

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martina VRHAR

**VPLIV TEMPERATURE NA IZRAŽANJE GENA
comX BAKTERIJE *Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martina VRHAR

**VPLIV TEMPERATURE NA IZRAŽANJE GENA *comX* BAKTERIJE
*Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON *comX* EXPRESSION IN
*Bacillus subtilis***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja dr. Iztok Dogša in za recenzentko prof. dr. Darja Žgur-Bertok.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentor: dr. Iztok Dogša

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Iztok Dogša

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Martina Vrhar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22/.26:579.852.1:577.2.083(043)=163.6
KG	<i>Bacillus subtilis</i> /gen <i>comX</i> /izražanje genov/vpliv temperature/zaznavanje celične gostote/zunajcelični peptid ComX/operon <i>srfa</i>
AV	VRHAR, Martina
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/DOGŠA, Iztok (somentor)/ŽGUR-BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	VPLIV TEMPERATURE NA IZRAŽANJE GENA <i>comX</i> BAKTERIJE <i>Bacillus subtilis</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 64 str., 15 pregl., 12 sl., 24 pril., 127 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI

Čeprav je mehanizem zaznavanja celične gostote (kvoruma) pri *Bacillus subtilis* dobro poznan, vpliv fizikalno-kemijskih dejavnikov na zaznavanje kvoruma še ni v celoti pojasnjen. Preiskovali smo vpliv temperature (24, 37 in 51 °C) na koncentracijo signalnega peptida ComX ter na transkripcijo njegovega gena *comX* in gena *comQ*, ki kodira izoprenil transferazo odgovorno za nastanek zrelega ComX. Slednjega zazna receptor in histidin kinaza ComP, ki preko fosforilacije transkripcijskega regulatorja ComA inducira ekspresijo operona *srfa*. Ta kodira encime odgovorne za sintezo lipopeptidnega antibiotika surfaktina. Rezultati HPLC analize so pokazali, da koncentracija ComX v ravnem gojišču narašča s temperaturo gojenja. V nasprotju s tem pa smo s kvantitativnim PCR ugotovili, da so bile relativne količine kopij mRNA genov *comX*, *comQ* in *srfa* najnižje pri najvišji temperaturi. In sicer je bilo *comX* in *comQ* mRNA štiri krat več pri 24 °C kot pri 51 °C. Izražanje vseh treh preučevanih genov v odvisnosti od temperature ni sovpadalo s hitrostjo rasti, s končno gostoto celic v preučevanih kulturah in s količino ComX v izrabljenem gojišču. Zato lahko zaključimo, da negativni vpliv T na izražanje *srfa* ni povezan s signalnim peptidom ComX, temveč pri tem verjetno igra ključno vlogo druga regulatorna pot, ki je glede na podatke iz literature, najverjetneje povezana s povišano koncentracijo Spx pri višji temperaturi. Slednji je represor *srfa*. Povečane koncentracije ComX v gojišču pri višji temperaturi ne moremo razložiti na osnovi podatkov pridobljenih v okviru te diplomske naloge. ComX je okoli deset aminokislinskih ostankov dolg peptid, ki ima na triptofan vezano izoprenoidno verigo, kar mu daje amfifilni značaj. Možno je, da se pri višji temperaturi poviša difuzija ComX iz membrane v gojišče in/ali zniža particijski koeficient med gojiščem in membrano, kar bi lahko razložilo povišano koncentracijo te molekule v gojišču pri višjih temperaturah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.22/.26:579.852.1:577.2.083(043)=163.6
CX	<i>Bacillus subtilis</i> /gene <i>comX</i> /gene expression/influence of temperature/quorum sensing/extracellular peptide ComX/ <i>srfA</i> operon
AU	VRHAR, Martina
AA	MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/DOGŠA, Iztok (co-advisor)/ŽGUR-BERTOK, Darja (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2012
TI	THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON <i>comX</i> EXPRESSION IN <i>Bacillus subtilis</i>
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIV, 64 p., 15 tab., 12 fig., 24 ann., 127 ref.
LA	sl
AL	sl/en

AB

The mechanism of quorum sensing (QS) in *Bacillus subtilis* is well understood, however the influence of the physico-chemical factors on QS remains to be elucidated. We studied the influence of temperature (24, 37 and 51 °C) on concentration of the major signaling peptide of *B. subtilis*, ComX, and transcription of its gene *comX* and the *comQ* gene, which encodes isoprenyl transferase, ComQ, responsible for the processing and isoprenylation of mature ComX at the tryptophan residue. ComX is then released into the extracellular medium and by binding to the ComP receptor histidine kinase induces the expression of many genes, including the surfactin operon (*srfA*). HPLC results suggested that the concentration of ComX in the growth medium increases with temperature of cultivation. This was consistent with the activation potential of spent media, obtained by growing *B. subtilis* BD2833 at different temperatures. Spent medium prepared at 51 °C induced *srfA-lacZ* tester strain stronger than the one prepared at 24 °C. In contrast, based on quantitative PCR analyses of mRNA concentrations, transcription of *comX*, *comQ* and *srfA* was negatively regulated by temperature at 51 °C. The ratio of *comX* mRNA copies at 24 and 51 °C was 4 ± 2 , which is in contrast to concentrations of ComX in growth media. Therefore, expression of all three studied genes did not coincide with the growth rate and the final cell densities, which were higher at 51 than at 24 °C. Results suggest that ComX is not sufficient to overcome the high temperature induced inhibition of *srfA* expression, which may be, according to the literature, due to increased levels of Spx protein at higher temperature. While our data can not explain the higher concentration of ComX in the growth medium, it is possible, due to the amphiphilic nature of the ComX isoprenylated peptide, that higher temperature could have increased the diffusion of ComX from the membrane to the medium and/or reduce the partition coefficient between the membrane and the medium.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK	XIV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>	2
2.2 ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE PRI BAKTERIJAH	3
2.3 MEHANIZEM ZAZNAVANJA CELIČNE GOSTOTE PRI BAKTERIJI <i>B. subtilis</i>	5
2.4 GENETSKA KOMPETENCA PRI <i>B. subtilis</i>	7
2.5 ODZIV BAKTERIJE <i>B. subtilis</i> NA POVIŠANO IN ZNIŽANO TEMPERATURO	8
2.6 OPERON <i>srfA</i> IN NJEGOV PRODUKT SURFAKTIN	10
2.7 VPLIV TEMPERATURE IN DRUGIH DEJAVNIKOV NA OPERON <i>srfA</i> , GENSKI LOKUS <i>comQXPA</i> IN SIGNAL ComX	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Reagenti	13

3.1.2 Encimi	14
3.1.3 Material za enkratno uporabo	14
3.1.4 Aparature	15
3.1.5 Kompleti	15
3.1.6 Oligonukleotidni začetniki.....	16
3.1.7 Sevi.....	16
3.1.8 Priprava gojišč in raztopin	16
3.2 METODE	22
3.2.1 Gojenje seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (producent ComX) pri treh temperaturah	22
3.2.2 Stabilizacija RNA z reagentom RNa protect Bacteria Reagent	22
3.2.3 Izolacija celokupne RNA iz bakterij s kompletom RNeasy Mini Kit	23
3.2.4 Razgradnja DNA s kompletom RNase-Free DNase Set.....	23
3.2.5 Nadaljevanje izolacije celokupne RNA iz bakterij s kompletom RNeasy Mini Kit	24
3.2.6 Merjenje koncentracije in redčenje celokupne RNA	24
3.2.7 Reverzna transkripcija RNA v cDNA	24
3.2.8 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov	25
3.2.9 Preizkus ustreznosti in učinkovitosti oligonukleotidnih začetnikov za gene <i>comX</i> , <i>comQ</i> , <i>rpoB</i> in <i>lacZ</i> s PCR-jem in agarozno gelsko elektroforezo	26
3.2.10 Izolacija kromosomske DNA iz seva <i>B. subtilis</i> BD2833	27
3.2.11 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)	28
3.2.12 Analiza rezultatov kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR)	30
3.2.13 Pridobitev izrabljenega gojišča iz seva <i>E. coli</i> ED367	31
3.2.14 Pridobitev izrabljenih gojišč iz sevov <i>B. subtilis</i> BD2833 in BD2876.....	32
3.2.15 Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (HPLC).....	32
3.2.16 β -galaktozidazni test v mikrotiterskih ploščah	33
3.2.17 β -galaktozidazni test v mikrocentrifugirkah	34
4 REZULTATI.....	35
4.1 VPLIV TEMPERATURE NA RAST SEVA <i>B. subtilis</i> BD2833	35
4.2 VPLIV TEMPERATURE NA IZRAŽANJE <i>srfa</i>	36

4.3 VREDNOTENJE KOLIČINE FEROMONA ComX V IZRABLJENIH GOJIŠČIH Z METODO HPLC	38
4.3.1. Optimizacija metode HPLC	38
4.3.2. Vpliv temperature na vsebnost feromona ComX v izrabljenih gojiščih bakterije <i>B. subtilis</i>	40
4.4 VPLIV TEMPERATURE NA IZRAŽANJE GENOV <i>comX</i> IN <i>comQ</i>	42
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	43
5.1 RAZPRAVA.....	43
5.2 SKLEPI.....	46
6 POVZETEK (SUMMARY).....	47
7 VIRI	49
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Reagenti uporabljeni pri diplomskem delu.....	13
Preglednica 2: Encimi uporabljeni pri diplomskem delu.	14
Preglednica 3: Material za enkratno uporabo uporabljen pri diplomskem delu.....	14
Preglednica 4: Aparature uporabljene pri diplomskem delu.	15
Preglednica 5: Kompleti uporabljeni pri diplomskem delu.....	15
Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni pri kvantitativnem PCR v realnem času.	16
Preglednica 7: Sevi uporabljeni pri diplomskem delu.....	16
Preglednica 8: Sestava 40 µL reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo RNA v cDNA.	25
Preglednica 9: Program za termoblok za reverzno transkripcijo.....	25
Preglednica 10: Količine posameznih reagentov za eno 25 µL PCR reakcijo.	26
Preglednica 11: Program za termoblok za izvedbo PCR reakcije.	26
Preglednica 12: Temperaturni gradient temperatur naleganja oligonukleotidnih začetnikov uporabljen za PCR reakcijo.	26
Preglednica 13: Redčenje cDNA s SIGMA H ₂ O.	29
Preglednica 14: Sestava reakcijskih mešanic za qPCR.	29
Preglednica 15: Razmerja začetnih koncentracij mRNA genov <i>comX</i> in <i>comQ</i> producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX), normaliziranih na koncentracije celokupnih RNA pri treh različnih temperaturah gojenja. Razmerja so izračunana iz povprečnih začetnih koncentracij mRNA treh bioloških ponovitev pri posamezni temperaturi gojenja in pri posamezni ponovitvi gojenja.	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Bakterija <i>Bacillus subtilis</i> , SEM (Gschmeissner, 2012: 1).....	2
Slika 2: Mehanizem zaznavanja celične gostote pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Kleerebezem in sod., 1997: 896).....	4
Slika 3: Regulacija transkripcijskega aktivatorja ComA s celičnim signaliziranjem z dvema signalnima molekulama (Phr, ComX) pri <i>B. subtilis</i> (Griffith, 2009: 1).	5
Slika 4: <i>comQXPA</i> lokus pri <i>B. subtilis</i> (Kleerebezem in sod., 1997: 896).	7
Slika 5: Vpliv temperature gojenja na produkcijo surfaktina iz dveh izbranih sevov <i>B. subtilis</i> , ki sta izdelovala največ surfaktina (Abushady in sod., 2005: 342).	12
Slika 6: Rastne krivulje producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX) gojenega pri treh različnih temperaturah. Vsaka od treh rastnih krivulj prikazuje povprečje 9 rastnih krivulj bakterijskih kultur, ki smo jih gojili v treh neodvisnih poskusih.....	35
Slika 7: β -galaktozidazna aktivnost bakterijskih kultur producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX, s <i>srfa-lacZ</i> fuzijo) gojenih pri treh različnih temperaturah. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni treh bioloških ponovitev. ...	36
Slika 8: Začetne koncentracije mRNA (izražene kot emisija fluorescence reporterskega barvila SYBR Green [RFU] normalizirana na emisijo fluorescence pasivnega referenčnega barvila ROX [RFU]) gena <i>lacZ</i> (fuzija s <i>srfa</i>) normalizirane na koncentracije celokupne RNA. Bakterijske kulture producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX) so bile gojene pri treh različnih temperaturah. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni devetih bioloških ponovitev iz treh neodvisnih poskusov.	37
Slika 9: Kromatogram izrabljenih gojišč seva <i>E. coli</i> ED367 (induciranega z IPTG (+ComX) in neinduciranega (-ComX) za negativno kontrolo) pridobljenih pri 37 °C in β -galaktozidazna aktivnost seva <i>B. subtilis</i> BD2876 (-ComX - inaktiviran <i>comQ</i> , s <i>srfa-lacZ</i> fuzijo), ki smo mu dodali frakcije <i>E. coli</i> ED367.....	39
Slika 10: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX) in testerskega seva <i>B. subtilis</i> BD2876 (-ComX - inaktiviran <i>comQ</i>) za negativno kontrolo. Bakterijske kulture smo gojili pri 37 °C. Rumene kare ponazarjajo β -galaktozidazno aktivnost seva <i>B. subtilis</i> BD2876 (-ComX - inaktiviran <i>comQ</i> , s <i>srfa-lacZ</i> fuzijo), ki smo ga izpostavili frakcijam HPLC izrabljenega gojišča producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX, s <i>srfa-lacZ</i> fuzijo).....	39
Slika 11: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Izrabljeno gojišče pridobljeno pri posamezni temperaturi je bilo v treh ponovitvah nanešeno na kolono in rezultati posamezne ponovitve so ločeno prikazani na grafu. Z oblačkom je označeno območje za katerega predvidevamo, da ponazarja feromon ComX.....	40
Slika 12: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva <i>B. subtilis</i> BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Frakcije HPLC treh ponovitev izrabljenega gojišča iz posamezne temperature so bile združene in ponovno nanešene na kolono.	41

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Začetne koncentracije mRNA genov *comX* in *comQ* producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX), normalizirane na koncentracije celokupnih RNA.
- Priloga B: Generacijski časi bakterijskih kultur producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) trikrat gojenih v treh bioloških ponovitvah.
- Priloga C: Površina kromatografskih vrhov združenih frakcij HPLC treh ponovitev izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah gojenja in v treh neodvisnih poskusih.
- Priloga D: Kromatogram izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) in testerskega seva *B. subtilis* BD276 (-ComX - inaktiviran *comQ*) za negativno kontrolo. (2. ponovitev).
- Priloga E: Kromatogram izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. (2. gojene bakterijske kulture).
- Priloga F: Kromatogram izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. (3. gojene bakterijske kulture).
- Priloga G: Kromatogram izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Frakcije HPLC treh ponovitev izrabljenega gojišča iz posamezne temperature so bile združene in ponovno nanešene na kolono (2. gojene bakterijske kulture).
- Priloga H: Kromatogram izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Frakcije HPLC treh ponovitev izrabljenega gojišča iz posamezne temperature so bile združene in ponovno nanešene na kolono (3. gojene bakterijske kulture).
- Priloga I: Nastavitve pri novem dokumentu v programu SDS 2.3.
- Priloga J: Oznake analiziranih genov s pripadajočimi nastavitvami v programu SDS 2.3.
- Priloga K: Izbor luknjic mikrotiterske plošče za analizo izražanja posameznega gena v programu SDS 2.3.
- Priloga L: Program za kvantitativni PCR v realnem času v programu SDS 2.3.
- Priloga M: Končni ukazi pred zagonom programa za kvantitativni PCR v realnem času v programu SDS 2.3.
- Priloga N: Prikaz zavihkov in ukazov s katerimi odpremo okno za nastavitve poravnave krivulj v programu Origin Pro 8.
- Priloga O: Izbor funkcije poimenovane qPCR v programu Origin Pro 8.
- Priloga P: Nastavitve pri zavihku Data Selection v programu Origin Pro 8.
- Priloga Q: Enačba izbrane funkcije v programu Origin Pro 8.
- Priloga R: Označitev skupne vrednosti za učinkovitost podvajanja pri zavihku Parameters v programu Origin Pro 8.
- Priloga S: Določitev mejnih vrednosti pri ozadju, začetni koncentraciji in učinkovitosti podvajanja v programu Origin Pro 8.
- Priloga T: Poravnane krivulje nastale z izborom ukaza Fit v programu Origin Pro 8.
- Priloga U: Poročilo poravnave krivulj v programu Origin Pro 8-1. del.
- Priloga V: Poročilo poravnave krivulj v programu Origin Pro 8-2. del.
- Priloga W: 100.80 minutni program za identifikacijo in kvantifikacijo ComX s HPLC.

Priloga X: β -galaktozidazna aktivnost seva *B. subtilis* BD2876 (-ComX – inaktiviran *comQ*, s *srfA-lacZ* fuzijo) gojenega pri treh različnih temperaturah skupaj z izrabljenim gojiščem seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX, s *srfA-lacZ* fuzijo) pridobljenim pri 37 °C.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC prenašalec	ATP-Binding Cassette transporter (prenašalec z ATP-vezavno kaseto)
ACN	AcetoNitrile (acetonitril)
a.e.	Absorbančne Enot
AHL	Aciliran Homoserin Lakton
Amp/ Km/ Tc	Ampicilin/ Kanamicin/ Tetraciklin
ATP	Adenosine TriPhosphate (adenozin trifosfat)
β-ME	Beta-MerkaptoEtanol
bp	Bazni Par
cDNA	Complementary DeoxyriboNucleic Acid (komplementarna deoksiribonukleinska kislina)
CIRCE element	Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression (obrnjena ponovitev, ki uravnava izražanje šaperonov)
CM gojišče	Competence Medium (kompetenčno gojišče)
ComX	zunajcelični signalni peptid bakterije <i>B. subtilis</i>
CSF	The Competence and Sporulation Factor (kompetenčni in sporulacijski faktor bakterije <i>B. subtilis</i>)
dNTP	DeoxyriboNucleotide TriphosPhate (deoksiribonukleotid trifosfat)
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid (etilendiaminotetraocetna kislina)
EPS	Extracellular Polymeric Substances (zunajcelični polimerni matriks)
EtBr	Etidijev Bromid
H ₂ O	voda
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)
IG	Izrabljeno Gojišče

IPTG	IsoPropyl- β -D-ThioGalactopyranoside	(Izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid)
IR	InfraRed (infrardeče)	
Kp	Porazdelitveni Koeficient	
LB gojišče	Luria-Bertani gojišče	
Leu/ His/ Met/ Phe/ Ser	Levcin/ Histidin/ Metionin/ Fenilalanin/ Serin	
log	logaritem	
MAE	MiliAbsorbančne Enote	
ME	Millerjeve Enote	
mRNA	Messenger RiboNucleic Acid (informacijska ribonukleinska kislina)	
OD ₆₅₀	Optical Density at 650 nm (optična gostota pri valovni dolžini 650 nanometrov)	
ONPG	Ortho-NitroPhenyl- β -D-Galactopyranoside	(O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid)
PCR	Polymerase Chain Reaction (verižna reakcija s polimerazo)	
RFU	Relative Fluorescence Units (relativne fluorescenčne enote)	
TAE pufer	Tris-Acetic acid-EDTA (Tris acetatni pufer)	
TBAB gojišče	Tryptic Blood Agar Base (triptični krvni agar)	
TE pufer	Tris-EDTA (Tris pufer)	
TFA	TriFluoroacetic Acid (trifluoroocetna kislina)	
U	enota	
UV/VIS spektroskopija	UltraViolet-VISible spectroscopy	(ultravijolična in vidna spektroskopija)

SLOVARČEK

avtoinduktor	Signalna molekula, ki je del mehanizma zaznavanja celične gostote in je sposobna avtoindukcije.
biosurfaktanti	Površinsko aktivne in amfipatične molekule, ki jih mikroorganizmi sintetizirajo za različne namene.
eksponentna faza rasti	Faza v kateri bakterijske celice rastejo in se delijo.
delecija	Izguba nukleotidov.
ferotip	Komunikacijska skupina v kateri so združeni bakterijski sevi, ki lahko komunicirajo med sabo.
frakcija ali eluat	Vzorec v katerem je iz kolone kromatografa izločena tarčna snov.
genetska kompetenca	Sposobnost bakterijskih celic prevzemati tujo DNA.
genski polimorfizem	Prisotnost dveh ali več različnih alelov enega gena v populaciji, pri čemer mora biti posamezen alel prisoten v več kot 1% populacije, drugače govorimo o mutaciji.
inaktiviran	nedelujoč
insercija	Vrinek nukleotidov.
lag faza rasti	Faza prilagajanja bakterij na nove okoljske dejavnike.
mezofil	Optimalna temperatura rasti za te mikroorganizme je med 20 in 40 °C.
quorum sensing	Zaznavanje celične gostote.
procesiranje	Skrajšanje peptidov s proteolitično cepitvijo.
Real Time qPCR	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času.
reporterski gen	Reporterski ali poročevalski gen je gen, ki ga je lahko detektirati in ga zato spojimo z regulatornim nukleotidnim zaporedjem gena, ki nas zanima ter na ta način ugotovimo, če se je naš tarčni gen izrazil.
stacionarna faza rasti	Faza v kateri se število bakterijskih celic ne spreminja več.
surfaktin	Surfaktin je biosurfaktant, ki ga izdelujejo sevi <i>B. subtilis</i> .

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mnoge bakterije uravnavajo medsebojno komunikacijo z mehanizmom zaznavanja celične gostote. Celice izločajo v okolje signalne molekule, ki se pri mejni koncentraciji vežejo na receptorske proteine in sprožijo spremembe v izražanju tarčnih genov in posledično spremembe v fiziologiji populacije (Nealson in sod., 1970; Magnuson, 1994; Miller in Bassler, 2001). Bakterija *Bacillus subtilis* uravnava preko zaznavanja celične gostote fiziološke procese kot so kompetenca, sporulacija, produkcija antibiotikov in sinteza zunajceličnih encimov ter izgradnja biofilma (Solomon in sod., 1996; Comella in Grossman, 2005). Povišana celična gostota vodi tudi do izražanja surfaktinov, lipopeptidnih antibiotikov (Nakano in sod., 1991). Pomembna signalna molekula pri bakteriji *B. subtilis* je zunajcelični peptid ComX, ki ga bakterija zazna z dvokomponentnim sistemom, sestavljenim iz senzorske kinaze ComP in odzivnega regulatorja ComA (Magnuson, 1994). Vpliv fizikalno-kemijskih dejavnikov na zaznavanje celične gostote (QS) ni dobro poznan. Tako tudi vpliv temperature na intenzivnost sinteze ComX in izražanje genov *comX* in *comQ* pri *B. subtilis* še ni v celoti pojasnjen.

1.2 NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA

Namen tega diplomskega dela je preučiti vpliv temperature (51 °C, 37 °C, 24 °C) na izražanje genov *comX* in *comQ*, odgovornih za nastanek aktivnega ComX, ter na izražanje operona *srfA*, ki se odziva na ComX odvisen sistem za zaznavanje celične gostote pri bakteriji *B. subtilis*.

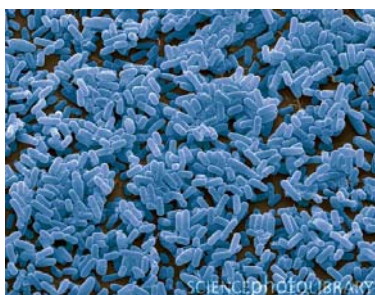
1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na preliminarne raziskave (Vogrič, diplomsko delo v pripravi) pričakujemo, da bo izražanje operona *srfA* ter izražanje genov *comX* in *comQ* pri bakteriji *B. subtilis* pozitivno korelirano s temperaturo gojenja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je po Gramu pozitivna bakterija, ki jo najdemo v tleh, vodi, zraku in na razpadajočih rastlinah. Običajno raste v obliki enocelične palčke, v redkih primerih tudi v verigah. Površino vegetativne celice pokriva kapsula. Je mezofil in fakultativen anaerob. Razgrajuje pektin in polisaharide v rastlinskih tkivih (Todar, 2011). Sicer lahko kontaminira hrano, vendar redko povzroči zastrupitev, saj ni patogen za človeka. Bakterije *B. subtilis* z mehanizmom zaznavanja celične gostote komunicirajo med sabo, kar omogoča pojave kot je rojenje celic in tvorbo biofilmov (Graumann, 2007).



Slika 1: Bakterija *Bacillus subtilis*, SEM (Gschmeissner, 2012: 1).

Ob vstopu v stacionarno fazo rasti, ko bakteriji *B. subtilis* začne primanjkovati hranil in zazna povišanje v gostoti celične populacije, se lahko odzove na različne načine. Celice postanejo gibljive in začnejo izdelovati antibiotike. *B. subtilis* lahko postane kompetenten in s prevzemanjem DNA iz okolja pridobi nov genetski material. V skrajnem primeru se lahko tudi diferencira v metabolno neaktivno endosporo, ki je zelo odporna na različne kemične in fizikalne dejavnike (Graumann, 2007).

