

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Diana GRUBLJEŠIČ

**IZRAŽANJE GENOV ZA SINTEZO MIKOBAKTINA V  
ODVISNOSTI OD ŽELEZA PRI BAKTERIJAH  
*Mycobacterium avium* PODVRSTE *paratuberculosis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Diana GRUBLJEŠIČ

**IZRAŽANJE GENOV ZA SINTEZO MIKOBAKTINA V ODVISNOSTI  
OD ŽELEZA PRI BAKTERIJAH *Mycobacterium avium* PODVRSTE  
*paratuberculosis***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EXPRESSION OF IRON DEPENDENT MYCOBACTIN SYNTHESIS  
GENES IN *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Inštitututa za fizikalno biologijo (IFB d.o.o.) v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc.dr. Polona Jamnik, za somentorja dr. Aleš Lapanje in za recenzentko doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič.

Mentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Somentor: dr. Aleš Lapanje

Recenzentka: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Diana GRUBLJEŠIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
 DK UDK 579.25:577.21.08(043) = 163.6  
 KG *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*/MAP/homeostaza železa/mikobaktini/sinteza mikobaktinov/izolacija RNA/izražanje genov/molekularno tehnike/verižna reakcija s polimerazo v realnem času/odziv *mbt* genov  
 AV GRUBLJEŠIČ, Diana  
 SA JAMNIK, Polona (mentorica)/LAPANJE, Aleš (somentor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (recenzentka)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
 LI 2012  
 IN IZRAŽANJE GENOV ZA SINTEZO MIKOBAKTINA V ODVISNOSTI OD ŽELEZA PRI BAKTERIJAH *Mycobacterium avium* PODVRSTE *paratuberculosis*  
 TD Diplomsko delo (univerzitezni študij)  
 OP XI, 57 str., 6 pregl., 20 sl., 1 pril., 64 ref.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* (MAP) je patogena bakterija, ki pri prežvekovalcih s preživljjanjem v makrofagih povzroča paratuberkulozo. Mnoge patogene bakterije proizvajajo siderofore, ki z visoko afiniteto do železa omogočajo preživetje tako v gostitelju kot tudi v okolju, kjer je železo težko dostopno. V primerjavi s sorodnimi mikobakterijami, ki proizvajajo mikobaktine, MAP ni sposobna proizvodnje tega siderofora (*in vivo* ali *in vitro*). Kljub temu pa lahko živi in se razmnožuje tako v gostitelju, kot v okolju. Kako torej pridobiva železo, ni jasno. S primerjavo mikobaktinskih operonov sorodnih vrst mikobakterij so v dosedanjih raziskavah ugotovili ohranjenost operona za sintezo mikobaktina tudi pri MAP, vendar z določenimi razlikami v dolžini in zaporedju posameznih genov. V raziskavi smo uporabili dva medija (S+Fe in S-Fe) v katerem smo gojili kulturo MAP (kravji sev CLIJ623) in glede na faze rasti z metodo qPCR opazovali odziv genov vpletenih v sintezo mikobaktina. S primerjanjem rastne krivulje smo ugotovili, da je pri vseh analiziranih genih do največjega odziva prišlo v stacionarni fazi rasti. Geni obeh *mbt* operonov so se v tej fazi izražali v signifikantno večji koncentraciji v mediju brez železa. S tem smo potrdili, da se geni odzivajo na pomanjkanje železa. Ugotovili smo tudi, da imajo enak transkripcijski profil, vendar se odzivi in koncentracije med izraženimi geni razlikujejo. Najnižjo odzivnost smo opazili pri genu *mbtA* (del operona *mbt-I*), ki se je izražal tudi v najmanjši koncentraciji. Ker je transkripcija genov *mbt*-operona regulirana z železo-odvisnim *IdeR* regulatorjem, smo analizirali tudi dinamiko in količino izražanja gena za *IdeR*. In ker *IdeR* vpliva na transkripcijo genov za sintezo bakterioferitinov (*bfrA*), smo preverili izražanje tudi gena *bfrA*. Ugotovili smo, da je *IdeR* regulator aktiven in njegovo izražanje je bilo precej konstitutivno. In potrdili smo tudi, da je izražanje gena *bfrA* ravno nasprotno izražanju genov *mbt*-operona. Z analizami smo torej dokazali, da se geni za sintezo mikobaktina pri MAP odzivajo na pomanjkanje železa, za nadaljnje študije pa bi bile potrebne še raziskave na posttranskripcijskem, translacijskem in posttranslacijskem nivoju.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 579.25:577.21.08(043) = 163.6  
 CX *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*/MAP/iron homeostasis/mycobactins/mycobactin synthesis/RNA isolation/gene expression/molecular techniques/real-time PCR/fold change  
 AU GRUBLJEŠIČ, Diana  
 AA JAMNIK, Polona (supervisor)/LAPANJE, Aleš (co-advisor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (reviewer)  
 PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
 PY 2012  
 TI EXPRESSION OF IRON DEPENDENT MYCOBACTIN SYNTHESIS GENES IN *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
 DT Graduation Thesis (University studies)  
 NO XI, 57 p., 6 tab., 20 fig., 1 ann., 64 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) is a pathogenic bacteria that resides within host macrophages during infection of ruminant animals and causes paratuberculosis. Many pathogenic bacteria secrete iron-chelating siderophores as virulence factors in the iron-limiting environments of their ruminant hosts to compete for ferric iron. Unlike other mycobacteria, which mobilize iron via mycobactins, MAP is unable to produce detectable mycobactin *in vitro* or *in vivo*. Although MAP fails to produce mycobactin it is able to survive within macrophages or in the environment. How bacteria acquires iron in the iron-limiting environments remains unknown. Comparative sequence analysis of *mbt* operon between mycobacteria species reveals that homologs to the *mbt* cluster were identified in the *Map* genome. However, a direct comparison of the *mbt* cluster in MAP with other mycobacteria show significant differences in primary structure of this region. Therefore usign qPCR we analyzed expression of genes that are involved in mycobactin synthesis in iron-replete (S+Fe) and iron-deplete (S-Fe) conditions and by measuring OD<sub>600</sub> comparing expression of genes to the bacterial growth. Our study shows that in iron-deplete conditions all *mbt* genes were significantly up-regulated in stationary phase and all genes have equal transcription profile, but their expression was shown in different concentration and different fold changes. The lowest expression concentration and fold change in iron-deplete conditions was showed by *mbtA* gene (*mbt-1* cluster). Since transcription of *mbt* genes is regulated by iron-dependent *IdeR* regulator, we also analyzed gene coding for *IdeR* and the other gene *bfrA* (iron storage gene) that is regulated by the same regulator and has a role in bacterioferritin synthesis. Study showed that *bfrA* was down-regulated in iron-deplete conditions, but significantly up-regulated in iron-replete conditions, what showed us *IdeR* is active. Taken togehter *mbt* genes and iron storage gene (*bfrA*) have opposite expressions in iron-deplete or iron-replete conditions. We have showed on trascritional level that all analyzed *mbt* genes respond to iron-deplete conditions, but more studies at posttrascriptional, translational and posttraslational level should be done.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>iii</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>iv</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>v</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>viii</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>viiix</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>x</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>xii</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Mycobacterium avium</i> PODVRSTE <i>paratuberculosis</i> .....	3
2.1.1 Splošne značilnosti MAP .....	3
2.1.2 Raznolikost med sevi MAP .....	3
2.1.3 Patogeneza .....	3
2.1.3.1 Paratuberkuloza (John's disease) .....	4
2.1.3.2 Chronova bolezen .....	4
2.2 HOMEOSTAZA ŽELEZA PRI MIKOBAKTERIJAH .....	5
2.3 SIDEROFORI PRI MIKOBAKTERIJAH .....	5
2.3.1 Mikobaktini in eksuhelini .....	5
2.3.2 Geni za sintezo mikobaktina pri <i>M. tuberculosis</i> .....	6
2.3.3 Primerjava <i>mbt</i> operonov med sevi mikobakterij – <i>M. paratuberculosis</i> (MAP), <i>M. avium</i> (MAV) in <i>M. tuberculosis</i> (MTB) .....	7
2.3.4 Regulacija transkripcije genov <i>mbt</i> operona .....	8
2.3.5 Vpliv okoljskih dejavnikov na ekspresijske analize MAP in drugih sevov .....	8
2.4 MERJENJE EKSPRESIJE GENOV .....	9
2.4.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	9
2.4.2.1 Princip metode qPCR .....	10
2.4.2.2 Metode zaznavanja .....	11
2.4.2.2.1 Nespecifične metode z uporabo SYBR Green kemije .....	11
2.4.2.3 Absolutna in relativna kvantifikacija .....	12
2.4.2.4 Vrednotenje qPCR rezultatov .....	12
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1 NAČRT POSKUSA .....	15
3.2 METODE .....	16
3.2.1 Bakterijski sevi MAP .....	16
3.2.1.1 Krvji sev CLIJ623 .....	16
3.2.1.2 Ovčji sev CLIJ361 .....	18
3.2.2 Merjenje optične gostote celic .....	18
3.2.3 Izolacija RNA .....	18

<b>3.2.4 Merjenje koncentracije in čistosti RNA .....</b>	19
<b>3.2.5 Tretiranje RNA vzorca z encimom DNaza .....</b>	19
<b>3.2.6 Reverzna transkripcija .....</b>	19
<b>3.2.7 qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....</b>	20
3.2.7.1 Priprava standardov .....	21
3.2.7.2 Priprava reakcijske mešanice za qPCR .....	21
3.2.7.3 Potek qPCR .....	22
3.2.7.4 Analiza podatkov.....	23
3.2.7.4.1 Ugotavljanje DNA kontaminacije .....	24
<b>3.2.8 Primerjava ekspresije .....</b>	25
3.2.8.1 Obdelava surovih podatkov qPCR .....	25
3.2.8.2 Absolutne vrednosti kopij genov in normalizacija na gen <i>sigA</i> .....	26
3.2.8.3 Razmerje LI/HI .....	27
3.2.8.4 Razmerje genov <i>mbt</i> operona v posameznih fazah rasti .....	28
<b>3.2.9 Statistično vrednotenje razultatov.....</b>	28
3.2.9.1 Studentov t-test.....	28
3.2.9.2 Pearsonov koeficient korelacijske .....	29
3.2.9.2.1 Interval zaupanja za koeficient korelacijske .....	29
3.2.9.2.2 Signifikanca razlik med korelacijskimi koeficienti.....	30
<b>3.3 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA .....</b>	30
<b>3.3.1 Priprava kulture MAP, sev CLIJ623 .....</b>	30
<b>3.3.2 Merjenje optične gostote .....</b>	31
<b>3.3.3 Izolacija RNA.....</b>	31
<b>3.3.4 Merjenje koncentracije in čistosti RNA .....</b>	32
<b>3.3.5 Tretiranje RNA z encimom DNaza.....</b>	32
<b>3.3.6 Reverzna transkripcija .....</b>	32
<b>3.3.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času – qPCR .....</b>	33
3.3.7.1 Priprava standardov .....	33
3.3.7.2 Reakcijska mešanica za qPCR .....	33
<b>4 REZULTATI .....</b>	34
<b>4.1 MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE .....</b>	34
<b>4.1.1 Kravji sev CLIJ623 .....</b>	34
<b>4.2 REZULTATI EKSPRESIJSKIH ANALIZ .....</b>	34
<b>4.2.1 Primerjava absolutnih vrednosti kopij genov .....</b>	35
<b>4.2.2 Razmerja LI/HI .....</b>	37
<b>4.2.3 Razmerja izraženih genov v stacionarni fazi .....</b>	42
<b>4.3 KORELACIJA IZRAŽENIH GENOV <i>mbt</i> OPERONA .....</b>	43
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	45
<b>5.1 RAZPRAVA .....</b>	45
<b>5.1.1 Merjenje optične gostote in izolacija mRNA .....</b>	45
<b>5.1.2 Ekspresijske analize .....</b>	45
<b>5.2 SKLEPI .....</b>	48
<b>6 POVZETEK.....</b>	49

**7 VIRI.....51**

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shematski prikaz biosinteze mikobaktina pri <i>M. tuberculosis</i> (Mukhopadhyay in sod., 2012).....	6
<b>Slika 2:</b> Primerjava <i>mbt-1</i> operona med MTB, MAV in MAP (Li in sod., 2005).....	7
<b>Slika 3:</b> Regulacija transkripcije <i>mbt</i> operona z <i>ideR</i> železo-odvisnim regulatorjem pri MTB (Rodriquez in Smith, 2003).....	8
<b>Slika 4:</b> Verižna reakcija s polimerazo (Lee, 2012).....	9
<b>Slika 5:</b> Faze PCR amplifikacijske krivulje, ki beleži emisijo fluorescence nastalega produkta vsakega cikla pomnoževanja (Wong in Medrano, 2005).....	10
<b>Slika 6:</b> Prikaz Ct vrednosti in pražne linije (Applied Biosystems/Life Technologies, 2012)	11
<b>Slika 7:</b> Pomnoževanje DNA z uporabo fluorescentnega označevalca SYBR Green (SG) (prikaz pomnoževanja ene verige DNA) (Fraga in sod., 2008). .....	12
<b>Slika 8:</b> Shema poteka dela od revitalizacije kulture do obdelave podatkov dobljenih s qPCR analizami .....	15
<b>Slika 9:</b> Postopek priprave vzorcev .....	17
<b>Slika 10:</b> Parametri pomnoževanja qPCR reakcije s SYBR Green kemijo .....	22
<b>Slika 11:</b> Prikaz Ct vrednosti in amplifikacijske krivulje vzorcev .....	23
<b>Slika 12:</b> Primer disociacijske krivulje vzorcev .....	23
<b>Slika 13:</b> Prikaz linearnenega razmerja Ct vrednosti in logaritemskih vrednosti količin standardne DNA (Applied Biosystems, Life Technologies, 2012).....	24
<b>Slika 14:</b> Rezultat (Ct vrednosti) testa DNA kontaminacije za gen <i>mbtA</i> .....	25
<b>Slika 15:</b> Meritve optične gostote (valovna dolžina 600nm) bakterije MAP v gojišču z železom in mikobaktinom (S+Fe+MJ) in v gojišču brez železa in mikobaktina (S-Fe-MJ). ..	34
<b>Slika 16:</b> Absolutne vrednosti kopij posameznega gena (normalizirane na gen <i>sigA</i> ) v mediju z železom in mikobaktinom (S+Fe) in v mediju brez železa in mikobaktina (S-Fe), prikazane na grafih lag (A), eksponentne (B) in stacionarne faze (C). .....	36
<b>Slika 17:</b> Odziv genov operona <i>mbt-1</i> – Razmerje normaliziranega izražanja genov <i>mbtA</i> (graf A), <i>mbtB</i> (graf B) in <i>mbtI</i> (graf C) v mediju brez železa (LI) in v mediju z železom (HI). .....	38
<b>Slika 18:</b> Odziv genov operona <i>mbt-2</i> – Razmerje normaliziranega izražanja genov <i>mbtK</i> (graf A) in <i>mbtL</i> (graf B) v mediju brez železa (LI) in v mediju z železom (HI). .....	39
<b>Slika 19:</b> Odziv genov – Razmerje normaliziranega izražanja genov <i>bfrA</i> (graf A) in <i>ideR</i> (graf B) v mediju brez železa (LI) in v mediju z železom (HI). .....	40
<b>Slika 20:</b> Razmerja izraženih genov (gen/ <i>mbtA</i> ) v mediju brez železa glede na medij z železom.....	42

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Modificirano Sauton's gojišče (Kopinč in Lapanje, 2012) .....	17
<b>Preglednica 2:</b> Kemikalije za reakcijsko mešanico.....	19
<b>Preglednica 3:</b> Priprava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo .....	20
<b>Preglednica 4:</b> Začeni oligonukleotidi za qPCR .....	21
<b>Preglednica 5:</b> Primer priprave mešanice .....	22
<b>Preglednica 6:</b> Pearsonovi koeficienti korelacije ( $r$ ) med izraženimi geni <i>mbt</i> operona in <i>bfrA</i> ter koeficienti $k$ , ki prikazujejo naklon krivulje med dvema genoma.....	43

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Kritične vrednosti Pearsonovega koeficiente korelacije pri določeni stopnji značilnosti (Košmelj, 2007)

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
Ct	cikel v katerem amplifikacijska krivulja seka pražno vrednost
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
Fe	železo
HEYM	Herrold's egg yolk gojišče
HI	»high iron«
LI	»low iron«
MJ	mikobaktin J
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> podvrste <i>paratuberculosis</i>
MAV	<i>Mycobacterium avium</i> podvrste <i>avium</i>
MQ	Mili-Q voda (voda obdelana z ionskim izmenjevalcem in filtrirana skozi 0,22 µm filter pri prevodnosti višji od 18, 2MΩ cm)
MTB	<i>Mycobacterium avium</i> podvrste <i>tuberculosis</i>
nm	nano meter
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem polju
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restriktijska analiza pomnožkov PCR)
RNA	ribonukleinska kislina
ROX	fluorescentno barvilo 6-karboksi-X-rodamin
S	substrat
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
T <sub>m</sub>	temperatura taljenja – temperatura pri kateri je 50% DNA v obliki enojne verige

## 1 UVOD

*Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* (MAP) je bakterija, ki povzroča paratuberkulozo pri prežvekovalcih, kot so govedo, ovce in koze. Paratuberkuloza je neozdravljiva kronična infekcijska bolezen prebavnega trakta. Živali se največkrat okužijo s kontaminirano krmo ali vodo, inkubacija pa je dolga in lahko traja tudi več let (Beard in sod., 2001; Li in sod., 2005). V zadnjih časih bakterijo MAP povezujejo tudi z razvojem Crohn-ove bolezni pri človeku.

MAP se v gostitelju nahaja in razmnožuje v makrofagih. Dolgo preživi tudi v okolju izven gostitelja, saj je odporna na okoljske dejavnike, kot so vročina, dehidracija in sončna svetloba. Tako lahko v zemlji in gnuju preživi več mesecov zaradi česar je nevarna za prenos infekcije med čredami še neokuženih živali. Nevarnost prenosa infekcije pa obstaja tudi s prodajo in prevozi živali. Bakterija naj bi preživela postopke pasterizacije pri proizvodnji mleka, poročali pa so tudi o prisotnosti bakterije v sirih in drugih mlečnih izdelkih (Behr in Collins, 2010; Pislak in sod., 1996; Ayele in sod. 2005; Ikonomopoulos in sod. 2005; Collins in sod., 2002).

Za MAP je tako kot za ostale patogene pomembno ohranjanje osnovnih celičnih funkcij, ne glede na okolje, v katerem se nahajajo. Ena izmed pomembnih funkcij je ohranjanje homeostaze železa tako v gostitelju kot v okolju izven gostitelja (zemlja, voda, gnoj).

V naravi je železo prisotno večinoma v obliki slabo topnih hidroksidov, zaradi česar je neposredna dostopnost železa za bakterije omejena. V gostitelju je zaradi anaerobnih pogojev železo topno in posledično bolj dostopno, vendar je tam kot del obrambnega mehanizma proti nevarnim patogenom dostopnost železa strogo regulirana in je vezano na vrsto ligandov z visoko afiniteto, kot so feritin, laktoferin in transferin, ki preprečujejo dostopnost železa, potrebnega za bakterijsko rast (Rodriquez in Smith, 2003). Mikroorganizmi so za pogoje, kjer je dostopnost železa omejena, razvili spojine – sideroforje, s katerimi pridobivajo težko dostopno železo (Schwartz and De Voss, 2001; Rodriquez in sod.; 2002). V primerjavi s sorodnimi podvrstami *Mycobacterium avium*, MAP *in vitro* ni sposobna proizvajanja sideroforov in rasti brez eksogeno dodanega siderofora-mikobaktina (Li in sod., 2005; Janagama in sod., 2010a).

S primerjavo mikobaktinskih operonov sorodnih vrst mikobakterij so v dosedanjih raziskavah ugotovili ohranjenost operona za sintezo mikobatina tudi pri MAP, vendar z določenimi razlikami v dolžini in zaporedju posameznih genov (Li in sod., 2005). Zaradi možne okvare v genih za sintezo mikobaktina, se postavlja vprašanje, kako bakterije MAP ohranjajo homeostazo železa.

Domnevajo, da MAP s preživljjanjem v celicah gostitelja pridobiva železo, ki je tam zaradi anaerobnih pogojev topno (Behr in Collins, 2010; Whittington in sod., 2004). Kaj pa se dogaja v okolju, kjer železo zaradi aerobnih pogojev ni dostopno in v celici gostitelja, kjer so koncentracije železa omejene, na genski ravni pri MAP pa še ni razjasnjeno.

Pri proučevanju izražanja genov mikobaktinskega operona v odvisnosti od razpoložljive koncentracije železa so do sedaj posvetili več pozornosti MAP sorodnim mikobakterijam, za katere je znano, da so sposobne proizvodnje mikobaktina. Za MAP pa je na tem področju zelo malo znanega.

Najpogosteji način ugotavljanja izražanja genov je danes qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času, kjer je za ugotavljanje ekspresije gena potrebna ustrezna izolacija mRNK, če opazujemo izražanje na ravni transkripcije (Moody, 2001; Wong in Medrano, 2005).

## 1.1 CILJI NALOGE

Cilj naloge je preveriti izražanje oziroma odzivnost genov, vpletenih v sintezo mikobaktina v odvisnosti od dostopnosti železa pri MAP kravjem sevu CLIJ623 in ovčjem sevu CLIJ 361. Glede na RFPL tipizacijo se MAP loči na tri tipe: C (cattle), S (sheep) in I (intermediate, podskupina ovčjega seva). Ena izmed razlik, ki loči omenjene tipe MAP, je nukleotidno zaporedje operonov za sintezo mikobaktina, ki se med tipi razlikujejo. Te razlike pa lahko vplivajo na sintezo mikobaktina na vseh nivojih nastanka proteina.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Nezmožnost proizvajanja mikobaktina pri MAP je posledica okvarjenega odziva genov za sintezo mikobaktina na zunanje koncentracije železa.
- Odziv genov za sintezo mikobaktina na zunanje koncentracije železa se razlikuje med kravjimi in ovčjimi sevi MAP.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 *Mycobacterium avium* PODVRSTE *paratuberculosis*

#### 2.1.1 Splošne značilnosti MAP

*Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* (MAP) je patogena bakterija, ki spada v rod mikobakterij. Je po Gramu pozitivna, negibljiva palčka (Pislak in sod., 1996). Bakterija povzroča paratuberkulozo pri govedu, ovcah in drugih prežvekovalcih (Li in sod., 2005, Janagama in sod., 2010b). Izolirali so jo tudi iz drugih vrst neprežvekovalcev, kot so zajci, konji in druge divje živali (Collins in sod., 2002; Beard in sod., 2001). MAP je zelo odporna na fizikalne dejavnike in prisotna v mleku naj bi preživelu postopke pasterizacije (Ayele in sod., 2005; Behr in Collins, 2010). Poročali so tudi o prisotnosti bakterije v sirih in drugih mlečnih izdelkih, kot posledica kontaminacije pri zbiranju mleka okuženih krav (Ikonomopoulos in sod., 2005). Dodatna pot okužbe je možna preko vodnih virov, ki so kontaminirani kot posledica izpiranja z MAP obremenjenih površin (pašniki). Ugotovljeno pa je bilo tudi, da preživi kloriranje vode (Li in sod., 2005; Behr in Collins, 2010).

#### 2.1.2 Raznolikost med sevi MAP

Z raziskovalnimi postopki, kot so RFLP tipizacija (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov) in PFGE (gelska elektroforeza v pulzirajočem polju) lahko delimo MAP na tri tipe, ki se glede na prisotnost polimorfizmov, kot posledice delecij in insercij, delijo na C (cattle oziroma tip II), S (sheep oziroma tip I) in I (intermediate oziroma tip III) (Whittington in sod., 2000; de Juan in sod. 2005; Stevenson in sod., 2009). Tip III ali intermediatni tip so uvrstili v podskupino tipa I in naj bi bil izoliran iz okuženih ovac in koz (Stevenson in sod., 2009).

