

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Simona KAMENŠEK

**VLOGA KOLICINOV BAKTERIJE *Escherichia coli* IN IZRAŽANJE
GENOV ZA NJIHOVO SINTEZO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ROLE OF COLICINS OF BACTERIA *Escherichia coli* AND
EXPRESSION OF GENES FOR THEIR SYNTHESIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

POPRAVKI

Doktorska naloga je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti. Delo je bilo opravljeno na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Del raziskav je potekal na Centru za funkcijsko genomiko in bio-čipe Inštituta za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ter v laboratoriju prof. dr. Osnat Gillor, Zuckerberg Institute for Water Research, The Jacob Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University, Izrael ob pomoči financiranja iz Evropskega projekta FP6 (Sixth EU Framework Programme for Research and Technological Development): Transnational Access, Dryland Research Specific Support Action (SSA).

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 6. 7. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja genetike. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Darja Žgur-Bertok.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Inštitut za mlekarstvo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja RUPNIK
Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Raziskovalna skupina ZZV
Maribor

Datum zagovora: 7.5.2013

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona KAMENŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 577.21:575(043.3)=163.6
KG kolicini/*Escherichia coli*/kolicin M/DNA mikromreže/izražanje kolicinskih genov/sinteza kolicinov/ekološka vloga kolicinov/protein IscR
AV KAMENŠEK, Simona, univ. dipl. mikrobiol.
SA ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje genetika
LI 2013
IN VLOGA KOLICINOV BAKTERIJE *Escherichia coli* IN IZRAŽANJE GENOV ZA NJIHOVO SINTEZO
TD Doktorska disertacija s področja genetike
OP XVIII, 172 str., 29 pregl., 38 sl., 4 pril., 302 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kolicini so proteini, katere sintetizirajo kolicinogeni sevi bakterije *Escherichia coli* in delujejo baktericidno na občutljive bakterije iste ali sorodne vrste. Vsem kolicinskim genom je skupno uravnavanje izražanja s proteinom LexA, represorjem odziva SOS, induciranim po poškodbah DNA. Ker so kolicini sproščeni z lizo producenta, je njihova sinteza tudi močno časovno uravnana, vendar so dejavniki, odgovorni za to časovno uravnavanje, neznani. Kolicini igrajo pomembno vlogo pri znotrajvrstnih interakcijah. Namen doktorskega dela je bil podrobneje razjasniti vlogo kolicinov v naravnem okolju in kompleksnost uravnavanja izražanja kolicinskih genov. Kolicin M (ColM) je najpogostejši kolicin naravnih kolicinogenih sevov, ki povzroči celično lizo s prekinitvijo sinteze peptidoglikana. Z namenom pridobiti vpogled v odziv občutljivih bakterijskih populacij na ColM v naravnem okolju, kakor tudi ob uporabi kolicina kot protimikrobnega sredstva, smo preučevali odziv seva *E. coli* na subinhibitorne koncentracije ColM s transkriptomsko analizo celotnega genoma z DNA mikromrežami in z uporabo fizioloških testov. Transkriptomsko analiza je pokazala povečanje izražanja genov stresnih odzivov ovojnice, osmotskih in drugih, vključno z geni dvokomponentnega sistema CreBC, geni za sintezo zunajceličnih polisaharidov in zmanjšano izražanje genov za gibljivost. Regulon Rcs igra ključno vlogo pri globalnem odzivu *E. coli* na tretiranje s kolicinom M. ColM ne inducira odziva SOS, ne povzroči povečanega nastanka biofilma in ne omogoči povečane sinteze zunajceličnega polisaharida kolanske kisline, zato ima velik potencial za nadaljni razvoj protimikrobnega sredstva. V naravnem okolju bi bili lahko s ColM inducirani stresni odzivi pomembni v znotrajvrstni dinamiki, saj v občutljivi bakteriji inducirajo odzive, ki omogočijo nekolicinogenim celicam ekološko prilagoditev, preživetje in tekmovanje s kolicinogenim sevom. Uravnavanje izražanja kolicinskih genov smo preučevali s sledenjem izražanja fuzij promotorjev genov aktivnosti kolicinov s poročevalskimi geni. Ugotovili smo, da pri uravnavanju izražanja gena porotvornega kolicina K, *cka*, protein IscR stabilizira protein LexA na promotor in skupaj s kooperativnostjo vezave dveh LexA dimerov povzroči zamik v transkripciji *cka* po indukciji odziva SOS, vendar le dokler je dovolj hranil. Rezultati kažejo, da IscR ne uravnava izražanja nukleaznih kolicinov. Na podlagi analize proteinov, ki se vežejo na promotor nukleaznega kolicina E8 in preučevanjem transkripcije v njihovi odsotnosti sklepamo, da je pri zamiku v izražanju gena po indukciji poškodb DNA morda vpleten protein AsnC. Izražanje kolicinskih genov je torej različno uravnano, vpleteni so različni regulatorni proteini in mehanizmi, pomembni pri njihovi ekološki vlogi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDK 577.21:575(043.3)=163.6
CX colicins/*Escherichia coli*/colicin M/DNA microarrays/colicin gene expression/
colicin synthesis/colicin ecological role/IscR protein
AU KAMENŠEK, Simona
AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological
and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY 2013
TI ROLE OF COLICINS OF BACTERIA *Escherichia coli* AND EXPRESSION
OF GENES FOR THEIR SYNTHESIS
DT Doctoral Dissertation
NO XVIII, 172 p., 29 tab., 38 fig., 4 ann., 302 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Colicins are proteins produced by *Escherichia coli* colicinogenic strains and are bactericidal for sensitive strains of the same or related species. Regulation by LexA the key regulator of the SOS response induced following DNA damage, is common to all colicins. Since colicins are released via lysis of the producer their synthesis is also characterized by tight temporal regulation which is poorly understood. Colicins play an important role in interspecies interactions. The aim of our study was to elucidate their role in their natural environments and their complex expression regulation. Colicin M (ColM) is the most common colicin found among natural colicinogenic strains and provokes cell lysis with the inhibition of peptidoglycan synthesis. To gain insight into the responses of sensitive bacterial populations to ColM in the natural environment or when used as an antimicrobial agent we studied the response of an *E. coli* strain to ColM subinhibitory concentrations on a global gene expression scale by using DNA microarrays and physiological tests. Transcriptomic analysis showed increased expression of envelope, osmotic and other stress responses, including the two-component system CreBC genes, genes for the synthesis of extracellular polysaccharides and decreased expression of genes for motility. The Rcs regulon plays a key role in the global response to *E. coli* upon treatment with colicin M. As ColM does not induce the SOS response, increased biofilm formation nor increased synthesis of the extracellular polysaccharide colanic acid, it shows high potential for further development as an antimicrobial agent. In the natural environment ColM induced stress responses could be important in intraspecies dynamics as they instigate responses in sensitive bacteria that enable ecological adaptation, survival and competition with noncolicinogenic cells. Expression control of colicin genes was studied by following the expression of colicin promoter fusions employing reporter genes. We found that protein IscR is involved in regulation of the pore-forming colicin K activity gene, *cka*. The IscR protein was shown to stabilize DNA bound LexA and that IscR together with cooperativity of two LexA dimers binding causes a delay in *cka* transcription upon SOS response induction, but only until nutrients are available. Our results also show that IscR does not control expression of nuclease colicins. Analysis of proteins that bind to the promoter of the nuclease colicin E8, and studies of transcription in their absence indicate that AsnC protein could be responsible for the expression delay following induction of DNA damage. The expression of individual colicin activity genes is controlled by specific regulatory proteins and mechanisms important for their ecological role.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	XI
KAZALO SLIK	XIII
KAZALO PRILOG	XV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XVI
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE:	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 BAKTERIOCINI BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 GENETIKA KOLICINOV	5
2.2.1 Plazmidi s kolicinskimi geni	5
2.2.2 Razporeditev kolicinskih genov	5
2.3 SPROŠČANJE KOLICINOV	7
2.4 STRUKTURNA ORGANIZACIJA KOLICINA	7
2.4.1 Vezava kolicina na celični receptor	8
2.4.2 Translokacija kolicinov preko celične ovojnice	9
2.4.3 Mehanizem delovanja kolicinov	11
2.4.3.1 Porotvorni kolicini	12
2.4.3.2 Kolicini z nukleazno aktivnostjo	12
2.4.3.2.1 DNazni kolicini	13
2.4.3.2.2 RNazni kolicini	14
2.4.3.3 Inhibicija sinteze peptidoglikana s kolicinom M	15
2.5 ZAŠČITA PRED KOLICINI	17
2.5.1 Imunost porotvornih kolicinov	17
2.5.2 Imunost nukleaznih kolicinov	17
2.5.3 Imunost kolicina M	18
2.6 URAVNAVANJE SINTEZE KOLICINOV	18
2.6.1 Uravnavanje izražanja kolicinskih genov s sistemom SOS	19
2.6.1.1 Mehanizem indukcije SOS	19
2.6.1.2 Lastnosti vezave represorja LexA na DNA	20
2.6.1.3 Uravnavanje transkripcije kolicinskih genov z LexA	21
2.6.2 Uravnavanje izražanja z okoljskimi dejavniki	22
2.6.2.1 Odvisnost od faze rasti in posledice pomanjkanja hranil	22
2.6.2.1.1 Odziv na težavne razmere (angl. stringent response)	22
2.6.2.1.2 Katabolna represija	23
2.6.2.2 Anaerobioza	23
2.6.2.3 Temperatura	24
2.6.2.4 Izražanje kolicinov v odvisnosti od globalnega regulatorja IscR	24
2.6.3 Uravnavanje izražanja kolicinskega operona z drugimi mehanizmi	25
2.6.3.1 Uravnavanje sinteze proteina lize na nivoju translacije s proteinom CsrA	25
2.6.3.2 Avtoregulacija izražanja kolicinskega operona z njegovimi produkti	25

2.7	EVOLUCIJA KOLICINOV IN PLAZMIDOV pCol	26
2.7.1	Evolucija z rekombinacijo	27
2.7.2	Evolucija s selekcijo.....	27
2.7.3	Evolucija kolicina M.....	28
2.8	EKOLOGIJA KOLICINOV	29
2.8.1	Modeli znotrajvrstne populacijske dinamike	29
2.9	UPORABA KOLICINOV IN OBETI.....	31
2.9.1	Kolicini kot laboratorijska orodja	31
2.9.2	Kolicini v zdravstvu in živilstvu	32
2.9.2.1	Uporaba kolicina M	33
3	MATERIALI IN METODE	34
3.1	MATERIALI	34
3.1.1	Bakterijski sevi.....	34
3.1.1.1	Laboratorijski sevi bakterije <i>Escherichia coli</i>	34
3.1.1.2	Kolicinogeni sevi bakterije <i>Escherichia coli</i> Pugsleyeve zbirke.....	35
3.1.2	Plazmidi	36
3.1.3	Gojišča	38
3.1.3.1	Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani).....	38
3.1.3.2	Tekoče gojišče LB z dodanimi antibiotiki.....	38
3.1.3.3	Trdno gojišče LB	38
3.1.3.4	Trdno gojišče LB z antibiotiki.....	39
3.1.3.5	Mehki LB agar.....	39
3.1.4	Kemikalije	39
3.1.5	Začetni oligonukleotidi.....	41
3.1.6	Encimi in njihovi reakcijski pufri	42
3.1.7	Raztopine	42
3.1.7.1	Raztopine za agarozno gelsko elektroforezo	42
3.1.7.2	Raztopine za NaDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo	43
3.1.7.3	Raztopine za pripravo kompetentnih celic	43
3.1.7.4	Raztopine za β -galaktozidazni test	43
3.1.7.5	Pufer za izolacijo RNA.....	43
3.1.7.6	Pufer za SPR.....	44
3.1.7.7	Raztopine za izolacijo rekombinantnih proteinov z afinitetno kromatografijo Ni-NTA.....	44
3.1.7.8	Raztopine uporabljene za izolacijo proteinov vezanih na promotorsko regijo kolicina E8 na magnetnih kroglicah	44
3.1.8	Kompleti	45
3.1.9	Laboratorijska oprema in drobn material.....	46
3.2	METODE	48
3.2.1	Priprava transkripcijskih fuzij s poročevalskima genoma <i>gfp</i> in <i>rfp</i> v plazmidih pSC304 in pKCT10	48
3.2.1.1	Priprava fragmenta promotorja gena kolicina M, <i>pcma</i> , in vektorja pSC10148	
3.2.1.1.1	Pomnoževanje promotorja gena aktivnosti kolicina M, <i>pcma</i> , z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	48
3.2.1.1.2	Restrikcija fragmenta <i>pcma</i> in vektorja pSC101	48
3.2.1.2	Priprava fragmenta gena <i>rfp</i> in vektorja pKCT2	49
3.2.1.2.1	Pomnoževanje gena <i>rfp</i> s PCR	49

