

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mihael ŠPACAPAN

**POVEZAVA MED CELIČNO GOSTOTO, KONCENTRACIJO
SIGNALNEGA PEPTIDA IN ODZIVOM NA SIGNAL PRI
BAKTERIJI *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**CORRELATION BETWEEN CELL DENSITY, SIGNAL PEPTIDE
CONCENTRATION AND SIGNAL RESPONSE OBSERVED IN
*Bacillus subtilis***

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih katedre za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić Mulec, za somentorja asist. dr. Iztok Dogša in za recenzenta doc. dr. Matej Butala.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Somentor: asist. dr. Iztok Dogša

Recenzent: doc. dr. Matej Butala

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: doc. dr. Matej BUTALA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: asist. dr. Iztok DOGŠA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mihael ŠPACAPAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 579.22/.26:579.852.1(043)=163.6
KG *Bacillus subtilis*/komunikacija med celicami/bakterijska signalizacija/signalni peptidi/zaznavanje celične gostote/zaznavanje kvoruma/surfaktin/kompetenca
AV ŠPACAPAN, Mihael, dipl. mikrobiol. (UN)
SA MANDIĆ MULEC, Ines (mentorica)/DOGŠA, Iztok (somentor)/BUTALA, Matej (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2015
IN POVEZAVA MED CELIČNO GOSTOTO, KONCENTRACIJO SIGNALNEGA PEPTIDA IN ODZIVOM NA SIGNAL PRI BAKTERIJI *Bacillus subtilis*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XIII, 55 str., 4 pregl., 4 slik, 4 pril. 77 vir.
IJ SL
JI sl/en
AI V magistrskem delu smo preučevali dinamiko sinteze signala ComX sistema za zaznavanje kvoruma ComQXPA bakterije *Bacillus subtilis* ter odziv, definiran kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona (*srfA-lacZ*), na signal ComX. Aktivnost promotorja smo vrednotili z β -galaktozidaznim testom. Naloga vključuje postavitev matematičnega modela in njegovo eksperimentalno preveritev. Koncentracije signala ComX in odziv bakterije *B. subtilis* na signal ComX smo merili tekom rasti v šaržnem reaktorskem sistemu. Meritve koncentracij signala ComX v gojišču smo izvajali z biosenzorskim sevom BD2876 ($\Delta comQ srfA-lacZ$), občutljivost bakterije na signal ComX z biosenzorskim sevom PS216 ($\Delta comQ srfA-lacZ$), odziv bakterije na signal ComX pa smo merili s poročevalskim sevom PS216 (*srfA-lacZ*). Vsi sevi zaznajo ComX, sintetizira pa ga le poročevalski sev. Poleg tega smo očistili v *E. coli* ED367 heterologno izražen ComX na plazmidu z IPTG inducibilnim promotorjem za meritev koncentracij ComX v gojišču in meritev občutljivosti biosenzorja PS216 na ComX. Ugotovili smo, da pri testiranih pogojih, ComX v gojišču narašča s kvadratom celične gostote. Odziv posamezne celice se je povečeval sorazmerno s hitrostjo rasti bakterijske populacije in občutljivostjo poročevalskega seva PS216 na signal ComX. Odziv zaradi ComX je dosegel maksimum že pri optični gostoti 0,2 a.u. (kar ustreza začetku logaritemsko rastne faze), kjer je bila koncentracija signalnega peptida 700 pM. Kasnejši porast odziva je sorazmeren s hitrostjo rasti bakterijske populacije. Kljub temu se koncentracija signala ComX po začetku logaritemsko rastne faze še vedno povečuje. Ob odsotnosti ComX je odziv pod mejo detekcije. Matematični model se je ujemal z eksperimentalno izmerjenimi vrednostmi odziva poročevalskih celic PS216.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 579.22/.26:579.852.1(043)=163.6
CX *Bacillus subtilis*/intracellular communication/bacterial signalization/signal peptides/
cell density sensing/quorum sensing/surfactin/competence
AU ŠPACAPAN, Mihael
AA MANDIĆ MULEC, Ines (supervisor)/DOGŠA, Iztok (co-advisor)/BUTALA, Matej
(reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TI CORRELATION BETWEEN CELL DENSITY, SIGNAL PEPTIDE
CONCENTRATION AND SIGNAL RESPONSE OBSERVED IN *Bacillus subtilis*
DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XIII, 55 p., 4 tab., 4 fig, 4 ann. 77 ref.
LA SI
AL sl/en
AB We studied the production and response dynamics of *Bacillus subtilis* ComX signal
of ComQXPA quorum sensing system. The response to ComX, defined as the
activity of the surfactin operon (*srfA-lacZ*) promotor was measured via β-
galactosidase assay. ComX concentrations and bacterial response to ComX were
determined in batch culture growth conditions. We quantified subnanomolar
concentrations of ComX signal with biosensor strain BD2876 ($\Delta comQ$ *srfA-lacZ*).
The sensitivity of *Bacillus subtilis* QS to varying ComX concentrations was
determined by biosensor strain PS216 ($\Delta comQ$ *srfA-lacZ*). Finally, we measured the
bacterial response as β-galactosidic activity with the reporter strain PS216 (*srfA-*
lacZ). All of the strains above respond to ComX signal, but only the reporter strain is
able to produce its own ComX signal. In order to quantify ComX concentrations, we
compared the response of biosensor BD2876 to *B. subtilis* PS216 spent media grown
in batch culture, to the response to known concentrations of exogenously added
ComX purified from an *E. coli* expression vector. Our findings conclude that ComX
concentration is proportional to the square of bacterial population size. Bacterial
response per cell was proportional to the bacterial population growth rate and
bacterial sensitivity of the PS216 *B. subtilis* strain to ComX. The increase in
response above OD₆₅₀ 0,2 a.u. could not be attributed to the increase in ComX, since
ComX concentration at that point, reaches the threshold concentration of 700 pM. At
this concentration, bacterial sensitivity to ComX remains constant, insensitive to
further increase of ComX concentration. Afterwards the cell response increment was
proportional to the cell population growth rate. However, ComX concentration in
batch culture spent media where the PS216 strain was grown kept increasing with
population size. In the absence of ComX there was no observed response. The
mathematical model fits the experimental data.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|--|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)..... | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VII |
| KAZALO SLIK | VIII |
| KAZALO PRILOG | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |
| SLOVARČEK..... | XII |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 ZAZNAVANJE KVORUMA PRI BAKTERIJAH | 3 |
| 2.2 DVOKOMPONENTNI SISTEMI BAKTERIJE <i>Bacillus subtilis</i> | 5 |
| 2.3 SISTEM ComQXPA BAKTERIJE <i>Bacillus subtilis</i> | 6 |
| 3 MATERIAL IN METODE | 10 |
| 3.1 REAGENTI | 10 |
| 3.2 MATERIAL ZA ENKRATNO UPORABO | 11 |
| 3.3 APARATURE | 12 |
| 3.4 SEVI | 13 |
| 3.5 ZALOŽNE RAZTOPINE..... | 13 |
| 3.5.1 Antibiotiki | 13 |
| 3.5.2 Reagenti | 14 |
| 3.5.3 Raztopine soli, pufri in založne raztopine za gojišča..... | 15 |
| 3.5.4 Filtrirane raztopine aminokislin | 17 |
| 3.5.5 Avtoklavirane raztopine aminokislin | 17 |
| 3.5.6 Agarizirana gojišča..... | 17 |
| 3.5.7 Tekoča gojišča..... | 18 |
| 3.6 METODE | 19 |
| 3.6.1 Priprava izrabljenega gojišča <i>E. coli</i> ED367..... | 19 |
| 3.6.2 Čiščenje ComX iz izrabljenega gojišča <i>E. coli</i> ED367 s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti..... | 20 |
| 3.6.3 β-galaktozidazni test v mikrotitrskih ploščah z biosenzorjem | 20 |
| 3.6.4 Meritve β-galaktozidazne aktivnosti seva poročevalca | 22 |
| 3.6.5 Gojenje sevov v zaprtem šaržnem bioreaktorskem sistemu..... | 22 |
| 3.6.6 Meritve odziva QS v odvisnosti od koncentracije ComX | 23 |
| 3.6.7 Priprava mikrotitrskih plošč za določanje koncentracije ComX v izrabljenem gojišču..... | 23 |
| 3.7 IZRAČUNI | 24 |
| 3.7.1 Določevanje koncentracije ComX v HPLC frakciji | 24 |
| 3.7.2 Izračun aktivnosti β-galaktozidaze | 25 |
| 3.7.3 Izločanje osamelcev | 26 |
| 3.7.4 Prileganje podatkov in reševanje diferencialnih enačb | 27 |
| 3.7.5 Izračun koncentracije ComX v izrabljenem producentskem gojišču | 27 |
| 3.7.6 Korekcija optične gostote..... | 28 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4 | REZULTATI..... | 29 |
| 4.1 | MODELIRANJE SINTEZE SIGNALA | 29 |
| 4.1.1 | Empirična potrditev modeliranja sinteze signala..... | 30 |
| 4.2 | MODELIRANJE ODZIVANJA NA SIGNAL | 33 |
| 4.2.1 | Empirična potrditev modeliranja odzivanja na signal | 37 |
| 5 | RAZPRAVA..... | 40 |
| 5.1 | DINAMIKA SINTEZE SIGNALA..... | 40 |
| 5.2 | DINAMIKA ODZIVANJA NA SIGNAL | 42 |
| 6 | SKLEPI | 45 |
| 7 | POVZETEK | 46 |
| 8 | VIRI | 48 |
| | ZAHVALA | |
| | PRILOGE | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|--|------|
| Preglednica 1: V nalogi uporabljeni reagenti | 10 |
| Preglednica 2: V nalogi uporabljen material za enkratno uporabo. | 11 |
| Preglednica 3: V nalogi uporabljene aparature..... | 12 |
| Preglednica 4: V nalogi uporabljeni bakterijski sevi in genotipi sevov. | 13 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|------|
| | str. |
| Slika 1: Časovni odvisnosti koncentracije signala ComX (■) in korigirane optične gostote pri 650 nm (●) v gojišču gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$). Prikazana je ena izmed 3 bioloških ponovitev. Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odkloni. | 31 |
| Slika 2: Odvisnost koncentracije ComX (●) od absorbance celic pri 650 nm za sev gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$). Prikazano je najboljše prileganje z Enačbo 11 (rdeča krivulja) skupaj s 95 % intervalom zaupanja prileganja (zelena krivulja). Prikazana je ena izmed 3 bioloških ponovitev. Eksperimentalne napake so standardni odkloni..... | 32 |
| Slika 3: Normalizirane meritve β -galaktozidazne aktivnosti biosenzorja 2(PS216, $\Delta comQ$ <i>srfA-lacZ</i>) v odvisnosti od koncentracije ComX za pet neodvisnih ponovitev. Prikazana je regresija vsem meritvam z Enačbo 15 (polna črta) skupaj s 95 % intervalom zaupanja regresije (prekinjena črta). Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odkloni posameznih setov meritev. | 35 |
| Slika 4: Časovni odvisnosti β -galaktozidazne aktivnosti (■), ki predstavlja celični odziv izražen na celico z modeliranimi vrednostmi iz Enačbe 20 (črna krivulja) in optične gostote kulture OD ₆₅₀ (■) z vrisanim prileganjem Enačbe 21 (zelena krivulja) za poročevalski sev (PS216, <i>srfA-lacZ</i>). Celični odziv posamezne celice predstavlja teoretične modelirane vrednosti odziva bakterije na ComX (leva stran Enačbe 20) in empirično izmerjeno β -galaktozidazne aktivnost. Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odmiki. Predstavljena je ena izmed 3 neodvisnih ponovitev..... | 38 |

KAZALO PRILOG

Priloga A: Potek programa izvedbe HPLC.

Priloga B: Graf odvisnosti korigirane optične gostote izmerjene pri 650 nm (■) od časa za poročevalske celice (PS216, *srfA-lacZ*) Z rdečo je vrisana logistična funkcija prikazana v Enačbi 21, z zeleno pa njen 95 % interval zaupanja. Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odkloni meritev. Prikazana je rastna krivulja istega seva kot na Sliki 4.

Priloga C: Eksperimentalna krivulja za 3. časovno točko na Slikah 1 in 2. β -galaktozidazne aktivnosti (■) biosenzorja 1 (BD2876, $\Delta ComQ$ *srf-lacZ*) v odvisnosti od izrabljenega gojišča gluhega producenta (PS216, $\Delta ComP$) gojenega v fermentorju. Vrisana je Hill-ova nelinearna regresija (rdeča črta) s 95 % intervalom zaupanja regresije (zeleno črta). Prikazane eksperimentalne napake so standardne napake.

Priloga D: Umeritvena krivulja za 3. časovno točko na Slikah 1 in 2 β -galaktozidazne aktivnosti (■) biosenzorja 1 (BD2876, $\Delta ComQ$ *srf-lacZ*) v odvisnosti od znane količine s HPLC prečiščenega signala ComX. Vrisana je Hill-ova nelinearna regresija (rdeča črta) s 95 % intervalom zaupanja regresije (zeleno črta). Prikazane eksperimentalne napake so standardne napake.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-----------------------|--|
| a.u. | absorbančne enote |
| <i>a</i> | 1. parameter prileganja funkcije $SM(N(t))$ |
| ACN | acetonitril |
| amp | ampicilin |
| <i>b</i> | 2. parameter prileganja funkcije $SM(N(t))$ |
| BSA | goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumine) |
| cat | kloramfenikol |
| <i>d</i> | časovni zamik odziva |
| glu | glutamat |
| his | histidin |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| IPTG | isopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid; analog alolaktoze |
| kan | kanamicin |
| <i>Km</i> | 3. parameter prileganja funkcije $W(SM)$, koncentracija SM pri 50 % V_{max} |
| <i>lacZ</i> | gen v laktoznem operonu, potreben za presnovo laktoze |
| LB | Luria-Bertani |
| leu | levcin |
| met | metionin |
| MU | Millerjeve enote |
| <i>n</i> | 2. parameter prileganja funkcije $W(SM)$, faktor kooperativnosti |
| <i>N</i> | celična gostota |
| neo | neomicin |
| OD ₆₅₀ | optična gostota pri 650 nanometrih izražena v absorbančnih enotah [a.u.] |
| ONPG | orto-nitrofenil- β -galaktozid |
| phe | fenilalanin |
| <i>R</i> | nivo celičnega odziva populacije |
| <i>R</i> ₀ | prekonočni odziv β -galaktozidaze |
| <i>SM</i> | signalna molekula |
| <i>t</i> | čas inkubacije |
| TBAB | agarsko gojišče z encimskim hidrolizatom proteinov |

| | |
|-----------|---|
| tet | tetraciklin |
| TFA | trifluoroacetna kislina |
| V_{max} | 1. parameter prileganja funkcije $W(SM)$, maksimalni odziv |
| $W(SM)$ | funkcija celičnega odziva v odvisnosti od gostote bakterij |
| Q | sorazmernostna konstanta |

SLOVARČEK

Biosenzor 1: Sev *Bacillus subtilis* BD2876 z okvarjenim genom *comQ*. Mutacija mu onemogoča sintezo lastnega signala ComX, lahko pa se nanj odziva. Odziv je definiran kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona. Vključen ima poročevalski gen *lacZ* brez lastnega promotorja katerega izražanje je pod uravnavo promotorja surfaktinskega operona *srfA*, kar omogoča kvantifikacijo odziva na signal ComX z β -galktozidaznim testom. Operon *srfA* je sicer odgovoren za sintezo surfaktina. Sev smo uporabili za določanje koncentracij ComX v izrabljenih gojiščih poročevalca *B. subtilis* PS216.

Biosenzor 2: Sev *Bacillus subtilis* PS216 z okvarjenim genom *comQ*. Njegove lastnosti so enake kot navedene za sev Biosenzor 1 le z genetskim ozadjem drugega seva. Sev smo uporabljali za določanje občutljivosti bakterije *B. subtilis* na signal ComX.

Gluhi producent: Sev *Bacillus subtilis* PS216 z okvarjenim genom *comP*. Mutacija mu onemogoča odziv na signal ComX, lahko pa ga sintetizira. Sev z nativnim operonom *srfA*. Sev smo gojili v zaprtem šaržnem reaktorju in določevali koncentracijo ComX signala v izrabljenem gojišču.

HPLC ozadje: Mešanica mobilnih faz visokotlačne kromatografske kolone, brez eluatov. Uporabljali smo ga pri določevanju koncentracije ComX z biosenzorjem 1. Dodatek ozadja za meritve krivulje v Prilogi C ustreza dodatku HPLC frakcije za meritve umeritvene krivulje v Prilogi D brez ComX.

Kvorum: Sklepčnost populacije oz. bakterijska gostota, pri kateri se sintetizira dovolj signala, da ta posredno uravnava tarčne gene oz. sproži odziv.

Nemi tester: Sev *Bacillus subtilis* PS216 z okvarjenim genom *comQ*. Mutacija mu onemogoča sintezo lastnega signala ComX. Sev z nativnim operonom *srfA*. Sev smo uporabljali za redčenje izrabljenega gojišča gluhega producenta in kot ozadje pri umeritveni krivulji med določevanjem koncentracije ComX signala seva gluhega producenta gojenega v zaprtem šaržnem reaktorju.

Odziv: Spremenjen vzorec izražanja genov, kot posledica zaznave signala. V tem delu je odziv definiran kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona (*srfA-lacZ*) merjena posredno preko β -galaktozidazne aktivnosti.

Pearsonov koeficient: Koeficient, ki vrednoti kakovost linearne zveze med spremenljivkama za dane izmerjene podatke.

Sev poročevalec: Sev *Bacillus subtilis* PS216 z genom *lacZ* brez lastnega promotorja pod uravnavo promotorja gena za operon *srfA*. Sev lahko sintetizira signal ComX in se nanj tudi odziva. Sev nam je služil kot referenca za divji tip in za končno empirično potrditev postavljenih modelov.

Signal: Molekula, ki jo celica izloča v zunajcelični prostor. Tam vpliva na istovrstne celice z receptorji za ta signal, vključujuč samo sebe. Pri *Bacillus subtilis* je signal modificiran peptid ComX.

