

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tjaša DRČAR

**DOLOČANJE SIGNALNIH MOLEKUL IN VPLIV
SLANOSTI NA NJIHOVO PRODUKCIJO PRI
BAKTERIJI *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tjaša DRČAR

**DOLOČANJE SIGNALNIH MOLEKUL IN VPLIV SLANOSTI NA
NJIHOVO PRODUKCIJO PRI BAKTERIJI *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF SIGNAL MOLECULES AND INFLUENCE OF
SALINITY ON THEIR PRODUCTION IN *Vibrio* sp.**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je dne 20.08.2009 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorico dr. Tjašo Danevčič in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentorica: dr. Tjaša Danevčič

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Predsednik komisije: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Tjaša Danevčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Darja Žgur Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tjaša Drčar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.222:579.266:547-314 (043) = 163.6
KG	<i>Vibrio</i> sp./signaliziranje pri mikroorganizmih/signalne molekule/acilhomoserin laktoni/sporazumevanje med bakterijami/slanost gojišča
AV	DRČAR, Tjaša
SA	STOPAR, David (mentor) / DANEVČIČ, Tjaša (somentorica) / ŽGUR BERTOK Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	DOLOČANJE SIGNALNIH MOLEKUL IN VPLIV SLANOSTI NA NJIHOVO PRODUKCIJO PRI BAKTERIJI <i>Vibrio</i> sp.
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 52 str., 1 pregl., 19 sl., 3. pril., 74 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Signalne molekule AHL so splošno razširjene med po Gramu negativnimi bakterijami. V diplomskem delu smo preučevali signaliziranje pri bakteriji <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki sintetizira prodigioninom podoben rdeč pigment. Signalne molekule smo ekstrahirali iz izrabljenega gojišča (IG) PKS kulture divjega seva <i>Vibrio</i> sp. s kislim etil acetatom. Tip signalnih molekul, ki jih producira <i>Vibrio</i> sp., smo določili z difuzijsko metodo v jamicah, pravokotnim nacepljanjem na plošče in tankoplastno kromatografijo z uporabo poročevalskih sevov (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 (pDCI41E33), <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026, <i>Escherichia coli</i> JM109 (pSB401)) in mutante R. Vpliv slanosti na produkcijo signalnih molekul pri <i>Vibrio</i> sp. smo ugotavljali z določanjem vpliva IG PKS različnih slanosti na produkcijo rdečega pigmenta pri mutanti R ter s tankoplastno kromatografijo s poročevalskima sevoma mutanto R in <i>E. coli</i> . Odziv mutante R smo merili s pomočjo določanja količine nastalega pigmenta. Ugotovili smo, da je sinteza rdečega pigmenta pri <i>Vibrio</i> sp. regulirana s sistemom zaznavanja celične gostote najverjetneje odvisnim od molekul AHL ter da bi lahko bil tip molekul AHL C6-HSL. Detekcija signalnih molekul je odvisna od občutljivosti detekcijske metode ter od občutljivosti in specifičnosti poročevalskega seva. Producija signalnih molekul je odvisna od slanosti in je najvišja pri 3 % slanosti, kjer je rast <i>Vibrio</i> sp. optimalna, medtem ko je močno zmanjšana pri ekstremnih slanostih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.222:579.266:547-314 (043) = 163.6
CX	<i>Vibrio</i> sp./cell-cell signaling in microorganisms/signal molecules/acylhomoserine lactone/communication in bacteria/salinity of medium
AU	DRČAR, Tjaša
AA	STOPAR, David (supervisor) / DANEVČIČ, Tjaša (co-advisor) / ŽGUR BERTOK Darja (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2010
TI	DETECTION OF SIGNAL MOLECULES AND INFLUENCE OF SALINITY ON THEIR PRODUCTION IN <i>Vibrio</i> sp.
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 52 p., 1 tab., 19 fig., 3. app., 74 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Gram-negative bacteria synthesize signal molecules named AHL for bacterial cell-cell communication. We studied quorum sensing mechanisms in <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 that produces prodiginine like pigment. Signal molecules were extracted with acidified ethyl acetate from culture supernatants of wild strain <i>Vibrio</i> sp. that were grown in PKS medium. Three methods were used to screen for AHL production (well-diffusion assay, T-sryke test and thin layer chromatography) and three different monitor strains were used (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 (pDCI41E33), <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026, <i>Escherichia coli</i> JM109 (pSB401)) and unpigmented mutant of <i>Vibrio</i> sp. We established the impact of salinity on the production of signal molecules in wild type <i>Vibrio</i> sp. by determining the effect of spent medium PKS of various salinity on the production of red pigment in the mutant R and by thin layer chromatography with two reporters (mutant R and <i>E. coli</i>). We measured response of mutant R through the determination of the resulting pigment. The results showed that the synthesis of red pigment in <i>Vibrio</i> sp. is regulated by the AHL quorum sensing system adding that the type could be molecule C6-HSL. Detection of signaling molecules is highly dependent on the sensitivity of the detection method and the sensitivity and specificity of reporter strains. We determined that the production of signaling molecules depends on the salinity and is major at 3 % (w/v) salinity, where growth of <i>Vibrio</i> sp. is optimal, while the production of signaling molecules is greatly reduced at extreme salinity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI

1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 ACILHOMOSERIN LAKTONI	3
2.1.1 Struktura in sinteza N-acil homoserin laktonov (AHL).....	4
2.1.2 Odkrivanje molekul AHL	6
2.1.2.1 Biosenzorski sistemi	6
2.2 AI-2 SIGNALNE MOLEKULE.....	8
2.2.1 Zaznavanje celične gostote pri vibrijih	9
2.3 DRUGI TIPI SIGNALNIH MOLEKUL PRI PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJAH.....	10
2.4 BIOSINTEZA IN REGULACIJA BIOSINTEZE PRODIGIOZINA	12
2.5 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL.....	14
2.6 NARAVNI RDEČE OBARVAN IZOLAT <i>VIBRIO</i> SP.....	15
3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Kemikalije.....	17
3.1.2 Gojišča	18
3.1.3 Bakterijski sevi.....	19
3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR	19
3.2.1 Gojenje bakterije <i>Vibrio</i> sp. za pripravo IG pri različnih slanostih ter za pridobivanje ekstraktov signalnih molekul različnih slanosti.....	19
3.2.2 Gojenje poročevalskih sevov za določanje tipa signalnih molekul, ki jih producira <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 z difuzijsko metodo v jamicah (well-diffusion) in tankoplastno kromatografijo (TLC)	19
3.3 IZOLACIJA SIGNALNIH MOLEKUL IN PRIPRAVA STANDARDOV	20

3.4 DOLOČANJE TIPA SIGNALNIH MOLEKUL, KI JIH SINTETIZIRA <i>VIBRIO</i> SP.	
DSM14379.....	21
3.4.1 Pravokotno nacepljanje na plošče	21
3.4.2 Difuzijska metoda v jamicah	21
3.4.3 Tankoplastna kromatografija	22
3.5 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL	23
3.5.1 Vpliv IG PKS različnih slanosti na produkcijo rdečega pigmenta pri rožnati mutantni divjega seva <i>Vibrio</i> sp.....	23
3.5.1.1 Ekstrakcija pigmenta.....	24
3.5.1.2 Določanje biomase	24
3.5.1.3 Določanje koncentracije pigmenta.....	25
4 REZULTATI.....	26
4.1 DOLOČANJE TIPA SIGNALNIH MOLEKUL, KI JIH PRODUCIRA <i>VIBRIO</i> SP.	
DSM14379.....	26
4.1.1 Preverjanje ustreznosti poročevalskih organizmov in prisotnosti signalnih molekul tipa AHL	26
4.1.2 Določanje tipa signalnih molekul	31
4.2 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL	33
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	39
5.1 DOLOČANJE SIGNALNIH MOLEKUL	39
5.2 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL	41
5.3 SKLEPI.....	43
6 POVZETEK	44
7 VIRI.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema biosinteze molekul AHL (Gera in Srivastava, 2006: 672).	5
Slika 2: Poročevalski plazmid pSB401, s fuzijo <i>luxRl::luxCDABE</i> (Winson in sod., 1998a: 188).	7
Slika 3: Strukture molekul AHL, ki odgovarjajo na poročevalski sev, ki ima okvarjene gene za bioluminiscenco (Winson in sod., 1998a: 187).	8
Slika 4: Shema zaznavanja celične gostote pri bakterijah <i>Vibrio harveyi</i> (levo) in <i>Vibrio cholerae</i> (desno) (Henke in Bassler, 2004: 6903).	10
Slika 5: Shematski prikaz uravnavanja biosinteze prodigiozina pri bakterijah <i>Serratia</i> sp. ATCC 39006 in <i>Serratia marcescens</i> ATCC 274 (Williamson in sod., 2006: 894).	14
Slika 6: Shematski prikaz načina nacepljanja divjega seva bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (wt) in poročevalskega seva (mutanta R, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> in <i>Escherichia coli</i>) za ugotavljanje tipa komunikacijskih oziroma signalnih molekul.	21
Slika 7: Plošča PKS 3 % NaCl z divjim sevom <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 nacepljenim pravokotno na poročevalski sev mutanto R, inkubirana 48 ur pri 28 °C.	26
Slika 8: Plošča LB z divjim sevom <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 nacepljenim pravokotno (ravne črte) na poročevalski sev bakterije <i>E. coli</i> JM109 (levo) in plošča PKS 3 % NaCl z divjim sevom <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 nacepljenim pravokotno na poročevalski sev bakterije <i>E. coli</i> JM109 (desno), inkubirani 24 ur pri 37°C.	27
Slika 9: Plošče s poročevalskim sevom <i>C. violaceum</i> CV026 v agariziranem gojišču LB s kanamicinom in dodatkom 50 µL 10 mM sintetičnih molekul AHL v luknjice inkubirane 24 ur pri 28 °C.	28
Slika 10: Plošče s poročevalskim sevom bakterije <i>E. coli</i> JM109 v agariziranem gojišču LB s kanamicinom in dodatkom 15 µL sintetičnih molekul AHL v luknjice (3-okso-C8-HSL, C6-HSL, C14-HSL, 3-okso-C6-HSL in 3-okso-C10-HSL) s časom zajemanja slike 80 sekund in 3 minute za C14-HSL, inkubirane 24 ur pri 37 °C.	29
Slika 11: Plošči s poročevalskim sevom mutanto R v agariziranem gojišču PKS 3 % NaCl z dodatkom 100 µL 100 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul resuspendiranega v DMSO (levo) ali 96 % etanol (desno), inkubirani 24 ur pri 28 °C.	30
Slika 12: Plošča s poročevalsko bakterijo <i>E. coli</i> JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom in dodatkom 100 µL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul raztopljenega v 96 % etanolu, s časom zajemanja slike 10 minut, inkubirana 24 ur pri 37 °C.	31

Slika 13: Plošča TLC z nanešenimi 5µL standardov C6-HSL in 3-okso-C10-HSL (10mM) ter 100 µL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul (EK) iz IG divjega seva <i>Vibrio</i> sp. pridobljenega iz PKS 3 % NaCl, preleta s poročevalsko bakterijo <i>E. coli</i> JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 15 minut, inkubirana 24 ur (a) in 48 ur (b) na 37 °C.....	32
Slika 14: Plošča TLC z nanešenim 100 µL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul ekstrahiranega iz IG divjega seva <i>Vibrio</i> sp. pridobljenega iz PKS 3 % NaCl, preleta s poročevalskim sevom mutante R v agariziranem gojišču PKS 3 % NaCl, inkubirana 48 ur na 28 °C.....	33
Slika 15: Plošča TLC z nanešenimi 100 µL 200 x koncentriranih ekstraktov signalnih molekul ekstrahiranih iz IG divjega seva <i>Vibrio</i> sp. pridobljenih iz PKS 0,5 %, 3 %, 5 % in 10 % (w/V) NaCl, preleta s poročevalskim sevom mutante R v agariziranem gojišču PKS 3 % NaCl, inkubirana 48 ur na 28 °C.....	34
Slika 16: Plošča TLC z nanešenimi 100 µL 200 x koncentriranih ekstraktov signalnih molekul ekstrahiranih iz IG divjega seva <i>Vibrio</i> sp. pridobljenih iz PKS 0,5 %, 3 %, 5 % in 10 % NaCl, preleta s poročevalskim sevom bakterije <i>E. coli</i> JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 30 minut, inkubirana 24 ur na 37 °C.....	35
Slika 17: Plošča TLC z nanešenimi 2 µL standardov C6-HSL in 3-okso-C10-HSL (10 mM) ter 100 µL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul iz IG divjega seva <i>Vibrio</i> sp. pridobljenega iz gojišča PKS 5 % NaCl, preleta s poročevalskim sevom bakterije <i>E. coli</i> JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 15 minut, inkubirana 24 ur na 37 °C.....	36
Slika 18: Količina pigmenta v celicah rožnate mutante divjega seva <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle v gojišču PKS z dodatkom 50 % (V/V) IG divjega seva <i>Vibrio</i> sp. pridobljenega iz PKS različnih slanosti pri 28 °C.....	37
Slika 19: Količina pigmenta v celicah rožnate mutante divjega seva <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle v gojišču PKS 5 % NaCl z dodatkom različnih količin IG divjega seva <i>Vibrio</i> sp. pridobljenega iz PKS 5 % NaCl pri 28 °C	38

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bakterijski sevi in plazmidi uporabljeni v diplomskem delu 19

KAZALO PRILOG

Priloga A: Plošča TLC z nanešenimi 5 µL standardov molekul AHL (10 mM), preleta s poročevalskim sevom bakterije <i>E. coli</i> JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 3 minute, inkubirana 24 ur na 37 °C.....	54
Priloga B: OD ₆₅₀ kultur divjega seva <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle v gojišču PKS različnih slanosti pri 28 °C, 24 ur.	54
Priloga C: p vrednosti pridobljene s T testom za dva neodvisna vzorca izračunane z Microsoft Excel orodjem za analizo.	55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AHL	N-acil-L-homoserin laktoni
acil-ACP	protein prenašalec acilne skupine
AI-2	avtoinduktor-2 (metil-2,3,3,4-tetrahidroksitetrahidrofuran)
CAI-1	od CqsA odvisna avtoinduktorska molekula
C4-HSL	N-butanoil homoserin laktona
C6-HSL	heksanoil-DL-homoserin lakton
C14-HSL	N-tetradekanoil-DL-homoserin lakton
DKP	diketopiperazini (tip signalnih molekul pri nekaterih po Gramu negativnih bakterijah)
DMSO	dimetilsulfoksid
DSM	Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutchland
GC	plinska kromatografija
HAI-1	Harveyi avtoinduktorska molekula -1
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
IG	izrabljeno gojišče
IR	infrardeča spektroskopija
<i>luxCDABE</i>	genska skupina, ki ima zapis za bioluminiscenco
LuxIM	homologa LuxIR
LuxIR	sodelujeta pri bioluminiscenci, <i>luxI</i> kot induktor, <i>luxR</i> kot odzivni regulator
LuxS	sintaza AI-2
MS	masna spektroskopija
MTA	metil tioadenozin
mutanta R	rahlo rožnata mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379
NaCl	natrijev klorid
NMR	jedrska magnetna resonanca
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
SAM	S-adenozil metioninom
<i>smaIR</i>	homologa <i>luxIR</i>
TLC	tankoplastna kromatografija
V/V %	volumsko - volumski odstotki
w/V %	utežno - volumski odstotki
wt	divji sev
QS	zaznavanje celične gostote
3-okso-C6-HSL	3-okso-heksanoil-L-homoserin lakton
3-okso-C8-HSL	3-okso-oktanoil-DL-homoserin lakton
3-okso-C10-HSL	3-okso-dekanoil-L-homoserin lakton

1 UVOD

Včasih je veljalo, da bakterije delujejo neodvisno druga od druge, vendar je sedaj znano, da so sposobne medsebojnih interakcij in sporazumevanja (Keller in Surette, 2006). Mikroorganizmi so ves čas pod vplivom okoljskih dejavnikov kot so temperatura, osmolarost, pH in dostopnost hrani. Bakterije so kot odgovor na te razmere razvile različne mehanizme, ki omogočajo prilagoditev na okoljske spremembe (Whitehead in sod., 2001). Proizvajajo številne sekundarne metabolite in odgovarjajo na širok spekter kemijskih spojin iz okolja (Keller in Surette, 2006). Interakcije znotraj bakterijske vrste in med vrstami so pomembne za razvoj združbe. Do izmenjave signalnih molekul lahko pride med organizmoma, ki prepoznavata enake ali sorodne signalne molekule. Bakterije so sposobne »prisluškovanja«, sporazumevanja med drugimi organizmi, tako da prepozna signalne molekule, ki jih same ne sintetizirajo ter tako uravnava svoj odgovor (Ryan in Dow, 2008). Medcelično sporazumevanje, kjer sodelujejo majhne signalne molekule, je prvič omenil kot termin zaznavanja celične gostote (quorum sensing - QS) Fuqua s sodelavci (1994). Ta opisuje specifično obliko medceličnega sporazumevanja, pri katerem je izražanje genov odvisno od celične gostote po tem, ko je bila dosežena kritična koncentracija signalnih molekul (t.i. avtoinduktorjev) (Winzer in sod., 2002). Avtoinduktorji, ki jih proizvajajo različne bakterije, se med sabo strukturno razlikujejo (Ryan in Dow, 2008) in so še v veliki meri neraziskani, vendar njihova zbirka hitro narašča (Keller in Surette, 2006).

Sistem signaliziranja pri po Gramu negativnih bakterijah temelji na N-acil-L-homoserin laktoneh (AHL). Prvič so sporazumevanje z molekulami AHL opisali pri bakteriji *Vibrio fischeri* (Nealson in sod., 1970). Po Gramu pozitivne bakterije ne proizvajajo molekul AHL, ampak proizvajajo aminokisline ali modificirane peptide (Ryan in Dow, 2008). Izjema je filamentozna bakterija *Streptomyces*, ki za sintezo antibiotika uporablja acilirane laktone (γ -butirolaktone) kot signalne molekule (Gera in Srivastava, 2006). Tako po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije uporabljajo izomere metil-2,3,3,4-tetrahidroksitetrahidrofurana (avtoinduktor-2 (AI-2)) (Ryan in Dow, 2008). Splošno uporabljene metode za analizo tipov laktonskih molekul QS so bioanaliza, tankoplastna kromatografija (TLC), plinska kromatografija (GC), visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC) in označevanje z izotopi (Yang in sod., 2006).

QS nadzoruje številne fiziološke procese kot so sinteza antibiotikov, razvoj biofilmov, kompetenca, celična diferenciacija, bioluminiscenca, rast, produkcija številnih zunajceličnih encimov razgradnje, prenos konjugativnega plazmida, izražanje virulentnih genov in produkcija pigmenta (Smith in sod., 2004; Pinto in sod., 2007). Pri nekaterih vrstah bakterije *Serratia* nadzoruje QS sistem produkcijo rdečega pigmenta 2-metil-3-pentil-6-metoksiprodigiozina (Whitehead in sod., 2001).

1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 je bila izolirana iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka (Stopar in sod., 2004) in proizvaja rdeč pigment, ki spada v družino prodigininom podobnih molekul, katerega sinteza je uravnana z zaznavanjem celične gostote (Štraser, 2008). V splošnem je pri po Gramu negativnih bakterijah zaznavanje celične gostote posredovano z N-acil-homoserin laktoni (Medina-Martínez in sod., 2006), zato smo sklepali na tak tip signalnih molekul pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379. Na zaznavanje celične gostote in produkcijo signalnih molekul imajo velik vpliv dejavniki iz okolja v katerem je prisotna bakterijska združba (Horswill in sod., 2007). Pri bakteriji *Vibrio* sp. je produkcija pigmenta odvisna od koncentracije soli (Starič, 2007), zato smo za določitev vpliva okoljskih dejavnikov na produkcijo signalnih molekul izbrali slanost.

