. W., & Margolin, W. (2015). The Min system and other nucleoid-independent regulators of Z ring positioning. W *Frontiers in Microbiology* (T. 6, Numer MAY).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00478>
- Rubinstein, S. M., Kolodkin-Gal, I., Mcloon, A., Chai, L., Kolter, R., Losick, R., & Weitz, D. A. (2012). Osmotic pressure can regulate matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 86(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08201.x>
- Rubio, A., & Pogliano, K. (2004). Septal localization of forespore membrane proteins during engulfment in *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal*, 23(7).
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600171>
- Rudner, D. Z., & Losick, R. (2001). Morphological Coupling in Development: Lessons from Prokaryotes. W *Developmental Cell* (T. 1, Numer 6). [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00094-6)
- Rudner, D. Z., & Losick, R. (2002). A sporulation membrane protein tethers the pro- σ K processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localization. *Genes and Development*, 16(8). <https://doi.org/10.1101/gad.977702>
- Rudner, D. Z., Pan, Q., & Losick, R. M. (2002). Evidence that subcellular localization of a bacterial membrane protein is achieved by diffusion and capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13).
<https://doi.org/10.1073/pnas.132235899>
- Ruvolo, M. V., Mach, K. E., & Burkholder, W. F. (2006). Proteolysis of the replication checkpoint protein Sda is necessary for the efficient initiation of sporulation after transient replication stress in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 60(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05167.x>
- Ruzheinikov, S. N., Das, S. K., Sedelnikova, S. E., Hartley, A., Foster, S. J., Horsburgh, M. J., Cox, A. G., McCleod, C. W., Mekhalfia, A., Blackburn, G. M., Rice, D. W., & Baker, P. J. (2001). The 1.2

- Å structure of a novel quorum-sensing protein, *Bacillus subtilis* LuxS. *Journal of Molecular Biology*, 313(1). <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5027>
- Ryter, A. (1965). Étude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 108.
- Sakai, A., Katayama, K., Katsuragi, T., & Tani, Y. (2001). Glycolaldehyde-forming route in *Bacillus subtilis* in relation to vitamin B6 biosynthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2). [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80057-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80057-8)
- Samadpour, A. N., & Merrih, H. (2018). DNA gyrase activity regulates DnaA-dependent replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 108(2). <https://doi.org/10.1111/mmi.13920>
- 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). <https://doi.org/10.1128/AEM.05031-11>
- Sauert, M., Temmel, H., & Moll, I. (2015). Heterogeneity of the translational machinery: Variations on a common theme. *W Biochimie* (T. 114). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.011>
- Sauert, M., Wolfinger, M. T., Vesper, O., Müller, C., Byrgazov, K., & Moll, I. (2016). The MazF-regulon: A toolbox for the post-transcriptional stress response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 44(14). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw115>
- Savchuk, O. A., Silvestre, O. F., Adão, R. M. R., & Nieder, J. B. (2019). GFP fluorescence peak fraction analysis based nanothermometer for the assessment of exothermal mitochondria activity in live cells. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44023-7>
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *W Canadian Journal of Microbiology* (T. 50, Numer 1). <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *W Nature Methods* (T. 9, Numer 7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Ois Franceschi, F., & Yonath, A. (2000). Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *W Cell* (T. 102).
- Schmalisch, M., Langbein, I., & Stülke, J. (2002). The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(5).
- Scholefield, G., Whiting, R., Errington, J., & Murray, H. (2011). Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Molecular Microbiology*, 79(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07507.x>
- Schultz, D., Lu, M., Stavropoulos, T., Onuchic, J., & Ben-Jacob, E. (2013). Turning oscillations into opportunities: Lessons from a bacterial decision gate. *Scientific Reports*, 3. <https://doi.org/10.1038/srep01668>

- 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). <https://doi.org/10.1073/pnas.0912185106>
- Schumacher, M. A., Lee, J., & Zeng, W. (2016). Molecular insights into DNA binding and anchoring by the *Bacillus subtilis* sporulation kinetochore-like RacA protein. *Nucleic Acids Research*, *44*(11). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw248>
- Schyns, G., Potot, S., Geng, Y., Barbosa, T. M., Henriques, A., & Perkins, J. B. (2005). Isolation and characterization of new thiamine-deregulated mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *187*(23). <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8127-8136.2005>
- Segev, E., Rosenberg, A., Mamou, G., Sinai, L., & Ben-Yehuda, S. (2013). Molecular kinetics of reviving bacterial spores. *Journal of Bacteriology*, *195*(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00093-13>
- Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S., & Socol, C. R. (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, *169*(12). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.001>
- Sen, S., Garcia-Ojalvo, J., & Elowitz, M. B. (2011). Dynamical consequences of bandpass feedback loops in a bacterial phosphorelay. *PLoS ONE*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025102>
- Seredick, S. D., & Spiegelman, G. B. (2007). *Bacillus subtilis* RNA Polymerase Recruits the Transcription Factor Spo0A~P to Stabilize a Closed Complex during Transcription Initiation. *Journal of Molecular Biology*, *366*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.010>
- Serra, C. R., Earl, A. M., Barbosa, T. M., Kolter, R., & Henriques, A. O. (2014). Sporulation during growth in a gut isolate of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *196*(23). <https://doi.org/10.1128/JB.01993-14>
- Serrano, M., Côté, L., Opdyke, J., Moran, C. P., & Henriques, A. O. (2003). Expression of spoIIJ in the prespore is sufficient for activation of σ_G and for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *185*(13), 3905–3917. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3905-3917.2003>
- Serrano, M., Gao, J. X., Bota, J., Bate, A. R., Meisner, J., Eichenberger, P., Moran, C. P., & Henriques, A. O. (2015). Dual-Specificity Anti-sigma Factor Reinforces Control of Cell-Type Specific Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005104>
- Serrano, M., Real, G., Santos, J., Carneiro, J., Moran, C. P., & Henriques, A. O. (2011). A negative feedback loop that limits the ectopic activation of a cell type-specific sporulation sigma factor of *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics*, *7*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002220>
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., & Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective α/β -type small acid-soluble proteins. *Journal of Bacteriology*, *188*(11). <https://doi.org/10.1128/JB.00212-06>
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>

- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *W Trends in Microbiology* (T. 15, Numer 4). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.004>
- Setlow, P. (2014). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0003-2012>
- Shahcheraghi, S., Ayatollahi, J., & Lotfi, M. (2015). Applications of *Bacillus subtilis* as an important bacterium in medical sciences and human life . *Tropical Journal of Medical Research*, 18(1). <https://doi.org/10.4103/1119-0388.152530>
- Shank, E. A., Klepac-Ceraj, V., Collado-Torres, L., Powers, G. E., Losick, R., & Kolter, R. (2011). Interspecies interactions that result in *Bacillus subtilis* forming biofilms are mediated mainly by members of its own genus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.1103630108>
- Sharp, M. D., & Pogliano, K. (2002). Role of cell-specific SpoIIIE assembly in polarity of DNA transfer. *Science*, 295(5552). <https://doi.org/10.1126/science.1066274>
- Sharp, M. D., & Pogliano, K. (2003). The membrane domain of SpoIIIE is required for membrane fusion during *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of Bacteriology*, 185(6). <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.2005-2008.2003>
- Sharpe, M. E., Hauser, P. M., Sharpe, R. G., & Errington, J. (1998). *Bacillus subtilis* cell cycle as studied by fluorescence microscopy: Constancy of cell length at initiation of DNA replication and evidence for active nucleoid partitioning. *Journal of Bacteriology*, 180(3). <https://doi.org/10.1128/jb.180.3.547-555.1998>
- Shemesh, M., Kolter, R., & Losick, R. (2010). The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC. *Journal of Bacteriology*, 192(24). <https://doi.org/10.1128/JB.01025-10>
- Shin, J. H., & Helmann, J. D. (2016). Molecular logic of the Zur-regulated zinc deprivation response in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12612>
- Shin, J. Y., Lopez-Garrido, J., Lee, S. H., Diaz-Celis, C., Fleming, T., Bustamante, C., & Pogliano, K. (2015). Visualization and functional dissection of coaxial paired SpoIIIE channels across the sporulation septum. *eLife*, 4(MAY). <https://doi.org/10.7554/eLife.06474>
- Shuster, B., Khemmani, M., Abe, K., Huang, X., Nakaya, Y., Maryn, N., Buttar, S., Gonzalez, A. N., Driks, A., Sato, T., & Eichenberger, P. (2019). Contributions of crust proteins to spore surface properties in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 111(3). <https://doi.org/10.1111/mmi.14194>
- Shuster, B., Khemmani, M., Nakaya, Y., Holland, G., Iwamoto, K., Abe, K., Imamura, D., Maryn, N., Driks, A., Sato, T., & Eichenberger, P. (2019). Expansion of the spore surface polysaccharide layer in *Bacillus subtilis* by deletion of genes encoding glycosyltransferases and glucose modification enzymes. *Journal of Bacteriology*, 201(19). <https://doi.org/10.1128/JB.00321-19>
- Siebring, J., Elema, M. J. H., Drubi Vega, F., Kovács, Á. T., Haccou, P., & Kuipers, O. P. (2014). Repeated triggering of sporulation in *Bacillus subtilis* selects against a protein that affects the timing of cell division. *ISME Journal*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.128>

- Simsek, D., & Barna, M. (2017). An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications. *W Current Opinion in Cell Biology* (T. 45).
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.010>
- Sinai, L., Rosenberg, A., Smith, Y., Segev, E., & Ben-Yehuda, S. (2015). The molecular timeline of a reviving bacterial spore. *Molecular Cell*, 57(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.019>
- Singh, P. K., Ramachandran, G., Ramos-Ruiz, R., Peiró-Pastor, R., Abia, D., Wu, L. J., & Meijer, W. J. J. (2013). Mobility of the Native Bacillus subtilis Conjugative Plasmid pLS20 Is Regulated by Intercellular Signaling. *PLoS Genetics*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003892>
- Smits, W. K., Bongiorno, C., Veening, J. W., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P., & Perego, M. (2007). Temporal separation of distinct differentiation pathways by a dual specificity Rap-Phr system in Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*, 65(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05776.x>
- Solomon, J. M., & Grossman, A. D. (1996). Who's competent and when: Regulation of natural genetic competence in bacteria. *W Trends in Genetics* (T. 12, Numer 4).
[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(96\)10014-7](https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10014-7)
- Solomon, J. M., Lazazzera, B. A., & Grossman, A. D. (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in Bacillus subtilis. *Genes and Development*, 10(16). <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.2014>
- Sonenshein, A. L. (2000). Control of sporulation initiation in Bacillus subtilis. *W Current Opinion in Microbiology* (T. 3, Numer 6). [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00141-7)
- Song, W., Joo, M., Yeom, J. H., Shin, E., Lee, M., Choi, H. K., Hwang, J., Kim, Y. I., Seo, R., Lee, J. E., Moore, C. J., Kim, Y. H., Eyun, S. il, Hahn, Y., Bae, J., & Lee, K. (2019). Divergent rRNAs as regulators of gene expression at the ribosome level. *Nature Microbiology*, 4(3).
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0341-1>
- Steil, L., Serrano, M., Henriques, A. O., & Völker, U. (2005). Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of Bacillus subtilis. *W Microbiology* (T. 151, Numer 2). <https://doi.org/10.1099/mic.0.27493-0>
- Stephenson, K., & Hoch, J. A. (2002). Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *W Molecular Microbiology* (T. 46, Numer 2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03186.x>
- Stephenson, S., Mueller, C., Jiang, M., & Perego, M. (2003). Molecular analysis of Phr peptide processing in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 185(16).
<https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4861-4871.2003>
- Sterlini, J. M., & Mandelstam, J. (1969). Commitment to sporulation in Bacillus subtilis and its relationship to development of actinomycin resistance. *The Biochemical journal*, 113(1).
<https://doi.org/10.1042/bj1130029>
- Strop, P., Smith, K. S., Iverson, T. M., Ferry, J. G., & Rees, D. C. (2001). Crystal Structure of the „cab”-type β Class Carbonic Anhydrase from the Archaeon Methanobacterium thermoautotrophicum. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 10299–10305.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M009182200>

- Stulke, J., Hanschke, R., & Hecker, M. (1993). Temporal activation of α -glucanase synthesis in *Bacillus subtilis* is mediated by the GTP pool. *Journal of General Microbiology*, 139(9), 2041–2045. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-9-2041>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. W *Microbial Cell Factories* (T. 19, Numer 1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Sun, D. L., Jiang, X., Wu, Q. L., & Zhou, N. Y. (2013). Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01282-13>
- Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M. F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S. D., & Hulett, F. M. (1996). Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178(5). <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1374-1385.1996>
- Sun, G., Yang, M., Jiang, L., & Huang, M. (2021). Regulation of pro- σ K activation: a key checkpoint in *Bacillus subtilis* sporulation. W *Environmental Microbiology* (T. 23, Numer 5). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15415>
- 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). <https://doi.org/10.1128/msphere.00463-20>
- Szurmant, H., & Hoch, J. A. (2010). Interaction fidelity in two-component signaling. W *Current Opinion in Microbiology* (T. 13, Numer 2, s. 190–197). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.007>
- Tanaka, Y., Nanamiya, H., Yano, K., Kakugawa, K., Kawamura, F., & Ochi, K. (2013). rRNA (rrn) operon-engineered *Bacillus subtilis* as a feasible test organism for antibiotic discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02604-12>
- Temmel, H., Müller, C., Sauert, M., Vesper, O., Reiss, A., Popow, J., Martinez, J., & Moll, I. (2017). The RNA ligase RtcB reverses MazF-induced ribosome heterogeneity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 45(8). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1018>
- Thi Nguyen, H. B., & Schumann, W. (2012). The sporulation control gene spo0M of *Bacillus subtilis* is a target of the FtsH metalloprotease. *Research in Microbiology*, 163(2). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.10.011>
- Thomaides, H. B., Davison, E. J., Burston, L., Johnson, H., Brown, D. R., Hunt, A. C., Errington, J., & Czaplewski, L. (2007). Essential bacterial functions encoded by gene pairs. *Journal of Bacteriology*, 189(2). <https://doi.org/10.1128/JB.01381-06>
- Tiwari, A., Ray, J. C. J., Narula, J., & Igoshin, O. A. (2011). Bistable responses in bacterial genetic networks: Designs and dynamical consequences. *Mathematical Biosciences*, 231(1), 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2011.03.004>
- Tobin, M. J., Cho, S. Y., Profy, W., Ryan, T. M., Le, D. H., Lin, C., Yip, E. Z., Dorsey, J. L., Levy, B. R., Rhodes, J. D., & Welsh, M. A. (2023). Reconstituting Spore Cortex Peptidoglycan Biosynthesis Reveals a Deacetylase That Catalyzes Transamidation. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.3c00100>