3.2.1.2.2	Ligacija s PCR pomnoženega fragmenta <i>rfp</i> v pJET1.2	50
3.2.1.2.3	Preverjanje vsebnosti in orientiranosti fragmenta <i>rfp</i> v vektorju pJET1.2 s PCR.....	50
3.2.1.2.4	Restrikcija pJET1.2 z <i>rfp</i> in vektorja pKCT2.....	51
3.2.1.3	Ligacija fragmenta <i>pcma</i> v pSC101 in <i>rfp</i> v pKCT2	52
3.2.2	Ligacija	52
3.2.3	Čiščenje PCR produktov in menjava pufru	52
3.2.4	Izolacija plazmidne DNA	53
3.2.5	Agarozna gelska elektroforeza	53
3.2.6	Čiščenje DNA iz agaroznega gela.....	53
3.2.7	Priprava kompetentnih celic	53
3.2.8	Transformacija kompetentnih celic	53
3.2.9	Mikroskopiranje z invertnim fluorescenčnim in konfokalnim mikroskopom	54
3.2.9.1	Vzorčenje za preučevanje izražanja fuzij <i>pcma-gfp</i> , <i>cka-rfp</i> in <i>lexA-gfp</i>	54
3.2.9.2	Priprava preparata.....	54
3.2.9.3	Svetlobna in fluorescenčna mikroskopija.....	54
3.2.9.4	Mikroskopiranje s konfokalnim mikroskopom	55
3.2.10	Izražanje in čiščenje rekombinantnega kolicina M.....	55
3.2.11	Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z NaDS (NaDS-PAGE).....	56
3.2.12	Določanje koncentracije proteinov	57
3.2.13	Določanje aktivnosti in stabilnosti kolicina M z metodo nakapljanje plošče.....	57
3.2.14	Določitev subinhibitorne koncentracije kolicina M za tretiranje <i>E. coli</i> v tekočem gojišču	58
3.2.15	Testiranje vpliva kolicina M na odziv SOS	58
3.2.15.1	Izražanje fuzije <i>umuD-gfp</i> (mikroskopiranje)	58
3.2.15.2	Izražanje fuzije <i>sulA-lacZ</i> (test aktivnosti β -galaktozidaze).....	58
3.2.16	Izolacija RNA	59
3.2.17	DNA mikromreže.....	59
3.2.17.1	Priprava tarče	60
3.2.17.2	Hibridizacija tarče na mikromreže	60
3.2.17.3	Analiza podatkov	60
3.2.18	Reverzna transkripcija za pripravo cDNA za PCR v realnem času.....	61
3.2.19	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)	62
3.2.20	Barvanje kapsule	65
3.2.21	Izolacija in kvantifikacija kolanske kisline	65
3.2.21.1	Izolacija zunajceličnih polisaharidov	65
3.2.21.2	Kvantifikacija kolanske kisline	66
3.2.22	Kvantifikacija biofilma	66
3.2.23	Resonanca površinskih plazmonov SPR	67
3.2.23.1	Priprava liganda.....	67
3.2.23.2	Meritve SPR	68
3.2.24	Priprava plazmidov pCol z odpornostjo proti ampicilinu.....	69
3.2.24.1	Preverjanje odpornosti kolicinogenih sevov proti nalidiksični kislini in priprava odpornih sevov	69

3.2.24.2	Preverjanje kolicinogenosti z metodo točkovnega nanašanja kolicinogenih sevov in prelivanja plošč	69
3.2.24.3	Konjugativni prenos pHly152-T8 in transpozicija Tn3.....	70
3.2.24.4	Transpozicija Tn3	70
3.2.25	Priprava grobih kolicinskih ekstraktov in test kvantifikacije sinteze kolicinov s conami lize po indukciji odziva SOS.....	71
3.2.26	Priprava transkripcijskih fuzij promotorjev genov z lacZ v pRW50.....	71
3.2.26.1	Priprava fragmentov promotorjev za kloniranje.....	72
3.2.26.1.1	Pomnoževanje promotorjev genov za kolicine s PCR.....	72
3.2.26.1.2	Restrikcija s PCR pomnoženih fragmentov promotorjev kolicinov.....	73
3.2.26.1.3	Restrikcija promotorjev <i>sulA1</i> , <i>cka1</i> in <i>cka2</i> iz pUC57	74
3.2.26.2	Priprava vektorja pRW50	74
3.2.26.3	Ligacija fragmentov promotorjev v pRW50	74
3.2.27	Rastni pogoji za spremljanje aktivnosti promotorjev v pRW50.....	75
3.2.27.1	Izražanje <i>cka</i> v prisotnosti in odsotnosti proteina IscR ob izobilju hranil	75
3.2.27.2	Izražanje <i>cka</i> , <i>cka1</i> , <i>cka2</i> in <i>sulA1</i> in genov nukleaznih kolicinov v prisotnosti in/ali odsotnosti proteina IscR	75
3.2.27.3	Izražanje <i>ce8a</i> v odsotnosti različnih transkripcijskih regulatorjev	75
3.2.27.3.1	Preverjanje ustreznosti sevov zbirke Keio z metodo PCR	76
3.2.28	Test aktivnosti β-galaktozidaze	77
3.2.29	Izolacija proteinov vezanih na promotorsko regijo kolicina E8 s testom »pull down«	78
3.2.29.1	Priprava z biotinom označene promotorske regije kolicina E8 z metodo PCR.....	78
3.2.29.2	Vezava biotinizirane regije promotorja kolicina E8 na magnetne kroglice ...	79
3.2.29.3	Priprava grobega celičnega ekstrakta, vezava celičnih proteinov na DNA na magnetnih kroglicah in elucija vezanih proteinov.....	79
3.2.29.4	Obarjanje iz DNA eluiranih proteinov s TCA.....	80
3.2.30	Analiza proteinov vezanih na promotorsko regijo kolicina E8 z masno spektrometrijo.....	80
4	REZULTATI.....	81
4.1	ODZIV <i>E. COLI</i> MG1655 NA TRETIRANJE S KOLICINOM M	81
4.1.1	Izolacija kolicina M	81
4.1.2	Aktivnosti kolicina M na trdnem gojišču in subinhibitorna koncentracija v tekočem gojišču	82
4.1.2.1	Aktivnost in stabilnost kolicina M	82
4.1.2.2	Določitev subinhibitorne koncentracije v tekočem gojišču.....	83
4.1.3	Vpliv kolicina M na odziv SOS.....	84
4.1.4	Analiza transkriptoma seva <i>E. coli</i> MG1655 ob izpostavljanju subinhibitorni koncentraciji kolicina M.....	86
4.1.4.1	Izolacija RNA	86
4.1.4.2	Diferenčno izražanje genov	88
4.1.5	Validacija rezultatov mikromrež s PCR v realnem času (qPCR).....	93
4.1.6	Kvantifikacije zunajceličnih polisaharidov.....	97
4.1.6.1	Kvantifikacija kapsule	97
4.1.6.2	Kvantifikacija kolanske kisline	98
4.1.6.3	Kvantifikacija nastanka biofilma.....	100

4.2	URAVNAVANJE TRANSKRIPCIJE GENA AKTIVNOSTI KOLICINA M	101
4.3	URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENA AKTIVNOSTI POROTVORNEGA KOLICINA K	103
4.3.1	Transkripcija gena <i>cka</i> kolicina K v odsotnosti indukcije SOS	103
4.3.2	IscR uravnava izražanje kolicina K.....	104
4.3.3	IscR in LexA delujeta soodvisno	105
4.3.4	IscR stabilizira LexA in povzroči zamik v transkripciji gena aktivnosti kolicina K po poškodbi DNA	106
4.3.5	Urnvananje aktivacije promotorja kolicina K z IscR je odvisno od hranil.....	109
4.3.5.1	Ali IscR stabilizira LexA na <i>pcka</i> v odvisnosti od kofaktorjev?.....	110
4.4	URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV NUKLEAZNIH KOLICINOV	112
4.4.1	Kvantifikacija sinteze kolicinov ob indukciji odziva SOS v odsotnosti IscR	112
4.4.1.1	Pregled promotorskih zaporedij preučevanih nukleaznih kolicinov za IscR vezavno zaporedje	117
4.4.2	Izražanje genov nukleaznih kolicinov na nivoju transkripcije	118
4.4.3	Iskanje transkripcijskih regulatorjev kolicina E8.....	120
4.4.3.1	Priprava z biotinom označenega promotorskega zaporedja kolicina E8	120
4.4.3.2	Profil proteinov vezanih na promotorsko zaporedje kolicina E8	121
4.4.3.3	Aktivnost promotorja gena kolicina E8 v odsotnosti regulatorjev transkripcije	124
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	129
5.1	RAZPRAVA.....	129
5.1.1	Odziv bakterije <i>E. coli</i> na kolicin M – vloga kolicinov v okolju.....	130
5.1.1.1	Spremembe v izražanju genov <i>E. coli</i> ob tretiranju s kolicinom M	130
5.1.1.2	Kolicin M ni iduciral sistema SOS	131
5.1.1.3	Kolicin M vpliva na poti prenosa signala.....	131
5.1.1.4	Kolicin M inducira izražanje genov za sintezo zunajceličnih polisaharidov	133
5.1.1.5	Kolicin M inducira dodatne osmotske in druge odzive na stres.....	133
5.1.1.6	Kolicin M je zmanjšal izražanje flagelarnih biosinteznih genov	135
5.1.1.7	Kolicin M inducira gene povezane z biofilmom	135
5.1.1.8	Kolicin M ni induciral povečane sinteze zunajceličnih polisaharidov	136
5.1.1.9	Odzivi na stres igrajo pomembno vlogo v znotrajvrstni dinamiki kolicinov v naravnem okolju	137
5.1.1.10	Kolicin M kot antibiotik	138
5.1.2	Urnvananje izražanja kolicinov	138
5.1.2.1	Urnvananje izražanja gena aktivnosti kolicina M, <i>cma</i>	139
5.1.3	Urnvananje izražanja porotvornih kolicinov – kolicina K.....	140
5.1.3.1	Heterogenost izražanja kolicina K v odsotnosti odziva SOS	140
5.1.3.2	Indukcija <i>cka</i> med odzivom SOS	141
5.1.3.3	IscR in LexA učinkovito reprimirata izražanje gena <i>cka</i>	141
5.1.3.4	IscR stabilizira LexA pri utišanju <i>pcka</i>	142
5.1.3.5	Aktivnost IscR odraža stanje hranil v celici	143