1 UVOD

Za bolj celostno razumevanje biologije bakterije *Bacillus subtilis*, moramo poleg lastnosti posamezne celice preučevati tudi lastnosti celotne bakterijske populacije (Shapiro, 1998). Značilnost te bakterije je, da se tekom rasti diferencira v različne specializirane celice oziroma subpopulacije (npr. producentke matriksa, spore, kompetentne celice, gibljive celice, producentke zunajceličnih encimov). Bakterija *B. subtilis* koordinira to diferenciacijo tudi z zaznavanjem lastnih signalnih molekul, ki se kopijo v zunajceličnem prostoru, po principu, ki je analogen autokrini signalizaciji evkariontskih celic višjih organizmov (López in sod., 2009). Eden izmed načinov komunikacije poteka preko isopreniliranega oligopeptida ComX, ki sproži odziv celic pri visoki gostoti bakterij (Ansaldi in sod., 2002) in je kodiran na operonu za zaznavanje kvoruma, *comQXPA*. Ta nosi zapis za 4 peptide, ComQ, ki procesira in modificira signal ComX, signal ComX, receptor ComP, ki ga ComX aktivira in transkripcjski regulator ComA. Aktivacija ComP sproži njegovo avtofosforilacijo in prenos fosfata na ComA (Weinrauch in sod., 1990; Roggiani in Dubnau 1993; Dubnau in sod., 1994). ComA-P pozitivno uravnava surfaktinski operon (*srfA*), ki je odgovoren za sintezo surfaktina (Nakano in sod., 1988). Torej je kopiranje tega potencialno industrijsko pomembnega lipopeptidnega antibiotika in surfaktanta (Peypoux in sod., 1999) posledica odziva na signal ComX. Dinamika sinteze in odzivanja bakterij na signale je še slabo poznana (Hense in Schuster, 2015). Zelo malo je kvantitativnih podatkov, ki bi nam omogočili natančneje razumeti, kako komuniciranje bakterij poteka in deluje (Drees in sod., 2014; Hense in Schuster, 2015). Zato smo v sklopu te magistrske naloge modelirali dinamiko sinteze signala in odzivanja (definiranega v tem delu kot aktivnost promotorja *srfA*) nanj v zaprtem bioreaktorskem sistemu.

Cilji magistrske naloge so bili:

- Ugotoviti morebitno odvisnost med celično gostoto bakterije *B. subtilis* in sintezo izvenceličnega signala ComX.
- Ugotoviti občutljivost bakterije na različne koncentracije signala ComX s spremeljanjem aktivnosti promotorja surfaktinskega operona (*srfA-lacZ*) z merjenjem aktivnosti β -galaktozidaze.
- Modelirati dinamiko odziva, definiranega kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona (*srfA-lacZ*), v zaprtem bioreaktorskem sistemu bakterije *B. subtilis* na signal ComX.

Predpostavili smo naslednje hipoteze:

- Sinteza signala ComX je pri *Bacillus subtilis* PS216 eksponentno sorazmerna s celično gostoto.
- Odziv posamezne celice, definiran kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona, *B. subtilis* PS216 je sorazmeren z občutljivostjo bakterije na signal ComX in hitrostjo rasti celične populacije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZAZNAVANJE KVORUMA PRI BAKTERIJAH

Celice komunicirajo med seboj z izvenceličnimi molekulami, ki uravnavajo izražanje genov v odvisnosti od celične gostote. Pojav so opazili prvič pri bakterijski bioluminiscenci v svetilnih organih višjih organizmov (Nealson in Hastings, 1979). Ko koncentracija signalne molekule doseže kritično mejo, se aktivirajo signalne kaskade, te pa preusmerijo RNA polimeraze k prepisu specifičnih tarčnih genov ali pa preprečijo njihov prepis (Atkinson in Williams, 2009). Preusmeritev polimeraze k tarčnim genom smatramo kot odziv bakterije. Pri bakteriji *B. subtilis*, v tem magistrskem delu, je to aktivnost promotorja surfaktinskega operona. Sistemi zaznavanja kvoruma omogočajo koordinacijo med celicami, sinhronizacijo odzivov populacije na okoljske spremembe, obrambo pred tujimi mikroorganizmi in prilagoditev na stres (Miller in Bassler, 2001; Darch in sod., 2012; Williams, 2007; Diggle in sod., 2007). Pogosto bo signal sprožil tudi prepis lastnega gena zaradi pozitivne povratne zanke (Whitehead in sod., 2001). Slednji mehanizem tudi omogoča pojav bistabilnega izražanja genov (Hense in Schuster, 2015).

Signale najpogosteje klasificiramo na podlagi njihove kemiske strukture. Pri po Gramu negativnih bakterijah so to najpogosteje N-acil homoserin laktoni (AHL) (Dunlap, 1997), in drugi derivati dolgoverižnih maščobnih kislin (Whitehead in sod., 2001). Pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa najpogosteje najdemo modificirane linearne ali ciklične peptide (Kleerebezem in sod., 1997). Po Gramu negativne (Fuqua in sod., 1994) in po Gramu pozitivne (Kleerebezem in sod., 1997) bakterije imajo dvokomponentne sisteme in histidinske kinaze s fosfatnimi kaskadami, s katerimi zaznavajo in prevajajo signale. Za signale je značilno, da se akumulirajo izven celice, da jih specifično prepoznajo receptorji in da ne sprožijo le prepisa genov za lastno detoksifikacijo ali presnova (Atkinson in Williams, 2009). Sistem signaliziranja mora zagotoviti posredno ali neposredno evolucijsko korist za bakterije, ki se na signal odzovejo. Prav tako prisluškovanje signalu, kjer se celica odziva na signal, sama pa ga ne proizvaja, ne uvrščamo v medcelično komunikacijo (Hense in Schuster, 2015).

Koncentracija signala v okolici ni odvisna le od celične gostote, temveč tudi od difuzijskih lastnosti signala v določenem okolju (Hense in sod., 2007). Celica, ki se odzove na signal,

bi tako lahko pri konstantni celični gostoti zaznavala le difuzijo signala v okolje, pri majhni difuzibilnosti, bi se signal kopičil v bližini receptorjev (Redfield, 2002). Tudi prostorska distribucija celic je v nehomogenih sistemih zelo pomembna. V celičnih skupkih je lokalna koncentracija signala večja, zato sistem za zaznavanje kvoruma (QS; quorum sensing) lahko poimenujemo kot sistem zaznavanja učinkovitosti (ES; Efficiency sensing), kjer je indukcija odziva (QS) odvisna tudi od difuzibilnosti signala in prostorske razporeditve celic in ne le od absolutne koncentracije signala (Hense in sod., 2012; Hense in sod., 2007).

Redfield (2002) meni, da QS sistemi ne omogočajo medceličnega komuniciranja, temveč le zaznavanje difuzibilnosti okolja, v katerem se posamezna bakterija nahaja. Tako naj bi posamezna bakterija z izločanjem signala prvotno zaznavala lastnosti okolja in preprečila neučinkovito sintezo izvenceličnih encimov okolju, kjer bi encimi takoj difundirali stran od celice. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* s sistemom zaznavanja kvoruma uravnava predvsem izločanje izvenceličnih encimov, surfaktantov in toksinov (Schuster in Greenberg, 2006). Redfield (2002) prav tako prigovarja, da QS ne omogoča medceličnega komuniciranja, saj je QS sistem dovzet za izkoriščanje s strani celic goljufov, ki koristijo skupne celične dobrine bakterijske kulture, a se na signale ne odzivajo. Vendar pa lahko bakterije preprečijo pojav goljufov z lokalizacijo sorodnih bakterij v prostorsko ločene mikrokolonije, kjer vse celice sodelujejo. V takšnih mikrokolonijah goljufi propadejo (Hense in sod., 2012). QS uravnava tudi vitalne procese v nekaterih bakterijah, zato je ohranjanje QS in kooperacija ključna za preživetje teh bakterij (Hense in Schuster, 2015). Na primer, Xavier in Bassler (2003) pokažeta, da je sinteza signala sklopljena z mehanizmom detoksifikacije stranskih produktov v centralnem metabolizmu *Vibrio harveyii*. Oslizlo in sod. (2014) pa pokažejo, da je mutacija v sintezi signalne molekule povezana s preveliko občutljivostjo na signal, kar metabolno iztroši celice *B. subtilis*. Youk in Lim (2014) z eksperimentom pri kvasovkah tudi izmerita kakšen delež odziva botruje zaznavanju signala, katerega je sintetizirala celica sama, in delež odziva zaradi signala sosednjih celic. Slednje potrjuje, da zaznavanje kvoruma ni sebično temveč kooperativno vedenje bakterij.

2.2 DVOKOMPONENTNI SISTEMI BAKTERIJE *Bacillus subtilis*

Modelni organizem, katerega smo preučevali v tem magistrskemu delu, bakterija *B. subtilis*, je sposoben diferenciacije v “sporulirajoče celice”, “nomadske celice”, “producente biofilma”, “kanibalistične celice”, “kompetentne celice” in “rudarske celice” (López in Kolter, 2010). Bakterije lahko diferencirajo v različne fenotipe zaradi sprememb v svojem okolju, kar lahko zaznavajo z dvokomponentnimi sistemi (Hoch, 2000). Dvokomponentni sistemi bakterij uravnavajo celično diferenciacijo, kemotakso, polzenje, metabolizem dušika in fosfata, odpornosti na antibiotike, kompetenco, in virulenco (Grebe in Stock, 1999; Capra in Laub, 2012). Vključeni so tudi v zaznavanje kvoruma (Kleerebezem in sod., 1997; Miller in Bassler, 2001). Dvokomponentni sistemi so sestavljeni iz senzorske domene, ki zaznava spremembe v okolju in nato avtofosforilira lasten histidinski rep, ki prenese fosfatno skupino na aspartatni rep regulatorja transkripcije. Ta se po prejemu fosfatne skupine zaradi konformacijske spremembe aktivira in uravnava prepis genov (Tanaka in sod., 1998).

Poleg dvokomponentnih sistemov bakterijski prepis genov uravnava jo tudi sigma dejavniki. Vsaka molekula holoencima RNA polimeraze vsebuje posamezen sigma dejavnik, ki omogoči RNA polimerazi prepoznavo promotorskih elementov in prepis tarčnih genov (Madigan in sod., 2009). Sigma dejavnik A ali σ^A je aktiven med normalno rastjo bakterije *B. subtilis*. Produkti genov, katerih prepis uravnava σ^A uravnava jo tudi kompetenco bakterije *B. subtilis* in nekatere druge adaptivne odzive (Haldenwang, 1995; Kobayashi in sod., 2003). DNA prepoznavna mesta in funkcije preostalih 8 sigma dejavnikov (npr σ^F , σ^E , σ^B in druge) pa lahko najdemo v podatkovni bazi DTBS (Database of transcriptional regulation of *B. subtilis*) (Makita in sod., 2004).

Pri bakteriji *Bacillus subtilis* so histidinske kinaze vpletene pri dvokomponentnem sistemu kemotakse (CheA-CheY), uravnavanju metabolizma fosforja (PhoR-PhoP), uravnavanju anaerobnega metabolizma (ResE-ResD), uravnavanju sinteze hidrolitičnih encimov (DegS-DegU), uravnavanju avtolize (LytS-LytT) in končno tudi ComP-ComA, ki kot dvokomponentni sistem sodeluje v zaznavanju kvoruma in uravnavanju kompetence (Fabret in sod., 1999). Ta omogoča bakteriji *B. subtilis* privzem izvencelične DNA

(Dubnau, 1991). Sistem ComP-ComA pa uravnava tudi prepis genov operona *srfA* (Nakano in sod., 1991a; Nakano in sod., 1991b; Nakano in sod., 1988).

V tem magistrskem delu smo spremljali aktivnost promotorja operona *srfA* sklopljenega s poročevalskim genom *lacZ* brez lastnega promotorja, ki kodira za encim β -galaktozidazo. Operon je ključen pri kompetenci *B. subtilis*, saj bakterije ne postanejo kompetentne v kolikor se geni operona *srfA* ne izražajo že tekom logaritemske faze rasti (Nakano in sod., 1991a; Nakano in Zuber, 1991; Nakano in Zuber, 1993; Dubnau, 1991).

2.3 SISTEM ComQXPA BAKTERIJE *Bacillus subtilis*

Izvencelični signal ComX posredno uravnava transkripcijo genov surfaktinskega operona (*srfA*) (Magnuson in sod., 1994). Za sintezo ComX sta potrebna gena: *comQ* in *comX* (Weinrauch in sod., 1991; Schneider in sod., 2002). Mutacije v teh genih onemogočijo sintezo ComX. V genu *comX* je zapis za 55 aminokislin dolg prekurzor za signal ComX. Mutacije v ohranjenem triptofanu različnih ComX sevov *B. subtilis* naredijo signal nefunkcionalen (Schneider in sod., 2002). Za sintezo signala ComX sta potrebna izključno gena *comX* in *comQ* (Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002), zato lahko z vnosom teh dveh genov v ekspresijski vektor sintetiziramo biološko aktiven signal ComX. Signal ComX je po cepitvi prekurzorja s proteinom ComQ (Okada in sod., 2006) sestavljen iz 5 do 10 aminokislin (Ansaldi in sod., 2002). Na ohranjenem triptofanu ima modifikacijo, ki amino skupino poveže z dvojnim obročem v triptofanu, da ustvari novo triciklično strukturo v triptofanskem ostanku (Okada in sod., 2005). Na ohranjenem triptofanu ima tudi pripeto farnezilno ali geranilno skupino. Skupina je pripeta na gama ogljiku triptofana (pozicija 3). Če je farnezilna ali geranilna skupina umetno pripeta kjerkoli drugje na triptofanskem ostanku signal ComX izgubi biološko aktivnost (Okada, 2011). Modifikacija signala je zelo pomembna in specifična za njegovo biološko aktivnost (Ansaldi in sod., 2002). Modifikacija s farnezilno ali geranilno skupino poveča maso signala (Ansaldi in sod., 2002) in njegovo hidrofobnost (Okada in sod., 2006). Modifikacijo izvede protein ComQ, ki ima ohranjeno vezavno mesto za izoprenoide (Okada in sod., 2006). Mutacija v tem mestu onemogoči isoprenilacijo (Okada, 2011).

Bakterija *B. subtilis* zaznava signal s histidinsko kinazo ComP, ki ima večjo hidrofobno domeno na amino-terminalnem koncu z 8 elementi, ki prehajajo celično membrano in

protein zasidrajo v njej, ter hidrofilen karboksi-terminalen konec, ki gleda v notranjost celice (Weinrauch in sod., 1990). Prvi štirje segmenti proteina ComP na amino-terminalnem koncu in na ekstracelularni strani celice oblikujejo dve zanki, ki sta ključni za odziv na ComX. Delecija druge zanke povzroči neodvisnost odziva ComP od ComX (Piazza in sod., 1999) kar pomeni, da je ta zanka verjetno vpletena v zaznavanje ComX.

Ko ComP zazna ComX, se senzorska kinaza avtofosforilira in prenese fosfatno skupino na transkripcijski regulator ComA, ta pa uravnava prepis surfaktinskega operona (Nakano in Zuber, 1991; Nakano in Zuber, 1993). Operon *srfA* sestavlja tudi gen *comS*, ki je ključen za nadaljnji razvoj kompetence (D'Souza in sod., 1994). Fosforiliran transkripcijski dejavnik ComA prepozna zaporedje navzgor od promotorja operona *srfA* in aktivira transkripcijo genov operona (Roggiani in Dubnau, 1993). Protein ComA ima ohranjen aspartat v svojem aminokislinskem zaporedju na amino-terminalnem koncu proteina, kamor se veže fosfatna skupina (Weinrauch in sod., 1990). Gen za uravnavanje kompetence *comS* kodira 46 aminokislin velik regulatorni protein, vpletен в izražanje kompetence, kar sklopi sintezo surfaktina s kompetenco (D'Souza in sod., 1994). Protein ComA uravnava izražanje mnogih genov, poleg genov operona *srfA* izraziteje uravnava še gen za fosfatazo RapF, gen za transkripcijski regulator levansaharoznega gena *sacV*, pektin liazni gen *pel* in prekurzor za lantibiotik *sunA* (Ogura in sod., 2001; Auchtung in sod., 2006; Comella in Grossman, 2005).

Na izražanje genov operona *srfA* pri bakteriji *B. subtilis* vpliva tudi izvencelični peptid CSF (ang. Competence stimulating factor). CSF je velik 520 do 720 daltonov. Za aktivnost CSF je potreben še Spo0K, to je permeaza, ki spusti CSF v celico (Solomon in sod., 1995). Peptid CSF znotraj celice inhibira fosfatazo, ki cepi fosfatno skupino s ComA in inaktivira delovanje ComA (Solomon in sod., 1996).

Sekvence gospodinjskih genov *rpoB* in *gyrA* ne varirajo toliko, kot varirajo pri lokusu *comQXP*. Ta polimorfizem molekule ComX je osnova različnih ferotipov *B. subtilis*, kjer je posamezen ferotip občutljiv le na določeno varianto signala (Tran in sod., 2000; Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Mandic-Mulec in sod., 2003; Ansaldi in Dubnau, 2004; Stefanic in Mandic-Mulec, 2009). Obstaja več variant signala ComX, z različnim aminokislinskim zaporedjem in različno modifikacijo triptofana. Diskriminacija variant

signala izvira predvsem iz amino-terminalne senzorske domene histidinske kinaze ComP (Tortosa in sod., 2001). Analiza sinonimnih in nesinonimnih mutacij v lokusu *comQXP*, pa je pokazala, da raznovrstnost ne izvira iz naključne mutageneze, temveč, da je bila ta podvržena močni naravnri selekciji (Ansaldi in Dubnau, 2004). Poznamo štiri večje skupine ferotipov *B. subtilis*, znotraj katerih se sevi prepoznavajo, navzkrižno pa ne (Ansaldi in sod., 2002; Ansaldi in Dubnau, 2004). Triptofanska modifikacija je tudi ključna pri diverzifikaciji prepoznavanja ferotipov (Ansaldi in sod., 2002). Signal ComX posameznega ferotipa lahko interferira z zaznavanjem signala svoje vrste pri bakteriji drugačnega ferotipa (Ansaldi in sod., 2002). V kubičnem centimetru zemlje lahko že najdemo različne ferotipe bakterije *B. subtilis* (Stefanic in Mandic-Mulec, 2009), kakor tudi na korenini enega paradižnika (Oslizlo in sod., 2015). Različne bakterijske ferotipe lahko najdemo tudi znotraj posameznega ekotipa (Stefanic in sod., 2012).