Za seva cMAP (cattle) in sMAP (sheep) je značilna počasna rast na gojiščih. Za razliko od kravjega seva pa raste ovčji mnogo počasneje ali sploh ne. Na ustreznem gojišču z dodatkom mikobaktina zaznamo rast kravjega seva po 4-16 tednih, medtem ko zaznamo rast ovčjega seva šele po 4 mesecih in več. S primerjavo rasti ovčjega seva na različnih gojiščih so ugotovili, da ne raste ob prisotnosti železa. Oba seva pa za rast potrebujeta dodatek mikobaktina (Behr in Collins, 2010; Whittington in sod., 1999; de Juan in sod., 2006; Merkal in Curran, 1974).

Poleg fenotipskih razlik med sevoma so z genetskimi analizami ugotovili razlike v nukleotidnem zaporedju operonov za sintezo mikobaktina. Glavna razlika je v dolžini gena *mbtA*, ki je pri kravjem sevu skrajšan v primerjavi z ovčjim sevom MAP in ostalimi mikobakterijami. Prav tako so pri kravjem sevu zaznali tudi nesinonimne mutacije (nesinonimne mutacije se lahko odražajo v zamenjavi AK) na genih *mbtE* in *mbtF* (Alexander in sod., 2009). Ovčji sev pa naj bi imel okvare v delovanju bakterioferitina (*bfrA*), ki ima vlogo shranjevanja železa (Janagama in sod., 2010a; Marsh in sod., 2006).

#### 2.1.3 Patogeneza

Najpogostejši prenos bakterije je fekalno-oralni prenos, kot pri ostalih patogenih. Direktno preko zaužitja kontaminiranih iztrebkov ali indirektno preko kontaminiranega mleka, vode ali

hrane. Za okužbo so dovzetnejše mlade živali zaradi nizke infekcijske doze. Največkrat se okužijo ob sesanju pri materi zaradi kontaminiranega vimena in volne (pri ovcah). Drugi najpogostejši vir okužbe je stalen vnos povzročitelja z onesnaženo krmo in vodo. Za nadaljnji razvoj bolezni v klinično obliko pa so pomembni še različni stresni in prehranski dejavniki, ki slabijo odpornost živali. Najvažnejši so brejost, porod, laktacija, neustrezna prehrana ter prisotnost drugih bolezni. S krmo zaužite mikobakterije pridejo v področju Peyerjevih plošč s pomočjo M celic skozi epitelij črevesne sluznice. Že nekaj ur po okužbi najdemo mikobakterije v makrofagih črevesne sluznice, ki jih zanesajo tudi v mezenterijalne bezgavke. Rezultat infekcije je granulomatozna vnetna zadebelitev črevesne sluznice in granulomatozno vnetje mezenterijalnih bezgavk. Od vdora mikobakterij v organizem pa do pojava prvih kliničnih znakov praviloma preteče več mesecev, lahko pa tudi več let. (Pislak in sod., 1996; Wu in sod., 2007).

MAP se v gostitelju nahaja in razmnožuje v makrofagih. Bakterije v makrofagih s svojo prisotnostjo zavirajo dozorevanje (acidifikacijo) fagosoma. V procesu acidifikacije se lizosom zlige s fagosomom, pri čemer pride do razgradnje fagocitiranih bakterij. Mikobakterije pa se s preprečevanjem tega zlitja izognejo razgradnji (Bannantine in Stabel, 2002; Wu in sod., 2007).

Bakterija dolgo preživi tudi v okolju izven gostitelja in se tako prenaša na nove gostitelje. V naravi lahko v zemlji in gnoju preživi več mesecev (Whittington in sod., 2005). Odporna naj bi bila na okoljske dejavnike, kot so vročina, dehidracija in sončna svetloba. Preživetje v tleh pa je odvisno od fizikalno-kemijskih značilnosti tal, vsebnosti organskih snovi, kalcija, železa in pH (Pavlik in sod., 2010)

Tako v gostitelju kot v okolju je dostopnost železa omejena, zato je za preživetje MAP v teh okoljih ključnega pomena učinkovit sistem pridobivanja železa. Mikroorganizmi so za pogoje, kjer je dostopnost železa omejena, razvili siderofore, ki se delijo na mikobaktine in eksoheline (Schwartz in De Voss, 2001; Rodriguez in sod.; 2002). V primerjavi s sorodnimi podvrstami *Mycobacterium avium*, MAP ni sposobna proizvajati sideroforov (*in vitro* ali *in vivo*) in ni sposobna rasti brez eksogeno dodanega siderofora-mikobaktina *in vitro* (Li s sod., 2005; Janagama in sod., 2010). Rast MAP *in vitro* v različni meri omogočajo mikobaktini iz drugih vrst mikobakterij. Včasih so pridobivali mikobaktin P iz *Mycobacterium phlei*, danes pa iz MAP mikobaktin pozitivnega seva NADC18 (Schwartz in de Voss, 2001). Domnevna se, da je nezmožnost proizvodnje mikobaktina primer adaptacije MAP na življenje znotraj celic.

### 2.1.3.1 Paratuberkuloza (John's disease)

Paratuberkuloza je neozdravljiva kronična infekcijska bolezen prebavnega trakta. Živali se največkrat okužijo s kontaminirano krmo ali vodo. Inkubacija je dolga, lahko traja tudi leto dni in več (Beard in sod., 2001, Pislak in sod., 1996; Bannantine in Stabel, 2002). Klinično pri obolelih živalih opazimo progresivno hujšanje, ki ne reagira na zdravljenje. Že v subkliničnem stadiju bolezni živali z iztrebki izločajo mikobakterije, s katerimi kontaminirajo okolje, v kliničnem stadiju pa se njihova količina močno poveča. Na ta način se infekcija širi med živalmi v čredi, s prodajo in prevozi živali pa tudi med čredami (Pislak in sod., 1996; Snyder in Champness, 2007).

### 2.1.3.2 Chronova bolezen

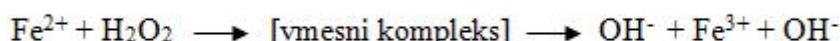
Bakterijo MAP v zadnjih časih povezujejo tudi z razvojem Crohn-ove bolezni pri človeku. Gre za kronično vnetje črevesja s podobnimi bolezenskimi znaki kot pri paratuberkulozi, kot

so izguba teže in driska. Vzrok bolezni še ni znan in prav tako povezava med paratuberkulozo pri živalih in Chronovo boleznijo pri ljudeh še ni povsem razjasnjena (Ayele in sod., 2005, McDonald in sod., 2005; Hermon-Taylor in El-Zaatari, 2004).

## 2.2 HOMEOSTAZA ŽELEZA PRI MIKOBAKTERIJAH

Železo je esencialen element, ki je nujen za normalno rast bakterij, saj je katalizator mnogih encimskih reakcij (de Voss in sod., 1999, Rodriguez in Smith, 2003; Harrison in sod., 2006). V anaerobnih pogojih se nahaja v topni obliki  $\text{Fe}^{2+}$  in je v redukcijskem stanju. V aerobnih pogojih je v oksidacijskem stanju  $\text{Fe}^{3+}$  in se nahaja v obliki netopnih mineralov ( $\text{Fe}_2\text{O}_3 \times n\text{H}_2\text{O}$ ). Na topnost vpliva tudi pH, ki se v aerobnih pogojih povečuje z zniževanjem pH. Zato je v vodi večina  $\text{Fe}^{2+}$  raztopljenega v nevtralnih pH pogojih,  $\text{Fe}^{3+}$  pa le v kislih pH pogojih.  $\text{Fe}^{3+}$  oblika je za razliko od  $\text{Fe}^{2+}$  oblike težko dostopna tako za bakterije kot za ostale organizme. Še posebej pa so koncentracije železa omejene v višjih organizmih, kjer je vezan na specifične železo vezavne proteine kot so transferini, lakoferini in feritini. Mikroorganizmi so zato razvili spojine - siderofore, ki z visoko afiniteto vežejo železo (Snyder in Champness, 2007; Miethke in Marahiel, 2007).

Pri mikobakterijah je homeostaza železa uravnavana s proizvodnjo mikobaktinov, s katerimi pridobivajo železo, kjer so koncentracije omejene (tako v okolju kot tudi v gostitelju). Ker so prevelike količine železa lahko tudi toksične, je sinteza mikobaktinov inducirana le ob pomanjkanju železa (Rodriguez in Smith, 2003). Železovi ioni namreč katalizirajo Fentonovo reakcijo, ki je pomemben način tvorbe hidroksilnega radikala v organizmu. Gre za reakcijo razpada vodikovega peroksida, pri čemer nastajajo mutagene oblike kisika, ki so močno toksične (Osredkar, 2011; Snyder in Champness, 2007).



Zato je ob zadostni količini železa inducirana sinteza bakterioferitinov, ki služijo za shranjevanje odvečnega železa, s čimer obvarujejo celico pred toksičnostjo (Harrison in sod., 2006).

## 2.3 SIDEROFORI PRI MIKOBAKTERIJAH

### 2.3.1 Mikobaktini in eksohelini

Siderofori so nizko molekularne spojine z visoko afiniteto do železa. Proizvajajo jih bakterije z namenom pridobivanja železa iz okolja (Rodriguez in Smith, 2003). Pri mikobakterijah poznamo dve skupini sideroforov - mikobaktine in eksoheline. Patogene vrste *M. tuberculosis* in *M. avium* proizvajajo mikobaktine, saprofitske vrste proizvajajo eksoheline, nekatere bakterije oboje, bakterije *M. avium* subsp. *paratuberculosis* pa ne proizvajajo nobenega od omenjenih sideroforjev (Rodriguez in Smith, 2003, De Voss in sod., 1999).

Eksohelini so za razliko od mikobaktinov manjši na račun kraje stranske alkilne verige, nekateri so bolj polarni in vodotopni. Mikobakterije proizvajajo dva tipa eksohelinov. Patogene mikobakterije proizvajajo eksoheline topne v kloroformu, ki imajo strukturo podobno lipofilnim mikobaktinom, saprofitske vrste mikobakterij pa proizvajajo eksoheline netopne v kloroformu, ki imajo strukturo podobno peptidom in so na račun polarnosti topni v vodi (Gobin in sod., 1999).

Pri *M. tuberculosis* naj bi nastajali dve obliki mikobaktina - mikobaktin in njegov vodotopni derivat, karboksi-mikobaktin (Rodriquez in Smith, 2003; de Voss in sod., 1999). Razlika med mikobaktini in karboksi-mikobaktini je v zamenjavi alkilne stranske verige s karboksilno. Mikobaktini vsebujejo dolgo lipidno molekulo, zaradi česar so hidrofobni in zasidrani v celični membrani, kjer delujejo kot receptorji za različne ferikomplekse. Karboksi-mikobaktini pa nastanejo z vezavo karboksilne skupine na mikobaktine zaradi česar so hidrofilni in lokalizirani ekstracelularno, kjer vežejo  $\text{Fe}^{3+}$  in ga dostavljajo do specifičnih membranskih receptorjev ali pa se kar celoten kompleks prenese v notranjost celice (Mukhopadhyay in sod., 2012; Rodriquez in Smith, 2003).

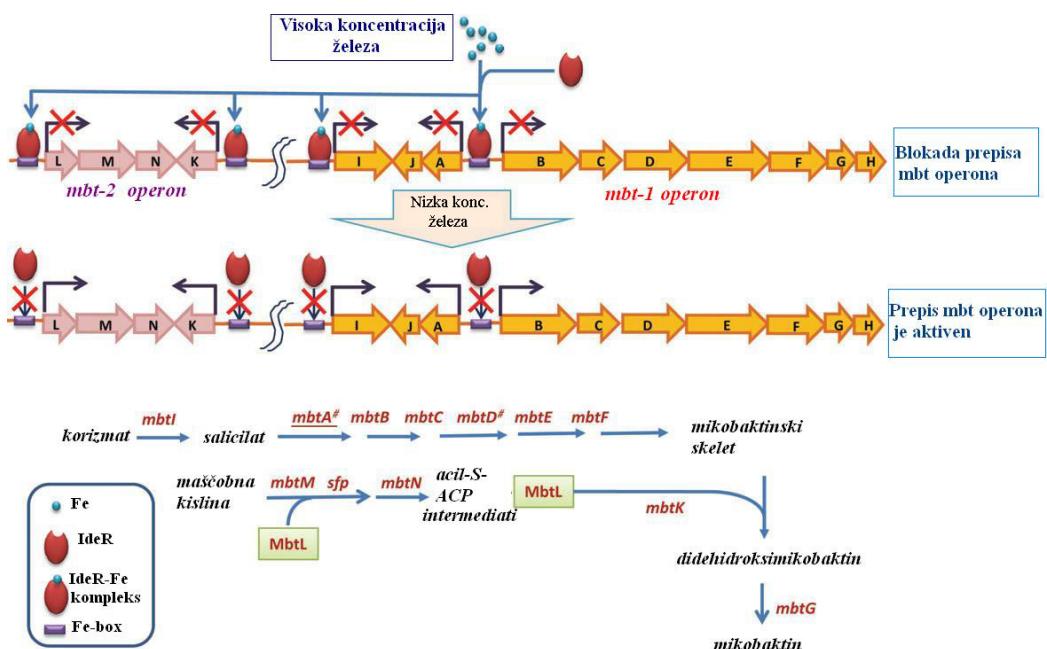
Proizvodnja sideroforov je inducirana le v pogojih pomanjkanja železa, s čimer se celica obvaruje prevelike koncentracije železa, ki bi posledično lahko bila toksična (Snyder in Champness, 2007).

Sinteza mikobaktinov je inducirana z encimi iz razreda neribosomalnih peptidnih sintaz. Sestavljeni so iz jedrnega dela in dolgih stranskih lipidnih molekul. Jederni del vsebuje hidroksifenilosazolinski obroč, ki nastane iz salicilne kisline (substrat v začetni fazi sinteze mikobaktina) in je odgovoren za vezavo železa. Lipidne molekule pa omogočajo vezavo mikobaktina na celično membrano in s tem prenos železa v celico (Mukhopadhyay in sod., 2011; Rodriquez in Smith, 2003).

### 2.3.2 Geni za sintezo mikobaktina pri *M. tuberculosis*

O genih za sintezo mikobaktina je pri mikobakterijah največ poznanega pri *M. tuberculosis* (MTB), zato naša raziskava sloni na primerjavi znanih dejstev tega seva.

Geni za sintezo mikobaktina so pri mikobakterijah organizirani v dva operona: *mbt-1* in *mbt-2*. Operon *mbt-1* obsega gene *mbtABCDEFGHIJ*, *mbt-2* pa *mbtKLMN*. Proizvodi genov so encimi iz razreda neribosomalnih peptidnih (*mbtB*, *mbtE* in *mbtF*) in poliketidnih (*mbtC*, *mbtD*) sintaz, salicilat sintaza (*mbtI*), saliciloil-AMP-ligaza (*mbtA*) ter encim hidroksilaza (*mbtG*), ki sodelujejo v biosintezi mikobaktina in njegovega vodotopnega derivata, karboksi-mikobaktina (Rodriquez in Smith, 2003; Quadri in sod., 1998).

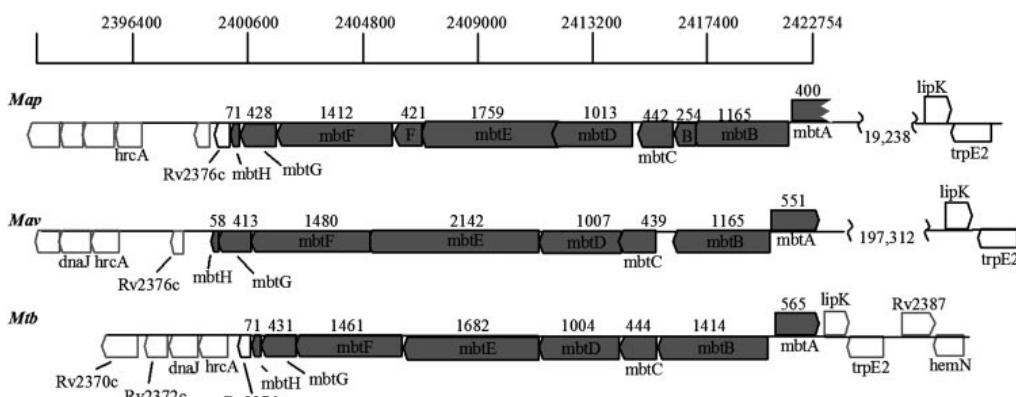


Slika 1: Shematski prikaz biosinteze mikobaktina pri *M. tuberculosis* (Mukhopadhyay in sod., 2012)

Produkti *mbt-1* operona so odgovorni za sintezo mikobaktinskega skeleta (jedro mikobaktina). Produkti operona *mbt-2* (maščobni acil-S intermediati) pa sodelujejo v sintezi lipidnih molekul. Sinteza je v prvem koraku odvisna od produkcije salicilata iz korizmata oziroma njegovega vmesnega produkta izokorizmata. Producijo salicilata omogoča encim salicilat sintaza kodirana preko gena *mbtI*, ki za svoje delovanje nujno potrebuje Mg<sup>2+</sup> ione (Zwahlen in sod., 2007; Harrison in sod., 2006). V naslednjem koraku produkti gena *mbtA* (saliciloil-AMP-ligaze) aktivirajo salicilat. Produkti gena *mbtB* (feniloksazolin sintaza) pa aktivirano salicilno kislino vežejo s serinom in katalizirajo (hidroksi)feniloksazolin formacijo. Produkti operona *mbt-2* (maščobni acil-S-intermediati) skupaj z mikobaktinskim skeletom sintetizirajo didehidroksi mikobaktin, tako, da produkti gena *mbtL*, odgovorni za prenos acilne skupine, in produkti gena *mbtK* (lizin N-acil transferaza) prenesejo sintetizirano lipidno molekulo na ε-amino skupino lizina mikobaktinskega jedra. V zadnjem koraku pa produkti gena *mbtG* (L-lizin-6-monooksigenaze) katalizirajo hidroksilacijo, kjer nastane mikobaktin (Mukhopadhyay in sod., 2012; de Voss in sod., 1999; Zwahlen in sod., 2007).

### 2.3.3 Primerjava *mbt* operonov med sevi mikobakterij – *M. paratuberculosis* (MAP), *M. avium* (MAV) in *M. tuberculosis* (MTB)

S primerjavo *mbt* operonov so ugotovili, da sta oba operona ohranjena pri vseh mikobakterijah, za katera so znana zaporedja genomov (MTB, MAV in MAP), vendar le MAP ne proizvaja mikobaktina. Pri vseh omenjenih mikobakterijah so tudi v celoti ohranjena regulatorna mesta za vezavo IdeR represorja (Li in sod., 2005).

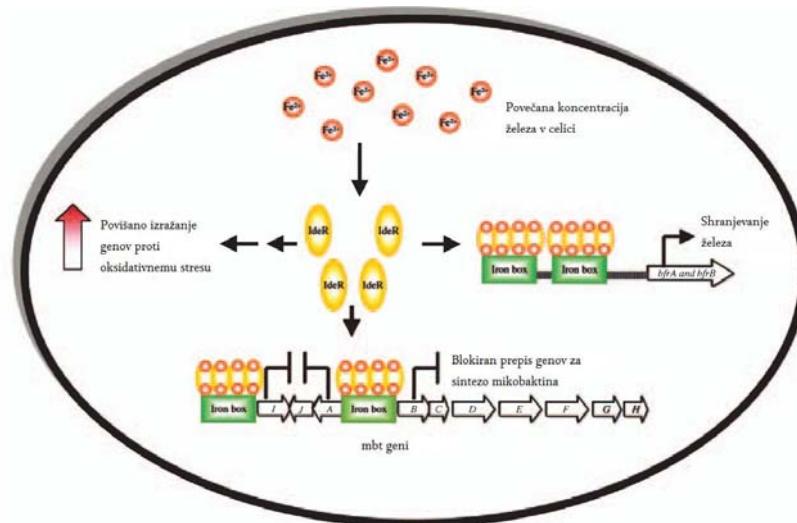


Slika 2: Primerjava *mbt-1* operona med MTB, MAV in MAP. lipK=mbtJ in trp=mbtI (Li in sod., 2005)

Med *mbtI* in *mbtJ* je pri MAP oziroma MAV prisotna 6,6 oziroma 5,7 kb insercija v primerjavi z MTB. Pri MAV je med *mbtA* in *mbtJ* prisotna 197,3 kb velika insercija v primerjavi z MTB, medtem ko je pri MAP insercija velika 19,3 kb, vendar te insercije po vsej verjetnosti ne vplivajo bistveno na produkcijo mikobaktina, saj MAV kljub vsemu proizvaja ta siderofor. Glavna razlika je delecija *mbtA* pri MAP v primerjavi z MTB in MAV, ki okrne C-terminalni del proteina. Gen *mbtA* ima dolžino 400 kb v primerjavi z MAV, ki ima 551 kb in MTB 565 kb. Po homologiji naj bi ta del proteina vseboval pomembna vezavna mesta za ATP, ki sodeluje v encimski reakciji aktivacije salicilata v začetni fazni sinteze mikobaktina. V tem primeru bi ob pomanjkanju železa prišlo do kopiranja salicilata v celici (Li in sod., 2005; Quadri in sod., 1998).

### 2.3.4 Regulacija transkripcije genov *mbt* operona

Transkripcija genov za sintezo mikobaktina je pri MTB pod vplivom IdeR regulatorja, ki ob prisotnosti železa zavira njihovo prepisovanje, medtem ko aktivira gene za shranjevanje železa (*bfrA*, *bfrB*). V prisotnosti železa se *IdeR* veže na del promotorske regije DNA, onemogoči vezavo polimeraz in tako zavira prepis. Ob odsotnosti železa pa *IdeR* represor sprosti vezavno mesto in omogoči prepis (Rodriquez in Smith, 2003; Rodriquez in sod, 2002).



Slika 3: Regulacija transkripcije *mbt* operona z *IdeR* železo-odvisnim regulatorjem pri MTB (Rodriquez in Smith, 2003).

Ob povečani koncentraciji železa v celici nastane kompleks *IdeR*-Fe<sup>2+</sup>, ki se veže na del sekvence na promotorski regiji DNA. Z vezavo onemogoči prepis genov za sintezo mikobaktina in sproži prepis genov, ki kodirajo proteine za shranjevanje železa (*bfrA*, *bfrB*). Poleg tega pa ob povečani koncentraciji železa indirektno vpliva tudi na mehanizme regulacije proti oksidativnemu stresu, s čimer se celica obvaruje toksičnosti ob preveliki koncentraciji železa. Obratno ob pomanjkanju železa kompleks *IdeR*-Fe<sup>2+</sup> ne nastane in je inducirana transkripcija genov za sintezo mikobaktina, transkripcija genov za shranjevanje železa pa zavrta oziroma je ravnotežje pomaknjeno proti transkripciji genov za sintezo mikobaktina (Rodriquez in Smith, 2003).

### 2.3.5 Vpliv okoljskih dejavnikov na ekspresijske analize MAP in drugih sevov

Z ekspresijskimi analizami *ideR* regulatorja, genov *mbtB* in *bfrA*, so pri MAP dokazali, da je *IdeR* regulator odvisen od železa in ob povečani koncentraciji železa zavira prepis gena *mbtB* ter inducira prepis *bfrA* (Janagama in sod., 2009) Wu in sodelavci (2007) so pri MAP ugotavljeni ekspresijo genov po izpostavitvi različnim stresnim dejavnikom (visoka temperatura, oksidativni stres in nizek pH) kot tudi v naravno okuženih kravah. Pri nizkem pH so *in vitro* zaznali povišano ekspresijo gena *mbtC* in *mbtH*.