Namen diplomskega dela je določiti tip signalnih molekul in vpliv slanosti na njihovo produkcijo pri bakteriji *Vibrio* sp.. V ta namen bomo:

- izolirali in identificirali signalne molekule divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 s pomočjo ustreznih poročevalskih sevov za detekcijo signalnih molekul AHL
- določili vpliv okoljskih dejavnikov (slanosti) na produkcijo signalnih molekul
- določili vpliv dodatka izrabljenega gojišča pridobljenega iz gojišča PKS 5 % (w/V) NaCl nepigmentirani mutanti divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 preko produkcije rdečega pigmenta

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- sinteza pigmenta je pri *Vibrio* sp. DSM14379 regulirana z mehanizmom zaznavanja celične gostote, ki temelji na molekulah AHL
- produkcija signalnih molekul je najvišja pri 3 % slanosti, kjer je rast *Vibrio* sp. optimalna
- dodatek izrabljenega gojišča pridobljenega iz gojišča PKS 5 % (w/V) NaCl nepigmentirani mutanti divjega seva *Vibrio* sp. zviša produkcijo pigmenta

2 PREGLED OBJAV

Bakterije sproščajo v okolje različne majhne molekule kot so sekundarni metaboliti (antibiotiki in siderofori), končne produkte metabolizma in signalne molekule, ki delujejo kot feromoni in jih včasih imenujejo avtoinduktorji. To so molekule, ki spodbudijo svojo lastno sintezo (Williams in sod., 2007).

Winzer in sodelavci (2002) so pojem medcelična signalna molekula (cell-to-cell signal molecule-CCSM) namenili za majhne difuzne molekule, ki sodelujejo pri medceličnem sporazumevanju ter predlagali štiri kriterije, ki definirajo signalne molekule vpletene v sporazumevanje znotraj vrste. Ti kriteriji so:

- sproščanje signalnih molekul:
 - med specifičnimi fazami rasti
 - pri določenih fizioloških pogojih
 - odgovor na spremembe okolja
- zaznavanje:
 - signalne molekule se kopijo izvencelično
 - prepozna jih specifični receptor
- celična občutljivost:
 - ko je dosežena kritična koncentracija signala, se sproži odgovor
- potreben je usklajen odgovor celic, ki ni vezan na detoksifikacijo izbrane substance ali na njen transport in metabolizem

Molekula je kvalificirana kot QS signalna molekula le, če so izpolnjeni vsi štirje zgoraj navedeni kriteriji, v večini primerov so izpolnjeni prvi trije (Williams in sod., 2007). Prav zadnji kriterij definira medcelično signaliziranje kot fenomen, ki je povezan z več kot le prisotnostjo toksične ali hranilne molekule (Winzer in sod., 2002).

Whitehead in sodelavci (2001) so signalne molekule razdelili v dva večja razreda:

- aminokisline in kratki peptidi (Gram pozitivne bakterije)
- derivati maščobnih kislin (Gram negativne bakterije)

2.1 ACILHOMOSERIN LAKTONI

Dolgo je veljalo, da so molekule AHL povezane izključno z uravnavanjem bioluminiscence v nekaterih morskih vibrijih kot je simbiont *Vibrio (Photobacterium) fischeri*. Po odkritju, da bakterija *Erwinia carotovora* proizvaja 3-okso-heksanoil-homoserin lakton (3-okso-C6-HSL), so predlagali splošno razširjenost molekul AHL med po Gramu negativnimi bakterijami

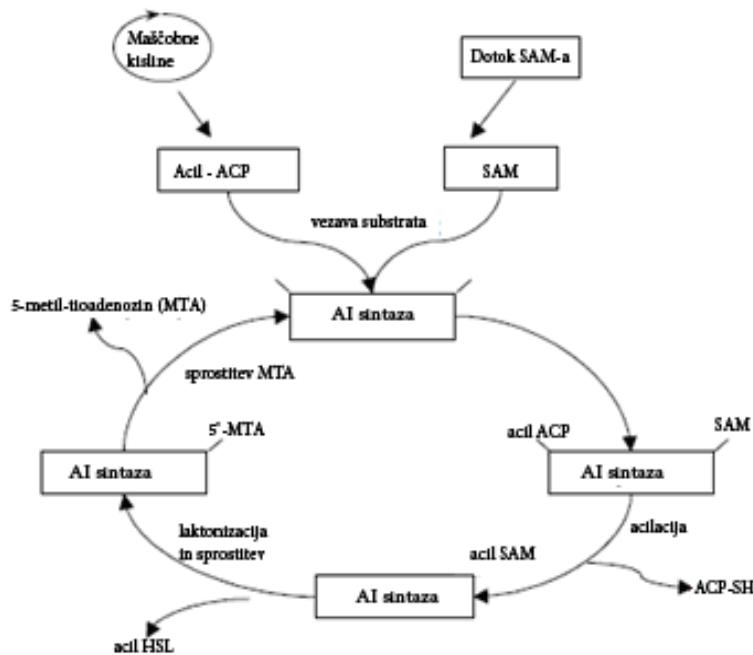
(Holden in sod., 2007). To so najbolj proučevana družina zunajceličnih signalnih molekul (Holden in sod., 2007). Delujejo v mikro- in nanomolarnih koncentracijah. Zadnje čase so še posebej zanimivi analogi laktonov, saj se le-ti lahko uporablajo za izdelavo tarč za zdravila s čimer bi nadzorovali medcelično sporazumevanje in potencialne antibakterijske agense (Yang in sod., 2006). Bakterijski LuxR proteini prepoznavajo tudi netipične signalne molekule, kar je v nekaterih nišah dober mehanizem uravnavanja izražanja genov populacije.

AHL producirajoči mikroorganizmi lahko tudi živijo v simbiozi z višjimi organizmi ali parazitirajo višje organizme. Tako so višji organizmi razvili mehanizme zaznavanja AHL in mehanizme odziva na te signalne molekule. Na ta način preprečijo ali omejijo okužbo (Gera in Srivastava, 2006).

2.1.1 Struktura in sinteza N-acil homoserin laktonov (AHL)

Glavni del molekule AHL je homoserinlaktonski obroč, ki je nesubstituiran na β - in γ - mestu, na α - mestu pa je povezan z verigo maščobne kisline, ki variira v dolžini, nasičenosti in oksidacijskem stanju (Williams in sod., 2007). Acilne verige imajo običajno soda števila ogljikovih (C) atomov (C4-C18), določili so tudi že molekule AHL s C5 in C7 acilnimi verigami (Lithgow in sod., 2000; Horng in sod., 2002; Williams in sod., 2007). Dolžina in substitucija acilne stranske verige določata specifičnost signalne molekule (Greenberg, 1979). Na tretjem ogljikovem atomu imajo molekule AHL acilno, karbonilno skupino ali so brez substitucije, lahko so nasičene ali imajo eno dvojno vez med ogljikoma (Gera in Srivastava, 2006).

Molekule AHL so intermediati poti biosinteze metionin-lizin-treonina (Slika 1) (Gera in Srivastava, 2006). Njihova sinteza poteka iz celičnih prekurzorjev s pomočjo sintaze I (AI sintaze). Z vezavo na aktivator transkripcije R inducirajo izražanje različnih tarčnih genov (Gram in sod., 1999). Sinteza molekul AHL vključuje reakcijo med S-adenozil metioninom (SAM) in proteinom prenašalcem acilne skupine (acil-ACP) (Keller in Surette, 2006). Acil-ACP nastaja kot intermediat v biosintezi maščobnih kislin. Protein LuxI poveže z amidno vezjo acilno stransko verigo acil-ACP in amino skupino homocisteinskega dela SAM. Laktonizacija intermediata in sprostitev metil tioadenozina (MTA) privede do tvorbe molekule AHL (Gera in Srivastava, 2006). Različni encimi LuxI uporabljajo različne acil-ACP osnove, kar vodi do produkcije različnih kemijskih struktur molekul AHL (Keller in Surette, 2006). Specifičnost vezave homologa proteina LuxI z ustreznim acil-ACP je zapisana v stranski acilni verigi acil-ACP. Homologen protein LuxI lahko proizvede le en tip avtoinduktorja, kljub temu je znanih nekaj primerov, kjer lahko le-ta proizvede tudi več različnih tipov molekul AHL (Gera in Srivastava, 2006).



Slika 1: Shema biosinteze molekul AHL (Gera in Srivastava, 2006: 672). SAM je S-adenozil metionin; acil-ACP je protein prenašalec acilne skupine; MTA je metil tioadenozin.

Sinteza molekul AHL predstavlja za celico srednji vložek energije. Protein LuxI proizvede eno predominantno AHL in eno ali več molekul AHL v manjših koncentracijah, kar je odvisno od bakterijskega seva. Različni proteini LuxR prepoznavajo različne molekule AHL ter lahko zaznajo različno število variant (Keller in Surette, 2006). Čeprav je protein R najučinkoviteje aktiviran s svojim avtoinduktorjem, kažejo aktivnost v mnogo večjih koncentracijah razni analogi, ki se razlikujejo v dolžini verige in naravi substitucije na 3 ogljikovem atomu (Shaw in sod., 1997).

Število po Gramu negativnih bakterij, ki imajo gena podobna *luxR* ali *luxI*, narašča. Podobnost sekvenč homolognih genov genoma *luxR* in *luxI* je precej nizka, za protein LuxR 18-25 %, za protein LuxI 28-35 % (Gera in Srivastava, 2006).

Biosinteza molekul AHL poteka, poleg homologov LuxI, s pomočjo družine sintaz AHL LuxM, ki je bila odkrita pri bakteriji *Vibrio harveyi* (Bassler in sod., 1993; Williams in sod., 2007). V nekaterih vibrijih sta hkrati prisotna homologa LuxI in LuxM (Williams in sod., 2007). Laue in sodelavci (2000) so odkrili tretjo potencialno družino sintaz AHL (HdtS).

Bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella* in *Klebsiella* nimajo sintaze AHL, imajo homolog proteina LuxR (SdiA), ki se oziva na 3-okso-C6-HSL, C6-HSL in 3-okso-C8-HSL, ki jih proizvajajo druge bakterije (Ahmer, 2004). Nekatere bakterije, ki si filogenetsko niso sorodne, tvorijo iste tipe molekul AHL, medtem ko tvorijo druge bakterije več različnih tipov molekul AHL (Gera in Srivastava, 2006).

2.1.2 Odkrivanje molekul AHL

Bakterije proizvajajo nizke koncentracije signalnih molekul, zato jih z običajnimi metodami težko zaznamo (Brelles-Mariño in Bedmar, 2001). Obstajajo različne analitske metode in poročevalski sevi, ki omogočajo učinkovito detekcijo, karakterizacijo in kvantifikacijo mikrobnih molekul AHL (Gera in Srivastava, 2006).

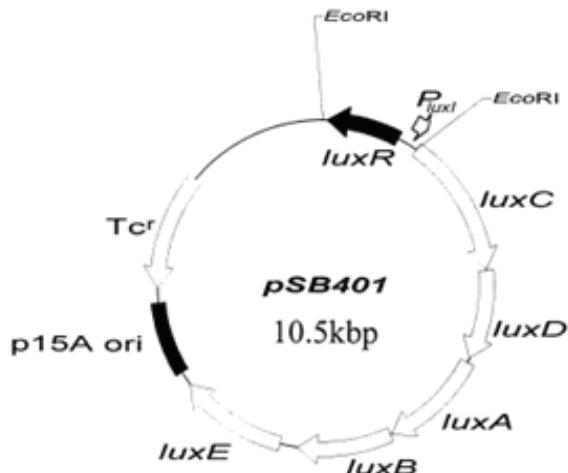
Najbolj občutljiva metoda je bioanaliza, njena detekcija seže do femtomola, vendar pa zahteva po meri narejene seve in plazmide za vsako posamezno molekulo ter zahteva vsaj 24 ur časa za detekcijo (Yang in sod., 2006). Tako lahko molekule AHL identificiramo s pomočjo metode TLC, na osnovi ločevanja bakterijskih ekstraktov in po razvitju prelitja TLC plošče z agariziranim gojiščem s poročevalskim organizmom (McClean in sod., 1997). Metoda TLC ima majhno občutljivost in je dobra metoda le, če imamo na voljo visoke koncentracije signalnih molekul. GC in HPLC sta najbolj uporabljeni metodi in jih lahko uporabimo za številne tarče, vendar nista enostavni in dovolj hitri metodi (Yang in sod., 2006). Uporabna orodja za določanje molekul AHL so tudi masna spektroskopija (MS), jedrska magnetna resonanca (NMR) in infrardeča spektroskopija (IR) (Brelles-Mariño in Bedmar, 2001). Za določanje molekul AHL in študijo kinetike produkcije molekul AHL sta prav tako uporabni preprosti metodi kot sta difuzijska metoda v jamicah in pravokotno/vzporedno nacepljanje na plošče (Ravn in sod., 2001).

2.1.2.1 Biosenzorski sistemi

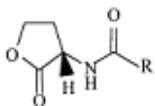
Detekcija molekul AHL poteka s pomočjo biosenzorskih organizmov in njihovih fenotipskih odgovorov kot so bioluminiscenca, produkcija violaceina in β -galaktozidazna aktivnost (Ravn in sod., 2001). Zaradi neujemanja v nukleotidnih sekvenkah med homologi *luxI* in *luxR* različnih bakterijskih vrst, je postala identifikacija teh genov pri različnih bakterijah z metodama DNK hibridizacije in PCR omejena (Winson in sod., 1998a). Biosenzorska tehnologija se je izkazala za izredno učinkovito metodo identifikacije homologov LuxI (Winson in sod., 1998b). Poročevalski sev vsebuje nek poročevalski gen, ki je odgovoren za specifičen odziv na signalne molekule ter nima sintaz AHL (Gera in Srivastava, 2006). Izražanje poročevalskega gena je možno le ob prisotnosti oksigenirane molekule AHL (Pinto in sod., 2007). V ta namen se uporablajo različni poročevalski geni kot so *lacZ*, *gfp*, *lux* in geni za produkcijo pigmenta (Gera in Srivastava, 2006). Zaradi baktericidnega ali bakteristatičnega delovanja nekaterih snovi, ki jih proizvaja proučevani mikroorganizem, se občasno pojavijo lažno negativni rezultati (Winson in sod., 1998a). Temu problemu se najlažje izognemo z ekstrakcijo molekul AHL iz izrabljenega gojišča (IG) z uporabo organskih topil (Gera in Srivastava, 2006). Ločevanje IG od organskega topila (diklorometan, etil acetat) z molekulami AHL deluje na osnovi masnih razlik in polarnosti (Gera in Srivastava, 2006). S transformacijo tarčnega organizma s poročevalskimi plazmidmi so lahko odpravili protimikrobnou aktivnost (Eberl in sod., 1996; Gera in Srivastava, 2006). En sam

biosenzorski sistem ne more detektirati vseh AHL pozitivnih sevov v populaciji (Ravn in sod., 2001).

Engebrecht in sodelavci so leta 1983 klonirali 9-kb fragment DNK, ki ima zapis za avtoinduktorski gen za luminiscenco, v heterolognega gostitelja bakterijo *Escherichia coli*. Genska skupina, ki ima zapis za bioluminiscenco, je sestavljena iz osmih genov *lux* in sicer *luxA-E*, *luxG*, *luxI* in *luxR* (Gera in Srivastava, 2006). Winson in sodelavci so leta 1998a pripravili poročevalski plazmidni vektor pSB401 s fuzijo poročevalskih genov *luxRI'* iz *Vibrio fischeri* in *luxCDABE* iz *Photobacterium luminescens* ter ga transformirali v *E. coli* (Slika 2). Ta poročevalski plazmid ima gen za receptor molekule AHL, ki se ob dodatku ustreznih molekul AHL, veže s sorodnim promotorjem *luxI* ter sproži prepis genske kasete *luxCDABE* ter posledično sproži luminiscenco, katere intenziteta je sorazmerna s koncentracijo prisotnih molekul AHL (Brelles-Mariño in Bedmar, 2001). Izražanje genov *luxCDABE* aktivirajo molekule AHL z dolžino verig od 6 do 8 C atomov z ali brez 3-okso substitucije (Slika 2) (Winson in sod., 1998a). *E. coli*, s plazmidom pSB401 je najbolj občutljiva na signalne molekule tipa 3-okso-C6-HSL (v nanomolarnih koncentracijah), ki je naravni induktor (Brelles-Mariño in Bedmar, 2001). Konstrukt pSB401 deluje pri 37 °C in ne potrebuje dodatka oksogenega aldehida (Holden in sod., 1999).



Slika 2: Poročevalski plazmid pSB401, s fuzijo *luxRI'*::*luxCDABE* (Winson in sod., 1998a: 188).



R	Kemijsko ime	Okrajšava
CH ₃ CH ₂ CH ₂	N-butanoil - L - homoserin lakton	BHL
CH ₃ (CH ₂) ₄	N-heksanoil - L - homoserin lakton	HHL
CH ₃ (CH ₂) ₆	N-oktanoil - L - homoserin lakton	OHL
CH ₃ (CH ₂) ₈	N-dekanoil - L - homoserin lakton	DHL
CH ₃ (CH ₂) ₁₀	N-dodekanoil - L - homoserin lakton	dDHL
CH ₃ COCH ₃	N-3-(oksobutanoil) - L - homoserin lakton	OBHL
CH ₃ (CH ₂) ₂ COCH ₃	N-3-(oksoheksanoil) - L - homoserin lakton	OHHL
CH ₃ (CH ₂) ₄ COCH ₃	N-3-(oksooktanoil) - L - homoserin lakton	OOHL
CH ₃ (CH ₂) ₆ COCH ₃	N-3-(oksodekanoil) - L - homoserin lekton	ODHL
CH ₃ (CH ₂) ₈ COCH ₃	N-3-(oksoododekanoil) L - homoserin lekton	OJDHL
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COCH ₃	N-3-(oktotetradekanoil) - L - homoserin lakton	OJDHL

Slika 3: Strukture molekul AHL, ki odgovarjajo na poročevalski sev, ki ima okvarjene gene za bioluminiscenco (Winson in sod., 1998a: 187).

Poročevalski sev *Agrobacterium tumefaciens* (pDCI41E33) ima fuzijo gena *lacZ* s *traG*, ki ga uravnava homolog LuxR imenovan TraR (Brelles-Mariño in Bedmar, 2001). Ta sev ne proizvaja svojih lastnih signalnih molekul, ampak poročevalsko gensko fuzijo *traG::lacZ* aktivirajo 3-okso AHL, kar povzroči izražanje β-galaktozidaze, ki hidrolizira v agarizirano gojišče dodan X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-β-D-galaktopiranozida). Posledica hidrolize X-gal je vidna kot modre lise na plošči TLC ali modre kolonije na Petrijevi plošči (Shaw in sod., 1997). Vektor pDCI41E33 omogoča najširšo detekcijo molekul AHL treh različnih razredov (nesubstituirane, 3-okso in 3-hidroksi derivate) (Cha in sod., 1998) in ni zmožen detekcije N-butanoil-homoserin laktona (C4-HSL) niti pri visokih koncentracijah (Shaw in sod., 1997).