Surfaktinski operon kodira encime za sintezo surfaktina. Surfaktin je sintetiziran neribosomsko z večjim encimskim kompleksom s 4 moduli. Surfaktin je zelo močan organski surfaktant (Nakano in sod., 1988; Stein, 2005; Kraas in sod., 2010). Ta ciklični lipopeptid je potencialno zelo pomemben za ekološke aplikacije, saj je biorazgradljiv (Christofi in Ivshina, 2002). Sestavljen je iz heptapeptida, povezanega z daljšo maščobno kislino tako, da tvori zaokroženo ciklično strukturo, topen je v polarnih in nepolarnih topilih in ima afiniteto za dvovalentne katione, na hitrost sinteze surfaktina pa močno vpliva količina kisika v gojišču, hitrost katabolizma ogljika in dejavniki vpleteni pri sintezi lipidov (Peypoux in sod., 1999; Stein, 2005; Raaijmakers in sod., 2010). Surfaktin ima zaradi svojih amfipatičnih lastnosti velik potencial za uporabo v industriji (Banat in sod., 2010). V farmaciji bi lahko izkoriščali nekatere izmed njegovih bioloških aktivnosti, kot so proti tumorsko učinkovanje, in zaviranje rasti gliv rodu *Mycoplasma* (Peypoux in sod., 1999; Raaijmakers in sod., 2010).

Schneider in sod. (2002) so dokazali, da se količina signala ComX veča sorazmerno s celično gostoto. Niso opazili pozitivne povratne zanke, ki je značilna za po Gramu negativne organizme (Whitehead, 2001), kjer povečevanje koncentracije signala pozitivno vpliva na izražanje gena za signal. Schneider in sod. (2002) menijo, da so opažanja neskladna z mnogo drugimi opisanimi sistemi zaznavanja celične gostote, kjer je porast signala pri neki kritični koncentraciji celic izrazito povečana. Če so povečali izražanje

comQ in *comX* ali celo samo *comX*, se indukcija operona *srfA* prične pri nižji celični gostoti. Torej je ComX limiten in koncentracija tega signala je pomembna za odziv (Schneider in sod., 2002). V sklopu te magistrske naloge natančneje preučimo sintezo signala v odvisnosti od celične gostote in kako je odziv na signal, oz. aktivnost promotorja surfaktinskega operona (*srfA-lacZ*) odvisna od celične gostote.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 REAGENTI

Preglednica 1: V nalogi uporabljeni reagenti.

| Reagent | Proizvajalec |
|---|--------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Merck, ZDA |
| 2-merkaptoetanol | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Acetonitril (ACN) | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Amonijev hidroksid | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Ampicilin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Merck, ZDA |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Fenilalanin | Merck, ZDA |
| Glukoza | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Goveji serumski albumin (BSA) | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Histidin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| IPTG | Sigma-Aldrich, ZDA |
| K_2HPO_4 | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Kanamicin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Kazeinski hidrolizat | BD, ZDA |
| KCl | Sigma-Aldrich, ZDA |
| KH_2PO_4 | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Kloramfenikol | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Kvasni ekstrakt | Biolife, Italija |
| LB agar | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Levcin | Sigma-Aldrich, ZDA |

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 1: V nalogi uporabljeni reagenti.

| Reagent | Proizvajalec |
|--|--------------------|
| Metionin | Merck, ZDA |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | Sigma-Aldrich, ZDA |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O | Sigma-Aldrich, ZDA |
| NaCl | Merck, ZDA |
| Na-Glutaminska kislina | Sigma-Aldrich, ZDA |
| NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Neomicin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| NH ₄ Cl | Merck, ZDA |
| Orto-nitro-fenil-galaktozid (ONPG) | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Podlaga za krvni agar (TBAB) | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Serin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Tetraciklin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| TFA, HPLC grade | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Toluen | Sigma-Aldrich, ZDA |

3.2 MATERIAL ZA ENKRATNO UPORABO

Preglednica 2: V nalogi uporabljen material za enkratno uporabo.

| Material | Proizvajalec |
|------------------------------|---------------------------------|
| Centrifugirke 50 ml | Isolab, Nemčija |
| Falkonke 15 ml | Isolab, Nemčija |
| Filtri (premer por – 0,2 µm) | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Mikrocentrifugirke 1,5 ml | Eppendorf, Nemčija |
| Petrijevke | Golias labortechnika, Slovenija |

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 2: V nalogi uporabljen material za enkratno uporabo.

| Material | Proizvajalec |
|------------------------|---------------------|
| Pipetni nastavki | Sarstedt, Nemčija |
| Rokavice | Kimberly-Clark, ZDA |
| Siringe | BD, ZDA |
| Sterilne plastične eze | Copan, Italija |

3.3 APARATURE

Preglednica 3: V nalogi uporabljene aparature.

| Aparatura | Proizvajalec |
|---|-------------------------------|
| Avtoklav (A-21) | Kambič, Slovenija |
| Bioreaktor, 2l 2x | Infors, Švica |
| Centrifuga (Sigma 3K30) | DJB Labcare, Velika Britanija |
| Črpalka (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 | Duran, Nemčija |
| Fotometer (MA 9510) | Iskra, Slovenija |
| HPLC mešalna komora | Knauer, Nemčija |
| Injektor | Knauer, Nemčija |
| Komplet pipet | Eppendorf, Nemčija |
| Kromatografska kolona (Nucleodur C18 Gravity) | Macherey-Nagel, Nemčija |
| Laminarij (Laminar Flow Cabinet) | ESCO, ZDA |
| Magnetni mešalnik (Rotamix 550 MMH) | Tehnica, Slovenija |
| pH meter (Inolab) | WTW, Nemčija |

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 3: V nalogi uporabljeni aparature.

| Aparatura | Proizvajalec |
|---|----------------------------|
| Sušilna omara za steklenice | Elektromedicina, Ljubljana |
| Stresalnik za mikrotitrsko plošče (Vibromix 31) | Tehtnica, Slovenija |
| Tehnica (Mettler PM4600 Balance) | Lab Extreme, ZDA |
| UV/VIS spektrofotometer | Thermo Scientific, ZDA |

3.4 SEVI

Preglednica 4: V nalogi uporabljeni bakterijski sevi in genotipi sevov.

| Sev | Genotip |
|--|---|
| <i>Bacillus subtilis</i> BD2876 “biosenzor 1” | <i>his leu met srfA-lacZ (tet) comQ::kan</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> PS216 “nemi tester” | <i>comQ::kan</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> PS216 “gluhi producent” | <i>comP::cat</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> PS216 “sev poročevalec” | <i>srfA-lacZ (neo)</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> PS216 “biosenzor 2” | <i>comQ::kan srfA-lacZ (tet)</i> |
| <i>Escherichia coli</i> ED367 (Ansaldi in sod. 2002) »producent ComX« | F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 indI sam7 nin5]) pET22</i> |

3.5 ZALOŽNE RAZTOPINE

3.5.1 Antibiotiki

Vse antibiotike smo sterilizirali s filtrom por premera 0,2 µm in jih alikvotirali v 1,5 ml mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke z antibiotikom smo hranili pri -20 °C.

Ampicilin (amp)

1 g ampicilina smo raztopili v 10 ml dH₂O. Tako smo pripravili ampicilin v koncentraciji 100 mg/ml.

Kanamicin (kan)

0,1 g kanamicina smo raztopili v 10 ml dH₂O. Tako smo pripravili kanamicin v koncentraciji 10 mg/ml.

Kloramfenikol (cat)

0,1 g kloramfenikola smo raztopili v 10 ml 96 % etanola. Tako smo pripravili kloramfenikol v koncentraciji 10 mg/ml.

Neomicin (neo)

0,5 g kanamicina smo raztopili v 10ml dH₂O. Tako smo pripravili neomicin v koncentraciji 50 mg/ml.

Tetraciklin (tet)

0,2 g tetraciklina smo raztopili v 10 ml 70 % etanola. Tako smo pripravili tetraciklin v koncentraciji 20 mg/ml.

3.5.2 Reagenti

1 % (m/v) Amonijev hidroksid (NH₄OH)

K 71,5 ml dH₂O smo dodali 28,5 ml NH₄OH.

10 % (v/v) Trifluoro-ocetna kislina (TFA)

V suho steklenico, večkrat oprano z vodo in absolutnim etanolom, smo odmerili 10 ml TFA in 90 ml dH₂O.

2-merkaptoetanol v Z-pufru

V 10 ml Z-pufra smo dodali 560 µl 2-merkaptoetanola. Tako smo pripravili 5,6 % (v/v) raztopino 2-merkaptoetanola.

Goveji serumski albumin (BSA ang. Bovine Serum Albumin)

V 10 ml dH₂O smo raztopili 0,5 g BSA. Raztopino smo sterilizirali s filtriranjem skozi filter s porami premera 0,2 µm in razparcelirali po 1 ml v 1,5 ml mikrocentrifugirke. Raztopino smo hranili pri -20 °C.

Isopropiliogalaktozid (IPTG)

0,238 g IPTG smo raztopili v 10 ml dH₂O. Tako smo pripravili IPTG v 100 mM koncentraciji. IPTG smo sterilizirali s filtracijo skozi filter s porami premera 0,2 µm in raztopino prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke z IPTG smo hranili pri -20 °C.

Mobilna faza A

V temeljito oprano, osušeno steklenico smo zatehtali 153,79 g čistega acetonitrila (ACN) (gostota pri 20 °C je enaka 776,7 mg/ml). V 2 ml mikrocentrifugirko smo na analitski tehnicni zatehtali 1 g dH₂O. V mikrocentrifugirko z 1 g dH₂O smo dodali se 0,200 g TFA. Mikrocentrifugirko s TFA smo dopolnili z dH₂O do 2 ml in vsebino mikrocentrifugirke dodali v steklenico.

Mobilna faza B

V temeljito oprano, osušeno steklenico smo zatehtali 398 g dH₂O. V 2 ml mikrocentrifugirko smo na analitski tehnicni zatehtali 1,00 g vode. V mikrocentrifugirko z 1 g vode smo dodali 0,500 g trifluoro-oacetne kisline (TFA). Mikrocentrifugirko s TFA smo dopolnili z dH₂O do 2 ml in jo dodali v steklenico. Nato smo zatehtali še 77,67 g čistega acetonitrila (ACN) (gostota pri 20 °C je enaka 776,7 mg/ml).

Orto-nitrofenilgalaktozid (ONPG) v Z-pufru

V 15 ml Z-pufra smo raztopili 120 mg ONPG. Raztopino smo dobro premešali in jo hranili v temi na 4 °C.

3.5.3 Raztopine soli, pufri in založne raztopine za gojišča

M9 soli

V 160 ml dH₂O smo dodali in z mešanjem na magnetnem mešalu raztopili:

8,5 g Na₂HPO₄ 2H₂O

3 g KH₂PO₄

0,5 g NaCl

1 g NH₄Cl

Dolili smo dH₂O do 200 ml in sterilizirali z avtoklaviranjem.

SS soli

V 1000 ml dH₂O smo v tem vrstnem redu dodali posamezne spojine in počakali, da se vsaka posamezna spojina raztopi:

6 g KH₂PO₄

14 g K₂HPO₄

2 g (NH₄)₂SO₄

1 g C₆H₅Na₃O₇ 2H₂O

0,2 g MgSO₄ 7H₂O

Z-pufer

10,6 g Na₂HPO₄ 2H₂O

6,2 g NaH₂PO₄ 2H₂O

0,7 g KCl

0,2 g MgSO₄ 7H₂O

Sestavine smo raztopili v dH₂O in nato dopolnili do 1000 ml.

Naslednje raztopine smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri 110 °C 20 minut:

1 M Kalcijev klorid (CaCl₂)

V falkonko smo zatehtali 1,47 g CaCl₂ in dolili dH₂O do 10 ml.

1 M Magnezijev klorid (MgCl₂)

V 80 ml dH₂O smo dodali 7,61 g MgCl₂ 6H₂O.

1 M Magnezijev sulfat (MgSO₄)

V falkonko smo zatehtali 2,46 g MgSO₄7H₂O in dolili dH₂O do 10 ml.

10 % (m/m) Kvasni ekstrakt

V 80 ml dH₂O smo dodali 8 g kvasnega ekstrakta.

2 % (m/m) Kazeinski hidrolizat

V 80 ml dH₂O smo dodali 1,6 g hidrolizata kazeina.

50 % (m/m) Glukoza

V čašo smo na tehnici zatehtali 50 g glukoze in dolili vode do 100 g. Na magnetnem mešalu smo s segrevanjem raztopili glukozo.

3.5.4 Filtrirane raztopine aminokislin

Aminokisline smo filtrirali preko por premera 0,2 µm.

Raztopina glutaminske kisline (glu)

V falkonko smo zatehtali 512 mg natrijeve soli glutaminske kisline monohidrat in dolili dH₂O do 10 ml.

Raztopina levcina, fenilalanina in serina (leu, phe, ser)

V falkonko smo zatehtali 40 mg levcina, fenilalanina in serina. Dolili smo dH₂O do 10 ml.

3.5.5 Avtoklavirane raztopine aminokislin

Raztopina histidina (his)

V čašo smo zatehtali 0,8 g histidina in dopolnili z 80 ml dH₂O.

Mešanica levcina (leu)

V čašo smo zatehtali 0,8 g levcina in dopolnili z 80 ml dH₂O.

Raztopina metionina (met)

V čašo smo zatehtali 0,8 g metionina in dopolnili z 80 ml dH₂O.

3.5.6 Agarizirana gojišča

Agar LB

V 250 ml erlenmajerico smo nalili 150 ml destilirane vode in dodali 5,25 g agarja LB (3,5 % m/m). Erlenmajerico smo avtoklavirali pri 121 °C, 15 min. Po avtoklaviranju smo erlenmajerico položili v vodno kopel na 55 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno isto temperaturo, smo dodali antibiotike. Gojišče smo sterilno razlili v majhne petrijevke (15 ml) in pustili, da se ohladijo. Hranili smo jih v temi pri 4 °C. Plošče, starejše od enega meseca smo zavrgli.

Agar TBAB

V 250 ml erlenmajerico smo nalili 150 ml destilirane vode in dodali 4,5 g TBAB (3 % m/m). Erlenmajerico smo avtoklavirali pri 121 °C, 15 min. Po avtoklaviranju smo erlenmajerico položili v vodno kopel na 55 °C. Ko se je gojišče ohladilo na to temperaturo, smo dodali antibiotike. Gojišče smo sterilno razlili v majhne petrijevke (15 ml) in pustili

da se ohladijo. Hranili smo jih v temi pri 4 °C. Plošče, starejše od enega meseca smo zavrgli.

3.5.7 Tekoča gojišča

Gojišče CM

V 400 ml 1x 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 MgCl₂ (1M)

Gojišče LB

V 250 ml steklenico smo nalili 100 ml dH₂O in dodali 2 g bujona LB (2 % m/m).

Steklenico smo avtoklavirali pri 121 °C 15 min. Gojišče smo hranili v temi na 4 °C.

Gojišče M9

V 210 ml sterilne dH₂O smo dodali:

60 ml M9 soli

600 µl 1M MgSO₄

2,4 ml 50 % glukoze

30 µl 1M CaCl₂

3 ml mešanice leu, phe, ser (40 µg/ml – končna koncentracija v gojišču)

3 ml Glutaminske kisline (400 µg/ml – končna koncentracija v gojišču)

1,2 ml his (4 mg/ml – končna koncentracija v gojišču)

1,2 ml met (4 mg/ml – končna koncentracija v gojišču)

300 µl amp (založna raztopina s koncentracijo 100 mg/ml)

Dolili smo še sterilno dH₂O do 300 ml

Koncentracije antibiotikov v gojiščih:

Za sev BD2876 biosenzor 1 ($\Delta comQ$ *srf-lacZ*) smo dodali kanamicin (kan) do končne koncentracije v gojišču 5 µg/ml in tetraciklin (tet) do končne koncentracije 20 µg/ml.

Za sev ED367 smo dodali amp do končne koncentracije v gojišču 100 µg/ml

Za sev PS216 biosenzor 2 ($\Delta comQ$ *srf-lacZ*) smo dodali kanamicin (kan) do končne koncentracije v gojišču 25 µg/ml in tetraciklin (tet) do končne koncentracije v gojišču 20 µg/ml.

Za sev PS216 gluhi producent ($\Delta comP$) smo dodali kloramfenikol (cat) do končne koncentracije v gojišču 5 µg/ml.

Za sev PS216 nemi tester ($\Delta comQ$) smo dodali kanamicina (kan) do končne koncentracije v gojišču 50 µg/ml.

Za sev PS216 sev poročevalec (*srf-lacZ*) smo dodali neomicin (neo) do končne koncentracije v gojišču 5 µg/ml).

Povečanje volumna zaradi dodatkov antibiotikov smo zanemarili.

3.6 METODE

3.6.1 Priprava izrabljenega gojišča *E. coli* ED367

Sev *E. coli* ED367, smo iz skrinje na -80 °C precepili na agarno ploščo LB z amp in ga inkubirali preko noči pri 37 °C. V sterilno 100 ml erlenmajerico smo odmerili 25 ml tekočega gojišča LB z amp v končni koncentraciji 100 µg/ml. Vanjo smo iz agarnega gojišča precepili sev *E. coli* ED367 in kulturo inkubirali na 37 °C pri 200 obratih/min na stresalniku preko noči (cca. 16 ur). Naslednji dan smo v dve sterilni 500 ml erlenmajerici z rilčkom odmerili po 125 ml gojišča M9 z dodanim amp v končni koncentraciji 100 µg/ml. V obe erlenmajerici smo nacepili 2 % (v/v) prekonočne kulture *E. coli* ED367 in jih stresali na 37 °C in 200 obratih/min. Rast kulture smo spremljali s spektrofotometrom. Ko je bila optična gostota izmerjena pri 650 nm (OD_{650}) cca. 0,7 a.u. smo v eno erlenmajerico dodali 500 µl IPTG, v založni koncentraciji 100 mM. Tako smo sprožili izražanje genov *comX* in *comQ* s pBAD24 promotorjem. Genska kaseta z geni *comX* in *comQ* se je nahajala med restriktijskim mestom XbaI in SalI. V drugo erlenmajerico smo dodali 500 µl destilirane vode. Služila nam je kot negativna kontrola. Erlenmajerice smo nato inkubirali 4 ure na 37 °C in 200 obratih/min. Po indukciji smo gojišča prelili v ločene centrifugirke in

centrifugirali pri 8000 obratih pri sobni temperaturi 10 min. Supernatant smo sterilno prefiltrirali v označene centrifugirke skozi filtre s porami premerom 0,2 µm in jih hranili pri 4 °C, največ 3 mesece.