B. subtilis je modelni organizem za raziskave po Gramu pozitivnih bakterij (Völker in Hecker, 2005). Pri analizi celotnega genoma so med drugim identificirali pet genov za signalno peptidazo in več genov, ki kodirajo komponente sekrecijskega aparata, zaradi česar je *B. subtilis* uporaben v industriji za produkcijo večjih količin encimov (Kunst in sod., 1997). Primer takšnega industrijsko pomembnega encima je subtilizin, ki ga dodajajo

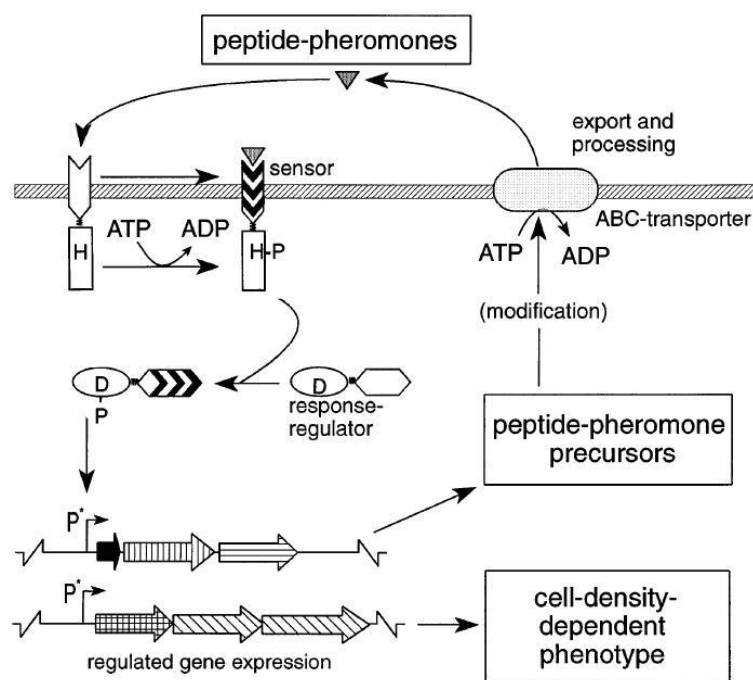
v detergente (Ferrari in sod., 1988; Bryan, 2000; Swartzburg, 2009). Mnogo genov v genomu *B. subtilis* je vključenih v sintezo sekundarnih metabolitov, med katere spadajo tudi antibiotiki (Kunst in sod., 1997). Iz bakterij *B. subtilis* so pridobili 66 antibiotikov, vključno z bacitracinom, ki zdravi bakterijske infekcije kože in preprečuje infekcije pri manjših urezninah in opeklinah (Swartzburg, 2009; Awais in sod., 2010). Podatki, ki so jih pridobili z analizami tako genoma kot tudi proteoma in transkriptoma te bakterije, so zelo uporabni za študij mikrobne fiziologije kot je na primer odziv bakterij na različne stresne dejavnike (Eymann in sod., 2002, 2004).

2.2 ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE PRI BAKTERIJAH

Zaznavanje celične gostote omogoča bakterijam medsebojno sporazumevanje, ki lahko poteka tudi med različnimi bakterijskimi vrstami. Pri tem izdelujejo in izločajo kemične signalne molekule imenovane avtoinduktorji, katerih koncentracija se spreminja glede na spremembe v gostoti celične populacije. Bakterije glede na celično gostoto regulirajo izražanje genov in s tem različne fiziološke procese (Miller in Bassler, 2001).

Avtoinduktorji pri po Gramu negativnih bakterijah so najpogostejše acilirani homoserin laktoni, hidrofobne molekule z nizko molekulsko težo, ki so jih prvič odkrili v bioluminiscentni bakteriji *Photobacterium fischeri* (Nealson in sod., 1970; Nealson in Hastings, 1979; Whitehead in sod., 2001). Bioluminiscenca je inducirana tudi pri bakteriji *Vibrio harveyi*, kar regulirata dva različna avtoinduktorja imenovana AI-1 in AI-2. AI-2 so našli v veliko tako po Gramu negativnih kot tudi po Gramu pozitivnih bakterijah (Schauder in sod., 2001). Rezultati raziskav nakazujejo na to, da bakterije AI-2 uporabljajo za medvrstno komunikacijo. Homolog gena *luxS*, od katerega je odvisna sinteza AI-2, so identificirali tudi v bakteriji *Bacillus subtilis*. Pokazali so, da *B. subtilis* sintetizira aktiven AI-2, ki je prepoznan v signalni poti bakterije *V. harveyi*. Ugotovili so tudi, da aktivnost encima LuxS pri *B. subtilis* igra pomembno vlogo pri tvorbi biofilma in rojenju. Odkrili so, da obstaja od AI-2 odvisna negativna inhibitorna povratna zanka, ki uravnava transkripcijo gena *luxS*. Produkcijo AI-2 negativno regulirata tudi transkripcijska faktorja SinR in Spo0A, glavna regulatorna proteina večceličnega socialnega obnašanja bakterije *B. subtilis* (Federle in Bassler, 2003; Lombardia in sod., 2006).

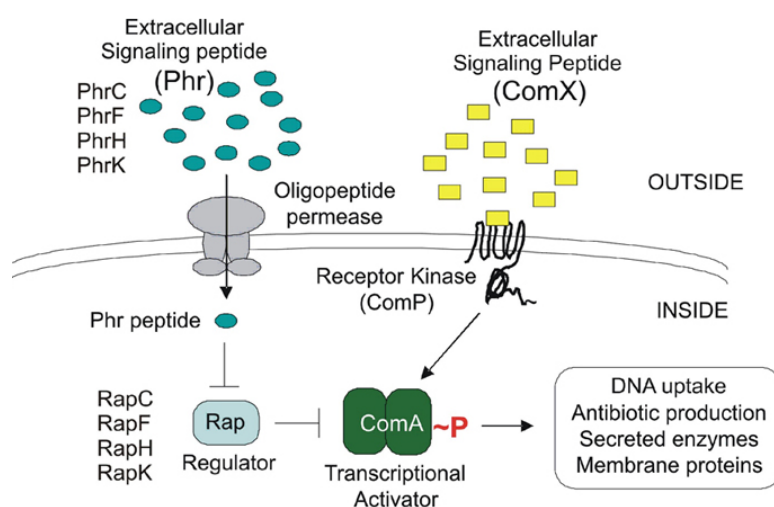
Pri po Gramu pozitivnih bakterijah so signalne molekule običajno procesirani oligopeptidi, ki jih zaznavajo z dvokomponentnim signalnim sistemom (Kleerebezem in sod., 1997). Te posttranslacijsko modificirane signalne molekule glede na njihove strukturne posebnosti uvrščamo v tri skupine (Williams in sod., 2007). Prva skupina so lantibiotiki (de Vos in sod., 1995), tipična predstavnika katerih sta nizin bakterije *Lactococcus lactis* (Kuipers in sod., 1995) in subtilin bakterije *B. subtilis* (Banerjee in Hansen, 1988). Zaradi naraščajoče odpornosti človeških patogenov na konvencionalne antibiotike, postajajo lantibiotiki s svojim antimikrobnim delovanjem na celične membrane vedno bolj zanimivi za znanstvenike kot modeli za nove načine zdravljenja bakterijskih infekcij (Parisot in sod., 2008). Stafilokoki izdelujejo tiolaktone, ki predstavljajo drugo skupino (Mayville in sod., 1999; McDowell in sod., 2001). Tretja skupina so peptidi z izopreniliranim triptofanskim ostankom, katerih edini znani predstavnik je ComX in njegove različice pri *B. subtilis* in drugih vrstah iz rodu *Bacillus* (Magnuson, 1994).



Slika 2: Mehanizem zaznavanja celične gostote pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Kleerebezem in sod., 1997: 896).

2.3 MEHANIZEM ZAZNAVANJA CELIČNE GOSTOTE PRI BAKTERIJI *B. subtilis*

Zaznavanje celične gostote pri bakteriji *Bacillus subtilis* je pomembno za razvoj kompetence, sporulacije in produkcije razgradnih encimov in antibiotikov (Comella in Grossman, 2005). Odgovor na povišano celično gostoto pri *B. subtilis* je uravnavan z dvema signalnima molekulama. To sta zunajcelična peptida ComX in CSF (Magnuson, 1994; Solomon in sod., 1995; Mandić-Mulec in sod., 2003).



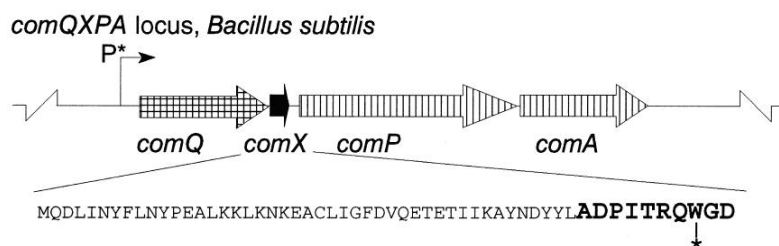
Slika 3: Regulacija transkripcijskega aktivatorja ComA s celičnim signaliziranjem z dvema signalnima molekulama (Phr, ComX) pri *B. subtilis* (Griffith, 2009: 1).

CSF je kompetenčni in sporulacijski dejavnik (Solomon in sod., 1996). Aktiven pentapeptid CSF nastane iz C-terminalnega konca prekursorskega proteina PhrC (Lanigan-Gerdes in sod., 2008). CSF se kopiči v zunajceličnem prostoru in prehaja nazaj v bakterijsko celico skozi oligopeptidno permeazo Spo0K (Solomon in sod., 1996). Znotraj celice se veže na dva različna znotrajcelična receptorja, ki vplivata na aktivnost odzivnega regulatorja ComA. Nizke koncentracije CSF stimulirajo aktivnost ComA in s tem razvoj kompetence z inhibiranjem aktivnosti aspartilfosfat fosfataze RapC, negativnega regulatorja ekspresije *srfA*, ki inhibira kopičenje fosforilirane oblike ComA. Pri višjih koncentracijah CSF inhibira s ComA uravnavano izražanje genov in stimulira sporulacijo z inhibiranjem aktivnosti fosfataze RapB (Solomon in sod., 1996; Lazazzera, 2000; Stephenson in sod., 2003; Auchtung in sod., 2006). CSF pozitivno regulira lastno

ekspresijo, kar pripisujejo njegovi sposobnosti inhibiranja aktivnosti RapC (Lazazzera in sod., 1999).

Signalni peptidi ComX so kopičijo v zunajceličnem prostoru. Ko njihova koncentracija dovolj naraste, jih zazna membransko vezana senzorska histidinska kinaza ComP, kar sproži niz fosforilacijskih dogodkov. ComP se avtofosforilira na ohranjenem histidinskem ostanku. Fosfatna skupina je nato prenesena na odzivni regulator ComA, ki je fosforiliran na ohranjenem aspartatnem ostanku. ComA se aktivira in vpliva na transkripcijo tarčnih genov. Tako torej obe signalni molekuli vplivata na fosforilacijo ComA (Weinrauch in sod., 1990; Magnuson, 1994; Solomon in sod., 1995; Piazza in sod., 1999; Miller in Bassler, 2001), razlikujeta pa se v tem, da ComX ni avtoregulator tako kot CSF (Lazazzera in sod., 1999; Schneider in sod., 2002).

Za nastanek aktivne signalne molekule ComX sta odgovorna gena *comX* in *comQ*. Najprej se iz gena *comX* sintetizira 55 aminokislin velik propeptid, ki še ni aktiven (Magnuson, 1994). ComQ procesira in posttranslacijsko modificira ComX z izoprenilacijo ohranjenega triptofanskega ostanka, okvara izoprenoidne vezavne domene ComQ pa prekine sintezo aktivnega ComX (Schneider in sod., 2002). Izražanje gena *comQ* je najvišje v zgodnji rastni fazi in se zniža v stacionarni rastni fazi. Delecija *comQ* prepreči razvoj kompetence in zniža izražanje operona *srfA* (Weinrauch in sod., 1991). Na prehodu v stacionarno fazo rasti je koncentracija signalnega peptida ComX dovolj velika, da ga zazna ComP (Kleerebezem in sod., 1997; Piazza in sod., 1999; Ogura in sod., 2003). Ugotovili so, da je za povečano produkcijo ComX, ki je v aktivni obliki velik 10 aminokislin, dovolj že povišano izražanje gena *comX* (Schneider in sod., 2002). Obstajajo različne signalne molekule ComX, na podlagi katerih bakterije uvrščamo v različne komunikacijske skupine ali ferotipe. Vse različice te signalne molekule so izoprenilirane s posttranslacijsko modifikacijo ohranjenega triptofanskega ostanka, razlikujejo se le v masi teh izoprenskih skupin (Ansaldi in sod., 2002; Mandić-Mulec in sod., 2003; Ansaldi in Dubnau, 2004; Okada in sod., 2005). Sevi, ki pripadajo različnim ferotipom, ne morejo komunicirati med sabo (Tran in sod., 2000; Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Stefanic in Mandić-Mulec, 2009).



Slika 4: *comQXPA* lokus pri *B. subtilis* (Kleerebezem in sod., 1997: 896).

Geni *comQ*, *comX*, *comP* in *comA* si v tem vrstnem redu sledijo na kromosomu. Odkrili so genski polimorfizem, ki zajema gena *comQ* in *comX* ter dve tretjini gena *comP*, ohranjen je le preostali del gena *comP* in gen *comA*. Ta del gena *comP*, v katerem so odkrili polimorfizem (Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in Dubnau, 2004), kodira membransko vezavno domeno senzorskega proteina ComP (Weinrauch in sod.; 1990, Piazza in sod., 1999). S to signalno potjo je neposredno uravnavano izražanje več kot 20 genov. Posredno je uravnavano izražanje še več kot 150 dodatnih genov, vključno s tistimi vpletenimi v razvoj kompetence. Ugotovili so, da ComA vpliva na najmanj 89 genov v 35 operonih, pri čemer so upoštevani le geni, ki niso odvisni od vpliva *comA* na ComK. Večina teh genov kodira membranske ali izločene proteine in proteine vpletene v produkcijo membranskih ali zunajceličnih produktov (Comella in Grossman, 2005). ComA med drugim aktivira transkripcijo genov *degQ* in *rapC* ter genov *srfA* operona. Gen *degQ* kodira pozitivni regulator genov za razgradne encime (Amory in sod., 1987; Msadek in sod., 1991). Na aktivnost ComA poleg ComX in CSF vplivajo še vsaj tri od gostote celične populacije odvisne signalne poti. Signalni peptidi PhrF, PhrG, PhrH in PhrK se izločijo v zunajcelični prostor in nato skozi oligopeptidno permeazo potujejo nazaj v celico, kjer inhibirajo aktivnost Rap proteinov (RapF, RapG, RapH, RapK). Rap proteini inhibirajo aktivnost ComA (Bongiorni in sod., 2005; Auchtung in sod., 2006; Griffith in Grossman, 2008; Lanigan-Gerdes in sod., 2008).

2.4 GENETSKA KOMPETENCA PRI *B. subtilis*

Genetska kompetenca pri *B. subtilis* se razvije na prehodu v stacionarno fazo rasti. Največ 10 % celic bakterijske kulture se diferencira in postane kompetentnih. Kompetentne celice

so metabolno manj aktivne in izdelujejo proteine s katerimi prevzemajo tujo DNA neodvisno od njenega nukleotidnega zaporedja (Albano in sod., 1987; Dubnau, 1991; Grossman, 1995). Glavni regulator kompetence je transkripcijski faktor ComK. Med eksponentno fazo rasti je aktivnost ComK inhibirana zaradi interakcije ComK z MecA in MecB (ClpC) (Msadek in sod., 1994; Hahn in sod., 1996; Turgay in sod., 1998; Hamoen in sod., 2003). Pri višji gostoti celične populacije je aktiven ComA, ki aktivira transkripcijo operona *srfA* in s tem tudi gena *comS*, ki kodira majhen regulatorni protein ComS. ComS osvobodi ComK iz kompleksa z MecA in MecB in aktiven ComK potem vpliva na izražanje poznih kompetenčnih operonov (D'Souza in sod., 1994; Turgay in sod., 1997).

2.5 ODZIV BAKTERIJE *B. subtilis* NA POVIŠANO IN ZNIŽANO TEMPERATURO

Nenadno povišanje temperature na 48-50 °C inducira gene, ki kodirajo proteine vročinskega šoka. Pri *B. subtilis* je teh genov več kot 200. Proteini vročinskega šoka pomagajo bakterijam pri spopadanju s stresom, ki ga povzroči povišana temperatura. Večina proteinov vročinskega šoka spada bodisi med molekularne šaperone ali od ATP odvisne proteaze. Pri vročinskem šoku se naenkrat pojavi veliko nepravilno zviti in denaturiranih proteinov, iz katerih bi lahko nastali agregati. Šaperoni reorganizirajo in ponovno pravilno zvijejo polipeptidne verige. Za tiste, ki ne morejo več zavzeti pravilne konformacije, poskrbijo proteaze, ki jih razgradijo (Arnosti in sod., 1986; Gottesman in sod., 1997; Schumann, 2003). Izpostavitev bakterije *B. subtilis* W168, ki je rasla pri 37 °C, na 50 °C, prehodno zavre sintezo večine celičnih proteinov, njihova sinteza pa se povrne po 30 minutah. Temperatura 50 °C zmanjša tudi sintezo flagelina ter sintezo sigma dejavnikov, σ^{28} in σ^{43} , in že po treh minutah poviša vsebnost proteinov vročinskega šoka v celici (Arnosti in sod., 1986). Pri *B. subtilis* so geni, pomembni za odziv na povišano temperaturo, razdeljeni v 6 razredov. V razredu I. najdemo le dva operona, ki sta pod uravnavo σ^A in sicer *dnaK* in *groE*, ki kodirata šaperona. Oba operona sta uravnavana tudi preko CIRCE elementa (Li in Wong, 1992; Zuber in Schumann, 1994; Homuth in sod., 1997; Mogk in sod., 1997; Schumann, 2003). V razredu II. je 127 genov. Njihovo izražanje uravnava σ^B , ki uravnava odziv na različne stresne dejavnike vključno z vročinskim šokom. Geni razreda II uravnavajo tudi druge stresne dejavnike kot so: izsušitev, oksidativni stres, nizek pH in pomanjkanje kisika, glukoze ali fosfata (Boylan in sod., 1993; Hecker in sod.,

1996; Schumann, 2003). V razredu III. so operoni *clpC*, *clpE* in *clpP*. Njihov represor je CtsR. Protein ClpC, ki je bil identificiran tudi kot MecB, tvori kompleks z MecA in ComK, s čimer je preprečen razvoj kompetence. ClpP je nasprotno pozitivni regulator ekspresije *comK*, pomembno vlogo pa ima tudi pri drugih prilagoditvah na stacionarno fazo rasti kot so giblјivost, sporulacija in sinteza razgradnih encimov (Krüger in sod., 1997; Msadek in sod., 1994, 1998; Turgay in sod., 1997; Derre in sod., 1999; Schumann, 2003). V razred IV. so doslej uvrstili le en gen in sicer *htpG* (Schulz in sod., 1997; Versteeg in sod., 2003; Schumann, 2003). V razredu V. sta gena *htrA* in *htrB*, ki kodirata v membrano zasidrano proteazo. Ta dva gena sta pod uravnavo CssRS, dvokomponentnega signalnega sistema, ki zazna napačno zvite proteine zunaj celice (Hyyryläinen in sod., 2001; Darmon in sod., 2002; Schumann, 2003). Razred VI je drugi največji razred, ki šteje že približno 90 genov (Helmann in sod., 2001; Schumann, 2003). V raziskavah je bilo ugotovljeno tudi, da glicin betain, ki ga *B. subtilis* uporablja za prilagoditev na visok osmotski tlak, prav tako ščiti bakterijo pri vročinskem šoku. Pri sevu *B. subtilis* JH642, ki mu je bil v gojišče dodan glicin betain, se je skrajšala lag faza rasti pri temperaturi gojenja 52 °C. To je najvišja temperatura pri kateri lahko ta sev še raste, z ali brez dodatka glicin betaina (Holtmann in Bremer, 2004; Loshon in sod., 2006).

Bakterije *B. subtilis* naseljujejo površinske sloje tal, v katerih so fizikalno kemične spremembe pogoste. Bakterije so izpostavljene tudi zelo nizkim temperaturam, ki znižajo fluidnost membrane, znižajo encimsko aktivnost, povzročijo prepočasno in neučinkovito zvijanje proteinov ter nastanek sekundarnih struktur v RNA, kar vpliva na iniciacijo transkripcije. Pri nizkih temperaturah se prav tako zmanjša sinteza večine proteinov in inducira sinteza skupine proteinov, ki vplivajo na celične funkcije kot je splošni metabolizem, transkripcija, translacija in rekombinacija (Graumann in sod., 1996; Aguilar in sod., 1998; Graumann in Marahiel, 1999). Pri *B. subtilis* so pri nizki temperaturi sintetizirani proteini CspB, CspC in CspD. Ti proteini delujejo kot RNA šaperoni, saj se vežejo na enoverižne nukleinske kisline in tako zmanjšajo pojavljanje sekundarnih struktur v mRNA. Hkrati povečajo učinkovitost sinteze proteinov (Budde in sod., 2006; Graumann in sod., 1996, 1997). *B. subtilis* pri temperaturi gojenja 37 °C večinoma sintetizira nasičene maščobne kisline. Pri prenosu kulture na 20 °C je inducirana sinteza nenasičenih maščobnih kislin. Poviša se transkripcija gena *des*, ki kodira fosfolipidno desaturazo s

katero *B. subtilis* vstavlja dvojne vezi v obstoječe maščobne kisline. Povečan delež nenasičenih maščobnih kislin v membranskih fosfolipidih poveča fluidnost membrane (Aguilar in sod., 1998, 1999). Dvokomponentni sistem, sestavljen iz senzorske kinaze DesK in odzivnega regulatorja DesR, inducira transkripcijo gena *des* pri nizki temperaturi (Aguilar in sod., 2001). Rigidnost citoplazemske membrane bakterije *B. subtilis* pri nizki temperaturi je lahko preprečena tudi z od izolevcina odvisno sintezo razvejanih maščobnih kislin (Klein in sod., 1999). *B. subtilis* uporablja glicin betain tudi kot zaščito pri nizkih temperaturah. Glicin betain v veliki meri spodbuja rast pri 15 °C in omogoča podvojevanje bakterij tudi pri temperaturi 13 °C, ki inhibira njihovo rast (Hoffmann in Bremer, 2011).

2.6 OPERON *srfA* IN NJEGOV PRODUKT SURFAKTIN

Mikrobni biosurfaktanti so površinsko aktivne in amfipatične molekule, ki jih mikroorganizmi sintetizirajo za različne namene. Biosurfaktanti obdajo hidrofobne substrate, da jih celice lahko prevzamejo. Bakterijam tudi olajšajo rojenje, saj pomagajo pri premagovanju površinske napetosti (Desai in Banat; 1997; Starov in sod., 2000; Julkowska in sod., 2005; Swift in sod., 2008). Mikrobne biosurfaktante lahko delimo glede na molekulsko težo. Biosurfaktanti z nizko molekulsko težo so večinoma glikolipidi in lipopeptidi kot je na primer surfaktin. Njihova vloga je predvsem zmanjševanje površinske napetosti, medtem ko so biosurfaktanti z visoko molekulsko težo, kot so na primer lipopolisaharidi in lipoproteini, bolj učinkoviti pri stabilizacijah emulzij olja v vodi (Rosenberg in Ron, 1999).

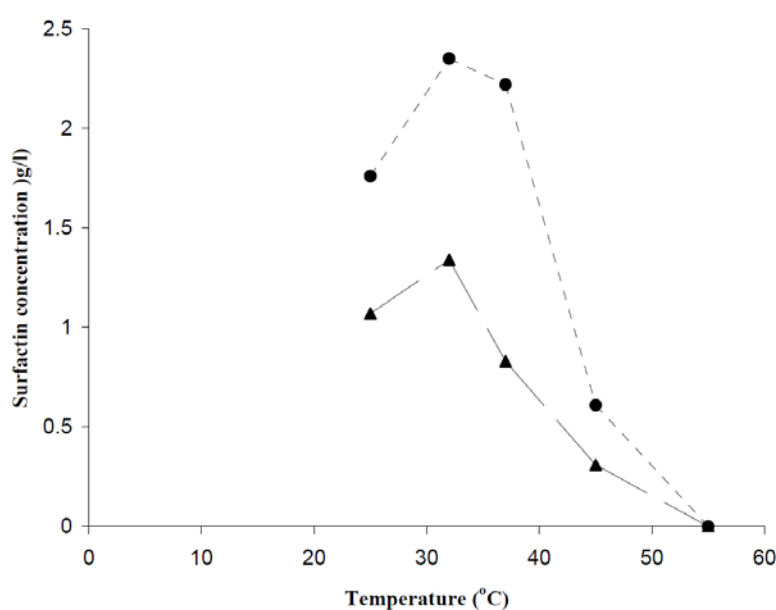
Surfaktin je biosurfaktant, ki ga izdeluje *B. subtilis*. Za njegovo sintezo sta odgovorna dva genska lokusa in sicer *sfp* in *srfA*. Operon *srfA* kodira tri podenote surfaktin sintetaze (Nakano in sod., 1988, 1992; Cosmina in sod., 1993), *sfp* pa kodira Sfp protein oziroma natančneje fosfopanteteinil transferazo, ki aktivira sedem PCP domen surfaktin sintetaze (Lambalot in sod., 1996; Reuter in sod., 1999). Ekspresija *srfA* se poveča v odvisnosti od dveh zunajceličnih signalnih peptidov (ComX, CSF). Ob zvišanju celične gostote, ko njuna koncentracija dovolj naraste, se aktivirata dve signalni poti, ki obe vodita do fosforilacije transkripcijskega aktivatorja ComA. Fosforiliran ComA se veže na promotorsko regijo *srfA* in tako aktivira njegovo ekspresijo (Roggiani in Dubnau, 1993; Magnuson, 1994;

Solomon in sod., 1996). Pomembno vlogo pri od ComA odvisni transkripciji *srfA* imata Spx protein in od ATP odvisna proteaza ClpXP. Interakcija Spx proteina z α podenoto RNA polimeraze ima negativen vpliv na od ComA odvisno transkripcijo *srfA*, zato je prisotna ClpXP proteaza, ki s proteolizo Spx protein odstrani (Nakano in sod., 2000, 2002, 2003). Ugotovili so, da gen *spx* med drugim inducira vročinski šok (Helmann in sod., 2001). Analize so pokazale visoke nivoje Spx proteina po inkubaciji na 50 °C, od ComA odvisna transkripcija *srfA* pa se z naraščajočimi količinami tega proteina znižuje (Nakano in sod., 2003). Operon *srfA* je pomemben tudi za razvoj kompetence in učinkovitost sporulacije. Znotraj tega operona se nahaja gen *comS*, katerega produkt omogoča ekspresijo gena *comK*, ki vpliva na ekspresijo poznih kompetenčnih genov (Nakano in sod., 1991; Hahn in Dubnau, 1991; D'Souza in sod., 1994; Turgay in sod., 1998).