Poročevalski sev *Chromobacterium violaceum* CV026 je mini Tn5 mutanta divjega seva *C. violaceum* ATCC 31532, ki ne tvori pigmenta violaceina (Brelles-Mariño in Bedmar, 2001). Homolog LuxR, CviR, iz *C. violaceum* je občutljiv na nesubstituirane molekule AHL z verigami od 4 do 8 C atomov (naravni ligand CviR je C6-HSL, ki je najbolj učinkovit pri aktivaciji produkcije violaceina) in je prav tako sposoben detekcije dolgoverižnih molekul AHL (C10 do C14), zaradi njihove sposobnosti, da inaktivirajo produkcijo violaceina, če je v medij dodana neka molekula AHL (3-okso-C6-HSL ali C6-HSL), ki aktivira produkcijo violaceina (McClean in sod., 1997).

2.2 AI-2 SIGNALNE MOLEKULE

Signaliziranje z molekulami AI-2 je trenutno edini poznan sistem, ki je zastopan tako pri po Gramu negativnih kot pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Williams in sod., 2007). Modelni organizem je *Vibrio harveyi*, pri katerem sistem AI-2 uravnava bioluminiscenco (Bassler in

sod., 1997). Molekula AI-2 v bakteriji *Vibrio harveyi* izpolnjuje vse štiri kriterije definicije CCSM. Izloča se med logaritemsko fazo rasti, skladišči se izvencelično ter sproži indukcijo bioluminiscence preko specifičnih signalnih transdukcijskih kaskad. Vendar je o fenotipih uravnanih z molekulami AI-2 pri drugih bakterijah kot *V. harveyi* le malo znano (Winzer in sod., 2002). Molekula AI-2 je pri bakteriji *Vibrio harveyi* boron diester (2R,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroksitetrahidrofurana (S-THMF) (Chen in sod., 2002). Za biosintezo molekule AI-2 je odgovoren encim LuxS (Ryan in Dow, 2008). Molekula AI-2 je stranski produkt SAM metabolizma. In sicer metalotransferaze sodelujejo v reakciji, kjer nastane S-adenozilhomocistein (SAH), ki je potencialni inhibitor metalotransferaz, zato je pomembno, da se odstrani iz celice. V nekaterih bakterijah encim Pfs pretvori SAH v S-ribozilhomocistein (SRH). Encim LuxS nato pretvori SRH v homocistein (Hcy) in prekurzor AI-2 4,5-dihidroksi 2,3-pantanedion (DPD), ki se spontano ciklizira v številne furanone (molekule AI-2) v kemijskem ravnotežju. Ta pot ima najmanjšo ceno produkcije signalnih molekul (Keller in Surrete, 2006). Molekula AI-2 je konzervativna znotraj bakterijskih vrst, tako so predpostavili njen vlogo v medvrstnem signaliziranju (Winzer in sod., 2002). Sperandio in sodelavci (2001) so z genskimi analizami potrdili, da je AI-2 signaliziranje globalni regulatorni sistem pri bakteriji *E. coli*.

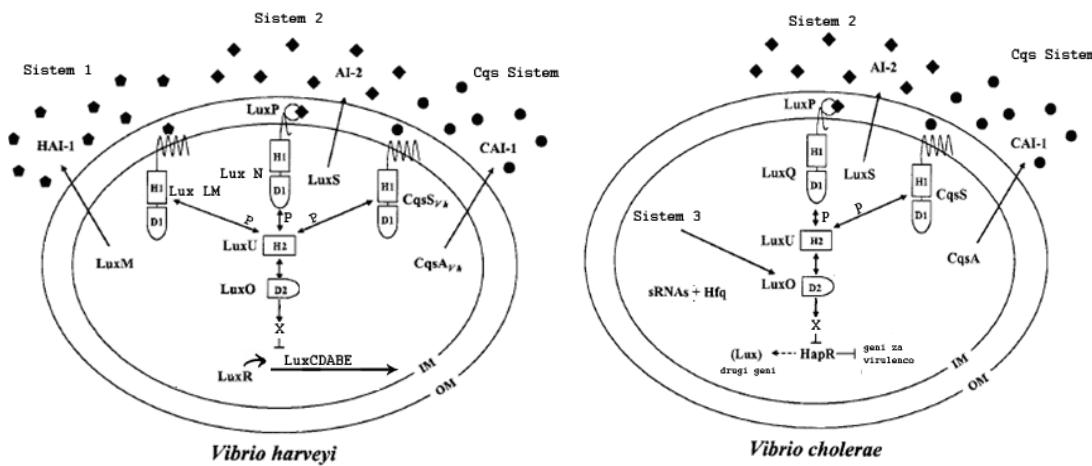
2.2.1 Zaznavanje celične gostote pri vibrijih

Pri bakteriji *Vibrio harveyi* so prisotni trije sistemi zaznavanja celične gostote (Bassler in sod., 1994a) (slika 4, levo). Signalna molekula sistema 1 (LuxLM/LuxN) je HAI-1 (*Harveyi* avtoinduktor), avtoinduktor drugega sistema (LuxS/LuxPQ) je molekula AI-2, CAI-1 (od CqsA odvisen avtoinduktor) je signalna molekula tretjega sistema (CqsA/CqsS) (Henke in Bassler, 2004). *Vibrio harveyi* se na signalne molekule odziva preko dvokomponentne fosforilacijske kaskade, ki nadzira produkcijo glavnega regulatorja LuxR (Walters in Bassler, 2006) (slika 4, levo).

Ko je celična gostota in koncentracija signalnih molekul nizka, se senzorske kinaze LuxN, LuxQ in CqsS avtofosforilirajo (Bassler in sod., 1994b). To sproži kaskado reakcij, LuxU prenese fosfatno skupino na LuxO, le-ta inhibira prepis struktturnih genov *lux* (*lux*-CDBEGH) (Lilley in Bassler, 2000). Ko sta celična gostota in koncentracija signalnih molekul visoki, LuxN, LuxQ in CqsS izgubijo kinazno aktivnost in preklopijo svojo funkcijo na fosfatazno. Posledično pride do defosforilacije LuxO (Henke in Bassler, 2004), kar povzroči njegovo deaktivacijo, sinteza LuxR je tako omogočena in sledi izražanje tarčnih genov (Milton, 2006).

Bakterija *Vibrio cholerae* ima prav tako tri senzorske sisteme (slika 4, desno). Signalna molekula sistema 1 (CqsA/CqsS) je CAI-1, sistema 2 (LuxS/LuxPQ) je AI-2, medtem ko sistem 3 (LuxU/LuxO) deluje vzporedno s prvima dvema. LuxU in HapR (analog LuxR pri *Vibrio cholerae* (Jobling in Holmes, 1997)) sprejemata informacije od vseh treh sistemov

(Miller, 2002). Pri nizki celični gostoti in koncentraciji signalnih molekul, aktiviran protein LuxO posredno reprimira izražanje HapR. Pri visoki celični gostoti in koncentraciji signalnih molekul, je protein LuxO inaktiviran, HapR tako ni več reprimiran in prepis genov za virulenco, tvorbo biofilma in drugih genov lahko steče (Milton, 2006).



Slika 4: Shema zaznavanja celične gostote pri bakterijah *Vibrio harveyi* (levo) in *Vibrio cholerae* (desno) (Henke in Bassler, 2004: 6903). Hal-1 (petkovnik). AI-2 (karo) in CAI-1 (krog) so signalne molekule. LuxN, LuxQ in CqsS so odgovarjajoči senzorji. LuxLM, LuxS in CqsA so proteini potrebni za sintezo signalnih molekul. P je fosfatna skupina. LuxU je histidin fosfotransferaza. LuxO je regulator odziva. X je represor lux genov, ki so regulirani z zaznavanjem celične gostote. LuxR in HapR sta aktivatorja prepisa genov. LuxCDABE so produkti genov iz luciferaznega operona. H je histidin. D je aspartat. Puščice predstavljajo aktivacijo, pravokotnica na koncu črte predstavlja inhibicijo.

2.3 DRUGI TIPI SIGNALNIH MOLEKUL PRI PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJAH

Holden in sodelavci (1999) so iz supernatantov kultur *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* in *Enterobacter agglomerans* ekstrahirali diketopiperazine (DKP). Pokazali so, da imajo vpliv na z molekulami AHL posredovano zaznavanje celične gostote. DKP lahko igrajo vlogo molekul AHL, tako da se vežejo na receptor LuxR ali v bližini njega in vplivajo na različne fenotipe. V študiji so ugotovili, da imajo molekule DKP podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot kratkoverižne molekule AHL. Zato za detekcijo molekul AHL v nekem organizmu ne zadostujejo le analize s poročevalskimi sevi, ampak je pomembna določitev kemijske strukture z uporabo MS in NMR tehnik. Za sproženje fiziološkega odziva so potrebne precej višje koncentracije DKP kot molekul AHL. Ti ciklični dipeptidi (ciklo(Δala-L-Val), ciklo(L-Pro-L-Tir), ciklo(L-Phe-L-Pro)) sprožijo odziv poročevalskega seva *E. coli* (pSB401). Prav tako sprožijo odziv pri nekaterih drugih poročevalskih sevih (*C. violaceum* CV026 in *A. tumefaciens* NT1 (pDCI41E33)). Z odkritjem,

da lahko nekatere molekule DKP aktivirajo poročevalske seve, ki se uporabljajo rutinsko za določanje molekul AHL, so določili omejitve tovrstne detekcije. Molekule DKP zmanjšajo sproščanje svetlobe iz *E. coli* (pSB401), ki jo je aktiviral 3-okso-C6-HSL, inhibicijska doza, ki zmanjša sproščanje svetlobe za 50 % je za ciklo(Δala-L-Val), ciklo(L-Pro-L-Tir) in ciklo(L-Phe-L-Pro) 0.8 mM, 0.9 mM in 1 mM, pri koncentraciji 3-okso-C6-HSL 1.56 nM, kar kaže na to, da so te molekule DKP šibki kompetitivni inhibitorji aktivacije LuxR s 3-okso-C6-HSL. Najprej so mislili, da so molekule DKP stranski produkt sterilizacije kompleksnega LB gojišča, saj lahko molekule DKP proizvedemo pri ekstremnih temperaturah in pH z neencimsko ciklizacijo linearnih dipeptidov, vendar so teorijo ovrgli, saj ekstrakt sterilnega gojišča ni sprožil luminiscence pri poročevalskem sevu *E. coli* (pSB401). Molekule DKP so prav tako izolirali in očistili iz kulture bakterij gojenih v minimalnem gojišču M9, ki ne vsebuje aminokislin in ima en sam vir ogljika, iz česar so sklepali, da poteka sinteza DKP iz produktov primarnega metabolizma bakterij ali nastajajo v bakterijskem metabolizmu razgradnje peptidov. Dokazali so tudi, da DKP vplivajo na prepis specifičnih genov v stacionarni fazi pri *E. coli*. Prav tako imajo molekule DKP biološki in farmakološki vpliv na celice višjih organizmov (Prasad, 1995), kar kaže na povezavo sporazumevanja z rastlinskimi in živalskimi celicami (Ryan in Dow, 2008).

Za po Gramu negativne bakterije je značilno tudi signaliziranje z molekulo AI-3, ta signalna molekula je odgovorna za signaliziranje med bakterijami ter rastlinami in živalmi. Struktura AI-3 je nepoznana, vendar zgodnje analize predlagajo, da je molekula AI-3 aromatska spojina in ne vsebuje ogrodja iz ogljikovih hidratov kot molekula AI-2 (Reading in Sperandio, 2006; Ryan in Dow, 2008).

Prisotnost peptidnega signaliziranja med po Gramu negativnimi bakterijami še preiskujejo, vendar sta znana vsaj dva primera. Bakterija *Providencia stuartii* je oportunist in je odgovorna za nozokomialne infekcije pri ljudeh. Proizvaja nepoznano signalno molekulo, ki je občutljiva na peptidaze, kar je značilno za peptide. Drug predstavnik med po Gramu negativnimi bakterijami je rastlinski patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Ryan in Dow, 2008).

Nekatere po Gramu negativne bakterije sintetizirajo difuzibilne signalne faktorje (DSF - (diffusible signal factor) in difuzibilne faktorje (DF - diffusible factor)) kot signalne molekule. Barber in sodelavci (1997) so pokazali, da signalna molekula DSF, ki nadzoruje sintezo virulenčnega faktorja pri rastlinskem patogenu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), ni derivat AHL, saj ni prišlo do aktivnega odziva na poročevalske seve, ki se uporabljajo za določanje molekul AHL. Signaliziranje z DSF so odkrili še pri *Burkholderia cepacia* (Ryan in Dow, 2008). Podobno funkcijo kot DSF ima tudi signalna molekula DF (Poplawsky in sod., 1998).

Nekateri avtorji omenjajo, da imajo indol in antibiotiki lastnosti signalnih molekul. Indol inducira le gene vpletene v svoj lasten prevzem in katabolizem, zato se je pojavilo vprašanje ali je indol sploh lahko imenovan kot signalna molekula. Wang in sodelavci (2001) so dokazali, da se indol lahko obnaša kot izvencelična signalna molekula pri bakteriji *E. coli*. Pokazali so, da indol uravnava izražanje številnih genov za izločanje pri bakteriji *E. coli* (Hirakawa in sod., 2005). Indol sodeluje tudi pri medvrstnem signaliziranju. Pozitivno vpliva na tvorbo biofilma pri bakterijah *Pseudomonas fluorescens* in *Ps. aeruginosa*, ki sami ne tvorita teh signalnih molekul (Lee in sod., 2007). Indol deluje kot signalna molekula tudi pri miksobakteriji *Stigmatella aurantiaca*, kjer inducira tvorbo spor (Gerth in sod., 1993). Antibiotiki imajo lastnosti štirih kriterijev, ki so jih predlagali Winzer in sodelavci (2002), ki definirajo QS signalne molekule (Williams in sod., 2007). Yim in sodelavci (2006) so predlagali, da so antibiotiki lahko vpleteni kot signalne molekule in so potencialni modulatorji izražanja genov pri subinhibitornih koncentracijah. Antibiotike različnih bakterijskih rodov so testirali na znanih sistemih za detekcijo molekul AHL. Rezultati so pokazali, da pri nizkih koncentracijah aktivirajo prepis iz promotorjev zaznavanja celične gostote in delujejo kot nadomestni avtoinduktorji v mehanizmu, ki ne zahteva LuxR ortologa.

2.4 BIOSINTEZA IN REGULACIJA BIOSINTEZE PRODIGIOZINA

Prodiginini so družina tripirolnih antibiotikov, ki imajo protimikrobsko, protimalarijsko, protiglivno, protiprotzojsko in imunosupresivno aktivnost. Sintetizirajo jih bakterije *Serratia* sp., *Streptomyces coelicolor*, *Vibrio* sp. in druge (Williamson in sod., 2006). Prodigiozini so sekundarni metaboliti, ki se sintetizirajo v stacionarni fazi bakterijske rasti (Bennett in Bentley, 2000). Nimajo ključne vloge pri rasti in preživetju celice, so neke vrste tok odstranjevanja odpadnih produktov primarnega metabolizma iz celice (Bu'Lock, 1961; Thomson in sod., 2000). To trditev potrjujejo raziskave s sorodnim pigmentom, undecilprodigiozinom, iz *Streptomyces*, kjer služi pigment kot ponor proline (Hood in sod., 1992).

Biosinteza prodigiozina je najbolje opisana pri bakterijah *Streptomyces* in *Serratia*. Prekurzorji v biosintezi prodigiozina so prolin, serin, alanin (Quadri in Williams, 1971; Bennett in Bentley, 2000) ter glicin in ocetna kislina (Hubbard in Rimington, 1950). Prodigiozinska sinteza poteka preko razcepljene poti, ki se konča z encimsko kondenzacijo končnih produktov, 2-metil-3-amilpirol (MAP) in 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karboksialdehid (MBC) (Harris in sod., 2004).

Uravnavanje sinteze prodigininov je kompleksno in poteka preko različnih mehanizmov (Williamson in sod., 2006). *Serratia* in *Streptomyces* spp. sintetizirata majhne molekule, ki so odgovorne za regulacijo sinteze prodiginina (Williamson in sod., 2006). Biosintetski geni so pri *Streptomyces coelicolor A3(2)* organizirani v gručo imenovano *red*, ki vsebuje 23 genov

(Cerdeño in sod., 2001) in gručo *pig* s 14 geni pri bakteriji *Serratia marcescens* ATCC 274 (Sma 274) (Harris in sod., 2004), pri bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006 ima zapis za sintezo prodigiozina 15 genov v Pig operonu, *pigA-O* (Slater in sod., 2003).

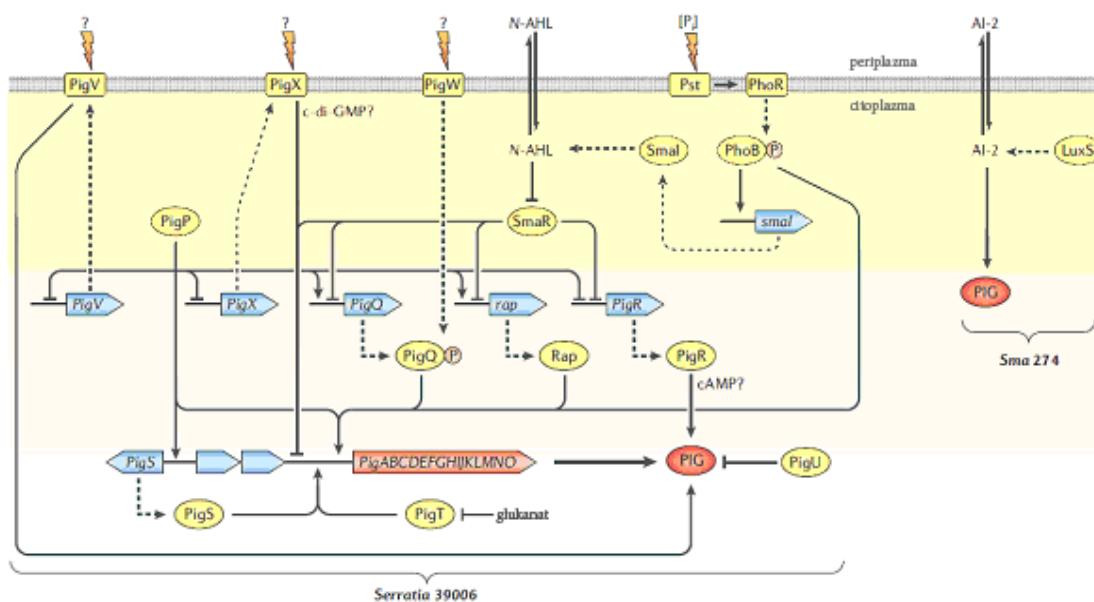
Serratia sp. ATCC 39006 sintetizira rdeč pigment 2-metil-3-pentil-6-metoksiprodigiozin (Harris in sod., 2004). Geni *pigA-O*, ki imajo zapis za sintezo pigmenta, se prepisujejo iz ene policistronske mRNA (Slater in sod., 2003). Sinteza pigmenta nadzoruje AHL QS sistem (Fineran in sod., 2005). Thomson in sodelavci (2000) so za določanje molekul AHL in homologov *luxR* in *luxI* v bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006 uporabili primerjalno TLC. Določili so homologa *luxIR*, *smaI* in *smaR*. Detektirali so, da SmaI proizvaja dva tipa signalnih molekul, C4-HSL in C6-HSL, vendar je glavni produkt C4-HSL. Pokazali so tudi, da dodatek oksogenega C4-HSL in C6-HSL, lahko inducira izražanje prodigiozina v mutantni *smaI* seva bakterije *Serratia* sp. ATCC39006. Zanimivo je, da se *smaR* homolog *luxR* prekriva s *smaI* in je prepisani skupaj s *smaI*. Tako okvara *smaR* ne vpliva na sintezo prodigiozina. Protein Rap je vpletен в pozitivno uravnavanje sinteze prodigiozina.