- Tojo, S., Hirooka, K., & Fujita, Y. (2013). Expression of kinA and kinB of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. *Journal of Bacteriology*, *195*(8). <https://doi.org/10.1128/JB.02131-12>
- 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). <https://doi.org/10.1111/mmi.12355>
- Trautmann, H. S., & Ramsey, K. M. (2022). A Ribosomal Protein Homolog Governs Gene Expression and Virulence in a Bacterial Pathogen. *Journal of Bacteriology*, *204*(10). <https://doi.org/10.1128/jb.00268-22>
- Trunet, C., Carlin, F., & Coroller, L. (2017). Investigating germination and outgrowth of bacterial spores at several scales. W *Trends in Food Science and Technology* (T. 64). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.008>
- Trunet, C., Ngo, H., & Coroller, L. (2019). Quantifying permeabilization and activity recovery of *Bacillus* spores in adverse conditions for growth. *Food Microbiology*, *81*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.013>
- Turnbull, P. C. (1996). *Medical Microbiology* (S. Baron, Red.; 4. wyd.). The University of Texas Medical Branch at Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/>
- Tzeng, Y. L., Zhou, X. Z., & Hoch, J. A. (1998). Phosphorylation of the Spo0B response regulator phosphotransferase of the phosphorelay initiating development in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(37). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23849>
- Ursem, R., Swarge, B., Abhyankar, W. R., Buncherd, H., De Koning, L. J., Setlow, P., Brul, S., & Kramer, G. (2021). Identification of Native Cross-Links in *Bacillus subtilis* Spore Coat Proteins. *Journal of Proteome Research*, *20*(3). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00025>
- Valenzuela-García, L. I., Zapata, B. L., Ramírez-Ramírez, N., Huchin-Mian, J. P., Robleto, E. A., Ayala-García, V. M., & Pedraza-Reyes, M. (2020). Novel Biochemical Properties and Physiological Role of the Flavin Mononucleotide Oxidoreductase YhdA from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(20). <https://doi.org/10.1128/AEM.01688-20>
- Valverde, R., Edwards, L., & Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. W *FEBS Journal* (T. 275, Numer 11). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06411.x>
- van Baarle, S., Celik, I. N., Kaval, K. G., Bramkamp, M., Hamoen, L. W., & Halbedel, S. (2013). Protein-protein interaction domains of *Bacillus subtilis* DivIVA. *Journal of Bacteriology*, *195*(5). <https://doi.org/10.1128/JB.02171-12>
- van Duin, J., & Kurland, C. G. (1970). Functional heterogeneity of the 30S ribosomal subunit of *E. coli*. *MGG Molecular & General Genetics*, *109*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00269653>
- van Duin, J., van Knippenberg, P. H., Dieben, M., & Kurland, C. G. (1972). Functional heterogeneity of the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli* - II. Effect of S21 on initiation. *MGG Molecular & General Genetics*, *116*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00582227>
- Van Ooij, C., Eichenberger, P., & Losick, R. (2004). Dynamic patterns of subcellular protein localization during spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *186*(14). <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4441-4448.2004>

- Varughese, K. I., Tsigelny, I., & Zhao, H. (2006). The crystal structure of beryll fluoride Spo0F in complex with the phosphotransferase Spo0B represents a phosphotransfer pretransition state. *Journal of Bacteriology*, *188*(13), 4970–4977. <https://doi.org/10.1128/JB.00160-06>
- Vasudevan, P., Weaver, A., Reichert, E. D., Linnstaedt, S. D., & Popham, D. L. (2007). Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K. *Molecular Microbiology*, *65*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05896.x>
- Veening, J. W., Hamoen, L. W., & Kuipers, O. P. (2005). Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *56*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04659.x>
- Verbruggen, S., & Menschaert, G. (2019). mQC: A post-mapping data exploration tool for ribosome profiling. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, *181*. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2018.10.018>
- Verdugo-Fuentes, A., Gastéllum, G., Rocha, J., & de la Torre, M. (2020). Multiple and overlapping functions of quorum sensing proteins for cell specialization in *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, *202*(10). <https://doi.org/10.1128/JB.00721-19>
- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A. C., Engelberg-Kulka, H., & Moll, I. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell*, *147*(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.047>
- Vohradsky, J., Schwarz, M., Ramaniuk, O., Ruiz-Larrabeiti, O., Hausnerová, V. V., Šanderová, H., & Krásný, L. (2021). Kinetic Modeling and Meta-Analysis of the *Bacillus subtilis* SigB Regulon during Spore Germination and Outgrowth. *Microorganisms*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010112>
- Voynow, P., & Kurland, C. G. (1971). Stoichiometry of the 30S Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, *10*(3). <https://doi.org/10.1021/bi00779a026>
- Wade, J. T., & Laub, M. T. (2019). Concerns about “Stress-induced MazF-mediated proteins in *Escherichia coli*”. *W mBio* (T. 10, Numer 3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00825-19>
- Wagner-Herman, J. K., Bernard, R., Dunne, R., Bisson-Filho, A. W., Kumar, K., Nguyen, T., Mulcahy, L., Koullias, J., Gueiros-Filho, F. J., & Rudner, D. Z. (2012). RefZ facilitates the switch from medial to polar division during spore formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *194*(17). <https://doi.org/10.1128/JB.00378-12>
- Wakeley, P., Hoa, N. T., & Cutting, S. (2000). BofC negatively regulates SpoIVB-mediated signalling in the *Bacillus subtilis* σ (K)-checkpoint. *Molecular Microbiology*, *36*(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01962.x>
- Wakeley, P. R., Dorazi, R., Hoa, N. T., Bowyer, J. R., & Cutting, S. M. (2000). Proteolysis of SpoIVB is a critical determinant in signalling of Pro- σ (K) processing in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *36*(6), 1336–1348. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01946.x>
- Wallberg, F., Tenev, T., & Meier, P. (2016). Analysis of apoptosis and necroptosis by fluorescence-activated cell sorting. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(4). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087387>