2.7 VPLIV TEMPERATURE IN DRUGIH DEJAVNIKOV NA OPERON *srfA*, GENSKI LOKUS *comQXP* IN SIGNAL ComX

V raziskavah so preizkušali vpliv različnih dejavnikov na izražanje *srfA*. Tako so na primer opazili, da stres z vodikovim peroksidom inaktivira pozitivni regulator izražanja *srfA* PerR, kar se kaže v znižanem izražanju *srfA*. Vloga PerR pri izražanju *srfA* ni odvisna od drugih regulatorjev izražanja *srfA* kot je na primer *comQXP*. PerR se veže direktno na promotorsko regijo *srfA* (Hayashi in sod., 2005). Preverjali so tudi vpliv superoksida pri mutanti *B. subtilis*, ki ne more sintetizirati superoksid dismutaze. Zaradi superoksidnega aniona inducirane z dodatkom parakvata se zniža transkripcija *comQXP* lokusa, kar posledično vpliva na znižanje izražanja *srfA* (Ohsawa in sod., 2006). Ugotovili so, da na izražanje *srfA* operona pri *B. subtilis* vpliva tudi pH. V sporulacijskem gojišču bogatem z glukozo in glutaminom, proti koncu eksponentne faze rasti pH bakterijske kulture pade na 5 ali nižje, kar zniža izražanje *srfA*. S poviševanjem pH do skoraj nevtralnega, se izražanje *srfA* in s tem produkcija surfaktina zelo povečata. Pri nizkih in visokih pH se *srfA* optimalno izraža, če sta aktivna tako ComA kot tudi ComP protein, vendar slednji ne inducira izražanja *srfA* v odvisnosti od pH. Za indukcijo izražanja *srfA* kot odgovor na spremembe v pH bakterijske kulture je pomembna Spo0K, odsotnost CSF pa na to vlogo oligopeptidne permeaze nima vpliva (Cosby in sod., 1998). V naslednji raziskavi so izbrana seva *B. subtilis*, ki sta izdelovala največ surfaktina, gojili pri različnih temperaturah

v rangu od 25 °C do 60 °C. Ugotovili so, da ima temperatura gojenja bakterijskih kultur velik vpliv na produkcijo surfaktina. Koncentracija tega biosurfaktanta narašča do temperature gojenja 30 °C, kjer je najvišja. Z višanjem temperature gojenja nad 30 °C se koncentracija surfaktina spet začne zniževati. Pri sevu, ki ga predstavlja spodnja krivulja na grafu (Slika 5), pri temperaturi gojenja 25 °C nastane nekoliko več surfaktina kot pri temperaturi gojenja 37 °C. Pri drugem sevu je obratno in nastane pri 37 °C nekoliko več surfaktina kot pri 25 °C (Abushady in sod., 2005).



Slika 5: Vpliv temperature gojenja na produkcijo surfaktina iz dveh izbranih sevov *B. subtilis*, ki sta izdelovala največ surfaktina (Abushady in sod., 2005: 342).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

Preglednica 1: Reagenti uporabljeni pri diplomskem delu.

Reagent	Proizvajalec
2-merkaptetanol	Sigma-Aldrich, ZDA
2-propanol	Merck, ZDA
ACN	Sigma-Aldrich, ZDA
agaroz	Sigma-Aldrich, ZDA
ampicilin	Sigma-Aldrich, ZDA
$C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$	Merck, ZDA
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich, ZDA
DNA marker GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder Mix	Fermentas, Kanada
EDTA	Sigma-Aldrich, ZDA
etanol	Sigma-Aldrich, ZDA
etidijev bromid	Sigma-Aldrich, ZDA
fenilalanin	Sigma-Aldrich, ZDA
fenol	Kemika, Hrvaška
glacialna očetna kislina	Merck, ZDA
glukoza	Kemika, Hrvaška
glutaminska kislina	Sigma-Aldrich, ZDA
H_2O brez vsebnosti RNaz	Sigma-Aldrich, ZDA
HCl	Merck, ZDA
histidin	Sigma-Aldrich, ZDA
IPTG	Sigma-Aldrich, ZDA
izoamilni alkohol	Merck, ZDA
K_2HPO_4	Kemika, Hrvaška
kanamicin	Sigma-Aldrich, ZDA
kazein hidrolizat	BD, ZDA
KCl	Sigma-Aldrich, ZDA
KH_2PO_4	Merck, ZDA
kloroform	Kemika, Hrvaška
kvasni ekstrakt	Biolife, Italija
LB agar	Sigma-Aldrich, ZDA
LB broth	Sigma-Aldrich, ZDA
levcin	Merck, ZDA
metionin	Sigma-Aldrich, ZDA
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich, ZDA
$MgSO_4 \times 7H_2O$	Merck, ZDA
$MnCl_2$	Sigma-Aldrich, ZDA
NaCl	Merck, ZDA
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	Merck, ZDA

se nadaljuje...

... nadaljevanje

Preglednica 1: Reagenti uporabljeni pri diplomskem delu.

Reagent	Proizvajalec
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Kemika, Hrvaška
nanašalni pufer 6 X Loading Dye	Fermentas, Kanada
NH ₄ Cl	Merck, ZDA
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, ZDA
ONPG	Sigma-Aldrich, ZDA
SDS	Sigma-Aldrich, ZDA
serin	Sigma-Aldrich, ZDA
TBAB	BD, ZDA
tetraciklin	Sigma-Aldrich, ZDA
TFA	Sigma-Aldrich, ZDA
toluen	Sigma-Aldrich, ZDA
Tris base	Merck, ZDA

3.1.2 Encimi

Preglednica 2: Encimi uporabljeni pri diplomskem delu.

Encim	Proizvajalec
DNA polimeraza	Fermentas, Kanada
DNaza I	QIAGEN, Nemčija
lizocim	Sigma-Aldrich, ZDA
proteinaza K	Sigma-Aldrich, ZDA
reverzna transkriptaza	Promega, ZDA
RNaza A	QIAGEN, Nemčija

3.1.3 Material za enkratno uporabo

Preglednica 3: Material za enkratno uporabo uporabljen pri diplomskem delu.

Material za enkratno uporabo	Proizvajalec
centrifugirke	Isolab, Nemčija
falkonke	Isolab, Nemčija
filtri (velikost por - 0,2 µm)	Sigma-Aldrich, ZDA
mikrocentrifugirke	Sigma-Aldrich, ZDA
mikrotiterske plošče	Brand, Nemčija
petrijevke	Golias Labortechnika, Slovenija
pipetni nastavki	Sarstedt, Nemčija
rokavice	Kimberly-Clark, ZDA
siringe	BD, ZDA

3.1.4 Aparature

Preglednica 4: Aparature uporabljene pri diplomskem delu.

Aparature	Proizvajalec
aparat za qPCR v realnem času (ABI 7900)	Applied Biosystems, ZDA
aparat za PCR (Biometra T Professional)	Novo Analitica, Slovenija
avtoklav (A-21)	Kambič, Slovenija
centrifuga (Centrifuge 5424; Centric 150; Sigma 3K30)	Eppendorf, Nemčija; Tehnica, Slovenija; DJB Labcare, Velika Britanija
črpalka (10 mL HPLC Pump K-501)	Knauer, Nemčija
detektor 1 (Smartline RI Detector 2300)	Knauer, Nemčija
detektor 2 (Spectro-Photometer K-2501)	Knauer, Nemčija
digestorij (W90)	Waldner, Nemčija
eksikator	Nalgene, ZDA
elektroforezna naprava (Standard Power Pack P25; Bio-Rad Mini-Sub Cell GT Systems)	Biometra, Nemčija; Novo Analitica, Slovenija
fotometer (MA 9510)	Iskra, Slovenija
injektor	Knauer, Nemčija
IR termometer (42529)	Extech Instrument, ZDA
kromatografska kolona (5 µm Nucleodur C18 Gravity)	Macherey-Nagel, Nemčija
laminarij (PCR Cabinet; Laminar Flow Cabinet)	ESCO, ZDA
magnetni mešalnik (Rotamix 550 MMH)	Tehnica, Slovenija
mešalna komora (Dynamic Mixing Chamber)	Knauer, Nemčija
NanoDrop (1000) spektrofotometer	Thermo Scientific, ZDA
pH meter (inoLab)	WTW, Nemčija
stresalna kopel (SW 22)	Julabo, Nemčija
stresalnik (Vibromix 40; V. EV 403; V. EVT 403)	Tehnica, Slovenija
stresalnik za mikrocentrifugirke (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, ZDA
stresalnik za mikrotiterske plošče (Vibromix 31)	Tehnica, Slovenija
tehtnica (Mettler PM4600 DeltaRange Balance)	Lab Extreme, ZDA
termoblok (Stuart Block Heater SBH130DC)	Bibby Scientific, ZDA
UV/VIS spektrofotometer (Multiscan Spectrum Microplate Reader)	Thermo Scientific, ZDA
vorteksno mešalo (MS 3 digital)	IKA, Nemčija

3.1.5 Kompleti

Preglednica 5: Kompleti uporabljeni pri diplomskem delu.

Komplet	Proizvajalec
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega, ZDA
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, ZDA
RNAprotect Bacteria Reagent	QIAGEN, Nemčija
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Nemčija
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Nemčija
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems, ZDA

3.1.6 Oligonukleotidni začetniki

Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni pri kvantitativnem PCR v realnem času.

	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
F128 <i>comQ</i> *	GTG CTG CAT TTA ACG ACT CCG AGC
R128 <i>comQ</i>	AAC AAG GCT TGG CGC GGG AAT
F98 <i>comX</i>	TCA CCC CAT TGA CGG GTT ATT GGA
R98 <i>comX</i>	GCC TGC CTT ATA GGT TTT GAT GTG C
F68 <i>rpoB</i>	CGC CGT TTA CGT TCT GTA GGC
R68 <i>rpoB</i>	CGC TCC ATA CGG CTT AAA CCG
F142 <i>lacZ</i>	GGA TCT GCC ATT GTC AGA CAT G
R142 <i>lacZ</i>	CTG TTG ACT GTA GCG GCT GAT G

*F-forward ali smerni oligonukleotidni začetnik; R-reverse ali protismerni oligonukleotidni začetnik; 128-dolžina produkta pomnoževanja; *comQ*-gen, za njegovo pomnoževanje sta bila skonstruirana oligonukleotidna začetnika.

3.1.7 Sevi

Preglednica 7: Sevi uporabljeni pri diplomskem delu.

<i>Bacillus subtilis</i> BD2833 (iz <i>B. subtilis</i> 168)	<i>his leu met srfA-lacZ (tet)</i>
<i>Bacillus subtilis</i> BD2876 (iz <i>B. subtilis</i> 168)	<i>his leu met srfA-lacZ (tet) comQ::Km</i>
<i>Escherichia coli</i> ED367 (iz <i>B. subtilis</i> 168)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pET22 (b)

3.1.8 Priprava gojišč in raztopin

50 % glukoza

V 250 mL čaši smo zatehtali 50 g glukoze in nato na tehtnici dodali dH₂O do 100 g. Glukozo smo na magnetnem mešalu še dodatno segrevali, da se je prej raztopila.

2 % kazein hidrolizat

V 100 mL dH₂O smo dodali 2 g kazein hidrolizata.

10 % kvasni ekstrakt

V 100 mL dH₂O smo dodali 10 g kvasnega ekstrakta.

Histidin

V 100 mL dH₂O smo dodali 1 g histidina.

Levcin

V 100 mL dH₂O smo dodali 1 g levcina.

Metionin

V 100 mL dH₂O smo dodali 1 g metionina.

MgCl₂ (1M)

V 100 mL dH₂O smo dodali 9,51 g MgCl₂.

1 x SS raztopina

V 1000 mL dH₂O smo v tem vrstnem redu dodali in počakali, da se posamezen reagent raztopi:

-6 g KH₂PO₄

-14 g K₂HPO₄

-2 g (NH₄)₂SO₄

-1 g C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O

-0,2 g MgSO₄ x 7H₂O

CM tekoče gojišče

V 400 mL 1 x SS raztopine smo sterilno dodali:

- 4 mL 50 % glukoze
- 4 mL 2 % kazein hidrolizata
- 4 mL 10 % kvasnega ekstrakta
- 2 mL histidina
- 2 mL levcina
- 2 mL metionina
- 1 mL MgCl_2 (1M)

Uporabili smo sterilne založne raztopine, ki smo jih pred uporabo avtoklavirali. Kvasni ekstrakt, kazein hidrolizat in aminokisline smo avtoklavirali pri 110 °C.

TBAB gojišče s Tc

V 200 mL dH_2O smo dodali 6 g TBAB. Po avtoklaviranju smo gojišče nekoliko ohladili v vodni kopeli in nato dodali 50 μL 0,1 M MnCl_2 in 0,2 mL Tc (založna raztopina antibiotika s koncentracijo 20 mg/mL). Gojišče smo v laminariju razlili v petrijevke, pustili, da se plošče posušijo in jih nato hranili na 4 °C v temi.

TBAB gojišče s Tc in Km

V 200 mL dH_2O smo dodali 6 g TBAB. Po avtoklaviranju smo gojišče nekoliko ohladili v vodni kopeli in nato dodali 50 μL 0,1 M MnCl_2 , 0,2 mL Tc (založna raztopina antibiotika s koncentracijo 20 mg/mL) in 0,1 mL Km (založna raztopina antibiotika s koncentracijo 10 mg/mL). Gojišče smo v laminariju razlili v petrijevke, pustili, da se plošče posušijo in jih nato hranili na 4 °C v temi.

MnCl₂ (0,1M)

V 100 mL dH₂O smo dodali 1,62 g MnCl₂.

LB tekoče gojišče z Amp

V 250 mL steklenico smo nalili 100 mL dH₂O in dodali 2 g LB broth (20g/1L dH₂O) ter dali avtoklavirat (121 °C, 15 minut). Ko se je gojišče nekoliko ohladilo v vodni kopeli, smo dodali 200 µL Amp (založna raztopina je 50 mg/mL, v gojišču mora biti koncentracija 100 µg/mL). Gojišče smo hranili na 4 °C v temi.

LB plošče z Amp

V 250 mL steklenico smo nalili 150 mL dH₂O in dodali 5,25 g LB agar (35g/1L dH₂O) ter dali avtoklavirat in sicer za 6 minut dlje kot običajno (121 °C, 21 minut). Ko se je gojišče nekoliko ohladilo v vodni kopeli, smo dodali 300 µL Amp (založna raztopina je 50 mg/mL, v gojišču mora biti koncentracija 100 µg/mL). Gojišče smo v laminariju razlili v male petrijevke, pustili, da se plošče posušijo in jih nato hranili na 4 °C v temi.

M9 soli

V 80 mL dH₂O smo dodali in z mešanjem na magnetnem mešalu raztopili:

-6,4 g Na₂HPO₄ x 7H₂O

-1,5 g KH₂PO₄

-0,25 g NaCl

-0,5 g NH₄Cl

Dolili smo dH₂O do 100 mL in sterilizirali z avtoklaviranjem.

M9 minimalno gojišče

V 70 mL sterilne dH₂O smo dodali:

-20 mL M9 soli

-200 µL 1M MgSO₄

-800 µL 50 % glukoze

-10 µL 1M CaCl₂

-1 mL mešanice Leu, Phe, Ser (40 µg/mL - končna koncentracija v gojišču)

-1 mL Glutaminske kisline (0,4 mg/mL - končna koncentracija v gojišču)

-400 µL His (40 µg/mL - končna koncentracija v gojišču)

-400 µL Met (40 µg/mL - končna koncentracija v gojišču)

-200 µL Amp (založna raztopina s koncentracijo 50 mg/mL)

Dolili smo še sterilno dH₂O do 100 mL.

TE pufer

V 50 mL dH₂O smo dodali 0,0186 g 1 mM EDTA in 0,1817 g 30 mM Tris base. S HCl smo pH uravnali na 8,0 in pufer dali avtoklavirat.

50 x TAE pufer

V vrč smo zatehtali 242 g Tris base in dolili dH₂O do 800 mL ter mešali na magnetnem mešalu dokler se Tris base ni raztopila. Nato smo v digestoriju dodali 57,1 mL glacialne očetne kisline. Na koncu smo še dodali 18,6 g EDTA in dolili dH₂O do 1000 mL.

IPTG (100 mM)

V sterilno 15 mL falkonko smo zatehtali 0,1192 g IPTG in dolili dH₂O do 5 mL. 100 mM IPTG smo sterilno prefiltrirali v novo sterilno 15 mL falkonko in razdelili v mikrocentrifugirke.

Z-pufer

V vrč smo zatehtali:

-10,679 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

-6,240 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

-0,745 g KCl

-0,246 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Nato smo dolili dH_2O do 1000 mL in pufer sterilno prefiltrirali v sterilne steklenice.

Acetonitril (ACN) z 0,1 % TFA

V čisto 500 mL steklenico smo v steklenem valju odmerili 396 mL ACN. V čisto čašo smo napipetirali 3,74 mL dH_2O in dodali 260 μL TFA. Količino dodanega TFA smo preverili na tehtnici. Znašala je 0,4056 g, zaradi česar smo dodali še 5,6 mL dH_2O , da smo potem v steklenici, ko smo vanjo zlili vsebino čaše, imeli 0,1 % TFA. Koncentracija ACN je zaradi dodane dH_2O bila 98 %.

0,1 % TFA

V čisto 500 mL steklenico smo odmerili 395 mL dH_2O in nato še v čisto čašo napipetirali 4,74 mL dH_2O . K dH_2O v čaši smo dodali 260 μL TFA in na tehtnici preverili, če je količina dodanega TFA znašala 0,4 g ($M_{\text{TFA}}=114,02$ g/mol). Če je teža presegala 0,4 g, smo dodali ustrezno količino dH_2O , da smo potem v steklenici, ko smo vanjo zlili vsebino čaše, dobili 0,1 % TFA.

10 % TFA

V čisto 200 mL steklenico smo odmerili 93,5 mL dH_2O in dodali 6,5 mL TFA.

1 % Amonijev hidroksid (NH_4OH)

K 71,5 mL dH_2O smo dodali 28,5 mL NH_4OH ($M_{\text{NH}_4\text{OH}}=35,04$ g/mol).

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje seva *B. subtilis* BD2833 (producent ComX) pri treh temperaturah

V laminariju smo sterilno pripravili 800 mL CM tekočega gojišča. V sterilno 100 mL erlenmajerico z rilčkom smo s sterilnim valjem odmerili 25 mL CM tekočega gojišča in iz plošče nacepili producentski sev *B. subtilis* BD2833 (Sev je bil pripravljen s transformacijo seva, ki vsebuje Tn917 *lacZ* OK120 insercijo v *srfa* (Tortosa in sod., 2001).) za prekonočno kulturo, ki smo jo v topli sobi pri 37 °C in pri 200 obratih na minuto stresali čez noč. Naslednji dan (po 13 urah in 30 minutah stresanja) smo s fotometrom izmerili OD₆₅₀ prekonočne kulture. V sterilnem valju smo ponovno odmerili po 25 mL CM tekočega gojišča v 10 (19 pri tretji ponovitvi) sterilnih 100 mL erlenmajeric z rilčkom in v 9 nacepili 2 % (500 µL) inokulum prekonočne kulture seva BD2833. Tri erlenmajerice z nacepljenim gojiščem in eno z nenacepljenim gojiščem za negativno kontrolo smo stresali pri 200 obratih na minuto pri (37 ± 1) °C, (51,3 ± 1) °C in pri sobni temperaturi (24 ± 1) °C. S fotometrom smo spremljali rast bakterij in sproti risali rastno krivuljo. Za izolacijo RNA smo eno uro po prehodu v stacionarno fazo rasti odvzeli po 1 mL vzorca iz devetih kultur in negativne kontrole (pri tretji ponovitvi smo najprej združili po dve kulturi gojeni na enaki temperaturi, da bi zmanjšali razlike med biološkimi ponovitvami in nato odvzeli 1 mL) v kivete ter izmerili OD₆₅₀. Nato smo posamezno kulturo redčili tako, da je OD₆₅₀ znašal 0,5 a.e..

3.2.2 Stabilizacija RNA z reagentom RNAProtect Bacteria Reagent

V 10 označenih sterilnih 2 mL mikrocentrifugirk smo odpipetirali po 1 mL reagenta RNAProtect Bacteria Reagent in dodali po 500 µL kultur (OD₆₅₀ = 0,5 a.e.) seva BD2833 gojenega pri treh različnih temperaturah. 5 sekund smo mešali na vorteksnem mešalu in nato inkubirali na sobni temperaturi 5 minut. Po inkubaciji smo centrifugirali pri 5000 x g 10 minut, odlili supernatant in pelete shranili preko noči pri -20 °C (QIAGEN, 2005).

3.2.3 Izolacija celokupne RNA iz bakterij s kompletom RNeasy Mini Kit

Pelete smo odtalili na sobni temperaturi (15-25 °C). V 10 označenih sterilnih 2 mL mikrocentrifugirkah smo pripravili po 10 µL QIAGEN proteinaze K (s SIGMA H₂O pripravljeno koncentracijo 20 mg/mL) in 200 µL pufra TE z lizocimom (k 2,4 mL pufra TE smo dodali 36 mg lizocima za koncentracijo 15 mg/mL). Te mešanice smo dodali k peletom in jih s pipetiranjem gor in dol previdno resuspendirali. Nato smo na vorteksnem mešalu 10 sekund mešali in inkubirali na sobni temperaturi (15-25 °C) na stresalniku za mikrocentrifugirke 15 minut (pri prvi ponovitvi). Pri drugi ponovitvi smo čas inkubacije podaljšali na 1 uro, pri tretji ponovitvi pa na 3 ure, da bi povečali donos RNA. Čas inkubacije lahko namreč podaljšamo brez kakršnih koli škodljivih učinkov, ker je RNA stabilizirana. Po inkubaciji smo dodali 700 µL pufra RLT (k 8,5 mL pufra RLT smo dodali 85 µL β-merkaptotetanol, ker ga mora biti 10 µL na 1 mL pufra RLT) in intenzivno mešali na vorteksnem mešalu. Ker so bili še vidni trdni delčki, smo centrifugirali 2 minuti na najvišji hitrosti, da je nastal pelet. V naslednjem koraku smo uporabili supernatant in dodali 500 µL 96 % etanola ter zmešali s pipetiranjem. 700 µL lizata smo nanegli na RNeasy Mini kolono vstavljeno v 2 mL zbirno mikrocentrifugirko ter centrifugirali 15 sekund pri 8000 x g. Kar je steklo skozi kolono smo zavrgli in ponovno na kolono nanegli preostalih 700 µL lizata, centrifugirali in zavrgli, kar je steklo v mikrocentrifugirko (QIAGEN, 2001, 2005).

3.2.4 Razgradnja DNA s kompletom RNase-Free DNase Set

Odpipetirali smo 350 µL pufra RW1 na RNeasy Mini kolono in centrifugirali 15 sekund pri 8000 x g ter zavrgli kar je steklo skozi kolono v mikrocentrifugirko. 10 µL DNaza I založne raztopine (pripravljene tako, da smo v plinotesno stekleničko z DNazo I v prahu dodali 550 µL SIGMA vode) smo dodali k 70 µL pufra RDD in na kratko pomešali na vorteksnem mešalu ter na kratko centrifugirali, da smo zbrali tekočino, ki se je nabrala na steni mikrocentrifugirke. Nato smo DNaza I inkubacijsko mešanico (80 µL) odpipetirali na RNeasy Mini kolono in pustili na sobni temperaturi (20-30 °C) 15 minut. Ponovno smo na kolono odpipetirali 350 µL pufra RW1, počakali 5 minut in potem centrifugirali 15 sekund pri 8000 x g. Kar je steklo skozi kolono smo zavrgli (QIAGEN, 2005).

3.2.5 Nadaljevanje izolacije celokupne RNA iz bakterij s kompletom RNeasy Mini Kit

RNeasy Mini kolono smo prenesli v novo 2 mL zbirno mikrocentrifugirko. Dvakrat smo na kolono nanesti 500 μ L pufru RPE (pred uporabo smo k pufru RPE dodali 4 volumne 96 % etanola) in prvič centrifugirali 15 sekund in drugič 2 minute pri 8000 x g ter zavrgli kar je steklo skozi kolono. Po centrifugiranju smo kolono previdno odstranili iz mikrocentrifugirke, saj smo morali paziti, da ni prišlo do stika kolone s tekočino v mikrocentrifugirki in s tem do neželenega prenosa etanola na kolono. Kolono smo prenesli v novo 1,5 mL zbirno mikrocentrifugirko in direktno na membrano kolone nanesti 50 μ L RNase-free water (vode brez vsebnosti RNaz). Nato smo centrifugirali 1 minuto pri 8000 x g in s tem eluirali RNA (QIAGEN, 2001, 2005).

3.2.6 Merjenje koncentracije in redčenje celokupne RNA

Koncentracijo celokupne RNA smo določili spektrofotometrično (NanoDrop). Najprej smo v mikrocentrifugirke odpipetirali trikrat po 2 μ L posamezne izolirane celokupne RNA. Pred vsakim odvzemom 2 μ L vzorca smo na kratko pomešali na vorteksnem mešalu. Koncentracijo posamezne izolirane celokupne RNA smo potem izmerili na NanoDropu v treh 1,5 μ L kapljicah. Za umerjanje smo uporabili SIGMA vodo. Merilno površino NanoDropa smo pred uporabo in med nanašanjem vzorcev čistili z dH₂O. Vse vzorce z izolirano RNA smo nato redčili z ustrežno količino SIGMA vode, da je bila potem koncentracija celokupne RNA v vseh vzorcih enaka. Koncentracijo smo preverili spektrofotometrično (NanoDrop).

3.2.7 Reverzna transkripcija RNA v cDNA

Pripravili smo reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo (Preglednica 8), tako da smo najprej v sterilne označene 0,5 mL mikrocentrifugirke v stojalu na ledu odpipetirali vse neencimske komponente. Nato smo na kratko pomešali na vorteksnem mešalu, dodali še inhibitor RNaz, reverzno transkriptazo in tarčno RNA ter še enkrat na kratko pomešali na vorteksnem mešalu (Applied Biosystems, 2006).

Preglednica 8: Sestava 40 μL reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo RNA v cDNA.

Komponenta	Volumen [μL]	Končna koncentracija
10 X RT pufer	4,0	1 X
MgCl_2 (25 mM)	8,8	5,5 mM
Mešanica dNTP-jev (2,5 mM)	8,0	500 μM
Naključni oligonukleotidni začetniki (50 μM)	2	2,5 μM
Inhibitor RNaz (20 U/L)	0,8	0,4 U/L
Reverzna transkriptaza (50 U/ μL)	1	1,25 U/ μL
Skupaj	24,6	
Tarčna RNA	15,4	

Po 10 μL posamezne reakcijske mešanice smo odpipetirali v 3 sterilne označene 0,1 mL mikrocentrifugirke v stojalu s hlajenjem. Na kratko smo še centrifugirali, da smo zbrali tekočino na stenah mikrocentrifugirk. Nato smo vse mikrocentrifugirke prenesli v termoblok in zagnali predhodno napisan program za reverzno transkripcijo (Preglednica 9).