3.6.2 Čiščenje ComX iz izrabljenega gojišča *E. coli* ED367 s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

Vzorec (cca. 4 ml) smo najprej zakisali do pH 2 z 10 % trifluoro-ocetno kislino (TFA) (cca. 330 µl). Zakisanju smo sledili s pH metrom. Nato smo dodali vzorcu čisti ACN, tako da je bilo razmerje ACN proti zakisanemu vzorcu enako 1:5. Vzorec smo prefiltrirali skozi filter s porami premera 0,2 µm, da smo odstranili delce, ki bi lahko zmanjšali pretočnost kromatografske kolone. Kromatografska kolona (C18, reverzna faza) je bila segreta na 30 °C. Z destilirano vodo smo sprali kromatografsko zanko in nanesli vzorec. Zagnali smo program (Priloga A) z mobilnima fazama A in B. Mobilno fazo A smo pripravili tako, da smo k ACN dodali 0,1 % (m/m) trifluoro-ocetne kisline (TFA). Mobilno fazo B smo pripravili tako da smo v 20 %(v/v) mešanico ACN v vodi dodali 0,1 % (m/m) TFA. Priprava mešanic je natančneje opisana v poglavju »3.1 Reagenti«. Sestavo mobilnih faz smo spremljali z merjenjem refrakcijskega indeksa. Spremljali smo tudi absorbanco svetlobe pri valovni dolžini 214 nm. Elucijski vrh ComX smo določili tako, da smo kromatograme izrabljenega gojišča kulture inducirane z IPTG primerjali s kromatogramom kontrolnega izrabljenega gojišča (»3.6.1 Priprava izrabljenega gojišča *E. coli* ED367«). V kontrolnem kromatogramu vrh s ComX ni prisoten. Ob elucijskem času ComX (odvisen od šarže pridobljenega gojišča) smo pobrali mililitrsko frakcijo v 1,5 ml mikrocentrifugirke. Te smo nevtralizirali s 50 µl 1 % (m/v) amonijevega hidroksida in ACN odstranili tako, da smo vzorec sušili v eksikatorju dokler se volumen izhodne mililitrske frakcije ni zmanjšal na 450-500 µl. Očiščenemu ComX smo pred nadaljnjo uporabo dodali BSA v končni koncentraciji 50 µg/ml. S tem smo v naslednjih poizkusih preprečili nespecifično vezavo ComX na receptor ComP (Magnuson in sod., 1994).

3.6.3 β-galaktozidazni test v mikrotitrskih ploščah z biosenzorjem

Priprava inokuluma: V 100 ml erlenmajerico smo odmerili 25 ml gojišča CM. V gojišče smo nacepili sev biosenzor 1 (BD2876, $\Delta comQ$ $srfA-lacZ$) ali biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ$ $srfA-lacZ$) iz agarnega gojišča. Kulturo smo na agarskem gojišču vedno najprej precepili iz

sveže založne kulture, shranjene na -80°C . Pri precepljanju v tekoče gojišče kultura biosenzorjev ni bila nikoli starejša od enega tedna. Tekočo kulturo smo preko noči (ne več kot 16 ur) stresali pri 200 obratih/min pri 37°C . Naslednji dan smo 2 % (v/v) inokulum precepili v 25 ml svežega gojišča CM. Sveže gojišče smo nato stresali na 200 obratih/min pri 37°C 6 ur do pol ure natančno. Po šestih urah, ko kultura preide v začetek stacionarne faze, smo prenesli 4 % (v/v) inokuluma v sveže gojišče CM. Po $95\ \mu\text{l}$ 4% inokuluma smo dodali z multikanalno pipeto v posamezno luknjico na mikrotitrski plošči z vzorci. Mikrotitrskie plošče smo nato pripravili za inkubacijo (Vogrič in sod., 2013). V mikrotitrskie plošče smo v kote vstavili plastične distančnike (odrezane konice pipetnih nastavkov). Tako smo zagotovili, da je pokrov mikrotitrskie plošče dopuščal boljši pretok zraka, saj mikrotitrskia plošča ni bila nepredušno zaprta. Pokrove smo na plošče pritrdili s krep lepilnim trakom. Stresalnik za mikrotitrskie plošče smo prenesli v 40 l vrečo za avtoklaviranje. Tako smo zagotovili manjšo možnost za kontaminacijo biosenzorskega seva, preprečili izhlapevanje vode, ter zagotovili večjo homogenost rastnih pogojev. Plošče smo na stresalnik pritrdili z gumijastimi čepi in v vreči smo na stresalniku navlažili papirnate brisače, ki so zagotovile, da je bila vlaga v “inkubacijski vreči” višja. Vrečo smo s krep lepilnim trakom nepredušno zaprli in mikrotitrsko ploščo stresali pri 1000 obratih/min pri 27°C za 16 ur. Po 16 urah smo plošče obrisali in brez pokrova na optičnem čitalniku pomerili OD₆₅₀ za posamezno luknjico. Po meritvi smo v posamezno luknjico dodali $25\ \mu\text{l}$ 5,6 % (v/v) mešanice merkaptola v Z-pufru in $10\ \mu\text{l}$ toluena. Ploščo smo inkubirali 30 min na ledu. Tako smo zagotovili permeabilnost celic in primeren redoks potencial za delovanje encima β -galaktozidaze. Nato smo plošče v posodi z vročo vodo segreli na 30°C (kjer encim deluje optimalno). Temperaturo smo preverjali z infrardečim termometrom. Nazadnje smo v posamezno luknjico dodali $25\ \mu\text{l}$ raztopine ONPG v Z-pufru (v založni koncentraciji 8 mg/ml). Pri dodajanju reagentov v mikrotitrskie plošče smo tekočino iz pipet stisnili le do prvega stopa, saj smo se želeli ogniti zračnim mehurčkom, ki bi zmotili spektrofotometrične meritve. Po dodatku ONPG smo ploščo pokrili s stekelcem dimenzijs mikrotitrskie plošče, ki smo ga predhodno segreli na 30°C ter nato ploščo pokrili z natančno očiščenim pokrovom. Ploščo smo vstavili v spektrofotometer kjer smo pomerili kinetiko β -galaktozidazne aktivnosti. Optično gostoto pri 420 nm smo pomerili 8 krat v intervalih minute pri $33,5^{\circ}\text{C}$ s predinkubacijo na isti temperaturi 3 min. Ker se encimska

reakcija razgradnje ONPG prične takoj po dodatku ONPG, je treba postopke eksperimenta po dodatku ONPG, izvajati zelo hitro.

3.6.4 Meritve β -galaktozidazne aktivnosti seva poročevalca

Sev poročevalec (PS216, *srfA-lacZ*) smo gojili v fermentorju ter brozgo vzorčili ob različnih časih. Vzorcu smo vedno izmerili volumen in OD₆₅₀. Po 5 min centrifugiranja pri 8000 obratih, smo odlili supernatant in ga shranili pri -20 °C. Zamrznjene celice smo potem resuspendirali v SS pufu in po 200 µl resuspendiranih celic nanesli v luknjice mikrotitrsko plošče. V posamezno luknjico smo dodali 25 µl 5,6 % (v/v) mešanice β -merkaptoetanola v Z-pufu in 10 µl toluena. Ploščo smo inkubirali 30 minut na ledu. Tako smo zagotovili permeabilnost celic in primeren redoks potencial za delovanje encima β -galaktozidaze. Nato smo plošče v posodi z vročo vodo segreli na 30° C (kjer encim optimalno deluje). Temperaturo plošče smo preverjali z infrardečim termometrom. Nazadnje smo v posamezno luknjico dodali 25 µl raztopine ONPG v Z-pufu (v založni koncentraciji 8 mg/ml). Po dodatku ONPG smo ploščo hitro pokrili z ogretim stekelcem dimenzij mikrotitrsko plošče in močno očiščenim pokrovom. Ploščo smo vstavili v spektrofotometer in izmerili absorbanco pri 420 nm v časovnih intervalih ene minute, pri stalni temperaturi 33,5 °C. Trudili smo se biti čim bolj hitri, saj se encimska reakcija razgradnje ONPG prične takoj po dodatku ONPG. Pri izračunu betagalaktozidazne aktivnosti smo število celic določili na podlagi izmerjene absorbance pri OD₆₅₀ pred zamrznitvijo vzorca.

3.6.5 Gojenje sevov v zaprtem šaržnem bioreaktorskem sistemu

Seve smo nacepili iz -80 °C na agarske plošče in jih hranili za nadaljnja nacepljanja največ do enega tedna pri sobni temperaturi. V 100 ml erlenmajerico smo odmerili 25 ml gojišča CM ter ga inokulirali s kulturo iz agarnega gojišča. Kulture smo preko noči stresali na 37 °C in 200 obratih/min. Bioreaktorje smo napolnili z raztopino SS in sterilizirali z avtoklaviranjem. V bioreaktorje smo pred pričetkom gojenja dodali sterilne dodatke po receptu za gojišče CM. Bioreaktor smo nacepili s prekonočno kulturo, ki smo jo dvakrat sprali v raztopini SS tako, da smo jo vsakič centrifugirali 5 min pri 8000 obratih. Sev smo inokulirali v bioreaktor. Bioreaktor smo vzdrževali pri temperaturi 37 °C. Mešalo smo nastavili da obratuje pri 700 obratih/min. Prezračevanje smo izključili, saj smo ugotovili,

da inhibira produkциjo ComX. pH nismo uravnavali in nismo dodali protipenilnih sredstev. Bakterijsko rast smo spremljali ob različnih časih z vzorčenjem fermentacijske brozge in meritvami OD₆₅₀. V posamezni točki smo gojišče vzorčili tako, da smo odvzeto fermentacijsko brozgo (12 ml) centrifugirali 5 min pri 8000 obratih in supernatant prefiltrirali skozi filter s porami premera 0,2 µm. Izrabljeno gojišče smo za nadaljnje eksperimente uporabili še isti dan, do večera pa smo ga hranili pri 4 °C.

3.6.6 Meritve odziva QS v odvisnosti od koncentracije ComX

Za določanje občutljivosti odziva, definiranega kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona, seva biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ$ *srfA-lacZ*) na signal ComX smo uporabili s HPLC očiščen signal, ki smo ga pridobili iz izrabljenega gojišča *E. coli* ED367. Ta heterologno izraža ComX. Očiščen ComX iz *E. coli* smo redčili v raztopini SS do fiziološko primerne koncentracije, v območju med 40-700 pM za biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ$ *srf-lacZ*), ki smo jo ocenili na osnovi kromatografskega vrha pri 214 nm. V frakcijo s ComX smo dodali BSA v končni koncentraciji 50 µg/ml (Magnuson in sod., 1994). Mobilno fazo HPLC smo uporabili za redčenje frakcije s ComX. Mobilno fazo smo najprej redčili na enak način kot HPLC frakcijo s ComX ter redčeno mobilno fazo uporabili za redčitveno vrsto ComX. Nato smo 10 µl posamezne redčitve ComX odpipetirali v luknjice celotnega stolpca v mikrotitrski plošči (8 ponovitev) ter jih dopolnili s 95 µl pufra SS. Eksperiment smo nadaljevali kot je opisano v poglavju »3.6.3 β-galaktozidazni test v mikrotitrskih ploščah z biosenzorjem.«

3.6.7 Priprava mikrotitrskih plošč za določanje koncentracije ComX v izrabljenem gojišču

V pridobljena izrabljena gojišča seva *B. subtilis* PS216 gluhega producenta ($\Delta comP$) in nemega testerja ($\Delta comQ$) smo dodali BSA v končni koncentraciji 50 µg/ml (Magnuson in sod., 1994). Eksogeno pridobljeni ComX smo redčili v raztopini SS do fiziološko primerne koncentracije (za biosenzor 1 (BD2876, $\Delta comQ$ *srfA-lacZ*) v območju od 1 do 5 nM). Ko smo izparevali ACN iz HPLC frakcije s ComX smo enako po postopku opisanem v poglavju »3.6.2 Čiščenje ComX iz izrabljenega gojišča *E. coli* ED367 s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti« izparili ACN in nevtralizirali HPLC ozadje, ki je sestal samo iz HPLC mobilnih faz A in B v deležu, enakem kot je delež mobilnih faz pri

elucijskem času signala ComX. Ozadje smo enako redčili v raztopini SS, kot smo redčili eksogeno pridobljeni ComX. Ozadju smo prav tako dodali BSA v končni koncentraciji 50 µg/ml. V mikrotitrski plošči smo naredili 2x redčitveno vrsto, kjer smo redčili ComX frakcijo v SS raztopini s HPLC ozadjem redčenim v SS raztopini. V isto mikrotitrsko ploščo smo v lihe stolpce plošče odpipetirali 95 µl izrabljenega gojišča nemega testerja. V sode stolpce pa smo odpipetirali 95 µl izrabljenega gojišča gluhega producenta različno redčenim izrabljenim gojiščem nemega testerja. Izrabljena gojišča smo vzorčili v istih rastnih fazah posameznega seva. V stolpce s sevom nemega testerja smo odpipetirali po 10 µl posamezne redčitve ComX in v en stolpec, ki nam je služil kot negativna kontrola smo odpipetirali 10 µl ozadja. V stolpce z gojiščem gluhega producenta smo odpipetirali 10 µl HPLC ozadja. Tako so se stolpci z izrabljenim gojiščem producentskega seva in stolpci z izrabljenim gojiščem testerskega seva razlikovali le v koncentraciji prisotnega ComX. Tako smo lahko določili koncentracijo ComX v izrabljenem gojišču gluhega producenta. Natančneje, to smo storili s primerjavo umeritvene krivulje β -galaktozidaznega odziva biosenzorskega seva 1 (BD2876, $\Delta comQ srfA-lacZ$) na eksogeno dodan ComX (Priloga D) s krivuljo β -galaktozidaznega odziva biosenzorskega seva 1 na izrabljeno gojišče gluhega producenta (Priloga C). Tako pripravljene plošče smo nadaljnje testirali po postopku opisanem v poglavju »3.6.3 β -galaktozidazni test v mikrotitrskih ploščah z biosenzorjem«, kjer smo kot biosenzor uporabili sev biosenzor 1. Ker prečiščen ComX s časom lahko izgublja biološko aktivnost, smo pazili, da smo eksogeni ComX in izrabljena gojišča sevov *Bacillus* pridobili isti dan in takoj inkubirali plošče, da smo lahko naslednje jutro izmerili β -galaktozidazno aktivnosti biosenzorskih celic.

3.7 IZRAČUNI

3.7.1 Določevanje koncentracije ComX v HPLC frakciji

Povprečno absorbanco pri 214 nm smo določili z integriranjem kromatograma od časa, ko smo pričeli vzorčiti frakcijo s signalom ComX do časa, ko smo končali z vzorčenjem mililitrske frakcije. Za molekulo ComX smo ocenili ekstinkcijski koeficient pri valovni dolžini 214 nm. Nato smo iz Beer-Lambertove zveze izračunali koncentracijo ComX v posamezni HPLC frakciji.

$$A = \varepsilon l c \quad \dots(1)$$

Enačba (1): Beer-Lambertova zveza, A je absorbanca pri 214 nm [a.u.] , ε je ekstinkcijski koeficient [a.u. $1\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$], l je dolžina optične poti [cm] in c je koncentracija [mol l^{-1}]. Ekstinkcijski koeficient smo ocenili na podlagi kemijske sestave signala (Okada, in sod., 2005), delne ekstinkcijske koeficiente aminokislin v acetonitrilu smo povzeli po izsledkih avtorjev Kuipers in Gruppen (2007), za farnezil smo predpostavili, da ima enak ekstinkcijski koeficient kot polovica skvalena (Jarstfer in sod., 2002; Pittler in sod., 1995). Tako ocenjena vrednost ekstinkcijskega koeficiente za ComX je $46300\text{ a.u. }1\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$.

3.7.2 Izračun aktivnosti β -galaktozidaze

β -galaktozidazno aktivnost [Millerjeve enote, MU] prilagojeno za merjenje v mikrotitrskih ploščah smo izračunali po naslednji formuli (Vogrič, 2013).

$$\beta - \text{gal. akt} = \frac{V_r v_k}{V_c OD_{650}} 1000 \quad \dots(2)$$

V_r je volumen reakcijske zmesi [ml], v_k sprememba absorbance pri valovni dolžini 420 nm na minuto [a.u. min^{-1}], V_c volumen suspenzije celic [ml], OD_{650} pa je absorbanca celic pri valovni dolžini 650 nm preračunana na optično pot 1 cm [a.u.] z odšteto absorbanco praznega gojišča. Za izračun kinetike v_k smo izračunali naklon premice iz meritev absorbance pri 420 nm v odvisnosti od časa. Za podatke kinetike pri 420 nm v odvisnosti od časa smo kot merilo linearne korelacije izračunali Pearsonov koeficient. Če je bil Pearsonov koeficient manjši od 0,95 meritev nismo upoštevali, saj so bile izmerjene vrednosti absorbance pri 420 nm izven linearne območja odvisnosti absorbance od koncentracije orto-fenola. V nekaterih primerih smo lahko Pearsonov koeficient popravili, tako da smo za ceno manjše natančnosti meritev izračunali naklon brez zadnjih nekaj točk. Pri meritvi OD_{650} smo odšteli absorbanco mikrotitrske plošče z gojiščem. Pri gojenju prekonočne biosenzorske kulture v posameznih jamicah mikrotitrskih plošč lahko pride do kontaminacije. Takšne jamice imajo zaradi tujih celic drugačno optično gostoto pri 650 nm kot običajno, tuje celice pa niso občutljive na signal ComX. Prav tako je lahko biosenzorski sev 1 (BD2876, $\Delta comQ\text{-}srfa-lacZ$) slabo zrastel, kar pa se je kazalo v premajhni optični gostoti. Zato v naših meritvah nismo upoštevali osamelcev. Osamelce

smo izločili iz meritev OD_{650} in iz meritev kinetike absorbance pri 420 nm v_k . Pri meritvah β -galaktozidazne aktivnosti seva poročevalca (PS216, *srfA-lacZ*) smo za izračun β -galaktozidazne aktivnosti uporabili vrednost OD_{650} izmerjeno pri vzorčenju kulture.