- Wang, B., & Artsimovitch, I. (2021). A Growing Gap between the RNAP and the Lead Ribosome. *W Trends in Microbiology* (T. 29, Numer 1). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.011>
- Wang Erickson, A. F., Deighan, P., Chen, S., Barrasso, K., Garcia, C. P., Martínez-Lumbreras, S., Alfano, C., Krysztofinska, E. M., Thapaliya, A., Camp, A. H., Isaacson, R. L., Hochschild, A., & Losick, R. (2017). A novel RNA polymerase-binding protein that interacts with a sigma-factor docking site. *Molecular Microbiology*, *105*(4). <https://doi.org/10.1111/mmi.13724>
- Wang, H., Wang, Y., & Yang, R. (2017). Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. *W Applied Microbiology and Biotechnology* (T. 101, Numer 3). <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8080-9>
- Wang, K. H., Isidro, A. L., Domingues, L., Eskandarian, H. A., McKenney, P. T., Drew, K., Grabowski, P., Chua, M. H., Barry, S. N., Guan, M., Bonneau, R., Henriques, A. O., & Eichenberger, P. (2009). The coat morphogenetic protein SpoVID is necessary for spore encasement in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *74*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06886.x>
- Wang, L., Grau, R., Perego, M., & Hoch, J. A. (1997). A novel histidine kinase inhibitor regulating development in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, *11*(19). <https://doi.org/10.1101/gad.11.19.2569>
- Wang, L. K., Lima, Ch. D., & Shuman, S. (2002). Structure and mechanism of T4 polynucleotide kinase: an RNA repair enzyme. *The EMBO Journal*, *21*(14), 3873–3880. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf397>
- Wang, S. T., Setlow, B., Conlon, E. M., Lyon, J. L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., & Eichenberger, P. (2006). The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, *358*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.059>
- War Nongkhaw, F. M., & Joshi, S. R. (2014). Epiphytic and endophytic bacteria that promote growth of ethnomedicinal plants in the subtropical forests of Meghalaya, India. *Revista de Biologia Tropical*, *62*(4). <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.12138>
- Watabe, K. (2013). Overview of study on *Bacillus subtilis* spores. *W Yakugaku Zasshi* (T. 133, Numer 7). <https://doi.org/10.1248/yakushi.13-00143>
- Weber, H. J. (1972). Stoichiometric measurements of 30S and 50S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. *MGG Molecular & General Genetics*, *119*(3). <https://doi.org/10.1007/BF00333861>
- Whitten, A. E., Jacques, D. A., Hammouda, B., Hanley, T., King, G. F., Guss, J. M., Trewhella, J., & Langley, D. B. (2007). The Structure of the KinA-Sda Complex Suggests an Allosteric Mechanism of Histidine Kinase Inhibition. *Journal of Molecular Biology*, *368*(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.064>
- Wicke, D., Meißner, J., Warneke, R., Eifmann, C., & Stülke, J. (2023). Understudied proteins and understudied functions in the model bacterium *Bacillus subtilis*—A major challenge in current research. *W Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.15053>
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornheln, C., Hartsch, T., & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, *407*(6802). <https://doi.org/10.1038/35030006>

- Winnen, B., Anderson, E., Cole, J. L., King, G. F., & Rowland, S. L. (2013). Role of the PAS sensor domains in the bacillus subtilis sporulation kinase KinA. *Journal of Bacteriology*, *195*(10). <https://doi.org/10.1128/JB.00096-13>
- Wolf, D., Kalamorz, F., Wecke, T., Juszcak, A., Mäder, U., Homuth, G., Jordan, S., Kirstein, J., Hoppert, M., Voigt, B., Hecker, M., & Mascher, T. (2010). In-depth profiling of the LiaR response of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *192*(18). <https://doi.org/10.1128/JB.00543-10>
- Wu, L. J., & Errington, J. (2000). Identification and characterization of a new prespore-specific regulatory gene, rsfA, of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *182*(2). <https://doi.org/10.1128/JB.182.2.418-424.2000>
- Wu, L. J., & Errington, J. (2003). RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*, *49*(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03643.x>
- Wu, R., Gu, M., Wilton, R., Babnigg, G., Kim, Y., Pokkuluri, P. R., Szurmant, H., Joachimiak, A., & Schiffer, M. (2013). Insight into the sporulation phosphorelay: Crystal structure of the sensor domain of Bacillus subtilis histidine kinase, KinD. *Protein Science*, *22*(5). <https://doi.org/10.1002/pro.2237>
- Xavier, K. B., & Bassler, B. L. (2003). LuxS quorum sensing: More than just a numbers game. *W Current Opinion in Microbiology* (T. 6, Numer 2). [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00028-6)
- Xue, S., & Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: A new frontier in gene regulation and organismal biology. *W Nature Reviews Molecular Cell Biology* (T. 13, Numer 6).
- Yang, J., Anderson, B. W., Turdiev, A., Turdiev, H., Stevenson, D. M., Amador-Noguez, D., Lee, V. T., & Wang, J. D. (2020). The nucleotide pGpp acts as a third alarmone in Bacillus, with functions distinct from those of (p) ppGpp. *Nature Communications*, *11*(1).
- Yeak, K. Y. C., Boekhorst, J., Wels, M., Abee, T., & Wells-Bennik, M. H. J. (2023). Prediction and validation of novel SigB regulon members in Bacillus subtilis and regulon structure comparison to Bacillales members. *BMC Microbiology*, *23*(1).
- York, A. (2020). A short and long distance relationship. *W Nature Reviews Microbiology* (T. 18, Numer 11). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00445-z>
- Yu, B. J., Kim, J. A., Moon, J. H., Ryu, S. E., & Pan, J. G. (2008). The diversity of lysine-acetylated proteins in Escherichia coli. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*(9).
- Yu, Y. T. N., & Kroos, L. (2000). Evidence that SpoIVFB is a novel type of membrane metalloprotease governing intercompartmental communication during Bacillus subtilis sporulation. *Journal of Bacteriology*, *182*(11). <https://doi.org/10.1128/JB.182.11.3305-3309.2000>
- Yung, P. T., & Ponce, A. (2008). Fast sterility assessment by germinable-endospore biosimetry. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(24). <https://doi.org/10.1128/AEM.01437-08>
- Zapf, J., Sen, U., Hoch, J. A., & Varughese, K. I. (2000). A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure*, *8*(8), 851–862.

- Zeigler, D. R. (2011). The genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23: Insights into speciation within the *B. subtilis* complex and into the history of *B. subtilis* genetics. *Microbiology*, *157*(7). <https://doi.org/10.1099/mic.0.048520-0>
- Zeytuni, N., Hong, C., Flanagan, K. A., Worrall, L. J., Theiltges, K. A., Vuckovic, M., Huang, R. K., Massoni, S. C., Camp, A. H., Yu, Z., & Strynadka, N. C. (2017). Near-atomic resolution cryoelectron microscopy structure of the 30-fold homooligomeric SpoIIAG channel essential to spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1704310114>
- Zhang, C., Huang, J., Zhang, J., Liu, S., Cui, M., An, B., Wang, X., Pu, J., Zhao, T., Fan, C., Lu, T. K., & Zhong, C. (2019). Engineered *Bacillus subtilis* biofilms as living glues. *Materials Today*, *28*.
- Zhang, G., An, Y., Zaved, H. M., Guo, Q., Yang, M., Yuan, J., Li, W., Sun, W., & Qi, X. (2019). *Bacillus subtilis* spore surface display technology: A review of its development and applications. *W Journal of Microbiology and Biotechnology* (T. 29, Numer 2). Korean Society for Microbiolog and Biotechnology. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.06066>
- Zhang, J., Ichikawa, H., Halberg, R., Kroos, L., & Aronson, A. I. (1994). Regulation of the transcription of a cluster of *Bacillus subtilis* spore coat genes. *Journal of Molecular Biology*, *240*(5). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1456>
- Zhang, P., Garner, W., Yi, X., Yu, J., Li, Y. Q., & Setlow, P. (2010). Factors affecting variability in time between addition of nutrient germinants and rapid dipicolinic acid release during germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, *192*(14).
- Zhang, Y., Delbrück, A. I., Off, C. L., Benke, S., & Mathys, A. (2020). Flow Cytometry Combined With Single Cell Sorting to Study Heterogeneous Germination of *Bacillus* Spores Under High Pressure. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03118>
- Zheng, J. J., Perez, A. J., Tsui, H. C. T., Massidda, O., & Winkler, M. E. (2017). Absence of the KhpA and KhpB (JAG/EloR) RNA-binding proteins suppresses the requirement for PBP2b by overproduction of FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Molecular Microbiology*, *106*(5).
- Zhou, B., Alon, S., Rao, L., Sinai, L., & Ben-Yehuda, S. (2022). Reviving the view: evidence that macromolecule synthesis fuels bacterial spore germination. *microLife*, *3*.
- Zhou, R., Cusumano, C., Sui, D., Garavito, R. M., & Kroos, L. (2009). Intramembrane proteolytic cleavage of a membrane-tethered transcription factor by a metalloprotease depends on ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38). <https://doi.org/10.1073/pnas.0901455106>
- Zhou, R., & Kroos, L. (2004). BofA protein inhibits intramembrane proteolysis of pro- σ K in an intercompartmental signaling pathway during *Bacillus subtilis* sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(17).
- Zhou, R., & Kroos, L. (2005). Serine proteases from two cell types target different components of a complex that governs regulated intramembrane proteolysis of pro- σ K during *Bacillus subtilis* development. *Molecular Microbiology*, *58*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04870.x>