Slika 5 prikazuje regulacijo genov odgovornih za sintezo prodigiozina pri bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006. V začetnih fazah rasti ob nizki celični gostoti in odsotnosti C4-HSL/C6-HSL, se SmaR veže na DNK in reprimira prepis (Slater in sod., 2003), genov *pigA-O* in regulatorjev *pigR*, *pigQ* in *rap*. Ob visoki celični gostoti naraste koncentracija C4-HSL/C6-HSL, ko je dosežena kritična koncentracija, se vežeta na protein SmaR in preprečita vezava SmaR na DNK, kar povzroči produkcijo proteinov PigQ, PigR in Rap. Senzorska kinaza PigW, ki se odziva na druge nepoznane signale, fosforilira PigQ, ki nato aktivira prepis *pigA-O* genov. PigR tudi vpliva na sintezo pigmenta, vendar njegovo delovanje ni v celoti poznano. PigP modulira izražanje šestih drugih proteinov, ki uravnavajo sintezo prodigiozina (PigQ, PigR, PigS, PigV, PigX in Rap) ter prepis genov *pigA-O*, od tega so trije geni (*pigQ*, *pigR* in *rap*) pod skupno kontrolo PigP in sistema zaznavanja celične gostote. PigU je represor sinteze pigmenta (Fineran in sod., 2005). Fiziološko zaznavanje fosfata v okolju je pomembno za nadzor odgovora z zaznavanjem celične gostote in za uravnavanje prepisa genov, ki imajo zapis za sintezo prodigiozina. Izražanje genov *smaI* in *pig* je pod nadzorom regulona PhoBR. Visoke koncentracije fosfata reprimirajo prepis genov *pig*. Sinteza pigmenta je torej pod vplivom fosfata in sistema zaznavanja celične gostote (Slater in sod., 2003). Protein PigT prav tako zaznava okoljske dejavnike, v prisotnosti glukonata se ne veže na promotor *pigA*, posledično ni sinteze pigmenta. Za pozitivno kontrolo nivoja prepisa genov *pigA-O* je odgovoren PigS (Fineran in sod., 2005).

SmaI in SmaR imata visoko homologijo s homologi LuxI pri *Erwinia chrysanthemi* (SmaR:EchR 55 %), *Erwinia carotovori* (SmaR:ExpR 55 %; SmaI:EcbI 53 %) in *Serratia liquefaciens* (SmaR:SwrR 71 %, SmaI:SwrI 55 %). Tako SwrI in SmaI sta primarno odgovorna za sintezo C4-HSL (Eberl in sod., 1996). SpnR je represor sinteze prodigiozina pri *S. marcescens* SS-1. SpnI je v večini odgovoren za sintezo dveh AHL (3-okso-C6-HSL in C6-HSL) in v manjši količini (C7-HSL in C8-HSL), za razliko od SmaI (*Serratia* spp. ATCC

39006,) in SwI (*S. liquefaciens* MG-1, ki sta pretežno odgovorna za sintezo C4-HSL ter manjše količine C6-HSL (Horng in sod., 2002).

Serratia marcescens ATCC 274 (Sma 274) ne sintetizira molekul AHL in nima homologa *smaI/R* (Harris in sod., 2004). Coulthurst in sodelavci (2004) so uporabili poročevalski sev *V. harveyi* BB170 (Bassler in sod., 1997), ki odgovori na prisotnost oksogene molekule AI-2 z indukcijo bioluminiscence, da bi določili molekule AI-2 v supernatantih kultur Sma 274 in *Serratia* sp. ATCC 39006. Pokazali so, da je aktivnost AI-2 prisotna pri obeh sevih, vendar je *luxS* vpletén v uravnavanje sinteze prodigiozina le pri Sma 274 (Slika 5).



Slika 5: Shematski prikaz uravnavanja biosinteze prodigiozina pri bakterijah *Serratia* sp. ATCC 39006 in *Serratia marcescens* ATCC 274 (Williamson in sod., 2006: 894). SmaI sintetizira molekule AHL. SmaR je represor PigR, rap, PigQ in PigA do O. PigW je senzor, PigQ je aktivator prepisa genov, PigR je vpletén v uravnavanje sinteze pigmenta, protein Rap uravnava sintezo antibiotika in pigmenta, PigA-O so potrebni za sintezo prodigiozina, P je fosfatna skupina, proteini PigS, PigV in PigX uravnavajo sintezo pigmenta, protein PigP uravnava njihovo izražanje, PigU je represor sinteze pigmenta. LuxS je sintaza AI-2. Regulon PhoB/R vpliva na sintezo pigmenta. PigT je senzor za zaznavanje glukonata. Aktivacija je prikazana s koničastimi puščicami, reprimiranje z znakom, ki ima na koncu črto.

2.5 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL

Horswill in sodelavci (2007) navajajo, da je v procesu zaznavanja celične gostote, okolje v katerem se nahajajo bakterije, izredno pomembno. Yates in sodelavci (2002) so ugotovili, da je homoserinlaktionski obroč molekul AHL občutljiv na pH, občutljivost pada z daljšanjem C verige. Molekule AHL so stabilne pri nizkih pH, pri višjih pH imajo razklenjene obroče in

niso aktivne kot QS signalne molekule (Williams in sod., 2007). 70 % hidroliza obroča C3-HSL poteče pri pH 6, C4-HSL obroč je popolnoma razklenjen pri pH 8 (Yates in sod., 2002). Acidofilni ekstremofil *Acidithiobacillus ferrooxidans* sodeluje pri pretvorbi kovinskih sulfidov in sprošča vsaj devet molekul AHL (N-acil, N-(3-oksoacil) in N-(3-hidroksiacil) substituirane obroče iz C8-C16) (Farah in sod., 2005).

Latour in sodelavci (2007) so dokazali vpliv temperature (8, 12, 15, 20, 24 in 28 °C) na produkcijo AHL pri bakteriji *Pectobacterium atrosepticum*, ki proizvaja v večjem deležu N-3-okso-C8-HSL ter v manjših količinah C8-HSL, 3-okso-C6-HSL in 3-okso-C10-HSL. Optimalna produkcija molekul AHL je bila pri 24 °C. Koncentracija molekul AHL in sintaze ExpI bakterije *P. atrosepticum* je naraščala s temperaturo (8-24 °C), pri 28 °C se je pojavil negativni vpliv. Yates in sodelavci (2002) so pokazali, da stabilnost AHL pada pri povišanju temperature od 22-37 °C. Schaefer in sodelavci (1996) so prav tako dokazali vpliv temperature na encimsko aktivnost sintaze LuxI, določili so optimalno temperaturo 20-30 °C, pri 37 °C so zaznali le še 10 % aktivnost.

Medina-Martínez in sodelavci (2005) so preučevali vpliv fizikalnih pogojev (vir ogljika, NaCl), normalno prisotnih v okolju (hrana), v katerem se nahajajo bakterije *Aeromonas* spp. Ugotovili so, da ob višanju koncentracije NaCl (0,5 % - 3,5 %) pada produkcija signalnih molekul C4-HSL, pri 4 % in 4,5 % (w/V) NaCl, niso zaznali C4-HSL, kar so povezali s slabo rastjo kulture (nizek CFU/mL). O vplivu NaCl na sintezo signalnih molekul ni veliko objav. Medina-Martínez in sodelavci (2006) so pokazali negativen vpliv glukoze na produkcijo C4-HSL pri bakteriji *Aeromonas hydrophila*, Ravn in sodelavci (2003) niso zaznali vpliva dodatka ali vpliva spremembe koncentracije glukoze na produkcijo 3-okso-C6-HSL pri bakteriji *Serratia proteamaculans*.

2.6 NARAVNI RDEČE OBARVAN IZOLAT *VIBRIO* SP.

Bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 (*Vibrio* sp.) je bila izolirana iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka (Stopar in sod., 2004). Za svojo rast potrebuje NaCl, je halotoleranten mikroorganizem, ki lahko raste v gojišču PKS do 17 % (w/V) NaCl (Danevčič, 2005).

Danevčič (2006) navaja, da je hitrost rasti *Vibrio* sp. odvisna od koncentracije soli v gojišču PKS. Največjo hitrost rasti so izmerili v rastnem gojišču z 1.76 % (w/V) NaCl, porazdeljena je asimetrično in je pomaknjena v desno proti višjim slanostim. Optimalna koncentracija soli za rast *Vibrio* sp. je 3 % (w/V) NaCl. Sprememba slanosti okolja vpliva na hitrosti rasti *Vibrio* sp. in na sestavo, aktivnost in urejenost membrane ter metabolno aktivnost (Danevčič, 2006). Rast *Vibrio* sp. je v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl prisotna od 15 °C do 44 °C (Danevčič, 2006).

Ena izmed najbolj opaznih lastnosti *Vibrio* sp. je produkcija rdečega pigmenta, ki se sintetizira v stacionarni fazni rasti (Starič, 2007) in je prodigiozinu podobna molekula, katere sinteza je uravnana z zaznavanjem celične gostote (Štraser, 2008). Na sintezo prodigiozina

vplivajo različni okoljski dejavniki kot so sestava gojišča, pH, temperatura (Williams in sod., 1971). Pri bakteriji *Vibrio* sp. je sinteza pigmenta najvišja pri 3 % (w/V) NaCl in temperaturi 28 °C, če koncentracijo NaCl znižamo ali zvišamo, sinteza pigmenta močno upade (Starič, 2007).

Divji sev *Vibrio* sp. DSM14379 ima dve nepigmentirani mutanti. Rahlo rožnata mutanta (mutanta R) je bila pridobljena z UV mutagenezo, bela mutanta (mutanta B) je bila pridobljena s staranjem kulture v tekočem gojišču PKS (Štraser, 2008). Pokazano je bilo, da se le mutanta R obarva v bližini divjega seva *Vibrio* sp. (Štraser, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- aceton $C_3H_6O M_w = 58,08 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- bidestilirana voda (MiliQ)
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) ($c=10 \text{ mg/mL}$)
- destilirana voda
- D-(+)-glukoza $C_6H_{12}O_6 M_w = 180,16 \text{ g/mol}$ (Kemika, Hrvaška)
- dimetilformamid (DMF) $C_3H_7NO M_w = 73,10 \text{ g/mol}$ (Kemika, Hrvaška)
- dimetilsulfoksid (DMSO) $C_2H_5OS M_w = 78,13 \text{ g/mol}$ (Fluka)
- dinatrijev hidrogen fosfat $Na_2HPO_4 M_w = 141,96 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- etanol 96 % (V/V) $C_2H_5OH M_w = 46,07 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- etil acetat $CH_3CO_2 M_w = 88,11 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- kalcijev klorid dihidrat $CaCl_2 \cdot 2H_2O M_w = 147,02 \text{ g/mol}$ (Zorka Šabac, Srbija)
- kalijev dihidrogen fosfat $KH_2PO_4 M_w = 136,09 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- kanamicin (založna koncentracija 50 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH, USA)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- magnezijev klorid heksahidrat $MgCl_2 \cdot 6H_2O M_w = 203,3 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat $MgSO_4 \cdot 7H_2O M_w = 246,48 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- metanojska kislina $CH_3CO_2 M_w = 43,03 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid $NaOH M_w = 40,00 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid $NaCl M_w = 58,5 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- N-(3-oxooctanoyl)-DL-homoserine lactone (3-okso-C8-HSL) $M_w = 233 \text{ g/mol}$ (SIGMA-ALDRICH, USA)
- N-hexanoyl-DL-homoserine lactone (C6-HSL) $M_w = 199,25 \text{ g/mol}$ (SIGMA-ALDRICH, USA)
- N-tetradecanoyl-DL-homoserine lactone (C14-HSL) $M_w = 311,46 \text{ g/mol}$ (SIGMA-ALDRICH, USA)
- N-3-oxodecanoyl-L-homoserine lactone (3-okso-C10-HSL) $M_w = 269,34 \text{ g/mol}$ (SIGMA-ALDRICH, USA)

- N-(β-ketocaproyl)-DL-homoserine lactone (3-okso-C6-HSL) $M_w = 213,2$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, USA)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- tetraciklin (založna koncentracija 20 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH, USA)
- TLC plošče-silica gel 60 RP-18 F_{254S} (20 x 20 cm) (Merck, Nemčija)
- tripton (Biolife, Italija)

3.1.2 Gojišča

- Gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt):
 - 5 g peptokompleks
 - 1 g kvasni ekstrakt
 - 2 g MgCl₂·6H₂O
 - 0 g (0 % PKS), 5 g (0,5 % PKS), 30 g (3 % PKS), 50 g (5 % PKS), 70 g (7 % PKS), 95 g (9,5 % PKS) ali 100 g (10 % PKS) NaCl
 - 1000 mL destilirane vode
- Gojišče M9: 200 ml 5xM9 soli (64 g Na₂HPO₄·2H₂O, 15 g KH₂PO₄, 5 g NH₄Cl, 150 g NaCl ter 1000 mL destilirane vode)
 - 2 mL 1M MgSO₄·7H₂O
 - 0,1 mL 1M CaCl₂·2H₂O
 - 10 mL 500 g L⁻¹ glukoze (končna koncentracija glukoze v gojišču 5 g L⁻¹)
 - 750 mL destilirane vode

Za trdna gojišča PKS smo dodali 15 g agar-agar na 1000 mL tekočega gojišča.

- Gojišče LB-Miller (Luria-Bertani broth):
 - 10 g tripton
 - 5 g kvasni ekstrakt
 - 10 g NaCl
 - 1000 mL destilirane vode

Za trdna gojišča LB smo dodali 15 g agar-agar na 1000 mL tekočega gojišča, za gojišča za difuzijo 12 g agar-agar na 1000 mL tekočega gojišča.

3.1.3 Bakterijski sevi

Preglednica 1: Bakterijski sevi in plazmidi uporabljeni v diplomskem delu.

Sev	plazmid	opis
<i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (<i>Vibrio</i> sp.)		divji sev
<i>Vibrio</i> sp. DSM14379 rahlo rožnata mutanta (mutanta R)		pridobljena z UV mutagenezo
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 (<i>C. violaceum</i>)	,	mini-Tn5 mutanta pridobljena iz <i>C. violaceum</i> ATCC 31532, <i>CviI</i> ::Tn5XylE, Km ^r , okvarjena sinteza pigmenta violaceina
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 (<i>A. tumefaciens</i>)	pDCI41E33 <i>traG</i> :: <i>lacZ traR</i> , Km ^r	avtoinduktorski poročevalski plazmid
<i>Escherichia coli</i> JM109 (<i>E. coli</i>)	pSB401 <i>luxRI'</i> :: <i>luxABCDE</i> , Tc ^r , z ori p15A	

3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR

3.2.1 Gojenje bakterije *Vibrio* sp. za pripravo IG pri različnih slanostih ter za pridobivanje ekstraktov signalnih molekul različnih slanosti

Za pripravo IG smo kulturo divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 iz trdnega gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl nacepili v 5 mL tekočega gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl. Gojišča, nacepljena z divjim sevom *Vibrio* sp. smo gojili 7 ur na stresalniku (Vibromix 40, Tehnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Nato smo prenesli 1 % (V/V) inokuluma v tekoča gojišča PKS z 0,5 % (w/V), 3 % (w/V), 5 % (w/V) in 10 % (w/V) NaCl.

3.2.2 Gojenje poročevalskih sevov za določanje tipa signalnih molekul, ki jih producira *Vibrio* sp. DSM14379 z difuzijsko metodo v jamicah (well-diffusion) in tankoplastno kromatografijo (TLC)

Kulturo mutante R smo iz trdnega gojišča PKS z 3 % (w/V) NaCl precepili v 5 mL tekočega gojišča PKS z 3 % (w/V) NaCl ter jo gojili 7 ur pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Nato smo prenesli 1 % (V/V) inokuluma v tekoče gojišče PKS z 3 % (w/V) NaCl ter inkubirali pod enakimi pogoji.

Kulturo bakterije *Chromobacterium violaceum* CV026 smo iz trdnega gojišča LB z 20 µg/mL kanamicina precepili v 5 mL tekočega gojišča LB s kanamicinom ter inkubirali pri 200 obratih na minuto pri 28 °C preko noči. V tekoče gojišče LB s kanamicinom smo prenesli 2 % (V/V) inokuluma prekonočne kulture ter inkubirali pod enakimi pogoji.

Kulturo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDCI41E33) smo iz trdnega gojišča LB s 100 µg/mL kanamicina precepili v 5 mL tekočega gojišča LB s kanamicinom ter inkubirali pri 200 obratih na minuto pri 28 °C preko noči. V tekoče gojišče LB s kanamicinom smo prenesli 2 % (V/V) inokuluma prekonočne kulture ter inkubirali pod enakimi pogoji.

Kulturo bakterije *Escherichia coli* JM109 smo iz trdnega gojišča LB z 10 µg/mL tetraciklina precepili v 5 mL tekočega gojišča LB s tetraciklinom ter inkubirali pri 200 obratih na minuto pri 37 °C preko noči. V tekoče gojišče LB s tetraciklinom smo prenesli 2 % (V/V) inokuluma prekonočne kulture ter inkubirali pod enakimi pogoji.

3.3 IZOLACIJA SIGNALNIH MOLEKUL IN PRIPRAVA STANDARDOV

Signalne molekule smo izolirali iz IG kulture divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKS pri različnih slanostih.

IG smo pripravili tako, da smo prekonočne kulture (PKS z 0,5 %, 3 %, 5 % in 10 % NaCl) centrifugirali 15 minut pri 13 000 obratih in 4°C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatante smo prefiltrirali skozi filtre s porami premera 0,2 µm (Sartorius, Germany) ter jih shranili pri -20°C.

Signalne molekule smo ekstrahirali iz 45 mL IG z dodatkom enakega volumna etil acetata z 0,5 % (V/V) metanojske kisline. Mešanico smo premešali trikrat 30 s na mešalu, nato smo odstranili organsko (etyl acetatno) fazo in supernatantu spet dodali 45 mL etil acetata. Postopek smo ponovili trikrat. Na koncu smo združili vse tri frakcije etil acetata (~ 135 mL) in topilo izparevali z dušikom. Posušen ekstrakt smo 100 in 200 x koncentrirali v 96 % etanolu ali v dimetilsulfoksidu (DMSO).

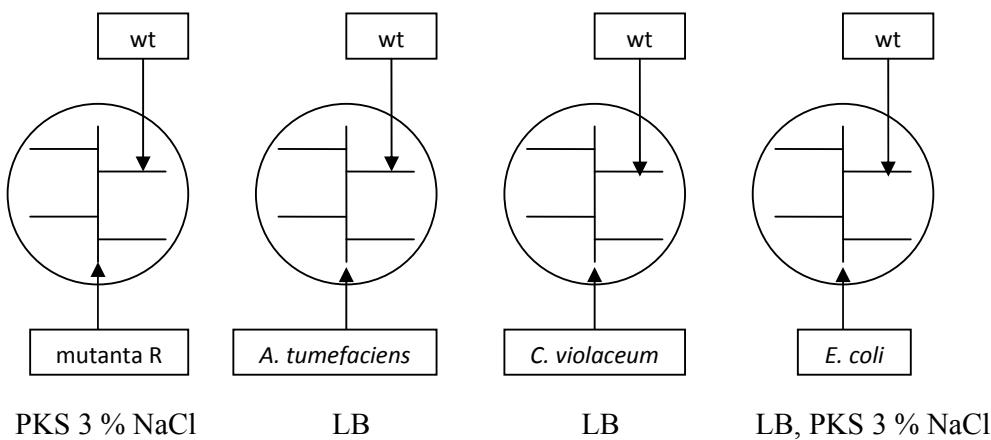
Sintetične molekule AHL (N-(3-oksooctanoil)-DL-homoserin lakton (3-okso-C8-HSL), N-heksanoil-DL-homoserin laktone (C6-HSL), N-tetradekanoil-DL-homoserin lakton (C14-

HSL), N-3-oksodekanoil-L-homoserin lakton (3-okso-C10-HSL), N-(β -ketokaproil)-DL-homoserin lakton (3-okso-C6-HSL)) smo raztopili v DMSO, da je bila končna koncentracija 10 mM.