3.7.3 Izločanje osamelcev

Običajno se osamelce izloča na podlagi vrednosti Z . Ta je definirana kot obratno sorazmerno razmerje med razliko izmerjene vrednosti od povprečja in standardnim odklonom meritev (Iglewicz in Hoaglin, 1993). Torej nam vrednost Z pove koliko daleč se nahaja naš podatek od povprečja meritev relativno na standarni odklon meritev v predpostavljeni normalni porazdelitvi podatkov. Takšno določevanje vzorcev za majhno število podatkov lahko zavajajoče. Pri manjšem številu podatkov je lahko vrednost Z premajhna. Zato smo uporabili modificirano vrednost Z (Iglewicz in Hoaglin, 1993), ki je odvisna od mediane in ne od povprečja. Ta predstavlja razdaljo naše meritve od mediane vseh izmerjenih podatkov, relativno na standardni odklon mediane. Vrednost M_i nam predstavlja merilo za določevanje osamelcev, ki za razliko od Z vrednosti ni odvisna od osamelcev (ker osamelci spremenijo vrednost povprečja meritev in ne njihove mediane).

$$M_i = \frac{0,6745(x_i - \bar{x})}{MAD} \quad \dots(3)$$

$$MAD = \bar{x}(|x_i - \bar{x}|) \quad \dots(4)$$

V enačbi (3) je prikazan izračun vrednosti M_i . x_i je izmerjena vrednost, \bar{x} mediana in MAD absolutni odklon mediane. Kot vidimo v enačbi (4) je MAD definiran kot produkt mediane z absolutno razliko med izmerjeno vrednostjo in povprečjem podatkov. V primerjavi z običajnim izračunom standardnega odklona, MAD ponuja odklon, na katerega prisotni osamelci manj vplivajo, kar je še posebej izrazito pri manjšem številu meritev. Ker so enačbe (3) in (4) za določevanje osamelcev veljavne za podatke porazdeljene po normalni porazdelitvi smo morali vse izmerjene vrednosti prej logaritmirati. Predpostavili smo namreč, da so zaradi asimetrije razporeditve podatkov naši podatki razporejeni po logaritemsko normalni distribuciji. Optična gostota in kinetika absorbance pri 420 nm

imata absolutno izhodišče, ki je enako nič in lahko le naraščata, zato standardni odklon naših podatkov nad in pod povprečjem ni simetričen.

3.7.4 Prileganje podatkov in reševanje diferencialnih enačb

Vsa prileganja eksperimentalno izmerjenih podatkov k matematičnim modelom z izjemo končnega rezultata smo opravili s pomočjo programa Origin 9.0. Vse integrale diferencialnih enačb smo analitično rešili s pomočjo programa Wolfram Mathematica 10. Končni izraz odzivanja celic v Enačbi 20 pa smo prilegali eksperimentalnim podatkom na Sliki 4 s pomočjo funkcije Reševalnik v programu Microsoft Excel 2010.

3.7.5 Izračun koncentracije ComX v izrabljenem producentskem gojišču

Neznano koncentracijo ComX v izrabljenem gojišču seva »gluhega producenta« (PS 216, $\Delta comP$) odvzetem v posamezni časovni točki rastne krivulje na Slikah 1 in 2 smo pridobili tako, da smo v programu Origin 9.0 naredili ne-linearno regresijo s Hill-ovo funkcijo, za podatke β -galaktozidazne aktivnosti celic biosenzor 1 (BD2876, $\Delta comQ$ srfA-lacZ) v odvisnosti od redčenega izrabljenega gojišča »gluhega producenta« (Priloga C) in za podatke β -galaktozidazne aktivnosti celic biosenzor 1 v odvisnosti od redčenega eksogeno dodanega prečiščenega ComX v znani koncentraciji (Priloga D). β -galaktozidazno aktivnost smo izmerili kot je opisano v poglavju: »3.6.3 β -galaktozidazni test v mikrotitrskih ploščah z biosenzorjem«. Prečiščen ComX smo dobili kot je opisano v poglavju: »3.6.2 Čiščenje ComX iz izrabljenega gojišča *E. coli* ED367 s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti«. Koncentracijo ComX smo izračunali kot je opisano v poglavju: »3.7.1 Določevanje koncentracije ComX v HPLC frakciji«. S programom smo izračunali tudi 95 % interval zaupanja za Hill-ovo regresijo. Nato smo na krivulji grafa β -galaktozidazne aktivnosti v odvisnosti od deleža izrabljenega gojišča (Priloga C) izbrali točko s čim ožjim 95 % intervalom zaupanja. Nato smo iz zgornje in spodnje meje intervala izbrane točke izračunali standardno napako. Z operacijo najdi X iz Y (find X from Y) smo v programu Origin na umeritveni krivulji (Priloga D) z znano količino eksogeno dodanega ComX poiskali enak odziv kot na grafu Priloge C. Kot napako smo prikazovali standardno napako, ta je enaka korenju vsoti kvadratov standardne napake točke v regresijski meritveni krivulji (Priloga C) in izračunane napake operacije najdi X iz Y programa Origin na umeritveni krivulji (Priloga D).

3.7.6 Korekcija optične gostote

Med spremeljanjem OD_{650} smo vse vrednosti večje od 0,4 a.u. popravili zaradi nelineranosti optične gostote v odvisnosti od celične gostote. Popravek to upošteva in prikaže absorbance, kot če bi se odvisnost še naprej nadaljevala linearно. Funkcijo korigirane optične gostote (5) smo določili z redčenjem celic v nelinearnem območju. Točke, kjer smo redčeno optično gostoto izmerjeno v linearinem območju pomnožili z redčitvijo in tako dobili korigirano optično gostoto, smo izrisali na graf v odvisnosti od izmerjene optične gostote neredčene kulture in jih prilegali s polinomom:

$$f(x) = x^2 - 0,0992x + 0,3417 \quad \dots(5)$$

Funkcija korigirane optične gostote, $f(x)$ (Enačba 5), v odvisnosti od izmerjene optične gostote pri 650 nm za bakterijo *B. subtilis* gojen pri prej opisanih laboratorijskih pogojih.

4 REZULTATI

Sistem zaznavanja celične gostote lahko razdelimo na dva dela:

- Sinteza signala.
- Zaznavanje signala.

Oba pojava smo modelirali za celotno rastno krivuljo bakterije *B. subtilis*.

4.1 MODELIRANJE SINTEZE SIGNALA

Koncentracija signalne molekule ComX je sorazmerna s številom celic, ki signalni peptid sintetizirajo in s hitrostjo sinteze ComX na celico:

$$dSM(t) = \frac{dSM(t)}{N(t) dt} N(t) dt \quad \dots(6)$$

kjer je SM koncentracija signala, t je čas in N je količina celic.

Nadalje predpostavljamo, da je hitrost sinteze signala ComX na celico sorazmerna s hitrostjo rasti celotne populacije. Ta predpostavka implicira, da mora bakterija zaznavati rast **celotne populacije**:

$$\frac{dSM(t)}{N(t) dt} \propto \frac{dN(t)}{dt} \quad \dots(7)$$

Po združitvi Enačbe 6 in 7 dobimo:

$$\int_{SM(t_1)}^{SM(t_2)} dSM(t) \propto \int_{N(t_1)}^{N(t_2)} N(t) dN(t) \quad \dots(8)$$

Po integriranju izraza 8 dobimo:

$$SM(t_2) - SM(t_1) \propto (N(t_2))^2 - (N(t_1))^2 \quad \dots(9)$$

Ker smo celice pred gojenjem dvakrat sprali z raztopino SS, pričakujemo da bo $SM(t_1)$ v Enačbi 9 enak 0. Prav tako zanemarimo število celic v Enačbi 9 ob inokulaciji fermentorja $N(t_1)$, saj je koncentracija celic zelo majhna ($OD_{650} = 0,02$ a.u. $\pm 0,02$ a.u.).

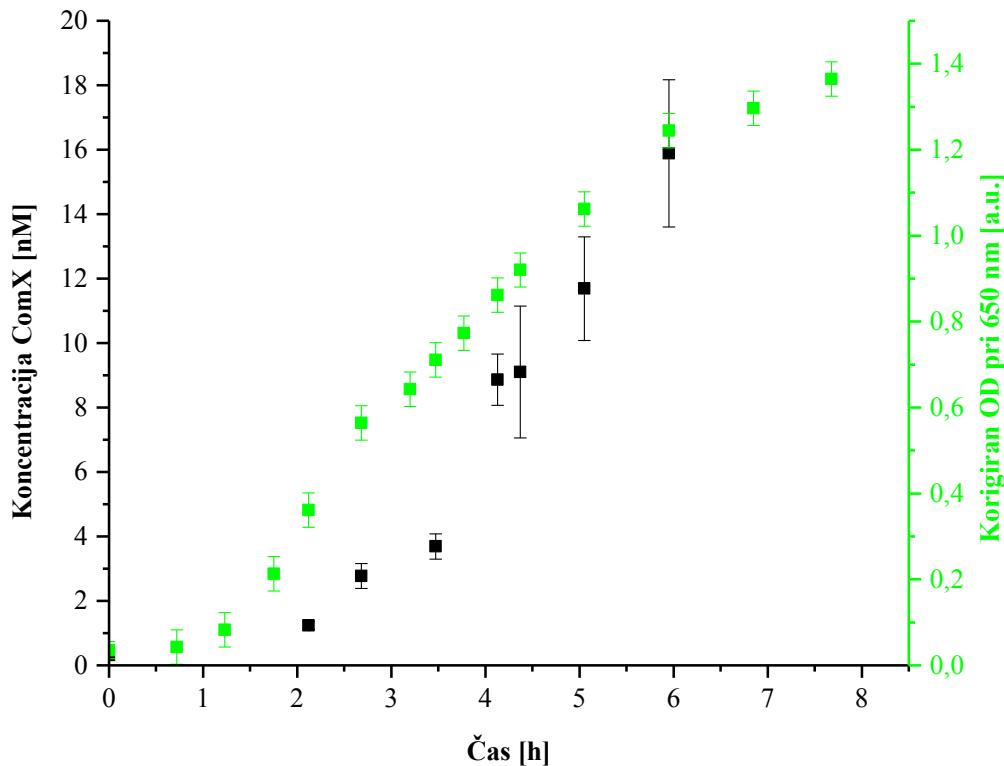
Naš izraz se tako glasi:

$$SM(t_2) \propto (N(t_2))^2 \quad \dots(10)$$

Naš končni model v Enačbi 10 predvideva, da bo v zaprtem bioreaktorskem sistemu količina ComX naraščala s kvadratom celične gostote. Če bi se npr. celična gostota povečala za 2x, bi se koncentracija sintetiziranega signala v gojišču povečala za 4x. Če bi v Enačbi 7 predpostavljeni, da je sinteza signala sorazmerna s hitrostjo rasti posamezne celice, bi morali spremembo celične gostote po času izraziti na celico. Tako bi po integraciji izraza dobili linearno odvisnost koncentracije signala ComX od celične gostote, izražanje ComX pa bi bilo potem odvisno predvsem od hitrosti rasti posamezne celice. To bi pomenilo, da bi se za 2x povečanje celične gostote koncentracija sintetiziranega signala povečala le za 2x in ne za 4x kot to predpostavljamo v modelu pri Enačbi 10.

4.1.1 Empirična potrditev modeliranja sinteze signala

V skladu s postavljenim modelom smo gojili sev gluhega producenta *B. subtilis* (PS216, *ΔcomP*) v zaprtem reaktorskemu sistemu in merili koncentracijo ComX v izrabljenem gojišču (Slika 1) (Opisano v poglavju: »3.7.5 Izračun koncentracije ComX v izrabljenem producentskem gojišču«).



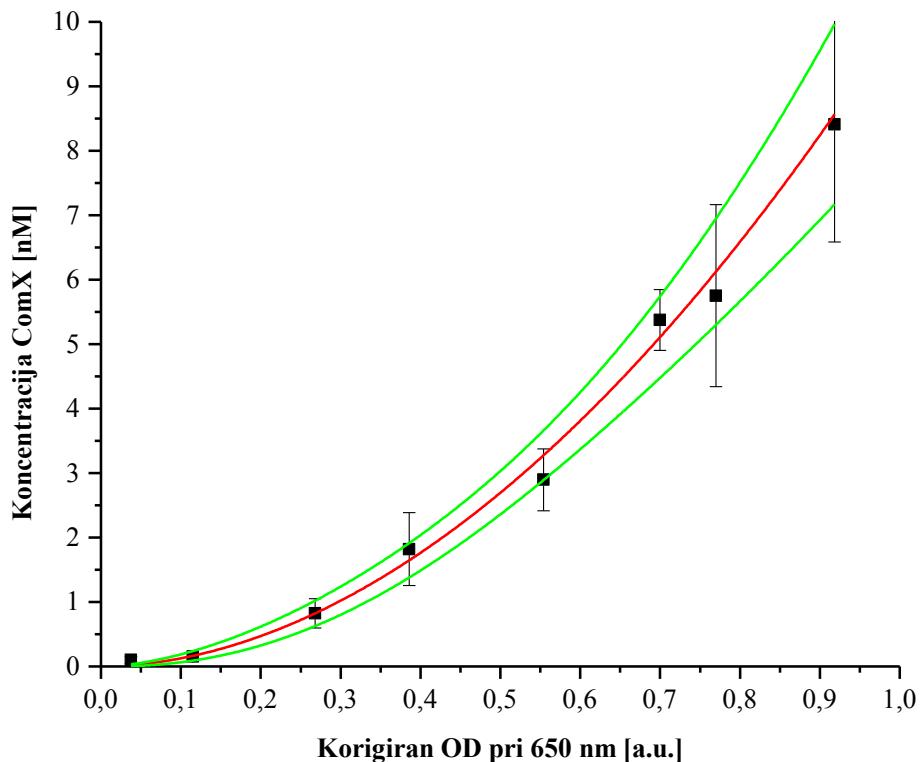
Slika 1: Časovni odvisnosti koncentracije signala ComX (■) in korigirane optične gostote pri 650 nm (●) v gojišču gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$). Prikazana je ena izmed 3 bioloških ponovitev. Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odkloni.

Izmed 3 bioloških ponovitev je prikazana reprezentativna rastna krivulja seva gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$) s korigirano absorbanco pri OD_{650} na sekundarni osi [a.u.] in koncentracije ComX [nM] na primarni osi (Slika 1). Koncentracijo ComX v izrabiljenem gojišču gluhega producenta smo določili s primerjavo β -galaktozidazne aktivnosti biosenzorja 1 (BD2876, $\Delta comQ$ srfA-lacZ) v izrabiljenem gojišču gluhega producenta in v izrabiljenem gojišču nemega testerja (PS216, $\Delta comQ$) z dodanim prečiščenim ComX v znani koncentraciji (Priloge C in D).

Ker v skladu s hipotezo pričakujemo eksponentno odvisnost koncentracije ComX od celične gostote smo izmerjenim podatkom prilegali naslednjo eksponentno funkcijo:

$$f(x) = a x^b \quad \dots(11)$$

V Enačbo 11 smo za odvisno spremenljivko $f(x)$ vnesli optično gostoto pri 650 nm [a.u.], kot neodvisno spremenljivko x pa smo vnesli koncentracijo signala ComX [nM] v izrabljenem gojišču. Za vsak nabor podatkov od skupno treh neodvisnih ponovitev smo naredili regresijo z Enačbo 11 v programu Origin. Program nam je podal koeficiente a in b pridobljene z regresijo. Za vsak koeficient nam je podal tudi 95 % interval zaupanja. Iz treh ponovitev smo izračunali končne koeficiente a in b in ju uporabljali pri nadalnjem razvoju modela zaznavanja. V kolikor naš matematični model v Enačbi 10 drži, bi pričakovali, da bo parameter b enak 2.



Slika 2: Odvisnost koncentracije ComX (•) od absorbance celic pri 650 nm za sev gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$). Prikazano je najboljše prileganje z Enačbo 11 (rdeča krivulja) skupaj s 95 % intervalom zaupanja prileganja (zelena krivulja). Prikazana je ena izmed 3 bioloških ponovitev. Eksperimentalne napake so standardni odkloni.

Na Sliki 2 je prikazan reprezentativni graf odvisnosti koncentracije ComX od korigirane optične gostote pri OD₆₅₀ ene izmed treh podobnih ponovitev za sev gluhega producenta

(PS216, $\Delta ComP$) gojenega v zaprtem reaktorskem sistemu. Podatki meritev koncentracije ComX so enake kot na Sliki 1.

Ugotovili smo, da koncentracija ComX narašča s kvadratom celične gostote, ki smo jo določali s pomočjo korigirane optične gostote (OD_{650}), saj povprečje parametra b v prileganju z Enačbo 11 znaša $2,05 \pm 0,10$. Rezultat je v skladu z našim modelom, ki je podan v Enačbi 10, kjer pričakujemo vrednost 2 v kolikor koncentracija ComX narašča s kvadratom celične gostote. Parameter a je znašal $(9,6 \pm 0,6) \text{ nM a.u}^{-2,05}$, ki pove, kakšna je koncentracija signala upoštevajoč model v Enačbi 10 pri $OD_{650}=1 \text{ a.u.}$

4.2 MODELIRANJE ODZIVANJA NA SIGNAL

Celični odziv celotne populacije je enak številu celic ter hitrosti »sinteze« odziva na celico. V tem delu smo celični odziv merili kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona (*srfA-lacZ*), ki se odzove na signal ComX.

$$dR(t) = \frac{dR(t)}{N(t) dt} N(t) dt \quad \dots(12)$$

R je nivo celičnega odziva celotne populacije, ki smo ga kasneje merili kot aktivnost β -galaktozidaze seva poročevalca (PS216, *srfA-lacZ*) (glej »3.6.4 Meritve β -galaktozidazne aktivnosti seva poročevalca«) in predstavili izraženega na celično gostoto, $N(t)$ pa opisuje funkcijo celične gostote po času, (Priloga B). Kot v Enačbi 7 smo tudi tukaj predpostavili, da je hitrost nastajanja odgovora na celico sorazmerna s hitrostjo rasti **celotne populacije**. Hkrati vemo, da je odgovor odvisen tudi od signala v skladu s funkcijo $W(SM)$, katero opredelimo v Enačbi 15 in eksperimentalno potrdimo na Sliki 3. Tako dobimo:

$$\frac{dR(t)}{N(t) dt} \propto W(SM) \frac{dN(t)}{dt} \quad \dots(13)$$

Ko Enačbo 13 vstavimo v Enačbo 12 dobimo:

$$dR(t) \propto W(SM) \frac{dN(t)}{dt} N(t) dt \quad \dots(14)$$

$W(SM)$ ima obliko Hill-ove funkcije, s katero smo iz empiričnih podatkov (»3.6.4 Meritve β -galaktozidazne aktivnosti seva poročevalca«) v programu Origin 9.0 izračunali prileganje za podatke odvisnosti med celičnim odzivom in koncentracijo signala ComX:

$$W(SM) \propto \frac{V_{max} SM(t)^n}{Km^n + SM(t)^n} \quad \dots(15)$$

Parametre funkcije V_{max} , Km in n nam izračuna program Origin s 95 % intervalom zaupanja za posamezno prileganje. $SM(t)$ predstavlja koncentracijo ComX, ki je funkcija časa in V_{max} maksimalen odziv celice. V našem modelu smo odziv celic normalizirali na maksimum, predpostavili pa smo, da se Km (koncentracija signala, kjer celice dosežejo polovico V_{max}) ne spreminja.