Spis tabel

Tabela 4.1. Stężenia oraz średnica obszaru inhibicji wzrostu dla wybranych związków chemicznych wykryte metodą dyfuzji płytkowej	130
Tabela 4.2. Wartości OD ₅₆₀ biofilmów utworzonych przez szczepy <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT), badany (3KO) oraz BGSC	131
Tabela 4.3. Średnice hodowli szczepów <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT) i badany (3KO) wyrażone w cm	132
Tabela 4.4. Stężenie i zawartość całkowitego RNA w poszczególnych lizatach hodowli szczepów <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT) i badany (3KO)	133
Tabela 4.5. Stężenie i zawartość całkowitego RNA po oczyszczaniu w poszczególnych próbkach przeznaczonych na RNA-seq	134
Tabela 4.6. Stężenie i zawartość mRNA po deplecji rRNA dla poszczególnych próbek przeznaczonych na RNA-seq	135
Tabela 4.7. Stężenie i zawartość całkowitego RNA po trawieniu nukleazą i oczyszczaniu w poszczególnych próbkach przeznaczonych na RIBO-seq	135
Tabela 4.8. Wyniki testu współczynnika korelacji Pearsona dla poszczególnych powtórzeń	141
Tabela 4.9. Wykaz zbadanych genów białek rybosomalnych, których znormalizowane odczyty RNA-seq nie przekroczyły średniej	153
Tabela 4.10. Wykaz genów, które wykazały różnicę w ekspresji na poziomie transkrypcji między szczepem badanym (3KO) a kontrolnym (WT) na podstawie analizy RNA-seq	155
Tabela 4.11. Wykaz genów, które wykazały różnicę w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO)	158
Tabela 4.12. Średnie długości komórek <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT) i badany (3KO) w fazie logarytmicznej (T0), a także po jednej (T1) i dwóch godzinach od indukcji sporulacji (T2) wyrażone w μm	162
Tabela 4.13. Średnie długości spor <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT) i badany (3KO) w trakcie trwania procesu germinacji wyrażone w μm	169
Tabela 4.14. Wyniki testu U Manna–Whitneya dla intensywności fluorescencji RpsB-GFP w sporach szczepów WT i 3KO	175
Tabela 4.15. Wyniki testu U Manna–Whitneya dla intensywności fluorescencji OPP-Alexa w szczepach WT i 3KO	177
Tabela 5.1. Mapa ciepła ekspresji genów wykazujących różnice na poziomie transkrypcji w fazie logarytmicznej (T0) między szczepem badanym (3KO) a kontrolnym (WT)	181

Tabela 5.2. Wykaz genów związanych z tworzeniem płaszcza, w tym skorupy, które wykazały różnicę w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO)	190
Tabela 5.3. Wykaz genów ogólnych białek stresu, które wykazały różnicę w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO)	195
Tabela 5.4. Wykaz genów, które wykazały największe różnice w poziomie translacji między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO)	197
Tabela 5.5. Wykaz genów białek rybosomalnych, które wykazały różnice w ekspresji genów między szczepem kontrolnym (WT) a badanym (3KO)	202

Spis rycin

Rycina 1.1. Schemat morfologicznych zmian zachodzących podczas procesu sporulacji u <i>B. subtilis</i> (Qin i in., 2022)	13
Rycina 1.2. Schemat działania generatora higrowoltaicznego wykorzystującego spory <i>B. subtilis</i> (X. Chen i in., 2014) - zmodyfikowane	17
Rycina 1.3. Uproszczony schemat podejmowania decyzji o rozpoczęciu procesu sporulacji lub kompetencji u <i>B. subtilis</i> (Schultz i in., 2013) - zmodyfikowane	17
Rycina 1.4. Schemat budowy kinaz histydynowych KinA, KinB, KinC, KinD oraz KinE (R. Wu i in., 2013)	19
Rycina 1.5. Schemat działania kinaz histydynowych (Davidson i in., 2018) - zmodyfikowane	20
Rycina 1.6. Czasoprzestrzenne rozdzielanie aktywacji kinaz KinB i KinC podczas indukcji ruchu ślizgowego u <i>B. subtilis</i> (Grau i in., 2015) - zmodyfikowane	22
Rycina 1.7. Schemat zależności stężenia Spo0A~P od podjętych zachowań adaptacyjnych u <i>B. subtilis</i> (Kovács, 2016) - zmodyfikowane	23
Rycina 1.8. Schemat powstawania peptydów sygnałowych CSF oraz PhrE (Pottahil & Lazazzera, 2003) - zmodyfikowane	25
Rycina 1.9. Schemat działania autoinduktorów CSF, PhrA i PhrE (Pottahil & Lazazzera, 2003) - zmodyfikowane	26
Rycina 1.10. Schemat szlaku <i>phosphorelay</i> w porównaniu do dwuskładnikowego mechanizmu odpowiedzi (Mitrophanov & Groisman, 2008) - zmodyfikowane	28
Rycina 1.11. Schemat regulacji <i>phosphorelay</i> poprzez fosfatazy (Mitrophanov & Groisman, 2008) - zmodyfikowane	29
Rycina 1.12. Schemat tworzenia się włókna osiowego i rozchodzenia się chromosomów potomnych podczas sporulacji (Schumacher i in., 2016) - zmodyfikowane	35
Rycina 1.13. Schemat zakotwiczania regionu <i>oriC</i> chromosomu na biegunie komórkowym podczas sporulacji (Kloosterman i in., 2016) - zmodyfikowane	36
Rycina 1.14. Schemat przesuwania się pierścienia Z ze środka komórki do jej biegunów (Ben-Yehuda & Losick, 2002) - zmodyfikowane	37
Rycina 1.15. Schemat przedstawiający skutki braku białka SpoIIE w komórce <i>B. subtilis</i> podczas sporulacji (Barák & Muchová, 2018)	39
Rycina 1.16. Schemat asymetrycznego rozłożenia białek FtsZA i SpoIIE podczas powstawania septy sporulacyjnej (Khanna i in., 2021)	39