5.1.4	Uravnavanje izražanja nukleaznih kolicinov je neodvisno od IscR	144
5.1.4.1	Protein AsnC morda uravnava sintezo kolicina E8	145
5.2	SKLEPI	146
6	POVZETEK (SUMMARY)	148
6.1	POVZETEK	148
6.2	SUMMARY	151
7	VIRI	154
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najbolje preučeni kolicini in proteini celične ovojnice, ki jih kolicini uporabljajo za vstop v celico (Šmarda in Šmajš, 1998: 566; Kleanthous, 2010: 844).....	8
Preglednica 2: Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	34
Preglednica 3: Kolicinogeni sevi Pugsleyeve zbirke.	35
Preglednica 4: Plazmidi.	36
Preglednica 5: Delovne koncentracije antibiotikov v gojišču LB.	38
Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev promotorske regije kolicina M za pripravo <i>pcma-gfp</i>	48
Preglednica 7: Restriksijska mešanica za pripravo vektorja izpeljanke pSC101.	49
Preglednica 8: Restriksijska mešanica za pripravo promotorske regije kolicina M, <i>pcma</i>	49
Preglednica 9: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev gena <i>rfp</i> za pripravo fuzije <i>cka-rfp</i>	50
Preglednica 10: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za potrditev vsebnosti in pravilne orientacije <i>rfp</i>	51
Preglednica 11: Restriksijska mešanica za pripravo fragmenta <i>rfp</i>	51
Preglednica 12: Restriksijska mešanica za pripravo vektorja pKCT2.	52
Preglednica 13: Defosforilacijska mešanica za pripravo defosforiliranega vektorja pKCT2.	52
Preglednica 14: Uporabljeni začetni oligonukleotidi ter pogoji PCR za pomnoževanje gena za sintezo kolicina M in njegove imunosti (Rijavec, 2010: 51).	55
Preglednica 15: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za pomnoževanje cDNA izbranih genov s qPCR.	62
Preglednica 16: Začetni oligonukleotidi za pripravo liganda (DNA) (Butala in sod., 2012).	68
Preglednica 17: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev regij promotorjev kolicinov za pripravo fuzij z <i>lacZ</i> v pRW50. ...	73
Preglednica 18: Restriksijska mešanica za pripravo fragmentov promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D.	73
Preglednica 19: Restriksijska mešanica za pripravo fragmentov promotorskih regij <i>sulA1</i> , <i>cka1</i> in <i>cka2</i>	74
Preglednica 20: Restriksijska mešanica za pripravo vektorja pRW50.	74
Preglednica 21: Začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za potrditev ustreznosti sevov zbirke Keio.	76
Preglednica 22: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev biotinilirane regije promotorja kolicina E8.	78
Preglednica 23: Cone lize pri tretiranju sevov <i>E. coli</i> DH5 α in MG1655 s kolicinom M na ploščah LB.	83
Preglednica 24: Izbrani geni z diferenčnim izražanjem po tretiranju s kolicinom M po 30 in 60 min (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013: 3).	90
Preglednica 25: Sprememba v izražanju genov z log ₂ razmerji in standardnimi odkloni vrednosti izražanja genov kot povprečje treh ali štirih bioloških ponovitev poskusov. .	95
Preglednica 26: Količina in razmerje produkcije CA med tretiranimi in netretiranimi kulturami.	99

Preglednica 27: Regije promotorskih zaporedij kolicinov K, E2, E5, E6, E7, E8, D.	117
Preglednica 28: Izbrani potencialni transkripcijski regulatorji kolicina E8, določeni z masno spektrometrijo.	123
Preglednica 29: Aktivnost β -galaktozidaze v preliminarnem iskanju potencialnih transkripcijskih regulatorjev kolicina E8.....	125

KAZALO SLIK

Slika 1: Organizacija zapisa za kolicine na plazmidih pCol: strukturni gen za kolicin (<i>cx</i> a), gen za protein imunosti (<i>cx</i> i) in lize (<i>cx</i> l). (Cascales in sod., 2007: 163).	6
Slika 2: Strukturna organizacija molekule kolicina (Šmarda in Šmajš, 1998: 570).	7
Slika 3: Modela vstopa kolicina preko zunanje membrane in periplazme s translokacijskima sistemoma Tol in Ton (Cascales in sod., 2007: 194).	10
Slika 4: Shematski povzetek vezave, translokacije in delovanja kolicinov (Cascales in sod., 2007: 171).	11
Slika 5: Pregled sinteze, sproščanja in delovanja nukleaznih kolicinov (Kleanthous in Walker, 2001: 625).	13
Slika 6: Mesto cepitve tRNA s kolicinom E5 in kolicinom D (Masaki in Ogawa, 2002: 434).	14
Slika 7: Sinteza peptidoglikanskih lipidnih intermediatov in mehanizem delovanja ColM (Barreateau in sod., 2010: 12379).	16
Slika 8: Potek dogajanj med odzivom SOS (Michel, 2005: e255).	20
Slika 9: Hipoteza o evoluciji s selekcijo vključuje dva koraka v nastanku nove imunosti (Riley in Wertz, 2002a: 360).	28
Slika 10: Shema plazmida pRW50 z vstavljenim fragmentom regije promotorjev preučevanih kolicinov.	72
Slika 11: Slika gela NaDS-PAGE prikazuje čistost in velikost izoliranega kolicina M.	82
Slika 12: Rastna krivulja seva MG1655 tretiranega z različnimi koncentracijami kolicina M (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013).	84
Slika 13: Rast bakterije <i>E. coli</i> ENZ1257 s transkripcijsko fuzijo <i>sulA-lacZ</i> na kromosomu ob tretiranju s kolicinom M v koncentracijah 0, 10, 20 in 30 ng/ml.	85
Slika 14: Aktivnost β -galaktozidaze v sevu <i>E. coli</i> ENZ1257 s transkripcijsko fuzijo <i>sulA-lacZ</i> na kromosomu ob tretiranju s kolicinom M v koncentracijah 0, 10, 20 in 30 ng/ml.	86
Slika 15: Primer vzorcev izoliranih totRNA ločenih z agarozno gelsko elektroforezo na 1-odstotnem gelu.	87
Slika 16: Primer elektroferograma in pripadajoče slike gela vzorca totRNA iz analize s kapilarno elektroforezo (Agilent BioAnalyzer).	87
Slika 17: Graf večstopenjskega lestvičenja (MDS) za 500 najbolj diferencno izraženih (DE) genov.	88
Slika 18: GeNorm graf s povprečno stabilnostjo izražanja M.	94
Slika 19: Graf spreminjanja vrednosti C_t izbranih genov med vzorci treh ponovitev ...	94
Slika 20: Validacija rezultatov DNA mikromrež s qPCR (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013: 8).	97
Slika 21: Umeritvena krivulja z L-fukozo kot standardom za izračun koncentracije kolanske kisline.	99
Slika 22: Razmerje v količini CA med tretirano in netretirano kulturo po času 60, 90 in 120 min.	100
Slika 23: Izražanje gena aktivnosti kolicina M, <i>cm</i> a, na ravni posameznih celic v RW118.	102
Slika 24: Fluorescenčni sliki prikazujeta sočasno izražanje transkripcijskih fuzij <i>cka-rfp</i> in <i>lexA-gfp</i> v RW118 (Kamenšek in sod., 2010: 7).	104

Slika 25: Izražanje gena <i>cka</i> kolicina K je odvisno od IscR.....	105
Slika 26: IscR utiša <i>sulA1</i> različico promotorja <i>sulA</i> (Butala in sod., 2012: 133).....	106
Slika 27: IscR in LexA soodvisno utišata <i>pcka</i> po poškodbi DNA (Butala in sod., 2012: 135).....	108
Slika 28: IscR uravnava izražanje kolicina K v odvisnosti od hranil (Butala in sod., 2012: 134).....	110
Slika 29: Vezava IscR na fragment promotorja <i>cka</i> z metodo SPR v odvisnosti od dGTP.....	111
Slika 30: Rastne krivulje sevov Keio wt in $\Delta iscR$ (<i>iscR</i> -) s plazmidi z zapisi za kolicin K, E2, E5, E6, E7, E8, D po indukciji SOS z Nal (37 μ M).....	113
Slika 31: Produkcija kolicinov, prikazana s conami lize indikatorskega seva DH5 α s pBR322, po dodatku grobih kolicinskih ekstraktov kolicinogenih kultur sevov Keio wt in $\Delta iscR$ (<i>iscR</i> -).	114
Slika 32: Produkcija kolicinov kvantificirana z metodo nakapljanih plošč.....	116
Slika 33: Aktivnost β -galaktozidaze z Nal tretiranega seva Keio wt s plazmidi pRW50 s fuzijami promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D z genom <i>lacZ</i> in OD ₆₀₀ v odvisnosti od časa.	119
Slika 34: Aktivnost β -galaktozidaze netretiranega seva Keio wt s plazmidi pRW50 s fuzijami promotorjev kolicinov E2, E5, E7, E8, D z genom <i>lacZ</i> in OD ₆₀₀ v odvisnosti od časa.	119
Slika 35: PCR pomnožek promotorske regije kolicina E8.	120
Slika 36: 12-odstotni NaDS PAGE gel z ločenimi izoliranimi proteini, ki so bili vezani na zaporedje promotorja kolicina E8.....	122
Slika 37: Potrditveni PCR za izbrane Keio seve.....	124
Slika 38: Transkripcijska aktivnost kolicina E8 in K v sevih z delecijami transkripcijskih regulatorjev ob tretiranju z Nal.....	128

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Sekvence kloniranih zaporedij pomnoženih s PCR in sekvenciranih (Macrogen). Podčrtana so restrikcijska mesta.
- Priloga B:** Nukleotidna zaporedja promotorske regije *sulA* in različice *sulA1*, IscR mesto pri promotorju *cka*, ter promotorske regije *cka* in različic *cka1* in *cka2* klonirane v pRW50.
- Priloga C:** Preglednica z diferenčno izraženimi geni po 30- in 60-minutnem izpostavljanju subinhibitornim koncentracijam kolicina M.
- Priloga D:** Preglednica s proteinskimi kandidati določenimi z masno spektrometrijo.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AK	aminokislina
ANOVA	analiza variance (angl. analysis of variance)
Ap	ampicilin
Ap ^f	proti ampicilinu odporen
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
BCA reagent	bicinhonin-kislinski reagent
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
btn	biotin
CA	kolanska kislina (angl. colanic acid)
cDNA	komplementarna veriga DNA
Cm	kloramfenikol
ColD	kolicin D
ColE2	kolicin E2
ColE5	kolicin E5
ColE6	kolicin E6
ColE7	kolicin E7
ColE8	kolicin E8
ColK	kolicin K
ColM	kolicin M
C _t	pražni cikel pri metodi qPCR (angl. treshold cycle)
<i>cxa</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin X
<i>cxi</i> in <i>imm</i>	gen, ki kodira protein imunosti proti kolicinu X
<i>cxl</i> in <i>kill</i>	gen, ki kodira gen za lizo (spročanje kolicina X)
Da	Dalton– enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ¹² C
Δ	grška črka delta, ki pomeni delecijo gena
ΔRn	sprememba signala fluorescence pri qPCR med začetnimi in končnimi cikli
DE	diferenčno izražanje (angl. differential expression)
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DNaza	deoksiribonukleaza, encim, ki cepi molekule DNA
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (angl. deoxyribonucleotide triphosphate)
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
dUTP	deoksiuridin trifosfat
DTT	ditiotreitol (treo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)
e	ekstinkcijski koeficient
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
EPS	zunajcelični polisaharidi (angl. extracellular polysaccharides)