Preglednica 9: Program za termoblok za reverzno transkripcijo.

	Inkubacija	Reverzna transkripcija	Inaktivacija reverzne transkriptaze
Trajanje	10 min	30 min	5 min
Temperatura	25 $^{\circ}\text{C}$	48 $^{\circ}\text{C}$	95 $^{\circ}\text{C}$

cDNA smo do nadaljne uporabe shranili na -70 $^{\circ}\text{C}$.

3.2.8 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov

Za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili internetno orodje (Primer-BLAST (NCBI, 2012)). Najprej smo v program vnesli parametre, ki ustrezajo lastnostim, ki jih morajo imeti oligonukleotidni začetniki primerni za kvantitativni PCR v realnem času (qPCR). Ustrezna dolžina produktov pomnoževanja je med 80 in 150 bp, ustrezna dolžina oligonukleotidnih začetnikov med 18 in 30 bp (optimalna je 20 bp), vsebnost GC parov oligonukleotidnih začetnikov in produktov pomnoževanja med 30 in 80 % (optimalna med 40 in 60 %). Primerna temperatura taljenja (T_m) je med 55 in 60 $^{\circ}\text{C}$, razlika v T_m med smernim in protismernim oligonukleotidnim začetnikom ne sme biti višja od 4 $^{\circ}\text{C}$.

3.2.9 Preizkus ustreznosti in učinkovitosti oligonukleotidnih začetnikov za gene *comX*, *comQ*, *rpoB* in *lacZ* s PCR-jem in agarozno gelsko elektroforezo

Za gena *comX* in *comQ* smo oblikovali in preizkusili tri pare oligonukleotidnih začetnikov, za gen *rpoB* en par in za gen *lacZ* dva para. Za vsak gen smo potem izbrali najbolj učinkovit par oligonukleotidnih začetnikov (smerni in protismerni oligonukleotidni začetnik). Pripravili smo založne raztopine oligonukleotidnih začetnikov (100 μM koncentracije), pri eksperimentalnem delu pa smo uporabili 10 μM koncentracije oligonukleotidnih začetnikov. PCR reakcije smo izvajali v volumnu 25 μL po protokolu podanem v preglednicah (Preglednica 10, Preglednica 11, Preglednica 12).

Preglednica 10: Količine posameznih reagentov za eno 25 μL PCR reakcijo.

Reagent	Volumen [μL]
SIGMA H_2O	15.3
5 X pufer	5
MgCl_2 (25 mM)	2
Mešanica dNTP-jev (10 mM)	0.5
Smerni oligonukleotidni začetnik (10 μM)	0.5
Protismerni oligonukleotidni začetnik (10 μM)	0.5
DNA polimeraza (5 U/ μL)	0.2
DNA naravnega izolata seva 168 <i>B. subtilis</i> (10 ng/ μL) ali SIGMA voda za negativno kontrolo	1

Preglednica 11: Program za termoblok za izvedbo PCR reakcije.

35 krat					
		Denaturacija	Naleganje	Podaljševanje	
Trajanje	2 min	30 s	30 s	30 s	5 min
Temperatura	95 °C	95 °C	Temperaturni gradient	72 °C	72 °C

Preglednica 12: Temperaturni gradient temperatur naleganja oligonukleotidnih začetnikov uporabljen za PCR reakcijo.

Položaj mikrocentrifugirke v PCR aparatu	4	5	6	7	8	9	10
Temperatura naleganja oligonukleotidnih začetnikov [°C]	54,8	55,9	56,9	58,1	59,1	60,2	61,1

Uspešnost PCR reakcij smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (3 % agaroz). V elektroforezno banjico smo nalili 1 X TAE pufer (4 °C) in gelček prenesli v banjico. Na parafilmu smo zmešali po 1 µL nanašalnega pufra (Loading Dye 6 X) z 10 µL PCR produkta oziroma 5 µL DNA markerja (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder Mix) in vse vzorce nanесли na gelček. Električno napetost smo nastavili na 75 V (električni tok-49 mA) in elektroforezo pustili teči, dokler nismo presodili, da sta se barvili iz nanašalnega pufra, ki označujeta DNA velikosti 300 bp in 4000 bp, dovolj ločili. Nato smo gelček 10 minut barvali v posodici z razredčenim etidijevim bromidom (dodane je 50 µL/1L (TAE pufra) založne raztopine EtBr s koncentracijo 10 mg/mL) in ga še za 10 minut prenesli v dH₂O. Na koncu smo gelček vizualizirali pod UV lučjo in se, glede na velikost PCR produkta in intenziteto fluorescence, odločili pri vsakem genu za najustreznejši in najučinkovitejši par začetnih oligonukleotidov.

3.2.10 Izolacija kromosomske DNA iz seva *B. subtilis* BD2833

Izolirali smo kromosomsko DNA iz seva *B. subtilis* BD2833, da bi jo uporabili kot pozitivno kontrolo pri qPCR. Najprej smo odpipetirali 5 mL LB tekočega gojišča v sterilno označeno epruveto in nacepili sev *B. subtilis* BD2833 za prekonočno kulturo, ki smo jo v topli sobi pri 28 °C in pri 200 obratih na minuto stresali čez noč. Prekonočno kulturo smo 100 krat razredčili s svežim LB tekočim gojiščem (50 µL prekonočne kulture smo redčili z 4950 µL svežega LB tekočega gojišča) in dodali še 100 µL 50 % glukoze do končne koncentracije 1 % (glukoza namreč prepreči sporulacijo bakterij). Bakterije smo pri 200 obratih na minuto in pri 37 °C stresali do pozne eksponentne faze rasti. Nato smo 1,5 mL kulture prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 16000 x g. Odstranili smo supernatant in ponovno centrifugirali 1,5 mL kulture iz pozne eksponentne faze rasti (skupni volumen iz katerega smo izolirali DNA je tako znašal 3 mL). Po centrifugiranju smo supernatant previdno odstranili s pipeto in celice resuspendirali v 300 µL TES pufra (1/10 volumna iz katerega smo izolirali DNA). V naslednjem koraku smo dodali 6 µL lizocima s koncentracijo 50 mg/mL do končne koncentracije 1 mg/mL in 2 µL ribonukleaze (RNase A) s koncentracijo 10 mg/mL do končne koncentracije 60 µg/mL ter inkubirali 30 minut pri 37 °C. Nato smo dodali 33 µL 10 % raztopine SDS do končne koncentracije 1 % in 2 µL proteinaze K s koncentracijo 20 mg/mL do končne koncentracije

120 µg/mL ter pri 50 °C inkubirali preko noči. Naslednji dan smo v digestoriju dodali 200 µL fenola, rahlo stresli suspenzijo in centrifugirali 10 minut pri 16000 x g. Zgornjo fazo, ki vsebuje pufer TES in kromosomsko DNA, smo z odrezanim pipetnim nastavkom prenesli v novo mikrocentrifugirko in ji dodali 200 µL mešanice kloroforma in izoamilnega alkohola v razmerju 24:1. Nato smo centrifugirali 10 minut pri 16000 x g. Ponovno smo zgornjo fazo prenesli v novo mikrocentrifugirko in ji dodali 2,5 volumna hladnega 96 % etanola (shranjen pri -20 °C). Z obračanjem mikrocentrifugirke smo pospešili obarjanje DNA, na kratko centrifugirali pri 16000 x g, odstranili supernatant in dodali 500 µL hladnega 70 % etanola ter na ledu 15 minut inkubirali. Dvakrat smo še na kratko centrifugirali pri 16000 x g, da smo odstranili ves supernatant. Po sušenju ob ognju smo DNA raztopili v 100 µL dH₂O in jo shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.11 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Najprej smo vsebino treh mikrocentrifugirk, v katerih je bila cDNA, ki smo jo v treh ponovitvah sintetizirali iz posamezne izolirane RNA, združili v eno mikrocentrifugirko. Iz cDNA in pozitivne kontrole smo pripravili 10-kratno, 50-kratno, 100-kratno in 500-kratno redčitev. Redčili smo na način kot je prikazan v Preglednici 13. Ker nas je zanimalo izražanje 4 različnih genov (*comQ*, *comX*, *rpoB* in *srfA*, ki je v fuziji z *lacZ*), smo vse redčitve pripravili v 4 ponovitvah. V laminariju v katerega ne vnašamo DNA smo najprej pripravili 4 različne reakcijske mešanice za qPCR. Sestava posamezne reakcijske mešanice za eno reakcijo je prikazana v Preglednici 14. Za reakcijske mešanice smo potrebovali Power SYBR Green PCR Master Mix in 4 različne pare (smernih (forward) in protismernih (reverse)) oligonukleotidnih začetnikov za 4 različne gene (*comQ*, *comX*, *rpoB* in *lacZ*). V luknjice mikrotiterske plošče (s 384 luknjicami) smo odpipetirali po 11,6 µL posamezne reakcijske mešanice. V drugem laminariju smo potem dodali 8,4 µL cDNA oziroma pozitivne kontrole (kromosomska DNA iz BD2833) oziroma negativne kontrole (dH₂O) (Applied Biosystems, 2006). Na ploščo smo še pritrdili prozorno folijo in centrifugirali 2 minuti pri 1000 x g. Ploščo smo po centrifugiranju zavili v aluminijasto folijo in jo odnesli do aparata za kvantitativni PCR v realnem času (Nacionalni inštitut za biologijo). Na računalniku namenjenemu upravljanju z aparatom za kvantitativni PCR v realnem času smo zagnali program SDS 2.3. Protokol, ki smo ga uporabili za

pomnoževanje DNA s kvantitativnim PCR v realnem času je prikazan v Prilogi L. Dodana je disociacijska stopnja (Stage 4). S to dodatno analizo smo želeli na koncu preveriti, če je nastal enak tip produktov pomnoževanja pri posameznem preučevanem genu. Enak tip produkta namreč razpade pri enaki temperaturi.

Preglednica 13: Redčenje cDNA s SIGMA H₂O.

30 µL 1x cDNA			
<i>comQ</i>	<i>comX</i>	<i>rpoB</i>	<i>lacZ</i>
2 µL 1x cDNA + 18 µL H ₂ O	2 µL 1x cDNA + 18 µL H ₂ O	2 µL 1x cDNA + 18 µL H ₂ O	2 µL 1x cDNA + 18 µL H ₂ O
8 µL 10x cDNA + 32 µL H ₂ O	8 µL 10x cDNA + 32 µL H ₂ O	8 µL 10x cDNA + 32 µL H ₂ O	8 µL 10x cDNA + 32 µL H ₂ O
20 µL 50x cDNA + 20 µL H ₂ O	20 µL 50x cDNA + 20 µL H ₂ O	20 µL 50x cDNA + 20 µL H ₂ O	20 µL 50x cDNA + 20 µL H ₂ O
8 µL 100x cDNA + 32 µL H ₂ O	8 µL 100x cDNA + 32 µL H ₂ O	8 µL 100x cDNA + 32 µL H ₂ O	8 µL 100x cDNA + 32 µL H ₂ O

Preglednica 14: Sestava reakcijskih mešanic za qPCR.

<i>comQ</i>	<i>comX</i>	<i>rpoB</i>	<i>lacZ</i>
10 µL Master Mix + 0,8 µL F128 + 0,8 µL R128	10 µL Master Mix + 0,8 µL F98 + 0,8 µL R98	10 µL Master Mix + 0,8 µL F68 + 0,8 µL R68	10 µL Master Mix + 0,8 µL F142 + 0,8 µL R142

3.2.12 Analiza rezultatov kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR)

Rezultate qPCR smo analizirali s pomočjo matematičnega modela:

$$R_n = Bckg + R_0 \cdot (1 + ER)^{(n-1)} \quad \dots (1)$$

kjer je R_n koncentracija pomnožene cDNA (izražena kot emisija fluorescence reporterskega barvila SYBR Green [RFU] normalizirana na emisijo fluorescence pasivnega referenčnega barvila ROX [RFU]), $Bckg$ je fluorescenca ozadja, R_0 je začetna koncentracija mRNA (izražena kot emisija fluorescence reporterskega barvila SYBR Green [RFU] normalizirana na emisijo fluorescence pasivnega referenčnega barvila ROX [RFU]), ER je učinkovitost podvajanja in n število ciklov podvojevanja cDNA. qPCR eksperimentalne podatke smo uredili z uporabo programa Microsoft Excel, kjer smo uporabili lastno avtomatizirano preglednico (makro). Ker so bile iz vsake cDNA narejene štiri redčitve, smo morali podatke qPCR (v clipped obliki prenesene iz programa SDS 2.3, predstavljajo emisijo fluorescence reporterskega barvila SYBR Green [RFU] normalizirano na emisijo fluorescence pasivnega referenčnega barvila ROX [RFU]) normalizirati na redčitev. Nato smo pri teh normaliziranih podatkih izbrisali tiste, ki so bili izven eksponentnega območja krivulj pomnoževanja cDNA in torej niso ustrezali modelu. Podatke za izbris smo določili tako, da smo od neobdelanih rezultatov, ki še niso bili normalizirani, najprej odšteli ozadje, nato narisali logaritemski graf in določili mejno vrednost do katere je PCR reakcija tekla zagotovo eksponentno ($=0,2$) in nad katero rezultatov nismo upoštevali. Te obdelane podatke smo nato prenesli v program OriginPro 8, kjer smo jih prilegali modelu iz enačbe 1. V programu smo si pripravili tabele s podatki. Na x-osi so bile zaporedne številke meritev fluorescence iz qPCR. Na y-osi pa so bile pripadajoče vrednosti in sicer so bili v eni tabeli rezultati qPCR (posameznega gena) 3 bioloških ponovitev iz enake temperature, vsaka v štirih redčitvah. Izbrali smo zadnjih devet vrednosti podvojevalnih krivulj cDNA enakih redčitev treh bioloških ponovitev, ki jih je program prilegal in na ta način izračunal začetne koncentracije mRNA za vsak vzorec. Postopek smo ponovili pri naslednji trojki redčitev. Nastavitve, ki jih je program potreboval za ta izračun so prikazane v Prilogah N, O, P, Q, R, S, T. Izbrali smo nelinearno poravnavo krivulj. Izbrane podatke smo poravnali na način imenovan Global Fit. Pri parametrih smo še nastavili učinkovitost podvajanja (ER) kot skupno. Mejne vrednosti pa

smo določili za ozadje (B) 500, za začetno koncentracijo (R0) 0,01 in za ER 1,05. Na koncu smo izbrali ukaz Fit in program je poravnal izbrane krivulje. O uspešnosti poravnave smo se prepričali v poročilu, ki ga je program izpisal (Prilogi U in V). Izračunal je tudi statistične vrednosti, na primer χ^2 in R^2 , ki podajata kvaliteto prileganja. V vseh primerih smo dobili $R^2 > 0.997$ in $\chi^2 < 1$. Za končni rezultat smo potrebovali povprečne vrednosti, ki smo jih izračunali v programu Microsoft Excel. Najprej smo izračunali povprečno začetno koncentracijo mRNA štirih redčitev iz iste biološke ponovitve. Dobljeno povprečno začetno koncentracijo mRNA (brez enote) iz vsake biološke ponovitve smo normalizirali na koncentracijo celokupne RNA (ng/ μ L) vsake biološke ponovitve. Nato smo iz treh povprečnih začetnih koncentracij mRNA (tri biološke ponovitve) normaliziranih na koncentracije celokupnih RNA izračunali končno povprečno začetno koncentracijo mRNA za vsako temperaturo pri posamezni ponovitvi gojenja in pri posameznem preučevanju genu in zraven še standardni odklon in relativno napako. Iz teh končnih povprečnih začetnih koncentracij mRNA (normaliziranih na koncentracije celokupnih RNA) smo potem izračunali razmerja med temperaturami.

3.2.13 Pridobitev izrabljenega gojišča iz seva *E. coli* ED367

V sterilno 100 mL erlenmajerico z rilčkom smo s sterilnim valjem odmerili 25 mL LB tekočega gojišča z dodanim ampicilinom in iz plošče nacepili sev *Escherichia coli* ED367 (Sev je bil pripravljen tako, da so *comQ* in *comX* gene klonirali pod uravnavo T7 promotorja v vektor pET22 (b) in transformirali v sev *E. coli* BL21 (DE3), ki kodira T7 polimerazo pod uravnavo IPTG inducibilnega promotorja (Ansaldi in sod., 2002).) za prekonočno kulturo, ki smo jo pri 37 °C in pri 200 obratih na minuto stresali čez noč. Naslednji dan smo v dve sterilni 100 mL erlenmajerici z rilčkom s sterilnim valjem odmerili po 50 mL M9 minimalnega gojišča z dodanim ampicilinom. V obe smo nacepili 2 % (1 mL) inokulum prekonočne kulture in dali stresati pri 37 °C in pri 200 obratih na minuto. S fotometrom smo spremljali rast bakterij in ko je OD₆₅₀ dosegel 0,7 a.e., smo v eno erlenmajerico dodali 250 μ L 100 mM IPTG, ki inducira nastajanje signalnega peptida ComX. Drugo kulturo smo uporabili kot negativno kontrolo. Po štirih urah indukcije (stresanje pri 37 °C in pri 200 obratih na minuto) smo obe kulturi prelili v štiri sterilne centrifugirke, v centrifugi nasproti razporedili tisti s podobno težo in centrifugirali 5 minut

pri 8000 x g. Supernatant (izrabljena gojišča) smo sterilno prefiltrirali v sterilne označene falkonke. Izrabljena gojišča smo shranili v zamrzovalni skrinji pri -20 °C.

3.2.14 Pridobitev izrabljenih gojišč iz sevov *B. subtilis* BD2833 in BD2876

V laminariju smo sterilno pripravili 800 mL CM tekočega gojišča. S sterilnim valjem smo odmerili po 25 mL CM tekočega gojišča v dve sterilni 100 mL erlenmajerici z rilčkom. V eno erlenmajerico smo nacepili producerski sev *B. subtilis* BD2833, v drugo pa testerski sev *B. subtilis* BD2876 (enak kot BD2833, vendar z inaktiviranim *comQ* genom, kar mu onemogoča izdelavo aktivnega ComX (Tortosa in sod., 2001).). Po 13 urah in 30 minutah stresanja pri 200 obratih na minuto pri 37 °C smo prekonočnima kulturama s fotometrom izmerili OD₆₅₀. Nato smo s sterilnim valjem odmerili po 55 mL CM tekočega gojišča v 12 sterilnih označenih 250 mL erlenmajeric z rilčkom. V 6 erlenmajeric smo nacepili 2 % (1,1 mL) inokulum prekonočne kulture producenta, v drugih 6 erlenmajeric pa 2 % (1,1 mL) inokulum prekonočne kulture testerja. Dve kulturi s producentom in dve s testerjem smo dali stresati pri 200 obratih na minuto pri (37 ± 1) °C, (51,3 ± 1) °C in pri sobni temperaturi (24 ± 1) °C. S fotometrom smo spremljali rast bakterij in sproti risali rastno krivuljo. Eno uro po prehodu v stacionarno fazo rasti smo kulture prelili v 24 sterilnih centrifugirk, centrifugirali 5 minut pri 8000 x g in supernatant (izrabljena gojišča) sterilno prefiltrirali v 24 sterilnih označenih falkonk. Izrabljena gojišča smo shranili v zamrzovalni skrinji pri -20 °C.

3.2.15 Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (HPLC)

Tekočinsko kromatografijo (HPLC) in gradientni način eluiranja z dvema mobilnima fazama (0,1 % TFA in acetonitril z 0,1 % TFA) smo uporabili za ločevanje signalnega peptida ComX od ostalih sestavin izrabljenega gojišča. Vzorec (pH 2), smo nanegli na kromatografsko kolono segreto na 30 °C (NUCLEODUR C₁₈ Gravity). Vzorec smo pripravili tako, da smo k 5,12 mL izrabljenega gojišča seva *B. subtilis* BD2833 ali BD2876 dodali 0,88 mL 10 % TFA oziroma da smo k 9,5 mL izrabljenega gojišča seva *E. coli* ED367 dodali 1 mL 10 % TFA. Pred nanosom vzorca smo zanko veliko 5 mL in kolono sprali z 0,1 % TFA, iz zanke izpihali tekočino in nanegli 5 mL vzorca ter zagnali 100.80

minutni program (Priloga W). Od 47 do 58 minute (pri določitvi območja, v katerem se je eluiral ComX, smo upoštevali tudi, da vzorec rabi 9 minut, da v celoti prepotuje kolono in pride do detektorja (214 nm)) smo zbrali frakcije (1 mL), jih nevtralizirali s 50 μ L NH_4OH in nato 90 minut pustili v eksikatorju, da je izhlapel ACN.

3.2.16 β -galaktozidazni test v mikrotiterskih ploščah

S sterilnim valjem smo odmerili 25 mL CM tekočega gojišča v sterilno 100 mL erlenmajerico z rilčkom in nacepili s testerskim sevom *B. subtilis* BD2876 ter inkubirali preko noči pri 37 °C in 200 obratih na minuto. Naslednji dan smo precepili v 25 mL CM tekočega gojišča 500 μ L prekonočne kulture in stresali v topli sobi pri 37 °C in pri 200 obratih na minuto 6 ur. Iz te kulture smo pripravili 4% inokulum (k 11 mL CM tekočega gojišča v sterilni kadički smo dodali 440 μ L testerske kulture). Po 100 μ L 4% inokuluma smo z multikanalno pipeto odpipetirali v mikrotitersko ploščo in dodali po 100 μ L vzorca (npr. frakcije). Mikrotitersko ploščo smo pokrili s pokrovom (vmes smo dali štiri distančnike), zalepili s trakom in jo stehali. Platformo stresalnika za mikrotiterske plošče smo oblekli v 40 L vrečo (za avtoklaviranje), ki smo jo s ščipalkami pritrdili ob robe stresalnika. Na sredino platforme stresalnika smo v obliki križa položili omočene trakove brisače, ploščo pritrdili na stresalnik in dodatno pritrdili z gumijastimi trakovi. V vrečo smo zajeli čim več zraka in jo zgoraj zavezali. Mikrotitersko ploščo smo pri 28 °C in pri 1000 obratih na minuto stresali 16 ur. Naslednji dan smo si najprej pripravili raztopino ONPG v Z-pufri (k 10,5 mL Z-pufra smo dodali 42 mg ONPG) z mešanjem na magnetnem mešalu v čaši pokrili z alufolijo in ga nato do uporabe shranili v hladilniku. Mikrotitersko ploščo smo po 16 urah stresanja ponovno stehali (preverili smo količino izhlapele tekočine) in z UV/VIS fotometrom izmerili OD_{650} . Nato smo pri 4 °C in pri 1200 x g centrifugirali 20 minut in z multikanalno pipeto odstranili supernatant (180 μ L). V naslednjem koraku smo v vse luknjice mikrotiterske plošče dodali 180 μ L Z-pufra z dodanim β -ME (k 20 mL Z-pufra smo dodali 140 μ L β -ME), resuspendirali in nato dodali še po 10 μ L toluena ter ponovno resuspendirali. Mikrotitersko ploščo smo pokrili in inkubirali na ledu 30 minut. Medtem smo si pripravili posodo s toplo vodo in UV/VIS spektrofotometer nastavili na 33,5 °C. Po 30 minutah na ledu smo mikrotitersko ploščo

prenesli v posodo s toplo vodo in z IR termometrom preverjali temperaturo. Ko je temperatura na pokrovu mikrotiterske plošče dosegla 29 °C, smo jo prenesli na papirnato brisačo, previdno obrisali dno in z multikanalno pipeto hitro v vse luknjice dodali 50 µL raztopine ONPG v Z-pufu. Nato smo mikrotitersko ploščo hitro pokrili s čistimi objektnimi stekelci in ob strani z dvema papirnatima trakovima ter novim čistim pokrovom, vstavili v UV/VIS spektrofotometer in zagnali predhodno sestavljen protokol merjenja kinetike β-galaktozidazne aktivnosti.