Rycina 1.17. Schemat asymetrycznego rozłożenia białek DivIVA i SpoIIIE podczas powstawania septy sporulacyjnej (Eswaramoorthy i in., 2014)	40
Rycina 1.18. Szlak aktywacji σF oraz lokalizacja jego składników w komórce przedpodziałowej oraz po asymetrycznym podziale (Bradshaw & Losick, 2015) - zmodyfikowane. A. Szlak aktywacji σF . B. Lokalizacja SpoIIAA, SpoIIAB oraz σF w komórce przedpodziałowej oraz po asymetrycznym podziale	41
Rycina 1.19. Schemat wiązania SpoIIAA do kompleksu SpoIIAB- σF skutkujący uwolnieniem σF oraz zablokowaniem SpoIIAB (Masuda i in., 2004) - zmodyfikowane	42
Rycina 1.20. Schemat zmiany lokalizacji SpoIIIE z „divisomu” na biegun komórki, która jest związana oligomeryzacją cząsteczki (Bradshaw & Losick, 2015)	43
Rycina 1.21. Schemat budowy monomeru SpoIIIE u <i>B. subtilis</i> (Fiche i in., 2013) - zmodyfikowane	45
Rycina 1.22. Dwa modele translokacji DNA przez SpoIIIE (Mohamed i in., 2021) - zmodyfikowane. A. Model kanału. B. Model pora wodnego	45
Rycina 1.23. Schemat tworzenia się proponowanego kanału przewodzącego DNA przez kompleksy SpoIIIE (Fleming i in., 2010) - zmodyfikowane. A - widok z boku, B - widok z góry	46
Rycina 1.24. Schemat tworzenia się proponowanego pora wodnego przewodzącego DNA przez kompleksy SpoIIIE (Fiche i in., 2013) - zmodyfikowane	46
Rycina 1.25. Schemat dysocjacji kompleksu SpoIIIE w presporze pod wpływem interakcji z SRS o niedozwolonym kierunku (Ptacin i in., 2008) - zmodyfikowane	47
Rycina 1.26. Schemat translokacji chromosomu oraz pochłonięcia prespory przez komórkę macierzystą (Lopez-Garrido i in., 2018)	47
Rycina 1.27. Schemat zmiany lokalizacji SpoIIIE w zależności od etapu procesu sporulacji (N. J. L. Liu i in., 2006)	48
Rycina 1.28. Schemat kaskady sporulacyjnych czynników σ (Watabe, 2013)	49
Rycina 1.29. Schemat wzajemnej komunikacji prespory i komórki macierzystej w celu koordynacji poszczególnych etapów sporulacji (Hilbert & Piggot, 2004) - zmodyfikowane	49
Rycina 1.30. Schemat eksportu SpoIIIR z prespory do przestrzeni międzybłonowej septy (Diez i in., 2012) - zmodyfikowane	51
Rycina 1.31. Schemat aktywacji σE poprzez proteolityczne rozszczepienie sekwencji N-końcowej przez SpoIIIGA (Imamura i in., 2008)	52
Rycina 1.32. Schemat pochłaniania prespory przez komórkę macierzystą (Ojkc i in., 2016) - zmodyfikowane	54

Rycina 1.33. Schemat skoordynowanej syntezy i degradacji peptydoglikanu, umożliwiający migrację przednich krawędzi błony komórki macierzystej w celu pochłonięcia prespory (Khanna i in., 2020)	55
Rycina 1.34. Schemat interakcji SpoIIQ zlokalizowanego w presporze ze SpoIIIAH zlokalizowanym w komórce macierzystej (Broder & Pogliano, 2006)	57
Rycina 1.35. Schemat zaproponowanego kanału tworzonego przez kompleks SpoIIQ po stronie prespory i SpoIIIAA-SpoIIIAH po stronie komórki macierzystej (Crawshaw i in., 2014) - zmodyfikowane	58
Rycina 1.36. Schemat proponowanego działania SpoIIIE w celu fuzji błony komórki macierzystej podczas pochłonięcia prespory (N. J. L. Liu i in., 2006)	59
Rycina 1.37. Schemat regulacji transkrypcji σ G (Mearls i in., 2018) - zmodyfikowane	60
Rycina 1.38. Schemat lokalizacji białek, biorących udział w szlaku aktywacji σ K (R. Zhou & Kroos, 2004)	62
Rycina 1.39. Kolokalizacja kanałów SpoIIIA-H-SpoIIQ z kompleksem SpoIVFA-SpoIVFB-BofA (Kroos & Akiyama, 2013) - zmodyfikowane	64
Rycina 1.40. Przekrój przez sporę <i>B. subtilis</i> (Popham, 2002) - zmodyfikowane	66
Rycina 1.41. Schemat interakcji białek wymaganych do zainicjowania składania płaszczka (K. H. Wang i in., 2009) - zmodyfikowane	67
Rycina 1.42. Schemat powstawania modyfikacji peptydoglikanu w korze spor (Tobin i in., 2023) - zmodyfikowane	71
Rycina 1.43. Schemat sekwencji zdarzeń podczas germinacji spor przedstawiona na zdjęciach mikroskopowych z kontrastem fazowym (Sinai i in., 2015) - zmodyfikowane	73
Rycina 1.44. Schemat regulacji translacji przez wyspecjalizowane rybosomy (Gay i in., 2022) - zmodyfikowane	75
Rycina 1.45. Schemat działania hipotetycznego filtra rybosomowego (Mauro & Edelman, 2007) - zmodyfikowane	77
Rycina 1.46. Przykłady heterogeniczności rybosomów u eukariontów (Xue & Barna, 2012) - zmodyfikowane	80
Rycina 1.47. Przykład heterogeniczności rybosomów wywołany przez obecność różnych rRNA na przykładzie <i>P. falciparum</i> (Xue & Barna, 2012) - zmodyfikowane	81
Rycina 1.48. Schemat tworzenie bezliderowych mRNA oraz rybosomów stresowych przez MazF (Vesper i in., 2011) - zmodyfikowane	82
Rycina 1.49. Model naprawy rybosomów stresowych poprzez działanie ligazy RtcB u <i>E. coli</i> (Temmel i in., 2017) - zmodyfikowane	83

Rycina 1.50. Schemat zależnego od otwartej ramki odczytu rozszczepiania mRNA przez MazF w rybosomie stresowym (Oron-Gottesman i in., 2016)	86
Rycina 1.51. Lokalizacja operonów <i>rrn</i> w genomie <i>B. subtilis</i> (Nanamiya i in., 2010)	91
Rycina 1.52. Heterogeniczność sekwencji 16S, 23S i 5S rRNA między różnymi operonami <i>rrn</i> w <i>B. subtilis</i> (Nanamiya i in., 2010)	92
Rycina 1.53. Ekspresja poszczególnych operonów <i>rrn</i> podczas sporulacji (Koga i in., 2006) - zmodyfikowane. A – operony <i>rrn</i> , których ekspresja wzrasta podczas sporulacji; B – operony <i>rrn</i> , których ekspresja nie zmienia się podczas sporulacji	92
Rycina 1.54. Ekspresja poszczególnych operonów w komórce macierzystej i presporze (Rosenberg i in., 2012) - zmodyfikowane	93
Rycina 1.55. Konsensusowa palindromowa sekwencja DNA wykrywana przez Zur (Prestel i in., 2015)	98
Rycina 1.56. Dopasowanie konsensusowej sekwencji rozpoznawanej przez Zur z sekwencją promotorową wybranych genów represjonowanych przez Zur, w tym <i>rpsNB</i> , <i>rpmEB</i> i <i>rpmGC</i> (Prestel i in., 2015)	98
Rycina 1.57. Schemat działania Zur w zależności od związanego cynku (J. H. Shin & Helmann, 2016) - zmodyfikowane	99
Rycina 1.58. Schemat regulacji genu <i>rpmEB</i> przez Zur w warunkach a) dostępu cynku, b) niedoboru cynku (Moore & Helmann, 2005) - zmodyfikowane	101
Rycina 1.59. Opóźnienie germinacji spor u mutantu $\Delta rpmE$ w porównaniu do szczepu dzikiego (WT) (Sinai i in., 2015)	102
Rycina 1.60. Opóźnienie w rozpoczęciu translacji białek podczas germinacji spor mutantu $\Delta rpmE$ w porównaniu do spor szczepu dzikiego (WT) (Sinai i in., 2015) - zmodyfikowane. A) Analiza typu dot blot próbek białka wyekstrahowanych ze spor 30 i 60 minut po indukcji germinacji wykonana w dwóch powtórzeniach. B) Zdjęcia mikroskopii poklatkowej syntezy białka MalS-GFP w czasie rzeczywistym podczas germinacji spor	102
Rycina 1.61. Schemat zmiany konformacji RpmE podczas obrotu głowy 30S u <i>E. coli</i> (Fischer i in., 2015) - zmodyfikowane	103
Rycina 1.62. Schemat powstawania podjednostek rybosomów 30S zawierających RpsN oraz podjednostek 30S zawierających RpsNB (Natori i in., 2007) - zmodyfikowane	105
Rycina 1.63. Region promotora <i>rpmGC</i> (Gabriel & Helmann, 2009)	107
Rycina 3.1. Schemat fragmentacji RNA w warunkach alkalicznych (Lemire i in., 2016) - zmodyfikowane	121
Rycina 3.2. Schemat przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania RNA-seq i RIBO-seq (Kopik i in., 2021) - zmodyfikowane	123