3.4 DOLOČANJE TIPOA SIGNALNIH MOLEKUL, KI JIH SINTETIZIRA *VIBRIO* SP. DSM14379

3.4.1 Pravokotno nacepljanje na plošče

Kulturo divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 (wt) smo nacepili pravokotno s štirimi poročevalskimi sevi na trdno gojišče PKS s 3 % (w/V) NaCl (mutanta R divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379, *Escherichia coli* JM109 (pSB401)) in na LB brez dodanega antibiotika (bakterije *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDCI41E33), *Chromobacterium violaceum* CV026 in *Escherichia coli* JM109 (pSB401)) (slika 6).



Slika 6: Shematski prikaz načina nacepljanja divjega seva bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 (wt) in poročevalskega seva (mutanta R, *Agrobacterium tumefaciens*, *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*) za ugotavljanje tipa komunikacijskih oziroma signalnih molekul.

V trdno gojišče LB s poročevalskim sevom *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDCI41E33) smo predhodno dodali X-Gal s končno koncentracijo 40 μ g/mL. X-Gal smo raztopili v DMF, da je bila založna koncentracija 10 mg/mL.

3.4.2 Difuzijska metoda v jamicah

Plošče za difuzijsko metodo v jamicah smo pripravili tako, da smo 50 mL kulture štirih poročevalskih sevov gojenih 24 ur pri optimalnih pogojih (točka 3.2.2) prilili v 100 mL

termostatiranih agariziranih gojišč (1,2 % agar, 50 °C) PKS in LB ter razlili v Petrijeve plošče po 20 mL gojišča z ustrezeno kulturo in antibiotikom. V trdno gojišče na plošči smo z obrnjениm pipetnim nastavkom (1mL) izdolbli jamice, približno 7 mm premera.

V jamice smo odpipetirali po 100 µL 100 x in 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul izoliranih iz IG kultur *Vibrio* sp. gojenih v PKS s 3 % (w/V) NaCl raztopljenih v 96 % etanolu ali DMSO, 15 ali 50 µL sintetičnih molekul AHL (3-oxo-C8-HSL, C6-HSL in C14-HSL) ter 100 µL IG *Vibrio* sp. (PKS s 3 % (w/V) NaCl) ter jih tako testirali na prisotnost in tip molekul AHL. Plošče smo inkubirali preko noči na 28 °C (bakterije *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDCI41E33) in mutanta R) ter na 37 °C (bakterijo *Escherichia coli* JM109).

Kulturi bakterije *Agrobacterium tumefaciens* NT1 v agariziranem gojišču smo dodali X-Gal (končna koncentracija 40 µg/mL).

Kot negativno kontrolo smo uporabili 96 % etanol ali DMSO (v katerem smo raztopili ekstrakt signalnih molekul).

3.4.3 Tankoplastna kromatografija

Na plošče TLC smo nanesli 100 µL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul (ekstrahiranih iz IG PKS z 0,5 %, 3 % in 5 % in 10 % (w/V) NaCl) in 2 µL ali 5 µL sintetičnih molekul AHL (3-okso-C8-HSL, C6-HSL, C14-HSL, 3-okso-C10-HSL in 3-okso-C6-HSL). Razvijanje TLC kromatogramov je potekalo v stekleni komori približno 4 ure pri sobni temperaturi z razvijalcem (60:40 (V/V) - metanol:MiliQ voda). Plošče smo po razvijanju sušili vsaj 15 minut in jih prelili s termostatiranimi agariziranimi gojiščema s kulturama dveh poročevalskih sevov (bakterije *Escherichia coli* JM109 in mutante R), ki sta bila pripravljena kot je opisano pod točko 3.4.2. Prelite plošče TLC smo inkubirali preko noči na 28°C (mutanta R) in 37°C (bakterija *Escherichia coli* JM109).

Plošče s poročevalskim sevom bakterije *E. coli* JM109 (pravokotno nacepljanje seva na plošče, difuzijska metoda v jamicah in TLC plošče) smo fotografirali z dokumentacijskim sistemom s CCD kamero visoke resolucije imenovanim G:BOX (računalniški program za zajem slike GeneSnap) v temi z različnimi časi zajemanja slike.

3.5 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL

Vpliv slanosti na produkcijo signalnih molekul pri divjem sevu *Vibrio* sp. DSM14379 smo ugotavljali z določanjem vpliva IG PKS različnih slanosti na produkcijo rdečega pigmenta pri mutanti R divjega seva *Vibrio* sp. in s tankoplastno kromatografijo s poročevalskima sevoma (mutanto R in bakterijo *E. coli*).

Odziv poročevalskega seva mutante R smo merili s pomočjo določanja količine nastalega pigmenta.

3.5.1 Vpliv IG PKS različnih slanosti na produkcijo rdečega pigmenta pri rožnatih mutantih divjega seva *Vibrio* sp.

IG iz PKS različnih slanosti (priprava glej točko 3.3.) smo dodali sveže gojišče PKS ustrezne slanosti, da smo slanost izenačili na 5 % (w/V) NaCl. Gojišča smo pripravili po naslednjem protokolu:

- 25 mL PKS 9,5 % NaCl + 25 mL IG iz PKS 0,5 % NaCl
- 25 mL PKS 7 % NaCl + 25 mL IG iz PKS 3 % NaCl
- 25 mL PKS 5 % NaCl + 25 mL IG iz PKS 5 % NaCl
- 25 mL PKS 0 % NaCl + 25 mL IG iz PKS 10 % NaCl

V tako pripravljena gojišča smo nacepili 1 % (V/V) inkubaciji kulture mutante R gojene v gojišču PKS 3 % NaCl pri 28 °C 7 ur in opazovali vpliv IG na produkcijo pigmenta pri mutanti R divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379. Delali smo v treh ponovitvah.

Vzorce smo inkubirali preko noči (17 ur) na stresalniku (Vibromix 40, Tehnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Po inkubaciji smo ekstrahirali proizvedeni pigment iz celic mutante R. Količino proizvedenega pigmenta smo normirali na količino biomase.

Kot kontrola nam je služilo gojišče PKS 5 % (w/V) NaCl s kulturo mutante R, ki smo jo gojili na enak način kot je opisano zgoraj.

Določali smo tudi vpliv različnih količin IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz PKS 5 % NaCl na produkcijo rdečega pigmenta pri mutanti R divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379.

Uporabljali smo naslednja razmerja:

- 0 %: 50 mL PKS 5 % NaCl + 0 mL IG iz PKS 5 % NaCl
- 25 %: 37,5 mL PKS 5 % NaCl + 12,5 mL IG iz PKS 5 % NaCl
- 50 %: 25 mL PKS 5 % NaCl + 25 mL IG iz PKS 5 % NaCl
- 75 %: 12,5 mL PKS 5 % NaCl + 37,5 mL IG iz PKS 5 % NaCl
- 80 %: 10 mL PKS 5 % NaCl + 40 mL IG iz PKS 5 % NaCl
- 90 %: 5 mL PKS 5 % NaCl + 45 mL IG iz PKS 5 % NaCl
- 100 %: 0 mL PKS 5 % NaCl + 50 mL IG iz PKS 5 % NaCl

Gojišče smo nacepili z 1 % (V/V) inokuluma kulture mutante R gojene v gojišču PKS 3 % NaCl pri 28 °C 7 ur. Delali smo v treh ponovitvah.

Vzorce smo inkubirali preko noči (17 ur) na stresalniku (Vibromix 40, Tehnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Po inkubaciji smo ekstrahirali proizvedeni pigment iz celic mutante R. Količino proizvedenega pigmenta smo normirali na količino biomase.

3.5.1.1 Ekstrakcija pigmenta

Različnim vzorcem kultur mutante R smo najprej izmerili optično gostoto pri 650 nm (OD_{650}) s fotometrom (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija). Nato smo 1,5 mL kulture centrifugirali 10 minut pri 10 000 obratih in 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili in usedljivo celic resuspendirali v enakem volumnu acetona (Giri in sod., 2004) ter stresali 90 minut na stresalniku. Po stresanju smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 10 000 obratih in 4 °C ter tako odstranili ostanke celic.

3.5.1.2 Določanje biomase

Za določanje biomase smo 40 mL kulture centrifugirali 10 minut pri 13 000 obratih in 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili in pelet resuspendirali v enakem volumnu sterilne destilirane vode. Nato smo spet centrifugirali 10 minut pri 13 000 obratih in 4 °C, odlili supernatant in pelet resuspendirali v 5 mL sterilne destilirane vode. Suspenzije celic smo prenesli v tehtice, ki smo jih predhodno sušili pri 105 °C preko noči in prazne stehtali na tehnici SBC 33 (Scaltec, Nemčija). Suspenzijo celic smo sušili 24 ur na 105 °C in jo po sušenju stehtali, s čimer smo določili suho celično maso.

3.5.1.3 Določanje koncentracije pigmenta

Na mikrotitrsko ploščo smo v treh ponovitvah nanesli 300 µL ekstraktov pigmenta v acetonu ter izmerili absorbcijski spekter s spektrofotometrom (Multiscan Spectrum, THERMO, Finska) pri valovnih dolžinah od 380 do 600 nm s korakom po 5 nm in ločljivostjo 2 nm. Za ničlitev smo uporabili čisto topilo (aceton). Dobljene spektre smo s programom OriginPro 8 integrirali. Dobili smo površine, ki so proporcionalne koncentraciji pigmenta. Koncentracijo pigmenta v mg/L smo določili s pomočjo umeritvene krivulje:

$$y = 4,6282 \cdot x, \quad \dots (1)$$

kjer predstavlja y površino spektra pigmenta med 380 in 600 nm in x koncentracijo pigmenta v mg/L.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE TIPO SIGNALNIH MOLEKUL, KI JIH PRODUCIRA *VIBRIO* SP. DSM14379

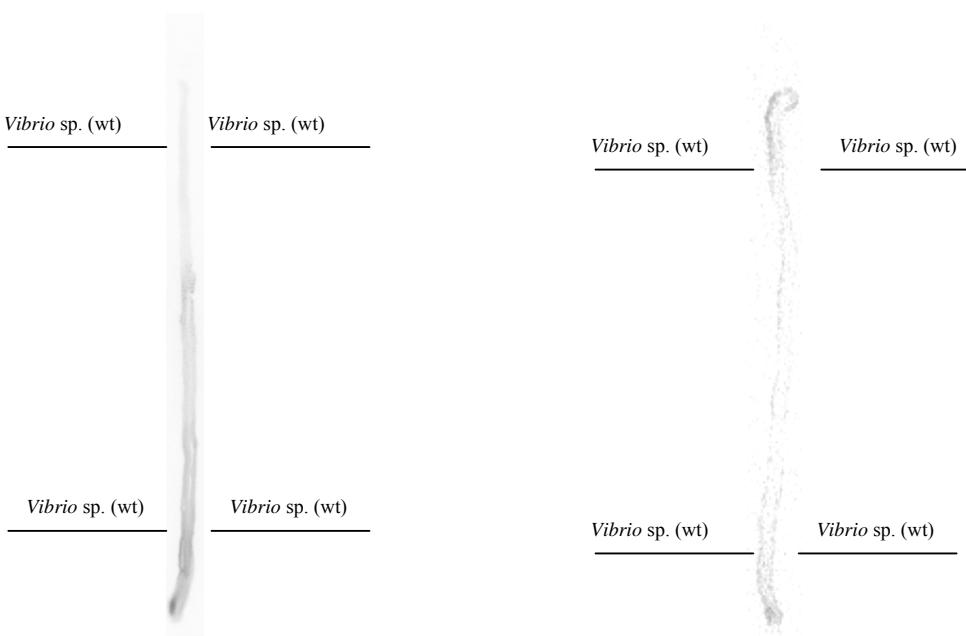
4.1.1 Preverjanje ustreznosti poročevalskih organizmov in prisotnosti signalnih molekul tipa AHL

Pri preverjanju ustreznosti poročevalskih organizmov in prisotnosti signalnih molekul tipa AHL s pravokotnim nacepljanjem na plošče in difuzijsko metodo v jamicah, smo dobili pozitiven odziv dveh poročevalskih sevov, mutante R in bakterije *E. coli* JM109.

Bližina divjega seva *Vibrio* sp. je povzročila povrnitev pigmentacije mutante R. Odgovorila je na signalne molekule, ki jih je bakterija *Vibrio* sp. sproščala v okolico (slika 7). Bakterija *E. coli* je v bližini divjega seva *Vibrio* sp. luminiscirala (slika 8). Na gojišu PKS 3 % NaCl je bakterija *E. coli* slabše rasla zaradi povečane koncentracije soli in manjše količine hranil (slika 8, desno), posledično je bila tudi intenziteta luminiscence slabša.



Slika 7: Plošča PKS 3 % NaCl z divjim sevom *Vibrio* sp. DSM14379 nacepljenim pravokotno na poročevalski sev mutanto R, inkubirana 48 ur pri 28 °C.



Slika 8: Plošča LB z divjim sevom *Vibrio* sp. DSM14379 nacepljenim pravokotno (ravne črte) na poročevalski sev bakterije *E. coli* JM109 (levo) in plošča PKS 3 % NaCl z divjim sevom *Vibrio* sp. DSM14379 nacepljenim pravokotno na poročevalski sev bakterije *E. coli* JM109 (desno), inkubirani 24 ur pri 37°C.

Poročevalska seva *C. violaceum* CV026 in *A. tumefaciens* NT1 se nista odzvala na rast divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379.

Preden smo izločili katerega od poročevalskih sevov, smo z difuzijsko metodo v jamicah preverili odzivnost poročevalskih sevov na sintetične molekule AHL (bakterijo *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* NT1 in mutanto R na 3-okso-C8-HSL, C6-HSL in C14-HSL ter bakterijo *E. coli* JM109 na 3-okso-C8-HSL, C6-HSL, C14-HSL, 3-okso-C10-HSL in 3-okso-C6-HSL). Preverili smo tudi sam vpliv topil, 96 % etanola oziroma DMSO, v katerih smo raztopili ekstrakte oziroma sintetične molekule AHL, na odziv poročevalskih sevov (negativna kontrola).

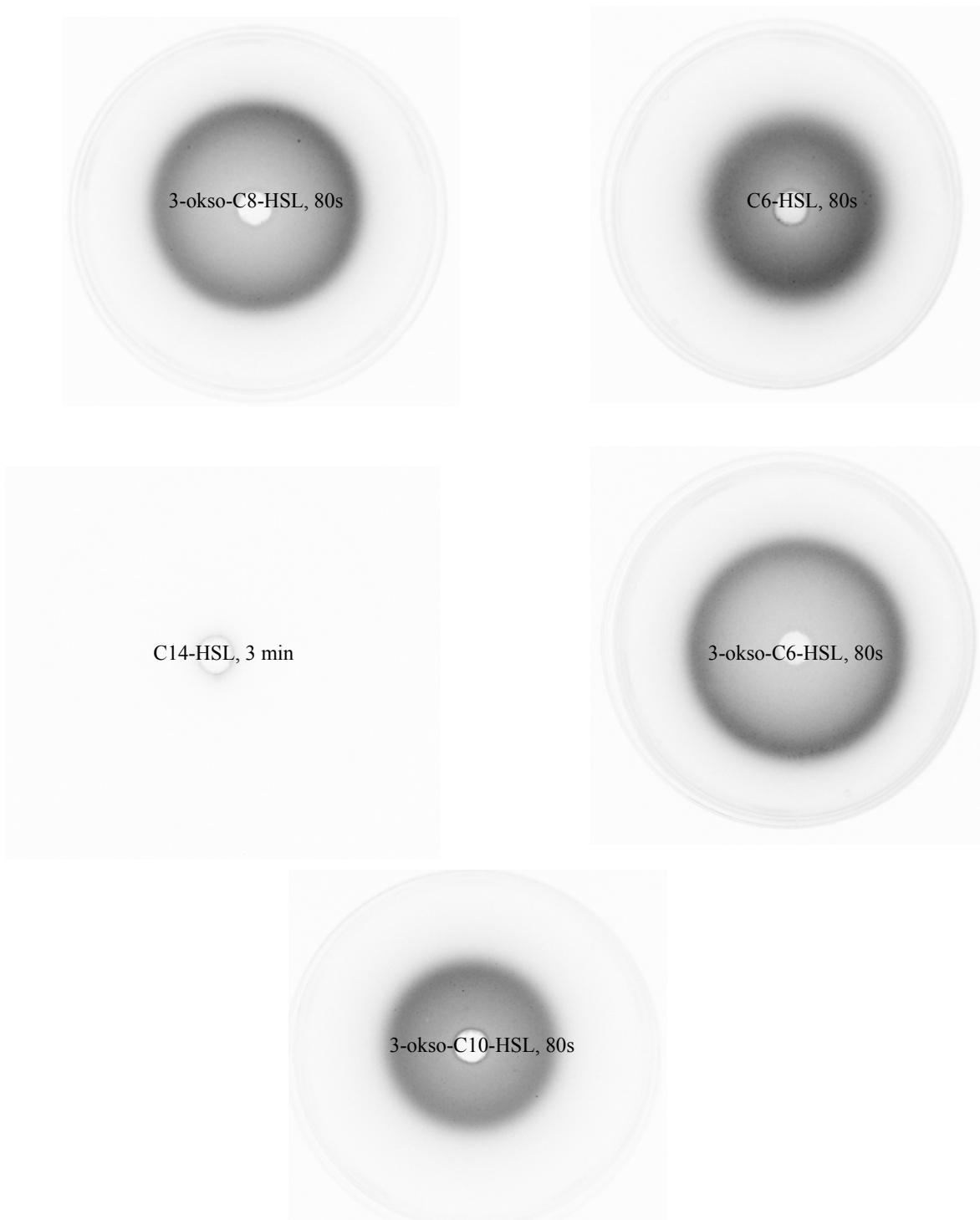
Potrdili smo odzivnost le dveh poročevalskih sevov. Poročevalski sev bakterije *A. tumefaciens* NT1 se ni odzval na nobeno od testiranih sintetičnih molekul AHL ali čisto topilo. Bakterija *C. violaceum* CV026 se je odzvala na vse tri sintetične molekule AHL (pozitivna kontrola), cona vijolične barve okoli jamice z C14-HSL je bila zelo majhna, C14-HSL se je slabo topil v DMSO (slika 9). Ob dodatku DMSO ni prišlo doobarvanja *C. violaceum* CV026.



Slika 9: Plošče s poročevalskim sevom *C. violaceum* CV026 v agariziranem gojišču LB s kanamicinom in dodatkom 50 µL 10 mM sintetičnih molekul AHL v luknjice inkubirane 24 ur pri 28 °C. C14-HSL (spodaj), C6-HSL (zgoraj levo) in 3-okso-C8-HSL (zgoraj desno).