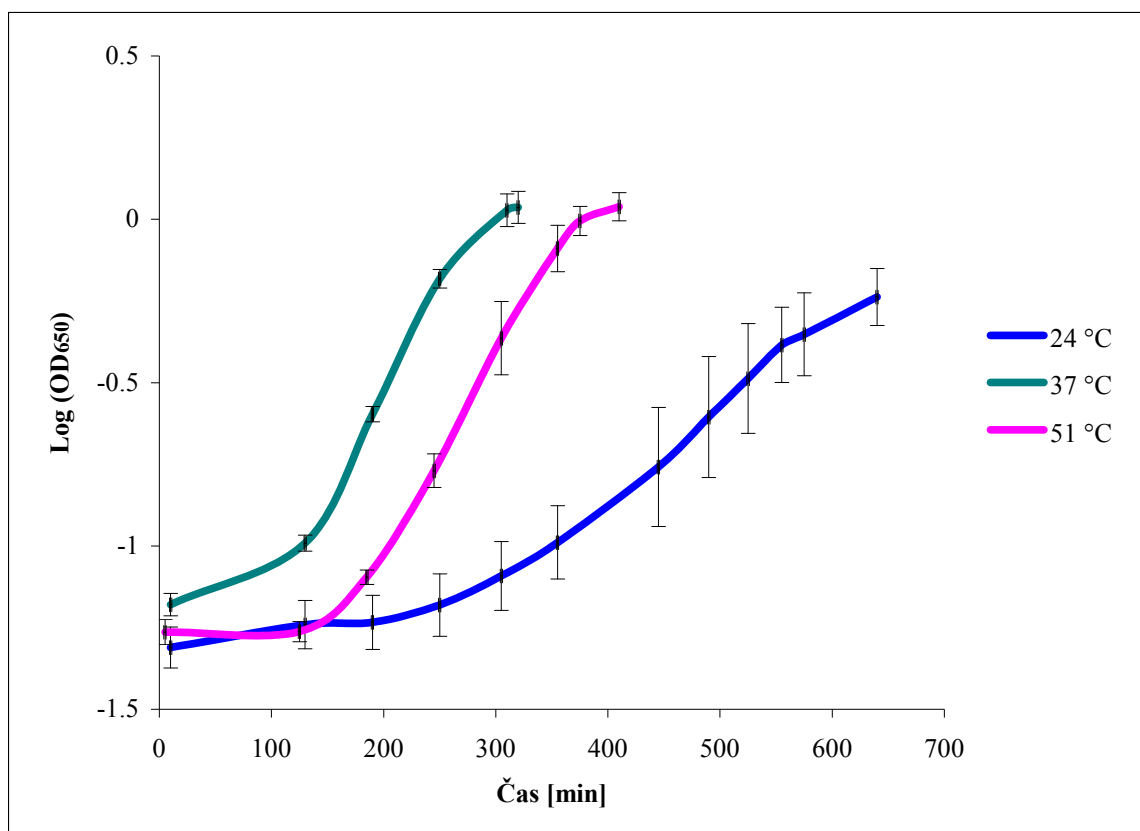
3.2.17 β-galaktozidazni test v mikrocentrifugirkah

Producenti sev *B. subtilis* BD2833 smo gojili pri treh različnih temperaturah kot je opisano na strani 20. Eno uro po prehodu v stacionarno fazo rasti smo odvzeli po 1 mL bakterijske kulture v mikrocentrifugirke, jih centrifugirali 5 minut pri 10000 obratih na minuto, previdno odstranili supernatant in jih zamrznili pri -20 °C. Naslednji dan smo bakterijske kulture brez gojišča v mikrocentrifugirkah odtalili in redčili z Z-pufrom tako, da je OD₆₅₀ znašal 0,5 a.e.. Pelet smo resuspendirali in zmešali na vorteksnem mešalu. Po 100 µL vzorca smo prenesli na mikrotitersko ploščo in v digestoriju vzorcem dodali po 100 µL Z-pufra z dodanim β-ME (14 µL β-ME na 1 mL Z-pufra), resuspendirali, dodali po 10 µL toluena, resuspendirali, ploščo pokrili in jo inkubirali na ledu 30 minut. Naslednji koraki so enaki kot pri metodi β-galaktozidazni test v mikrotiterskih ploščah.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV TEMPERATURE NA RAST SEVA *B. subtilis* BD2833

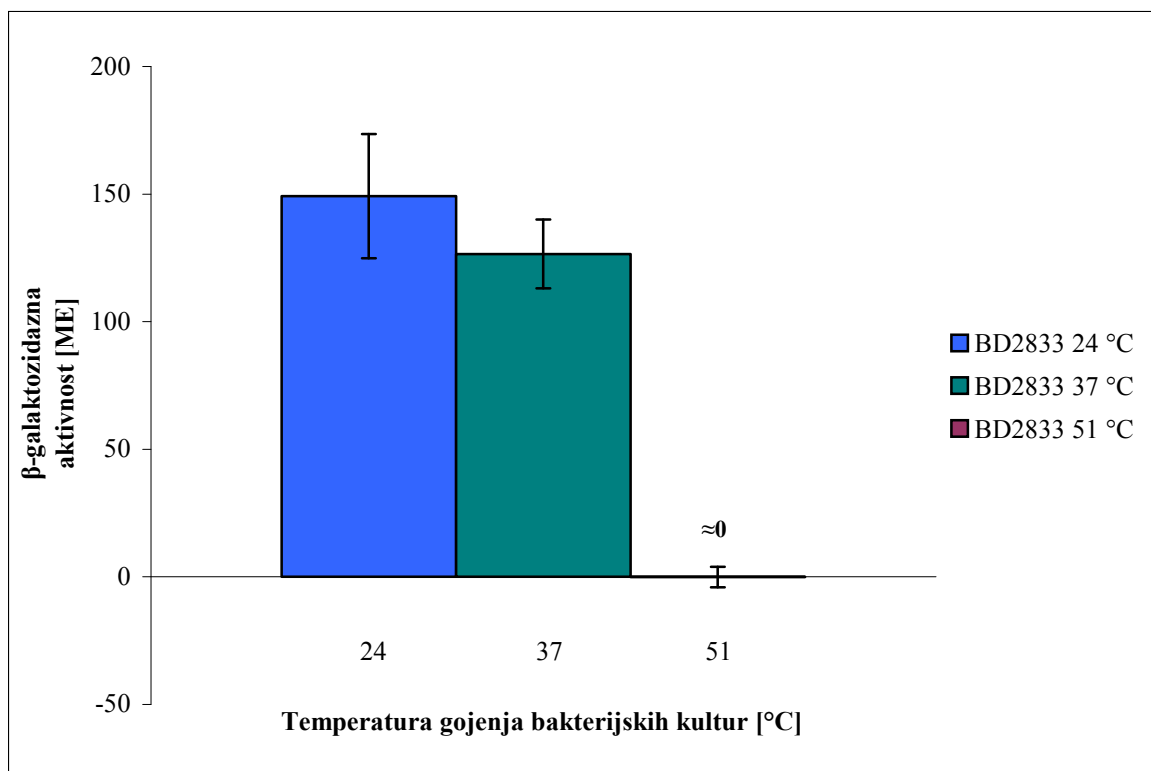
Kot je prikazano na Sliki 6, so izbrane temperature izrazito vplivale na rast seva *B. subtilis* BD2833 in povprečen generacijski čas je bil pri 51 °C (48 ± 11) minut, pri 37 °C (42 ± 5) minut in pri 24 °C (89 ± 11) minut. Torej je bila hitrost rasti najvišja pri 37 °C, nekoliko nižja pri 51 °C ter najnižja pri 24 °C. Dolžina lag faze rasti je bila pri 51 °C (160 ± 20) minut, pri 37 °C (100 ± 10) minut in pri 24 °C (200 ± 50) minut.



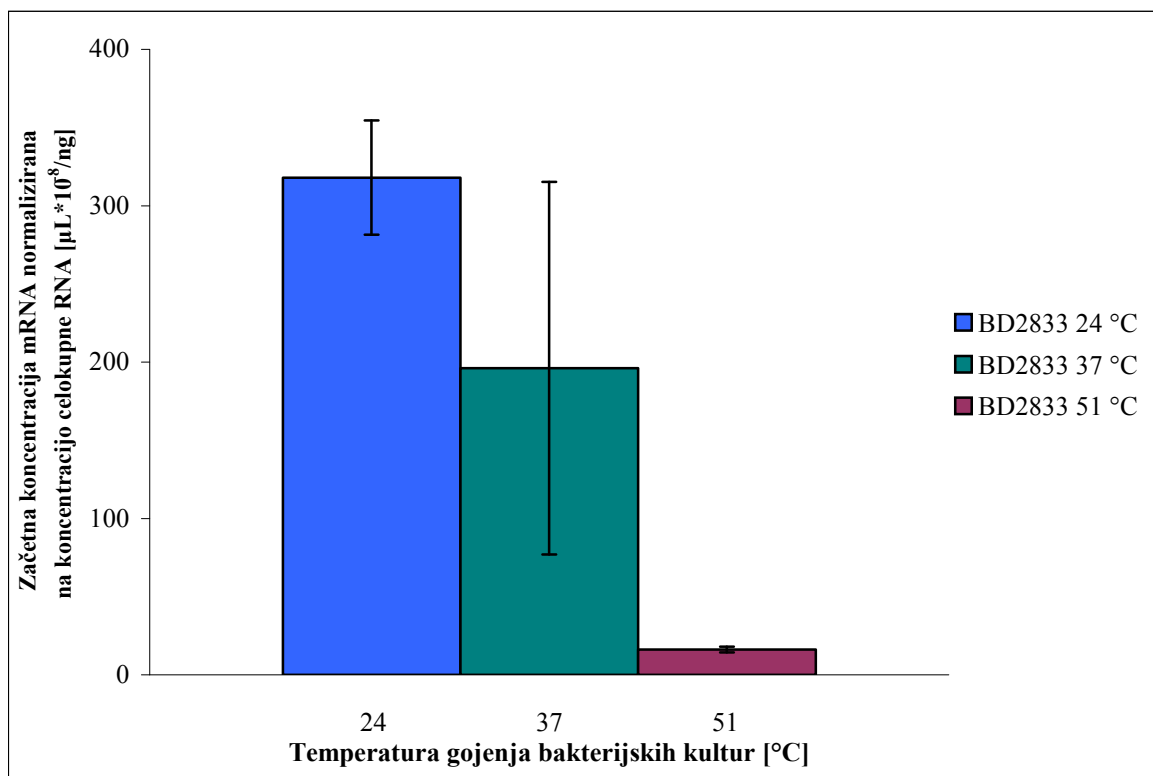
Slika 6: Rastne krivulje producentnega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) gojenega pri treh različnih temperaturah. Vsaka od treh rastijskih krivulj prikazuje povprečje 9 rastijskih krivulj bakterijskih kultur, ki smo jih gojili v treh neodvisnih poskusih.

4.2 VPLIV TEMPERATURE NA IZRAŽANJE *srfA*

Preverili smo vpliv izbranih temperatur na izražanje *srfA* in sicer z dvema metodama, s kvantitativnim PCR v realnem času in z merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti produktskega seva *B. subtilis* BD2833, ki nosi fuzijo *srfA-lacZ*. Pri sevu gojenem pri 51 °C ni bilo mogoče zaznati signifikantne β -galaktozidazne aktivnosti, medtem ko smo pri 37 °C in 24 °C zaznali aktivnost, ki se pri obeh temperaturah ni signifikantno razlikovala (Slika 7). Tudi koncentracija mRNA gena *lacZ* (fuzija s *srfA*) je bila pri 51 °C najnižja. Pri 37 °C in 24 °C pa nekoliko višja, vendar med obema temperaturama prav tako ni bilo signifikantne razlike na nivoju mRNA (Slika 8).



Slika 7: β -galaktozidazna aktivnost bakterijskih kultur produktskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX, s *srfA-lacZ* fuzijo) gojenih pri treh različnih temperaturah. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni treh bioloških ponovitev.

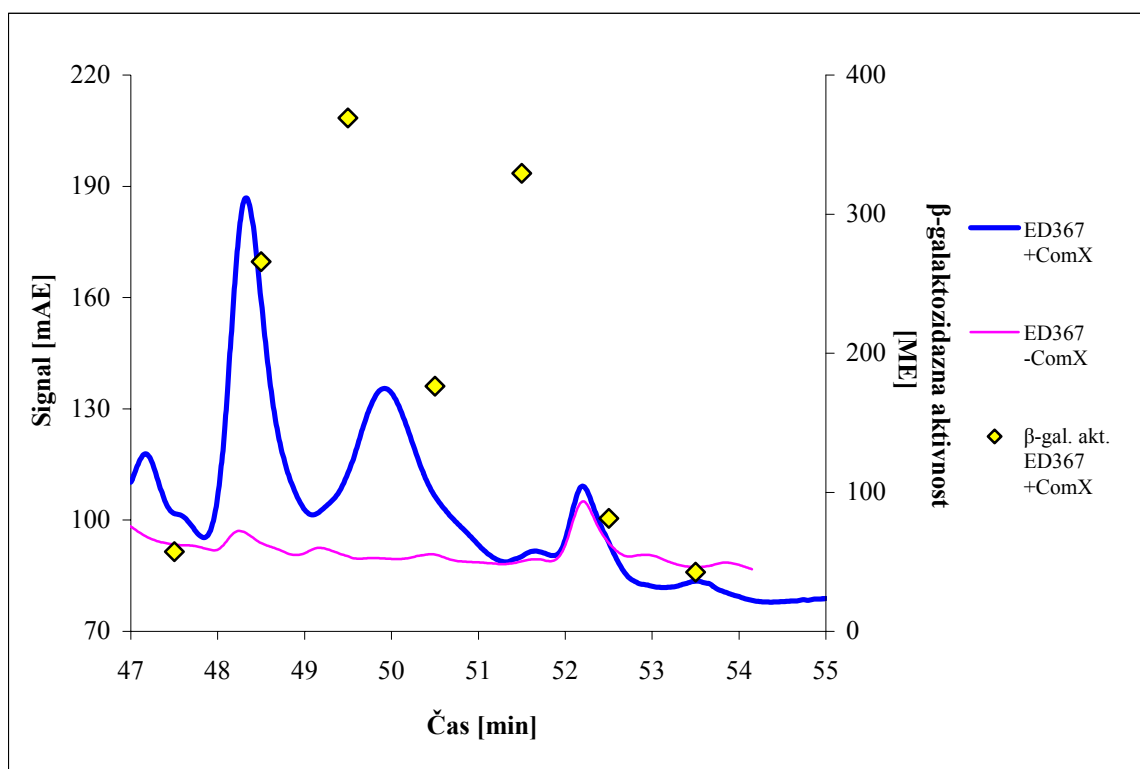


Slika 8: Začetne koncentracije mRNA (izražene kot emisija fluorescence reporterskega barvila SYBR Green [RFU] normalizirana na emisijo fluorescence pasivnega referenčnega barvila ROX [RFU]) gena *lacZ* (fuzija s *srfA*) normalizirane na koncentracije celokupne RNA. Bakterijske kulture produkcijskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) so bile gojene pri treh različnih temperaturah. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni devetih bioloških ponovitev iz treh neodvisnih poskusov.

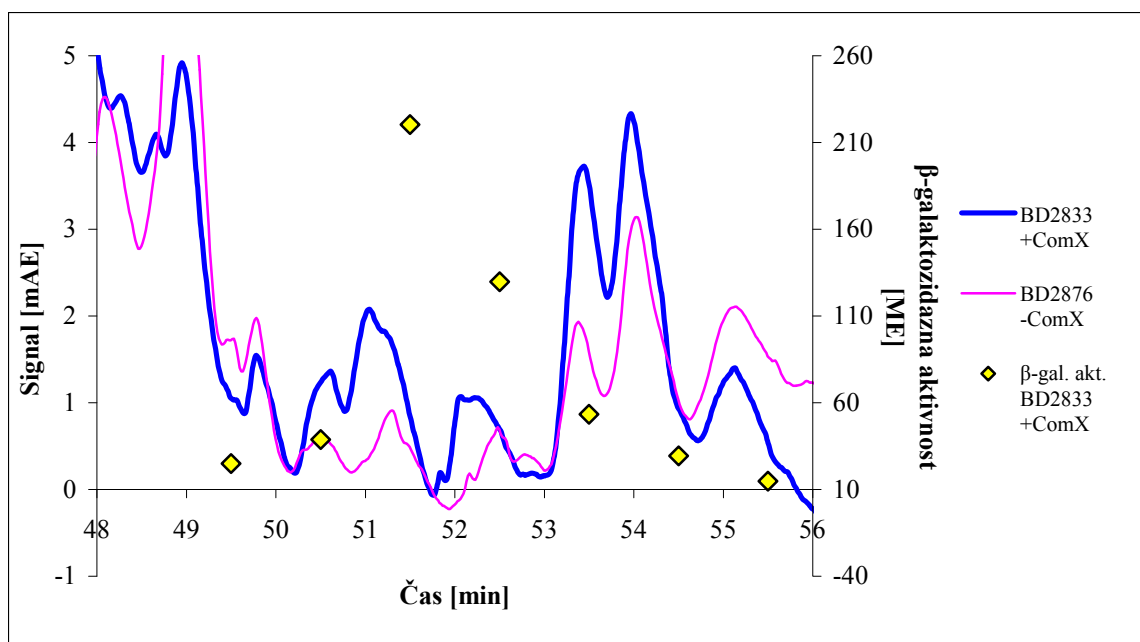
4.3 VREDNOTENJE KOLIČINE FEROMONA ComX V IZRABLJENIH GOJIŠČIH Z METODO HPLC

4.3.1. Optimizacija metode HPLC

V okviru te diplomske naloge smo vpeljali metodo detekcije peptida ComX s HPLC v izrabljenih gojiščih bakterije *B. subtilis*. V začetni fazi smo uporabili sev *E. coli* ED367, ki ob indukciji z IPTG izdeluje visoke koncentracije ComX (v naših poskusih do 40 krat višje kot sev *B. subtilis* BD2833 (30-40 nM v CM gojišču z bakterijsko kulturo pri $OD_{600}=0,4$ (Magnuson, 1994))), s čemer smo si olajšali določanje koncentracijskega območja acetonitrila (ACN) v mobilni fazi pri kateri se eluira ComX. Koncentracije ComX v eluatih izrabljenih gojišč smo določali tudi posredno z uporabo testerskega seva *B. subtilis* BD2876, ki je označen s *srfA-lacZ*, ne izdeluje pa lastnega ComX feromona. Kromatograma izrabljenega gojišča seva *E. coli* ED367 sta označena z dvema črtama, modra predstavlja izrabljeno gojišče seva, ki je bil induciran z IPTG in roza izrabljeno gojišče neinduciranega seva (negativna kontrola) (Slika 9). Rumene kare prikazujejo β -galaktozidazno aktivnost, ki smo jo izmerili v frakcijah induciranega seva z uporabo testerskega seva. Povišano β -galaktozidazno aktivnost sta pokazali dve frakciji med 48 in 50 minuto in ena frakcija med 51 in 52 minuto. V območju prvih dveh frakcij s povišano β -galaktozidazno aktivnostjo sta tudi na kromatogramu vidna dva kromatografska vrhova, ki sta izrazito višja od tistih v enakem območju pri negativni kontroli. Na naslednji sliki (Slika 10) sta podana kromatograma sevov *B. subtilis* BD2833 (producent ComX) in BD2876 (tester z inaktiviranim *comQ* genom - negativna kontrola). Rumene kare prikazujejo β -galaktozidazno aktivnost producentnega seva *B. subtilis* BD2833 in rezultati kažejo, da povišana β -galaktozidazna aktivnost testerja sovpada s frakcijami med 51 in 54 minuto. V tem območju so tudi vidni trije kromatografski vrhovi, ki so višji od tistih pri negativni kontroli.



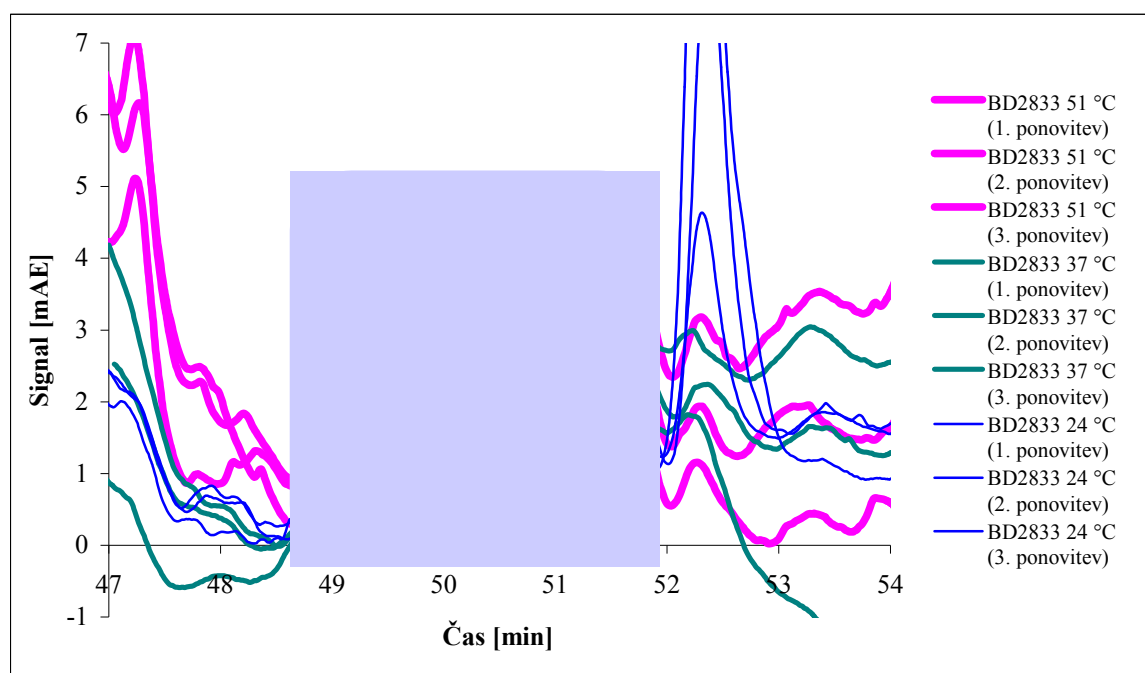
Slika 9: Kromatogram izbranih gojišč seva *E. coli* ED367 (induciranega z IPTG (+ComX) in neinduciranega (-ComX) za negativno kontrolo) pridobljenih pri 37 °C in β-galaktozidazna aktivnost seva *B. subtilis* BD2876 (-ComX - inaktiviran *comQ*, s *srfA-lacZ* fuzijo), ki smo mu dodali frakcije *E. coli* ED367.



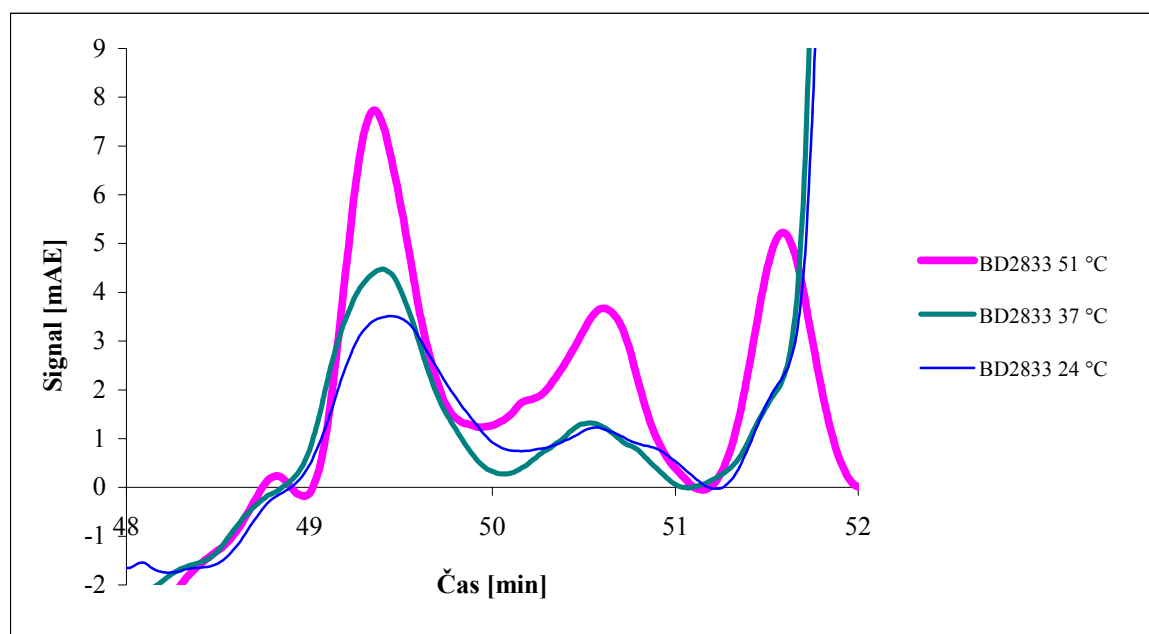
Slika 10: Kromatogram izbranih gojišč produktskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) in testerskega seva *B. subtilis* BD2876 (-ComX - inaktiviran *comQ*) za negativno kontrolo. Bakterijske kulture smo gojili pri 37 °C. Rumene kare ponazarjajo β-galaktozidazno aktivnost seva *B. subtilis* BD2876 (-ComX - inaktiviran *comQ*, s *srfA-lacZ* fuzijo), ki smo ga izpostavili frakcijam HPLC izbranih gojišč produktskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX, s *srfA-lacZ* fuzijo).

4.3.2. Vpliv temperature na vsebnost feromona ComX v izrabljenih gojiščih bakterije *B. subtilis*

Kromatogrami izrabljenih gojišč producentnega seva *B. subtilis* BD2833 (Slika 11), so pokazali, da je površina kromatografskih vrhov, v katerih je predvidoma prisoten signalni peptid ComX največja pri izrabljenih gojiščih pridobljenih pri 51 °C in najmanjša pri tistih pridobljenih pri 24 °C. Frakcije v območju treh minut (49 do 52 minuta), v katerih je predvidoma prisoten ComX, smo združili s frakcijami iz enakega območja drugih dveh ponovitev istega izrabljenega gojišča in jih ponovno nanesli na kromatografsko kolono. Dobili smo podoben rezultat kot prej z nekoliko jasneje vidnimi razlikami med izrabljenimi gojišči pridobljenimi pri treh različnih temperaturah (Slika 12).



Slika 11: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Izrabljeno gojišče pridobljeno pri posamezni temperaturi je bilo v treh ponovitvah nanešeno na kolono in rezultati posamezne ponovitve so ločeno prikazani na grafu. Z oblakom je označeno območje za katerega predvidevamo, da ponazarja feromon ComX.



Slika 12: Kromatogram izrabljenih gojišč produktskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Frakcije HPLC treh ponovitev izrabljenega gojišča iz posamezne temperature so bile združene in ponovno nanešene na kolono.

4.4 VPLIV TEMPERATURE NA IZRAŽANJE GENOV *comX* IN *comQ*

Rezultati qPCR so pokazali, da je koncentracija mRNA *comX* in *comQ* normalizirana na koncentracijo celokupne RNA najvišja pri 24 °C, nižja pri 37 °C in najnižja pri 51 °C, kar je vidno iz razmerij prikazanih v Preglednici 15. To pomeni, da je transkripcija *comX* in *comQ* pri višjih temperaturah inhibirana.

Preglednica 15: Razmerja začetnih koncentracij mRNA genov *comX* in *comQ* producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX), normaliziranih na koncentracije celokupnih RNA pri treh različnih temperaturah gojenja. Razmerja so izračunana iz povprečnih začetnih koncentracij mRNA treh bioloških ponovitev pri posamezni temperaturi gojenja in pri posamezni ponovitvi gojenja.

Razmerja začetnih koncentracij mRNA* (<i>Bacillus subtilis</i> BD2833)						
	<i>comX</i>			<i>comQ</i>		
	1. ponovitev	2. ponovitev	3. ponovitev	1. ponovitev	2. ponovitev	3. ponovitev
51 °C/37 °C	0.5	0.9	0.6	0.8	0.2	0.5
24 °C/37 °C	2.7	1.8	1.9	2.3	3.1	1.3
24 °C/51 °C	5.4	2.0	2.9	3.1	13.9	2.5

*izražene kot emisija fluorescence reporterskega barvila SYBR Green [RFU] normalizirana na emisijo fluorescence pasivnega referenčnega barvila ROX [RFU]

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Temperaturna odvisnost zaznavanja celične gostote pri *B. subtilis* je slabo poznana. Vpliv temperature smo preučevali preko merjenja izražanja genov seva *B. subtilis* BD2833 vpletenih v odziv na povišano celično gostoto (*srfA*, *comX*, *comQ*) in določanja koncentracije glavne signalne molekule (ComX) v rastnem gojišču s HPLC. Izbrali smo tri temperature gojenja: 51 °C, 37 °C in 24 °C.