Pri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) je ekspresija operonov *mbt-1* in *mbt-2* pod regulacijo *ideR* represorja, ki zavira transkripcijo v prisotnosti železa (Rodriquez in sod., 2002). Ugotovili so, da je delecija gena *ideR* letalna. Ekspresija posameznih genov iz *mbt* operonov je povišana v mediju brez železa, v makrofagi po infekciji z MTB *in vivo* in v človeških makrofagi pri *M. avium* (Talaat in sod., 2003; Hou in sod., 2002). Pri *M. tuberculosis* so ugotovili, da delecija gena *mbtB* onemogoči proizvodnjo mikobaktina in ne raste v mediju

brez železa in makrofagih *in vitro* (De Voss in sod., 1999; LaMarca in sod., 2003). Dokazali pa so tudi, da sta za rast MTB nujna gena *mbtK* in *mbtG* (Krithika in sod., 2006). Pri *M. smegmatis* so Chavadi in sodelavci (2011) ugotovili, da so geni *mbtA*, *mbtB*, *mbtC*, *mbtD*, *mbtF* in *mbtG* nujni, med tem ko gen *mbtH* ni nujen za rast.

## 2.4 MERJENJE EKSPRESIJE GENOV

Za merjenje ekspresije genov se danes uporablja več metod oziroma pristopov, največkrat pa se uporablja mikromereže (biočipi) in verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) (Moody, 2001; Bustin, 2000; Wong in Medrano, 2005). V nalogi smo uporabili metodo verižne reakcije v realnem času s predhodnim prepisom mRNA v komplementarno cDNA.

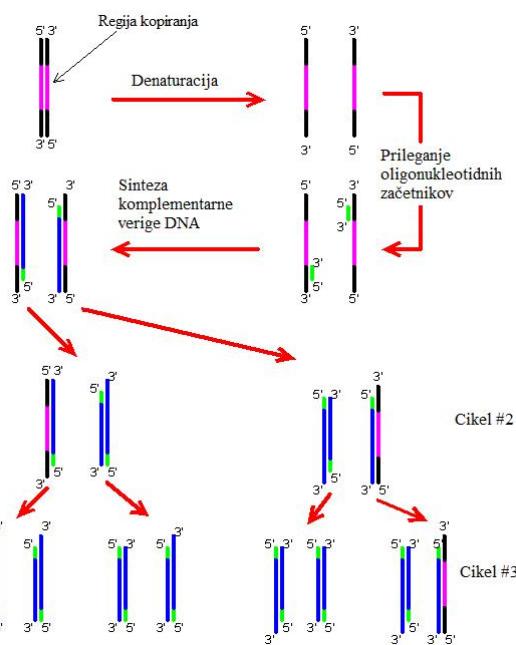
### 2.4.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je encimska metoda za eksponentno pomnoževanje izbranega DNA zaporedja s pomočjo termostabilne DNA-polimeraze, ki ima optimalno temperaturo delovanja pri 72 °C. Svojo aktivnost ohrani tudi, če je krajši čas izpostavljen višim temperaturam, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA. Reakcija poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih. Pomnožujemo lahko eno- ali dvoverižno DNA.

Sestavljen je iz treh faz (slika 5):

- denaturacije DNA pri temperaturi višji od 90 °C
- komplementarnega prileganja začetnih oligonukleotidov na enoverižno DNA
- sinteze (podaljševanja) komplementarne verige DNA pri temperaturi 50-60 °C z encimom DNA-polimeraza.

Po končani reakciji je potrebno produkte analizirati še z gelsko elektroforezo (Jeršek, 2003).



Slika 4: Verižna reakcija s polimerazo (Lee, 2012)

## 2.4.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

PCR v realnem času oziroma kvantitativni PCR (ang. quantitative ali qPCR) za razliko od običajnega PCR omogoča merjenje količine produkta med samo reakcijo. Pomnoževanje in zaznavanje poteka sočasno, torej za določevanje produkta ne potrebujemo elektroforeze. To je tudi glavna prednost PCR v realnem času v primerjavi z navadnim PCR, kot tudi nižja in boljša meja detekcije. Za kvantitativno ocenjevanje ekspresije genov (določanje števila kopij novih mRNA v celici) je potrebno molekule mRNA najprej prepisati v cDNA z encimom reverzna transkriptaza in nato s pomnoževanjem cDNA določimo količino mRNA (Bustin, 2000).

### 2.4.2.1 Princip metode qPCR

Princip reakcije je tako kot pri običajnem PCR *in vitro* pomnožitev dela tarčne DNA s termostabilno DNA-polimerazo, s to razliko, da pri qPCR v reakcijsko mešanico dodamo še barvilo, ki se veže na dvoverižno DNA in nam služi za spektrofotometrično določitev količine pomnožka tekom reakcije. Pod enakimi pogoji izvedemo posebej še reakcijo pomnoževanja znanih koncentracij DNA standarda, ki je enako velik odsek DNA, kot tisti v vzorcu, le da poznamo njegovo začetno koncentracijo in nam zato služi za določitev umeritvene krivulje (Bustin, 2000).

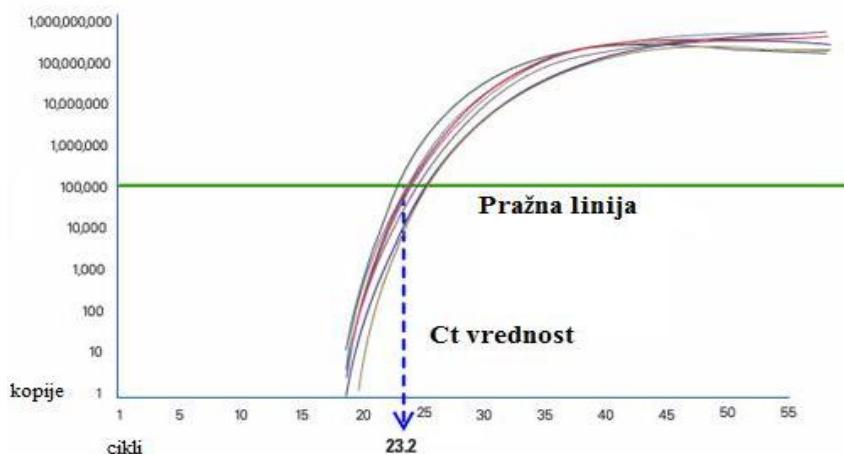
Naraščanje količine produkta (pomnožka) med qPCR lahko razdelimo v štiri faze: začetno-lag fазo, zgodnjo eksponentno, eksponentno in stacionarno fazo (oz. faza platoja). Nepretrgano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu omogoči, da izmerimo količino pomnožka, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, katera podaja odvisnost intenzitete fluorescence ( $\Delta R_n$ ) posazmeznih vzorcev od števila ciklov (Wong in Medrano, 2005).



Slika 5: Faze PCR amplifikacijske krivulje, ki beleži emisijo fluorescence nastalega produkta vsakega cikla pomnoževanja (Wong in Medrano, 2005)

Prvih 10 do 15 ciklov med začetno fazo je fluorescenza produkta (pomnožka) nižja ali enaka fluorescenci ozadja. V tej fazi določimo bazno linijo. V zgodnji eksponentni fazi fluorescenza produkta preseže fluorescenco ozadja. Tu določimo linijo prazne vrednosti (threshold), ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno različna od fluorescence ozadja. Nato za

vsak vzorec določimo cikel, ko krivulja preseže linijo pražne vrednosti ( $C_t$  vrednost). Med eksponentno fazo je pomnoževanje optimalno in z vsakim cikлом se v idealnih reakcijskih pogojih količina produkta podvoji (pri 100 % učinkovitosti pomnoževanja). Po končanem pomnoževanju nam na osnovi izmerjenih vrednosti računalnik poda amplifikacijsko krivuljo, ki prikazuje odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. V zadnji, plato fazi, pa se pomnoževanje prekine, zaradi porabe reagentov in upada aktivnosti encima. Na tem nivoju podatki o fluorescence niso več uporabni za kvantitativno analizo (Wong in Medrano, 2005; Behr in Collins, 2010).



Slika 6: Prikaz  $C_t$  vrednosti in pražne linije. Cikel pri katerem fluorescenza vzorca preseže linijo pražne vrednosti je vrednost  $C_t$ . To je točka na eksponentnem delu krivulje pomnoževanja, kjer fluorescenza pomnožka preseže fluorescenco ozadja (Applied Biosystems. Life Technologies., 2012)

#### 2.4.2.2 Metode zaznavanja

Za določevanje pomnožkov pri qPCR poznamo dve metodi: nespecifičen način zaznavanja z uporabo barvila SYBR Green in specifičen način z označenimi sondami TaqMan. Pri metodi SYBR Green se barvilo veže na del dvojnovidjačne DNA, pri čemer se sprošča fluorescence. Barvilo ni specifično in se veže na katerikoli del dvooverižne DNA. Pri TaqMan pa so označene sonde specifične za izbrano zaporedje in se za razliko od SYBR Green veže na specifično izbrano zaporedje (Bustin, 2000; Wong in Medrano, 2005). Za naše analize smo uporabili SYBR Green kemijo.

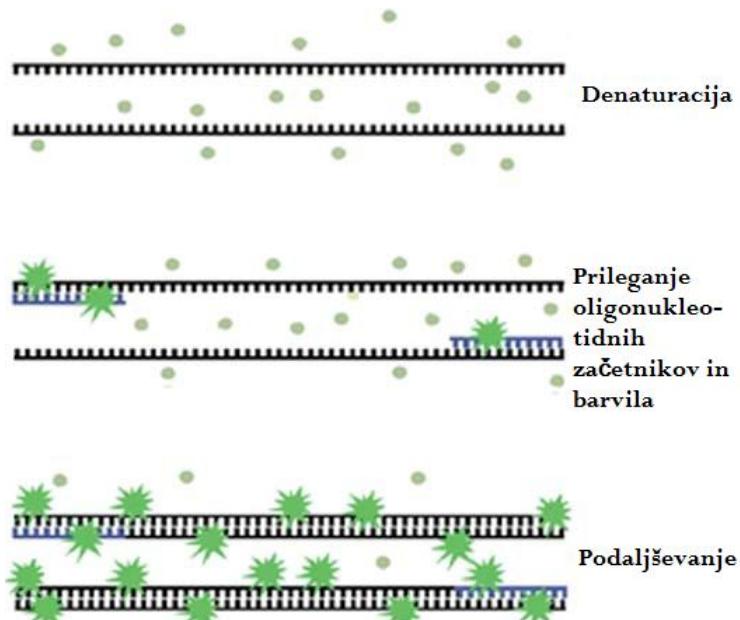
##### 2.4.2.2.1 Nespecifične metode z uporabo SYBR Green kemije

SYBR Green je fluorogeno barvilo, ki se veže na vsako dvojnovidjačno DNA in fluorescira le, ko je vezano na DNA. Njegova fluorescensa je v nevezani obliki 1000x manjša od tiste v vezani obliki. Več kot je pomnožkov, več barvila se veže in večja je intenziteta fluorescence. Do povečanja oddane fluorescence tako pride med podaljševanjem, med denaturacijo pa se zopet zmanjša.

Prednost fluorogenih barvil je ta, da jih lahko uporabljam s katerimikoli začetnimi oligonukleotidi na pripadajoči tarčni molekuli. Slabost pa je v vezavi fluorogenih barvil na vse pomnožke, tako na specifične kot nespecifične, ter različne dimere, zaradi česar lahko dobimo lažne rezultate oziroma netočno interpretacijo rezultatov. Specifičnost lahko povečamo s spremeljanjem talilne krivulje (melting curve), saj se ta razlikuje med različnimi

pomnožki zaradi njihove različne dolžine in nukleotidne sestave. Talilna krivulja je krivulja, ki preko meritve fluorescence prikazuje stopnjo denaturacije dvooverižne DNA v odvisnosti od temperature.  $T_m$  je prevojna točka na talilni krivulji in prikazuje temperaturo pri kateri pride do denaturacije DNA verige.

Z merjenjem talilne krivulje ugotavljamo tudi, če so se pomnoževali pravi fragmenti. Vsak od nastalih produktov ima določeno  $T_m$ , ki je odvisna od dolžine in vrste baznih parov. V primeru kontaminacije ali tvorbe dimerov med začetnima oligonukleotidoma se bodo  $T_m$  med produkti razlikovale (Bustin, 2000).



**Slika 7:** Pomnoževanje DNA z uporabo fluorescentnega označevalca SYBR Green (SG) (prikaz pomnoževanja ene verige DNA) Stopnja 1: Prileganje začetnih oligonukleotidov na denaturirano DNA, SYBR Green prost v raztopini. Stopnji 2 in 3: Podaljševanje in postopna vezava SYBR Green-a v dvojno vijačnico (Fraga in sod., 2008).

#### 2.4.2.3 Absolutna in relativna kvantifikacija

Rezultate qPCR lahko določamo na dva načina: z absolutno ali relativno kvantifikacijo. Z absolutno kvantifikacijo lahko iz standardne krivulje s primerjavo Ct vrednosti vzorca s Ct vrednostmi standardov določimo absolutno število kopij v vzorcu.

Z relativno kvantifikacijo pa opisujemo spremembe v izražanju tarčnega gena glede na referenčni gen. Rezultate podamo kot razmerja med tarčnim in referenčnim amplifikonom v istem in različnih vzorcih (Wong in Medrano, 2005; Bustin, 2000).

#### 2.4.2.4 Vrednotenje qPCR rezultatov

- Bazna linija

Bazna linija je število ciklov, pri kateri jakost fluorescence še ne preseže praga detekcije. Odstraniti mora fluorescence ozadja, ne sme pa biti na področju, kjer se amplifikacijski signal začne dvigovati nad njo. Računalnik jo avtomatično sam nastavi 1-2 cikla pred prvo amplifikacijsko krivuljo, lahko pa jo ročno spremenimo (Wong in Medrano, 2005).

- deltaRn

Delta Rn je razlika med emisijo fluorescence produkta (Rn) in fluorescentnim signalom bazne linije. Je normaliziran reporterski signal, ki predstavlja razmerje med signalom reporterskega barvila in pasivne reference. Pasivna reference se uporablja za normalizacijo signala reporterskega barvila. Z njo korigiramo nihanje fluorescentnega signala, ki ne izvira iz PCR ampak fluorescence ozadja, kot so komponente reakcije, prašni delci (Wong in Medrano, 2005).

- Pražna vrednost (threshold)

Pražno vrednost določimo, ko signal preseže fluorescence ozadja, torej v zgodnji eksponentni fazi. Vrednost predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno različna od fluorescence ozadja. Nastavimo jo lahko ročno, običajno pa jo avtomatsko izračuna računalnik kot 10x standardno deviacijo povprečnega signala bazne linije (Bustin, 2000; Wong and Medrano, 2005).

- Vrednost Ct

Vrednost Ct je točka na eksponentnem delu krivulje pomnoževanja DNA, kjer je fluorescensa pomnožka večja od fluorescence ozadja. Rezultat je cikel, v katerem fluorescensa vzorca preseže linijo pražne vrednosti. Na osnovi Ct vrednosti primerjamo med seboj dobljene podatke in jih uporabimo za nadaljnjo obdelavo. Ct vrednost je obratno sorazmerna z začetnim številom kopij, torej več začetnega vzorca pomeni nižji cikel pri katerem fluorescensa preseže fluorescence ozadja (Bustin, 2000, Wong in Medrano, 2005).

- Amplifikacijska krivulja

Krivulja, ki prikazuje odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov oziroma potek pomnoževanja DNA v času (Wong in Medrano, 2005).

- Standardna krivulja

Standardno krivuljo pripravimo z zaporednim redčenjem standarda znane koncentracije. Kot standard se najpogosteje uporablja plazmid, ki vsebuje tarčno sekvenco. Krivulja odraža linearno razmerje med Ct vrednostmi in logaritemskimi vrednostmi količin standardne DNA ( $\log N$ ) in omogoča določitev koncentracij neznane DNA v vzorcu na podlagi njene Ct vrednosti.

Iz krivulje lahko razberemo mnoge podatke o poteku reakcije, kot so naklon, y-presek in korelacijski koeficient. Iz naklona določimo učinkovitost pomnoževanja: pri naklonu -3,32 je učinkovitost 100 %. V vsakem ciklu naj bi se količina produkta podvojila (v tem primeru naklon ustreza vrednosti -3,32), v praksi pa je običajno učinkovitost nekoliko nižja.

Korelacijski koeficient  $R^2$  je mera prileganja, ki pove, kako dobro se meritve prilegajo idealni krivulji (pri idealnem prileganju je -1), ki je v tem primeru premica. Zaradi pogojev je ponavadi vrednost manjša od -1, priporočljivo pa je vsaj 0,99 (Bustin, 2000; Wong in Medrano, 2005).

- Učinkovitost encimske reakcije

Učinkovitost encimske reakcije razberemo iz enačbe standardne krivulje. Ustreza vrednosti naklona, ki mora biti čim bližje vrednosti -3,32, kar je idealna vrednost (100 % učinkovitost). Učinkovitost je ovisna od začetnih oligonukleotidov in inhibicije.

- Tm

Disociacijska (talilna) krivulja je krivulja, ki prikazuje odvisnost stopnje denaturacije dvooveržne DNA od temperature. Ključna točka na krivulji je temperatura taljenja (Tm). Označuje temperaturo pri kateri je 50 % DNA v obliki enojne verige.

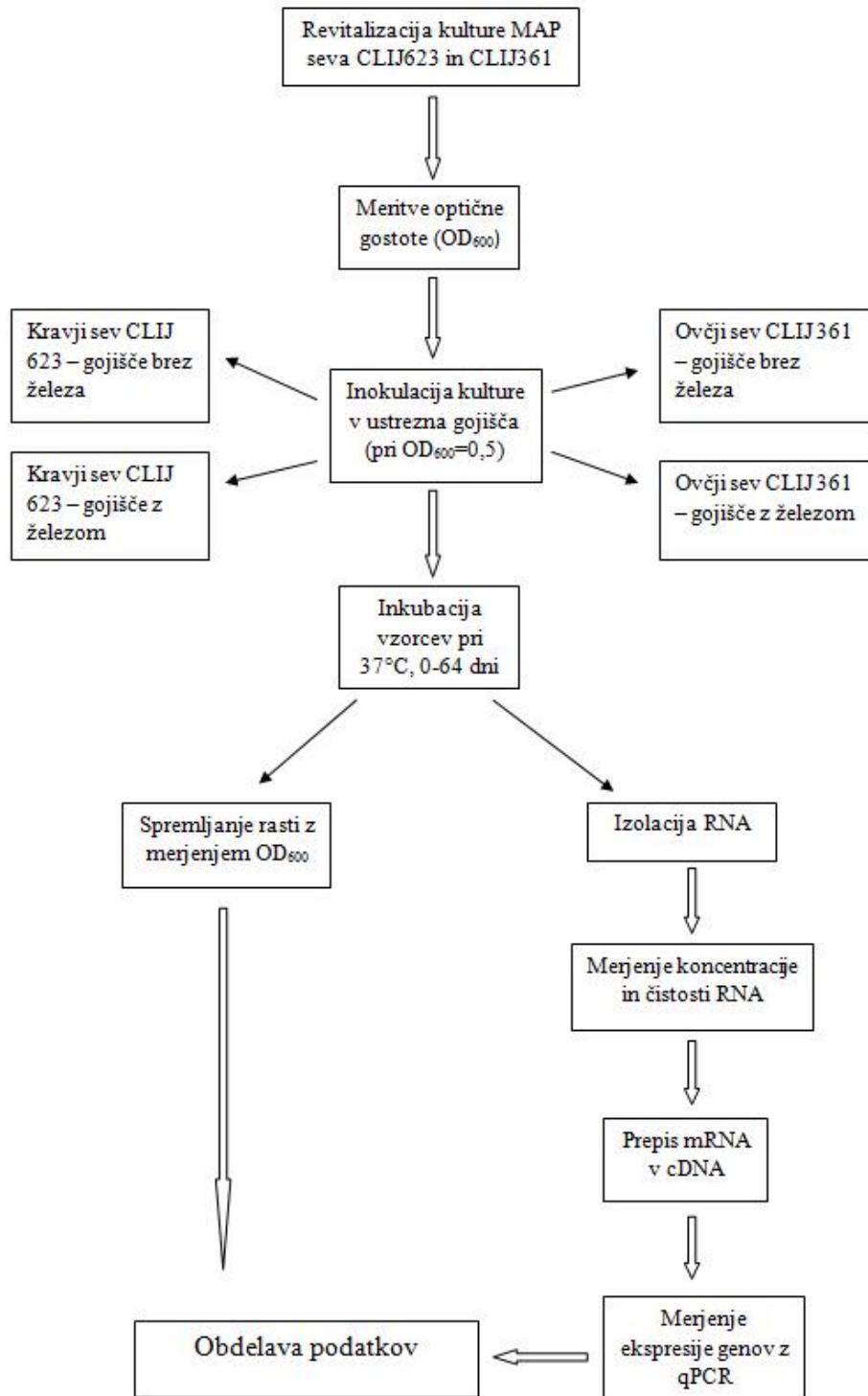
Pri uporabi SYBR Green kemije ugotavljamo, ali imajo talilne krivulje vrh pri isti temperaturi. V primeru pojava nespecifičnih produktov pri PCR (npr. dimeri začetnih oligonukleotidov) se talilne krivulje razlikujejo. Tako z merjenjem talilne krivulje ugotavljamo tudi, če so se pomnoževali pravi fragmenti (Wong in Medrano, 2005).

- Občutljivost qPCR:

Občutljivost PCR je določena kot najnižja koncentracija DNA, ki jo lahko določimo v izbranih razmerah priprave vzorca in izvedbe PCR.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 NAČRT POSKUSA



Slika 8: Shema poteka dela od revitalizacije kulture do obdelave podatkov dobljenih s qPCR analizami

Poskus je zajemal več faz: revitalizacijo kulture MAP, merjenje optične gostote, izolacijo RNA, tretiranje izolirane RNA z encimom DNaza, reverzno transkripcijo z encimom reverzna transkriptaza, analize verižne reakcije s polimerazo v realnem času ter obdelavo in interpretacijo podatkov.

Kulturo MAP krajji sev CLIJ623 smo revitalizirani na Inštitutu za fizikalno biologijo (Herrold's egg yolk trdno gojišče, Becton Dickinson). Zrasle kolonije smo precepili v modificirano Sauton's gojišče z dodatkom železa in mikobaktina J ( $100\mu\text{L/L}$  Fe,  $2\text{mg/L}$  MJ). Pri dovolj visoki OD<sub>600</sub> (0,4-0,5) smo kulturo nato precepili v dve različni gojišči iz katerih smo vsak dan izolirali RNA za merjenje izražanja genov. Gojišči v kateri smo kulturo precepili sta bili pripravljeni po modificiranem protokolu za Sauton's tekoče gojišče (preglednica 1), ki se med seboj razlikujeta v vsebnosti železa in mikobaktina. Z izolirano RNA smo ugotavljali spreminjanje izražanja genov *mbt* operona. Poskus smo pripravili v treh paralelkah.

Ovčji sev CLIJ361 so na inštitutu prav tako revitalizirali na trdnem Herrold's egg yolk gojišču (»HEYM«, Becton Dickinson), zrasle kolonije pa precepili v komercialna gojišča 7H9 z mikobaktinom in ADC (Difco, Becton Dickinson). Kultura iz neznanih razlogov ni zrasla, zato smo jo izločili iz poskusa.