EtBr	etidijev bromid
FD	hitro rezanje (angl. fast digest)
g	gravitacijski težni pospešek pri centrifugiranju ali gram (utežna enota)
gDNA	genomska DNA
GFP	zeleni fluorescenčni protein (angl. green flurescent protein)
h	ura
His	histidin
His-tag	histidinski rep
H-N-H	histidin-asparagin-histidin
Imm	protein imunosti
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
kan	kanamicinska kasetna oz. zaporedje z zapisom odpornosti proti kanamicinu
kbp	tisoč baznih parov
kDa	tisoč Daltonov
Km	kanamicin
Km ^r	proti kanamicinu odporen
l	liter
<i>lacZ</i>	gen z zapisom za encim β -galaktozidaza
LB	gojišče Luria-Bertani
log ₂ FC	logaritem razmerja izražanja genov med vzorcema z osnovo 2 (angl. log ₂ fold change)
Lys	protein lize
mA	miliamper
M	molarnost, mol/l
MDS	večstopenjsko lestvičenje (angl. multidimensional scailing)
Met	metionin
μ g	mikrogram
mg	miligram
μ l	mikroliter
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimal inhibitory concentration)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger ribonucleic acid)
MWCO	mejna molekulska masa (angl. molecular weight cut-off)
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecilsulfatom (angl. sodium-dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis)
Nal	nalidiksična kislina
Nal ^r	proti nalidiksični kislini odporen
Ni-NTA	nikelj-nitrilotriocetna kislina
ng	nanogram
nt	nukleotid
nukleotid	A nukleotid adenina C nukleotid citozina G nukleotid gvanina T nukleotid timina U nukleotid uracila
obr./min	obrati na minuto

OD ₆₀₀	optična gostota, merjena pri 600 nm (angl. »optical density«)
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranozid
ORF	odprt bralni okvir (angl. open reading frame)
<i>pcxa</i>	regija promotorja kolicina x
pCol	plazmid, ki kodira kolicinski operon
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
p-vrednost	meja statistične značilnosti
PP	pirofosfat
ppGpp	gvanozin 3`-difosfat 5`-difosfat
pufer B&W	pufer za vezavo in spiranje (angl. bind and wash)
qPCR	PCR v realnem času (angl. quantitative PCR ali real-time PCR)
R	premer
RFP	rdeči fluorescenčni protein (angl. red fluorescence protein)
RIN	število, ki je merilo razgrajenosti RNA (angl. RNA integrity number)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RNaza	encim, ki cepi molekule RNA
rRNA	ribosomska RNA
RU	odzivna enota (angl. response unit)
SAP	Alkalna fosfataza rakov (angl. shrimp alkaline phosphatase)
sek	sekunda
Ser	serin
Sm	streptomycin
Sm ^r	proti streptomycinu odporen
SPR	rezonanca površinskih plazmonov (angl. surface plasmon resonance)
ssDNA	enoverižna deoksiribonukleinska kislina (angl. single stranded deoxyribonucleic acid)
t	čas
T	temperatura
T _m	temperatura tališča
TBE	tris-boratni elektroforezni pufer
Tc	tetraciklin
Tc ^r	odpornost proti antibiotiku tetraciklin
TE	tris-EDTA
Tn3	transpozon Tn3
tRNA	prenašalna RNA
totRNA	celotna celična RNA
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina (angl. transfer ribonucleic acid)
TSE	pufer Tris-NaCl-EDTA (angleško 'Tris-saline-EDTA')
Tyr	tirozin
U	enota (angl. unit)
UDP	uridin difosfat
UV	ultravijolična svetloba
V	enota napetosti volt
v/v	razmerje volumnov
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
wt	divji tip (angl. wild type)
w/v	razmerje masa in volumna

1 UVOD

Bakterije proizvajajo različne snovi s protimikrobnimi lastnostmi, s katerimi se odzivajo na izzive okolja. Te vključujejo širokospektralne klasične antibiotike, metabolne produkte kot so dušik in vodikov peroksid, litične dejavnike kot je lizocim, številne proteinske toksine, med katerimi so tudi bakteriocini (Campbell, 1981; Riley in Wertz, 2002b). Bakteriocine producirajo vse do sedaj preučevane bakterijske vrste in so zelo pogosta in raznolika skupina proteinov z različnimi mehanizmi delovanja (Klaenhammer, 1988; Riley in Wertz, 2002a). V nasprotju s klasičnimi antibiotiki imajo bakteriocini relativno ozek spekter delovanja in so toksični samo za dovezetne bakterijske seve iste ali sorodne vrste (Riley in Gordon, 1999; Riley in Wertz, 2002b). Prvi bakteriocin je bil opisan pri bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*) leta 1925 in je bil poimenovan kolicin (Cascales in sod., 2007, cit. po Gratia, 1925). Kolicini so sintetizirani v času stresa in se iz proizvodnjske celice sprostijo z lizo celice, zaradi česar mora biti njihova sinteza natančno uravnana (Cascales in sod., 2007). Izsledki laboratorijskih raziskav kažejo, da igrajo kolicini pomembno vlogo v dinamiki bakterijskih populacij pri znotraj in medvrstnih interakcijah zaradi kompeticije med bakterijami, ki naseljujejo isto ekološko nišo (Czárán in sod., 2002; Kirkup in Riley, 2004; Majeed in sod., 2011). Vendar ostaja še vrsta nejasnosti glede njihovih vlog v naravnem okolju.

Najpogostejši med kolicini naravnih populacij bakterije *Escherichia coli* je kolicin M in je edini kolicin, ki povzroči lizo občutljive bakterijske celice s prekinitvijo sinteze peptidoglikana. Kolicin M cepi prekursor peptidoglikana, lipid II, ki je skupen vsem bakterijskim vrstam (Barreteau in sod., 2010). Ker je celična stena nujna za preživetje bakterij, je pomembna tarča za antibiotike in kolicin M je s svojim protimikrobnim delovanjem pritegnil pozornost kot osnova za razvoj novega protimikrobnega sredstva. Trenutno predstavljajo rezistence patogenih bakterij proti klinično pomembnim antibiotikom največji globalni zdravstveni problem, še posebej so pogoste znotraj enterobakterij (Lautenbach in sod., 2001; Paterson, 2006; Kumarasamy in sod., 2010). Za učinkovito zdravljenje okužb je zato nujen razvoj novih antibiotikov. Bakteriocini omogočajo alternativno rešitev, saj imajo ozek spekter delovanja (Riley in Wertz, 2002b; Gillor in sod., 2004; Schamberger in sod., 2004; Gillor in sod., 2008a; Gordon, 2009). Veliko raziskav se v zadnjih letih posveča kolicinu M. Kljub temu nobena raziskava do sedaj ni preučevala vpliva kolicina M na transkriptom občutljivih bakterij. Učinki protimikrobnih snovi so odvisni od njihove koncentracije. Bakterije se lahko na nizke koncentracije odzovejo s prilagajanjem in znano je, da nekateri antibiotiki v subletalnih koncentracijah sprožijo odzive, ki pripomorejo k porajanju in širjenju rezistenc (Beaber in sod., 2004; Davies in sod., 2006). Pri razvoju novih antibiotikov je pomembno predvideti neugodne posledice njihove uporabe. Zato smo se namenili preučiti vpliv kolicina M na izražanje genov celotnega genoma občutljive bakterije

Escherichia coli z mikromrežami in z uporabo fizioloških testov. Izsledki raziskave bi bili pomembni za uporabo kolicina M kot protimikrobnega sredstva in na podlagi odzivov občutljivih bakterijskih populacij tudi za razjasnitev njegove ekološke vloge.

Za razumevanje ekologije kolicinov je pomembno tudi s tem povezano razumevanje uravnavanja njihove sinteze. Izražanje kolicinskih genov je primarno pod kontrolo odziva SOS in zato so le-ti inducirani v času stresa. Izražanje pa ni utišano le s proteinom LexA, represorjem odziva SOS, ampak bi lahko bilo uravnano z različnimi drugimi globalnimi regulatornimi dejavniki in okoljskimi signali (Cascales in sod., 2007). Znano je tudi, da prihaja v majhnem delu kolicinogene populacije do indukcije brez SOS inducirajočega signala (Mulec in sod., 2003; Mrak in sod., 2007; Kamenšek in sod., 2010). Po indukciji odziva SOS je izražanje kolicinskih genov zakasnjeno in vklopljeno po močni in dlje trajajoči poškodbi DNA. Ker se kolicini sproščajo ob lizi bakterijskih celic, bi zamik celicam omogočil, da popravijo DNA, pred indukcijo letalnega kolicina (Herschman in Helinski, 1967; Salles in sod., 1987). Kar nekaj raziskav se je posvetilo uravnavanju izražanja kolicinov. Znanih je že več regulatornih proteinov in signalov, ki vplivajo na natančno časovno uravnava (Butala in sod., 2012), vendar to področje kolicinov še zdaleč ni dovolj raziskano, da bi razumeli vso kompleksnost.

Da bi razjasnili uravnavanje izražanja kolicinskih genov na ravni posameznih celic bakterijske kulture v odsotnosti induktorjev odziva SOS, smo se osredotočili na preučevanje izražanja gena aktivnosti kolicina M, *cma*, ter gena aktivnosti kolicina K, *cka*, s pomočjo poročevalskih genov *gfp* in *rfp* za zeleni in rdeči fluorescirajoči protein.

Želeli smo tudi ugotoviti, kateri so še neznan regulatorni proteini in okoljski dejavniki, ki pogojujejo, da je izražanje kolicinov pri odzivu SOS zakasnjeno v primerjavi z ostalimi geni odziva SOS. Ker so predhodne raziskave pokazale, da je regulator transkripcije IscR vpleten pri uravnavanju izražanja gena *cka*, smo želeli podrobneje preučiti njegovo vlogo pri tem. Zanimalo nas je tudi, kateri drugi proteini poleg LexA uravnavajo izražanje nukleaznih kolicinov.

Namen doktorskega dela je bil razjasniti vlogo kolicinov v naravnem okolju, kompleksnost uravnavanja njihove sinteze in morebitne neželene učinke kolicina M uporabljenega v protimikrobni terapiji.

1.1 HIPOTEZE:

- Delovanje kolicina M, ki prekine sintezo peptidoglikana, pri višjih koncentracijah povzroči lizo bakterijskih celic, medtem ko se pri manjših koncentracijah bakterije lahko prilagodijo in preživijo. Kolicin M v subinhibitorni koncentraciji povzroči, da se občutljive bakterijske celice odzovejo in prilagodijo na stres s spremenjenim izražanjem genov, pri čemer inducirajo tudi odziv SOS.
- Geni kolicinov, kakor tudi geni odziva SOS, se brez dejavnika, ki poškoduje DNA, izražajo heterogeno v populaciji genetsko identičnih bakterijskih celic zaradi naključne indukcije. Gen aktivnosti kolicina K, *cka*, se izraža le v tistih bakterijskih celicah, ki hkrati izražajo tudi gen *lexA*, ki kodira represor sistema SOS, LexA.
- Izražanje genov za kolicine uravnava poleg proteina LexA še drugi globalni regulatorji in okoljski signali. Protein IscR je odgovoren za zakasnjeno izražanje gena *cka* za porotvorni kolicin K po indukciji odziva SOS. Pri uravnavanju izražanja operonov nukleaznih kolicinov sodelujejo drugi regulatorni proteini.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIOCINI BAKTERIJE *Escherichia coli*

Bakteriocini so raznolika skupina proteinov s protimikrobnim delovanjem in jih producirajo vse do sedaj preučevane bakterijske vrste (Klaenhammer, 1988; Riley in Wertz, 2002a). Gre za zelo učinkovite toksine, ki jih bakterije v glavnem proizvajajo v stresnih pogojih in z njimi uničijo občutljive bakterije iste ali zelo sorodne vrste (Riley in Gordon, 1999; Riley in Wertz, 2002b; Gillor in sod., 2008a). Bakteriocini naj bi igrali pomembno vlogo v ohranjanju mikrobne raznolikosti. Najbolje preučeni bakteriocini so kolicini, ki jih proizvajajo bakterije kolicinogenih sevov vrste *Escherichia coli* in nekaterih sorodnih vrst družine *Enterobacteriaceae* (Riley in Gordon, 1996).