Generacijski časi med 51 °C in 37 °C so primerljivi, vendar je večina bakterijskih kultur pri 51 °C rasla nekoliko počasneje, prav tako so bile lag faze rasti pri 51 °C dosledno daljše od tistih pri 37 °C. Pri visoki temperaturi se bakterije verjetno zaradi odziva na vročinski šok (Arnosti in sod., 1986; Msadek in sod., 1998) počasneje prilagodijo na dane razmere. Temperatura 51 °C je tudi že blizu 53 °C, ki je kritična temperatura, nad katero sev *B. subtilis* BD2833 ne raste več (Vogrič, diplomsko delo v pripravi), kar je skladno z nakazano počasnejšo rastjo. Optimalna temperatura gojenja za sev *B. subtilis* BD2833 sicer ni bila natančno ugotovljena, vendar je višja od 37 °C. Slednje nakazuje višja hitrost rasti pri 45 °C kot pri 37 °C (Vogrič, diplomsko delo v pripravi). Najdaljše generacijske čase in dolžine lag faz smo izmerili pri 24 °C, kjer je bila tudi končna bakterijska gostota nekoliko nižja kot pri ostalih dveh gojitvenih temperaturah. Iz navedenih rastnih parametrov lahko sklepamo, da so med izbranimi rastnimi pogoji najbolj stresni pogoji pri temperaturi 24 °C, sledi 51 °C in nato 37 °C. Ohno in sodelavci (1995) predvidevajo, da je koncentracija surfaktina povezana z rastjo bakterij *B. subtilis* oziroma končnim številom živih celic pri posamezni temperaturi. Če bi to držalo v splošnem, bi pričakovali, da bo izražanje surfaktina skladno z rastnimi parametri tudi v našem primeru najnižje pri 24 °C. Vendar naši rezultati pridobljeni tako z merjenjem izražanja *srfA* s qPCR in preko *srfA-lacZ* (merjenje β -galaktozidazne aktivnosti) nakazujejo, da je izražanje *srfA* najvišje ravno pri 24 °C in drastično znižano pri 51 °C. Ti rezultati so skladni z že obstoječimi rezultati, ki tudi kažejo, da je ob povišanih temperaturah (okrog 50 °C) produkcija surfaktina zmanjšana (Ohno in sod., 1995; Abushady in sod., 2005). Znižano izražanje surfaktina pri visoki temperaturi ni povezano s hitrostjo rasti, ki je še vedno učinkovita pri 51 °C. Eden

od možnih vzrokov bi lahko bil v prenizki koncentraciji peptida ComX, ki preko ComP-ComA dvokomponentnega regulatornega sistema aktivira *srfA* (Magnuson, 1994). Vendar naše HPLC meritve ComX v izrabljenem gojišču kažejo, da je koncentracija ComX pri 51 °C najvišja. Tudi potencial izrabljenega gojišča pridobljenega pri 51 °C, da inducira izražanje *srfA* v testerskem sevu, je bil najvišji (Vogrič, diplomsko delo v pripravi). Torej znižanega izražanja *srfA* pri 51 °C ne moremo razložiti s spreminjanjem zunajcelične koncentracije ComX. To kažejo tudi rezultati poskusa, kjer smo ob konstantni koncentraciji ComX opazovali izražanje *srfA* in opazili, da pri 51 °C izražanja *srfA* skoraj ni bilo (Priloga X). Torej je vpliv temperature na izražanje *srfA* odvisen od drugih regulatornih dejavnikov. Morda temperatura vpliva na *srfA* transkripcijski aktivator ComA, neodvisno od ComX ali pa deluje preko sistema, ki je neodvisen od medceličnega signaliziranja. Na primer, od ComA odvisna transkripcija *srfA* pri *B. subtilis* se zniža ob povečanih količinah Spx proteina, ki s svojim vplivom na RNA polimerazo prepreči proteinu ComA, da bi aktiviral transkripcijo *srfA* operona (Nakano in sod., 2003). Helmann in sodelavci (2001) so ugotovili, da se gen *spx* inducira ob vročinskem šoku. Tudi Nakano in sodelavci (2003) so po inkubaciji na 50 °C izmerili visoke nivoje Spx proteina, kar lahko razloži znižano izražanje *srfA* pri 51 °C v naših poskusih.

Ostane vprašanje, zakaj koncentracija ComX v izrabljenih gojiščih narašča s temperaturo, kar velja ob predpostavki, da je aktivnost gojišča odvisna v prvi meri samo od koncentracije ComX in da predstavljajo površine kromatografskih vrhov predvsem ComX. Pri bakterijah *Erwinia carotovora* in *Pectobacterium atrosepticum* so opazili, da so višje koncentracije signalov AHL sorazmerne s hitrejšo rastjo pri optimalnejši temperaturi gojenja (Hasegawa, 2005; Latour in sod., 2007). Če bi to držalo tudi za *B. subtilis*, bi morale biti koncentracije ComX najvišje pri temperaturi, pri kateri se bakterija najhitreje podvojuje. V naših poskusih je sev *B. subtilis* BD2833 pri 37 °C rasel nekoliko hitreje ali vsaj primerljivo kot pri 51 °C, koncentracije ComX pa so bile pri 51 °C znatno višje kot pri 37 °C. Skladne s hitrostjo rasti so bile le koncentracije ComX pri 24 °C. Pri tej temperaturi je bila hitrost rasti najnižja in prav tako tudi koncentracije ComX, vendar pa so nizke koncentracije verjetno deloma posledica nižje končne celične gostote. Schneider in sodelavci (2002) so namreč ugotovili, da ComX bakterije *B. subtilis* ni avtoinduktor in torej ne inducira povečanja lastne produkcije, ampak količina tega signalnega peptida

narašča sorazmerno s celično gostoto. Hkrati so avtorji tudi ugotovili, da se s podvojitvijo gena *comX* podvoji tudi produkcija ComX in zato bi pričakovali, da bo izražanje genov skladno s koncentracijami ComX. Toda rezultati qPCR kažejo da se je izražanje genov *comX* in *comQ* z zvišanjem temperature gojenja znižalo, kar je sicer bolj podobno rezultatom izražanja *srfA* operona. Alternativno lahko razložimo višanje zunajceličnih koncentracij s temperaturo z izločanjem signalnega peptida v zunajcelični prostor. Ni znano na kakšen način se ComX izloči v zunajcelični prostor, do zdaj znani mehanizmi prehoda membrane signalnih peptidov po Gramu pozitivnih bakterij in nekaterih kvasovk pa sicer potekajo preko ABC prenašalcev (Miller in Bassler, 2001; Chen in sod., 1997). Poleg prečenja membrane mora ComX tudi preko celične stene ter zunajceličnega polimernega matriksa (EPS). Struktura celične stene se lahko spremeni v odvisnosti od temperature (Mendelson in Favre, 1987; Prayitno in Archibald, 1997) in s tem tudi difuzija skozi njo. Prav tako je struktura EPS, ki obdaja celice, lahko pogojena s temperaturo (Czaczyk in Myszk, 2007). Sicer v splošnem velja, da je difuzija višja pri višji temperaturi, kar bi lahko razložilo višanje zunajcelične koncentracije ComX z višanjem temperature. Pomemben parameter pri razporejanju amfifilnih molekul med vodno fazo in membrano je porazdelitveni koeficient, ki nam pove kakšna je težnja amfifilne molekule, da ostaja v eni izmed obeh faz. Silvius in l'Heureux (1994) sta ugotovila, da imajo izoprenilirani peptidi visoko afiniteto za lipidne dvosloje. Pomembno vlogo pri zasidranju peptidov s hidrofobnimi interakcijami v membrano ima izoprenilacija. To so ugotovili tudi Xie in sodelavci (2000), ki so preučevali analoge feromona α -faktorja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Analog feromona, ki ima z izoprenilacijo dodano farensilno skupino in je tudi po velikost podoben feromonu ComX ima visok porazdelitveni koeficient ($K_p \approx 10^6$), zato bi lahko podobne lastnosti pričakovali tudi pri ComX. Iz tega sledi, da je lahko membrana rezervoar za ComX in s tem predstavlja znaten del vsega sintetiziranega ComX. Če zmanjšamo porazdelitveni koeficient, lahko s tem znatno zvišamo količino ComX v mediju. Porazdelitveni koeficient bi se na primer lahko spremenil neposredno zaradi temperature (Forciniti in sod., 1991; Sarubbo in sod., 2004) ali pa zaradi drugačne fosfolipidne sestave membrane, ki se spreminja z gojitveno temperaturo (Aguilar in sod., 1998; Hoyrup in sod., 2001), kar bi skupaj s povišano difuzijo ob višji temperaturi lahko razložilo povišano količino zunajceličnega ComX, kljub nižjemu izražanju genov *comX/comQ*.

5.2 SKLEPI

- Generacijski čas seva *B. subtilis* BD2833 je najkrajši pri 37 °C, nekoliko daljši pri 51 °C in najdaljši pri 24 °C.
- Temperatura gojenja seva *B. subtilis* BD2833 vpliva na izražanje operona *srfA* in sicer je koncentracija mRNA gena *lacZ* (fuzija s *srfA*) signifikantno nižja pri 51 °C kot pri 37 °C in 24 °C.
- Ob predpostavki, da aktivne HPLC frakcije vsebujejo izključno ComX, sklepamo, da temperatura gojenja seva *B. subtilis* BD2833 vpliva na koncentracijo signalnega peptida ComX v izrabljenih gojiščih in sicer je koncentracija ComX v izrabljenih gojiščih pri 51 °C višja kot pri 37 °C in 24 °C.
- Temperatura gojenja seva *B. subtilis* BD2833 vpliva na izražanje genov *comX* in *comQ* in sicer se z višanjem temperature gojenja koncentracija mRNA obeh genov zniža.
- Glede na zgoraj navedene sklepe, lahko postavljeno hipotezo, ki pravi, da bo izražanje operona *srfA* ter izražanje genov *comX* in *comQ* pri bakteriji *B. subtilis* pozitivno korelirano s temperaturo gojenja, zavrnilo.
- Kot možno razlago znižanega izražanja operona *srfA* pri 51 °C neodvisno od ComX navajamo povečane količine Spx proteina.
- Kot možno razlago razlik, med vplivom temperature na izražanje genov *comX* in *comQ* in vplivom temperature na koncentracijo ComX v izrabljenih gojiščih, navajamo hitrejšo difuzijo ComX v zunajcelični prostor pri višji temperaturi in spremembo porazdelitvenega koeficienta ComX med membrano in gojiščem.

6 POVZETEK (SUMMARY)

Po Gramu pozitivne paličaste bakterije *Bacillus subtilis* lahko z mehanizmom zaznavanja celične gostote komunicirajo med sabo (Miller in Bassler, 2001). V skladu z gostoto celične populacije sprožijo razvoj kompetence ali sporulacije ter produkcijo razgradnih encimov in antibiotikov (Graumann, 2007). Odgovor na povišano celično gostoto pri *B. subtilis* je uravnavan z dvema signalnima molekulama (ComX, CSF). Glavna signalna molekula je zunajcelični peptid ComX, ki ga zazna membransko vezana histidinska kinaza ComP, ki se avtofosforilira. ComP-P fosforila odzivni regulator ComA, ki potem aktivira transkripcijo mnogih genov, med drugim tudi izražanje operona *srfA* (Magnuson, 1994). Ta operon kodira proteine za sintezo surfaktina in za aktivacijo kompetence (Nakano in sod., 1988, 1991). ComX se sintetizira kot 55 aminokislin dolg propeptid, ki ga procesira in modificira z izoprenilacijo ohranjenega triptofanskega ostanka protein ComQ (Magnuson, 1994). Bakterije *B. subtilis* naseljujejo površinske sloje tal, v katerih so fizikalno kemične spremembe zelo pogoste in kjer so bakterije izpostavljene temperaturnim nihanjem (Graumann in Marahiel, 1999). Pri vročinskem šoku se pojavi veliko nepravilno zviti in denaturirani proteini, ki jih proteini vročinskega šoka razgradijo ali z reorganizacijo polipeptidnih verig vrnejo v funkcionalno stanje (Arnosti in sod., 1986). Nizke temperature znižajo fluidnost membrane, upočasnijo zvijanje proteinov in stabilizirajo sekundarne strukture RNA, kar negativno vpliva na iniciacijo translacije (Graumann in Marahiel, 1999).

Vpliv temperature na intenzivnost sinteze ComX oziroma njegovo koncentracijo v izrabljenih gojiščih ter na izražanje genov *comX*, *comQ* še ni poznan. Preverili smo tudi vpliv temperature na izražanje *srfA*, ki je odvisno od ComX sistema za zaznavanje celične gostote. Kot modelni organizem smo uporabili sev *B. subtilis* BD2833, ki smo ga gojili v CM gojišču pri treh različnih temperaturah ((51 ± 1) °C, (37 ± 1) °C, (24 ± 1) °C). Sledili smo transkripciji izbranih tarčnih genov in koncentraciji signalne molekule ComX v izrabljenem rastnem gojišču. Ugotovili smo, da je sev *B. subtilis* BD2833 najhitreje rasel pri 37 °C, nekoliko počasneje pri 51 °C in najpočasneje pri 24 °C. Ekspresija *srfA* gena je bila pri 24 °C učinkovita in se je pri 51 °C signifikantno znižala. Ta sprememba ni korelirala s koncentracijami ComX v izrabljenem gojišču in bi lahko bila, glede na

objavljene podatke v literaturi posledica povečanih količin Spx proteina (Hermann in sod., 2001; Nakano in sod., 2003). HPLC analize so namreč pokazale, da je bila koncentracija ComX najvišja v rastnem gojišču pridobljenem iz celic gojenih pri 51 °C. V nasprotju s tem podatkom smo ugotovili, da je bila koncentracija mRNA *comX* in *comQ* najvišja pri 24 °C. Možno je, da so povišane koncentracije ComX v zunajceličnem prostoru pri višji temperaturi posledica hitrejše difuzije ComX in spremembe porazdelitvenega koeficienta ComX med membrano in gojiščem. ComX ima zaradi izoprenoidne modifikacije verjetno amfifilno naravo (Forciniti in sod., 1991; Hoyrup in sod., 2001; Sarubbo in sod., 2004).

7 VIRI

Abushady H. M., Bashandy A. S., Aziz N. H., Ibrahim H. M. M. 2005. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. *International Journal of Agriculture & Biology*, 7, 3: 337-344

Aguilar P. S., Cronan J. E., de Mendoza D. 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *Journal of Bacteriology*, 180, 8: 2194-2200

Aguilar P. S., Lopez P., de Mendoza D. 1999. Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the $\Delta 5$ desaturase of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 181, 22: 7028-7033

Aguilar P. S., Hernandez-Arriaga A. M., Cybulski L. E., Erazo A. C., de Mendoza D. 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal*, 20, 7: 1681-1691

Albano M., Hahn J., Dubnau D. 1987. Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 169: 3110-3117

Amory A., Kunst F., Aubert E., Klier A., Rapoport G. 1987. Characterization of the *sacQ* genes from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 169: 324-333

Ansaldi M., Marolt D., Stebe T., Mandić-Mulec I., Dubnau D. 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Molecular Microbiology*, 44, 6: 1561-1573

Ansaldi M., Dubnau D. 2004. Diversifying selection at the *Bacillus* quorum-sensing locus and determinants of modification specificity during synthesis of the ComX pheromone. *Journal of Bacteriology*, 186, 1: 15-21

Applied Biosystems. 2006. Power SYBR Green PCR Master Mix and RT-PCR protocol. Foster City, Applied Biosystems: 68 str.

Arnosti D. N., Singer V. L., Chamberlin M. J. 1986. Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 168, 3: 1243-1249

Auchtung J. M., Lee C. A., Grossman A. D. 2006. Modulation of the ComA-dependent quorum response in *Bacillus subtilis* by multiple Rap proteins and Phr peptides. Journal of Bacteriology, 188: 5273-5285

Awais M., Pervez A., Yaqub A., Shah M. M. 2010. Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide gel. Pakistan Journal of Zoology, 42, 3: 267-275

Banerjee S., Hansen J. N. 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. Journal of Biological Chemistry, 263, 19: 9508-9514

Bongiorni C., Ishikawa S., Stephenson S., Ogasawara N., Perego M. 2005. Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems. Journal of Bacteriology, 187, 13: 4353-4361

Boylan S. A., Redfield A. R., Brody M. S., Price C. W. 1993. Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 175, 24: 7931-7937

Bryan P. N. 2000. Protein engineering of subtilisin. Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 2: 203-222

Budde I., Steil L., Scharf C., Völker U., Bremer E. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. Microbiology, 152: 831-853

- Chen P., Sapperstein S. K., Choi J. D., Michaelis S. 1997. Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone a-factor. *Journal of Cell Biology*, 136, 2: 251-269
- Comella N., Grossman A. D. 2005. Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 57, 4: 1159-1174
- Cosby W. M., Vollenbroich D., Lee O. H., Zuber P. 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, 180, 6: 1438-1445
- Cosmina P., Rodriguez F., de Ferra F., Grandi G., Perego M., Venema G., van Sinderen D. 1993. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 8, 5: 821-831
- Czaczyk K., Myszka K. 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 6: 799-806
- Darmon E., Noone D., Masson A., Bron S., Kuipers O. P., Devine K. M., van Dijl J. M. 2002. A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184, 20: 5661-5671
- Derre I., Rapoport G., Msadek T. 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 31, 1: 117-131

- Desai J. D., Banat I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 1: 47-64
- De Vos W.M., Kuipers O.P., van der Meer J.R., Siezen R.J. 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 17: 427-437
- D'Souza C., Nakano M. M., Zuber P. 1994. Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 9397-9401
- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55: 395-424
- Eymann C., Homuth G., Scharf C., Hecker M. 2002. *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, 184: 2500-2520
- Eymann C., Dreisbach A., Albrecht D., Bernhardt J., Becher D., Gentner S. 2004. A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics*, 4: 2849-2876
- Federle M. J., Bassler B. L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *Journal of Clinical Investigation*, 112: 1291-1299
- Ferrari E., Henner D. J., Perego M., Hoch J. A. 1988. Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. *Journal of Bacteriology*, 170, 1: 289-295
- Forciniti D., Hall C. K., Kula M. R. 1991. Temperature dependence of the partition coefficient of proteins in aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, 2, 2: 115-128

- Gottesman S., Wickner S., Maurizi M. R. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes & Development*, 11: 815-823
- Graumann P., Schröder K., Schmid R., Marahiel M. A. 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178, 15: 4611-4619
- Graumann P., Wendrich T. M., Weber M. H. W., Schröder K., Marahiel M. A. 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Molecular Microbiology*, 25, 4: 741-756
- Graumann P. L., Marahiel M. A. 1999. Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1, 2: 203-209
- Graumann P. 2007. *Bacillus: Cellular and molecular biology*. Wymondham, Caister Academic Press: 454 str.
- Griffith K. L., Grossman A. D. 2008. A degenerate tri-partite DNA binding site required for activation of ComA-dependent quorum response gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 381, 2: 261-275
- Griffith K. L. 2009. Regulation of biological networks by cell-cell signaling. Amherst, University of Massachusetts: 1 str.
<http://www.bio.umass.edu/mcb/faculty/Griffith.html> (december 2011)
- Grossman A. D. 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, 29: 477-508
- Gschmeissner S. 2012. *Bacillus subtilis* bacteria, SEM. London, Science Photo Library: 1 str.
<http://www.sciencephoto.com/media/12304/view> (junij 2012)

Hahn J., Dubnau D. 1991. Growth stage signal transduction and the requirements for *srfA* induction in development of competence. *Journal of Bacteriology*, 173, 22: 7275-7282

Hahn J., Luttinger A., Dubnau D. 1996. Regulatory inputs for the synthesis of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 21: 763-75

Hamoen L. W., Venema G., Kuipers O. P. 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149: 9-17

Hasegawa H., Chatterjee A., Cui Y., Chatterjee A. K. 2005. Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, N-acyl homoserine lactone, and extracellular proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8: 4655-4663

Hayashi K., Ohsawa T., Kobayashi K., Ogasawara N., Ogura M. 2005. The H₂O₂ stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187, 19: 6659-6667

Hecker M., Schumann W., Völker U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 19, 3: 417-428

Helmann J. D., Wu M. F. W., Kobel P. A., Gamo F., Wilson M., Morshedi M. M., Navre M., Paddon C. 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *Journal of Bacteriology*, 183, 24: 7318-7328

Hoffmann T., Bremer E. 2011. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *Journal of Bacteriology*, 193, 7: 1552-1562

Holtmann G., Bremer E. 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *Journal of Bacteriology*, 186, 6: 1683-1693

- Homuth G., Masuda S., Mogk A., Kobayashi Y., Schumann W. 1997. The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *Journal of Bacteriology*, 179, 4: 1153-1164
- Hoyrup P., Davidsen J., Jorgensen K. 2001. Lipid membrane partitioning of lysolipids and fatty acids: effects of membrane phase structure and detergent chain length. *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 13: 2649-2657
- Hyyryläinen H., Bolhuis A., Darmon E., Muukkonen L., Koski P., Vitikainen M., Sarvas M., Prágai Z., Bron S., van Dijl J. M., Kontinen V. P. 2001. A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Molecular Microbiology*, 41, 5: 1159-1172
- Julkowska D., Obuchowski M., Holland I. B., Séror S. J. 2005. Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *Journal of Bacteriology*, 187, 1: 65-76
- Kleerebezem M., Quadri L. E. N., Kuipers O. P., de Vos W. M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24, 5: 895-904
- Klein W., Weber M. H. W., Marahiel M. A. 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *Journal of Bacteriology*, 181, 17: 5341-5349
- Krüger E., Msadek T., Ohlmeier S., Hecker M. 1997. The *Bacillus subtilis clpC* operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology*, 143: 1309-1316
- Kuipers O.P., Beerthuyten M.M., de Ruyter P.G.G.A., Luesink E.J., de Vos W.M. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 27299-27304

- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390: 249-256
- Lambalot R. H., Gehring A. M., Flugel R. S., Zuber P., LaCelle M., Marahiel M. A., Reid R., Khosla C., Walsh C. T. 1996. A new enzyme superfamily-the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology*, 11, 3: 923-936
- Lanigan-Gerdes S., Briceno G., Dooley A. N., Faull K. F., Lazazzera B. A. 2008. Identification of residues important for cleavage of the extracellular signaling peptide CSF of *Bacillus subtilis* from its precursor protein. *Journal of Bacteriology*, 190, 20: 6668-6675
- Latour X., Diallo S., Chevalier S., Morin D., Smadja B., Burini J., Haras D., Orange N. 2007. Thermoregulation of N-acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 12: 4078-4081
- Lazazzera B. A., Grossman A. D. 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends in Microbiology*, 6, 7: 288-294
- Lazazzera B. A., Kurtser I. G., Mcquade R. S., Grossman A. D. 1999. An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 181, 17: 5193-5200
- Lazazzera B. A. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 177-182
- Li M., Wong S. L. 1992. Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 174, 12: 3981-3992

- Lombardía E., Rovetto A. J., Arabolaza A. L., Grau R. R. 2006. LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 12: 4442-4452
- Loshon C. A., Wahome P. G., Maciejewski M. W., Setlow P. 2006. Levels of glycine betaine in growing cells and spores of *Bacillus* species and lack of effect of glycine betaine on dormant spore resistance. *Journal of Bacteriology*, 188, 8: 3153-3158
- Magnuson R. D. 1994. Characterization of a competence pheromone in *Bacillus subtilis*. Cambridge, Massachusetts Institute of Technology: 122 str.
- Mandić-Mulec I., Kraigher B., Cepon U., Mahne I. 2003. Variability of the quorum sensing system in natural isolates of *Bacillus* sp. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 1: 23-28
- Mayville P., Ji G., Beavis R., Yang H., Goger M., Novick R. P., Muir T. W. 1999. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 1218-1223
- McDowell P., Affas Z., Reynolds C., Holden M. T., Wood S. J., Saint S., Cockayne A., Hill P. J., Dodd C. E. R., Bycroft B. W., Chan W. C., Williams P. 2001. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 41: 503-512
- Mendelson N. H., Favre D. 1987. Regulation of *Bacillus subtilis* macrofiber twist development by ions: effects of magnesium and ammonium. *Journal of Bacteriology*, 169, 2: 519-525
- Miller M. B., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-99

- Mogk A., Homuth G., Scholz C., Kim L., Schmid F. X., Schumann W. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. EMBO Journal, 16, 15: 4579-4590
- Msadek T., Kunst F., Klier A., Rapoport G. 1991. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. Journal of Bacteriology, 173: 2366-2377
- Msadek T., Kunst F., Rapoport G. 1994. MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 5788-5792
- Msadek T., Dartois V., Kunst F., Herbaud M., Denizot F., Rapoport G. 1998. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, grown at high temperature and sporulation. Molecular Microbiology, 27, 5: 899-914
- Nakano M. M., Marahiel M. A., Zuber P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 170, 12: 5662-5668
- Nakano M. M., Xia L., Zuber P. 1991. Transcription initiation region of the *sfA* operon, which is controlled by the *comP-comA* signal transduction system in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 173, 17: 5487-5493
- Nakano M. M., Corbell N., Besson J., Zuber P. 1992. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. Molecular Genetics and Genomics, 232: 313-321

- Nakano M. M., Zhu Y., Liu J., Reyes D. Y., Yoshikawa H., Zuber P. 2000. Mutations conferring amino acid residue substitutions in the carboxy-terminal domain of RNA polymerase σ can suppress *clpX* and *clpP* with respect to developmentally regulated transcription in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 37, 4: 869-884
- Nakano M. M., Nakano S., Zuber P. 2002. Spx (YjbD), a negative effector of competence in *Bacillus subtilis*, enhances ClpC-MecA-ComK Interaction. *Molecular Microbiology*, 44, 5: 1341-1349
- Nakano S., Nakano M. M., Zhang Y., Leelakriangsak M., Zuber P. 2003. A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7: 4233-4238
- NCBI. 2012. Primer-BLAST. Bethesda, NCBI - National Center for Biotechnology Information: software
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (april 2011)
- Nealson K. H., Platt T., Hastings J. W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104, 1: 313-322
- Nealson K. H., Hastings J. W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43, 4: 496-518
- Ogura M., Shimane K., Asai K., Ogasawara N., Tanaka T. 2003. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49, 6: 1686-1697
- Ohno A., Ano T., Shoda M. 1995. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 5: 517-519

Ohsawa T., Tsukahara K., Sato T., Ogura M. 2006. Superoxide stress decreases expression of *srfA* through inhibition of transcription of the *comQXP* quorum-sensing locus in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry*, 139: 203-211

Okada M., Sato I., Cho S. J., Iwata H., Nishio T., Dubnau D., Sakagami Y. 2005. Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nature Chemical Biology*, 1: 23-24

Parisot J., Carey S., Breukink E., Chan W. C., Narbad A., Bonev B. 2008. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52, 2: 612-618

Piazza F., Tortosa P., Dubnau D. 1999. Mutational analysis and membrane topology of ComP, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development. *Journal of Bacteriology*, 181, 15: 4540-4548

Prayitno N. R., Archibald A. R. 1997. The effects of growth conditions on cell wall composition and cell morphology in a temperature-sensitive *tag-B* mutant of *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13: 207-217

QIAGEN. 2001. RNeasy Mini handbook. Düsseldorf, QIAGEN: 116 str.