Za ugotavljanje razlike v izražanju genov za sintezo mikobaktina pri kravjem sevu623 bakterije MAP smo se odločili analizirati gene *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK* in *mbtL*, ki se v *mbt* operonih nahajo za predpostavljenim vezavnim mestom za transkripcijski regulator *IdeR*. Analizirali smo tudi gen *bfrA*, katerega produkti sodelujejo v sintezi proteinov za shranjevanje železa. Geni *mbtA*, *mbtB* in *mbtI* so del operona *mbt-1*, gena *mbtK* in *mbtL* pa del operona *mbt-2*. Kot že omenjeno *IdeR* ob vezavi na del verige blokira prepis omenjenih genov in hkrati inducira ekspresijo genov, ki so odgovorni za sintezo proteinov za shranjevanje železa (gen *bfrA*). Z namenom, da bi preverili funkcijo in delovanje *ideR* regulatorja smo poleg omenjenih genov analizirali tudi gen *ideR*.

Izražanje analiziranih genov smo normalizirali na izražanje gena *sigA*, ki se izraža neodvisno od naših pogojev rasti. Ekspresija gena *sigA* je namreč neodvisna od okoljskih stresnih dejavnikov in poteka konstantno skozi vse faze rasti (Hu in Coates, 1999). Tako lahko iz razmerja preiskovanega in normalizacijskega gena ugotovimo ali je prišlo do razlike v izražanju.

Izolacijo RNA smo izvedli vsak dan, ter za spremljanje rasti kulture vsak drugi dan izmerili OD<sub>600</sub>. Tako smo lahko spremljali izražanje genov v odvisnosti od faze rasti.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Bakterijski sevi MAP

#### 3.2.1.1 Kravji sev CLIJ623

V raziskavi smo uporabili sev CLIJ 623. Sev je bil izoliran iz okuženega goveda v Avstraliji, kjer so tudi sekvenirali celoten genom tega seva (CSIRO, AUS).

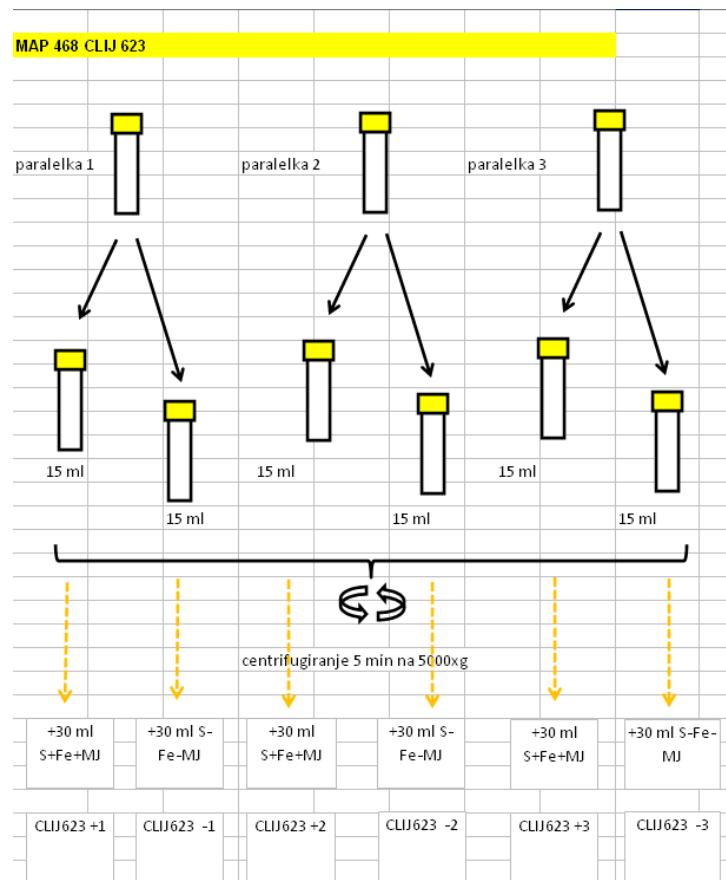
Celice smo revitalizirali na HEYM gojišču z mikobaktionom J (Bekton Dickinson) in shranili pri temperaturi  $37^{\circ}\text{C}$ . Zrasle kolonije smo precepili v modificirano Sauton's gojišče z dodatkom železa in mikobaktina, ter zopet inkubirali pri temperaturi  $37^{\circ}\text{C}$ . Pri OD<sub>600</sub> 0,4-0,5 smo kulturo po postopku (slika 9) precepili v dve različni gojišči pripravljeni po

modificiranim protokolu za Sauton's tekoče gojišče (preglednica 1), ki se razlikujeta v vsebnosti železa in mikobaktina.

**Preglednica 1: Modificirano Sauton's gojišče (Kopinč in Lapanje, 2012)**

Kemikalije	Količine za 1L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
citronska kislina	2 g
L-asparagin	4 g
glicerol	60 mL
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg
Tween 80	250 mg
Mikobaktin J	0 ali 2 mg
100 mM $\text{FeCl}_3$	0 ali 1 mL

Vse sestavine (preglednica 1) smo zatehtali v čašo in dodali vodo. Mešanico smo dobro premešali z magnetnim mešalom in na koncu umerili pH na 6,8 z dodajanjem NaOH. Gojišča smo razdelili po 300 mL v čaše z zamaškom in sterilizirali v avtoklavu ( $t = 15$  min,  $T = 120^\circ\text{C}$ ,  $p = 1,1$  bar).



**Slika 9: Postopek priprave vzorcev**

Kulture v Sauton's gojišču (v treh paralelkah) smo centrifugirali 5 minut na 5000 x g, odlili supernatant in resuspendirali v svežem Sauton's gojišču z ali brez mikobaktina in železa (slika 9). Sledila je inkubacija pri 37 °C.

### 3.2.1.2 Ovčji sev CLIJ361

Ovčji sev smo na Inštitutu za fizikalno biologijo poskusili revitalizirat v komercialnem HEYM gojišču z dodanim mikobaktinom (Becton Dickinson), gojiščih 7H9 in ADC (Difco, Becton Dickinson).

### 3.2.2 Merjenje optične gostote celic

Rast kulture MAP smo tekom inkubacije spremljali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm. Meritve smo naredili po enkrat za vsako paralelno kulturo vsak drugi dan. Meritve dneva 0 predstavljajo tisti dan, ko smo suspenzijo precepili v Sauton's gojišče.

S suspenzijo celic smo napolnili kiveto in izmerili OD glede na sterilno Sauton's gojišče. Pred vsakim merjenjem smo bakterijsko suspenzijo v centrifugirki dobro premešali.

### 3.2.3 Izolacija RNA

Prvo izolacijo RNA smo opravili pri  $OD_{600} = 0,1$  (dan 0), se pravi na dan, ko smo precepili kulturo v novo gojišče. Izolirali smo vedno tri različne vzorce (iz treh neodvisnih poskusov ozziroma bioloških ponovitev), enkrat na dan.

RNA smo izolirali v laminariju, ki smo ga očistili s čistilom RNazaZap (Ambion, USA), da smo se izognili morebitni kontaminaciji z RNazami. Uporabili smo sterilne rokavice ter Eppendorf centrifugirke brez RNaz.

RNA smo izolirali po modificiranem protokolu Chomczynski in Sacchi 2006:

1. 1-2 mL kulture, sledi 3 min centrifugiranje na 10000 x g in odstranitev supernatanta.
2. Resuspendiranje v 500  $\mu$ L sol D in dodatek 375 mg steklenih kroglic.
3. Stresanje v SmartHelix Bead Beaterju 2 min na max frekvenci (30 Hz).
4. Po korakih dodamo najprej 50  $\mu$ L natrijevega acetata, premešamo, in 500  $\mu$ L kislega fenol-kloroforma-izoamilalkohola, 25:24:1 ( $H_2O$  nasičenega), premešamo.
5. Stresanje v Mill Mix 20 (Tehnica, SLO) 2 min na max frekvenci (30 Hz).
6. Postavimo na led za 15 min.
7. Supernatant (vodna faza) prenesemo v čiste epice in dodamo 500  $\mu$ L izopropanola, inkubiramo vsaj 1 uro na -20 °C.
8. Centrifugiranje 20 min na 16000 x g pri 4 °C, zavrzemo supernatant.
9. Peletu dodamo 300  $\mu$ L sold, premešamo, dodamo 300  $\mu$ L izopropanola, premešamo in inkubiramo vsaj 30 min na -20 °C.
10. Centrifugiranje 15 min na 16.000 x g pri 4 °C, zavrzemo supernatant.
11. Dodamo 1 mL 75 % EtOH, zmešamo na vrtinčniku. Inkubiramo 5 min na sobni temperaturi, da raztopimo ostanke GITC (gvanidinijev tiocianat); vzorce na tej stopnji lahko hranimo na -20 °C poljubno časa.
12. Centrifugiranje 20 min pri 16000 x g pri 4 °C, odlijemo supernatant.
13. Posušimo RNA pelet na zraku, 5-10 min.

14. Resuspendiramo v 40 µL DEPC vode in pred nadaljnjo uporabo shranimo vzorce na -80 °C.

### 3.2.4 Merjenje koncentracije in čistosti RNA

Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo določili s spektrofotometrom (Synergy H4™ Hybrid Reader, BioTek) z merjenjem absorbance pri  $\lambda_{260}$ . Čistost RNA je odvisna od kontaminacije vzorca z DNA, proteini, in ostalim kot so gvanidinij in druge soli, ki izvirajo iz izolacijskih pufrov (Chomzynski in Sacchi, 1987). Čistost izolacije ocenimo iz razmerja med absorbancami  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ , ki mora biti nad 1,8 za ocenitev čistega vzroca RNA. Tako RNA kot DNA absorbirata pri valovni dolžini 260, medtem ko proteini absorbirajo pri 280. Kontaminacijo s solmi pa določimo z razmerjem absorbanc  $\lambda_{260}/\lambda_{240}$ , kjer čist vzorec predstavlja vrednosti nad 1,4 (Held, 2008). Učinkovitost oziroma koncentracijo RNA določimo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 260, vendar le, kadar čistost (razmerje absorbanc  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ ) doseže vrednosti nad 1,8 oziroma nad 1,4 pri merjenju kontaminacije z solmi.

Kontaminacijo z DNA pa smo preverjali z metodo qPCR, kjer smo skupaj z RT vzorci (prepisani vzorci z encimom reverzna transkriptaza) pomnoževali NORT vzorce (vzorci brez reverzne trankripcije, le tretirani z encimom DNaza). Postopek za metodo qPCR je opisan v poglavju 3.1.7.

### 3.2.5 Tretiranje RNA vzorca z encimom DNaza

Uporabili smo kemikalije: DNaza, RNaza free (Fermentas), DNazni pufer (Fermentas), RNazni inhibitor (Applied Biosystems), EDTA (Fermentas) in DEPC vodo (Ambion) iz katerih smo pripravili reakcijsko mešanico (preglednica 2) v 1,5 mL Eppendorf centrifugirke. V PCR Eppendorf centrifugirke smo odpipetirali po 7 µL pripravljene mešanice, dodali 20 µL vzorca RNA in na koncu 3 µL DNaze.

**Preglednica 2: Kemikalije za reakcijsko mešanico za tretiranje RNA z encimom DNaza**

Reakcijska mešanica	Volumen za 1 vzorec
DEPC voda	3 µL
DNazni pufer	3 µL
RNAzni inhibitor	1 µL
DNAza I, RNAza free	3 µL
vzorec RNA	20 µL

Sledila je:

- inkubacija 1,5 h na 37 °C
- dodatek 3 µL EDTA (25 mM)
- inkubacija 5 min na 70 °C

### 3.2.6 Reverzna transkripcija

Po čiščenju vzorca z DNazo sledi prepis RNA v komplementarno cDNA z encimom reverzna transkriptaza. Prepisu sledi pomnoževanje tarčne DNA z verižno reakcijo s polimerzo v realnem času (qPCR).

Za reverzno transkripcijo RNA smo uporabili High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AB Applied Biosystems) in DEPC vodo (dietilpirokarbonat – spojina, s katero odstranimo prisotne RNaze v vodi) (Ambion). Iz omenjenih reagentov smo pripravili reakcijsko mešanico (preglednica 3) v 1,5 mL Eppendorf centrifugirke, ki smo jo dobro zmešali na vrtinčniku. V PCR Eppendorf centrifugirke smo odpipetirali 10 µL reakcijske mešanice in 10 µL vzorca.

**Preglednica 3: Priprava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo**

Reakcijska mešanica	Volumen za 1 vzorec
DEPC voda	3,2 µL
10xRT pufer	2 µL
25xdNTP mešanica	0,8 µL
10xRT naključni začetni nukleotidi	2 µL
Reverzna transkriptaza	1 µL
RNAzni inhibitor	1 µL
RNA tretirana z DNazo	10 µL

Sledila je:

- inkubacija 10 min na 25 °C
- inkubacija 120 min na 37 °C
- inkubacija 5 min na 85 °C

### 3.2.7 qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času smo izvajali na inštrumentu ABI Prism® 7500HT Sequence detection system (Applied Biosystems). Za zaznavanje nastalega PCR produkta v realnem času smo uporabljali SYBR Green kemijo.

Uporabljali smo SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems), ki vsebuje fluorescentno barvilo SYBR Green® I, AmpliTaq gold® DNA polimerazo, encim Uracil-DNA N-glikozilazo (UNG), ki prepečuje kontaminacijo s PCR produkti, dNTP, pasivno referenco ROX in optimizirane komponente pufra. V reakcijsko mešanico smo dodajali specifične začetne oligonukleotide za vsak vzorec:

**Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi za qPCR**

ime začetnega oligonukleotida	sekvence	tarčni gen	temperatura prileganja	dolžina pomnožka (bp)
mbtA5F	CACCAACCGGCACACCAA	<i>mtbA</i>	60 °C	59
mbtA5R	TGGCGTTGAAGACGT			
mbtB1F	CCGAAGGGTGTGAAAGTCA	<i>mbtB</i>	62 °C	136
mbtB1R	ACACGTCCATCACCGAGATGT			
mbtI1F	CCGTTGTCTCCAAGTGCCTT	<i>mbtI</i>	60 °C	99
mbtI1R	CCAAGCCGCAGCAGAAAC			
mbtK2F	AGCTACTCGCTGCCGTTGAT	<i>mbtK</i>	60 °C	128
mbtK1R	GCGTGCAGTCCCAGATCGTA			
mbtL2F	TCACCCGAAAACCACGTCA	<i>mbtL</i>	60 °C	126
mbtL2R	GAACGCCACCGAGTCCAG			
sigA2F	GGCAGCGACCAAAGCAAG	<i>sigA</i>	60 °C	54
sigA2R	TGTGGCGGTGCGTTTCAC			
bfrA1F	AGTTTTGCGTCTGCTAACGA	<i>bfrA</i>	60 °C	69
bfrA1R	GGAGTGCAGGAAGTATTGGTTGA			
ideR1F	TGTATCTGCGGACCATCTACGA	<i>ideR</i>	60 °C	92
ideR1R	GGTCGGCCGCTCTGAT			

Z uporabo SBYR Green kemije zaznavanje produkta temelji na fluorescenci, ki se sprošča ob vezavi barvila na del dvostranske DNA, ki z nastanjem novih dvostranskih molekul DNA narašča. Teoretično se v vsakem ciklu število kopij tarčne DNA podvoji.

Reakcijske pogoje qPCR je potrebno za vsak vzorec optimizirati: določiti temperature, število in čase ciklov, ter nastaviti disociacijsko krivuljo za pridobitev talilne krivulje.

### 3.2.7.1 Priprava standardov

Plazmidne standarde za absolutno kvantifikacijo transkriptov so pripravili na Inštitutu za fizikalno biologijo. Iz pripravljenih založnih raztopin standardov z znanimi koncentracijami (*mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL*, *sigA*, *ideR* in *bfrA*) smo z miliQ vodo pripravili 6 zaporednih 10-kratnih redčitev za umeritveno krivuljo.

### 3.2.7.2 Priprava reakcijske mešanice za qPCR

- Reakcijske mešanice za PCR v realnem času smo pripravljali v brezprašni komori
- Pred in po delu smo komoro razkužili in osvetlili z UV lučjo
- Uporabljali smo vedno nove rokavice (osvetljene z UV lučjo) in vse kemikalije so bile vedno na hladnjem (-10 °C do +4 °C)
- Volumen reakcijske mešanice za en vzorec je znašal 20 µL. Vseboval je:
  - 19 µL reakcijske mešanice
  - 1 µL vzorca cDNA

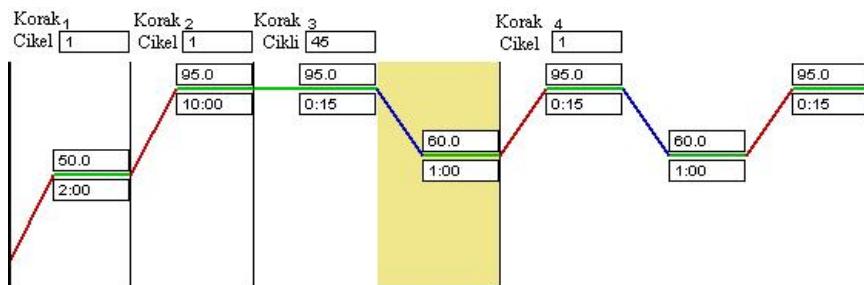
#### Preglednica 5: Primer priprave mešanice za qPCR

Sestavine reakcijske mešanice	Volumen za 1 vzorec
H <sub>2</sub> O <sub>pcr</sub>	7,4 µL
začetni oligonukleotid F	0,8 µL
začetni oligonukleotidR	0,8 µL
SYBR Green master mix	10 µL
suspenzija cDNA	1µL
<b>skupaj</b>	<b>20 µL</b>

- Najprej smo v 1,5 mL Eppendorf centrifugirke odpipetirali izračunan volumen vode, nato oba začetna oligonukleotida in nazadnje SYBR Green master mix. Mešanico nato dobro premešali na vrtinčniku in na PCR ploščo 96-format odpipetirali po 19 µL mešanice v vsako jamico. Na koncu smo odpipetirali po 1 µL vzorca DNA v vsako jamico.
- V vsako PCR reakcijo smo odpipetirali tudi standarde, ki smo jih predhodno pripravili in negativne kontrole. Standardi predstavljajo znane koncentracije določenega odseka DNA, ki nam služi kot umeritvena krivulja iz katere lahko izračunamo koncentracije naših produktov. Negativna kontrola pa mešanico, ki smo ji namesto DNK dodali 1 µL deionizirane vode.
- PCR ploščo napolnjeno z vzorci smo pokrili s folijo, dobro zatesnili in centrifugirali toliko, da se mešanica posede.
- Ploščo smo nato prensli v qPCR aparatu (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Life technologies, ZDA) in nastavili parametre za določeno reakcijo.

#### 3.2.7.3 Potek qPCR

Ploščo smo nato postavili v ciklični termostat in izvedli pomnoževanje DNA. Pomnoževanje DNA je sestavljeni iz štirih faz: S prvo fazo se začne 2 minutna aktivacija nukleaze UNG pri 50 °C za prepečevanje kontaminacije s PCR produkti (odstrani vse uracile, ki so vezani na enojni ali dvojni viačnici in prepreči vnovično pomnoževanje pomnožkov potem, ko je reakcija že končana). Sledi ji 10 minutna aktivacija DNA-polimeraze pri 95 °C. Tretja faza je sestavljena iz 45 ciklov 15 sekundne denaturacije DNA pri 95 °C, 1 minutnega prileganja začetnih oligonukleotidov na specifične dele DNA ter podaljševanja specifičnih začetnih oligonukleotidov pri 60 °C. Na koncu sledi še četrta faza disociacije DNA, ki je sestavljena iz 15 sekundne denaturacije pri 95 °C, počasnega ohlajanja do 1 minutnega prileganja pri 60 °C in 15 sekundne denaturacije pri 95 °C.



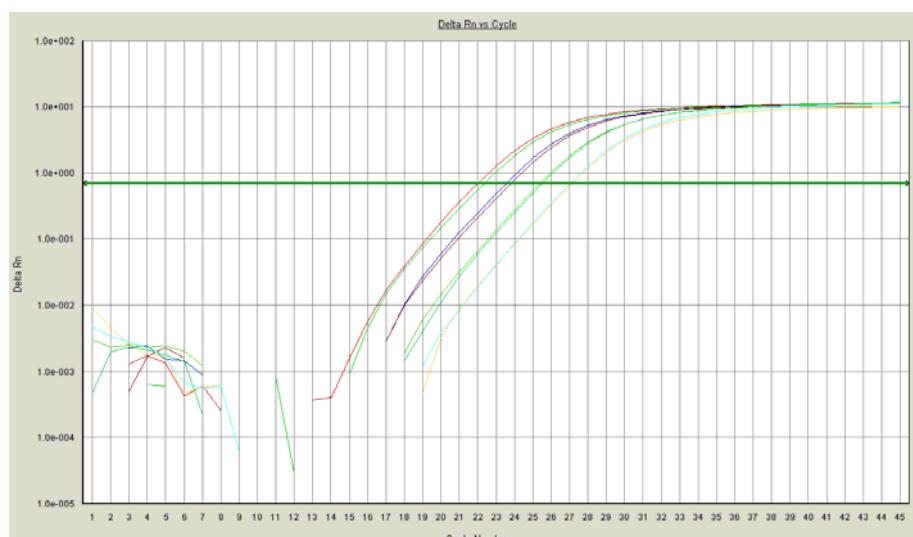
Slika 10: Parametri pomnoževanja qPCR reakcije s SYBR Green kemijo

### 3.2.7.4 Analiza podatkov

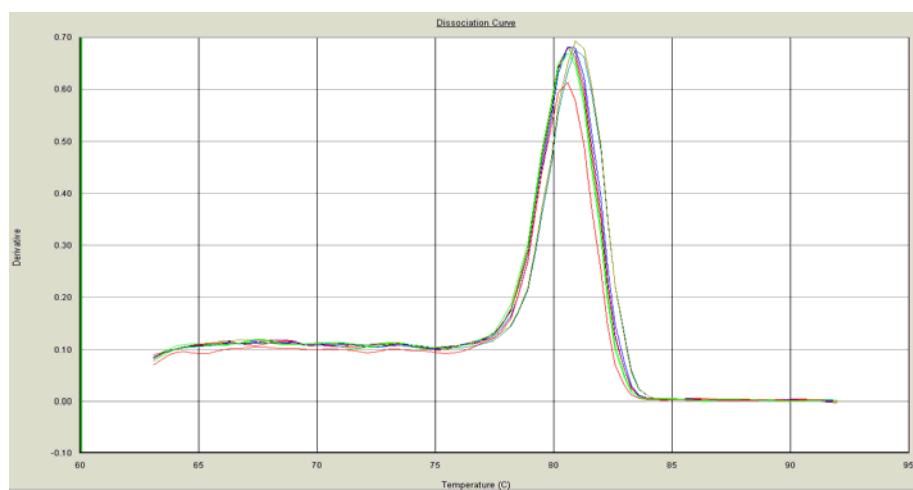
Po izvedbi reakcije nam računalniški program SDS v1.3.1 (Applied Biosystems) poda grafično predstavitev pomnoževanja vzorcev.

Rezultate analiziramo tako, da izberemo avtomatsko nastavitev bazne linije in ročno določimo linijo prazne vrednosti (threshold) v spodnjem eksponentnem delu krivulje pomnoževanja. Preverimo tudi, če imajo talilne krivulje vrh pri isti temperaturi. V primeru večjih odstopanj tako reakcijo izključimo iz nadaljnje obdelave podatkov.

Amplifikacijska krivulja (Slika 11) prikazuje podatke o kinetiki pomnoževanja tarčne sekvence, talilna krivulja (Slika 12) pa podatke o lastnostih končnega produkta pomnoževanja.