Bakterija *E. coli* JM109 se je odzvala na vseh pet testiranih sintetičnih molekul AHL in sicer si je sledila intenziteta luminiscence od najmanjše proti največji C14-HSL < 3-okso-C10-HSL < C6-HSL < 3-okso-C8-HSL < 3-okso-C6-HSL (slika 10). Celice ob dodatku DMSO niso luminiscirale.

Mutanta R ni odgovorila niti na testirane sintetične molekule AHL, niti na sama topila.



Slika 10: Plošče s poročevalskim sevom bakterije *E. coli* JM109 v agariziranem gojišču LB s kanamicinom in dodatkom 15 µL sintetičnih molekul AHL v luknjice (3-okso-C8-HSL, C6-HSL, C14-HSL, 3-okso-C6-HSL in 3-okso-C10-HSL) s časom zajemanja slike 80 sekund in 3 minute za C14-HSL, inkubirane 24 ur pri 37 °C.

Preverili smo tudi vpliv IG pripravljenega iz kulture *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasla v PKS 3 % NaCl na vse štiri poročevalske seve, kjer tudi nismo opazili nikakršnega fiziološkega odziva.

Nato smo preverili odziv poročevalskih sevov na ekstrakt signalnih molekul divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 še z difuzijsko metodo v jamicah. S to metodo smo potrdili rezultate pridobljene s pravokotnim nacepljanjem na plošče, odzvala sta se le poročevalska seva, mutanta R in bakterija *E. coli* JM109.

Odziv bakterij *C. violaceum* CV026 in *A. tumefaciens* NT1, ki smo ga dobili z difuzijsko metodo v jamicah, je tudi sovpadal z odzivom dobljenim s pravokotnim nacepljanjem. Poročevalska seva se nista odzvala na ekstrakt signalnih molekul, zato smo ju v nadaljnjih testih izključili.

Poročevalski sev mutante R se je odzval na 100 x koncentriran ekstrakt signalnih molekul, ekstrahiranih iz IG *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v PKS 3 % NaCl, raztopljenih v 96 % etanola (močnejši odziv) ali DMSO (šibkejši odziv) (slika 11). Zaradi močnejšega odziva mutante R na ekstrakt signalnih molekul raztopljen v 96 % etanolu, smo v nadaljnjih poskusih opustili raztapljanje v DMSO.



Slika 11: Plošči s poročevalskim sevom mutanto R v agariziranem gojišču PKS 3 % NaCl z dodatkom 100 μ L 100 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul resuspendiranega v DMSO (levo) ali 96 % etanol (desno), inkubirani 24 ur pri 28 °C.

Poročevalski sev bakterije *E. coli* JM109 se je odzval šele na 200 x koncentriran ekstrakt signalnih molekul, ekstrahiranih iz IG PKS 3 % NaCl divjega seva *Vibrio* sp., raztopljen v 96 % etanolu (slika 12).



Slika 12: Plošča s poročevalsko bakterijo *E. coli* JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom in dodatkom 100 µL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul raztopljenega v 96 % etanolu, s časom zajemanja slike 10 minut, inkubirana 24 ur pri 37 °C.

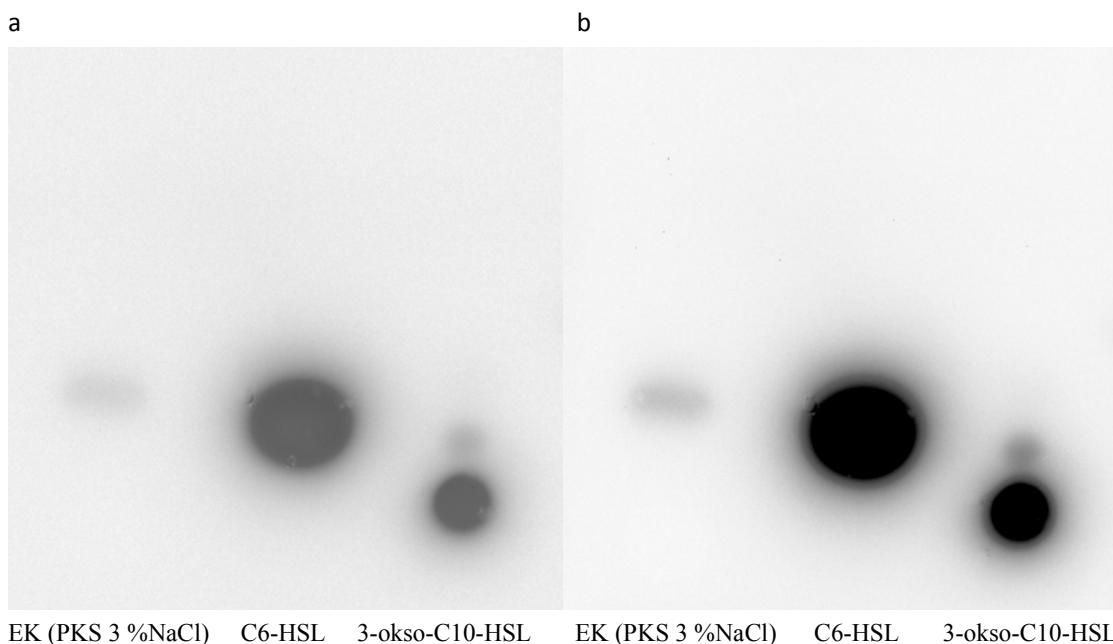
S pravokotnim nacepljanjem na plošče in difuzijsko metodo v jamicah smo določili prisotnost signalnih molekul pri divjem sevu *Vibrio* sp. DSM14379. Po preverjanju ustreznosti poročevalskih organizmov smo izbrali dva ustrezna poročevalska seva, ki sta odgovorila na ekstrakt signalnih molekul, za nadaljne določanje tipa signalnih molekul divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379.

4.1.2 Določanje tipa signalnih molekul

Z metodo tankoplastne kromatografije smo želeli določiti tip signalnih molekul divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379. Uporabili smo le dva tipa sintetičnih molekul AHL (C6-HSL, 3-okso-C10-HSL). C14-HSL smo izločili zaradi izredno šibkega odziva, medtem ko sta 3-okso-C8-HSL in 3-okso-C6-HSL sprožila močno luminiscenco (priloga A) in ni bilo možno določiti luminiscence sosednjih vzorcev. Tudi z dodatkom manjše količine teh dveh standardov na ploščo TLC je bila luminiscenca še vedno močna.

Na ploščo smo poleg dveh sintetičnih molekul AHL nanesli 200 x koncentriran ekstrakt signalnih molekul, ekstrahiran iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz PKS 3 % NaCl, ki je pri poročevalski bakteriji *E. coli* JM109 spodbudil luminiscenco. Luminiscenca je bila po

48 urah intenzivnejša (slika 13 b) kot po 24 urah (slika 13 a). Ekstrakt signalnih molekul (IG PKS 3 % NaCl) je potoval do linije s sintetičnim C6-HSL (slika 13).



Slika 13: Plošča TLC z nanešenimi 5 μ L standardov C6-HSL in 3-okso-C10-HSL (10mM) ter 100 μ L 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul (EK) iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz PKS 3 % NaCl, prelita s poročevelsko bakterijo *E. coli* JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 15 minut, inkubirana 24 ur (a) in 48 ur (b) na 37 °C.

Tudi mutanta R se je obarvala ob dodatku 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul, ekstrahiranega iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz PKS 3 % NaCl, saj je bila vidna rožnata cona (slika 14). Mutanta R se ni odzvala na vzporedno nanešeni sintetični molekuli AHL (C6-HSL, 3-okso-C10-HSL) na ploščo.



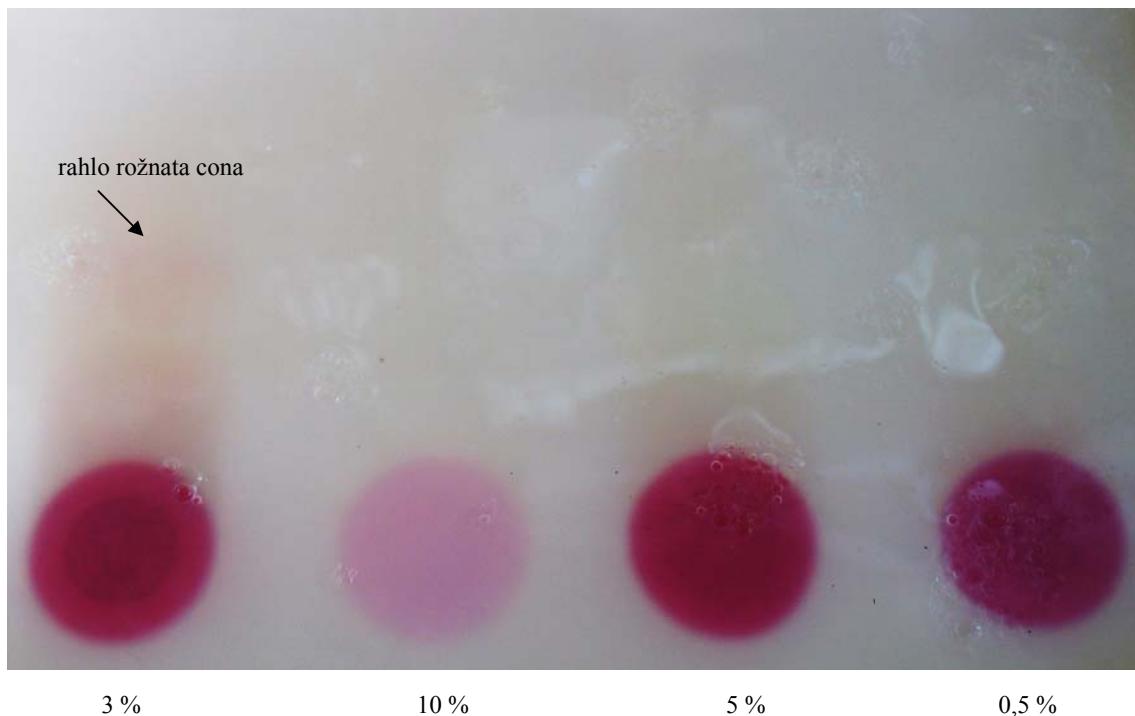
Slika 14: Plošča TLC z nanešenim 100 μL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul ekstrahiranega iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz PKS 3 % NaCl, prelita s poročevalskim sevom mutante R v agariziranem gojišču PKS 3 % NaCl, inkubirana 48 ur na 28 °C.

4.2 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL

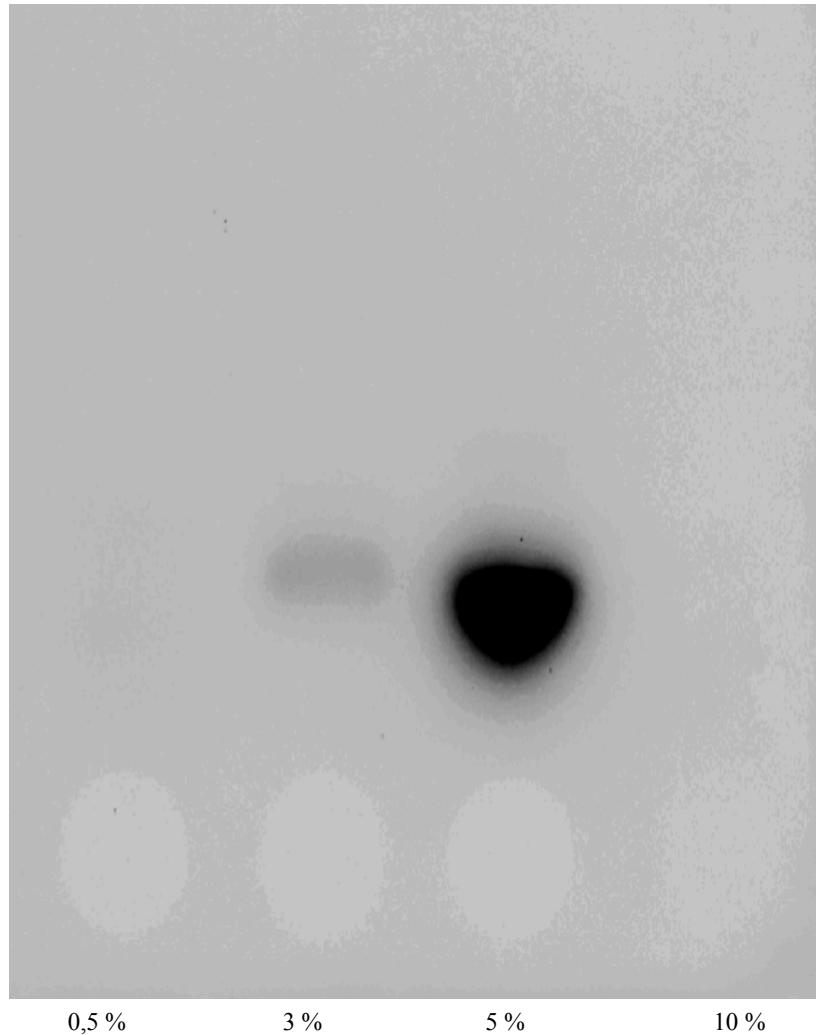
Za določanje vpliva slanosti na produkcijo signalnih molekul pri bakteriji *Vibrio* sp., smo z metodo TLC preverili odgovor poročevalskih sevov na ekstrakte signalnih molekul izoliranih iz PKS gojišč različnih slanosti (0,5 %, 3 %, 5 % in 10 %) ter določili vpliv IG pridobljenega iz različnih slanosti na produkcijo rdečega pigmenta pri mutanti R divjega seva *Vibrio* sp.. Odziv mutante R smo merili s pomočjo določanja količine nastalega pigmenta.

Ugotovili smo, da slanost vpliva na produkcijo signalnih molekul pri divjem sevu *Vibrio* sp. DSM14379. Mutanta R se je odzvala le na ekstrakt signalnih molekul 3 % (w/V) NaCl, kjer

se je pojavila rahlo rožnata cona (slika 15). Poročevalski sev *E. coli* se je odzval na ekstrakt signalnih molekul iz *Vibrio* sp. pridobljenih iz 3 in 5 % (w/V) NaCl (slika 16). Odziv je bil močnejši na ekstrakt signalnih molekul pridobljenih iz 5 % slanosti. Noben poročevalski sev se ni odzval na ekstrakt signalnih molekul, ekstrahiranih iz IG *Vibrio* sp., ki je rasel pri ekstremnih slanostih (0,5 in 10 % (w/V) NaCl).

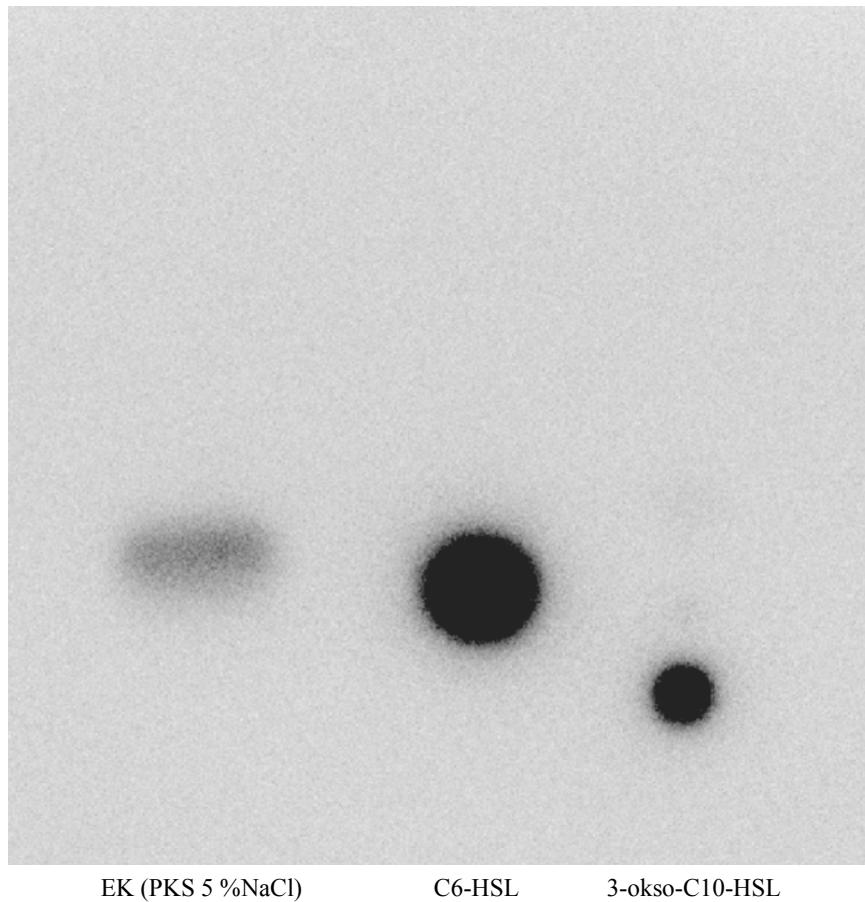


Slika 15: Plošča TLC z nanešenimi $100 \mu\text{L}$ $200 \times$ koncentriranih ekstraktov signalnih molekul ekstrahiranih iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenih iz PKS 0,5 %, 3 %, 5 % in 10 % (w/V) NaCl, prelita s poročevalskim sevom mutante R v agariziranem gojišču PKS 3 % NaCl, inkubirana 48 ur na 28 °C.



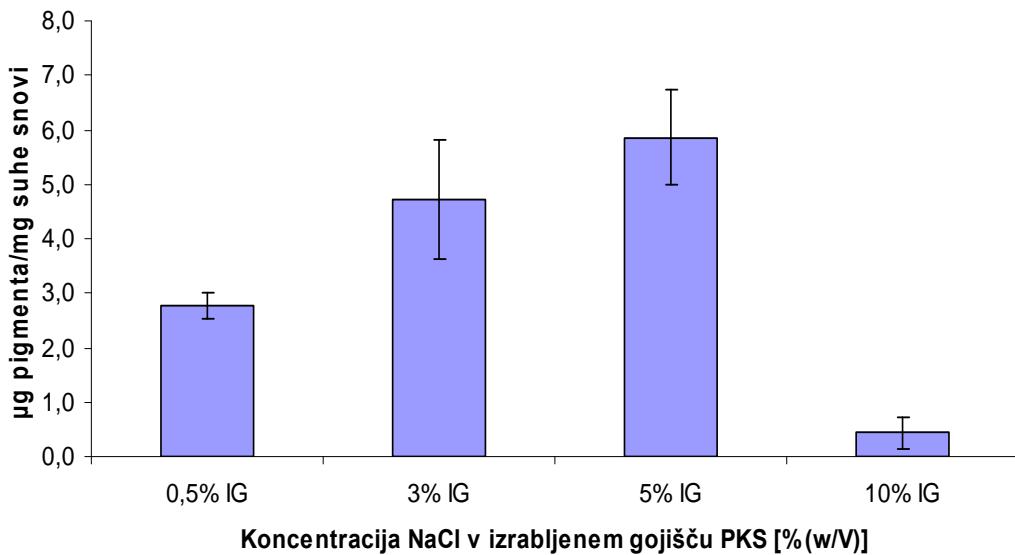
Slika 16: Plošča TLC z nanešenimi $100 \mu\text{L}$ $200 \times$ koncentriranih ekstraktov signalnih molekul ekstrahiranih iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenih iz PKS 0,5 %, 3 %, 5 % in 10 % NaCl, preleta s poročevalskim sevom bakterije *E. coli* JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 30 minut, inkubirana 24 ur na 37°C .