Escherichia coli proizvaja dva tipa bakteriocinov, in sicer kolicine in mikrocine. Kolicini so zelo raznolika skupina, opisanih je več kot 34 različnih kolicinov, velikosti od 25 do 80 kDa. V odzivu na stres del kolicinogene populacije proizvaja in izloča kolicin, katerega sinteza je pod kontrolo odziva SOS. Zapis za kolicine se nahaja na plazmidih in ga vedno sestavljata dva gena: gen za toksin in konstitutivno izraženi gen za protein imunosti, ki ščiti proizvajalsko celico pred lastnim kolicinom (Šmarda in Šmajš, 1998). Številni plazmidi imajo še gen za protein lize, ki omogoča sproščanje kolicina iz celice ob indukciji sinteze kolicina. Še vedno pa se ne ve, kako so sproščeni kolicini, katerih operoni nimajo zapisa za protein lize. Ko so kolicini sproščeni, se vežejo na specifični površinski receptor tarčne celice, nakar sledi transport v celico. Kolicini koristijo receptorje vpletene v prevzem hranil, kot je BtuB, receptor vitamina B₁₂. Ko kolicini vstopijo v celice, le-te propadejo zaradi tvorbe por v citoplazemski membrani, nukleazne aktivnosti ali inhibicije sinteze peptidoglikana (Cascales in sod., 2007).

Druga skupina bakteriocinov, ki jih proizvaja *Escherichia coli*, so mikrocini (Braun in sod., 2002). Mikrocini so proteini manjši od 10 kDa. Zapis za mikrocine je lahko na kromosomu ali plazmidu in ga sestavljata le dva gena: gen z zapisom za baktericidni protein in gen imunosti. Produkcija mikrocinov je inducirana pod specifičnimi pogoji, kot npr. pri pomanjkanju hranil in železa, in ni pod kontrolo odziva SOS. Mikrocini niso sproščeni s celično lizo, pač pa so aktivno izločeni iz celice. Izločanje je lahko kompleksno in pogosto vključuje za mikrocin specifične proteine, kot tudi osnovne gospodinjne proteine. Večina mikrocinov naj bi za vezavo na tarčne celice uporabljala površinske receptorje vpletene v prevzemu železa. Način delovanja mikrocinov je slabo raziskan, vendar je znano, da nekateri lahko porušijo membranski potencial tarčne celice (Gillor in sod., 2004; Gordon in O'Brien, 2006).

2.2 GENETIKA KOLICINOV

2.2.1 Plazmidi s kolicinskimi geni

Zapis za sintezo kolicinov se nahaja na plazmidih pCol, ki jih glede na lastnosti delimo v 2 skupini (Hardy in sod., 1973).

Skupina I so majhni plazmidi v velikem številu kopij (približno 20 kopij), dolžine od 6 do 10 kb. Imajo faktor mobilizacije, ki omogoči mobilizacijo v prisotnosti konjugativnih plazmidov. Vsebujejo en kolicinski operon, v glavnem za kolicine skupine A, ki vstopajo v celico preko translokacijskega sistema Tol (Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007).

Skupina II so veliki plazmidi v eni kopiji, dolgi okoli 40 kb. So konjugativni in omogočijo horizontalne prenose genetskega materiala med donorsko in recipientsko celico. Običajno imajo zapis za kolicine skupine B, ki vstopajo v celico preko translokacijskega sistema Ton. Lahko imajo tudi dva kolicinska operona, enega ob drugem, in te celice proizvajajo 2 različna kolicina, npr. kolicin B in D, B in M, in Ia in V (Cascales in sod., 2007).

2.2.2 Razporeditev kolicinskih genov

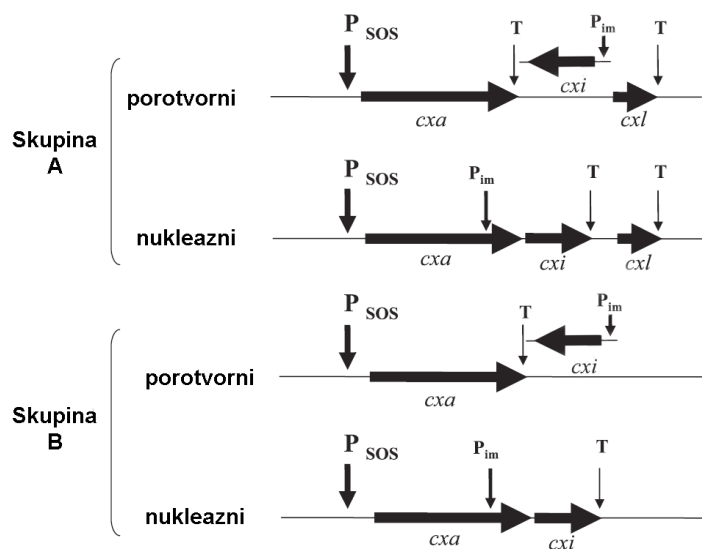
Genetski zapis za sintezo in sproščanje kolicina je na plazmidu pCol in je odvisen od mehanizma delovanja zapisanega kolicina (Slika 1). Operoni kolicinov imajo enega do tri gene. Operoni vseh kolicinov imajo promotor s SOS nukleotidnimi zaporedji, na katera se veže represor LexA in tako utiša promotor. Sledi strukturni gen kolicina ali gen za aktivnost, imenovan *cx*, kjer x pomeni specifični kolicin X. Najverjetneje je v primeru porotvornih kolicinov skupine B to tudi edini gen operona (Riley, 1993a; Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007).

Strukturnemu genu za kolicin sledi gen za protein imunosti (*imm* ali *cxi*), ki se veže s kolicinom in zaščiti proizvajalsko celico in kolicinogeni sev proti lastnemu kolicinu (Šmarda in Šmajš, 1998). Pri nukleaznih kolicinih je gen za protein imunosti *cxi* del kolicinskega operona in se nahaja navzdol od strukturnega gena za kolicin *cx*. Gen za protein imunosti nukleaznih kolicinov je pod kontrolo dveh promotorjev: promotorja SOS kolicinskega operona in lastnega šibkega promotorja. Le-ta se nahaja znotraj strukturnega gena za nukleazni kolicin. Dva promotorja vzdržujeta konstantno produkcijo proteina imunosti in s tem veliko večjo raven proteina imunosti kot kolicina, kar zagotavlja, da ni nikoli prostega kolicina, ki bi uničil proizvajalsko celico. Protein imunosti se po sintezi takoj poveže z nukleaznim kolicinom in tako prepreči njegovo aktivnost (Masaki in Ohta, 1985; Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007).

Operon porotvornih kolicinov nima gena za protein imunosti *cxi*, se pa ta nahaja na nasprotni verigi DNA, v regiji med genom za kolicin in genom za protein lize. Gen imunosti se prepisuje konstitutivno pod kontrolo lastnega šibkega promotorja, ki ni odvisen od sistema SOS. Smer prepisovanja je nasprotna prepisovanju gena za kolicin (Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007).

Zadnji gen kolicinskega operona je gen za protein lize (*kill* ali *cxl*), ki je vpleten v sproščanje kolicina iz proizvajalske celice z lizo in je posledično odgovoren za smrt celice po indukciji sinteze kolicina (van der Wal in sod., 1995; Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007).

Pri transkripciji kolicinskih operonov skupine A nastaneta dva prepisa mRNA zaradi prisotnosti dveh terminatorjev (Slika 1). Krajša in pogostejša mRNA pri operonih porotvornih kolicinov pripada kolicinskemu genu, pri nukleaznih kolicinih pa kolicinskemu in imunskemu genu. Daljša in manj pogosta mRNA pripada transkriptu celotnega operona, ki vključuje še gen za protein lize. Posledično je protein lize sintetiziran v manjši količini kot kolicin in protein imunosti (Llobès in sod., 1986; Llobès in sod., 1988a). Gen *cxl* je le na operonih kolicinov skupine A in nekaterih iz skupine B, kot so kolicin 5, 10 in D. Zato sinteza tistih kolicinov, ki nimajo gena *cxl*, za proizvajalske celice ni letalna (Cascales in sod., 2007).



Slika 1: Organizacija zapisa za kolicine na plazmidih pCol: strukturni gen za kolicin (*cxa*), gen za protein imunosti (*cxi*) in lize (*cxl*). Vodoravne puščice predstavljajo gene, označeni so še promotor SOS (P_{sos}), promotor gena imunosti (P_{im}) in terminator transkripcije (T) (Cascales in sod., 2007: 163).

Figure 1: Organization of colicin gene cluster on pCol plasmids: colicin activity gene (*cxa*), immunity (*cxi*) and lysis protein genes (*cxl*). Horizontal arrows denote genes, indicated are also SOS promoter (P_{sos}), immunity gene promoter (P_{im}) and transcriptional terminator (T) (Cascales in sod., 2007: 163).

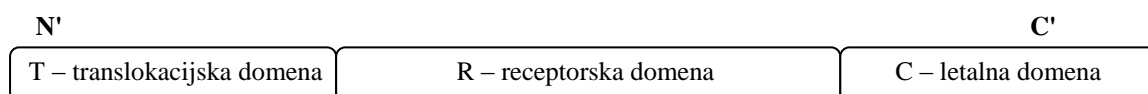
2.3 SPROŠČANJE KOLICINOV

Kolicini nimajo N-terminalnih signalnih sekvenc in nobenih domen za iznos, zato iz proizvodne celice niso sproščeni s transportnim sistemom tako kot ostali proteini (Braun in sod., 1994). Pri večini kolicinov njihovo sproščanje iz celice omogoča protein lize (van der Wal in sod., 1995). Protein lize je majhen lipoprotein pripet v periplazemskem prostoru na citoplazemsko ali zunanjo membrano (Braun, 1975; Howard in sod., 1991; van der Wal in sod., 1995). Za fiziološke spremembe, ki nastanejo zaradi proteinov lize pozno po njihovi sintezi, je potrebna zadostna koncentracija proteina lize (Pugsley in Schwartz, 1983). Mehanizem delovanja proteinov lize pri sproščanju kolicinov še ni razjasnjen. Je pa znano, da so posledica delovanja proteina lize spremembe v strukturi celične ovojnice in aktivacija OmpLA, fosfolipaze A na zunanji membrani. Ta povzroči nastanek fosfolipidov, ki so detergenti in permeabilizirajo zunanjo in notranjo celično membrano, kar vodi v smrt proizvodne bakterije (Pugsley in Schwartz, 1984; Dekker in sod., 1999; Cascales in sod., 2007).

Sproščanje kolicina iz proizvodne celice s proteinom lize drži za kolicine, zapisane na majhnih plazmidih skupine I (kolicini skupine A in kolicina 5, 10, D skupine B). Veliko manj je znanega o sproščanju kolicinov skupine B, ki so zapisani na velikih plazmidih skupine II (Ia, Ib, B, M) in nimajo zapisa za protein lize. Sinteza teh kolicinov zato ni letalna za proizvodno celico (Riley, 1993a; van der Wal in sod., 1995), zaradi česar je tudi sproščanje manj učinkovito (Šmarda in Šmajš, 1998).

2.4 STRUKTURNA ORGANIZACIJA KOLICINA

Čeprav se kolicini razlikujejo v velikosti (25–80 kDa), pa je strukturna organizacija vseh kolicinskih molekul enaka. Sestavljajo jih tri funkcionalne domene (Slika 2): (1) receptorska domena R je osrednji del, ki služi za prepoznavanje in vezavo na specifični receptor na zunanji bakterijski membrani; (2) translokacijska domena T je N-terminalni del molekule kolicina in je vpletena pri translokaciji kolicina preko celične ovojnice; in (3) citotoksična domena C na C-terminalnem delu molekule je odgovorna za letalno delovanje kolicina na specifično celično tarčo. Citotoksična domena ima tudi kratko zaporedje za vezavo proteina imunosti (Baty in sod., 1988; Bénédetti in sod., 1991; Šmarda in Šmajš, 1998). Osrednji del zajema približno 50 % proteina, N- in C-terminalna dela po približno 25 % proteina (Riley, 1993a).