Slika 11: Prikaz Ct vrednosti in amplifikacijske krivulje vzorcev

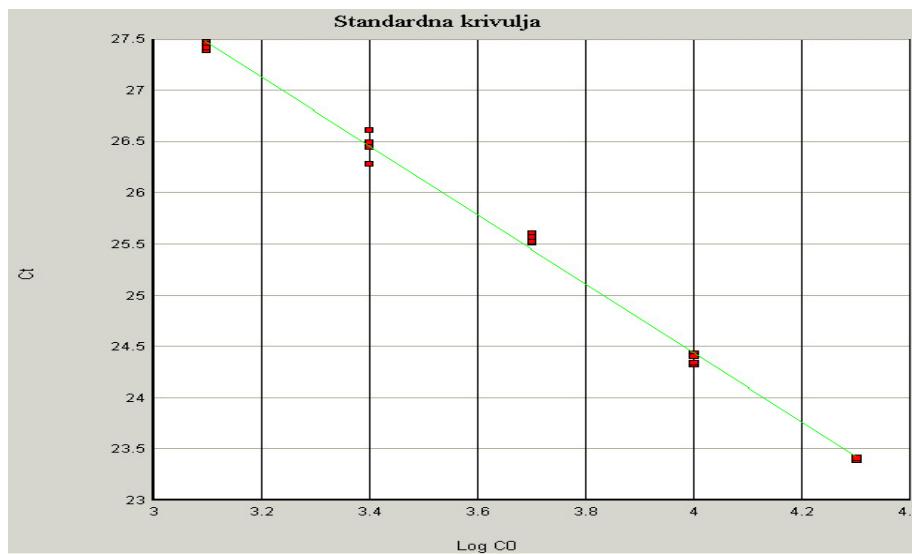


Slika 12: Primer disociacijske krivulje vzorcev

Surove podatke nato obdelamo na različne načine glede na tip podatkov in glede na naše potrebe. Določene  $Q_{ly}$  vrednosti prenesemo v program Microsoft Excel za nadaljnjo obdelavo.

Rezultate qPCR lahko določamo na dva načina, z absolutno ali relativno kvantifikacijo. V našem primeru smo rezultate qPCR obdelali z absolutno kvantifikacijo z uporabo umeritvene

krivulje. Absolutno kvantifikacijo uporabljamo, ko nas zanima točno število kopij gena. S primerjavo Ct vrednosti vzorca s Ct vrednostmi standardov (z uporabo standardne krivulje) določimo absolutno število kopij v vzorcu. Metoda predvideva, da sta učinkovitosti pomnoževanja amplikona v vzorcu in standardu enaki. Pomembno je tudi, da koncentracija vzorčne DNA leži znotraj območja koncentracij, ki ga zajamemo z redčitvami standarda in da je v območju, ki ga lahko zanesljivo kvantificiramo (Wong in Medrano, 2005).

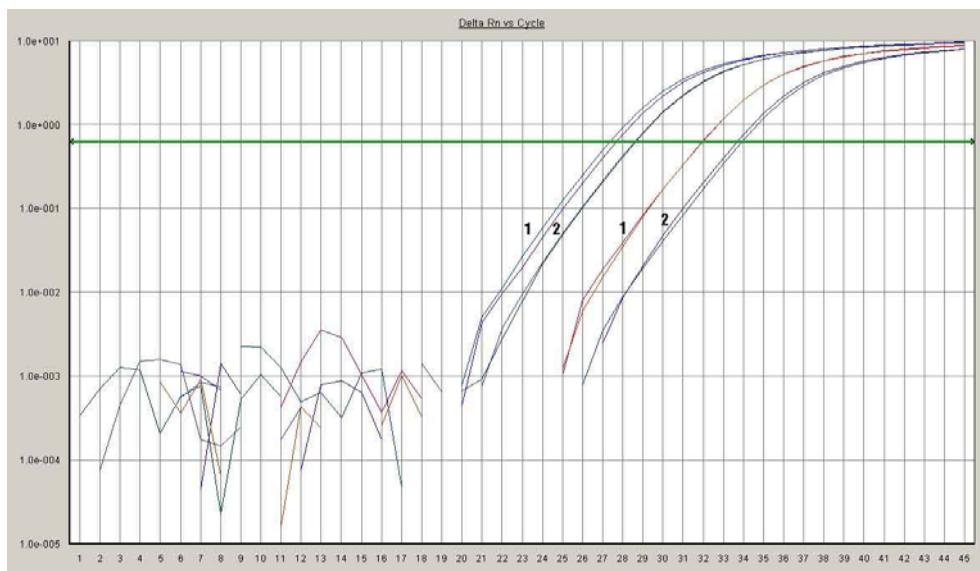


Slika 13: Prikaz linearnega razmerja Ct vrednosti in logaritemskih vrednosti količin standardne DNA (Applied Biosystems, 2012)

Iz enačbe standardne krivulje smo razbrali tudi učinkovitost encimske reakcije, ki ustreza vrednosti naklona in mora biti čim bližje vrednosti -3,32, kar je idealna vrednost (100 % učinkovitost).

### 3.2.7.4.1 Ugotavljanje DNA kontaminacije

Čistost izolirane RNA smo ugotavljali z metodo qPCR. Vzorce iz posameznih dnevov izolacije, ki smo jih očistili z encimom DNAAza (vzorci NORT) smo skupaj z cDNK (RT vzorci) vzorci (RNA tretirana z DNAAzo in prepisana v cDNA) pomnoževali z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Test kontaminacije smo vedno opravili na genu *mbtA*, pod enakimi reakcijskimi pogoji, kot za vse ostale gene.



Slika 14: Rezultat (Ct vrednosti) testa DNA kontaminacije za gen *mbtA*: Številka 1 predstavlja en vzorec in številka 2 drugi vzorec, kjer sta pri višjem ciklu pomnoženi prepisani RNA in pri nižjem DNA.

Razlika v Ct vrednostih vzorcev RT (reverzna transkripcija) in NORT (brez reverzne transkripcije) mora biti čim večja. Ker pa je v praksi nemogoče povsem odstraniti prisotno DNA, smo v našem primeru določili za še sprejemljivo, če kontaminacija ni presegla 10 % PCR produkta, kar pomeni vsaj 3,3 cikle razlike. V primeru kontaminacije večje od 10 % smo ponovili čiščenje z DNazo in reverzno transkripcijo.

### 3.2.8 Primerjava ekspresije

Rezultate qPCR smo obdelali z uporabo programa Microsoft Excel.

#### 3.2.8.1 Obdelava surovih podatkov qPCR

qPCR smo iz programa SDS v1.3.1. prenesli v program Microsoft Excel, jih obdelali in izbrali vrednosti, katere smo žeeli uporabiti v izračunih.

Iz dobljenih Ct vrednosti program SDS poda koncentracijo DNA ( $Q_{ty}$ ) v vzorcu glede na umeritveno krivuljo. Za izračun števila kopij gena v vzorcu smo upoštevali predpostavko, da velja:

$$1 \text{ plazmid} = 1 \text{ gen (copy number)} \quad \dots(1)$$

$$\text{dolžina plazmida [bp]} = \text{dolžina vektorja [bp]} + \text{dolžina inserta [bp]} \quad \dots(2)$$

Iz koncentracije ( $Q_{ty}$ ) smo izračunali število kopij gena v našem vzorcu. Predhodno smo izračunali še molsko maso plazmida z določenim insertom, ki smo ga uporabili v analizi. Iz molske mase in koncentracije ( $Q_{ty}$ ) smo nato izračunali množino. Z uporabo Avogadrovega števila, ter upoštevanjem redčitev vzorca in volumna ekstrakta smo izračunali število kopij gena.

Molsko maso plazmida z insertom dobimo:

$$M_w [\text{bp}] = 650 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \quad \dots(3)$$

kjer je  $M_w$  povprečna molska masa enega baznega para.

$$M_w = \text{dolžina plazmida [bp]} \times 650 \text{ g/mol} \quad \dots(4)$$

kjer  $M_w$  pomeni molsko maso plazmida.

Množino za 1 ng/ml plazmida izračunamo:

$$n = \frac{m}{M_w} \quad \dots(5)$$

Število kopij gena izračunamo:

$$N = n \times N_A \quad \dots(6)$$

kjer  $N$  pomeni število kopij molekul/ml,  $n$  pomeni množino in  $N_A$  Avogadrovo število.

Formula, ki smo jo uporabili v Excelu torej sledi:

$$N = \left( \frac{Q_{ty} \times 10^{-9}}{M_w} \right) \times 6,022 \times 10^{23} \times R \times V_e \quad \dots(7)$$

kjer  $N$  pomeni število kopij molekul/ml,  $n$  pomeni množino,  $Q_{ty}$  količino DNA,  $N_A$  Avogadrovo število,  $R$  faktor redčenja in  $V_e$  volumen ekstrakta.

### 3.2.8.2 Absolutne vrednosti kopij genov in normalizacija na gen *sigA*

Vsakemu vzorcu izolirane RNA smo z metodo qPCR izmerili ekspresijo normalizatorja *sigA*. *SigA* je gen, ki kodira enega od sigma faktorjev RNA polimeraze (proteini potrebni za iniciacijo RNA sinteze). Ekspresija gena *sigA* ni odvisna od okoljskih stresnih dejavnikov in poteka konstantno skozi vse faze rasti (Yanmin Hu in sod., 1999). Iz razmerja preiskovanega in normalizacijskega gena lahko ugotovimo ali je prišlo do razlike v izražanju.

Žeeli smo ugotoviti, kako se koncentracija mRNA spreminja s časom, se pravi z dnevi izolacije. Iz standardne krivulje s primerjavo Ct vrednosti vzorca s Ct vrednostmi standardov določimo absolutno število kopij v vzorcu.

Absolutne vrednosti izražanja genov dobimo po zgoraj opisanem postopku (poglavlje 3.1.8.1). Ker smo vzorce za analizo nanašali vedno v dveh ponovitvah in dveh različnih redčitvah izberemo ustreznejši redčitvi in izračunamo povprečje vrednosti ter standardni odklon (s tem upoštevamo tehnično napako obeh meritev). Standardni odklon uporabljamo kot mero

reprezentativnosti aritmetične sredine. Manjši kot je standardni odklon (v primerjavi z aritmetično sredino) manjše so razlike med dejanskimi vrednostmi spremenljivke in njeno aritmetično sredino ter obratno (Bastič, 2006). Razlike med rezultati smo preverili s statističnim t-testom, s katerim smo ugotovili, ali so razlike statistično značilne.

Števila kopij gena smo normalizirali na gen *sigA* in izračunali standardni odklon:

$$R_{i(LI)} = \frac{X_{i(LI)}}{X_{sigA(LI)}} ; \quad R_{i(HI)} = \frac{X_{i(HI)}}{X_{sigA(HI)}} \quad \dots(8)$$

kjer  $R_{i(LI)}$  in  $R_{i(HI)}$  pomeni razmerje genov i (i so geni *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL*, *bfrA* in *ideR*) in gena *sigA*;  $X_i$  pomeni števila kopij genov *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL*, *bfrA* in *ideR*; HI »high iron« in LI »low iron«.

$$\text{st. odklon } (R_{i(LI)}) = R_{i(LI)} \times \sqrt{\left(\frac{\text{st. odklon } X_{i(LI)}}{X_{i(LI)}}\right)^2 + \left(\frac{\text{st. odklon } X_{sigA(LI)}}{X_{sigA(LI)}}\right)^2} \quad \dots(9)$$

Absolutne vrednosti smo izračunali posebej za medij z železom in medij brez železa ter jih med seboj primerjali.

### 3.2.8.3 Razmerje LI/HI

Ker smo želeli ugotoviti, kako se geni mbt operona izražajo ob pomanjkanju železa, smo izračunali razmerje izraženih genov med medijem brez železa in mikobaktina (low iron – LI) in medijem z železom in mikobaktinom (high iron – HI). Normalizirane vrednosti genov v mediju brez železa in mikobaktina (LI) smo delili z vrednostmi v mediju z železom in mikobaktinom (HI), ter izračunali standardni odklon. Iz razmerij vidimo ali se v mediju brez železa določen gen izraža v povišani (»up regulacija«) oziroma znižani (»down regulacija«) koncentraciji glede na medij z železom:

$$Y_i = \frac{R_{i(LI)}}{R_{i(HI)}} \quad \dots(10)$$

kjer  $Y_i$  pomeni razmerje LI/HI.

$$\text{st. odklon } (Y_i) = Y_i \times \sqrt{\left(\frac{\text{st. odklon } R_{i(LI)}}{R_{i(LI)}}\right)^2 + \left(\frac{\text{st. odklon } R_{i(HI)}}{R_{i(HI)}}\right)^2} \quad \dots(11)$$

kjer  $R_{i(LI)}$  pomeni razmerje gena  $i$  (i so geni *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL*, *bfrA* in *ideR*) in *sigA* v mediju brez železa (LI) in  $R_{i(HI)}$  pomeni razmerje gena  $i$  (*mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL*, *bfrA* in *ideR*) v mediju z železom (HI).

### 3.2.8.4 Razmerje genov *mbt* operona v posameznih fazah rasti

Želeli smo ugotoviti tudi kakšna so razmerja izraženih genov glede na gen *mbtA*. Ta razmerja smo izračunali tako, da smo kopije genov delili s kopijami genov izbranega gena *mbt* operona. V našem primeru smo izbrali gen *mbtA* in tako dobili vrednosti kolikokrat se določen gen *mbt* operona bolj oziroma manj izrazi glede na drugega. S tem preverimo tudi delovanje *ideR* regulatorja. V primeru večjih odstopanj lahko sklepamo, da ima določen gen okvaro pri regulaciji transkripcije.

Izračunali smo razmerja izraženih genov v mediju brez železa, v posameznih fazah rasti (lag, eksponentna in stacionarna faza), v vsaki fazi izračunali povprečje in standardni odklon. Statistično značilnost ( $p < 0,05$ ) razlik pa preverili s t-testom.

Razmerja, povprečja in standardno odklon smo izračunali:

$$Z_i = \frac{R_{i(LD)}}{R_{mbtA(LD)}} \quad \dots(12)$$

kjer  $Z_i$  pomeni razmerje gena  $i$  ( $i$  so geni *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL*, *bfrA* in *ideR*) in *mbtA*.

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N Z_i}{N} \quad \dots(13)$$

kjer  $Z_i$  predstavlja vrednost razmerja iz posamezne faze in  $N$  število razmerij v posamezni fazi.

$$\text{st. odklon } (Z_i) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (Z_i - \mu)^2} \quad \dots(13)$$

Standardni odklon smo izračunali z uporabo Excelove enačbe za standardni odklon vzorca, kjer  $Z_i$  predstavlja vrednost spremenljivk,  $\mu$  predstavlja pričakovano aritmetično sredino in  $N$  predstavlja velikost vzorca.

### 3.2.9 Statistično vrednotenje rezultatov

#### 3.2.9.1 Studentov t-test

Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi (med rezultati izraženih genov) smo uporabili Studentov t-test. S t-testom ugotavljamo ali so razlike med aritmetičnima sredinama dveh vzorcev signifikantne. Torej (če so razlike), ali so nastale slučajno ali pa so statistično značilne.

Postavili smo ničelno domnevo  $H_0$ , ki pravi, da med rezultati izraženih genov ni statističnih razlik in raziskovalno domnevo  $H_1$ , ki pravi da so med rezultati izraženih genov statistično značilne razlike. Stopnjo značilnosti pa smo izbrali 0,05 oziroma 5 %.

S predpostavko, da je varianca med vzorci enaka (analize pod enakimi pogoji) smo z uporabo Excelove formule za t test izračunali p vrednosti. Uporabili smo metodo za dva neodvisna ali odvisna vzorca in dvostransko porazdelitev.

Pri verjetnosti nad 0,05 ničelne hipoteze, ki pravi, da med rezultati ni značilnih razlik, ne zavrnemo. Trdimo lahko, da razlike (če so) niso posledica kakega sistematičnega vpliva, pač pa so nastale slučajno (Bastič, 2006). V primeru p vrednosti pod 0,05 pa ničelno hipotezo zavrnemo in posledično sprejmemo hipotezo, ki pravi, da se rezultati statistično značilno razlikujejo.

### 3.2.9.2 Pearsonov koeficient korelacije

Pearsonov koeficient korelacije ( $r_{xy}$ ) je številska mera, ki predstavlja velikost linearne povezanosti spremenljivk X in Y, merjenih na istem predmetu preučevanja. Ponavadi nas zanima, ali sta spremenljivki v populaciji sploh povezani (Košmelj, 2007). Danes najpogosteje uporabljena metoda ugotavljanja korelacije izraženih genov je Pearsonova metoda ozziroma Spearmanova metoda rangov (Hardin in sod., 2007). S Pearsonovim koeficientom smo ugotavliali ali med izraženimi geni *mbt* operona obstaja korelacija. Korelacijsko smo preverili med geni *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL* in *bfrA*.

Postavili smo:

- ničelno domnevo  $H_0: \rho = 0$ , spremenljivki nista linearno povezani
- alternativno domnevo  $H_1: \rho \neq 0$ , spremenljivki sta linearno povezani

$r > r_{tab}$ ,  $H_0$  zavrnemo in sprejmemo  $H_1$

$r < r_{tab}$ , sprejmemo  $H_0$

Z uporabo Excelove formule za Pearsonov koeficient korelacije smo izračunali vrednosti r, ki lahko zavzamejo vrednosti vedno samo med -1 in 1. Govorimo lahko o pozitivni in negativni povezanosti. Pozitivna povezanost obstaja takrat, kadar so vrednosti prve (X) spremenljivke in druge spremenljivke (Y) visoke ozziroma nizke. Tedaj je koeficient pozitiven in blizu 1. Negativna povezanost pa obstaja takrat, kadar so vrednosti prve (X) spremenljivke visoke in vrednosti druge (Y) spremenljivke nizke ozziroma obratno. Tedaj je koeficient negativen in blizu -1.

Z uporabo priloge A, v kateri je podana kritična vrednost Pearsonovega koeficiente pri določeni stopnji značilnosti  $p$  ( $p=0,05$ ) in določeni velikosti vzorca  $n$  ( $n=21$ ), smo ničelno domnevo zavnili ozziroma sprejeli. Če je izračunana ocena  $r$  po absolutni vrednosti večja od kritične vrednosti ( $r_{tab}$ ), ničelno domnevo zavrnemo v korist alternativne domneve (Košmelj, 2007).

#### 3.2.9.2.1 Interval zaupanja za koeficient korelacije

Interval zaupanja, ki ga določata njegova spodnja in njegova zgornja meja, je interval, v katerem se z dano gotovostjo (ponavadi določimo 95 %) nahaja ocenjevalni parameter. Z uporabo Fisherjevega postopka smo določili interval zaupanja za Pearsonov koeficient korelacije. V tem postopku je treba s pomočjo tabele (priloga) pretvoriti Pearsonov korelacijski koeficient v Fisherjev koeficient. Izračunamo spodnjo in zgornjo mejo intervala

zaupanja za Fisherjev koeficient (enačba 14), ter standardni odklon (enačba 15) in s pomočjo tabele (priloga) pretvorimo izračunani meji nazaj v Pearsonov koeficient (Kožuh, 2005).

$$\begin{aligned} Zr &= 1,96 \times se_{Zr} \\ Zr &+ 1,96 \times se_{Zr} \end{aligned}$$

...14

kjer je  $Zr$  vrednost Fisherjevega koeficiente in  $se$  standardna napaka Fisherjevega koeficiente.

$$se_{Zr} = \frac{1}{\sqrt{n-3}}$$

...15

kjer je  $se_{Zr}$  standardna napaka za Fisherjev koeficient in  $n$  število vzorcev.

### 3.2.9.2.2 Signifikanca razlik med korelacijskimi koeficienti

Z uporabo spletnega računalna (<http://vassarstats.net/rdiff.html>) smo preverili domneve o razlikah med korelacijskimi koeficienti. Zanimalo nas je, ali obstajajo statistično značilne razlike med korelacijskimi izraženih genov.

Postavili smo ničelno domnevo  $H_0$ , ki pravi, da med korelacijskimi koeficienti izraženih genov ni statističnih razlik in raziskovalno domnevo  $H_1$ , ki pravi da so med korelacijskimi koeficienti izraženih genov statistično značilne razlike. Stopnjo značilnosti pa smo izbrali 0,05 oziroma 5 %. Z uporabo Fisherjeve metode, ki pretvori  $r$  (Pearsonov koeficient) v  $Z$  koeficient smo izračunali vrednosti  $p$ . Pri verjetnosti  $p$  nad 0,05 ničelne hipoteze, ki pravi da med korelacijskimi koeficienti ni značilnih razlik, ne zavrnemo. Pri verjetnostih  $p$  pod 0,05 pa zavrnemo ničelno hipotezo v korist alternativne, ki pravi da so med korelacijskimi koeficienti statistično značilne razlike.