Ker smo dobili močnejši odziv bakterije *E. coli* JM109 na $200 \times$ koncentriran ekstrakt signalnih molekul ekstrahiran iz IG iz PKS 5 % NaCl kot iz IG iz PKS 3 % NaCl, smo na ploščo skupaj s sintetičnimi molekulami AHL nanesli ekstrakt 5 % slanosti, da bi lahko natančneje določili lege ekstrakta signalnih molekul in sintetičnih molekul AHL (slika 17). Ekstrakt signalnih molekul (IG PKS 5 % NaCl) je potoval do linije s sintetičnim C6-HSL.



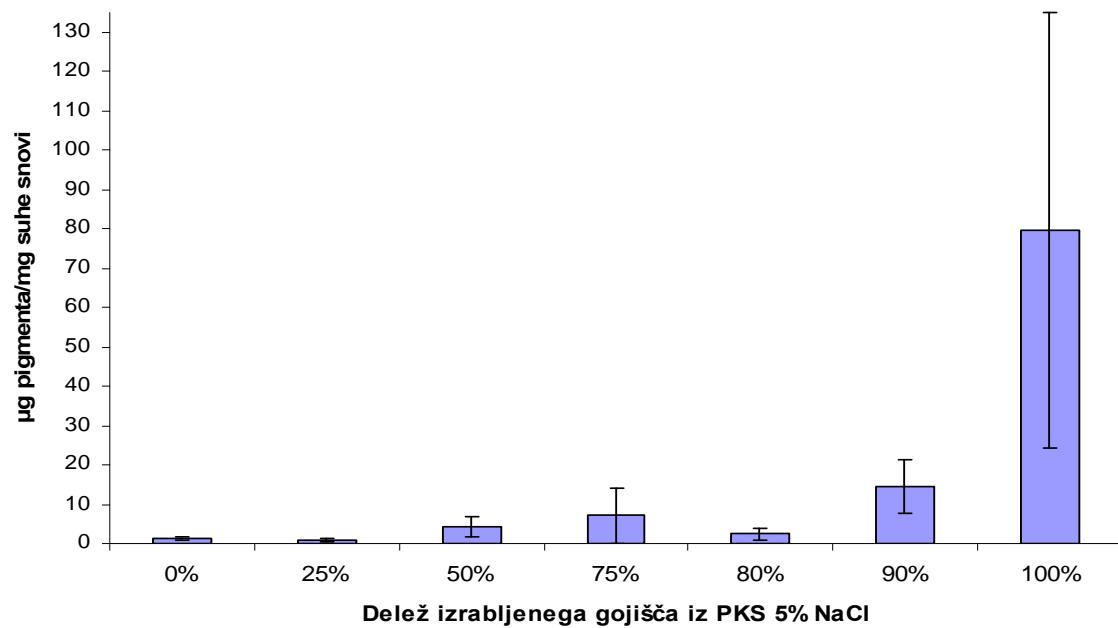
Slika 17: Plošča TLC z nanešenimi 2 µL standardov C6-HSL in 3-okso-C10-HSL (10 mM) ter 100 µL 200 x koncentriranega ekstrakta signalnih molekul iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz gojišča PKS 5 % NaCl, prelita s poročevalskim sevom bakterije *E. coli* JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 15 minut, inkubirana 24 ur na 37 °C.

Slika 18 prikazuje vpliv dodatka IG PKS divjega seva *Vibrio* sp. štirih različnih slanosti kulturi mutante R. Vpliv smo merili z določanjem količine pigmenta, ki ga je v gojišče izločila mutanta R. Krivulja je zvonaste oblike, z vrhom pri dodatku IG iz PKS 5 % NaCl (6 µg pigmenta na mg suhe snovi). Pri dodatku IG iz 10 % slanosti je bilo proizvedenega zelo malo pigmenta (13 x manj kot pri 5 % slanosti), količina nastalega pigmenta pri dodatku IG iz 3 % slanosti je podobna količini nastalega pigmenta pri 5 % slanosti. Pri dodatku IG iz 0.5 % slanosti je bila količina nastalega pigmenta približno dvakrat manjša kot pri dodatku IG iz 5 % slanosti. Rezultati sovpadajo z rezultati profila metode TLC s poročevalskim sevom *E. coli* JM109 (slika 16).



Slika 18: Količina pigmenta v celicah rožnate mutante divjega seva *Vibrio* sp., ki so rasle v gojišču PKS z dodatkom 50 % (V/V) IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz PKS različnih slanosti pri 28 °C. V vseh primerih je bila končna koncentracija NaCl pri kateri je rasla mutanta R divjega seva *Vibrio* sp 5 %.

Ker je bila produkcija pigmenta najvišja ob dodatku IG 5 % NaCl, smo določili tudi vpliv različnih količin IG iz PKS 5 % NaCl z merjenjem odziva poročevalskega seva mutante R (slika 19). Sama kultura mutante R brez dodanega IG je proizvedla zelo malo pigmenta (1,14 µg pigmenta/mg suhe snovi). Količina pigmenta ni signifikantno naraščala s količino IG do 80 %, medtem ko je prišlo do znatnega povečanja pigmentacije pri 90 in 100 % IG. Količine pigmenta z različnimi deleži (25 %-90 %) izrabljenih gojišč se med seboj signifikantno ne razlikujejo ($p > 0.05$), statistično se razlikuje le količina pigmenta pri 100 % IG ($p < 0.05$) (priloga B).



Slika 19: Količina pigmenta v celicah rožnate mutante divjega seva *Vibrio* sp., ki so rasle v gojišču PKS 5 % NaCl z dodatkom različnih količin IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenega iz PKS 5 % NaCl pri 28 °C.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Cilj diplomskega dela je bil določiti signalne molekule pri medceličnem sporazumevanju in vpliv slanosti na njihovo produkcijo pri bakteriji *Vibrio* sp. V ta namen smo izolirali signalne molekule iz IG divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 ter poskušali določiti vrsto signalnih molekul s pomočjo poročevalskih sevov za detekcijo molekul AHL. Določili smo tudi vpliv slanosti na produkcijo signalnih molekul ter vpliv dodatka IG PKS 5 % (w/V) NaCl na produkcijo rdečega pigmenta mutante R divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379.

5.1 DOLOČANJE SIGNALNIH MOLEKUL

Sistem zaznavanja celične gostote je splošno razširjen med vibriji, ki naseljujejo morsko okolje (Milton, 2006). *Vibrio* sp. DSM14379 sintetizira prodigiozinu podoben pigment in znano je, da pri bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006 sintezo pigmenta nadzoruje AHL QS-sistem (Fineran in sod., 2005). Ker je AHL QS-sistem splošno razširjen med po Gramu negativnimi bakterijami, smo sklepalni na tak tip signaliziranja pri bakteriji *Vibrio* sp. Tako smo za določanje signalnih molekul uporabili tipične biosenzorske sisteme za določanje molekul AHL. En sam biosenzorski sistem ne more detektirati vseh tipov molekul AHL, ki jih sintetizira preučevani sev (Ravn in sod., 2001), zato je potrebno testiranje s pomočjo več biosenzorskih sistemov.

Signalne molekule smo ekstrahirali iz IG s kislim etil acetatom (0,5 % (V/V) metanojska kislina), ker je učinkovitost ekstrakcije s kislim etil acetatom dvakrat večja kot s samim etil acetatom (Ravn in sod., 2001). Signalne molekule smo detektirali s pomočjo treh znanih poročevalskih sevov (*Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDCI41E33), *Chromobacterium violaceum* CV026 in *Escherichia coli* JM109 (pSB401) in mutante R ter njihovih fenotipskih odgovorov (β -galaktozidazna aktivnost, produkcija violaceina, bioluminiscenca in produkcija rdečega pigmenta). Prvi trije poročevalski sevi imajo okvarjen gen za sintazo AHL, medtem ko je bila pri mutanti R taka okvara le predlagana. Štraser (2008) navaja, da ima mutanta R divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 najverjetnejše okvarjene gene za sintezo signalnih molekul, ki so vpleteni v pigmentacijo mutante. Na ekstrakt signalnih molekul *Vibrio* sp. sta odgovorila le dva poročevalska seva, to sta bakterija *E. coli* in mutanta R.

Občutljivost detekcijskega sistema se je izkazala za izredno pomemben parameter. Ugotovili smo, da je od treh metod (pravokotno nacepljanje na plošče, difuzijska metoda v jamicah in tankoplastna kromatografija), ki smo jih uporabili za določanje tipa signalnih molekul, ki jih producira divji sev *Vibrio* sp. DSM14379, najmanj občutljiva metoda tankoplastne

kromatografije, s katero smo detektirali šele 200 x koncentriran ekstrakt signalnih molekul, medtem ko je najbolj občutljiva metoda pravokotno nacepljanje na plošče, saj je za odziv poročevalskih sevov zadostovala že njihova rast v bližini divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379, ki je sproščal v okolico signalne molekule ter na ta način posredoval signal poročevalskim sevom. Z difuzijsko metodo v jamicah smo z mutantom R zaznali 100 x koncentriran ekstrakt signalnih molekul, medtem ko smo z bakterijo *E. coli* JM109 zaznali šele 200 x koncentriran ekstrakt signalnih molekul. Difuzijsko metodo v jamicah smo uporabili le kot detekcijsko metodo in ne kot kvantitativno metodo. Medina-Martínez in sodelavci (2006) so poročali o slabih občutljivosti difuzijske metode v jamicah. Metodo so opisali kot semi-kvantitativno metodo ne kot pravo kvantitativno metodo. Z nobeno metodo nismo zaznali signalnih molekul v samem IG bakterije *Vibrio* sp.. Pokazali smo tudi, da topili (tako 96 % etanol kot DMSO) nista vplivali na odzivanje poročevalskih organizmov.

Sama občutljivost detekcije je odvisna tudi od spodnje meje koncentracije signalnih molekul, ki jo je določen poročevalski sev še sposoben zaznati. Poročevalski sev *A. tumefaciens* odgovori na izredno nizke koncentracije sorodnih signalnih molekul *tra* sistema (0,5 fmol 3-okso in 3-hidroksi derivatov AHL, mnogo manj za večino 3-nesubstituiranih AHL in ne odgovori na C4-HSL), medtem ko ostali biosenzorski sistemi zahtevajo precej višje koncentracije signalnih molekul za detekcijo (Shaw in sod., 1997). CviR pri bakteriji *Chromobacterium violaceum* se odziva predvsem na kratkoverižne nesubstituirane molekule AHL (McClean in sod., 1997), LuxR pri bakteriji *Vibrio fischeri* odgovarja na molekule AHL z ogljikovimi verigami C6 ali C8 z ali brez 3-okso substitucije (Winson in sod., 1998b). Poročevalski sev *A. tumefaciens* se ni odzval na nobeno od testiranih sintetičnih molekul AHL, zato smo ga izločili iz poskusov. Poročevalski sev *C. violaceum* ni zaznal nobene molekule AHL v ekstraktu signalnih molekul *Vibrio* sp., možno je, da *Vibrio* sp. proizvaja tak tip signalnih molekul, na katere R protein bakterije *C. violaceum* ne odgovarja ali proizvaja signalne molekule v tako nizkih koncentracijah, ki jih ta poročevalski sev ne more zaznati. R proteini so namreč visoko specifični za sorodne AHL signalne molekule, vendar lahko na njihove analoge odgovorijo le, če so prisotni v dovolj visokih koncentracijah (Shaw in sod., 1997). Poročevalski sev *E. coli* je odgovoril na ekstrakt signalnih molekul *Vibrio* sp., saj smo bioluminiscenco zaznali z vsemi tremi detekcijskimi metodami. S TLC metodo smo lahko primerjali retencijski faktor (Rf) vzorca z Rf standardov ter določili, da je ekstrakt signalnih molekul *Vibrio* sp. v liniji s standardom C6-HSL. Za 3-nesubstituirane derivate molekul AHL so značilne okrogle lise z jasnimi robovi na ploščah TLC, ekstrakt signalnih molekul *Vibrio* sp. je proizvajal lise z nejasnimi robovi, lise z repi in nejasnimi robovi so značilne za 3-okso derivate molekul AHL (Shaw in sod., 1997). Poročevalski sev mutanta R ni odgovorila na nobeno testirano sintetično molekulo AHL, odgovarja le na ekstrakt signalnih molekul *Vibrio* sp., tako ne moremo trditi, da je profil TLC s poročevalskim sevom *E. coli* resnično dokazal, da je v ekstraktu signalnih molekul prisoten C6-HSL. Možno je tudi, da mutanta R nima

okvare v sintezi signalnih molekul, ampak v sintezi katerega od prekurzorjev pigmenta, ki morda ostanejo v ekstraktu signalnih molekul pridobljenem iz IG kulture *Vibrio* sp. in ob dodatku kulturi mutante R sprožijo njen ponovno pigmentacijo.

Poleg tega lahko, da *Vibrio* sp. sintetizira več različnih tipov signalnih molekul, ki jih z našimi poročevalskimi sevi nismo mogli določiti. Signalna molekula, ki je močno aktivna lahko prikrije manj aktivno, ki potuje na plošči TLC s podobnim, a ne identičnim Rf. Uporaba novih poročevalskih sevov bi močno pripomogla k detekciji novih signalnih molekul in občutljivosti TLC metode (Shaw in sod., 1997). Thomson in sodelavci (2000) so pri bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006 pokazali, da proizvaja tip signalnih molekul C6-HSL v manjših koncentracijah ter da lahko dodatek oksogenega C6-HSL inducira izražanje prodigiozina v mutantni *smaI* seva *Serratia* sp. ATCC39006. Tako bi lahko za potrditev, da bakterija *Vibrio* sp. res sintetizira C6-HSL tip signalnih molekul uporabili kot poročevalski sev *SmaI* mutanto bakterije *Serratia marcescens*, ki ima okvaro v sintezi C6-HSL in N-butanoil-HSL, ki je njen glavni produkt. Da bi mutanto R lahko zagotovo obravnavali kot poročevalski sev za detekcijo signalnih molekul, ki so vpletene v regulacijo rdečega pigmenta, bi morali določiti mesto mutacije v njenem genomu, ki je povzročila okrnitev pigmentacije.

Možno je tudi, da sistem zaznavanja celične gostote pri bakteriji *Vibrio* sp. sploh ni povezan s tipom signalnih molekul AHL, morda je tu vpletен nek drug tip signalov, ki prav tako spodbudijo odziv poročevalskega seva *E. coli* JM109 (pSB401). Holden in sodelavci (1999) so ugotovili, da lahko molekule DKP, ki so prisotne pri nekaterih po Gramu negativnih bakterijah, igrajo vlogo molekul AHL, saj imajo podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot kratkoverižne molekule AHL in sprožijo odziv poročevalskega seva *E. coli* (pSB401). Prav tako so za sproženje odziva potrebne precej višje koncentracije DKP kot molekul AHL, kar bi lahko pojasnilo nizko občutljivost poročevalskega seva *E. coli* na dodan ekstrakt signalnih molekul bakterije *Vibrio* sp.. Tip signalnih molekul pri *Vibrio* sp. bi najlažje določili z določitvijo kemijske strukture z uporabo MS in NMR tehnik (Holden in sod., 1999).

5.2 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SIGNALNIH MOLEKUL

Danevčič in sodelavci (2005) so izbrali reprezentativne koncentracije soli (0.5, 3 in 10 % (w/V) NaCl) glede na porazdelitev hitrosti rasti bakterije *Vibrio* sp., na podlagi tega smo si izbrali iste tri koncentracije soli ter 5 % (w/V) NaCl. Številni avtorji navajajo vpliv okoljskih dejavnikov na produkcijo signalnih molekul (Yates in sod., 2002; Farah in sod., 2005; Medina-Martínez in sod., 2005; Medina-Martínez in sod., 2006; Horswill in sod., 2007; Williams in sod., 2007; Latour in sod., 2007). Divji sev *Vibrio* sp. DSM14379 je halotoleranten mikroorganizem, ki najbolje raste pri optimalni koncentraciji NaCl 3 % (w/V). Zanimalo nas je kako odstopanja od optimalne koncentracije soli vplivajo na produkcijo signalnih molekul in posledično na produkcijo rdečega pigmenta. Pri ekstremnih slanostih

(0,5 in 10 % (w/V) NaCl) je produkcija pigmenta močno zmanjšana (Starič, 2007), ugotovili smo, da takšni pogoji vplivajo tudi na produkcijo signalnih molekul. Z metodo TLC pri ekstremnih slanostih nismo dobili odgovora poročevalskih sevov *E. coli* in mutante R. Najverjetnejše je pri teh pogojih koncentracija signalnih molekul padla pod mejo detekcije. Ob dodatku IG, pridobljenega iz kultur *Vibrio* sp. gojenih v PKS različnih slanosti, mutanti R je bila sinteza pigmenta močno zmanjšana pri ekstremnih slanostih, negativen vpliv je bil precej večji pri 10 % kot pri 0,5 % (w/V) NaCl. Medina-Martínez in sodelavci (2005) so ugotovili, da ob višanju koncentracije NaCl pada produkcija signalnih molekul C4-HSL pri bakteriji *Aeromonas* spp., pri visokih koncentracijah NaCl niso več zaznali signalnih molekul, kar so povezali s slabo rastjo kulture (nizek CFU/mL). V našem primeru je bil OD₆₅₀ kultur divjega seva *Vibrio* sp., ki so rasle v gojišču PKS različnih slanosti, nekoliko nižji pri ekstremnih slanostih, vendar pa rast ni bila zelo zmanjšana (Priloga B), Verjetno je vzrok zmanjšane produkcije pigmenta pri ekstremnih slanostih odsotnost signalnih molekul.

Sestava IG se močno razlikuje od svežega gojišča, tekom gojenja se kopičijo številni bakterijski produkti, ki lahko sprožijo različne odgovore (Winzer in sod., 2002), ki vplivajo pozitivno ali negativno na signaliziranje, zato je lahko odziv kot posledica signaliziranja precenjen ali podcenjen. Količina dodanega IG PKS 5 % NaCl kulturi mutante R je signifikantno vplivala na produkcijo pigmenta pri mutanti R, samo v primeru, ko smo dodali 100 % IG. Možno je, da so na produkcijo pigmenta mutante R vplivale tudi druge komponente IG in ne le molekule AHL, kar bi lahko držalo, če bi bilo v IG prisotnih več intermedirov sinteze pigmenta ter če mutanta R nima mutacije v sintazi signalnih molekul, pač pa nekje v biosintetski poti pigmenta.

5.3 SKLEPI

Z našimi eksperimenti smo potrdili, da je pri divjem sevu *Vibrio* sp. DSM14379:

- sinteza rdečega pigmenta uravnana s sistemom zaznavanja celične gostote najverjetneje odvisnim od molekul AHL
- možna signalna molekula bi lahko bila C6-HSL
- detekcija signalnih molekul je bila najbolj občutljiva z metodo pravokotnega nacepljanja na plošče, manjša z difuzijsko metodo v jamice in najmanj občutljiva pri metodi TLC (potrebno do 200 x koncentriranje), detekcija je bila odvisna tudi od specifičnosti poročevalskega seva
- produkcija signalnih molekul je odvisna od slanosti in je najvišja pri 3 % (detekcija z mutanto R) oziroma 5 % (detekcija z *E.coli*) slanosti, kjer je rast *Vibrio* sp. hitra, medtem ko je bila močno zmanjšana pri ekstremnih slanostih

6 POVZETEK

Sporazumevanje med bakterijami je splošno razširjeno (Keller in Surette, 2006). Medcelično sporazumevanje, kjer sodelujejo majhne signalne molekule, je prvič omenil kot termin zaznavanja celične gostote Fuqua s sodelavci (1994). Zaznavanje celične gostote temelji pri po Gramu negativnih bakterijah na signalnih molekulah AHL. Sporazumevanje z molekulami AHL so najprej opisali pri bakteriji *Vibrio fischeri* (Nealson in sod., 1970). Tipi molekul AHL se strukturno razlikujejo v dolžini ogljikovih verig in substituciji acilne stranske verige (Greenberg, 1979). Različni homologi sintaz LuxI so odgovorni za sintezo molekul AHL. Detekcija molekul AHL poteka s pomočjo poročevalskih sevov in njihovih fenotipskih odgovorov (bioluminiscenca, produkcija violaceina, β -galaktozidazna aktivnost) (Ravn in sod., 2001). Med po Gramu negativnimi bakterijami so zastopani še drugi manj poznani tipi signalnih molekul (AI-2 molekule, diketopiperazini, AI-3 molekule, DSF in DF, indol, antibiotiki in druge). Te signalne molekule uravnavajo različne procese v bakterijski celici. Pri bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006 je s sistemom AHL zaznavanja celične gostote regulirana sinteza rdečega pigmenta prodigiozina (Slater in sod., 2003).

