



## Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

**APVV-18-0104**

**Asymetrické bunkové delenie počas tvorby bakteriálnej endospóry**

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Imrich Barák, DrSc.**

Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV, v. v. i.**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav molekulárnej biológie SAV, v. v. i.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. University of York, Veľká Británia
2. Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences. Prague, Czech Republic
3. Ecole Polytechnique Federale Lausanne, Švajčiarsko
4. CEITEC, Brno, Česká Republika
5. European XFEL (X-ray Free Electron Laser), Hamburg, Nemecko

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Žiadne.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. A. Vetráková, R. Kallianková Chovanová, R. Rechtoriková, D. Krajčíková, and I. Barák (2023) Bacillus subtilis spores displaying RBD domain of SARS-CoV-2 spike protein. Computational and Structural Biotechnology Journal 18, 1474-1486 (doi: 10.1016/j.csbj.2020.06.005) (IF = 7.27) (Q1 JCR2022; Q1 SJR2022)
2. S. Holmes, ...I. Barak et al. C. Darmanin (2022) Megahertz pulse trains enable multi-hit serial crystallography experiments at X-ray Free Electron Lasers. Nature Communications 13:4708. doi: 10.1038/s41467-022-32434-6 (IF 14.92) (Q1 JCR2021; Q1 SJR2021)
3. Z. Chromikova, R. Kalliankova-Chovanova, D. Tamindžija, B. Bartova, D. Radnovic, R. Bernier-Latmani, I. Barak (2022) Implantation of Bacillus pseudomycoides chromate transporter increases chromate tolerance in Bacillus subtilis. Frontiers Microbiol. 13: Art. 842623. doi: 10.3389/fmicb.2022.842623 (IF 5.64) (Q? JCR2021; Q? SJR2021)
4. Barak I. (2021) Special Issue "Bacillus subtilis as a Model Organism to Study Basic Cell Processes". Microorganisms 9, 2459 (IF 4.15) (Q2 JCR2019; Qx SJR2019)
5. N. Labajova, N. Baranova, M. Jurásek, R. Vácha, M. Loose and I. Barak (2021) DivIVA binds to cardiolipin-containing lipid bilayers. Int. J. Mol. Sci., 22, 8350. <https://doi.org/10.3390/ijms22158350> (IF 5.92) (Q1 JCR2020; Q1 SJR2020)
6. D. Krajcikova, V. Bugarova and I. Barak (2021) Interactions of bacillus subtilis basement spore coat layer proteins. Microorganisms 9, 285. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020285> (IF 4.15) (Q2 JCR2019; Qx SJR2019)

7. H. Han, R. Schubert, J. Makroczyova, D. Meza, P. Heuser, M. Aepfelbacher, I. Barák, C. Betzel, P. Fromme, J. Hajdu, I. Kursula, V. S. Lamzin, P. Nissen, E. Tereschenko, J. Schulz, C. Uetrecht, J. Uličný and K. Lorenzen (2021) The XBI BioLab for life science experiments at the European XFEL. *Journal of Applied Crystallography* 54, 1-15.  
<https://doi.org/10.1107/S1600576720013989> (IF = 2.99) (Q2 JCR2019; Q1 SJR2019)
8. M. Bodík, D. Krajčiková, J. Hagara, E. Majkova, I. Barák and P. Šiffalovič (2021) Diffraction pattern of *Bacillus subtilis* CotY spore coat protein 2D crystals. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 197: 111425, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111425 (IF = 4.39) (Q1 JCR2019; Q1 SJR2019)
9. Gacek-Matthews A., Chromikova Z., Sulyok M., Lücking G., Barak I., Ehling-Schulz M. (2020) Beyond toxin transport: Novel role of ABC transporter for enzymatic machinery of cereulide NRPS assembly line. *mBio* 11: e01577-20 doi: 10.1128/mBio.01577-20 (IF = 6.78) (Q1 JCR2019; Q1 SJR2019)
10. J. Pospíšil, D. Vítovská, O. Kofroňová, K. Muchová, H. Šanderová, M. Hubálek, M. Šíková, O. Benada, I. Barák, and L. Krásný (2020) Bacterial nanotubes are a manifestation of cell death. *Nature Communications* 11: 4963. doi: 10.1038/s41467-020-18800-2 (IF = 12.12) (Q1 JCR2019; Q1 SJR2019)
11. . Muchová, Z. Chromiková and I. Barák (2020) Linking peptidoglycan synthesis protein complex with asymmetric cell division during *Bacillus subtilis* sporulation. *Int. J. Mol. Science* 21, 4513; doi:10.3390/ijms21124513 (IF = 4.56) (Q1 JCR2019; Q1 SJR2019)
12. Wollman A., Muchová K., Z. Chromiková, A.J. Wilkinson, I. Barák, M. Leake (2020) Single-molecule optical microscopy of protein dynamics and computational analysis of images to determine cell structure development in differentiating *Bacillus subtilis*. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, 1474-1486 (doi: 10.1016/j.csbj.2020.06.005) (IF = 6.02) (Q1 JCR2019; Q1 SJR2019)
13. E. Sobolev, S. Zolotarev, K. Giewekemeyer, J. Bielecki, K. Okamoto, H.K.N. Reddy, J. Andreasson, K. Ayyer, Imrich Barak et al. (2020) Megahertz single-particle imaging at the European XFEL. *Communications Physics – Nature* 3: 97 (DOI: 10.1038/s42005-020-0362-y) (IF = 4.68) (Q1 JCR2019; Q1 SJR2019)
14. D. Tamindžija, Z. Chromikova, A. Spaic, I. Barak, R. Bernier-Latmani, D. Radnovic, (2019) Chromate tolerance and removal of bacterial strains isolated from uncontaminated and chromium-polluted environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35: Art. # 56. (IF = 2.65)
15. I. Barak, K. Muchova, N. Labajova (2019) Asymmetric cell division during *Bacillus subtilis* sporulation. *Future Microbiology* 14: 353-363. (IF = 3.19)

### Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky tohto projektu sú dôležité hlavne pre pochopenie základných bunkových procesov v sporulujúcich baktériách ako *Bacillus subtilis* a *Clostridium difficile*. Pochopenie študovaných bunkových dejov ako bunkové delenie a diferenciácia buniek na molekulárnej úrovni má aj potenciál využitia na prípravu nových liečiv proti patogénym baktériám ako *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile* a ďalšie. Samotný študovaný modelový organizmus, *Bacillus subtilis*, je už v súčasnosti základom systémov na výrobu nových ľahko skladovateľných a použiteľných vakcín a nami študované spórové obalové proteíny majú veľký potenciál využitia v moderných nano-biotechnológiách. V rámci projektu sa nám podarilo pripraviť spóry, ktoré sú potencialnými orálnymi vakcínami proti SARS-CoV-2 a tento prístup by malo byť použiteľný na prípravu nových vakcín aj proti iným patogénom.

### Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Podrobné, molekulárne pochopenie životných procesov v modelovom mikroorganizme *Bacillus subtilis* vyžaduje skúmanie vzťahu štruktúra - funkcia pre všetky proteíny a ich komplexy v bunke. Boli sme úspešní hlavne v dosiahnutí niekoľkých jedinečných výsledkov. Najdôležitejšie bolo, že sme identifikovali väzbových partnerov SpoII<sub>E</sub> a poskytli dôkazy o ich časopriestorovej súhre počas procesu tvorby asymetrického septa. Ukázali sme, že SpoII<sub>E</sub> môže interagovať s negatívnymi regulátormi bunkového delenia, RefZ, MinJ a EzrA. Podrobnejšie analýzy potom odhalili, že membránová časť SpoII<sub>E</sub> je potrebná na jej interakciu s membránovými proteínmi MinJ a EzrA. Predpokladáme, že v sporulujúcich

bunkách *B. subtilis* sa komplex SpoII<sub>E</sub>-RefZ tvorí prechodne, len v čase, keď sa určuje miesto polárneho delenia. Charakterizovali sme časopriestorovú lokalizáciu týchto proteínov počas skorých štádií sporulácie. Pozorovali sme, že RefZ sa ko-lokalizoval so SpoII<sub>E</sub> v polárnom septe, kde RefZ tvoril ohniská prednostne zo strany septa s materskou bunkou. MinJ potom interaguje so SpoII<sub>E</sub> zo strany prespóry a EzrA sa lokalizuje spolu so SpoII<sub>E</sub> v membráne septa. Výber miesta sporulačného septa v presne určenej asymetrickej polohe je nevyhnutný pre diferenciáciu buniek, sporuláciu. Čoskoro po vstupe bunky do sporulácie a predtým, ako sa začne vytvárať sporulačné septum, chromozómy výrazne zmenia svoju morfológiu a vytvoria axiálny filament. Asymetrická prepážka potom rozpolí toto axiálny filament na presnom mieste, aby sa zabezpečilo správne zachytenie chromozómov v prespóre. Keďže RefZ sa špecificky viaže na DNA a ako sme tu ukázali, interaguje so SpoII<sub>E</sub>, navrhli sme model v ktorom prechodný komplex SpoII<sub>E</sub>-RefZ-DNA môže diktovať polohu FtsZ-prstenca na tomto správnom mieste septácie vzhľadom na chromozóm. Predpokladáme, že meracie zariadenie, ktoré bunka používa na nájdenie miesta asymetrického delenia, je samotný nukleoid.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

A detailed, molecular understanding of the life processes in model microorganism *Bacillus subtilis* requires an investigation of the structure - function relationship for all proteins and its complexes in the cell. We were successful by reaching a few unique results in frame of this project. The most crucial was that we identified binding partners of SpoII<sub>E</sub> and provided evidence about their spatio-temporal interplay during the process of asymmetric septum formation. We showed that SpoII<sub>E</sub> can interact with the negative regulators of cell division, RefZ, MinJ, and EzrA. More detailed analyses then revealed that the membrane part of SpoII<sub>E</sub> is required for its interaction with the membrane proteins MinJ and EzrA. We hypothesize that in sporulating *B. subtilis* cells the SpoII<sub>E</sub>-RefZ complex forms transiently, only during the time when the polar division site is being determined. We characterized the spatio-temporal localization of these proteins during the early stages of sporulation. We observed that RefZ co-localized with SpoII<sub>E</sub> at the polar septum, where RefZ formed foci preferentially from the mother cell side of the septum. MinJ then appeared to interact with SpoII<sub>E</sub> from the forespore side and EzrA co-localized with SpoII<sub>E</sub> in the septum membrane. The selection of the sporulation septum site at a precisely determined asymmetric position is essential for cell differentiation, sporulation. Soon after the cell enters sporulation and before the sporulation septum begins to form, the chromosomes significantly change their morphology and form an axial filament. The asymmetric septum then bisects this axial filament at the precise site to ensure correct chromosome trapping in the forespore. As RefZ specifically binds to DNA and, as we showed here, interacts with SpoII<sub>E</sub>, we suggest that the transient SpoII<sub>E</sub>-RefZ-DNA complex may dictate the position of the Z-ring at this proper septation site relative to the chromosome. We hypothesize that the measuring device that is used by the cell to find the asymmetric septum site is the nucleoid itself.