## 3.3 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA

### 3.3.1 Priprava kulture MAP, sev CLIJ623

Kemikalije za pripravo modificiranega Sauton's gojišča:

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, ZDA)
- MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Citronska kislina (Sigma-Aldrich, ZDA)
- L-asparaginska kislina (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Glicerol (Sigma-Aldrich, ZDA)
- ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Mikobaktin J (IDVET, Francija)
- FeCl<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, ZDA)
- NaOH (Sigma-Aldrich, ZDA)
- miliQ voda

Laboratorijska oprema:

- steklovina
- aparat za miliQ (Simplicity Water Purification System, Milipore, ZDA)
- magnetno mešalo
- tehnicka (Kern, Slo)
- pipete (Eppendorf, Germany)
- pH meter (Inolab, Germany)
- avtoklav (Kambič, Slo)
- centrifuga (Tehnica, Slo)
- brezprašna komora (Iskra PIO, Slo)

### **3.3.2 Merjenje optične gostote**

Kemikalije:

- Sauton's tekoče gojišče
- kultura (*Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*)

Laboratorijska oprema:

- spektrofotometer USB 2000 (Ocean Optics, ZDA)
- kivete (Ratiolab, Germany)
- brezprašna komora (Iskra PIO, Slo)
- pipete (Eppendorf, Germany)

### **3.3.3 Izolacija RNA**

Kemikalije:

- sold (denaturacijska raztopina; 4 M gvanidinijeve tiocianat; 25 mM natrijev citrat; pH 7,0; 0,5 % (w/v) N-laurosylsarcosine (sarkozil); 0,1 M 2-merkaptoetanol) (Ambion, ZDA)
- 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, ZDA)
- natrijev acetat (Sigma-Aldrich, ZDA), za pripravo 2 M raztopine natrijevega acetata
- kisli fenol-kloroform-izoamilalkohol, 25:24:1, H<sub>2</sub>O nasičenega (Roth, Germany)
- izopropanol (Sigma-Aldrich, ZDA)
- etanol (Sigma-Aldrich, ZDA), za pripravo raztopine 75 % (w/v) etanola
- DEPC-voda (Ambion, ZDA)
- steklene kroglice (Sigma-Aldrich, ZDA)

Laboratorijska oprema:

- brezprašna komora (Iskra PIO, Slo)
- pipete (Eppendorf, Germany)
- centrifuga (Tehnica, Slo)
- vrtinčnik (Assistant, Germany)
- Mill Mix 20 (Tehnica, SLO)

- termoblok
- zamrzovalnik (-20 °C)
- zamrzovalnik (-80 °C)

### **3.3.4 Merjenje koncentracije in čistosti RNA**

Kemikalije:

- DEPC voda (Ambion, ZDA)
- vzorci RNA

Laboratorijska oprema:

- Synergy H4™ Hybrid Reader (BioTek)
- brezprašna komora (Iskra PIO, Slo)
- pipete (Eppendorf, Germany)

### **3.3.5 Tretiranje RNA z encimom DNaza**

Kemikalije:

- DEPC voda (Ambion, Life technologies, ZDA)
- DNazni pufer (Fermentas, ZDA)
- RNazni inhibitor (Applied Biosystems, Life technologies, ZDA)
- EDTA (Fermentas, ZDA)
- DNaza (DNasa I, RNase free; Fermentas, ZDA)
- vzorci RNA
- čistilo RNazZap (Ambion, Life technologies, ZDA)

Laboratorijska oprema:

- gorilnik
- pipete (Eppendorf, Germany)
- vortex (Assistent, Germany)
- PCR ciklični termostat (Biometra, Germany)
- termoblok

### **3.3.6 Reverzna transkripcija**

Kemikalije:

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life technologies, ZDA):

- 10xRT pufer
- 25xdNTP mešanica
- 10xRT naključni začetni oligonukleotidi
- reverzna transkriptaza
- RNazni inhibitor
  
- DEPC voda (Ambion, Life technologies, ZDA)
- RNA tretirana z DNazo

Laboratorijska oprema:

- gorilnik
- pipete (Eppendorf, Germany)
- centrifuga (Sigma-Aldrich, ZDA)
- vrtinčnik (Assistant, Germany)
- PCR ciklični termostat (Biometra, Germany)

### **3.3.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času – qPCR**

#### **3.2.7.1 Priprava standardov**

Kemikalije:

- založne raztopine standardov (plazmidne standarde za absolutno kvantifikacijo transkriptov smo pripravili na Inštitutu za fizikalno biologijo) – *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtL*, *sigA*, *bfrA* in *ideR* (IFB, Slo)
- miliQ

Laboratorijska oprema:

- gorilnik
- pipete (Eppendorf, Germany)
- vrtinčnik (Assistant, Germany)

#### **3.3.7.2 Reakcijska mešanica za qPCR**

Kemikalije:

- miliQ (avtoklavirana)
- začetni oligonukletidi (Jena Bioscience, Germany)
- SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life technologies, ZDA)
- parafinsko olje (Sigma-Aldrich, ZDA)

Laboratorijska oprema:

- PCR komora
- multikanalne pipete (Eppendorf, Germany)
- pipete (Eppendorf, Germany)
- vrtinčnik (Assistent, Germany)
- centrifuga (Sigma-Aldrich, ZDA)
- termoblok
- qPCR ciklični termostat (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Life technologies, ZDA)

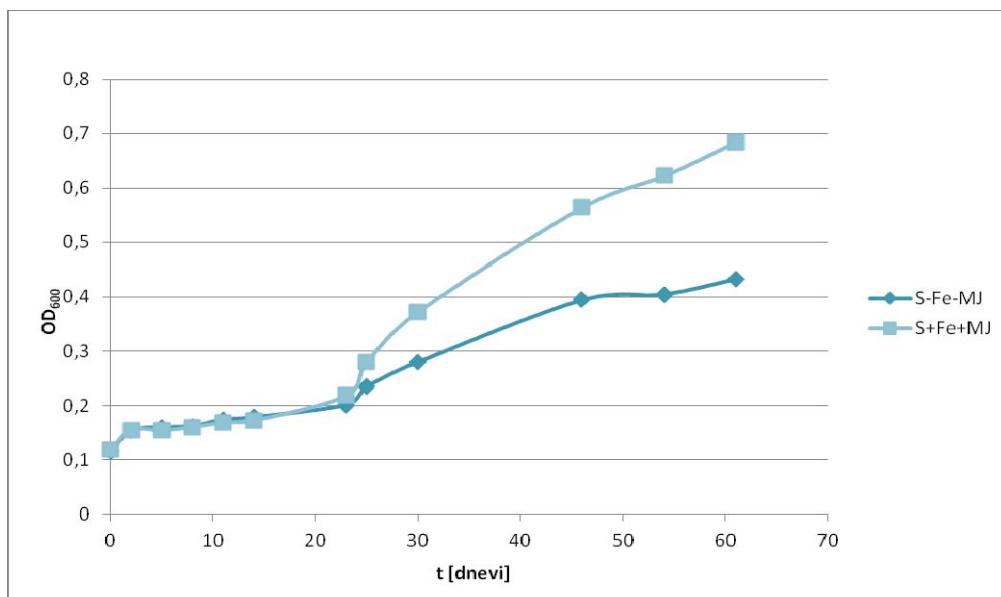
## 4 REZULTATI

### 4.1 MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE

#### 4.1.1 Kravji sev CLIJ623

Kulturi MAP smo z merjenjem optične gostote celic določili rastni krivulji. Spremljali smo rast kulture v mediju z železom in mikobaktinom in v mediju brez železa in brez mikobaktina. Ker nas je zanimalo kdaj, v kateri fazì rasti pride do spremembe izražanja genov za sintezo mikobaktina, glede na razpoložljive koncentracije železa, in kako se izražanje spreminja v različnih fazah rasti, smo rast z merjenjem optične gostote spremljali skozi vse fazì rasti.

Iz obeh krivulj (slika 15) je razvidna faza prilagajanja oziroma lag faza, kjer ni opaznih razlik v gostoti celic. Vidna razlika v rasti pa je v eksponentni oziroma logaritemski fazì. Vidimo, da je naklon rastne krivulje v mediju brez železa in mikobaktina nižji kot v mediju z železom in mikobaktinom. Ta razlika se nadaljuje tudi pri prehodu v stacionarno fazò rasti, kjer kultura v mediju brez železa in mikobaktina doseže nižjo optično gostoto.

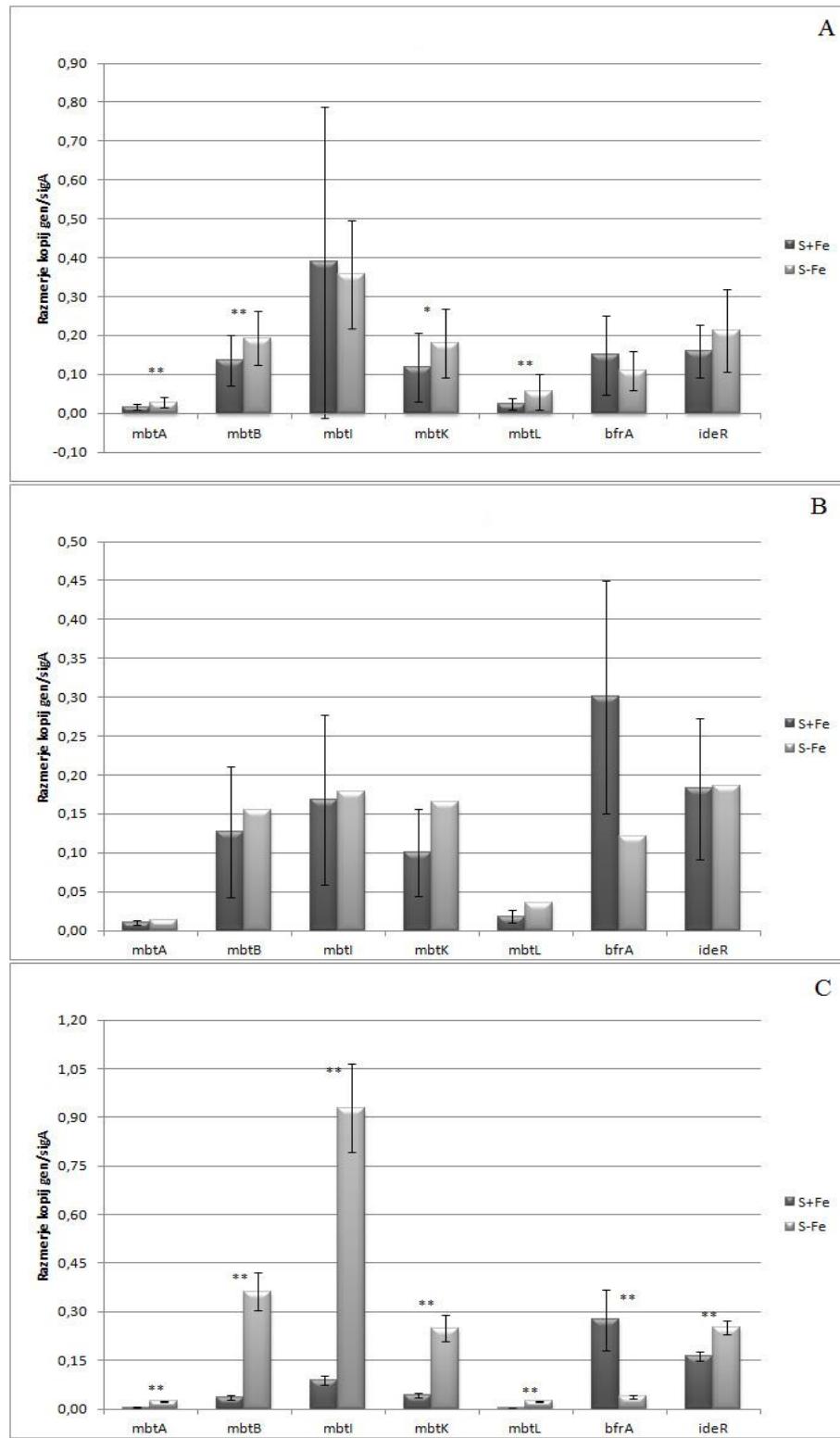


Slika 15: Meritve optične gostote (valovna dolžina 600nm) bakterije MAP v gojišču z železom in mikobaktinom (S+Fe+MJ) in v gojišču brez železa in mikobaktina (S-Fe-MJ).

### 4.2 REZULTATI EKSPRESIJSKIH ANALIZ

Ekspresijske enalize smo ugotavljali na genih *mbtA*, *mbtB*, *mbtI* (operon *mbt-1*), *mbtK* in *mbtL* (operon *mbt-2*), ki imajo vsak svoje vezavno mesto za *IdeR* represor. Poleg genov *mbt* operonov pa smo analizirali tudi gen za bakterioferitin (*bfrA*), pri katerem je transkripcija prav tako regulirana z *IdeR* regulatorjem, le da tu *IdeR* deluje kot aktivator in ne represor transkripcije. Preverili smo tudi dinamiko in količino izražanja gena za *IdeR*, ki predvidoma ni avtoreguliran in naj bi se izražal konstitutivno.

#### 4.2.1 Primerjava absolutnih vrednosti kopij genov



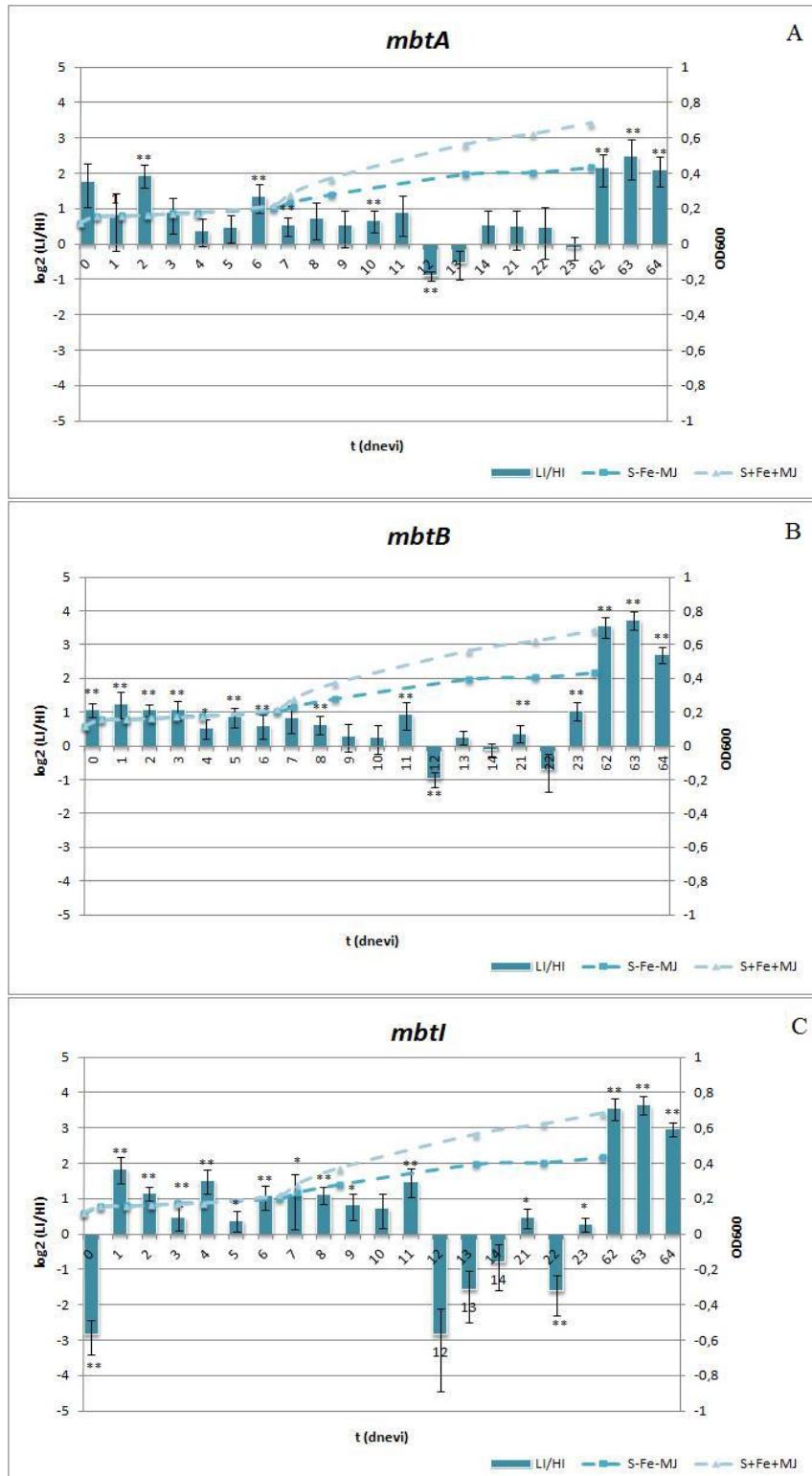
Slika 16: Absolutne vrednosti kopij posameznega gena (normalizirane na gen *sigA*) v mediju z železom in mikobaktinom (S+Fe) in v mediju brez železa in mikobaktina (S-Fe), prikazane na grafih lag (A), eksponentne (B) in stacionarne faze (C). Signifikantne razlike med izraženim genom v mediju z železom in genom v mediju brez železa ( $p < 0,05$ ) so označene z zvezdicami \*\* oziroma \* pri  $p < 0,08$ . Napake predstavljajo standardno deviacijo.

Gena *mbtA* in *mbtL* se izražata v najnižji koncentraciji glede na ostale analizirane gene. V vseh fazah se izražata približno 5-krat manj kot *mbtB*, *mbtK*, in *mbtL*. Izražanje obeh genov je nižje v primerjavi z ostalimi geni tako v mediju z železom kot v mediju brez železa.

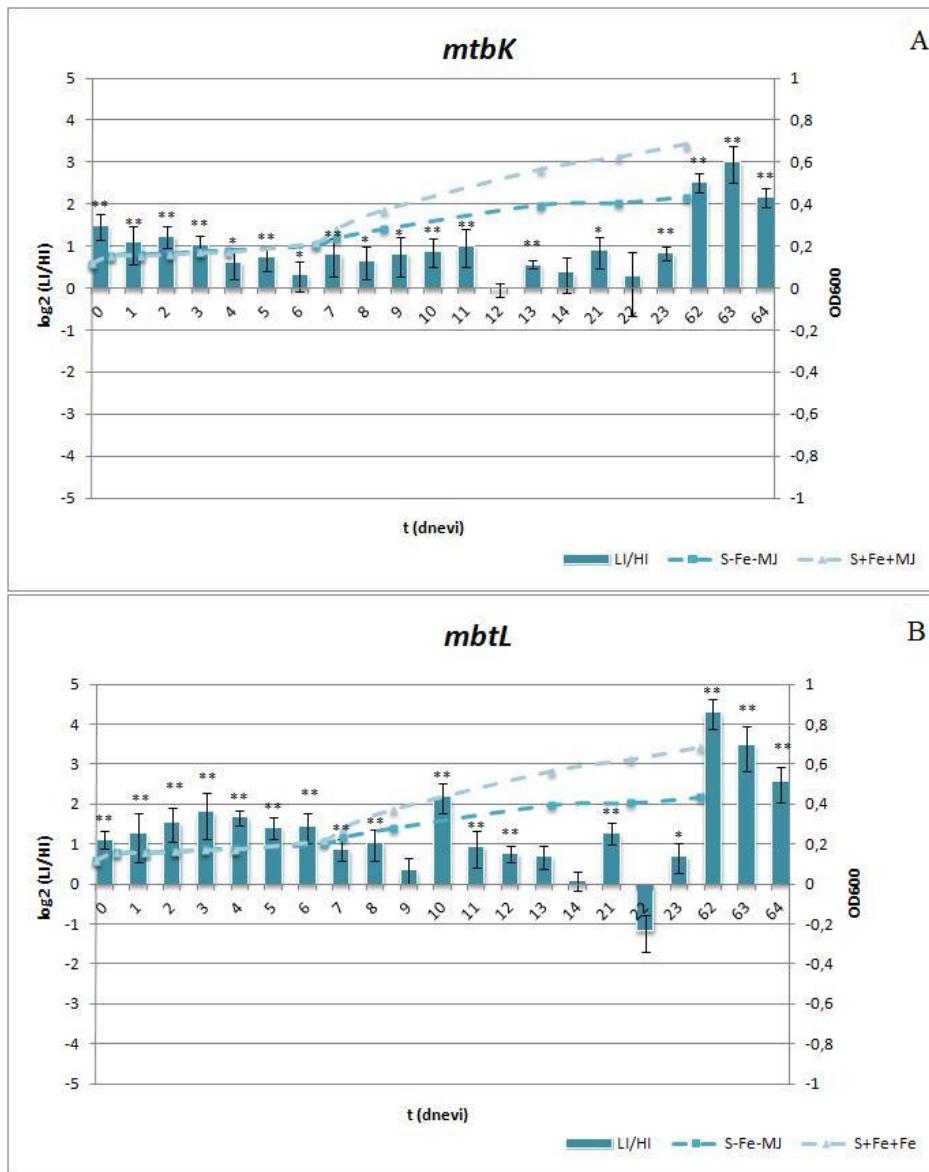
Razlike med izražanjem genov v mediju z železom in v mediju brez železa so najbolj izrazite in statistično značilne v stacionarni fazi rasti, za razliko od eksponentne faze, kjer razlike niso statistično značilne. V stacionarni fazi rasti vidimo v mediju brez železa glede na medij z železom 5-krat višje izražanje genov *mbtA*, 6-krat višje izražanje *mbtK*, približno 4-krat višje izražanje *mbtB*, 10-krat višje izražanje *mbtI* in *mbtL*. Pri genu *bfrA* opazimo 7-krat višje izražanje v mediju z železom glede brez železa, pri *IdeR* pa 1,5-krat višje izražanje v mediju brez železa.

#### 4.2.2 Razmerja LI/HI

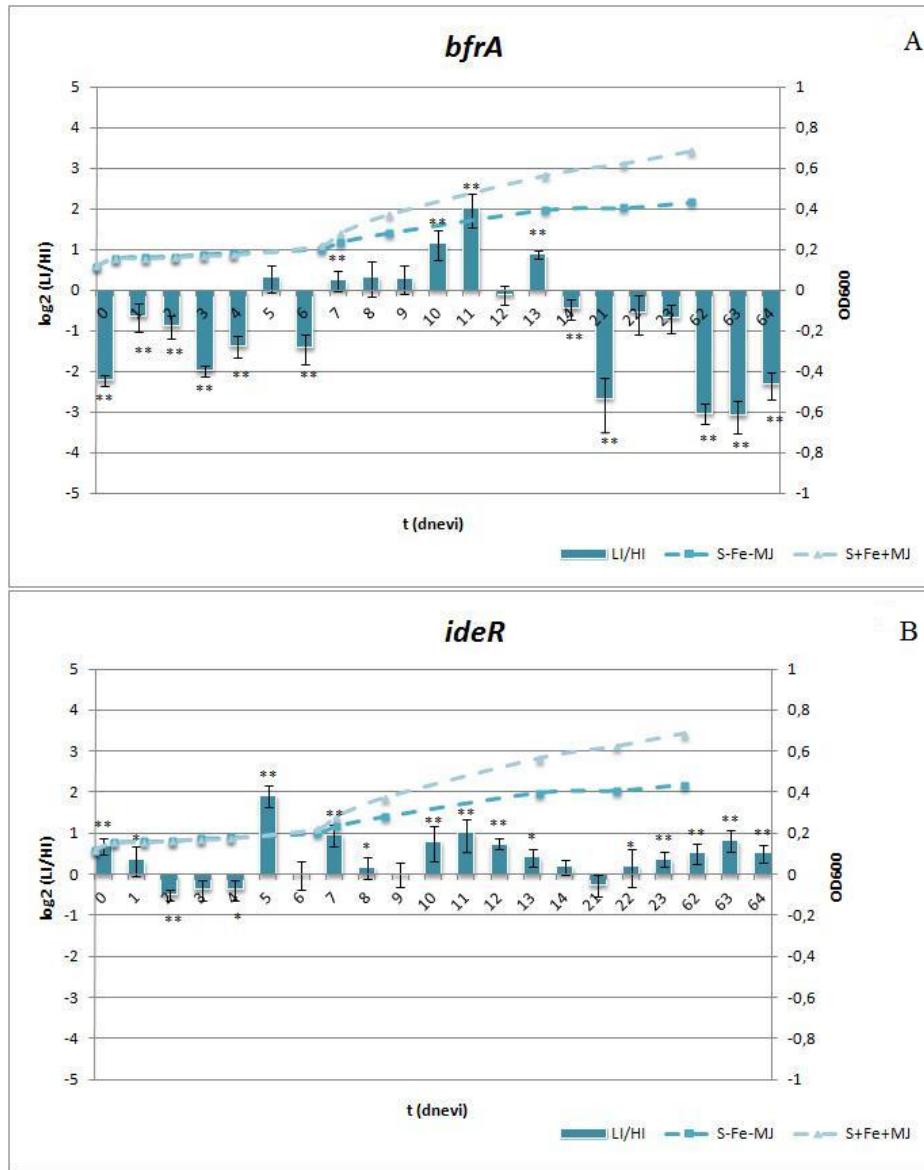
Vrednosti LI/HI predstavljajo razmerje med izražanjem genov v mediju brez železa in mikobaktina (low iron – LI) in vrednostmi v mediju z železom in mikobaktinom (high iron – HI). Pri vrednosti 1 (ozioroma 0 pri logaritmiranih vrednostih) je izražanje v obeh medijih enako. Dobljenim vrednostim smo izračunali tudi standardno deviacijo, ter s t-testom potrdili tiste razlike v izražanju, ki so signifikantne (označene z zvezdicami). Razmerja smo prikazali z grafi, ki smo jih izenačili skalo za lažjo primerjavo in logaritmirali vrednosti za jasnejši prikaz.



Slika 17: Odziv genov operona *mbt-I* – Razmerje normaliziranega izražanja genov *mbtA* (graf A), *mbtB* (graf B) in *mbtI* (graf C) v mediju brez železa (LI) in v mediju z železom (HI). Na grafih so predstavljena LI/HI razmerja izražanja genov, ter krivulji rasti v mediju z in brez železa (S+Fe+MJ in S-Fe-MJ). Signifikantne razlike so označene z dvema zvezdicama\*\* pri vrednostih  $p<0,05$ ;  $p$  vrednosti do 0,08 pa so označene z eno zvezdico\*. Napake predstavljajo standardno deviacijo.



Slika 18: Odziv genov operona *mbt-2* – Razmerje normaliziranega izražanja genov *mbtK* (graf A) in *mbtL* (graf B) v mediju brez železa (LI) in v mediju z železom (HI). Na grafih so predstavljena LI/HI razmerja izražanja genov, ter krivulji rasti v mediju z in brez železa (S+Fe+MJ in S-Fe-MJ). Signifikantne razlike so označene z dvema zvezdicama\*\* pri vrednostih  $p < 0,05$ ;  $p$  vrednosti do 0,08 pa so označene z eno zvezdico\*. Napake predstavljajo standardno deviacijo.