Slika 2: Strukturna organizacija molekule kolicina (Šmarda in Šmajš, 1998: 570).

Figure 2: Colicin molecule structural organisation (Šmarda in Šmajš, 1998: 570).

2.4.1 Vezava kolicina na celični receptor

Prvi korak v delovanju kolicinov je vezava receptorske domene na specifični protein zunanje membrane (Preglednica 1), ki primarno služi pri prepoznavanju in transportu za bakterijsko celico pomembnih fizioloških snovi (Di Masi in sod., 1973; Šmarda in Šmajš, 1998). Te receptorje koristijo kolicini in bakteriofagi za vstop v bakterijsko celico (Di Masi in sod., 1973). Večina primarnih receptorjev, ki jih uporabljajo kolicini, so β -sodčki, kot je BtuB za transport vitamina B₁₂ ali transporterji sideroforjev, kompleksov, ki prenašajo Fe³⁺ (Cir, FhuA, FepA). Pri prepoznavanju in translokaciji nekaterih kolicinov sodeluje še druga skupina porinov, proteinov zunanje membrane, ki v zunanji membrani tvorijo kanalčke, in so imenovani sekundarni receptorji (OmpF, A, C, W ali TolC). Nekateri porini so tudi neposredni primarni receptorji nekaterih kolicinov (OmpF, OmpW). Začetna vezava na receptor služi pozicioniranju kolicina na površino celice, medtem ko sekundarni receptor sodeluje pri translokaciji kolicina preko membrane (Šmarda in Šmajš, 1998).

Preglednica 1: Najbolje preučeni kolicini in proteini celične ovojnice, ki jih kolicini uporabljajo za vstop v celico. BtuB je transporter za vitamin B₁₂; Tsx je porin za sprejem nukleozidov; Cir, FepA in Fhu A so receptorji za sideroforje, prenašalce železa; OmpF, OpmA, OmpW so nespecifični porini. Simbol * označuje kolicine zapisane na plazmidih tipa II (Šmarda in Šmajš, 1998: 566; Kleanthous, 2010: 844).

Table 1: Best studied colicins and cell envelope proteins used for colicin cell import. BtuB is a vitamin B₁₂ transporter; Tsx is a nucleoside specific porin; Cir, FepA, FhuA are siderophore receptors; OmpF, OpmA, OmpW are nonspecific porins. Symbol * designates colicins encoded on type II plasmids (Šmarda in Šmajš, 1998: 566; Kleanthous, 2010: 844).

Kolicini	Primarni receptor	Proteini translokacije	Citotoksičnost
Skupina A			
A	BtuB	OmpF, TolABQR	porotvorni
E1	BtuB	TolC, TolAQ	porotvorni
E2, E7, E8, E9	BtuB	OmpF, TolABQR	DNaza
E3, E4, E6	BtuB	OmpF, TolABQR	16S rRNaza
E5	BtuB	OmpF, TolABQR	tRNaza
K	Tsx	OmpF, TolABQR	porotvorni
N	OmpF	OmpF, TolAQR	porotvorni
S4	OmpW	OmpF, TolABQR	porotvorni
Skupina B			
B*	FepA	TonB-ExbBD	porotvorni
D	FepA	TonB-ExbBD	tRNaza
Ia*, Ib*	Cir	Cir, TonB-ExbBD	porotvorni
5, 10	Tsx	TolC, TonB-ExbBD	porotvorni
M*	FhuA	TonB-ExbBD	inhibicija sinteze peptidoglikana

2.4.2 Translokacija kolicinov preko celične ovojnice

Vezava osrednje domene na receptor verjetno povzroči konformacijske spremembe kolicinske molekule, ki vodijo v interakcijo translokacijske domene na N-terminalnem delu s proteini translokacijskega sistema (Šmarda in Šmajš, 1998). Prenos kolicinov preko celične ovojnice (zunanje membrane, periplazme, notranje membrane) poteka po dveh proteinskih sistemih, nujnih za razvoj bakterijske celice, Tol in Ton. Sistem Tol uporabljajo za translokacijo kolicini skupine A (A, E1–E9, K, N, S4). Kolicini skupine B (B, D, Ia, Ib, 5, 10, M) se prenesejo preko sistema Ton (Preglednica 1) (Ahmer in sod., 1995; Lazdunski in sod., 1998).

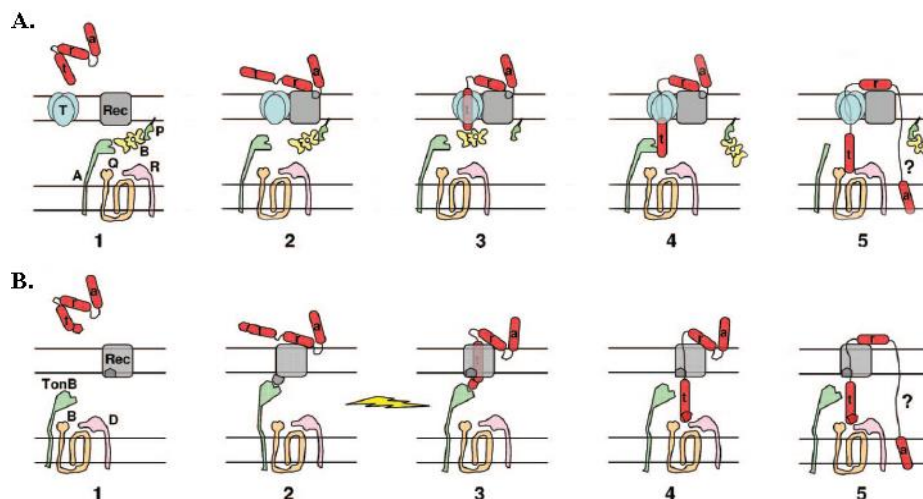
Sistem Tol (Slika 3A.) sestavljajo proteini notranje membrane TolA, TolQ in TolR, periplazemski protein TolB ter lipoprotein zunanje membrane Pal, ki pa ni potreben za transport kolicinov (Lazzaroni in sod., 1995). Kolicini skupine A in kolicina 5, 10 skupine B uporabljajo za vstop dva proteina zunanje membrane: celični receptor, ki služi za nameščanje kolicina in sekundarni receptor, porin, ki služi kot prenašalec preko katerega kolicin prečka zunanjo membrano (Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007). Po vezavi na receptor se kolicini delno odvijajo, translokacijska domena je nato prenesena preko zunanje membrane s sekundarnim receptorjem in v periplazmi interagira s komponento translokacijskega sistema, s TolB, kar prekine interakcijo TolB s Pal. Translokacijska domena nato disociira od TolB in se poveže najprej s TolA in nato s TolQ in/ali TolR (Lazzaroni in sod., 1995).

Sistem Ton (Slika 3B.) sestavljajo trije proteini notranje membrane TonB, ExbB in ExbD (Ahmer in sod., 1995; Lazdunski in sod., 1998). Translokacija kolicinov B preko zunanje membrane je veliko slabše raziskana kot translokacija kolicinov A in je od energije odvisna. Razen kolicinov 5 in 10 vsi kolicini skupine B za vstop uporabljajo le en protein zunanje membrane, ki je hkrati celični receptor in prenašalec preko zunanje membrane (Šmarda in Šmajš, 1998; Cascales in sod., 2007). Po vezavi translokacijske domene na receptor pride do interakcije TonB z zaporedjem TonB receptorja. Nato translokacijska domena preide skozi kanalček in se poveže s TonB preko svojega TonB zaporedja. Temu sledi disociacija in vezava z ExbB in/ali ExbD (Ahmer in sod., 1995; Lazdunski in sod., 1998).

Po vstopu translokacijske domene v periplazmo so proteini imunosti nukleaznih kolicinov sproščeni v medij (Duché in sod., 2006). Da protein imunosti disociira od citotoksične domene, mora priti do strukturnih sprememb citotoksične domene (Zakharov in Cramer, 2004; Cascales in sod., 2007). Citotoksična domena vstopi preko zunanje membrane v periplazmo z neznanim mehanizmom. Morda vstopi po isti poti kot N-terminalna domena (Dover in sod., 2000) ali preko zunanje membrane s konformacijskimi spremembami povzročenimi z interakcijo s fosfolipidi (Mosbahi in sod., 2006). Večina dokazov kaže, da je po končani translokaciji C-terminalne domene osrednja domena še vedno vezana na

receptor na celični površini (Bénédicti in sod., 1992) in N-terminalna domena vezana s Tol oz. Ton podenotami (Slika 3) (Duché in sod., 1995).

Za kolicine skupine B obstaja še en nepotrjeni model vstopa, kjer vstopi v celico celotni kolicin preko zunanje membrane in se pri vstopu v celico delno odvijje in nato zviije nazaj (Hilsenbeck in sod., 2004; Zeth in sod., 2008).

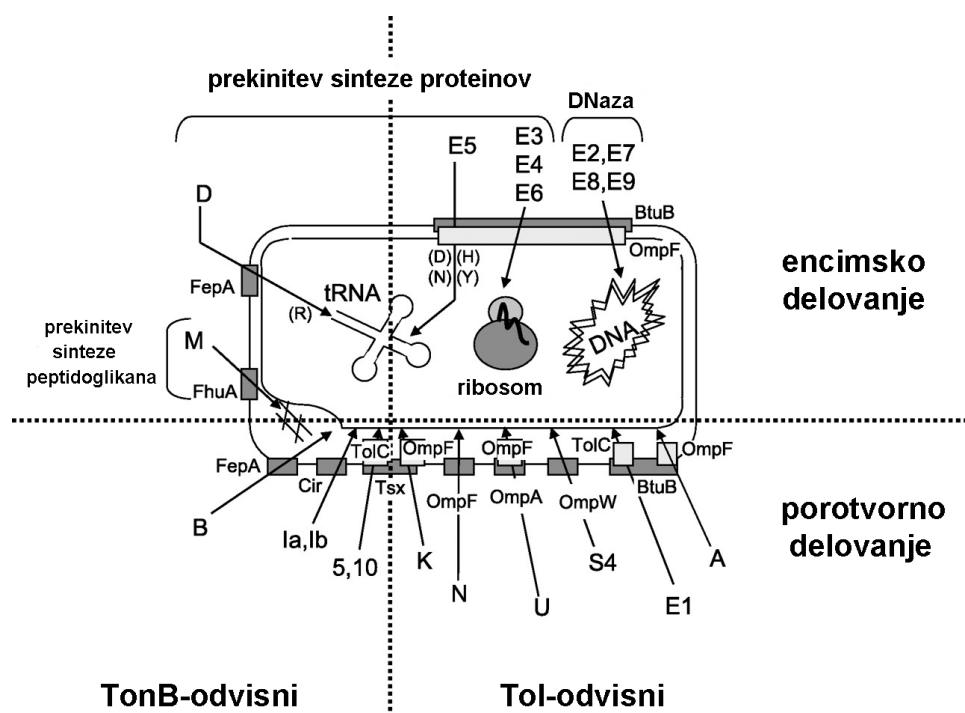


Slika 3: Modela vstopa kolicina preko zunanje membrane in periplazme s translokacijskima sistemoma Tol in Ton. (A.) Prenos kolicinov skupine A s sistemom Tol. Kolicin je rdeč, s ponazorjenimi domenami (t – translokacijska, r – receptorska, a – citotoksična); A – TolA; B – TolB; P – Pal; Q – TolQ; R – TolR; Rec – primarni receptor; T – sekundarni receptor oz. prenašalni protein. (B.) Prenos kolicinov skupine B s sistemom Ton. B – ExbB; D – ExbD; Rec – prepoznavni receptor in vstopni kanalček sistema TonB (Cascales in sod., 2007: 194).