Mikroorganizmi so ves čas pod vplivom okoljskih dejavnikov kot so temperatura, pH, dostopnost hranil, slanost (Whitehead in sod., 2001). Številni avtorji navajajo, da je produkcija molekul AHL občutljiva na spremembe parametrov v okolju (Yates in sod., 2002; Farah in sod., 2005; Medina-Martínez in sod., 2005; Medina-Martínez in sod., 2006; Horswill in sod., 2007; Williams in sod., 2007; Latour in sod., 2007).

V diplomske nalogi smo preučevali tip signalnih molekul, ki uravnava sintezo rdečega prodigiozinu podobnega pigmenta pri divjem sevu *Vibrio* sp. DSM14379 ter vpliv slanosti na sintezo signalnih molekul. V ta namen smo izolirali in identificirali signalne molekule divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 s pomočjo znanih poročevalskih sevov za detekcijo molekul AHL (*Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDCI41E33), *Chromobacterium violaceum* CV026, *Escherichia coli* JM109 (pSB401) in mutante R). Določili smo tudi vpliv slanosti na sintezo signalnih molekul z metodo TLC (odziv poročevalskih sevov na ekstrakte signalnih molekul različnih slanosti) ter vpliv IG pridobljenega iz različnih slanosti kulturi mutante R in merili odziv mutante R s pomočjo določanja količine nastalega pigmenta.

Dobljeni rezultati kažejo, da je sinteza rdečega pigmenta pri divjem sevu *Vibrio* sp. DSM14379 uravnana s sistemom zaznavanja celične gostote najverjetneje odvisnim od molekul AHL ter da bi lahko bil tip molekul AHL C6-HSL. Prav tako smo ugotovili, da je detekcija signalnih molekul močno odvisna od občutljivosti detekcijske metode ter od občutljivosti in specifičnosti poročevalskega seva. Potrdili smo hipotezo, da je produkcija signalnih molekul odvisna od slanosti in je najvišja pri 3 % slanosti, kjer je rast *Vibrio* sp. optimalna, medtem ko je močno zmanjšana pri ekstremnih slanostih.

7 VIRI

- Ahmer B.M.M. 2004. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Molecular Microbiology, 52: 933-945.
- Barber C.E., Tang J.L., Fend J.X., Pan M.Q., Wilson T.J.G., Slater H., Dow J.M., Williams P., Daniels M.J. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. Molecular Microbiology, 24: 555-566.
- Bassler B. L., Wright M., Showalter R. E. Silverman, M. R. 1993. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. Molecular Microbiology, 9: 773–786.
- Bassler B.L., Wright M., Silverman M.R. 1994a. Multiple signalling systems controlling expression of luminiscence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. Molecular Microbiology, 13, 2: 273-286.
- Bassler B.L., Wright M., Silverman M.R., 1994b. Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. Molecular Microbiology, 12: 403–412.
- Bassler B. L., Greenberg E. P., Stevens, A. M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology, 179: 4043-4045.
- Bennett J.W., Bentley R. 2000. Seeing red: the story of prodigiosin. Advances in Applied Microbiology, 47: 1-32.
- Bu'Lock J.D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Annual Review of Microbiology, 3: 293-342.
- Cerdeño A.M., Bibb M.J. Challis G.L. 2001. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. Chemistry and Biology, 8: 817–829.
- Cha C., Gao P., Chen Y-C., Shaw P.D., Farrand S.K. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions, 11, 11: 1119-1129.

- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B.L., Hughson F.M. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 15: 545-549.
- Coulthurst S.J., Kurz C.L., Salmond G.P. C. 2004. *luxS* mutants of *Serratia* defective in autoinducer-2-dependent ‘quorum sensing’ show strain-dependent impacts on virulence and production of carbapenem and prodigiosin. *Microbiology*, 150: 1901–1910.
- Danevčič T., Rilfors L., Štrancar J., Lindblom G., Stopar D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712: 1-8.
- Danevčič T. 2006. Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 94 str.
- Eberl L., Winson M.K., Sternberg C., Stewart G.S.A.B., Christiansen G., Chhabra S.R., Bycroft B., Williams P., Molin S., Givskov M. 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Molecular Microbiology*, 20: 127-136.
- Engebrecht J., Nealson K.L. Silverman M. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of the functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 32: 773-781.
- Farah C., Vera M., Morin D., Haras D., Jerez C.A., Giuliani N. 2005. Evidence for a functional quorum sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7033–7040.
- Fineran P.C., Slater H., Everson L., Hughes K., Salmond G.P.C. 2005. Biosynthesis of tripyrrole and β-lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Molecular Microbiology*, 6, 56: 1495-1517.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176: 269-275.
- Gera C., Srivastava S. 2006. Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. *Current Science*, 90, 5: 666- 677.

- Gerth K., Metzger R., Reichenbach H. 1993. Induction of myxospores in *Stigmatella aurantiaca* (myxobacteria): inducers and inhibitors of myxospore formation and mutants with a changed sporulation behavior. *Journal of General Microbiology*, 139: 865–871.
- Gram L., Christensen A.B., Ravn L., Molin S., Givskov M. 1999. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the *Enterobacteriaceae* isolated from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 8458–3463.
- Greenberg E.P., Hastings J.W., Ulitzur S. 1979. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria. *Archives of Microbiology*, 120: 87-91.
- Harris A.K.P., Williamson N.R., Slater H., Cox A., Abbasi S., Foulds I., Simonsen H.T., Leeper F.J., Salmond G.P.C. 2004. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species-and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*, 150: 35547- 3560.
- Henke J.M., Bassler B.L., 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 186: 3794–3805.
- Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T. Yamaguchi A. 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 55: 1113–1126.
- Holden M.T.G., Chhabra S.R., Nys R., Stead P., Bainton N.J., Hill P.J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England D., Rice S., Givskov M., Salmond G.P.C., Stewart G.S.A.B., Bycroft B.W., Kjelleberg S., Williams P. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 33, 6: 1254-1266.
- Holden M.T.G., Diggle S.P. Williams P. 2007. Quorum sensing. V: Encyclopedia of life sciences. Chichester, John Wiley & Sons Ltd., (marec, 2010): 1-17.
<http://www.els.net/> (doi: 10.1002/9780470015902.a0001426.pub2).
- Hood D.W., Heidstra R., Swoboda U.K., Hodgson D.A. 1992. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interactions between primary and secondary metabolism. *Gene*, 115: 5-12.
- Horng Y.T., Deng S.C., Daykin M., Soo P.C., Wei J.R., Luh K.T., Ho. S.W., Swift S., Lai H.C., Williams P. 2002. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator

of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*.
Molecular Microbiology, 45: 1655-1671.

Horswill A.R., Stoodley P., Stewart P.S., Parsek M.R. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 371–380.

Hubbard R., Rimington C. 1950. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochemical Journal*, 46, 2: 220-225.

Jobling M.G., Holmes R.K. 1997. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. *Molecular Microbiology*, 26: 1023–1034.

Keller L., Surette M.G. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 249-258.

Latour X., Diallo S., Chevalier S., Morin D., Smadja B., Burini J-F., Haras D., Orange N. 2007. Thermoregulation of N-Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 12: 4078-4081.

Laue B.E., Jiang Y., Chhabra S.R., Jacob S., Stewart G.S.A.B., Hardman A., Downie J.A., O'Gara F., Williams P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, 146: 2469-2480.

Lee J., Jayaraman A., Wood T. K. 2007. Indole is an interspecies biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology*, 7: 42-42.

Lilley B.N., Bassler B.L. 2000. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Molecular Microbiology*, 36: 940-954.

Lithgow J. K., Wilkinson A., Hardman A., Rodelas B., Wisniewski-Dye F., Williams P. Downie J. A. 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Molecular Microbiology*, 37: 81-97.

- McClean K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Camara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology*, 143: 3703-3711.
- Medina-Martínez M.S., Uyttendaele M., Demolder V., Debevere J. 2006. Effect of temperature and glucose concentration on the N-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*. *Food Microbiology*, 23: 534-540.
- Medina-Martínez M.S., Uyttendaele M., Demolder V., Debevere J. 2005. Influence of food system conditions on N-acyl-L-homoserine lactones production by *Aeromonas* spp.. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 244-252.
- Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K., Bassler B.L. 2002. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 110: 303-314.
- Milton D.L. 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 61-71.
- Nealson K. H., Platt T., Hastings J. W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104: 313-322.
- Pinto U.M., Viana E.S., Martins M.L., Vanetti M.C.D. 2007. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control*, 18: 1322-1327.
- Poplawsky A.R., Chun W., Slater H., Daniels M.J., Dow M. 1998. Synthesis of extracellular polysaccharide, extracellular enzymes and xanthomonadin in *Xanthomonas campestris*: evidence for the involvement of two intercellular regulatory signals. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 11: 68-70.
- Prasad C. 1995. Bioactive diketopiperazines. *Peptides*, 16: 151-164.
- Qadri S.M.H., Williams R.P. 1971. Incorporation of methionine into prodigiosin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 230, 1: 181-184.
- Ravn L., Christensen A.B., Molin S., Givskov M., Gram L. 2001. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 239-251.

Reading N.C., Sperandio V. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiology Letters, 254: 1–11.

Ryan R.P., Dow J.M. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. Microbiology, 154: 1845-1858.

Schaefer A.L., Val D.L., Hanzelka B.L., Cronan J.E., Greenberg E.P., 1996. Generation of cell to cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 9505–9509.

Shaw P.D., Ping G., Daly S.L., Cha C., Cronan Jr. J.E., Rinehart K.L., Farrand S.K. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United states of America, 94: 6036-6041.

Slater H., Crow M., Everson L., Salmond G.P.C. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependet and –independent pathways. Molecular Micobiology, 2, 47: 303-320.

Smith J.L., Fratamico P.M., Novak J.S. 2004. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. Journal of Food Protection, 67, 5: 1053–1070.

Sperandio V., Torres A.G., Giron J.A., Kaper J.B. 2001. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Bacteriology, 183: 5187-5197.

Starič N. 2007. Vpliv okoljskih faktorjev na produkcijo barvila naravnega izolata *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 37 str.

Stopar D., Černe A., Žigman M., Poljšak-Prijatelj M. and Turk V. 2004. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the gulf of trieste. Microbial Ecology, 47: 1-8.

Štraser A. 2008. Opis lastnosti rdečega pigmenta iz naravnega izolata bakterije *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 51 str.

- Thomson N.R., Crow M.A., McGowan S.J., Cox A. Salmond G.P.C. 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Molecular Microbiology*, 36, 3: 539-556.
- Yang Y-H., Lee T-H., Kim J.H., Kim E.J., Joo H-S., Lee C-S., Kim B-G. 2006. High throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications. *Analytical Biochemistry*, 356: 297–299.
- Yates E.A., Philipp B., Buckley C., Atkinson S., Chhabra S.R., Sockett R.E., Goldner M., Dessaux Y., Câmara M., Smith H., Williams P. 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain lengthdependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 70: 5635–5646.
- Yim G., Wang H.H.M., Davies J. 2006. The truth about antibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 163-170.
- Van Houdt R., Moons P., Aertsen A., Jansen A., Vanoirbeek K., Daykin M., Williams P., Michiels C.W. 2007. Characterization of a *luxI/luxR*-type quorum sensing system and N-acyl-homoserine lactone-dependent regulation of exo-enzyme and antibacterial component production in *Serratia plymuthica* RVH1. *Research in Microbiology*, 158: 150-158.
- Wang D., Ding X., Rather P.N. 2001. Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183, 14: 4210-4216.
- Waters C.M., Bassler B.L. 2006. The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes & Development*, 20: 2754-2767.
- Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L., Salmond G.P.C. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 365-404.
- Williams R.P., Gott C.L., Qadri H., Scott R.H. 1971. Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 106, 2: 438-443.
- Williams P., Winzer K., Chan W.C., Câmara M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 1119-1134.

Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J. Salmond G.P. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 887-899.

Winson M.K., Swift S., Fish L., Throup J.P., Jörgensen F., Chhabra S.R., Bycroft B.W., Williams P., Stewart G.S.A.B. 1998a. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 163: 185-192.

Winson M.K., Swift S., Hill P.J., Sims C.M., Griesmayr G., Bycroft B.W., Williams P., Stewart G.S.A.B. 1998b. Engineering the *luxCDABE* genes from *Photorhabdus luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiology Letters*, 163: 193-202.

Winzer K., Hardie K.R., Williams P. 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now-gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology*, 5: 216-222.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju **prof. dr. Davidu Stoparju** za strokovne nasvete, predloge in popravke ter za vso podporo pri izdelavi diplomskega dela.

Najlepša hvala somentorici **asist. dr. Tjaši Danevčič** za pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju diplomske naloge ter za vse nasvete, prijaznost, čas in potrpežljive odgovore na vsa moja vprašanja. Iskrena hvala.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim iz katedre za Mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo (**Simoni, Nejc, Luki, Špeli in vsem ostalim**) za pogovore, smeh in krajanje časa ob delu v laboratoriju. **Julija** hvala za vso družbo, smeh, kavice in jabolčne zavitke ☺

Iskrena hvala tudi **prof. dr. Darji Žgur Bertok** za recenzijo moje diplomske naloge ter predsednici komisije za zagovor diplomskega dela **prof. dr. Ines Mandić Mulec** za posvečen čas in trud.

Nenazadnje hvala tudi vsem **profesorjem in profesoricam**, ki so delili z mano svoje znanje o mikroorganizmih ter vsem **sošolcem** za nepozabna študijska leta.

Vsem članom komisije še iskrena hvala za hitre popravke moje diplome kljub pomanjkanju časa.

Zahvaljujem se tudi:

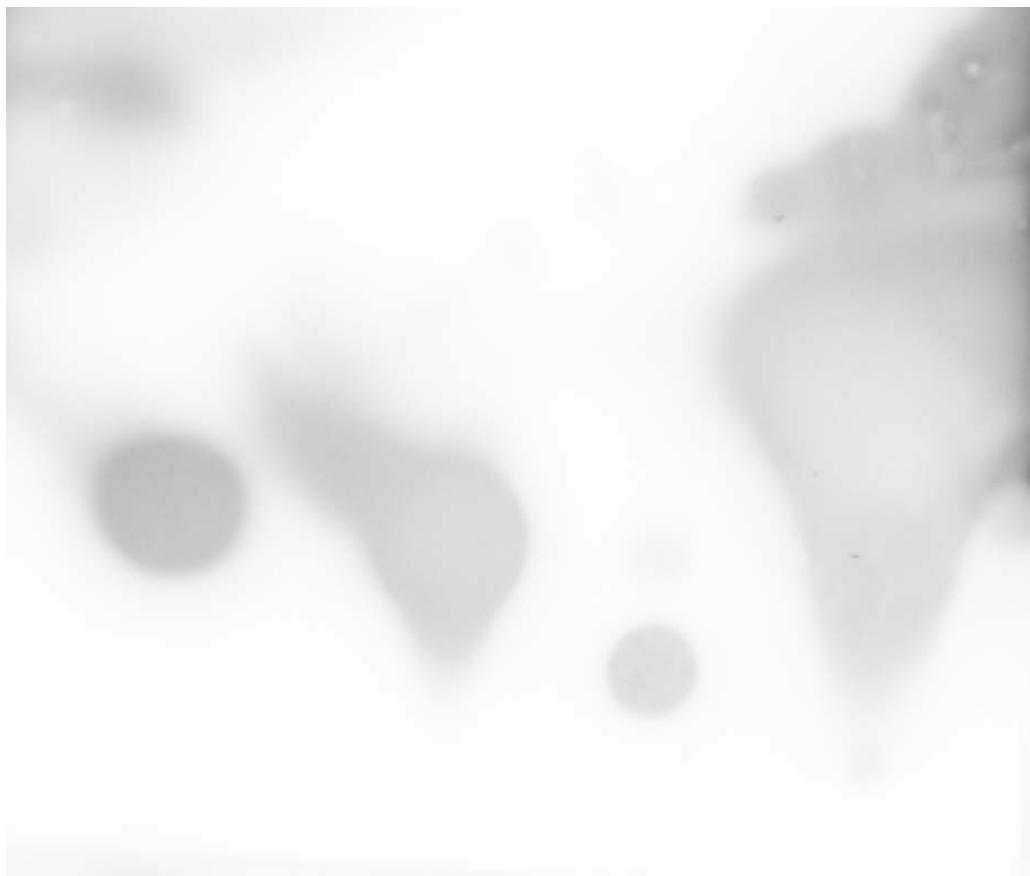
Svojim staršem **mami Nevenki in atku Pavlu** za vse kar sta mi omogočila, za podporo in vse nasvete. Brez vaju ne bi bila danes kar sem.

Hvala tudi **stari mami** za vso podporo.

Za pomoč pri oblikovanju diplome najlepša hvala **bratu Gregu in sestri Tini** za čas in trud ter **fantu Janiju** za pomoč pri oblikovanju diplome, spodbude, potrpežljivost, nasvete, čas in trud, prijateljstvo in ljubezen, ki mi jo daješ.

Hvala vam!

PRILOGE



C6-HSL

3-okso-C8-HSL

3-okso-C10-HSL

3-okso-C6-HSL

Priloga A: Plošča TLC z nanešenimi 5 µL standardov molekul AHL (10 mM), preleta s poročevalskim sevom bakterije *E. coli* JM109 v agariziranem gojišču LB s tetraciklinom, s časom zajemanja slike 3 minute, inkubirana 24 ur na 37 °C.

Priloga B: OD₆₅₀ kultur divjega seva *Vibrio* sp., ki so rasle v gojišču PKS različnih slanosti pri 28 °C, 24 ur.

PKS X %	OD ₆₅₀
PKS 0,5 % NaCl	1,339
PKS 3 % NaCl	1,564
PKS 5 % NaCl	1,602
PKS 10 % NaCl	1,190

Priloga C: p vrednosti pridobljene s T testom za dva neodvisna vzorca izračunane z Microsoft Excel orodjem za analizo. Količine pigmenta v gojiščih z dodanim IG 25 %, IG 50 %, IG 75 %, IG 80 %, IG 90 % in IG 100 % smo primerjali s količino pigmenta v gojišču PKS 5 % NaCl brez dodanega IG. p vrednost manjša od 0,05 določa statistično različne vrednosti, p vrednost večja od 0,05 kaže na enakost vzorcev.

dodatek različnih deležev IG iz PKS 5 % NaCl						
	IG 25 %	IG 50 %	IG 75 %	IG 80 %	IG 90 %	IG 100 %
p vrednost	0,196	0,065	0,110	0,399	0,065	0,048