Slika 19: Odziv genov – Razmerje normaliziranega izražanja genov *bfrA* (graf A) in *ideR* (graf B) v mediju brez železa (LI) in v mediju z železom (HI). Na grafih so predstavljeni LI/HI razmerja izražanja genov, ter krivulji rasti v mediju z in brez železa (S+Fe+MJ in S-Fe-MJ). Signifikantne razlike so označene z dvema zvezdicama\*\* pri vrednostih  $p < 0,05$ ;  $p$  vrednosti do 0,08 pa so označene z eno zvezdico\*. Napake predstavljajo standardno deviacijo.

Iz LI/HI razmerja (slika 17, 18 in 19) lahko vidimo izražanje posameznega gena v mediju brez železa in mikobaktina (S-Fe-MJ) glede na medij z železom in mikobaktinom (S+Fe+MJ).

Izražanje gena *mbtA* (slika 17A) je signifikantno zvišana v lag fazi ter v stacionarni fazi rasti, kjer je zvišanje bolj izrazito. Gen *mbtB* (slika 17B) ima povisano ekspresijo skozi vse faze rasti, razen v dvanajstem dnevu. Najbolj izrazito pa je opazno signifikantno zvišano izražanje v stacionarni fazi. Gen *mbtI* (slika 17C) se izraža v povisani koncentraciji v vseh fazah rasti, razen v dnevu 0 in 22, kjer je izražanje signifikantno znižano. Kot pri ostalih genih pa je najbolj izrazito signifikantno povisano izražanje v stacionarni fazi rasti. Izražanje gena *mbtK* (slika 18A) je zvišano v vseh fazah rasti in tudi precej konstantno. Izrazito signifikantno višje izražanje pa je zopet v stacionarni fazi. Gen *mbtL* (slika 18B) ima signifikantno povisano izražanje skozi vse faze rasti, najbolj izrazito pa v stacionarni fazi.

Na sliki 19A je razvidno, da je ekspresija gena *bfrA* signifikantno znižana v vseh fazah rasti, razen v drugi polovici lag faze, kjer v parih primerih opazimo signifikantno zvišanje ekspresije. Razvidno je, da se gen *bfrA* v primerjavi z geni *mbt* operona izraža ravno nasprotno glede na razpoložljive koncentracije železa.

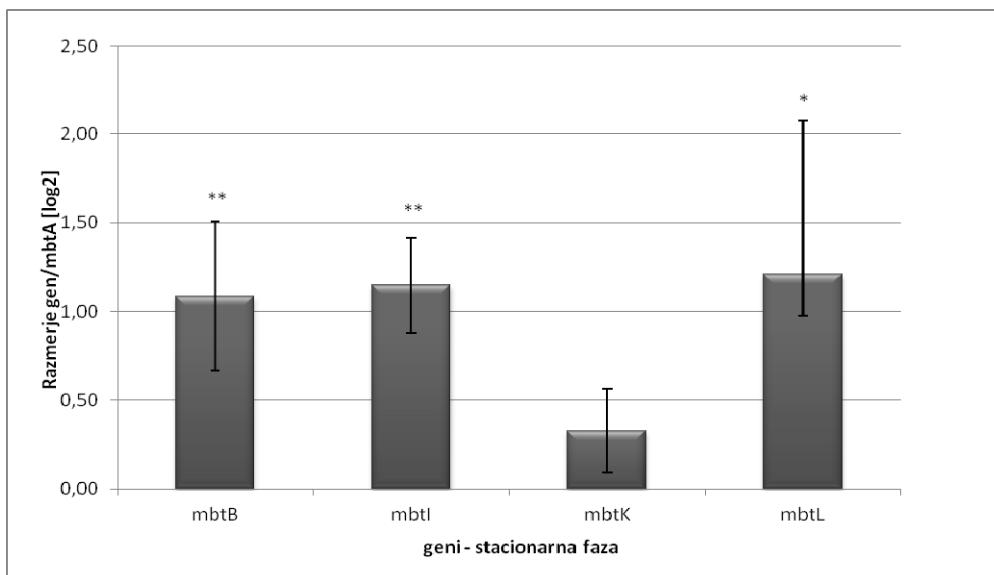
Na sliki 19B je razvidno, da ekspresija *IdeR* regulatorja močno niha. V prvih nekaj dneh zaznamo signifikantno zvišanje kot tudi znižanje ekspresije. V drugi polovici lag faze je vidno signifikantno zvišanje ekspresije ter v prehodu v eksponentno in stacionarno fazo, vendar v zelo različnih razmerjih.

Iz slik 17 in 18 je razvidno, da imajo geni obeh *mbt* operonov signifikantno zvišano izražanje v stacionarni fazi rasti, *bfrA* (slika 19A) pa v skladu s pričakovanji signifikantno znižano izražanje. Izražanje regulatorja *IdeR* (slika 19B) variira po fazah, večinoma pa zvišano ali znižano izražanje ne presega faktorja 2.

Z računanjem LI/HI razmerja izraženih genov v mediju S+Fe in S-Fe lahko prikažemo odziv na pomanjkanje železa, ki je lahko negativen ali pozitiven, vendar o sami količini izraženega gena ne vemo nič. Razmerja LI/HI dveh različnih genov med medijema lahko dobimo enaka, vendar iz popolnoma različnih vrednosti kopij genov. Enako razmerje lahko dobimo na račun velikega števila kopij v mediju brez železa in velikega števila kopij v mediju z železom, in obratno na račun nizkega števila kopij gena v mediju brez železa in nizkega števila kopij gena v mediju z železom.

#### 4.2.3 Razmerja izraženih genov v stacionarni fazi

Ker nas je zanimalo kolikokrat se je določen gen *mbt* operona bolj ali manj izrazil glede na drugega, smo izračunali tudi razmerja izraženih genov. Z izbranim genom (v našem primeru *mbtA*) smo izračunali razmerja vseh analiziranih genov. Izbrali smo stacionarno fazo, ker so v tej fazi razlike v izražanju v vseh primerih statistično značilne. Vrednosti večje ali manjše od 0 so nakazovale višjo ali nižjo spremembo v izražanju za faktor  $2^y$  glede na spremembo izražanja gena *mbtA*. Za preverjanje domnev o razlikah smo uporabili Studentov t-test in na podlagi  $p$  vrednosti izbrali le signifikantne razlike med geni.



**Slika 20:** Razmerja izraženih genov (gen/*mbtA*) v mediju brez železa glede na medij z železom. Prikazane so povprečne vrednosti razmerja (LI/HI)gen/(LI/HI)*mbtA* v stacionarni fazi rasti. Signifikantne razlike so označene z dvema zvezdicama\*\* pri vrednostih  $p<0,05$ ;  $p$  vrednosti do 0,08 pa so označene z eno\*. Vrednosti nad x osjo oziroma večje od 0, prikazujejo višjo spremembo v izražanju in vrednosti nižje od 0 prikazujejo nižjo spremembo v izražanju glede na spremembo gena *mbtA*.

S slike 20 je razvidno, da se vsi geni *mbt* operona na pomanjkanje železa odzivajo močneje kot *mbtA*, saj ni nobeno razmerje nižje od vrednosti 0. Povišanje izražanja genov *mbtB*, *mbtI* in pogojno *mbtL* ( $p=0,08$ ) v stacionarni fazi je 2-krat večje kot povišanje izražanja *mbtA*. Domneve o razlikah med genom *mbtK* in *mbtA* s t-testom nismo potrdili, torej med izražanjem oziroma odzivom genov *mbtK* in *mbtA* ni statistično značilnih razlik.

#### 4.3 KORELACIJA IZRAŽENIH GENOV *mbt* OPERONA

**Preglednica 6:** Pearsonovi koeficienti korelacije ( $r$ ) med izraženimi geni *mbt* operona in *bfrA* ter koeficienti  $k$ , ki prikazujejo naklon krivulje med dvema genoma. Za vsak korelacijski koeficient pa je prikazan tudi interval zaupanja.

	<i>mbtA</i>	<i>mbtB</i>	<i>mbtI</i>	<i>mbtK</i>	<i>mbtL</i>	<i>bfrA</i>
<i>mbtA</i>	$r = 1$					
<i>mbtB</i>	$r = 0,837$	$r = 1$				
	$0,634 \leq r \leq 0,931$					
	$k = 0,333$					
<i>mbtI</i>	$r = 0,812$	$r = 0,971$	$r = 1$			
	$0,587 \leq r \leq 0,921$	$0,929 \leq r \leq 0,988$				
	$k = 0,317$	$k = 0,953$				
<i>mbtK</i>	$r = 0,881$	$r = 0,976$	$r = 0,936$	$r = 1$		
	$0,725 \leq r \leq 0,95$	$0,941 \leq r \leq 0,99$	$0,846 \leq r \leq 0,974$			
	$k = 0,699$	$k = 1,948$	$k = 1,903$			
<i>mbtL</i>	$r = 0,701$	$r = 0,895$	$r = 0,8806$	$r = 0,813$	$r = 1$	
	$0,387 \leq r \leq 0,869$	$0,755 \leq r \leq 0,956$	$0,725 \leq r \leq 0,95$	$0,587 \leq r \leq 0,921$		
	$k = 0,221$	$k = 0,708$	$k = 0,707$	$k = 0,322$		
<i>bfrA</i>	$r = -0,381$	$r = -0,33$	$r = -0,273$	$r = -0,292$	$r = -0,292$	$r = 1$
	$-0,698 \leq r \leq 0,06$	$-0,67 \leq r \leq 0,12$	$-0,63 \leq r \leq 0,179$	$-0,642 \leq r \leq 0,16$	$-0,642 \leq r \leq 0,16$	
	$k = -0,563$	$k = -1,035$	$k = -1,035$	$k = -0,596$	$k = -1,97$	

V pregledanici so prikazani Pearsonovi koeficienti korelacije med LI/HI razmerji izraženih genov *mbt* operona in *bfrA*. Glede na  $r_{tab}$  vrednost ( $r_{tab} = 0,4329$ ), ki smo jo iz priloga A razbrali glede na število vzorcev  $n$  ( $n=21$ ), smo sprejeli oziroma zavrnili ničelno hipotezo. Ugotovili smo, da so v vseh primerih  $r$  vrednosti večje od  $r_{tab}$ , razen med genom *bfrA*. Med izraženimi geni *mbt* operona torej obstaja linearna povezanost, in sicer pozitivna korelacija, med tem ko med geni *mbt* operona in *bfrA* ni korelacija.

Izračunali smo tudi naklon krivulj  $k$ , ki prikazujejo linearno povezanost med geni. Namreč dva para genov lahko izražata enak koeficient korelacije med tem, ko je naklon krivulje drugačen, npr. bolj strm pri enem paru in obratno. Naklon krivulje ( $k$ ) pove razmerje  $Y/X$  in česar lahko tudi vidimo kateri gen je bolj odziven glede na drugega.

Med koeficientom  $k$ , naklonom krivulje, med genom *mbtA* in ostalimi geni *mbt* operona ( $Y=mbtA$ ,  $X=mbtK$ ), lahko vidimo, da je med *mbtA* in *mbtK* naklon 0,7, kar je dvakrat več kot med ostalimi geni primerjanimi z genom *mbtA*. Iz vseh naklonov krivulj lahko tudi vidimo, da imajo najnižji koeficient geni korelirani z genom *mbtA* ( $Y=mbtA$ ,  $X=$ ostali geni), kjer se vrednosti gibljejo vedno okoli  $k=0,3$ , podobno tudi med *mbtK* in *mbtL*. V primerjavi z geni *mbtB*, *mbtI* in *mbtK*, kjer so vrednosti v povprečju  $k=0,8$ , se pravi do 3x bolj strmo spremenjanje linearne krivulje med geni. Glede na vrednosti koeficiente  $k$  med geni *mbtA* in stalmi geni *mbt* operona lahko vidimo, da je *mbtA* približno 0,3x manj odziven kot ostali geni.

Izračunane odzivnosti so še en primer prikaza korelacije in razmerja med izraženimi geni, kot v poglavju 4.5., vendar so vrednosti razmerij precej manj natančna. Vzrok je v tem, da smo tu

za izračun razmerja uporabili vse meritve (vse faze oziroma čase), v poglavju 4.5. pa samo meritve iz stacionarane faze, kjer je dejansko prišlo do povišanega izražanja. V tem primeru pa so zajeti tudi časi, kjer ni bilo povišanega izražanja, kar posledično popači dejanske relacije.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V raziskavi smo žeeli preveriti izražanje genov za sintezo mikobaktina pri bakteriji MAP v odvisnosti od koncentracije železa. Preveriti smo žeeli kje in kdaj prihaja do razlik v izražanju genov v odvisnosti od faze rasti in kakšne so te razlike. Operona se s primerjavo *mbt* operonov sorodnih mikobakterij nekoliko razlikujeta, zato nas je zanimalo ali so te razlike vzrok za nezmožnost proizvodnje mikobaktina. S poskusom smo žeeli preveriti predvsem funkcionalnost genov *mbt*-operona na transkripcijski ravni, ko bakteriji primanjkuje železa. Zanimalo nas je tudi, ali se izražanje genov razlikuje med ovčjim in kravjim sevom. Zaradi neznanih vzrokov ovčji sev ni pokazal rasti tudi po enem letu inkubacije, zato smo za nadaljnje delo izbrali kravji sev CLI623.

#### 5.1.1 Merjenje optične gostote in izolacija mRNA

V prvem delu raziskave so analize zajemale merjenje optične gostote kulture MAP gojene v dveh različnih gojiščih (S+Fe+MJ in S-Fe-MJ, kjer Fe pomeni železo in MJ, mikobaktin J). Z merjenjem optične gostote smo žeeli zajeti vse faze rasti pri katerih smo kasneje z izolirano mRNA preverili izražanje genov na ravni transkripcije. V lag fazi so meritve OD<sub>600</sub> in izolacija mRNA zajemale prvih 14 dni. Dosedanje raziskave drugih raziskovalcev so zajemale meritve in izolacijo le prvih nekaj dni, ker pa obstaja možnost, da je zaradi počasne rasti MAP odziv na pomanjkanje železa bolj počasen, smo meritve v lag fazi zajeli v večjem razponu. V eksponentni in stacionarni fazi pa smo vzeli po tri meritve pri katerih smo izolirali tudi mRNA.

Glede na rastni krivulji, ki smo jih dobili z merjenjem OD<sub>600</sub>, smo glavne razlike opazili v eksponentni in stacionarni fazi rasti. V mediju brez železa in mikobaktina je bila optična gostota nižja, prav tako tudi naklon krivulje. Sklepamo lahko, da je kulturi primanjkovalo železa in da ima glede na kulturo, ki je rasla z železom in mikobaktinom počasnejšo rast, kar se kaže v nižjem naklonu rastne krivulje. Glede na te razlike že lahko sklepamo na že znana dejstva, da ima MAP okvaro pri sintezi mikobaktina.

Za stacionarano fazo je značilno, da se število celic ne spreminja in je dosežena takrat, ko začne v rastnem gojišču primanjkovati hranil ali se začnejo kopiti toksični produkti, ki inhibirajo rast (Danevčič in Mandić-Mulec, 2007). Kultura v gojišču brez železa in mikobaktina je prej prešla v stacionarno fazo verjetno zaradi pomanjkanja železa in nesposobnosti tvorbe mikobaktina.

Kot vemo je sinteza mikobaktina inducirana v pogojih, ko železa primanjkuje, zato smo te razlike v rasti dobro pogledali tudi na ravni transkripcije genov. Največje razlike smo pričakovali v eksponentni kot tudi v stacionarni fazi rasti.

#### 5.1.2 Ekspresijske analize

Izražanje genov smo prikazali z absolutnimi vrednostmi izraženih genov (slika 16) in razmerjem LI/HI (slika 17, 18 in 19), kjer lahko vidimo ali imajo geni v mediju brez železa povišano oziroma znižano izražanje glede na medij z železom. Torej kakšen je odziv na pomanjkanje železa. Analizirane gene smo normalizirali na gen *sigA*, s čimer smo preverili ali

so se analizirani geni izražali le na osnovnem celičnem nivoju, neodvisno od stresnih pogojev ali pa so se odzivali glede na koncentracije železa v gojišču.

Kot je iz rezultatov razvidno (slike 16-19) je do najbolj izrazitih razlik v izražanju prišlo v stacionarni fazi, kjer se vsi izraženi geni v mediju brez železa glede na medij z železom signifikantno razlikujejo. Vsi geni *mbt* operona so se v gojišču brez železa v primerjavi z gojiščem z železom izražali v večji koncentraciji. Razlog za to bi lahko bil, da je MAP izkoriščala železo, ki se je preneslo iz gojišča, v katerem smo kulturo revitalizirali (S+Fe+MJ), v novo gojišče (S-Fe-MJ). Tako je do pomanjkanja železa prišlo šele v stacionarni fazi in ker je izražanje genov za sintezo mikobaktina inducirano v pogojih pomanjkanja železa (Behr in Collins, 2010), je do signifikantno zvišanega izražanja prišlo šele v stacionarni fazi.

Iz grafov (slika 16) vidimo tudi razlike v standardni deviaciji med fazami rasti. Najnižje deviacije so v stacionarni fazi, med tem ko so v lag in eksponentni fazi večje. Razlike v deviaciji lahko pripisemo manj stabilni oziroma variabilni ekspresiji v lag in eksponentni fazi, zaradi česar so v teh fazah deviacije posledično večje. Za razliko bolj definiranega izražanja v stacionarni fazi, kjer je deviacija posledično manjša.

Za primerjavo lahko v gojišču brez železa vidimo (slike 16-19) signifikantno znižano izražanje gena *bfrA* v stacionarni fazi, za katerega je značilno, da se izraža ravno nasprotno kot geni *mbt* operona. Torej, kadar je prisotnega dovolj železa, *IdeR* regulator inducira transkripcijo genov za sintezo proteinov odgovornih za shranjevanje železa in obratno. S tem smo lahko potrdili delovanje *IdeR* regulatorja pri MAP, kar je tudi v skladu z dosedanjimi raziskavami Janagame in sodelavcev (Janagama in sod., 2009).

Iz prikazanih absolutnih vrednosti genov v stacionarni fazi (slika 16C) smo ugotovili, da sta se gena *mbtA* in *mbtL* v mediju brez železa izražala v najnižji ter gen *mbtI* v najvišji koncentraciji v primerjavi z ostali geni *mbt*-operona. Z računanjem razmerja genov, kjer smo žeeli prikazati v kakšnem razmerju se geni odzivajo (slika 20), pa smo ugotovili, da imajo geni *mbtB*, *mbtI* ter pogojeno tudi *mbtL* 2-krat večji odziv na pomanjkanje železa kot *mbtA*. Razlog, da je tudi gen *mbtL* 2-krat bolj odziven, čeprav je v mediju brez železa izražen v podobni koncentraciji kot *mbtA*, je v tem, da se je pri računanju LI/HI razmerje povečalo na račun nizkega števila kopij v mediju z železom. Kar je tudi razvidno s sliko 16C. Pri preverjanju domnev o razlikah med geni s t-testom nismo dobili signifikance med genoma *mbtA* in *mbtK*, iz česar lahko sklepamo, da med njunima odzivoma ni razlik. Razlike, ki so nastale niso statistično značilne. Gena *mbtA* in *mbtK* sta torej v primerjavi z ostalimi geni najmanj odzivna.

Z računanjem korelacije med izraženimi geni *mbt* operona, smo z uporabo Pearsonovega koeficiente korelacije, ki preverja linearno povezano med izbranimi genoma, prišli do rezultatov, da med vsemi geni *mbt* operona obstaja korelacija izražanja. Sklepamo lahko, da imajo geni enak transkripcijski profil, razen *bfrA*, ki z vsemi geni *mbt* operona ni pokazal korelacije ( $r < r_{tab}$ ). Vse vrednosti (razen pri *bfrA*) kažejo pozitivno korelacijo med geni, kar pomeni, da se ob povečanju izražanja enega gena poveča izražanje tudi drugega gena. Glede na teorijo, ki pravi, da se geni *mbt* operona in *bfrA* izražajo ravno nasprotno, bi pričakovali korelacijo izražanja *mbt* genov tudi z genom *bfrA*, le z negativnim predznakom. Korelacijske nismo dobili, ker smo pri računanju upoštevali vse čase oziroma faze rasti in ker v analiziranem časovnem okviru ni ustreznega trenda izražanja, ki bi ustrezal linearni povezanosti med geni. Če primerjamo izražanje na slikah 17-19 (razmerja LI/HI), kjer smo ugotovili, da se *mbt* geni in *bfrA* izražajo ravno nasprotno, vidimo, da smo to dokazali le v stacionarni fazi in pogojno lag fazi, med tem ko je v eksponentni fazi trend izražanje povsem drugačen. Zaradi česar posledično ne moremo dobiti korelacije.

Glede na statistične teste, kjer smo preverjali domneve o razlikah med korelacijskimi koeficienti med geni smo ugotovili, da med koeficienti  $r$  ni statistično značilnih razlik, torej je moč korelacije med geni približno enaka ( $r=0,9$ ). Vzrok za to bi lahko bil v širokem razponu intervalov zaupanja. Predvidevamo lahko, da imajo *mbt* geni enak transkripcijski profil, ne vemo pa ali imajo enako tudi odzivnost. Zato smo primerjali tudi naklone krivulj, ki prikazujejo linearno povezanost med geni. Ugotovili smo, da imajo najnižji koeficient  $k$ , geni korelirani z *mbtA* iz česar lahko sklepamo, da je gen *mbtA* najmanj odziven na pomanjkanje železa. V vseh primerih se je izražal do 0,3-krat manj v primerjavi z ostalimi geni *mbt* operona (preglednica 6). Ta interpretacija odzivnosti je še en primer prikaza korelacije in razmerja med izraženimi geni kot v primeru razmerij, ki smo jih izračunali v poglavju 4.2.3 ozziroma prikazani na sliki 20, le da so v tem primeru precej manj natančne. Razlog pa je ta, da smo za izračun razmerja uporabili vse meritve (vse faze ozziroma čase), v poglavju 4.2.3 pa samo meritve iz stacionarane faze, kjer je dejansko prišlo do povišanega izražanja. V tem primeru pa so zajeti tudi časi, kjer ni bilo povišanega izražanja, kar posledično popači dejanske relacije.

Z vsemi analizami in obdelavo rezultatov smo prišli do zaključkov, da se vsi geni *mbt*-operona izražajo v odvisnosti od pomanjkanja železa. Vzroka za nesposbnost tvorbe mikobaktina na transkripcijskem nivoju nismo našli. Pomembna, na proteinskem nivoju še neraziskana, je delecija *mbtA* pri MAP v primerjavi z MTB in MAV, ki okrne C-terminalni del proteina. Ta del naj bi vseboval pomembna vezavna mesta za ATP, ki sodeluje v encimski reakciji aktivacije salicilata v začetni fazni sinteze mikobaktina. V tem primeru bi ob pomanjkanju železa prišlo do kopiranja salicilata v celici (Li in sod., 2005; Quadri in sod., 1998). Zanimivo bi bilo torej vzporedno z našimi analizami meriti tudi koncentracijo salicilata v celici. Glede na teorijo, ki poleg dveh skupin sideroforov (mikobaktine in eksoheline) uvršča tudi salicilno in citronsko kislino kot železova kelatorja, vendar z veliko nižjo afiniteto (de Voss in sod., 1999), bi bilo možno sklepati, da MAP izkorišča salicilat. Z rezultati smo namreč ugotovili, da se prav gen *mbtI*, ki je odgovoren za sintezo salicilata, izraža v največji koncentraciji. Razlog za to pa je lahko tudi v majhnih konstantih encimske reakcije. Konstanta encimske reakcije pove, koliko substrata lahko encim pretvori v produkt v določeni časovni enoti (Boyer, 2005), zato bi lahko iz rezultatov sklepali, da je za pretvorbo korizmata v salicilat potrebno mnogo več encima kodiranega preko *mbtI*. Iz istega razloga lahko sklepamo, da se gena *mbtA* in *mbtL* izražata v nizki koncentraciji. V primeru visoke konstante encimske reakcije pri aktivaciji salicilata, je potrebno manj encima kodiranega preko gena *mbtA*, zato se posledično izraža v nizki koncentraciji. V tem primeru lahko pričakujemo, da je natančna regulacija posameznih genov *mbt*-operonov dodatno regulirana, morda preko povratne zanke z intermediati v postopku sinteze mikobaktina. Vse to bi bilo potrebno še proučiti. Vzrok manjše odzivnosti genov *mbtA* in *mbtK* na pomanjkanje železa pa je lahko na samem promotorskem mestu pred genoma.