Slika 3: Models of colicin import over the outer membrane into the periplasm using Tol and Ton translocation systems. (A.) Import of group A colicins by Tol translocation machinery. Colicin is red, with indicated domains (t – translocation, r – receptor binding, c – cytotoxic); A – TolA; B – TolB; P – Pal; Q – TolQ; R – TolR; Rec – receptor; T – secondary receptor or porin. (B.) Import of group B colicins by Ton translocation machinery. B – ExbB; D – ExbD; Rec – receptor and import channel of TonB system (Cascales in sod., 2007: 194).

2.4.3 Mehanizem delovanja kolicinov

Kolicini povzročijo smrt občutljive celice s citotoksično domeno, ki po translokaciji preko celične ovojnice interagira s specifično tarčo v celici. Kolicini uničijo celico z enim od mehanizmov delovanja (Slika 4): najbolj pogosta je tvorba kanačka oz. pore v citoplazemski membrani (Bénédicti in sod., 1991; Šmarda in Šmajš, 1998); manj pogosta je nukleazna aktivnost, pri kateri pride do cepitve DNA, 16S rRNA in tRNA; najmanj pogosta je inhibicija sinteze peptidoglikana (Konisky, 1982; Šmarda in Šmajš, 1998). Študije kažejo, da je samo ena ali nekaj kolicinskih molekul dovolj, da uniči občutljivo bakterijsko celico (Schaller in sod., 1981; Šmarda in Šmajš, 1998).



Slika 4: Shematski povzetek vezave, translokacije in delovanja kolicinov. Ločeni so po mehanizmu delovanja in vstopa. Označeni so proteini zunanje membrane, ki so hkrati receptorji in transporterji za kolicin B, D, Ia, Ib, M, N. Poleg primarnih so še sekundarni receptorji zunanje membrane, vpleteni v translokacijo (OmpF za kolicin A, E2–9, K in U; TolC za kolicine 5, 10 in E1). Označene so celične tarče, tarčne tRNA so označene s črkami: D – aspartat, H – histidin, N – asparagin, R – arginin, Y – tirozin (Cascales in sod., 2007: 171).

Figure 4: Schematic summary of colicin reception, translocation and mode of action. Colicins are distinguished by their general modes of action and transit machinery. Indicated are outer membrane proteins used for reception and translocation (for colicin B, D, Ia, Ib, M, N) and besides primary receptors also outer membrane proteins involved in translocation (OmpF for colicins A, E2–9, K and U; TolC for colicins 5, 10 and E1). Indicated are cell targets, the specific tRNA target is indicated by one-letter code: D – aspartate, H – histidine, N – asparagine, R – arginine, Y – tyrosine (Cascales in sod., 2007: 171).

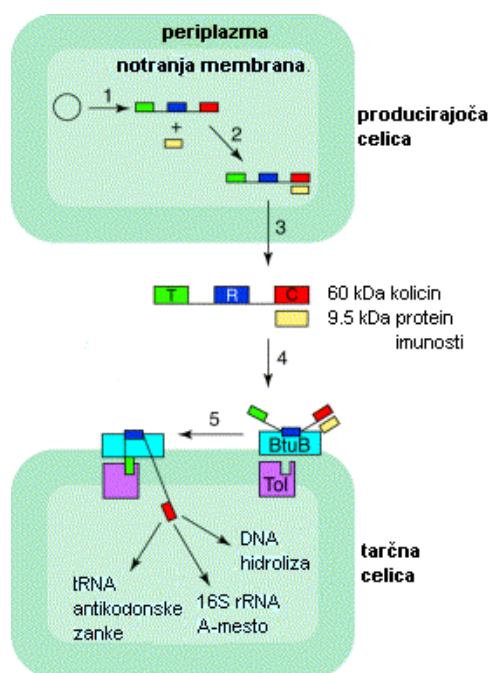
2.4.3.1 Porotvorni kolicini

Porotvorni kolicini (A, E1, B, Ia, Ib, K, N, U, 5 in 10) (Slika 4) povzročijo nastanek ionskih kanalčkov oz. por v citoplazemski membrani, zaradi česar pride do depolarizacije membrane (Bénédicti in sod., 1991; Šmarda in Šmajš, 1998).

Molekule kolicinov so dobro topne v vodi. C-terminalno domeno sestavlja 10 tesno pakiranih α -vijačnic, od katerih je 8 amfipatskih in 2 hidrofobni (vijačnici 8 in 9). Vezavi C-terminalne domene na citoplazemsko membrano sledi odvijanje domene in vstavev hidrofobnih enot v citoplazemsko membrano in oblikovanje kanalčka (Duché in sod., 1996; Zakharov in Cramer, 2002). Vstavev v membrano je orientirana in je možna le iz pozitivno nabite strani, torej iz periplazemskega prostora (Šmarda in Šmajš, 1998). Kolicinski kanalčki se odpirajo in zapirajo v odvisnosti od napetosti, odprejo se pri pozitivni in zaprejo pri negativni električni napetosti in če se membranski potencial na elektronegativni notranji površini spusti do -85 mV se kanaček zapre (Bourdineaud in sod., 1990). Odprti kanalček nastane s premikom nekaterih amfipatičnih heliksov, zaradi česar pride do vključitve velikega dela domene v in preko citoplazemske membrane (Slatin in sod., 1994; Qiu in sod., 1996). Odprtje pore vodi v propad celice, saj inducira izstop fosfata in K^+ , kar vodi v pomanjkanje citoplazemskega ATP in inhibicijo protonskega gradienta (Lazdunski in sod., 2000).

2.4.3.2 Kolicini z nukleazno aktivnostjo

Pri nukleaznih kolicinih mora, za razliko od porotvornih kolicinov, citotoksična domena poleg zunanje membrane in periplazme prečkati tudi citoplazemsko membrano (Slika 5) (James in sod., 2002; Cascales in sod., 2007). Pri prehodu DNaznih kolicinov skozi citoplazemsko membrano nastane kanalček, ki pa za razliko od porotvornih kolicinov ni napetostno odvisen. Je zelo kratko obstojen in nastane kot posledica strukturnih sprememb pri vezavi na lipide, vendar pa ni odgovoren za celično smrt. RNazni kolicini pri prehodu v bakterijsko celico ne tvorijo kanalčka. Mehanizem translokacije nukleaznih kolicinov preko citoplazemske membrane ni dobro poznan (Lazdunski in sod., 1998; Cascales in sod., 2007). Predvideva se, da se nukleazna domena med vstopom v citosol razvije in se nato ponovno sama zviže (Cascales in sod., 2007) in da ob prečanju citoplazemske membrane poteče cepitev citotoksične domene od ostale molekule (de Zamaroczy in Buckingham, 2002; Shi in sod., 2005).



Slika 5: Pregled sinteze, sproščanja in delovanja nukleaznih kolicinov. (1) Po sintezi kolicina (receptorska domena R – modra, translokacijska domena T – zelena, citotoksična domena C – rdeča), proteina imunosti (rumen) in lize (2) se protein imunosti veže na nukleazno domeno. (3) Kompleks kolicin-protein imunosti je sproščen z delovanjem proteina lize. (4) Nukleazni kolicini uporabljajo receptor vitamina B₁₂, BtuB, kot primarni receptor. (5) Translokacijska domena interagira s Tol proteini v periplazmi preko drugih membranskih proteinov, protein imunosti se odcepi in pride do translokacije citotoksične domene preko obeh membran. Celična smrt je nato povzročena z nukleaznim delovanjem (Kleanthous in Walker, 2001: 625).

Figure 5: Overview of nuclease colicins synthesis, export and cytotoxic activity. (1) Following colicin (receptor domain R – blue, translocation domain T – green, cytotoxic domain C – red), immunity (yellow) and lysis protein synthesis (2) immunity protein binds to nuclease domain. (3) Colicin-immunity protein complex is released by lysis protein action. (4) Nuclease colicins use vitamin the receptor of vitamin B₁₂, BtuB as a primary receptor. (5) Translocation domain interacts with Tol proteins in periplasm through other membrane proteins, immunity protein separates, cytotoxic domain translocates over both membranes and nuclease activity occurs (Kleanthous in Walker, 2001: 625).

2.4.3.2.1 DNazni kolicini

Kolicini E2, E7, E8 in E9 (Slika 4) (Šmarda in Šmajš, 1998) delujejo na kromosomsko DNA kot nespecifične DNA nukleaze (DNaze). Celično smrt povzročijo z naključnim cepljenjem bakterijskega kromosoma, pri čemer ustvarijo ponavljajoče dvovertične prelome, ki jih popravljalni mehanizmi ne morejo popraviti. Pri cepitvi nastaneta produkt s 5'-fosfatno skupino in produkt s 3'-OH (Pommer in sod., 2001; Cascales in sod., 2007).

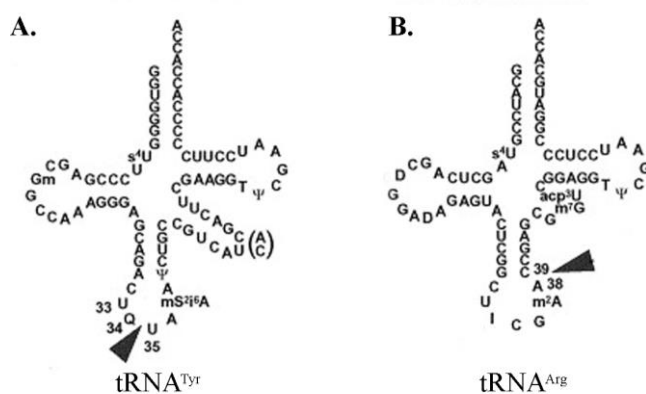
Sredica aktivnega mesta na C-terminalnem koncu molekule kolicina je struktura iz 34 AK in se imenuje motiv H-N-H (histidin-asparagin-histidin). Motiv veže dvovalentni kovinski kation ali druge dvovalentne katione (Mg^{2+} , Ca^{2+}) in je ključen za hidrolitično delovanje (Pommer in sod., 1998; Kleanthous in sod., 1999; James in sod., 2002).

2.4.3.2.2 RNazni kolicini

Kolicini z RNazno aktivnostjo povzročijo celično smrt v občutljivih celicah z inhibicijo proteinske sinteze zaradi cepitve fosfodiesterne vezi v 16S rRNA (rRNaze) ali tRNA (tRNaze) (Slika 4) (Šmarda in Šmajš, 1998).

rRNazni kolicini E3, E4, E6 odrežejo 49 nt dolg fragment iz 3'-OH konca 16S rRNA. Ta regija na podenoti ribosoma 30S je v neposredni bližini dekodirnega centra, kjer pride do interakcije mRNA s tRNA (Lasater in sod., 1989; Šmarda in Šmajš, 1998). Takšni ribosomi niso več sposobni vezave mRNA in posledično je translacija onemogočena (Šmarda in Šmajš, 1998).

tRNazna kolicina E5 in D cepita enojno fosfodiesterko vez v antikodonski zanki določenih tRNA (Slika 6) (Ogawa in sod., 1999; Tomita in sod., 2000). Kolicin E5 cepi antikodonsko zanko tRNA za histidin (His), asparagin (Asn), tirozin (Tyr) in asparaginsko kislino (Asp). Tem tRNA je skupno, da imajo na 1. poziciji antikodona, na ohlapni bazi (angl. wobble position), analog gvanina Q (angl. queuine). Cepitev v antikodonski zanki tRNA se pojavi med 1. in 2. bazo antikodona (Ogawa in sod., 1999). Kolicin D cepi tRNA za arginin (Arg) na specifični poziciji zunaj antikodona (Tomita in sod., 2000).



Slika 6: Mesto cepitve tRNA s (A.) kolicinom E5 in (B.) kolicinom D (Masaki in Ogawa, 2002: 434).