Rycina 3.3. Schemat działania OPP (J. Liu i in., 2012) - zmodyfikowane	125
Rycina 4.1. Krzywe wzrostu dla szczepu kontrolnego (WT) oraz szczepu badanego (3KO) w pożywce LB, CH i BMM	129
Rycina 4.2. Histogram tworzenia biofilmu przez szczepy <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT), badany (3KO) oraz BGSC. A) Inkubacja przez trzy dni w szklanych probówkach. B) Inkubacja przez pięć dni w plastikowych falkonach	131
Rycina 4.3. Tworzenia biofilmu przez szczepy <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT), badany (3KO) oraz BGSC. A) Inkubacja przez trzy dni w szklanych probówkach. B) Inkubacja przez pięć dni w plastikowych falkonach	132
Rycina 4.4. Mobilność szczepów <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT) i badany (3KO) na płytkach Petriego z półpłynnym podłożem LB zawierającym 0,22%, 0,25%, 0,30%, 0,33% lub 0,35% agar	133
Rycina 4.5. Zdjęcia reprezentatywnego 15% denaturującego żelu poliakrylamidowego przed i po wycięciu fragmentów żelu w celu izolacji odcisków rybosomów	136
Rycina 4.6. Zdjęcia reprezentatywnego 6% natywnego żelu poliakrylamidowego przed i po wycięciu fragmentów żelu w celu izolacji bibliotek cDNA przeznaczonych na RNA-seq	137
Rycina 4.7. Zdjęcia reprezentatywnego 6% natywnego żelu poliakrylamidowego przed i po wycięciu fragmentów żelu w celu izolacji bibliotek cDNA przeznaczonych na RIBO-seq	137
Rycina 4.8. Zdjęcie reprezentatywnego wirtualnego żelu bibliotek cDNA przeznaczonych na RNA-seq oraz RIBO-seq	138
Rycina 4.9. Zdjęcia wybranych elektroferogramów bibliotek cDNA przeznaczonych na RNA-seq oraz RIBO-seq	138
Rycina 4.10. Zdjęcia wykresów (jakości, zawartości par GC oraz rozkładu długości sekwencji) wykonanych programem FastQC dla reprezentatywnych bibliotek	140
Rycina 4.11. Schematy wykresów PCA dla obu powtórzeń RNA-seq i RIBO-seq	141
Rycina 4.12. Mapa ciepła ekspresji czynników transkrypcyjnych związanych z procesem sporulacji, czyli σ H, Spo0A, σ F, σ E, σ G oraz σ K na poziomie transkrypcji	142
Rycina 4.13. Mapa ciepła ekspresji białek związanych z procesem sporulacji na poziomie transkrypcji	144
Rycina 4.14. Mapa ciepła ekspresji białek związanych z procesem sporulacji na poziomie translacji	145
Rycina 4.15. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie transkrypcji	146
Rycina 4.16. Wizualizacja zmapowanych odczytów RNA-seq i RIBO-seq do genu <i>rpsNB</i> w szczepie WT i 3KO w pierwszej godzinie po indukcji sporulacji (T1)	148

Rycina 4.17. Wizualizacja zmapowanych odczytów RNA-seq i RIBO-seq do genu <i>rpmEB</i> w szczepie WT i 3KO w trzeciej godzinie po indukcji sporulacji (T3)	149
Rycina 4.18. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie transkrypcji z wyłączeniem genów <i>rpmEB</i> , <i>rpmGC</i> oraz <i>rpsNB</i>	150
Rycina 4.19. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie translacji	151
Rycina 4.20. Mapa ciepła ekspresji białek rybosomalnych na poziomie translacji z wyłączeniem genów <i>rpmEB</i> , <i>rpmGC</i> i <i>rpsNB</i>	152
Rycina 4.21. Wizualizacja zmapowanych odczytów RNA-seq i RIBO-seq do genu <i>rpsB</i> w szczepie WT i 3KO w siódmej godzinie po indukcji sporulacji (T7)	154
Rycina 4.22. Krzywe wzrostu porównujące szczepy WT i WT-GFP oraz 3KO i 3KO-GFP hodowane w pożywce CH	161
Rycina 4.23. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu WT <i>B. subtilis</i> przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i SynaptoRed oraz wyznakowane RpsB-GFP wraz z korespondującymi z nimi wykresami średniego natężenia fluorescencji RpsB-GFP w komórce	163
Rycina 4.24. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu WT <i>B. subtilis</i> przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i OPP-Alexa oraz korespondujące z nimi wykresy średniego natężenia fluorescencji OPP w komórce	165
Rycina 4.25. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu 3KO <i>B. subtilis</i> przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i SynaptoRed oraz wyznakowane RpsB-GFP	166
Rycina 4.26. Zdjęcia mikroskopowe komórek szczepu 3KO <i>B. subtilis</i> przed (T0) i w trakcie trwania procesu sporulacji (T1-T7), wybarwione DAPI i OPP-Alexa oraz korespondujące z nimi histogramy przedstawiające porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji OPP-Alexa w obu szczepach	167
Rycina 4.27. Histogram wydajności germinacji spor uzyskanych ze szczepów <i>B. subtilis</i> : kontrolnego (WT) i badanego (3KO)	168
Rycina 4.28. Krzywa wzrostu dla spor uzyskanych ze szczepów <i>B. subtilis</i> : kontrolnego (WT) i badanego (3KO)	168
Rycina 4.29. Wykres zmian długości spor <i>B. subtilis</i> : kontrolny (WT) i badany (3KO) w trakcie trwania procesu germinacji	169
Rycina 4.30. Zdjęcia mikroskopowe spor szczepu WT <i>B. subtilis</i> przed inkubacją w wysokiej temperaturze (T-1), a także przed (T0) i w trakcie trwania procesu germinacji (T1-T6), wybarwione DAPI, GFP i SynaptoRed	171