QIAGEN. 2005. RNAProtect Bacteria Reagent handbook. Düsseldorf, QIAGEN: 52 str.

Reuter K., Mofid M. R., Marahiel M. A., Ficner R. 1999. Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO Journal*, 18, 23: 6823-6831

Roggiani M., Dubnau D. 1993. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter of *srfA*. *Journal of Bacteriology*, 175, 10: 3182-3187

- Rosenberg E., Ron E. Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 154-162
- Sarubbo L. A., de Oliveira L. A., Figueiredo Porto A. L., de Campos-Takaki G. M., Tambourgi E. B. 2004. Partition of proteins in aqueous two-phase systems based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 5: 685-691
- Schauder S., Shokat K., Surette M. G., Bassler B. L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 41, 2: 463-476
- Schneider K. B., Palmer T. M., Grossman A. D. 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184, 2: 410-419
- Schulz A., Schwab S., Homuth G., Versteeg S., Schumann W. 1997. The *htpG* gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. *Journal of Bacteriology*, 179, 10: 3103-3109
- Schumann W. 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress & Chaperones*, 8, 3: 207-217
- Silvius J. R., l'Heureux F. 1994. Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochemistry*, 33: 3014-3022
- Solomon J. M., Magnuson R., Srivastava A., Grossman A. D. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 9: 547-58

- Solomon J. M., Lazazzera B. A., Grossman A. D. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 10: 2014-2024
- Starov V. M., Kosvintsev S. R., Velarde M. G. 2000. Spreading of surfactant solutions over hydrophobic substrates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 227, 1: 185-190
- Stefanic P., Mandić-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1756-1764
- Stephenson S., Mueller C., Jiang M., Perego M. 2003. Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 185, 16: 4861-4871
- Swartzburg R. 2009. *Bacillus subtilis*. Thousand Oaks, Probiotic.org: 1 str.
<http://www.probiotic.org/bacillus-subtilis.htm> (december 2011)
- Swift S., Rowe M. C., Kamath M. 2008. Quorum sensing. V: *Bacterial physiology: A molecular approach*. El-Sharoud W. (ed.). Heidelberg, Springer-Verlag: 179-232
- Todar K. 2011. *Todar's online textbook of bacteriology: The genus Bacillus*. Madison, University of Wisconsin, Department of Bacteriology: 6 str.
<http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> (december 2011)
- Tortosa P., Logsdon L., Kraigher B., Itoh Y., Mandić-Mulec I., Dubnau D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*, 183, 2: 451-460
- Tran L. P., Nagai T., Itoh Y. 2000. Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 37, 5: 1159-1171

- Turgay K., Hamoen L. W., Venema G., Dubnau D. 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 11: 119-128
- Turgay K., Hahn J., Burghoorn J., Dubnau D. 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO Journal*, 17: 6730-38
- Versteeg S., Escher A., Wende A., Wiegert T., Schumann W. 2003. Regulation of the *Bacillus subtilis* heat shock gene *htpG* is under positive control. *Journal of Bacteriology*, 185, 2: 466-474
- Völker U., Hecker M. 2005. From genomics via proteomics to cellular physiology of the Gram-positive model organism *Bacillus subtilis*. *Cellular Microbiology*, 8, 7: 1077-1085
- Vogrič V. 2012. Vpliv temperature na medcelično signaliziranje s ComX pri bakteriji *Bacillus subtilis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: (v pripravi)
- Weinrauch Y., Penchev R., Dubnau E., Smith I., Dubnau D. 1990. A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes & Development*, 4: 860-872
- Weinrauch Y., Msadek T., Kunst F., Dubnau D. 1991. Sequence and properties of *comQ*, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173, 18: 5685-5693
- Whitehead N. A., Barnard A. M. L., Slater H., Simpson N. J. L., Salmond G. P. C. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 365-404

Williams P., Winzer K., Chan W. C., Camara M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362: 1119-1134

Xie H., Becker J. M., Gibbs R. A., Naider F. 2000. Structure, biological activity and membrane partitioning of analogs of the isoprenylated α -factor mating peptide of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Peptide Research*, 55, 5: 372-382

Zuber U., Schumann W. 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 176, 5: 1359-1363

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec, ki me je že tekom študija pri svojih predavanjih navdušila nad mikrobno fiziologijo. Njeni strokovni nasveti in spodbuda pa so mi bili v veliko pomoč pri izvedbi in pisanju diplomskega dela.

Velika zahvala gre tudi delovnemu mentorju dr. Iztoku Dogši, ki mi je bil zmeraj pripravljen pomagati, tako pri eksperimentalnem delu kot tudi pozneje pri analizi rezultatov in pisanju diplomske naloge. Na njega sem se lahko vedno zanesla, da bo našel rešitev za vsak problem, tudi, če se je meni zdel nerešljiv.

Prof. dr. Darji Žgur-Bertok se zahvaljujem za hiter pregled diplomske naloge in vse koristne strokovne napotke.

Hvala gospe Lini Burkan Makivić za pregled oblikovne pravilnosti diplomske naloge.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo za vso pomoč in prijaznost. Hvala tudi ostalim iz Biotehniške fakultete, ki so na kakršnikoli način pripomogli k nastanku te diplomske naloge.

Prav posebna zahvala gre mojim staršem, fantu Gorazdu in prijateljicama Moniki in Nataši, ki so me vedno podpirali in mi stali ob strani v trenutkih, ko sem jih najbolj potrebovala.

PRILOGE

Priloga A: Začetne koncentracije mRNA genov *comX* in *comQ* producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX), normalizirane na koncentracije celokupnih RNA. Posamezna vrednost v tabeli prikazuje povprečno začetno koncentracijo mRNA treh bioloških ponovitev pri posamezni temperaturi gojenja in pri posamezni ponovitvi gojenja.

Začetne koncentracije mRNA* (<i>Bacillus subtilis</i> BD2833) [$\mu\text{L} \cdot 10^{-8}/\text{ng}$]:						
	<i>comX</i>			<i>comQ</i>		
Temperatura gojenja	1. ponovitev	2. ponovitev	3. ponovitev	1. ponovitev	2. ponovitev	3. ponovitev
24 °C	37.9	26.5	42.2	36.4	37.5	24.8
37 °C	13.9	14.9	22.6	15.8	12.1	19.8
51 °C	7.1	13.2	14.6	11.9	2.7	9.9

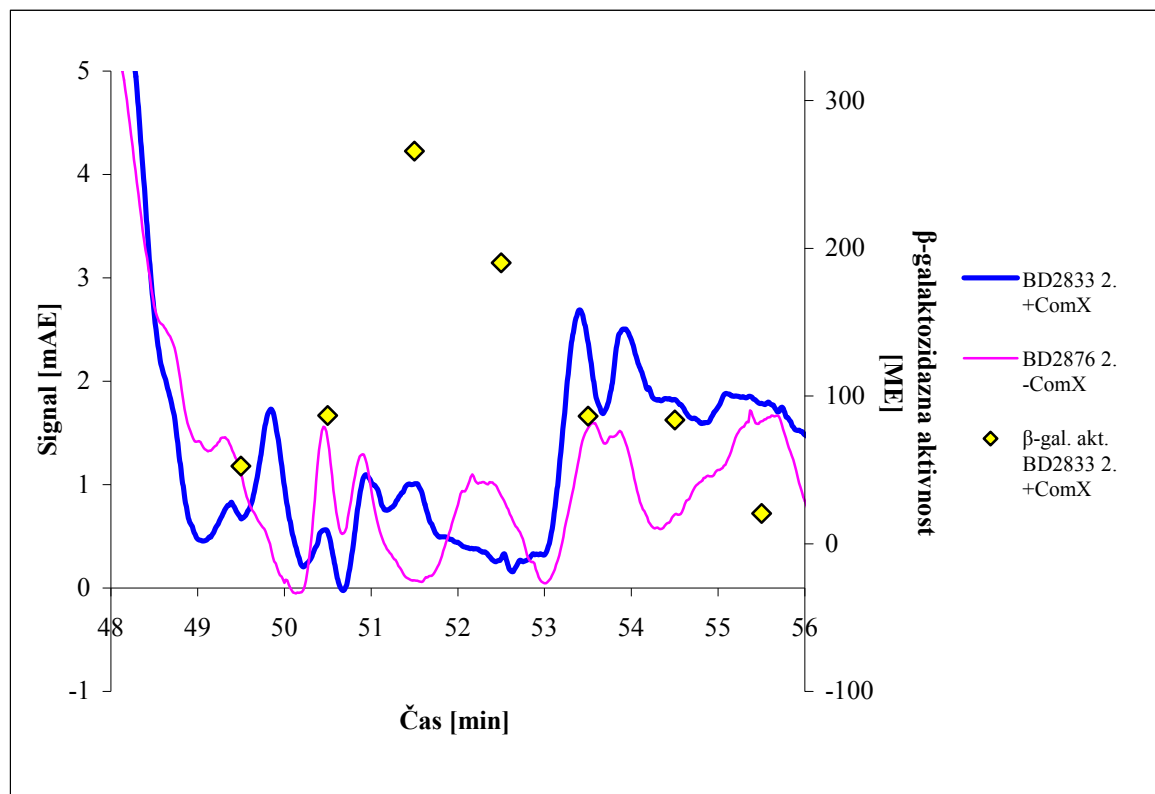
*izražene kot emisija fluorescence reporterskega barvila SYBR Green [RFU] normalizirana na emisijo fluorescence pasivnega referenčnega barvila ROX [RFU]

Priloga B: Generacijski časi bakterijskih kultur producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) trikrat gojenih v treh bioloških ponovitvah.

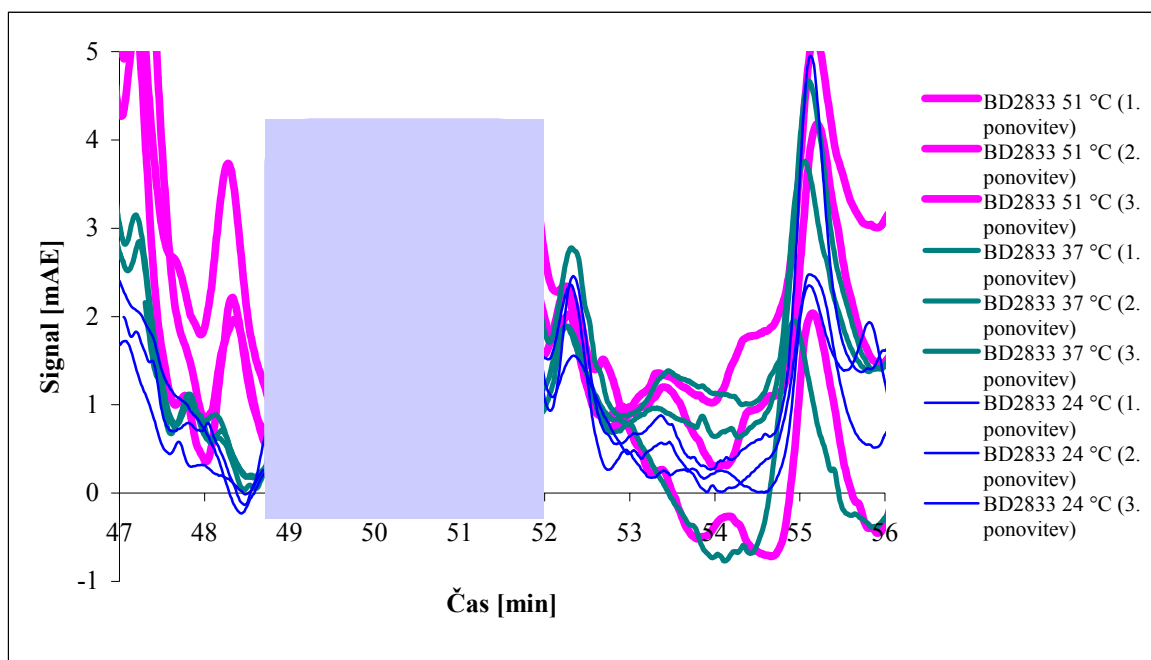
Generacijski časi (<i>Bacillus subtilis</i> BD2833) [min]:									
Temperatura gojenja	1. ponovitev			2. ponovitev			3. ponovitev		
24 °C	71,78	78,47	134,83	91,06	61,84	75,26	95,99	103,78	84,55
37 °C	44,30	48,93	44,82	37,34	36,08	38,32	41,87	42,12	46,52
51 °C	52,42	52,72	70,40	37,29	37,85	37,26	45,05	50,08	48,80

Priloga C: Površina kromatografskih vrhov združenih frakcij HPLC treh ponovitev izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah gojenja in v treh neodvisnih poskusih.

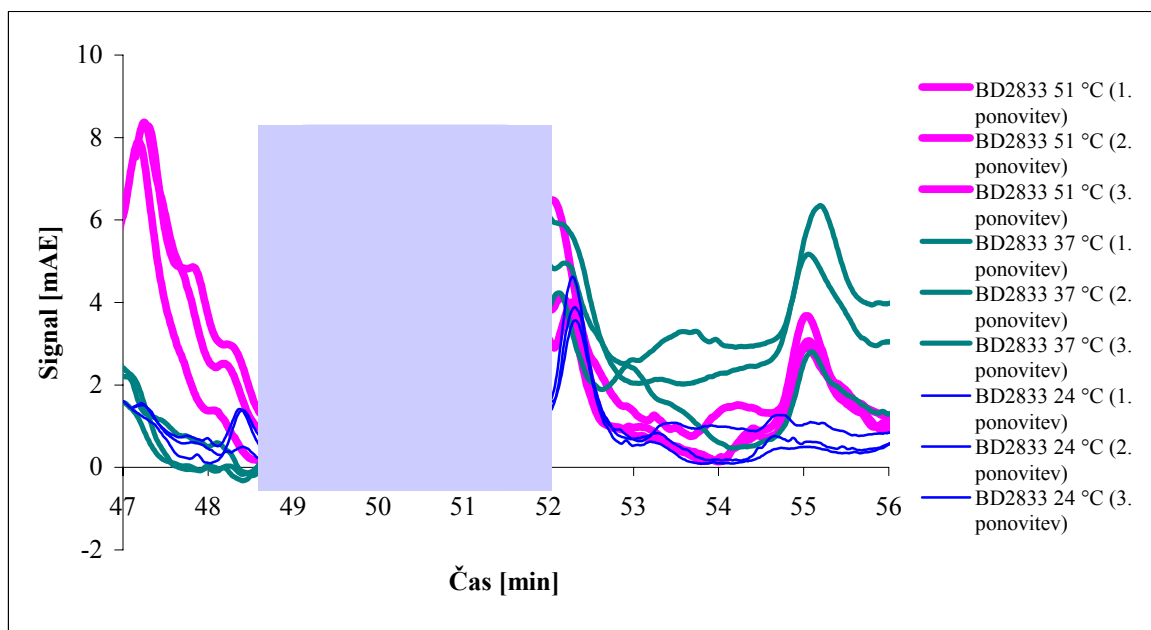
Površina kromatografskih vrhov (<i>Bacillus subtilis</i> BD2833) [mAE x min]:			
	Trikrat pridobljena izrabljena gojišča (IG)		
Temperatura gojenja bakterijskih kultur	1.	2.	3.
24 °C	5.0	5.8	4.2
37 °C	5.6	6.0	4.5
51 °C	7.7	8.7	6.7
Temperatura gojenja bakterijskih kultur	Povprečna površina treh IG		Standardni odklon povp. povr. treh IG
24 °C	5.0		0.8
37 °C	5.4		0.8
51 °C	7.7		1.0



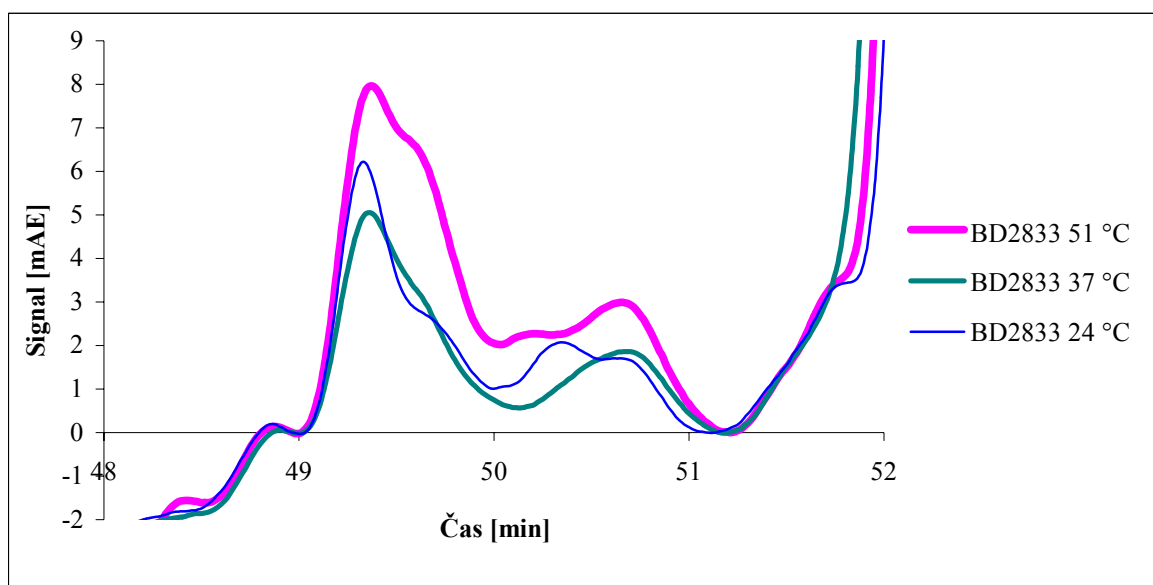
Priloga D: Kromatogram izrabljenih gojišč producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) in testerskega seva *B. subtilis* BD276 (-ComX - inaktiviran *comQ*) za negativno kontrolo. Bakterijske kulture smo gojili pri 37 °C. Rumene kare ponazarjajo β-galaktozidazno aktivnost testerskega seva *B. subtilis* BD276 (-ComX - inaktiviran *comQ*, s *srfA-lacZ* fuzijo), ki smo ga izpostavili frakcijam HPLC izrabljenega gojišča producerskega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX, s *srfA-lacZ* fuzijo) (2. ponovitev).



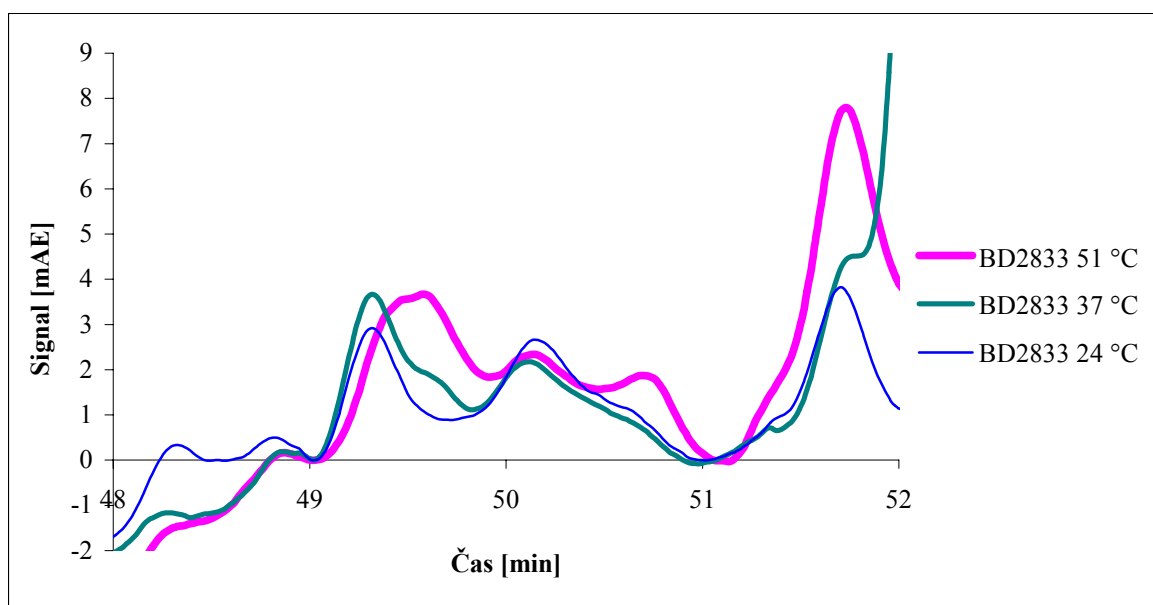
Priloga E: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Izrabljeno gojišče iz posamezne temperature je bilo v treh ponovitvah nanešeno na kolono in rezultati posamezne ponovitve so ločeno prikazani na grafu. Z oblačkom je označeno območje za katerega predvidevamo, da ponazarja feromon ComX (2. gojene bakterijske kulture).



Priloga F: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Izrabljeno gojišče iz posamezne temperature je bilo v treh ponovitvah nanešeno na kolono in rezultati posamezne ponovitve so ločeno prikazani na grafu. Z oblačkom je označeno območje za katerega predvidevamo, da ponazarja feromon ComX (3. gojene bakterijske kulture).



Priloga G: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Frakcije HPLC treh ponovitev izrabljenega gojišča iz posamezne temperature so bile združene in ponovno nanešene na kolono (2. gojene bakterijske kulture).



Priloga H: Kromatogram izrabljenih gojišč producentnega seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX) pridobljenih pri treh različnih temperaturah. Frakcije HPLC treh ponovitev izrabljenega gojišča iz posamezne temperature so bile združene in ponovno nanešene na kolono (3. gojene bakterijske kulture).

New Document

Assay: Standard Curve (AQ)

Container: 384 Wells Clear Plate

Template: Blank Template

Browse...

Barcode:

☐ Save Settings As My Default

OK Cancel

Priloga I: Nastavitve pri novem dokumentu v programu SDS 2.3.

Detector Manager

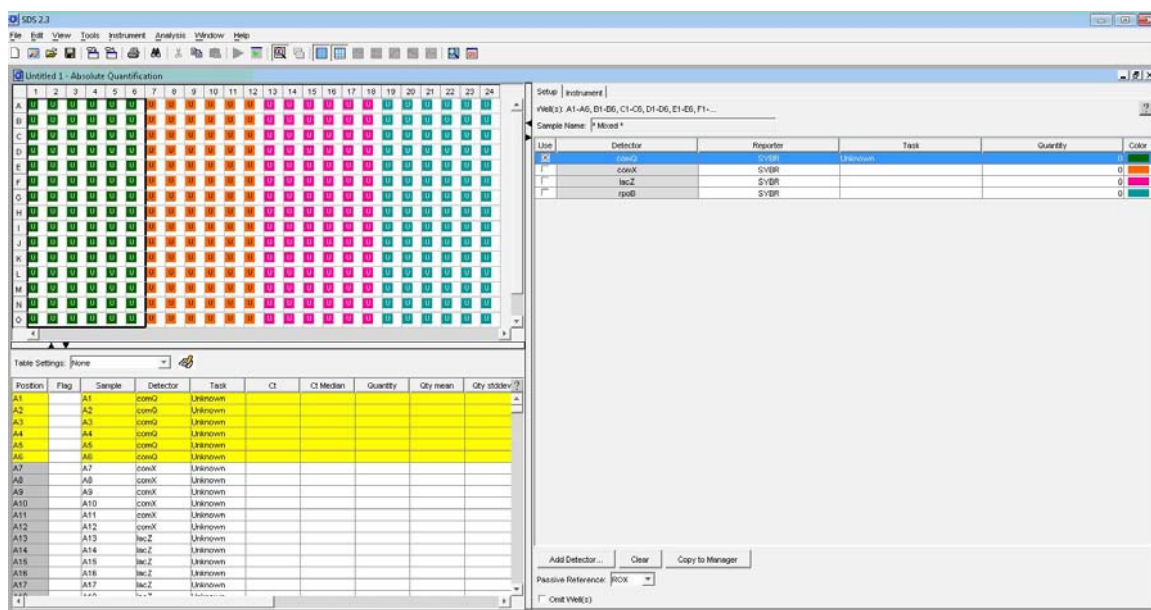
Find:

Group	Name	Reporter	Guencher	Color	...	...	...	...
Default	comQ	SYBR	Non Fluorescent	Green	...	...	...	...
Default	comX	SYBR	Non Fluorescent	Orange	...	...	...	...
Default	lacZ	SYBR	Non Fluorescent	Pink	...	...	...	...
Default	rpoB	SYBR	Non Fluorescent	Teal	...	...	...	...