Kako bakterija prezivi v okolju, kjer je železo težko dostopno, ostaja vprašanje s katerim se številni raziskovalci še danes ukvarjajo. Glede na zmožnost preživetja v okolju izven celice, kot tudi v celici, MAP verjetno izkorišča mikobaktine eksogenega izvora – izkorišča mikobaktin sorodnih mikobakterij, s katerimi sobiva v okolju (Miethke in Marahiel, 2007). Ali pa privzema železo kot intracelularni parazit okoljskih ameb z mehanizmom, ki je neodvisen od mikobaktina. Lahko, da v celici izkoršča železo na račun nižjega redoka potenciala, zaradi česar je bolj dostopno. Z analizami genov odgovornih za dormanco, pa so potrdili, da je MAP sposobna tudi prehoda v dormantno fazo. Dormanca je stanje s katerim mnoge bakterije prezivijo neugodne razmere, zmanjšajo metabolno aktivnost s čimer

varčujejo z energijo. Poraba in potreba po železu je manjša in tako je v nekultivabilni fazi obstojnost bakterije bistveno daljša. Ob spremembi razmer pa bakterije ponovno postanejo aktivne (Whittington in sod., 2004). Tako je s stališča razvoja infekcije pomembno razumevanje obstoja MAP v okolju kot tudi v gostitelju. Preživetje v obeh primerih nakazuje na možen obstoj potencialnega partnerja, mikrobnega ali kemijskega izvora, kar omogoča perzistentnost MAP.

## 6.2 SKLEPI

- Ugotovili smo, da se geni obeh *mbt*-operonov (*mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK* in *mbtL*) odzivajo na pomanjkanje železa.
- Signifikantne razlike in največji odzivi v izražanju so se pokazali v stacionarni fazi rasti.
- Gena *mbtA* in *mbtL* sta se izražala v najmanjši in gen *mbtI* v največji koncentraciji.
- Odzivnost na pomanjkanje železa je bila najmanjša odzivnost pri genu *mbtA* in *mbtK*, v primerjavi z geni *mbtB*, *mbtI* in pogojno *mbtL*, ki so bili 2-krat bolj odzivni.
- Iz ugotovljenih rezultatov lahko predvidevamo, da nizka koncentracija izražanja in nižji odziv gena *mbtA* verjetno vzrok nesposobnosti tvorbe mikobaktina pri MAP, kot predvideva literatura.
- Odziva genov med kravjim in ovčjim sevom nismo mogli primerjati, saj ovčji sev zaradi neznanih razlogov ni kazal rasti.
- Z nadaljnimi raziskavami bi bilo potrebno preveriti izražanje tudi drugih genov *mbt*-operonov pri MAP ter ugotoviti morebitne vzroke nesposobnosti tvorbe mikobaktina tudi na posttranskripcijskem, translacijskem in posttranslacijskem nivoju.

## 6 POVZETEK

V raziskavi smo preverili izražanje genov za sintezo mikobaktina pri bakteriji *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* (MAP) za katero je znano, da ni sposobna sinteze tega železovega kelatorja. Patogena bakterija, ki povzroča paratuberkulozo pri prežvekovalcih in s tem velike ekonomske škode kmetovalcem, je zelo perzistentna v okolju in zato nevarna za prenos bolezni v čredi in med čredami. Mikobaktini s katerimi sorodne mikobakterije pridobivajo težko dostopno železo, so esencialni za preživetje tako v okolju kot tudi v gostitelju. Tako se je postavilo vprašanje, kako preživi bakterija MAP s stališča pridobivanje železa in njegove homeostaze.

Ker so z dosedanjimi raziskavami ugotovili, da so geni za sintezo mikobaktina ohranjeni tudi pri MAP smo se odločili analizirati njihovo izražanje. Pri *M. tuberculosis* so geni za sintezo mikobaktina organizirani v dva operona. Operon *mbt-1* obsega gene *mbtABCDEFGHIJ*, operon *mbt-2* pa obsega gene *mbtKLMN*. V naši raziskavi smo analizirali gene *mbtA*, *mbtB* in *mbtI*, ki so del operona *mbt-1* ter gene *mbtK* in *mbtL*, ki so del operona *mbt-2*. Omenjeni geni se na obeh operonih nahajajo vsak za svojim vezavnim mestom transkripcijskega regulatorja *ideR*. S tem smo žeeli preveriti tudi, ali ima kateri od analiziranih genov okvaro na vezavnem mestu transkripcijskega regulatorja. *ideR* je železo-odvisni regulator, ki ob prisotnosti železa blokira prepis genov za sintezo mikobaktina. Z vezavo na del DNA verige onemogoči prepisovanje mikobaktinskega operona, hkrati pa aktivira prepis genov (*bfrA*), ki kodirajo encime za sintezo bakterioferitinov ter s tem obvaruje celico pred toksičnostjo zaradi prevelike koncentracije železa. V raziskavi smo zato analizirali tudi gen *bfrA* in z namenom, da bi preverili funkcijo in delovanje *ideR* regulatorja, smo poleg omenjenih genov analizirali tudi gen *ideR*. V raziskavi smo uporabili dva medija (S+Fe in S-Fe) v katerem smo gojili kulturo MAP (kravji sev CLIJ623) in glede na faze rasti opazovali odziv genov vpleteneh v sintezo mikobaktina. Glede na raziskave sorodnih mikobakterij smo na pomanjkanje železa pričakovali velik odziv genov *mbt* operona, ter negativen odziv gena *bfrA* oziroma povišan odziv gena *bfrA* v mediju z železom. S primerjanjem rastne krivulje smo ugotovili, da je pri vseh analiziranih genih do največjega odziva prišlo v stacionarni fazi rasti. Geni obeh *mbt* operonov so se v tej fazi izražali v signifikantno večji koncentraciji v mediju brez železa. S tem smo potrdili, da se geni odzivajo na pomanjkanje železa. Ugotovili smo tudi, da imajo enak transkripcijski profil, vendar se odzvi med geni razlikujejo in geni se izražajo v zelo različnih koncentracijah. Najnižjo odzivnost smo opazili pri genu *mbtA* (del operona *mbt-1*), ki se je izražal tudi v najmanjši koncentraciji. Gen, katerega produkti sodelujejo v začetni fazi sinteze mikobaktina, bi torej lahko bil vzrok za okvare pri sintezi mikobaktina, vendar bi bilo potrebno opraviti še marsikatero raziskavo v tej smeri. Prav tako se je v nižji koncentraciji izražal tudi gen *mbtL*, ki je del operona *mbt-2*. V največji koncentraciji pa se je izražal gen *mbtI*, katerega produkti sodelujejo v prvi fazi sinteze mikobaktina. Primerljiv odziv genu *mbtA* na pomanjkanje železa pa smo opazili tudi pri genu *mbtK*, ki je prav tako del operona *mbt-1*. Dvakrat večji odziv pa smo zaznali pri genih *mbtI*, *mbtB* in pogojno *mbtL*. V največji koncentraciji pa se je izražal gen *mbtI*. Ugotovili smo, da je izražanje gena *bfrA* ravno nasprotno izražanju genov *mbt* operonov. V mediju brez železa nismo zaznali povišanega izražanja, obratno pa smo v mediju z železom zaznali signifikantno zvišano izražanje. Preverili smo tudi dinamiko in količino izražanja gena za *ideR*, ki predvidoma ni avtoreguliran in se je izražal precej konstitutivno. Izražanje regulatorja *ideR* je po fazah sicer variiralo, večinoma pa zvišano ali znižano izražanje ni preseglo faktorja 2.

Z analizami smo torej dokazali, da se geni za sintezo mikobaktina na pomanjkanje železa odzivajo. Odzvi in koncentracije se sicer razlikujejo med geni, zato bi bilo potrebno te razlike

preveriti tudi na posttranskripciskem, translacijskem in posttranslacijskem nivoju, kot tudi analizirati izražanje ostalih genov obeh *mbt* operonov. Dokazali smo tudi da je regulator *ideR* aktiven, ter zaznali povišano izražanje gena *bfrA* ob povečani koncentraciji železa. Razlike v odzivu in koncentraciji pa lahko pripišemo večim dejavnikom, ki bi jih bilo potrebno še preveriti.

## 7 VIRI

- Alexander D.D., Turenne C., Behr M.A. 2009. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Journal of Bacteriology, 191, 3: 1018-1025.
- Applied Biosystems/Life Technologies, 2012. Real time PCR vs traditional PCR vs digital PCR. Foster City, Life Technologies: 4 str.  
<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-vs-traditional-pcr.html> (3. junij 2012)
- Ayele W.Y., Svastova P., Roubal P., Bartos M., Pavlik I. 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. Applied and Environmental Microbiology, 71, 3: 1210-1214.
- Bannantine J.P., Stabel J.R. 2002. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. BMC Microbiology, 2: 2, doi:10.1186/1471-2180-2-2: 7 str.
- Bastič M. 2006. Metode raziskovanja. Maribor, Univerza v Mariboru. Ekonomsko-poslovna fakulteta Maribor: 14-27.
- Behr M.A., Collins D. M. 2010. Paratuberculosis: Organism, disease, control. Cambridge, CAB International. 375 str.
- Beard P.M., Daniels M.J., Henderson D., Pirie A., Rudge K., Buxton D., Rhind S., Greig A., Hutchings M.R., McKendrick I., Stevenson K., Sharp J.M. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminants wildlife in Scotland. Journal of Clinical Microbiology, 39, 4: 1517-1521.
- Boyer R. F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 130-134.
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25: 169-193.
- Chalut C., Botella L., de Sousa-D'Auria C., Houssin C., Guilhot C. 2006 The nonredundant roles of two 4'-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of Mycobacteria. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United states of America, 103, 22: 8511-8516.
- Chavadi S.S., Stirrett K.L., Edupuganti U.R., Vergnolle O., Sadhanandan G., Marchiano E., Martin C., Qui W., Soll C.E., Quardi L.E.N. 2011. Mutational and phylogenetic analyses of the mycobacterial *mbt* gene cluster. Journal of Bacteriology, 193, 21: 5905-5913.
- Chomczynski P., Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nature Protocols, 1, 2: 581-585.

- Collins D.M., Zoete M.D., Cavaignac S.M. 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR Test based on a novel DNA sequence difference. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 12: 4760-4762.
- Danevčič T., Mandić-Mulec I. 2007. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov za študente mikrobiologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 10-11.
- de Juan L., Mateos A., Dominiguez L., Sharp J.M., Stevenson K. 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 106: 249-257.
- de Juan L., Alvarez J., Romero B., Bezos J., Castellanos E., Aranaz A., Mateos A., Dominiguez L. 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 9: 5927-5932.
- de Voss J.J., Rutter K., G. Schroeder B., Clifton E. III. 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 181, 15: 4443-4451.
- Fischer D. 1999. Rational structural genomics: affirmative action for ORFans and the growth in our structural knowledge. *Protein Engineering*, 12, 12: 1029-1030.
- Fox R.J., Dimmic M.W. 2006. A two-sample Bayesian t-test for microarray data. *BMC Bioinformatics*, 7: 126, doi:10.1186/1471-2105-7-126: 11 str.
- Fraga D., Meulia T., Fenster S. 2008. Real-Time PCR. V: Current protocols essential laboratory techniques. Galloher S.R., Willey E.A. (eds.). New Jersey, Willey: 10.3.1-10.3.34.
- Gibson J., Doyle K., Kramer J. 2008. Total RNA purification for real-time RT-PCR. *Genetic engineering and biotechnology News*, 28, 1: 24-24.
- Gobin J., Wong D.K., Gibson W., Horwitz M.A. 1999. Charatcerization of exochelins of the *Mycobacterium bovis* type strain and BCG substrains. *Infection and Immunity*, 67: 2035-2039.
- Harrison A.J., Yu M., Gardenborg T., Middleditch M., Ramsay R.J., Backer E.N., Lott J.S. 2006. The structure of *mbtI* from *Mycobacterium tuberculosis*, the first enzyme in the biosynthesis of the sderophore mcoabactin, rveals it to be a salicylate synthase. *Journal of Bacteriology*, 188, 17: 6081-6091.
- Hardin J., Mitani A., Hicks L. and VanKoten B. 2007. A robust measure of correlation between two genes on a microarray. *BMC Bioinformatics*, 8: 220, doi:10.1186/1471-2105-8-220: 13 str.
- Held P. 2008. Measure your purity, assement of nucleic acid purity via UV absorbance. G.I.T. Laboratory Journal, 5, 6: 9-11.

Hermon-Taylor J., El-Zaatari F.A.K 2004. The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Chrone disease. V: Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public health consequences, monitoring and management. Padley S., Bartram J., Rees G., Dufour A., Cotruvo J. (eds.). London, IWA Publishing: 74-94.

Hou J.Y., Graham J.E., Clark-Curtiss J.E. 2002. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selected capture of transcribed sequences (SCOTS). Infection and Immunity, 70: 3714-3726.

Hu Y., Coates A.R.M. 1999. Transcription of two sigma 70 homologue genes, *sigA* and *sigB*, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, 181, 1: 469-476.

Ikonomopoulos J., Pavlik I., Bartos M., Svastova P., Yayo Ayele W., Roubal P., Lukas J., Cook N., Gazouli M. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. Applied and Environmental Microbiology, 71, 12: 8934-8936.

Janagama H.K., Senthilkumar, Bannantine J.P., Kugadas A., Jagtap P., Higgins L., Witthuhn B.A., Sreevatsan S. 2010a. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* is strain dependent. BMC Microbiology, 10: 268, doi:10.1186/1471-2180-10-268: 11 str.

Janagama H., Lamont E.A., George S., Bannantine J.P., Xu W.W., Tu Z.J., Wells S.J., Schefers J., Sreevatsan S. 2010b. Primary transcriptomes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. BMC Genomics, 11: 561, doi: 10.1186/1471-2164-11-561: 11. str.

Janagama H.K., Senthilkumar T.M.A., Bannantine J.P., Rodriguez G.M., Smith I., Paustian M.L., McGarvey J.A., Sreevatsan S. 2009. Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (*IdeR*) of *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*. Microbiology, 155: 3683-3690.

Jeršek B. 2003. Higiena živil: Laboratorijske vaje za predmet Higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 25-38.

Kopinč R., Lapanje A. 2012. Antibiotic susceptibility profile of *Mycobacterium avium* subspecies *hominis* is altered in low-iron conditions. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67, 12: 2903-2907.

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. Dop. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 161-170, 213-213.

[\(1.6.2012\)](http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf)

Kožuh B. 2005. Statistika II. Ljubljana, Filozofska fakulteta: 15-22.

- Krithika R., Marathe U., Saxena P., Ansari Z., Mohanty D., Gokhale R.S. 2006. A genetic locus required for iron acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 7: 2069-2074.
- LaMarca B.B.D., Zhu W., Arceneaux J.E.L., Byers B.B., Lundrigan M.D. 2004. Participation of fad and *mbt* genes in synthesis of mycobactin in *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology, 186, 2: 374-382.
- Li L., Bannantine J., Qing Zhang J., Amonsin A., May B.J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S., Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 35: 12344-12349.
- Marsh I. B., Bannantine J.P., Paustian M. L., Tizard M. L., Kapur V., Whittington R.J. 2006. Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. Journal of Bacteriology, 188, 6: 2290-2293.
- McDonald W.L., O'Riley K.J., Schroen C.J., Conron R.J. 2005. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* in milk. Applied and Environmental Microbiology, 71, 4: 1785-1789.
- Merkel R.S., Curran B.J. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Applied Microbiology, 28, 2: 276-279.
- Miethke M., Marahiel M.A. 2007. Siderophore-based iron acquisition an pathogen control. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71, 3: 413-451.
- Moody D.E. 2001. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression. Journal of Animal Science, 79, Suppl. E: E128-E135.
- Mukhopadhyay S., Nair S., Ghosh S. 2012. Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unreveling virulence mechanisms and finding new drug targets. FEMS Microbiology Reviews, 36: 463-485.
- Osredkar J. 2011. Oksidativni stres. Zdravniški vestnik, 81: 393-406.
- Pavlik I., Horvathova A., Bartosova L., Babak V., Moravkova M. 2010. IS900 RFLP types of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces and enviromental samples on four dairy cattle farms. Veterinary Medicina, 55, 1: 1-9.
- Pislak M., Juntes P., Pogačnik M. 1996. Paratuberkuloza pri ovcah in kozah. V: Možnost razvoja reje drobnice v Sloveniji. Postojna, Hotel Jama, 27. do 29. novembra 1996. Pogačnik M., Kompan D., Cvirk M. (ur.). Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 245-250.
- Quardi L.E.N., Sello J., Keating T.A., Weinreb P.H., Walsh C.T. 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. Chemistry and Biology, 5: 631-645.

Lee F. 2009. Molecular Biology Web Book: Polymerase Chain Reaction. Los Angeles, Web Books Publishing: 2 str.  
<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9E.htm> (10. maj 2012)

Rodriquez G.M., Voskuil M.I., Gold B., Schoolnik G.K., Smith I. 2002. *IdeR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: Role of *ideR* in iron-dependent gene expression, iron metabolism and oxidative stress response. *Infection and Immunity*, 70, 7: 3371-3381.

Rodriquez G.M., Smith I. 2003. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Molecular Microbiology*, 47, 6: 1485-1494.

Schwartz B.D., De Voss J.J. 2001. Structure and absolute configuration of mycobactin J. *Tetrahedron Letters*, 42: 3653-3655.

Snyder L., Champness W. 2007. Molecular genetics of bacteria. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, ASM Press: 735 str.

Stevenson K., Alvarez J., Bakker D., Biet F., de Juan L., Denham S., Dimareli Z., Dohmann K., Gerlach G.F., Heron I., Kopecna M., May L., Pavlik I., Sharp M., Thibault V.C., Willemse P., Zadoks R. N., Greig A. 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiology*, 9: 212. doi:10.1186/1471-2180-9-212. 13 str.

Talaat A. M., Lyons R., Howard S.T., Johnston S.A. 2003. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13: 4602-4607.

Whittington R.J., Marsh I., McAllister S., Turner M.J., Marshall D.J., Fraser C.A. 1999. Evaluation of Modified BACTEC 12B Radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 4: 1077-1083.

Whittington R.J., Hope A.F., Marshall D.J., Taragel C.A., Marsh I. 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 9: 3240-3248.

Whittington R.J., Marsh I.B., Reddaclif L.A. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 9: 5304-5308.

Whittington R.J., Marshall D.J., Nicholls P.J., Marsh I.B., Reddacliff L.A. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5: 2989-3004.

Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39: 75-85.

Wu C., Schmoller S.K., Shin S.J., Talaat A.M. 2007. Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *in vitro* and in naturally infected cows. *Journal of Bacteriology*, 189, 21: 7877-7886.

Yellaboina S., Ranjan S., Vindal V., Ranjan A. 2006. Comparative analysis of iron regulated genes in mycobacteria. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters*, 580: 2567-2576.

Zwahlen J., Kolappan S., Zhou R., Tonge P. 2007. Structure and mechanism of *mbtI*, the salicylate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 46: 954-964.

## ZAHVALA

Inštitutu za fizikalno biologijo, ki mi je omogočil izdelavo te naloge.

Roku Kopinču, ki me je strokovno in potrežljivo vodil skozi praktično delo, za pregled in nasvete pri pisanju.

Dr. Alešu Lapanje za usmeritve pri pisanju diplomske naloge, strokovni pregled in nasvete.

Doc. dr. Poloni Jamnik za svobodo pri izbiri teme diplomske naloge, za pomoč in nasvete pri pisanju, ter strokovni pregled naloge.

Recenzentki, doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič, za hiter, strokoven pregled in koristne nasvete za izboljšavo diplomske naloge.

Mateju Somraku za pregled in nasvete pri pisanju diplomske naloge in vsem ostalim sodelavcem za nesebično pomoč, razumevanje in vzpodbudne besede.

Na koncu bi se rada zahvalila staršema, sestri in Maticu za vso njihovo podporo, spodbude in brezmejno pomoč.

## PRILOGE

Priloga A: **Kritične vrednosti Pearsonovega koeficiente korelacije pri določeni stopnji značilnosti,  $\alpha = 0,01$  in  $\alpha = 0,05$**  (Košmelj, 2007: 213)

V preglednici je za število enot v vzorcu  $N$  in za verjetnost  $\alpha$  navedena kritična absolutna vrednost ocene Pearsonovega koeficiente korelacije  $r$ , pri kateri zavrnemo ničelno domnevo  $H_0: \rho = 0$  pri dvostranskem poskusu.

n	$\alpha$		n	$\alpha$		n	$\alpha$	
	0,05	0,01		0,05	0,01		0,05	0,01
1	-	-	31	0,3550	0,4556	61	0,2521	0,3274
2	-	-	32	0,3494	0,4487	62	0,2500	0,3248
3	0,9969	0,9999	33	0,3440	0,4421	63	0,2480	0,3223
4	0,9500	0,9900	34	0,3388	0,4357	64	0,2461	0,3198
5	0,8783	0,9587	35	0,3338	0,4296	65	0,2441	0,3173
6	0,8114	0,9172	36	0,3291	0,4238	66	0,2423	0,3150
7	0,7545	0,8745	37	0,3246	0,4182	67	0,2404	0,3126
8	0,7067	0,8343	38	0,3202	0,4128	68	0,2387	0,3104
9	0,6664	0,7977	39	0,3160	0,4076	69	0,2369	0,3081
10	0,6319	0,7646	40	0,3120	0,4026	70	0,2352	0,3060
11	0,6021	0,7348	41	0,3081	0,3978	71	0,2335	0,3038
12	0,5760	0,7079	42	0,3044	0,3932	72	0,2319	0,3017
13	0,5529	0,6835	43	0,3008	0,3887	73	0,2303	0,2997
14	0,5324	0,6614	44	0,2973	0,3843	74	0,2287	0,2977
15	0,5140	0,6411	45	0,2940	0,3801	75	0,2272	0,2957
16	0,4973	0,6226	46	0,2907	0,3761	76	0,2257	0,2938
17	0,4821	0,6055	47	0,2876	0,3721	77	0,2242	0,2919
18	0,4683	0,5897	48	0,2845	0,3683	78	0,2227	0,2900
19	0,4555	0,5751	49	0,2816	0,3646	79	0,2213	0,2882
20	0,4438	0,5614	50	0,2787	0,3610	80	0,2199	0,2864
21	0,4329	0,5487	51	0,2759	0,3575	82	0,2172	0,2830
22	0,4227	0,5368	52	0,2732	0,3542	84	0,2146	0,2796
23	0,4132	0,5256	53	0,2706	0,3509	86	0,2120	0,2764
24	0,4044	0,5151	54	0,2681	0,3477	88	0,2096	0,2732
25	0,3961	0,5052	55	0,2656	0,3445	90	0,2072	0,2702
26	0,3882	0,4958	56	0,2632	0,3415	92	0,2050	0,2673
27	0,3809	0,4869	57	0,2609	0,3385	94	0,2028	0,2645
28	0,3739	0,4785	58	0,2586	0,3357	96	0,2006	0,2617
29	0,3673	0,4705	59	0,2564	0,3328	98	0,1986	0,2591
30	0,3610	0,4629	60	0,2542	0,3301	100	0,1966	0,2565