Po združitvi Enačbe 15 in 14 dobimo:

$$dR(t) \propto \frac{V_{max} (SM(t))^n}{Km^n + (SM(t))^n} \frac{dN(t)}{dt} N(t) dt \quad \dots(16)$$

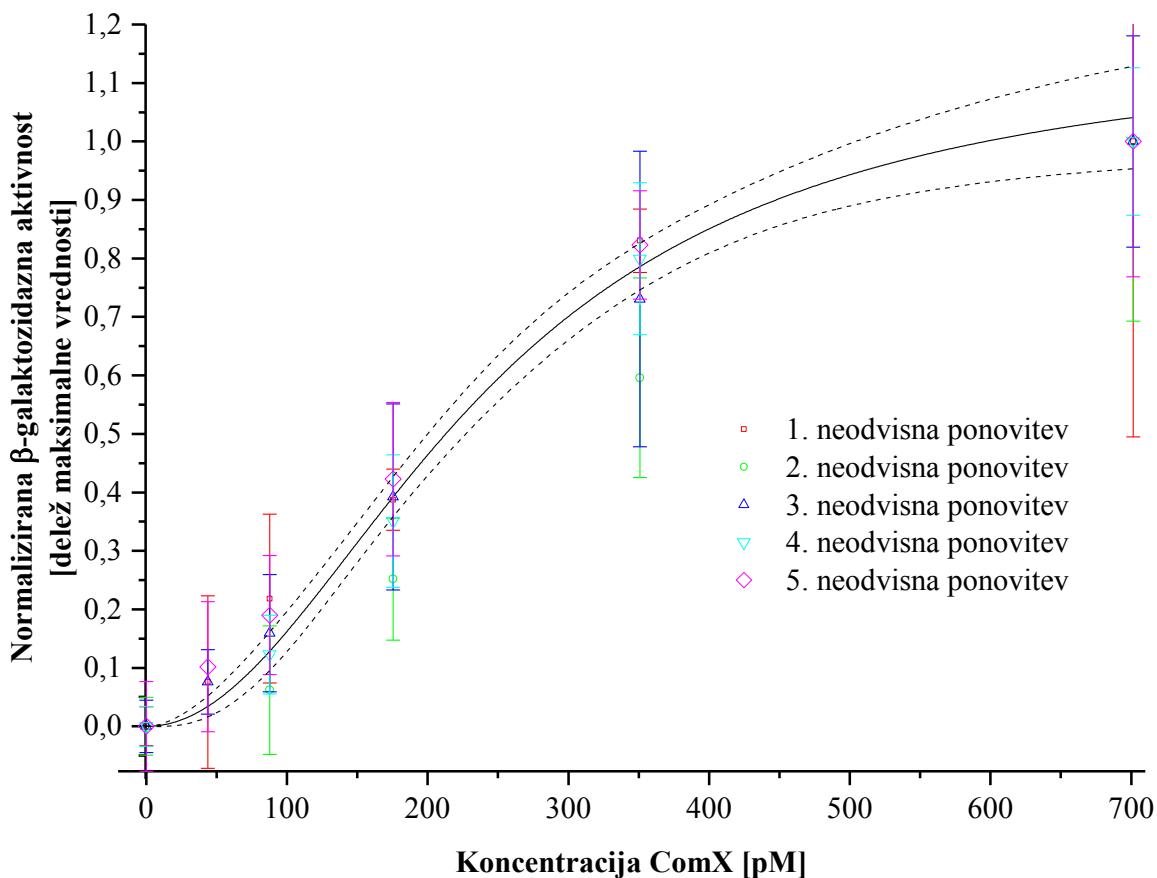
Po upoštevanju Enačbe 10 se Enačba 17 glasi:

$$dR(t) \propto \frac{V_{max} (a N(t)^2)^n}{Km^n + (a N(t)^2)^n} \frac{dN(t)}{dt} N(t) dt \quad \dots(17)$$

Če Enačbo 17 zapišemo v integralni obliki dobimo:

$$\int_{t_1}^{t_2} dR(t) \propto \int_{N(t_1)}^{N(t_2)} \frac{V_{max} (a N(t)^2)^n}{Km^n + (a N(t)^2)^n} N(t) dN(t) \quad \dots(18)$$

Rešitev integrala v Enačbi 18, bi se bistveno poenostavila, če bi poznali vrednost n . V ta namen smo izvedli poskus, kjer smo spremenjali samo koncentracijo ComX ter opazovali odziv ($W(SM)$ Enačba 15). Prileganja te funkcije na eksperimentalne podatke je prikazano na Sliki 3, kot odziv celic biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ srfA-lacZ$) na eksogeno dodan prečiščen signal ComX. Regresija je bila opravljena za pet neodvisnih bioloških ponovitev.



Slika 3: Normalizirane meritve β -galaktozidazne aktivnosti biosenzorja 2 (PS216, $\Delta comQ$ $srfA-lacZ$) v odvisnosti od koncentracije ComX za pet neodvisnih ponovitev. Prikazana je regresija vsem meritvam z Enačbo 15 (polna črta) skupaj s 95 % intervalom zaupanja regresije (prekinjena črta). Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odkloni posameznih setov meritev.

Na Sliki 3 lahko vidimo normalizirano β -galaktozidazno aktivnost biosenzorja 2 (PS216, $\Delta comQ$ $srfA-lacZ$) v odvisnosti od eksogeno dodanega prečiščenega ComX [pM]. Ker smo v magistrski nalogi modelirali dinamiko odziva za sev PS216 in ne za sev BD2876, smo za ta del uporabili biosenzor 2 in ne biosenzor 1 (BD2876, $\Delta comQ$ $srfA-lacZ$). Seva imata enaki mutaciji vendar različno genetsko ozadje. Prav tako je občutljivost biosenzorja 2 na ComX približno 8x večja, kar lahko vidimo s primerjavo Slike 3 in Priloge D. Kvaliteta prileganja funkcije je zadovoljiva. Hill-ova regresija se je enako dobro prilegala tudi za vsak posamezen nabor nenormaliziranih podatkov. Podatke smo normalizirali tako, da smo vsak nabor podatkov delili z maksimalno izmerjeno vrednostjo β -galaktozidazne aktivnosti znotraj nabora. S tem smo predpostavili, da so vsi celični odzivi sorazmerni glede na maksimalen izmerjen celični odziv, oziroma glede na odziv pri največji dodani količini ComX znotraj posameznega nabora izmerjenih podatkov 5 neodvisnih ponovitev.

Absolutna (izmerjena) β -galaktozidazna aktivnost med posameznimi neodvisnimi ponovitvami pri določeni koncentraciji dodanega signala pa se je razlikovala. Razlike v intenziteti odziva pripisujemo variaciji pogojev rasti med posameznimi šaržami in jih v končnem modelu odzivanja v Enačbi 20 odpravi sorazmernostna konstanta Ω . Slika 3 opisuje občutljivost seva PS216 na ComX, ta pa vpliva na odziv, karakteriziran kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona (Enačba 13). Rezultati ne-linearne regresije za parametre prileganja so: $n = 2.0 \pm 0.2$ in $Km = (240 \pm 20)$ pM. Funkcija na Sliki 3 ustreza funkciji $W(SM)$ v Enačbi 13 in dalje.

Ker je v skladu s Sliko 3 faktor kooperacije n enak 2 se rešitev integrala Enačbe 18 glasi:

$$R(t_2) - R(t_1) \propto Vmax \left((N(t_2))^2 - \left(\frac{Km \operatorname{ArcTan} \left(\frac{(N(t_2))^2 a}{Km} \right)}{a} \right) \right) \quad \dots(19)$$

R je enak celokupnemu nivoju celičnega odziva. Ko ga izrazimo na posamezno celico ga lahko empirično merimo kot β -galaktozidazno aktivnost in predstavlja aktivnost promotorja surfaktinskega operona posamezne celice. $N(t)$ opisuje funkcijo celične gostote (Priloga B). Vrednosti N v času t_1 smo zanemarili, saj je celic v času inokulacije tako malo ($OD_{650}=0,02$ a.u. $\pm 0,02$ a.u.), da je prispevek k celičnemu odzivu R zanemarljiv. Poročevalske celice rastejo v prekonočni kulturi. Ko jih naslednji dan inokuliramo, spiranje celic ne zmanjša znotrajcelične koncentracije β -galaktozidaze. Zato moramo prištetи vrednost R_0 , ki predstavlja nivo prekonočnega odziva v celicah. Ta vrednost ni enaka $R(t_1)$, ki je sicer enaka nič, saj je na začetku rasti celični odziv enak 0. Dodatno je smiselno uvesti časovni zamik d , ki predstavlja čas, ko celica zazna signal in se v obliki prevedene β -galaktozidaze nanj nam opazno odzove. Biološko smiselne vrednosti se gibajo v velikostnem rangu pol ure, kolikor tudi približno znaša podvojevalni čas bakterije v logaritemski rastni fazi. Če Enačbo 19 zapisemo kot nivo odziva preračunan na celico dobimo naslednji izraz:

$$\frac{R(t_2-d)}{N(t_2)} = \Omega \frac{Vmax \left((N(t_2-d))^2 - \left(\frac{Km \operatorname{ArcTan} \left(\frac{(N(t_2-d))^2 a}{Km} \right)}{a} \right) \right)}{N(t_2)} + \frac{R_0}{N(t_2)} \quad \dots(20)$$

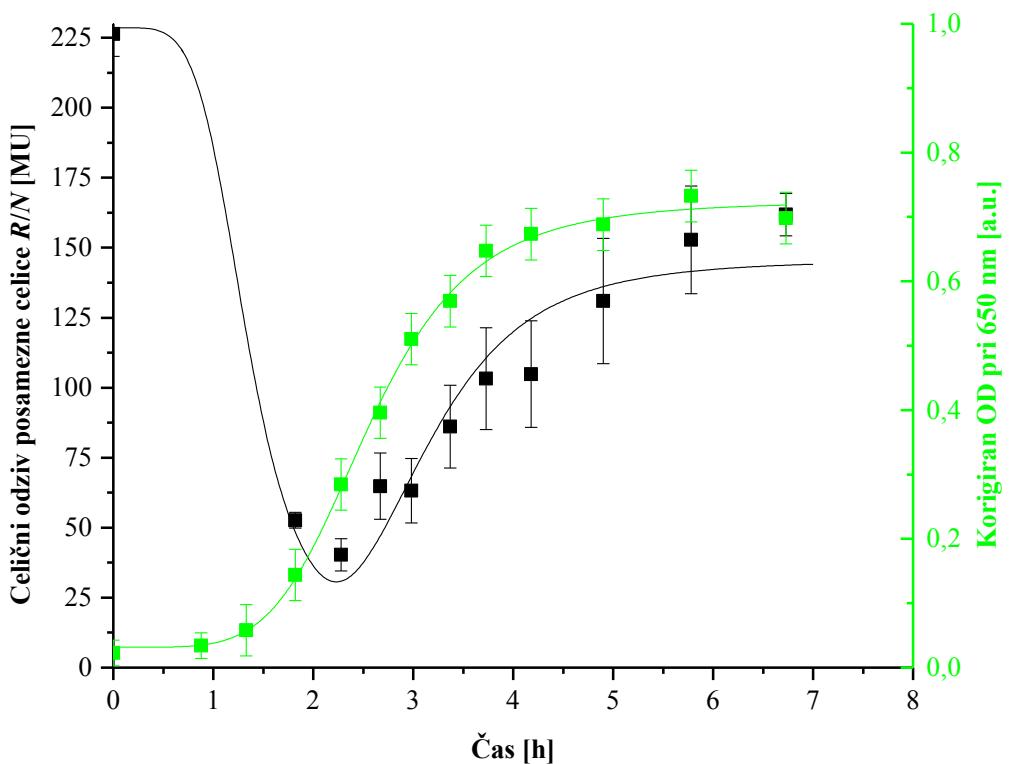
Ko je $t_2 < d$ predpostavljamo, da je celični odziv enak prekonočnemu odgovoru R_0 . Sorazmernostna konstanta Ω ima pri empirični potrditvi modela odziva enote a.u.⁻² MU in jo uporabimo za pretvorbo sorazmernostnega izraza v končno enačbo s katero prilegamo

eksperimentalne podatke. Prav tako smo predpostavljeni, da je K_m enak pri biosenzorju 2 (PS216, $\Delta comQ srf-lacZ$) kot pri sevu poročevalcu (PS216, $srf-lacZ$). Torej seva dosežeta polovico V_{max} pri enaki koncentraciji ComX, maksimalni odziv na celico, izražen v MU pa ni nujno enak.

Če naša prvotna predpostavka modela drži in je celični odgovor res odvisen od hitrosti rasti celične populacije, velikosti celične populacije in pa od uteži, ki jo prispeva uravnavanje odziva s sistemom za zaznavanje kvoruma $W(SM)$, potem bi se pri empirični potrditvi modela moral celični odgovor $R(t)$ izražen na posamezno celico, kot β -galaktozidazna aktivnost, skladati s končno Enačbo 20.

4.2.1 Empirična potrditev modeliranja odzivanja na signal

Prileganje Enačbe 20 na eksperimentalne podatke smo naredili v programu Excel s pomočjo Reševalnika. Pred tem smo rastno krivuljo poročevelskega seva (PS216, $srfA-lacZ$) aproksimirali z logistično funkcijo (Priloga B). Merilo za kvaliteto prileganja eksperimentalnih podatkov k modelu odzivanja je predstavljala vsota kvadratov razlik posameznih izračunanih vrednosti odziva na posamezno celico v Enačbi 20 in empirično izmerjene β -galaktozidazne aktivnosti.



Slika 4: Časovni odvisnosti β -galaktozidazne aktivnosti (■), ki predstavlja celični odziv izražen na celico z modeliranimi vrednostmi iz Enačbe 20 (črna krivulja) in optične gostote kulture OD₆₅₀ (■) z vrisanim prileganjem Enačbe 21 (zelena krivulja) za poročevalski sev (PS216, *srfA-lacZ*). Celični odziv posamezne celice predstavlja teoretične modelirane vrednosti odziva bakterije na ComX (leva stran Enačbe 20) in empirično izmerjeno β -galaktozidazne aktivnost. Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odmiki. Predstavljena je ena izmed 3 neodvisnih ponovitev.

Na Sliki 4 je prikazan celični odziv na ComX signal, merjen kot β -galaktozidazna aktivnost posamezne celice za sev poročevalec (PS216, *srf-lacZ*) gojen v zaprtem šaržnem bioreaktorju. Odziv na signal pomeni aktivnost promotorja surfaktinskega operona. Na sekundarni osi je prikazana rastna krivulja istega seva s korigirano absorbanco pri 650 nm kot merilo bakterijske gostote. Rastna krivulja je prilegana s funkcijo logistic (Priloga B). Model predvideva da bo odgovor na celico v času manjšem od časovnega zamika d zgolj padal, saj je količina prekonočno sintetizirane β -galaktozidaze konstantna (ta takrat ni inducirana), število celic pa se povečuje. Za časovni zamik smo s prileganjem dobili $d = (20 \pm 5)$ min. Po tej točki se populacija prične odzivati na signal in nivo odziva na posamezno celico narašča s celično gostoto, vendar je odziv v primerjavi s prekonočnim

odzivom še vedno šibak. Po dveh urah koncentracija signala ComX v fermentorju (Slika 2) doseže vrednost, pri kateri funkcija $W(SM)$ (Enačba 15) prikazana na Sliki 3 doseže V_{max} , kar smo določili z eksperimentom (Slika 1), in odziv posamezne celice narašča predvsem sorazmerno z rastno hitrostjo celične populacije. Če bi po dveh urah signal odstranili iz gojišča in bi celična populacija še vedno rasla, bi bil celični odziv na osnovi našega modela enak nič, saj bi bil člen $W(SM)$ v Enačbi 14 enak 0 kot lahko to vidimo na Sliki 3. Zato je ComX nujni pogoj za celični odziv, vendar pa po dveh urah gojenja povečevanje signala nima več vpliva na povečevanje celičnega odziva posamezne celice, merjenega na nivoju izražanja aktivnosti promotorja gena *srfA*. Ko se celična gostota ustali in koncentracija ComX doseže 700 pM (Enačba 15, Slika 3), pričakujemo da bo odziv posamezne celice tekom časa nespremenjen, ne glede na to, da se koncentracija ComX v sistemu lahko še vedno veča. Uspešno prileganje eksperimentalnih podatkov k modelni funkciji odziva je v skladu s predpostavljenim matematičnim modelom. To tudi nakazuje, da sta funkciji produkcije signala ComX seva gluhega producenta (PS216 $\Delta comP$) v odvisnosti od časa v šaržnem bioreaktorju na Sliki 1 in funkcija občutljivosti seva biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ$ *srf-lacZ*) v odvisnosti od koncentracije ComX (Slika 3) enaki kot pri sevu poročevalcu (PS216, *srf-lacZ*) s katerim smo na Sliki 4 model odzivanja na signal ComX tudi eksperimentalno potrdili.

5 RAZPRAVA

5.1 DINAMIKA SINTEZE SIGNALA

Končni model koncentracije ComX v odvisnosti od optične gostote (OD_{650}) v Enačbi 10 se ujema z eksperimentalno določenim parametrom b regresije v Enačbi 11. To je v skladu z našo prvotno domnevo eksponentnega kopičenja signala tekom rasti producenta v zaprtem bioreaktorskem sistemu in predpostavko, da je kopičenje ComX odvisno predvsem od hitrosti rasti **populacije celic**. Če se npr. celična gostota poveča za 2x, se koncentracija sintetiziranega signala ComX v gojišču poveča za 4x. Sicer bi opazili podobno odvisnost koncentracije signala v odvisnosti od celične gostote kot Xavier in Bassler (2003) in Anetzberger in sod. (2012), kjer je sinteza signala močno sklopljena s centralnim metabolizmom posamezne bakterije, oz. z rastno hitrostjo **posamezne celice**, kar so potrdili za signal AI-2 pri *Vibrio harveyii*. V njihovem sistemu se 2x celična porast pokaže v 2x porasti količine signala AI-2. Mehanizem zaznavanja parametra pri *B. subtilis*, ki korelira s hitrostjo rasti celične populacije je za enkrat še neznan.