Rycina 4.31. Zdjęcia mikroskopowe spor szczepu 3KO <i>B. subtilis</i> przed inkubacją w wysokiej temperaturze (T-1), a także przed (T0) i w trakcie trwania procesu germinacji (T1-T6), wybarwione DAPI, GFP i SynaptoRed	172
Rycina 4.32. Procent spor wykazujący zieloną fluorescencję, spowodowaną obecnością RpsB-GFP oraz procent spor wykazujący niebieską fluorescencję, wywołaną barwieniem DAPI	173
Rycina 4.33. Histogramy przedstawiające porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji RpsB-GFP w sporach szczepów WT i 3KO dla punktu czasowego T-1	173
Rycina 4.34. Histogramy przedstawiające porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji RpsB-GFP w sporach szczepów WT i 3KO dla punktów czasowych T0-T6	174
Rycina 4.35. Zdjęcia mikroskopowe spor szczepu WT oraz 3KO <i>B. subtilis</i> przed (T0) i w trakcie trwania procesu germinacji (T1-T4), wybarwione DAPI i OPP-Alexa wraz z odpowiadającymi im wykresami przedstawiającymi porównanie logarytmicznej wartości intensywności fluorescencji OPP-Alexa	176
Rycina 5.1. Schemat trzech rodzajów ruchu <i>B. subtilis</i> : pływanie, pełzanie i ślizganie (Kearns, 2010) - zmodyfikowane	180
Rycina 5.2. Schemat lokalizacji genu <i>rpmEB</i> w <i>Bacillus subtilis</i> (Pedreira i in., 2022)	183
Rycina 5.3. Schemat lokalizacji genu <i>rpmGC</i> w <i>Bacillus subtilis</i> (Pedreira i in., 2022)	183
Rycina 5.4. Schemat lokalizacji genów <i>sps</i> w chromosomie bakteryjnym <i>B. subtilis</i> oraz ich funkcji (Dubois i in., 2020) - zmodyfikowane	192
Rycina 5.5. Mapa ciepła transkrypcji genów, wykazujących różnicę w translacji, do których przyporządkowaną funkcją związaną z płaszczem spor lub ogólnym stresem	197
Rycina 5.6. Wizualizacja zmapowanych odczytów RIBO-seq do genów <i>rpsP</i> i <i>ylqC</i> w szczepie WT i 3KO w siódmej godzinie po indukcji sporulacji (T7) jako przykład genu, wykazującego różnicę w translacji (<i>ylqC</i>), który znajduje się w operonie z genem nie wykazującym różnicy (<i>rpsP</i>)	200

Aneks (naukowe *Curriculum vitae*)

WYKSZTAŁCENIE I DOROBEK ZAWODOWY

- 2019 – obecnie doktorantka w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UMCS
- 2018 – 2019 technik w Laboratorium Kryminalistycznym Komendy Wojewódzkiej
Policji w Lublinie
- 2017 staż na stanowisku Research Scholar na University of Idaho (USA)
- 2015 – 2017 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
kierunek: Biologia specjalność: Biochemia
tytuł: *Enzymatyczna transformacja prekursorów barwników w
obecności rozpuszczalników organicznych*
promotor: prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkołazka
- 2012 – 2015 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
kierunek: Biologia specjalność: Biologia ogólna i eksperymentalna
tytuł: *Wybrane przykłady zachowań u nietoperzy (Chiroptera,
Mammalia)*
promotor: dr Michał Piskorski

UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

- Udział w projekcie „Regulacja translacji u bakterii tworzącej spory – specjalizacja rybosomów u *Bacillus subtilis*” programu FIRST TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

ODBYTE W TRAKCIE DOKTORATU STAŻE NAUKOWE

- Staż naukowy w Pracowni Translatomiki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, Polska, 01.04.2021–31.03.2022.

UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH

a) MIĘDZYNARODOWYCH

- Iwańska O., Latoch P., Suchora M., Pidek I.A., Huber M., Bubak I., **Kopik N.**, Kovalenko M., Gąsiorowski M., Armache J-P, Starosta A.L., tytuł posteru *“Lake microbiome and trophy fluctuations of the ancient hemp rettery - an insight from shotgun sequencing of sedDNA”*, SedDNA Meeting, 06–09.06.2023, Poczdam, Niemcy
- **Kopik N.**, Iwańska O., Latoch P., Starosta A.L., tytuł posteru *„More accessible ribosome profiling (RIBO-seq) method for standard laboratory equipment”*, EMBO Young Scientists’ Forum, 21–22.10.2021, Warszawa, Polska

b) KRAJOWYCH

- I Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Biologicznych BIO-IDEA 2020, 06.07.2020, tytuł referatu *„W poszukiwaniu wyspecjalizowanych rybosomów u Bacillus subtilis”*, Lublin, Polska
- II Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej Doktorantów Nauk Biologicznych BIO-IDEA 2021, 15.05.2021, tytuł referatu *„Profilowanie rybosomów (RIBO-seq) u bakterii na przykładzie laseczki siennej (Bacillus subtilis)”*, Lublin (online), za które zdobyto **wyróżnienie**

PUBLIKACJE NAUKOWE

- Iwańska, O., Latoch, P., Suchora, M., Pidek, I. A., Huber, M., Bubak, I., **Kopik, N.**, Kovalenko, M., Gąsiorowski, M., Armache, J.P., Starosta, A.L. *Lake Microbiome and Trophy Fluctuations of the Ancient Hemp Rettery*. Scientific reports, 12(1), 8846. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12761-w> (2022)
- **Kopik, N.**, Chrobak, O., Latoch, P., Kovalenko, M., Starosta, A.L. *RIBO-seq in Bacteria: a Sample Collection and Library Preparation Protocol for NGS Sequencing*. Journal of Visualized Experiments (174), e62544, doi:10.3791/62544 (2021)

UDZIAŁ W SZKOLENIACH I KURSACH

- Szkolenie pt. „*Analiza danych RNA-seq w R*” organizowane przez Xenstats sp. z o. o., które odbyło się 16.04.2023
- Kurs pt. „*Wprowadzenie do analizy danych RNA-Seq*” organizowany przez data2biology sp. z o. o., które odbyło się 18–19.03.2023
- Kurs pt. „*Wprowadzenie do obróbki i analizy danych NGS*” organizowany przez data2biology sp. z o. o., które odbyło się 04.03.2023
- Szkolenie pt. „*Statystyka w R i RStudio*” organizowane przez Xenstats sp. z o. o., które odbyło się 21.01.2023
- Szkolenie pt. „*Wprowadzenie do R i RStudio dla początkujących*” organizowane przez Xenstats sp. z o. o., które odbyło się 14.01.2023
- Warsztat pt. „*Western blot – a technique possible to optimize*” organizowane przez Agrisera, które odbyło się 10.02.2022
- Szkolenie pt. „*Sposoby wizualizacji żeli i membran przy użyciu systemu ChemiDoc MP*” organizowane przez Bio-Rad sp. z o. o., które odbyło się 21.09.2020

POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ

- Współpraca w interdyscyplinarnym projekcie dotyczącym metagenomów z osadów jeziornych, które zaowocowało publikacją pt. „*Lake Microbiome and Trophy Fluctuations of the Ancient Hemp Rettery*”.
- Uczestnictwo i wygłoszenie prezentacji pt. „*Specific Alteration of the 30S Ribosomal Subunits of Bacillus subtilis During Sporulation*” podczas wydarzenia Lab Retreat zorganizowanego przez grupę badawczą pod przewodnictwem dr Sebastiana Glatta z Małopolskiego Centrum Biotechnologii i przy współudziale grup badawczych kierowanych przez dr Marię Górną (Uniwersytet Warszawski) i dr hab. Agatę Starostę, które odbyło się 01-03.10.2019 w Rychwałdzie, Polska.