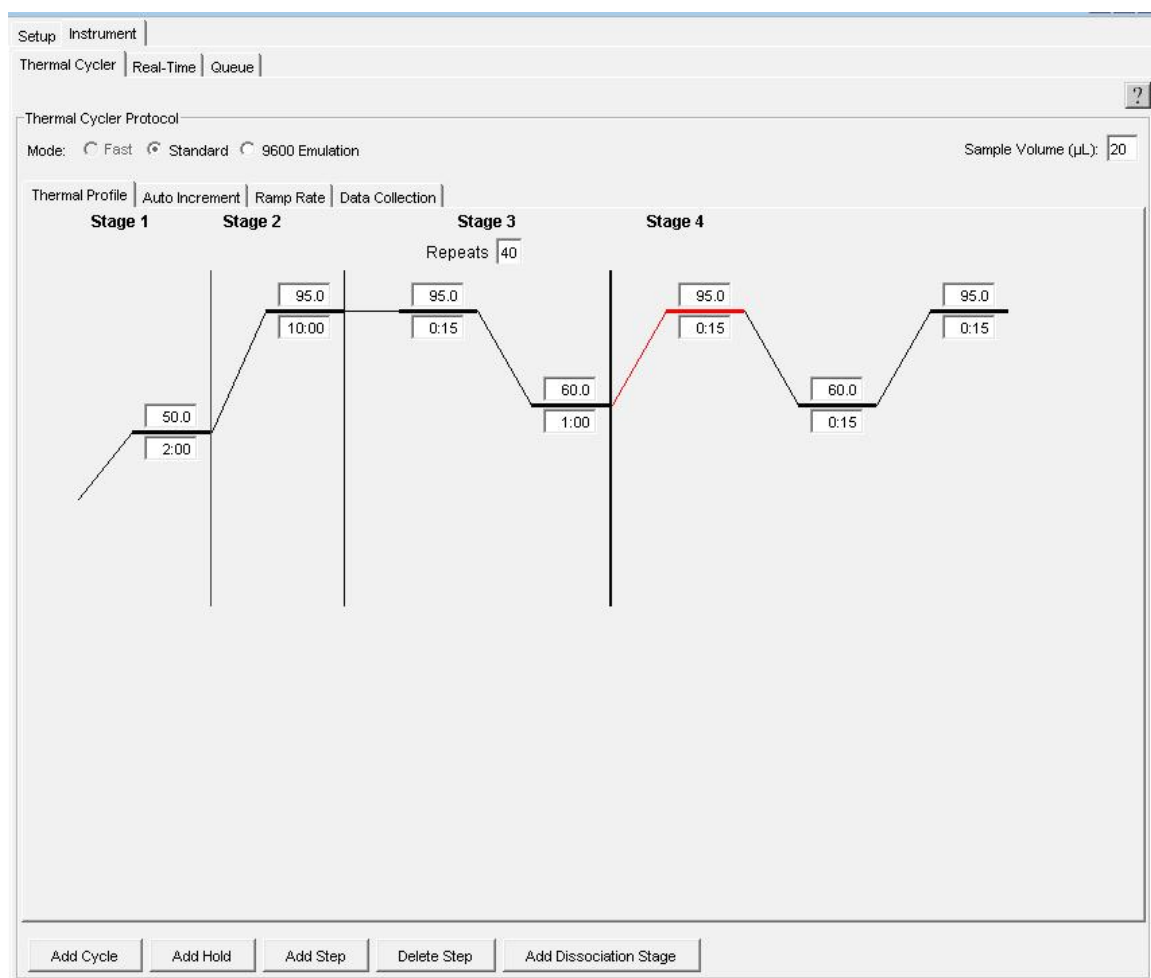
New... Open Delete Tools ▼

Copy To Plate Document Done

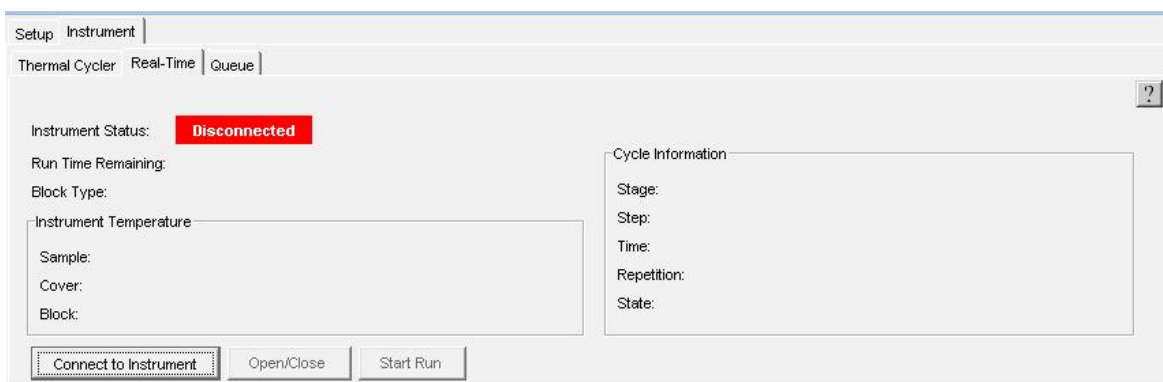
Priloga J: Oznake analiziranih genov s pripadajočimi nastavitvami v programu SDS 2.3.



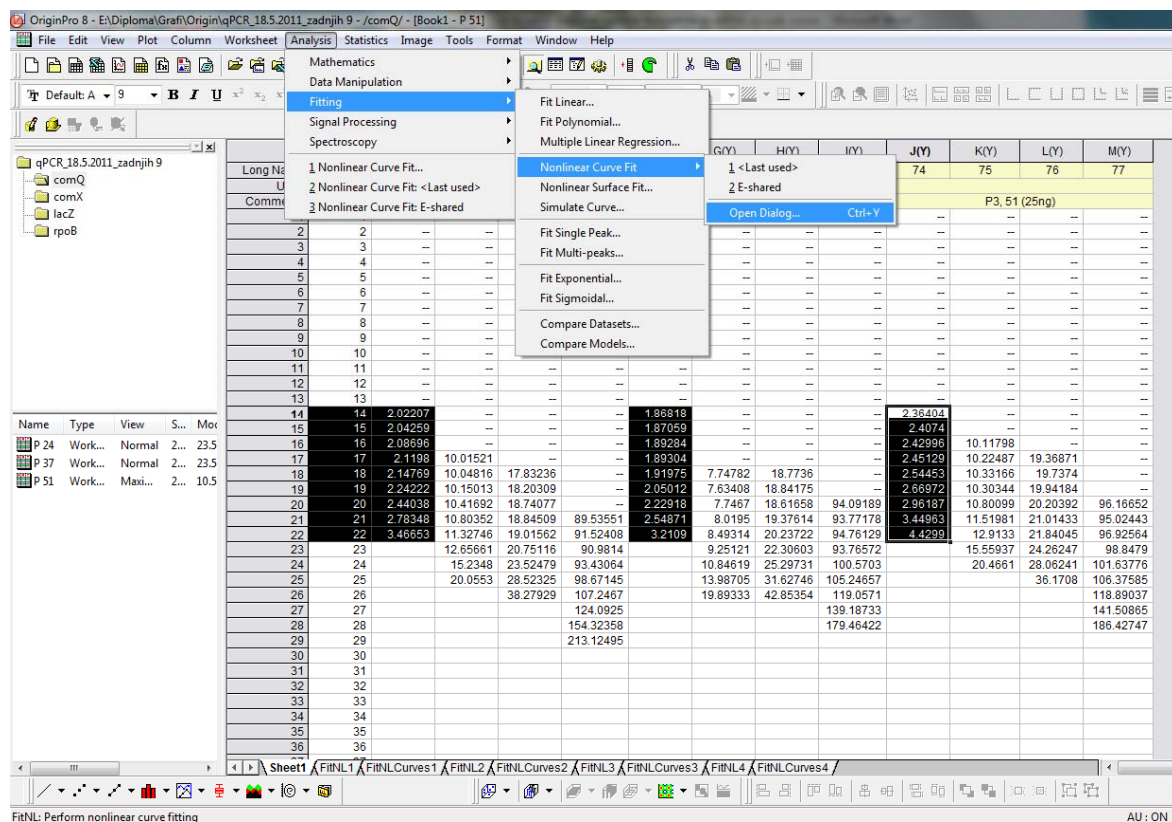
Priloga K: Izbor luknjic mikrotitrerske plošče za analizo izražanja posameznega gena v programu SDS 2.3.



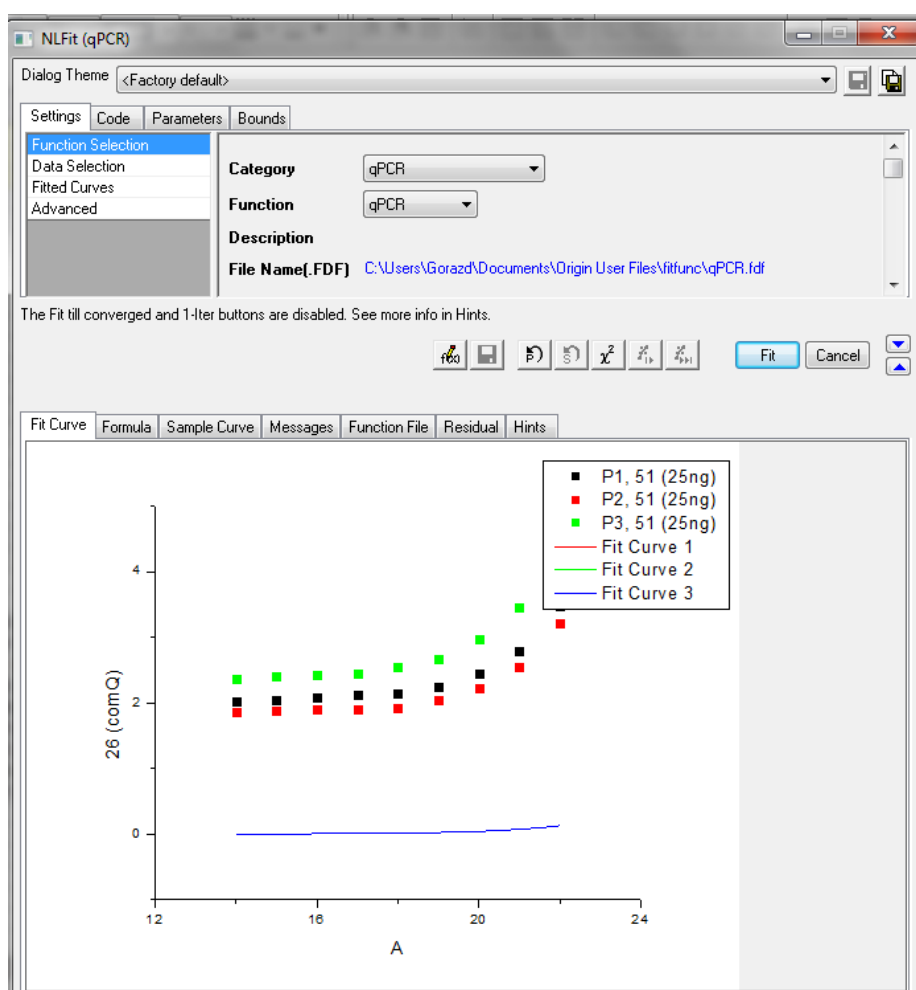
Priloga L: Program za kvantitativni PCR v realnem času v programu SDS 2.3.



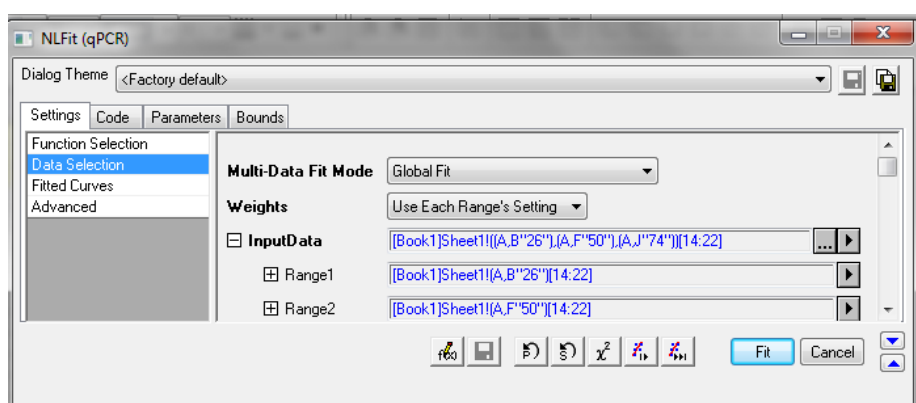
Priloga M: Končni ukazi pred zagonom programa za kvantitativni PCR v realnem času v programu SDS 2.3.



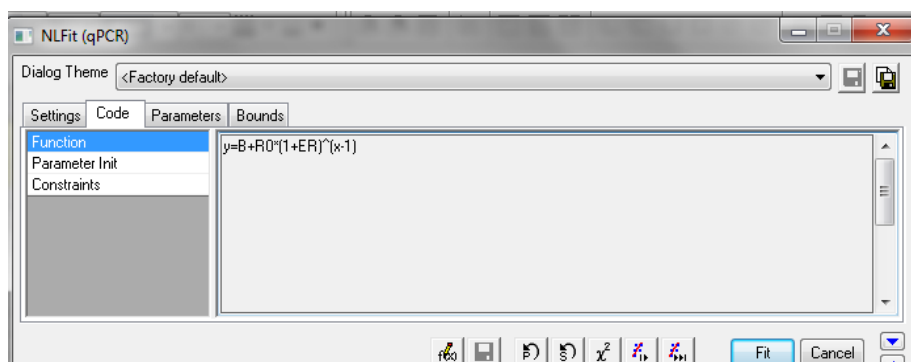
Priloga N: Prikaz zavihkov in ukazov s katerimi odpremo okno za nastavitve poravnave krivulj v programu Origin Pro 8.



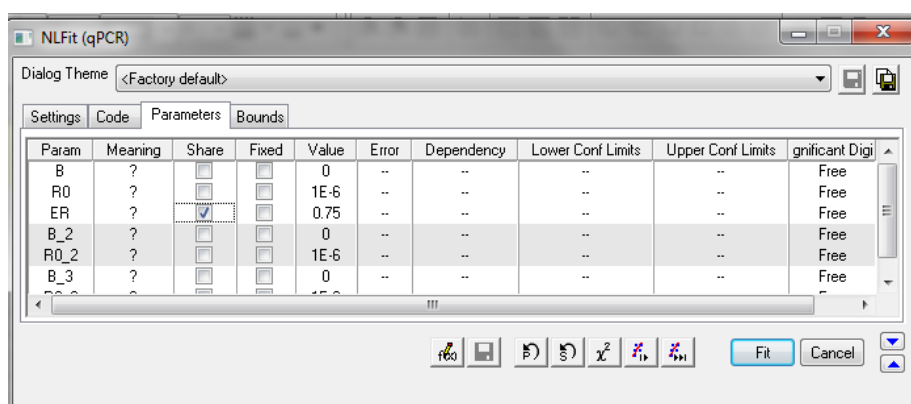
Priloga O: Izbor funkcije poimenovane qPCR v programu Origin Pro 8.



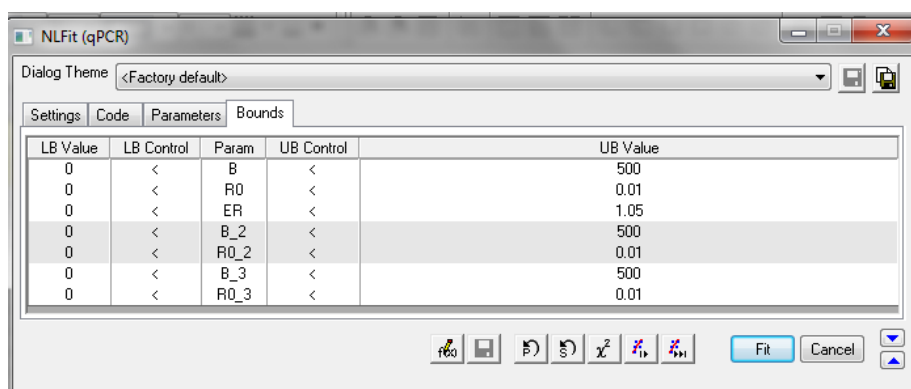
Priloga P: Nastavitve pri zavihku Data Selection v programu Origin Pro 8.



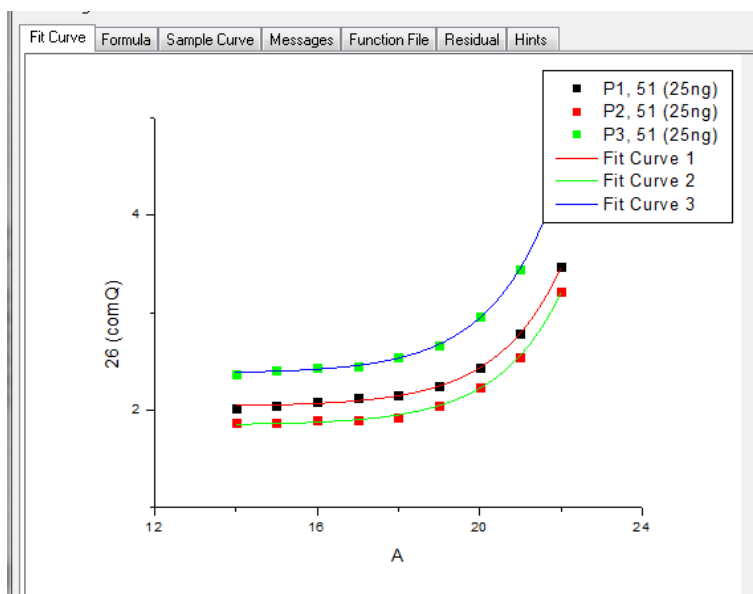
Priloga Q: Enačba izbrane funkcije v programu Origin Pro 8.



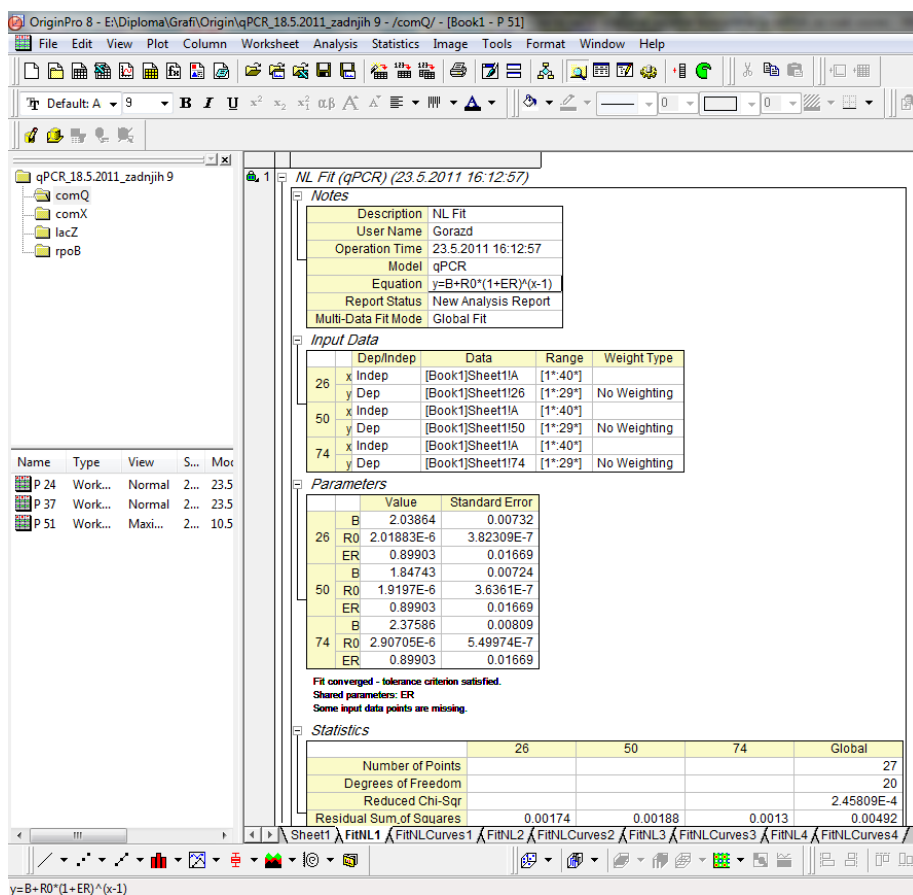
Priloga R: Označitev skupne vrednosti za učinkovitost podvajanja pri zavihku Parameters v programu Origin Pro 8.



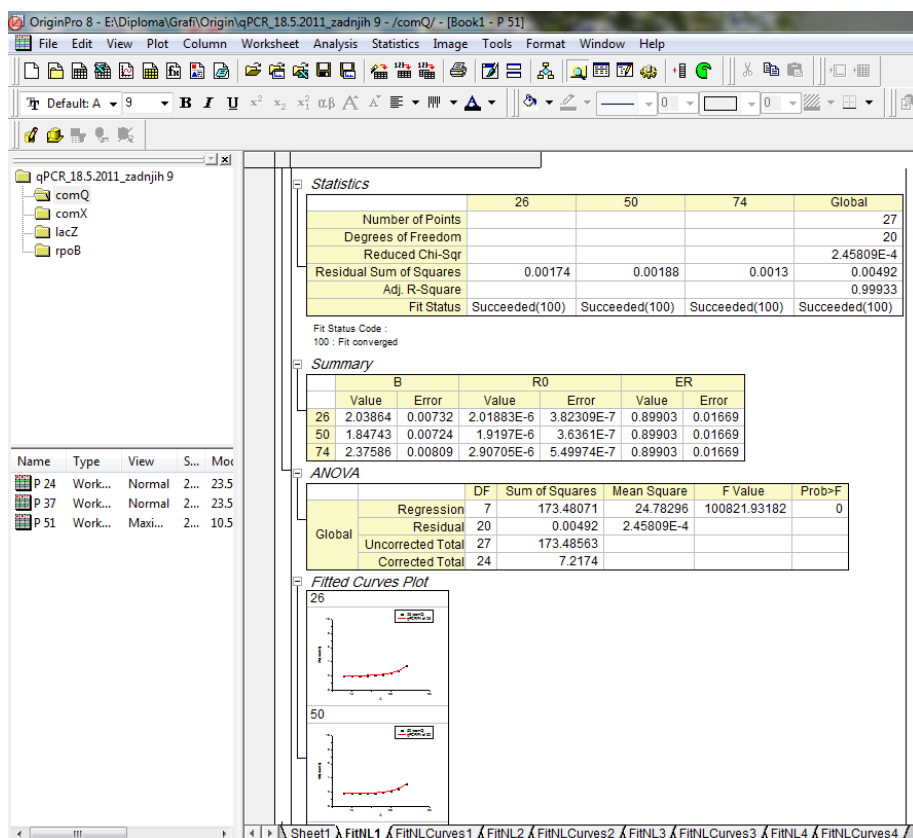
Priloga S: Določitev mejnih vrednosti pri ozadju, začetni koncentraciji in učinkovitosti podvajanja v programu Origin Pro 8.



Priloga T: Poravnane krivulje nastale z izborom ukaza Fit v programu Origin Pro 8.



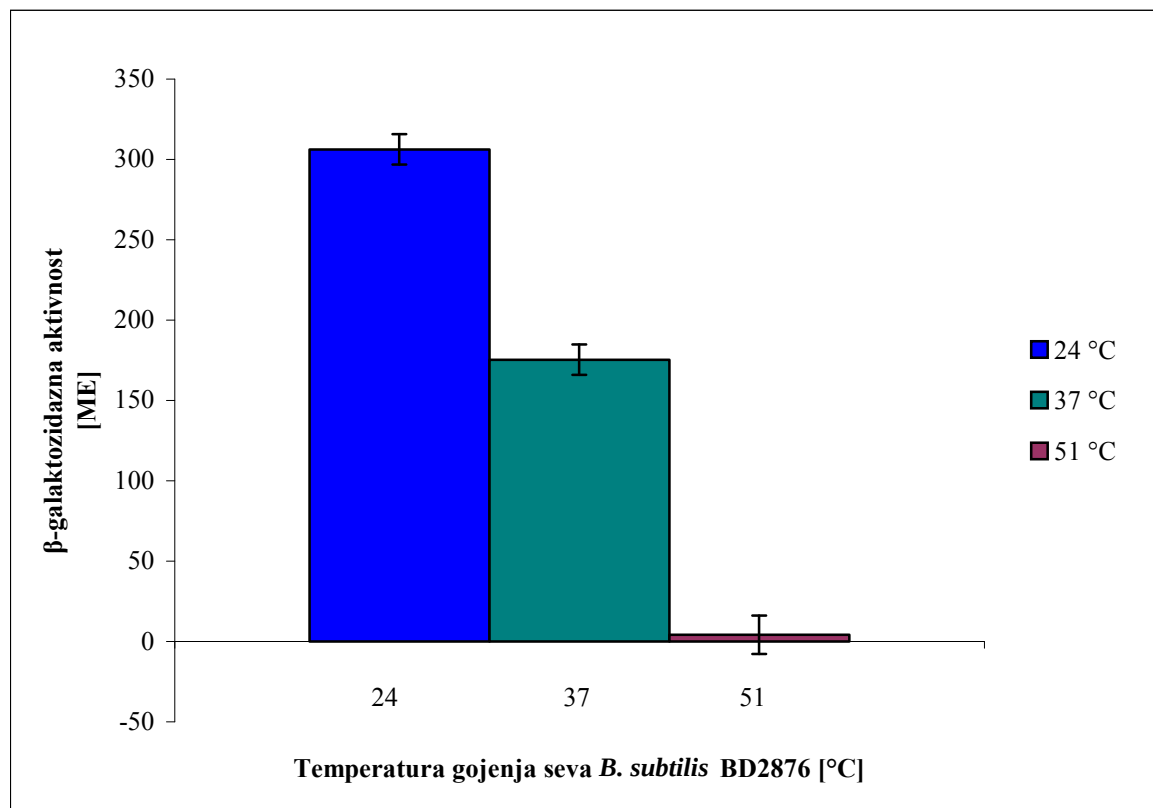
Priloga U: Poročilo poravnave krivulj v programu Origin Pro 8-1. del.



Priloga V: Poročilo poravnave krivulj v programu Origin Pro 8-2. del.

Priloga W: 100.80 minutni program za identifikacijo in kvantifikacijo ComX s HPLC.

Čas [min]	Pretok [mL/min]	ACN + 0,1 % TFA [% mobilne faze]	0,1 % TFA [% mobilne faze]
0.00	1	0	100
20.00	1	0	100
20.02	1	20	80
30.00	1	40	60
30.02	1	40	60
38.00	1	44	56
38.02	1	44	56
58.00	1	48	52
58.02	1	48	52
70.80	1	80	20
80.80	1	80	20
90.80	1	0	100



Priloga X: β -galaktozidazna aktivnost seva *B. subtilis* BD2876 (-ComX – inaktiviran *comQ*, s *srfA-lacZ* fuzijo) gojenega pri treh različnih temperaturah skupaj z izrabljenim gojiščem seva *B. subtilis* BD2833 (+ComX, s *srfA-lacZ* fuzijo) pridobljenim pri 37 °C.