Pri opazovanju 6 koncentracij 6 različnih signalnih molekul z radioaktivnimi označevalci pri bakteriji *Rhizobium leguminosarum* sta Blosser-Middleton in Gray (2001) opazila, da sta dva signala zastopana v večinskem deležu, da signali verjetno med seboj vplivajo na izražanje drug drugega in pa da koncentracija signalov narašča tekom rasti, se ustali v stacionarni fazni in nato prične padati. Blosser-Middleton in Gray (2001) opozarjata, da vzorec sinteze različnih signalov pri bakteriji ni vedno enak, kar zna biti odvisno od medsignalnih vplivov na sintezo posameznega signala. V našem delu interakcij med signali nismo upoštevali, saj nam dodatne signalne molekule, ki bi vplivale na sintezo ComX, niso poznane. Hense in sod. (2012) v kasnejših rastnih fazah opazijo upad koncentracije AHL (Acil homo-serin laktona) signala *Vibrio fischerii* zaradi pomanjkanja limitnega hranila. Hense in Schuster (2015) sta tudi opozorila, da padca v količini sinteze signala pri meritvah Blosser-Middleton in Gray (2001) ni moč pripisati enostavno zmanjšanju rastne hitrosti posamezne celice ali omejeni sintezi zaradi pomanjkanja hranil, saj teh dejavnikov ne moremo ločiti med seboj. Upada koncentracije signala ComX v tem delu nismo opazili, sintezo signala ComX pa smo spremljali le prvih 8 ur do stacionarne faze rasti bakterij.

V članku Hense in sod. (2012) modelirajo zaznavanje kvoruma pri bakteriji *V. fischeri*. V modelu predpostavljajo, da je sinteza signala odvisna tudi od signala samega. Torej izločanje in zaznavanje signalne molekule ojača sintezo enake signalne molekule. Hense in sod. (2012) so zato uporabili Hill-ovo enačbo za modeliranje sinteze signalnih molekul v odvisnosti od časa in ne eksponentne enačbe za modeliranje sinteze signala v odvisnosti od celične gostote, kot smo jo mi (Enačba 11). Hill-ovo enačbo sta uporabila tudi Youk in Lim (2014), saj je umetno konstruirana kvasovka prav tako vsebovala pozitivno povratno zanko. Hill-ovo enačbo so lahko uporabili, ker je funkcija sinteze signala v odvisnosti od koncentracije signala bila sigmoidne oblike. Zgornja limita funkcije v njenem delu je predstavljala V_{max} , faktor n pa je predstavljal eksponentni porast sinteze signala v odvisnosti od časa. Sistem *comQXPA* nima pozitivne povratne zanke (Schneider in sod., 2002). Izražanja signala pri *B. subtilis* zato nismo mogli opisati s to enačbo, zgornje limite sinteze signala po času pa v območju 8-ih ur nismo opazili. Sinteze signala v odvisnosti od časa nismo modelirali (modelirali smo sintezo signala v odvisnosti od **celične gostote**; Slika 2), je pa manj sunkovita in ni izrazito eksponentne narave kot pri prej omenjenih primerih, kar lahko ocenimo na Sliki 1.

Signal *V. harveyii* HAI-1 je bil pod mejo zaznave prvih 8 ur (pod 0,5 μM) in prične naraščati šele v pozni stacionarni fazni rasti (Anetzberger in sod., 2012). Na Sliki 1 vidimo, da koncentracija signala pri *B. subtilis* narašča od začetka rasti. Vemo, da ima *B. subtilis* drugačen mehanizem sinteze signala kot *V. Harveyii* saj pri slednji bakteriji ta služi drugačni funkciji (bioluminiscenci svetilnih organov višjih organizmov) (Anetzberger in sod., 2012). Pri *B. subtilis* pa signal ComX uravnava predvsem izražanje surfaktina, kompetenco in sporulacijo (Nakano in sod., 1991a). Anetzberger in sod. (2012) so pri *V. harveyii* izmerili μM koncentracije signalov v gojišču, kar je 1000x več kot smo pokazali za ComX, ki je prisoten v nanomolarnih koncentracijah. To nakazuje na veliko občutljivost uporabljenih biosenzorjev. Spodnja meja metode detekcije signala ComX, uporabljene v tem delu, je približno 100 pM. Na primer, signala CAI-1 Anetzberger in sod. (2012) niso mogli kvantificirati v absolutnih enotah, saj je bil prisoten v nM koncentracijah. So pa prav tako s podobnim biosenzorskim sevom *V. harveyii* potrdili le prisotnost tega signala in njegovo relativno biološko aktivnost v pozni stacionarni fazni. Absolutne koncentracije signala CAI-1 v mol/l niso izmerili. Mellbye in Schuster (2014) sta za bakterijo

P. aeruginosa pokazala, da redčenje šaržne kulture poveča ekspresijo signalnih molekul. Sistem sinteze signala v tem primeru verjetno odseva pomanjkanje hranil in ne povečevanje celične gostote, kot v našem primeru, kjer se količina signala povečuje z rastno hitrostjo celične populacije.

5.2 DINAMIKA ODZIVANJA NA SIGNAL

Dobro prileganje eksperimentalnih podatkov k modelni funkciji odziva, ki predstavlja aktivnost promotorja surfaktinskega operona, je v skladu z matematičnim modelom. To nakazuje, da sta funkciji produkcije signala seva gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$) v odvisnosti od časa v šaržnem bioreaktorju na Sliki 1 in funkcija občutljivosti seva biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ srf-lacZ$) v odvisnosti od koncentracije ComX (Slika 3) enaki pri sevu poročevalcu (PS216, $srf-lacZ$) s katerim smo na Sliki 4 model odzivanja na signal ComX tudi eksperimentalno potrdili. Celični odziv bakterije biosenzorja 2 (PS216, $\Delta comQ srf-lacZ$) v odvisnosti od koncentracije ComX doseže nasičenje pri relativno nizkih koncentracijah signala (700 pM) (Slika 3). To koncentracijo signala sev gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$) v fermentorju doseže že pri optični gostoti (merjeni pri 650 nm) 0,2 a.u. (Slika 1), ki jo bakterijska populacija doseže v prvih dveh urah gojenja pri testiranih pogojih. Kasneje odziv posamezne celice, prikazan na Sliki 4 kot β -galaktozidazna aktivnost seva poročevalca (PS216, $srf-lacZ$) narašča predvsem zaradi hitrosti rasti celične populacije in ni več občutljiv na nadaljnje povečevanje koncentracije ComX. Koncentracija signala se po tej točki še vedno povečuje, kot lahko vidimo na Sliki 1. Če bi pri enakih pogojih sintezo signala po dveh urah ustavili in ohranjali 700 pM koncentracijo signala, bi glede na model odzivanje na Sliki 4 izgledalo nespremenjeno. Če pa bi ComX v katerikoli časovni točki razgradili do konca, bi v skladu z napovedjo modela moral odziv posamezne celice padati proti 0. V preiskovanem časovnem intervalu rastne krivulje je ComX nujen pogoj za celični odziv *B. subtilis*, povečevanje signala ComX v fermentorju po dveh urah pa ne igra vloge pri povečevanju odziva posamezne celice na signal. To je prikazano z modelom in prilegajočimi eksperimentalnimi podatki na Sliki 4. Porast odziva po 2 urah v fermentorju se spreminja predvsem s hitrostjo rasti celične populacije. Funkcija občutljivosti seva biosenzor 2 na ComX, $W(SM)$ (Enačba 14), v tej točki doseže maksimalno vrednost, V_{max} (Slika 3 in Slika 1) in se preneha spremenjati. Potem se v Enačbi 14 spreminja le še velikost celične populacije in rastna hitrost celične

populacije. Mehanizem zaznavanja velikosti populacije nam je še neznan. V območju med 40 in 700 pM koncentracijo ComX (do dveh ur gojenja; Slika 1) smo zaznali tudi postopno naraščanje odziva (Slika 3). V tem območju se odziv posamezne bakterije na signal ComX povečuje stopenjsko, vendar v kratkem časovnem območju v primerjavi s časom celotne krivulje rasti bakterije, do njene stacionarne faze. Zato je, iz vidika časovnega obdobja celotne rastne krivulje, kvorum dosežen v sorazmerno ozkem koncentracijskem območju ComX in bi lahko koncentracija 700 pM signala ComX predstavljala kvorum bakterije. To bi bilo smiselno v naravnem okolju, kjer bakterijske populacije običajno ne dosegajo takov visoke celične gostote kot v laboratorijskih pogojih.

Receptorji autoinducirajočih bakterij zelo pogosto zaznavajo signal kooperativno (vezava več molekul signala ojača nadaljnjo vezavo drugih molekul in ojača zaznavanje signalnih molekul) ali pa histerezno (zaznavanje signala ojača izražanje signala samega, ustvari se pozitivna povratna zanka), kar omogoča da lahko sistem v dovolj grobih mejah poenostavimo s stikalom, kjer so celice v vključenem ali izključenem stanju, dejanska dinamika odziva na signal pa je bila le redkokdaj empirično potrjena (Hense in Schuster, 2015). V našem primeru bi lahko govorili o kooperativnem zaznavanju receptorja, saj je v enačbi (14) parameter n enak 2. Na Sliki 3, lahko tudi vidimo, da je sprememba odziva zaradi parametra n do limite V_{max} sunkovita. Molekularnega mehanizma pri *B. subtilis* s katerim bi receptor zaznal molekule kooperativno ne poznamo. Histereze sinteze signalnih molekul pa v našem sistemu ni (Schneider in sod., 2002).

Pri celicah, ki izločajo skupne dobrane, ki jih koristijo vse celice (npr. ekstracelularni encimi) cena kooperativnega obnašanja narašča linearno s populacijo, korist za populacijo pa narašča sigmoidno s populacijo (Hense in Schuster, 2015). Sigmoidna krivulja narašča bolj strmo kot linearne premice, zato na začetku skupna korist odtehta ceno sinteze skupne dobrane. Vendar ima sigmoida limito in tam se kooperacijsko vedenje ne splača, saj je cena sinteze skupne dobrane večja, kot je korist kooperacije. Pai in sod. (2012) v umetnem sistemu slednje tudi eksperimentalno potrdijo. V našem sistemu ne poznamo direktne evolucijske koristi, ki bi jo izražanje genov operona *srfA* lahko prineslo, opazimo pa, da se celični odziv posamezne prične izrazito povečevati po 2 urah, kar bi se lahko sovpadalo s spodnjo mejo intervala, kjer se kooperacija še splača. Ponovnega padca celičnega odziva

po 8 urah nismo opazili. Padec bi bil skladen z zgornjo mejo intervala, kjer se kooperacijsko vedenje za celico ne splača več.

Vse kar vpliva na lokalno koncentracijo signala v okolini receptorja je lahko informacija, katero celica obdela v odzivu na signal (Hense in Schuster, 2015). V našem sistemu je odziv posamezne celice odvisen predvsem od lokalne koncentracije ComX, torej bi celica lahko v naravi s tem sistemom zaznavala vse dejavnike, ki na to koncentracijo vplivajo, npr. difuzibilnost okolja, prisotnost proteaz, ki ComX inaktivirajo, število bakterij, ki ComX sintetizira, prostorsko razporeditev teh bakterij, slanost, ki bi lahko vplivala na aktivnost ComX. Ko pa je lokalna koncentracija signala ComX večja od 700 pM, celica verjetno zaznava predvsem dejavnike, ki vplivajo na velikost celične populacije in temu primerno prilagaja svoj odziv. Pri večjih bakterijskih gostotah je tako odziv posamezne celice tudi sorazmerno večji. To je v skladu z ugotovitvami Butler in sod. (2010), kjer pokažejo, da indukcija operona *srfA* lahko v nekaterih primerih nudi prednost bakterijam pri višjih celičnih gostotah. Pri večji difuzibilnosti okolja, kjer pa bi količina ComX v okolini celice padla pod cca. 100 pM, bi bil odziv celice na signal zanemarljiv (Slika 3). V teh pogojih bi verjetno bila sinteza dragega surfaktina nesmiselna, ne glede na bakterijsko gostoto, saj bi se surfaktin, ki je majhen lipopetid, z difuzijo razredčil. Zato bi bil celični odziv enak 0, četudi bi lahko bila celična gostota velika, kot vidimo v Enačbi 14.

6 SKLEPI

- V zaprtem bioreaktorskem sistemu je sinteza signala ComX pri sevu *B. subtilis* PS216 sorazmerna s kvadratom bakterijske populacije.
- Bakterijski odziv posamezne celice pri sevu *B. subtilis* PS216, ki predstavlja aktivnost promotorja surfaktinskega operona (*srfA-lacZ*), na signal ComX je odvisen od občutljivosti seva na signal ComX in hitrosti rasti celične populacije.
- Pri sevu *B. subtilis* PS216 in pri preučevanih pogojih koncentracija signala ComX nima vloge pri povečevanju intenzitete odziva posamezne celice, kadar je bakterijska gostota pri 650 nm višja od 0,2 a.u. Koncentracija ComX se navkljub temu s celično gostoto še vedno povečuje.

7 POVZETEK

Celice lahko z izvenceličnimi signali uravnavajo izražanje lastnih genov v odvisnosti od celične gostote (Nealson in Hastings, 1979). *Bacillus subtilis* lahko komunicira s signalom ComX, ki sproži odziv celic (v tej nalogi predstavljen kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona) pri visoki bakterijski gostoti (Magnuson in sod., 1994; Ansaldi in sod., 2002). Sistem za zaznavanje kvoruma *comQXPA*, vključuje gene z zapisom za štiri proteine, med katerimi je tudi ComP receptor, ki ga ComX aktivira. Aktivacija ComP sproži avtofosforilacijo tega receptorja in prenos fosfata na transkripcijski regulator ComA (Roggiani in Dubnau, 1993). ComA-P pozitivno uravnava operon *srfA*, ki je odgovoren za sintezo surfaktina (Nakano sod., 1991a). Kopičenje tega potencialno industrijsko pomembnega lipopeptidnega antibiotika in surfaktanta (Peypoux in sod., 1999) je torej posledica odziva na signal ComX (Ansaldi in sod., 2002). Surfaktin je tudi skupna dobrina celične populacije (Oslizlo in sod., 2014).

V magistrskem delu smo preiskovali odvisnost med celično gostoto bakterije *B. subtilis* in sintetiziranjem izvenceličnega signala ComX ter občutljivostjo bakterijskega odziva, definiranem kot aktivnost promotorja surfaktinskega operona, pri različni koncentraciji signala ComX, v zaprtem bioreaktorskem sistemu. V matematičnem modelu smo predpostavili, da je sinteza signala ComX sorazmerna z velikostjo celične populacije in da je odziv posamezne celic na signal ComX pri *B. subtilis* sorazmeren z občutljivostjo bakterije na signal ComX in hitrostjo rasti celične populacije.

Sistem zaznavanja celične gostote smo razklopili na sintezo in zaznavanje signala ComX. Oba pojava smo modelirali za celotno rastno krivuljo *B. subtilis*. Matematični model smo empirično potrdili. Prileganje eksperimentalnih podatkov k modelni funkciji odziva, je v skladu z matematičnim modelom. To tudi nakazuje, da sta funkciji produkcije signala seva gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$) v odvisnosti od časa v šaržnem bioreaktorju in funkcija občutljivosti seva biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ$ *srf-lacZ*) v odvisnosti od koncentracije ComX enaki pri sevu poročevalcu (PS216, *srf-lacZ*) s katerim smo model odzivanja na signal ComX tudi eksperimentalno potrdili.

V območju med 40 in 700 pM koncentracijo ComX se odziv bakterije *B. subtilis* seva biosenzor 2 (PS216, $\Delta comQ$ *srf-lacZ*) na signal povečuje stopenjsko vendar v kratkem

časovnem območju v primerjavi s časovnim obdobjem celotne rastne krivulje. ComX je nujen pogoj za celični odziv, vendar se pri koncentracijah signala, višjih od 700 pM odziv posamezne celice, merjen pri sevu poročevalcu (PS216, *srf-lacZ*) kot β -galaktozidazna aktivnost, povečuje le še sorazmerno s povečevanjem hitrosti rasti celične populacije in ne s povečevanjem signala ComX, čeprav koncentracija signala tekom rasti gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$) v fermentorju narašča tudi preko meje 700 pM. Mehanizem zaznavanja rasti celične populacije oziroma specifična vloga naraščanja koncentracije ComX nad 700 pM je še neznanka. Vendar, če signala ni tudi celičnega odziva ni, ne glede na ostale dejavnike. Model nam prinaša nov uvid v dinamiko sistema za zaznavanje kvoruma bakterije *B. subtilis*.

8 VIRI

- Anetzberger C., Reiger M., Fekete A., Schell U., Stambrau N., Plener L., Jung K., 2012. Autoinducers act as biological timers in *Vibrio harveyi*. PLoS ONE, 7, 10: e48310, doi: 10.1371/journal.pone.0048310: 13 str.
- 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.
- Ansaldi M., Marolt D., Stebe T., Mandic-Mulec I., Dubnau D. 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. Molecular Microbiology, 44, 6: 1561-1573.
- Atkinson S., Williams P. 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. Journal of the Royal Society Interface, 6, 40: 959-978.
- 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, 14: 5273-5285.
- Banat I. M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M. G., Fracchia L., Marchant R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 2: 427-444.
- Blosser-Middleton R. S., Gray, K. M. 2001. Multiple N-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. Journal of Bacteriology, 183, 23: 6771-6777.
- Butler M. T., Wang Q., Harshey R. M. 2010. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 8: 3776-3781.
- Capra E. J., Laub M. T. 2012. The evolution of two-component signal transduction systems. Annual Review of Microbiology, 66: 325-347.
- Christofi N., Ivshina I. B. 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Journal of Applied Microbiology, 93, 6: 915-929.

- 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.
- Darch S., West S. A., Winzer K., Diggle S. P. 2012. Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 21: 8259-8263.
- Diggle S. P., Griffin A. S., Campbell G. S., West S. A. 2007. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450, 7168: 411-414.
- Drees B., Reiger M., Jung K., Bischofs I. B. 2014. A modular view of the diversity of cell-density-encoding schemes in bacterial quorum-sensing systems. *Biophysical Journal*, 107, 1: 266-277.
- 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, 20: 9397-9401.
- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55, 3: 395-424.
- Dubnau D., Hahn J., Roggiani M., Piazza F., Weinrauch Y. 1994. Two-component regulators and genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*, 145, 5: 403-411.
- Dunlap P. V. 1997. N-acyl-l-homoserine lactone autoinducers in bacteria: unity and diversity. V: *Bacteria as multicellular organisms*. Shapiro J.A., Dworkin M. (eds.) New York, Oxford University Press: 69-106.
- Fabret C., Feher V. A., Hoch J. A. 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *Journal of Bacteriology*, 181, 7: 1975-1983.

- Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176, 2: 269-275.
- Grebe T. W., Stock J. B. 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Advances in Microbial Physiology*, 41: 139-227.
- Haldenwang W. G. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 59 ,1: 1-30.
- Hense B. A., Kuttler C., Müller J., Rothbauer M., Hartmann A., Kreft J. U. 2007. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Reviews Microbiology*, 5, 3: 230-239.
- Hense B. A., Müller J., Kuttler C., Hartmann A. 2012. Spatial heterogeneity of autoinducer regulation systems. *Sensors*, 12, 4: 4156-4171.
- Hense B. A., Schuster M. 2015. Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 1: 153-169.
- Hoch J. A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 2: 165-170.
- Iglewicz B., Hoaglin D. 1993. How to detect and handle outliers. Milwaukee, American Society for Quality Control Press: 87 str.
- Jarstfer M. B., Zhang D. L., Poulter C. D. 2002. Recombinant squalene synthase: Synthesis of non-head-to-tail isoprenoids in the absence of NADPH. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 30: 8834-8845.
- Kleerebezem M., Quadri L.E., 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.
- Kobayashi K., Ehrlich S. D., Albertini A., Amati G., Andersen K. K., Arnaud M., Mauel C. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8: 4678-4683.

- Kraas F. I., Helmetag V., Wittmann M., Strieker M., Marahiel M. A. 2010. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chemistry & Biology*, 17, 8: 872-880.
- Kuipers B. J., Gruppen H. 2007. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 14: 5445-5451.
- López D., Kolter R. 2010. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 2: 134-149.
- López D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & Development*, 23, 14: 1631-1638.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. 2009. Brock biology of microorganisms. 12th ed. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 191-192.
- Magnuson R., Solomon J., Grossman A. D. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, 77, 2: 207-216.
- Makita Y., Nakao M., Ogasawara N., Nakai K. 2004. DBTBS: database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* and its contribution to comparative genomics. *Nucleic Acids Research*, 32: 75-77.
- Mandic-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.
- Mellbye B., Schuster M. 2014. Physiological framework for the regulation of quorum sensing-dependent public goods in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 196, 6: 1155-1164.
- Miller M. B., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55, 1: 165-199.

- Nakano M. M., Magnuson R., Myers A., Curry J., Grossman A. D., Zuber P. 1991a. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173, 5: 1770-1778.
- 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. A., Zuber P. 1991b. Transcription initiation region of the *srfA* operon, which is controlled by the *comP-comA* signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173, 17: 5487-5493.
- Nakano M. M., Zuber P. 1993. Mutational analysis of the regulatory region of the *srfA* operon in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 175, 10: 3188-3191.
- Nakano M. M., Zuber P. 1991. The primary role of *comA* in establishment of the competent state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of *srfA*. *Journal of Bacteriology*, 173, 22: 7269-7274.
- Nealson K. H., Hastings J. W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43, 4: 496-518.
- Ogura M., Yamaguchi H., Yoshida K. I., Fujita Y., Tanaka T. 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. Subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Research*, 29, 18: 3804-3813.
- Okada M. 2011. Post-translational isoprenylation of tryptophan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 8: 1413-1417.
- Okada M., Sato I., Cho S. J., Dubnau D., Sakagami Y. 2006. Chemical synthesis of ComX pheromone and related peptides containing isoprenoidal tryptophan residues. *Tetrahedron*, 62, 38: 8907-8918.
- 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, 1: 23-24.

- Oslizlo A., Stefanic P., Dogsa I., Mandic-Mulec I. 2014. Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111, 4: 1586-1591.
- Oslizlo A., Stefanic P., Vatovec S., Beigot Glaser S., Rupnik M., Mandic-Mulec I. 2015. Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizoplane. Microbial Biotechnology, 8, 3: 527-540.
- Pai A., Tanouchi Y., You L. 2012. Optimality and robustness in quorum sensing (QS)-mediated regulation of a costly public good enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 48: 19810-19815.
- Peypoux F., Bonmatin J. M., Wallach J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology and Biotechnology, 51, 5: 553-563.
- 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.
- Pittler S. J., Fliesler S. J., Fisher P. L., Keller P. K., Rapp L. M. 1995. *In vivo* requirement of protein prenylation for maintenance of retinal cytoarchitecture and photoreceptor structure. Journal of Cell Biology, 130, 2: 431-439.
- Raaijmakers J. M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiology Reviews, 34, 6: 1037-1062.
- Redfield R. J. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? Trends in Microbiology, 10, 8: 365-370.
- Roggiani M., Dubnau D. 1993. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. Journal of Bacteriology, 175, 10: 3182-3187.
- 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.

- Schuster M., Greenberg E. P. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Medical Microbiology, 296, 2: 73-81.
- Shapiro J. A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annual Reviews in Microbiology, 52, 1: 81-104.
- 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, 16: 2014-2024.
- 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, 5: 547-558.
- Stefanic P., Decorosi F., Viti C., Petito J., Cohan F. M., Mandic-Mulec I. 2012. The quorum sensing diversity within and between ecotypes of *Bacillus subtilis*. Environmental Microbiology, 14, 6: 1378-1389.
- Stefanic P., Mandic-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* pherotypes at microscale. Journal of Bacteriology, 191, 6: 1756-1764.
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, 56, 4: 845-857.
- Tanaka T., Saha S. K., Tomomori C., Ishima R., Liu D., Tong K. I., Ikura M. 1998. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. Nature, 396, 6706: 88-92.
- Tortosa P., Logsdon L., Kraigher B., Itoh Y., Mandic-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., 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.

Vogrič V., 2013. Vpliv temperature na medcelično signaliziranje s ComX pri bakteriji *Bacillus subtilis*. Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Študij mikrobiologije: 16-32.

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.

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, 5: 860-872.

Whitehead N. A., Barnard A. M., Slater H., Simpson N. J., Salmond G. P. 2001. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 25: 365–404.

Williams P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. Microbiology, 153, 12: 3923-3938.

Xavier K. B., Bassler B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Current Opinion in Microbiology, 6: 191–197.

Youk H., Lim W. A. 2014. Secreting and sensing the same molecule allows cells to achieve versatile social behaviors. Science, 343, 6171: 628-638.

ZAHVALA

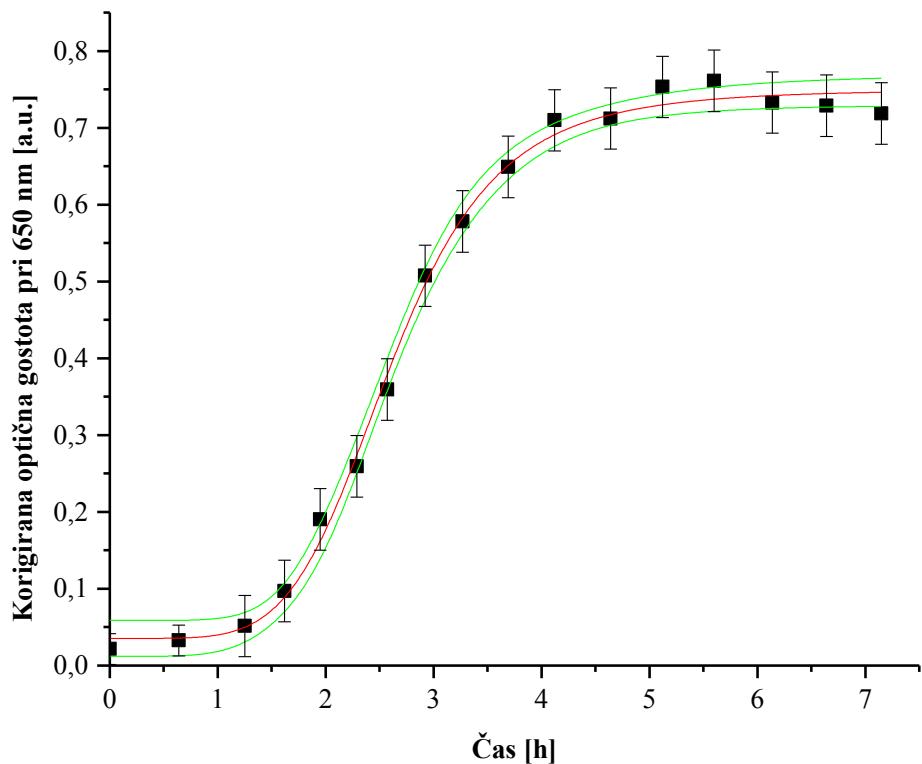
Hvala.

PRILOGE

Priloga A: Potek programa izvedbe HPLC.

| Čas | Pretok | Črpalka A | Črpalka B | Valovna dolžina |
|-------|----------|-----------|-----------|-----------------|
| [min] | [ml/min] | [% A] | [% B] | [nm] |
| 0,00 | 1 | 0 | 100 | 214 |
| 0,02 | 1 | 0 | 100 | 214 |
| 5,00 | 1 | 0 | 100 | 214 |
| 5,02 | 1 | 0 | 100 | 214 |
| 10,00 | 1 | 25 | 75 | 214 |
| 10,02 | 1 | 25 | 75 | 214 |
| 54,00 | 1 | 31 | 69 | 214 |
| 54,02 | 1 | 31 | 69 | 214 |
| 57,00 | 1 | 100 | 0 | 214 |
| 62,00 | 1 | 100 | 0 | 214 |
| 65,40 | 1 | 0 | 100 | 214 |

Priloga B: Graf odvisnosti korigirane optične gostote izmerjene pri 650 nm (■) od časa za poročevalske celice (PS216, *srfA-lacZ*) Z rdečo je vrnsana logistična funkcija prikazana v Enačbi 21, z zeleno pa njen 95 % interval zaupanja. Kot eksperimentalne napake so prikazani standardni odkloni meritev. Prikazana je rastna krivulja istega seva kot na Sliki 4.

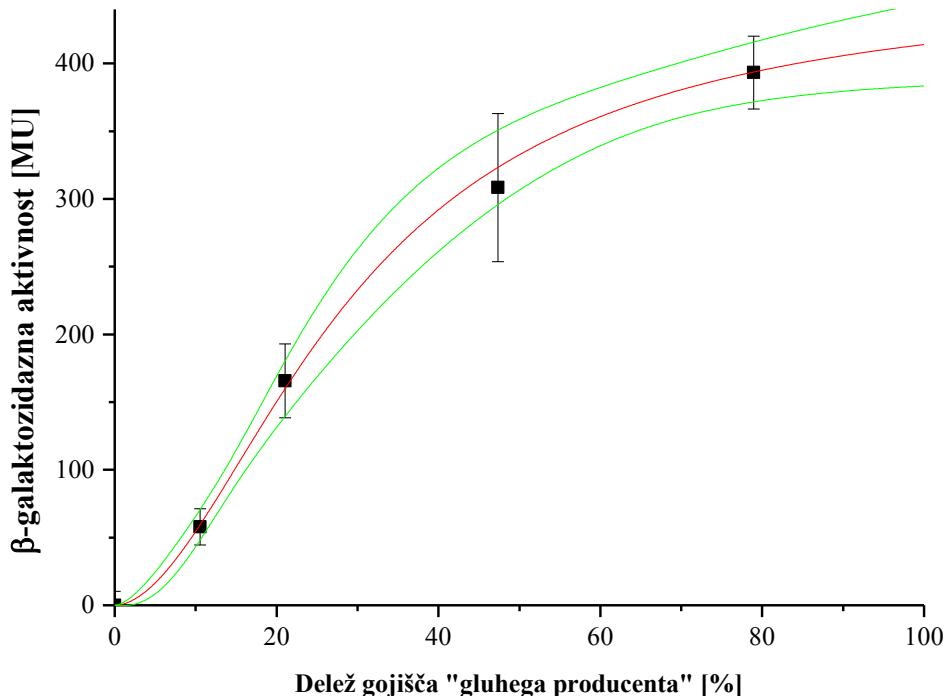


Na sliki vidimo enega izmed reprezentativnih grafov korigiranega OD₆₅₀ (Enačba 5) v odvisnosti od časa za poročevalski sev (PS216, *srf-lacZ*). Prileganje je bilo potrebno, saj je postavljen matematični model bakterijskega odziva v Enačbi 20 zvezen za celotno rastno krivuljo. Tako lahko predvidimo celični odziv pri katerikoli optični gostoti bakterijske populacije.

$$f(x) = \frac{A_1 - A_2}{1 + (\frac{x}{x_0})^p} + A_2 \quad \dots(21)$$

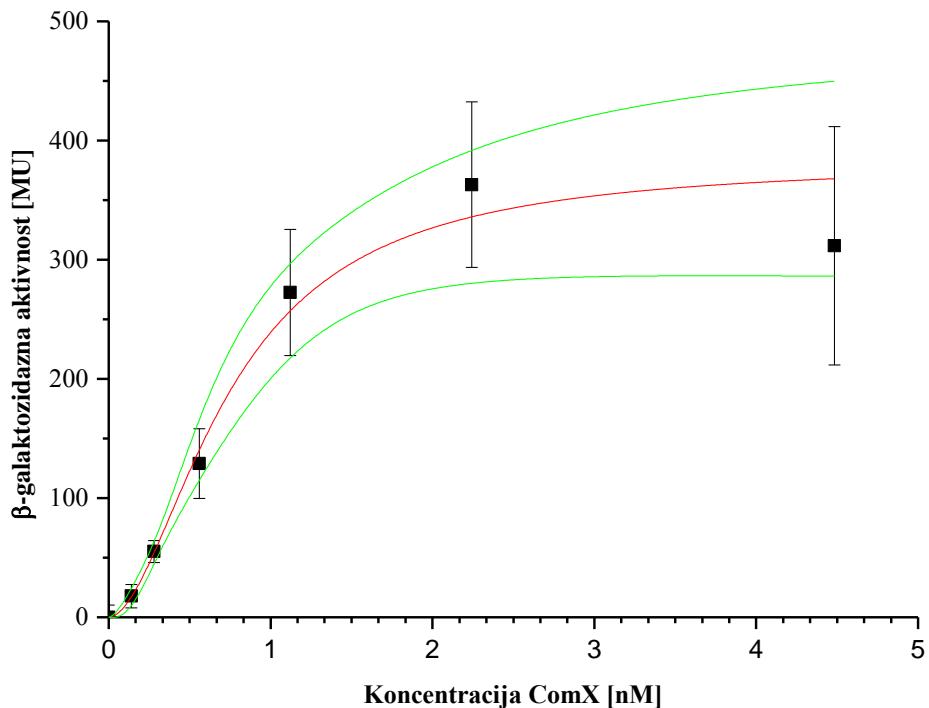
Enačba 21 je Funkcija logistic v programu Origin. A1, A2, x0 in p so parametri funkcije.

Priloga C: Eksperimentalna krivulja za 3. časovno točko na Slikah 1 in 2. β -galaktozidazne aktivnosti (■) biosenzorja 1 (BD2876, $\Delta ComQ srf-lacZ$) v odvisnosti od izrabljenega gojišča gluhega producenta (PS216, $\Delta ComP$) gojenega v fermentorju. Vrisana je Hill-ova nelinearna regresija (rdeča črta) s 95 % intervalom zaupanja regresije (zelena črta). Prikazane eksperimentalne napake so standardne napake.



Na sliki vidimo β -galaktozidazno aktivnost biosenzorja 1 (BD2876, $\Delta comQ srf-lacZ$) v odvisnosti od redčenega gojišča gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$), gojenega v fermentorju. Izrabljeno gojišče smo redčili z izrabljenim gojiščem nemega testerja (PS216, $\Delta comQ$), pri istih rastnih pogojih in v isti rastni fazi. Eksperimentalna krivulja je bila izmerjena za tretjo točko koncentracije ComX na Sliki 1 in 2. Za vsako izmed točk na Slikah 1 in 2 in točk na preostalih dveh neodvisnih ponovitvah smo izmerili podobno eksperimentalno krivuljo. S primerjavo eksperimentalne krivulje z umeritveno krivuljo v Prilogi D smo izračunali absolutno koncentracijo ComX v izrabljenem gojišču gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$), gojenega v fermentorju.

Priloga D: Umeritvena krivulja za 3. časovno točko na Slikah 1 in 2 β -galaktozidazne aktivnosti (■) biosenzorja 1 (BD2876, $\Delta ComQ srf-lacZ$) v odvisnosti od znane količine s HPLC prečiščenega signala ComX. Vrisana je Hill-ova nelinearna regresija (rdeča črta) s 95 % intervalom zaupanja regresije (zeleni črti). Prikazane eksperimentalne napake so standardne napake.



Na sliki vidimo β -galaktozidazno aktivnost biosenzorja 1 (BD2876, $\Delta comQ srf-lacZ$) v odvisnosti od znane količine s HPLC prečiščenega ComX, pridobljenega kot opisano v poglavju: »3.6.2 Čiščenje ComX iz izrabljenega gojišča *E. coli* ED367 s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti«. Prečiščen ComX smo redčili z izrabljenim gojiščem nemega testerja (PS216, $\Delta comQ$), pri istih rastnih pogojih in v isti rastni fazi za posamezno mersko točko na Sliki 1 in 2. Prikazana umeritvena krivulja je bila izmerjena za tretjo točko koncentracije ComX na Sliki 1 in 2. Za vsako izmed točk na Slikah 1 in 2 in točk na preostalih dveh neodvisnih ponovitvah smo izmerili podobno umeritveno krivuljo. S primerjavo umeritvene krivulje z meritveno krivuljo v Prilogi C smo izračunali absolutno koncentracijo ComX v izrabljenem gojišču gluhega producenta (PS216, $\Delta comP$), gojenega v fermentorju.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mihael ŠPACAPAN

**POVEZAVA MED CELIČNO GOSTOTO,
KONCENTRACIJO SIGNALNEGA PEPTIDA IN
ODZIVOM NA SIGNAL PRI BAKTERIJI *Bacillus*
*subtilis***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015