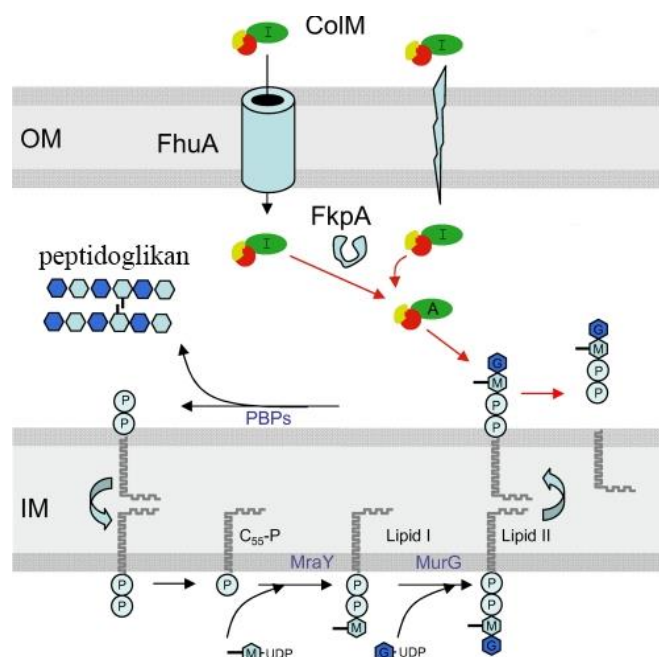
Figure 6: tRNA sites of (A.) colicin E5 and (B.) colicin D transferase activity (Masaki in Ogawa, 2002: 434).

2.4.3.3 Inhibicija sinteze peptidoglikana s kolicinom M

Kolicin M (ColM) je med najmanjšimi kolicini, velik le 271 AK (29,5 kDa), in je z vpletanjem v sintezo peptidoglikana edinstven v načinu delovanja (Braun in sod., 1974; Schaller in sod., 1982). Kolicin M je fosfataza, ki inhibira sintezo peptidoglikana s hidrolizo pirofosforilne vezi peptidoglikanskega prekursorja, lipida II (C₅₅-PP-NAcMur-pentapeptid-NAcGlc) (Slika 7), med lipidnim delom C₅₅ in pirofosforil-disaharid-peptidnim delom. Pri tem nastane PP-NAcMur-pentapeptid-NAcGlc in undekaprenol ali baktoprenol (C₅₅-OH), namesto undekaprenil pirofosfata (C₅₅-PP ali baktoprenol pirofosfat). Baktoprenol se kopiči v celici in se ne more regenerirati nazaj v undekaprenil fosfat (C₅₅-P). ColM s tem prepreči regeneracijo lipidnega prenašalca pri sintezi peptidoglikana (El Ghachi in sod., 2006).

Prenašalec C₅₅-PP je pri normalni sintezi peptidoglikana po prenosu lipida II preko notranje membrane sproščen in pretvorjen v baktoprenol monofosfat C₅₅-P, ki ponovno vstopi v reakcijski cikel (El Ghachi in sod., 2006). Z vpletanjem v obnavljanje baktoprenola ColM inhibira biosintezo peptidoglikana celične stene in O-antigena in povzroča lizo občutljivih bakterijskih celic (Braun in sod., 1974; Schaller in sod., 1982; Harkness in Braun, 1989). Undekaprenil fosfat C₅₅-P je pri Gram+ in Gram- bakterijah nepogrešljivi lipidni prenašalec različnih polisaharidov celične stene (peptidoglikan, O-antigen, teihojska kislina, kapsularni polisaharidi) (Reeves in sod., 1996).

ColM v občutljivo celico vstopi s sistemom Ton preko odprte pore receptorja FhuA (Braun, 1995; Braun in sod., 2002). Lahko pa vstopi preko zunanje membrane pri osmotskem šoku brez pomoči proteinov zunanje membrane (Slika 7) (Braun in sod., 1980). Molekula kolicina M se delno odvijje med translokacijo preko zunanje membrane. Po vezavi kolicina z receptorjem FhuA le-ta najprej reagira s TonB, kar odpre poro v FhuA, skozi katero gre N-terminalni konec kolicina M, ki interagira s TonB sistema TonB-ExbB-ExbD (Postle, 2007). Ko kolicin M vstopi v periplazmo, ga periplazemski protein FkpA, ki ga sestavlja šaperon in cis/trans-peptidil-prolil izomeraza (Saul in sod., 2004), zviije nazaj in ga aktivira s spremembo oblike *cis* v *trans* (cis-trans izomerizacija peptidil-prolil vezi) (Hullmann in sod., 2008; Barreteau in sod., 2010; Helbig in sod., 2010). Aktiven kolicin M v občutljivih celicah interagira s citoplazemsko membrano, kjer se nahaja njegov substrat, peptidoglikanski prekursor lipid II (Slika 7). Verjetno je, da hidrofobna vijačnica kolicina M, vijačnica $\alpha 1$ na N-terminalnem delu kolicina, pritrdi protein na citoplazemsko membrano (Gross in Braun, 1996; Zeth in sod., 2008).



Slika 7: Sinteza peptidoglikanskih lipidnih intermediatov in mehanizem delovanja ColM. Ponazorjeni sta notranja (IM) in zunanja (OM) membrana. Encim MraY katalizira prenos pirofosfo-MurNac-pentapeptida iz nukleotidnega prekursorja na lipidni prenašalec undekaprenil fosfat (C_{55} -P), pri čemer nastane lipid I; nato encim MurG doda skupino GlcNAc in nastane lipid II, ki je translociran iz notranje strani na zunanjo stran membrane. Sledi polimerizacija motiva disaharid-peptapeptid in vstavev v peptidoglikan s pomočjo proteinov PBP (angl. penicilin-binding protein) Pri tem se sprosti lipidni prenašalec v pirofosfatni obliki, ki se bo reciklirala. Vstopajoči ColM je v perioplazmi aktiviran s FkpA in cepi lipidne intermediete med C_{55} in pirofosforil-disaharid-peptidom. Inaktivna (I) in aktivna oblika ColM (A) sta označeni zeleno, receptorska in translokacijska domena pa rdeče in rumeno (Barreteau in sod., 2010: 12379).

Figure 7: Synthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates and mode of action of ColM. Presented are inner (IM) and outer (OM) membranes. The MraY enzyme catalyzes the transfer of the phospho-MurNac-pentapeptide from the nucleotide precursor onto the carrier lipid undecaprenyl phosphate (C_{55} -P), yielding lipid I; subsequently, the MurG enzyme adds the GlcNAc moiety, yielding lipid II, which is translocated from the inner side of membrane to the outer side. Thereafter, the disaccharide-pentapeptide motif is polymerized and incorporated into the peptidoglycan through the action of the penicillin-binding proteins (PBPs) releasing the lipid carrier in a pyrophosphate form that will be recycled. Incoming ColM is activated by FkpA in the periplasm and cleaves the lipid-linked intermediates between C_{55} and pyrophosphoryl-disaccharide-peptide. ColM inactive (I) and active (A) conformations are represented in green, the reception and translocation domains of ColM are represented in red and yellow, respectively (Barreteau in sod., 2010: 12379).

2.5 ZAŠČITA PRED KOLICINI

Kolicinogeni sevi so zaščiteni proti lastnemu kolicinu, ker proizvajajo tudi odgovarjajoči protein imunosti (Imm), ki interagira s C-terminalno domeno kolicina in ga inaktivira (Slika 5). Sintetizira se konstitutivno v nizki ravni, da ščiti kolicinogeno bakterijo pred lastnim kolicinom (Šmarda in Šmajš, 1998).

Poleg mehanizma imunosti še dva mehanizma zagotavljata odpornost bakterijskih celic proti delovanju drugih kolicinov: (a) odpornost zaradi spremembe receptorja za kolicin z mutacijo ali zaradi odsotnosti kolicinskega receptorja; (b) toleranca zaradi odsotnosti funkcionalnega sistema translokacije kolicinov, pri čemer ostaja receptor popolnoma funkcionalen (Šmarda in Šmajš, 1998). Gordon in sodelavci so pokazali, da je več kot 70 % naravnih izolatov *E. coli* odpornih proti najmanj enemu kolicinu in 30 % izolatov proti 3 ali več kolicinom (Gordon in sod., 1998).

2.5.1 Imunost porotvornih kolicinov

Kolicinogeni sevi imajo od 10^4 - do 10^7 -krat več proteina imunosti kot kolicina. Proteini imunosti porotvornih kolicinov se nahajajo v citoplazemski membrani celic proizvajalskega seva, kjer ščitijo pred učinkom kolicina, ki se membrani približa iz zunanje strani oz. periplazme, pa naj bo to lastni kolicin ali kolicin proizveden od bližnje celice. Aktivnost endogenega kolicina na citoplazemski strani ni možna, ker je polarnost transmembranskega potenciala obratna kot je potrebna za odprtje pore (Song in Cramer, 1991). Kolicini imunosti ne preprečijo vstavitve eksogenega kolicina v membrano, temveč se povežejo s citotoksično domeno kolicina, s čimer naj bi preprečili odpiranje kanalčka ali blokirali odprti kanalček (Llobès in sod., 1986; Zhang in Cramer, 1993; Espeset in sod., 1996).

2.5.2 Imunost nukleaznih kolicinov

Proteini imunosti nukleaznih kolicinov ščitijo celice proizvajalskega seva pred eksogenimi in endogenimi kolicini. Vsak nukleazni kolicin se poveže v kompleks s pripadajočim proteinom imunosti v citoplazmi takoj po sintezi kolicina in s tem prepreči njegovo encimsko delovanje ter propad proizvajalske celice. Kompleks kolicin-protein imunosti je sproščen v zunajcelični medij, nakar na celični površini pred vstopom v občutljivo celico pride do sprostitve proteina imunosti (Sidikaro in Nomura, 1974; Duché in sod., 2006). Proteini imunosti inaktivirajo nukleazne kolicine z neposredno vezavo na aktivno mesto s posnemanjem substratne RNA (proteini Imm tRNaz) (Graille in sod., 2004; Luna-Chávez in sod., 2006) ali z vezavo na mesto zraven aktivnega sterično ovirajo dostop substrata na vezavno mesto (proteini Imm DNaz in rRNaz) (Kleanthous in sod., 1999; Kleanthous in Walker, 2001).

2.5.3 Imunost kolicina M

Kolicin M je za razliko od drugih encimskih kolicinov iz celice sproščen brez vezanega proteina imunosti. Protein imunosti se nahaja v periplazmi, pripet na citoplazemsko membrano, kjer naj bi kolicin deloval. Protein imunosti kolicina M je pripet z N-terminalnim koncem v citoplazemski membrani preko α -vijačnice, medtem ko se večina polipeptida razprostira v periplazemskem prostoru. Še preden kolicin M doseže tarčo na citoplazemski membrani, je inaktiviran s proteinom imunosti v periplazmi (Ölschläger in Braun, 1987; Ölschläger in sod., 1991). Protein imunosti naj bi inaktiviral vstopajoči kolicin z vezavo v kompleks ali onemogočil kolicinu dostop do tarče z neznanim mehanizmom (Gerard in sod., 2011). Kolicin M ne deluje na citoplazemski strani notranje membrane, po vsej verjetnosti zato, ker je kolicin M v neaktivni obliki dokler ni aktiviran s proteinom FkpA po vstopu preko zunanje membrane v periplazmo (Harkness in Braun, 1990; Hullmann in sod., 2008; Barreteau in sod., 2010; Helbig in sod., 2010).

2.6 URAVNAVANJE SINTEZE KOLICINOV

Bakterije sintetizirajo kolicine v stresnih pogojih, njihova sinteza pa je uravnana z več mehanizmi. Vsem je skupno uravnavanje s sistemom SOS, ki uravnava izražanje genov odgovornih za popraviljanje poškodovane DNA (Schnarr in sod., 1991). Pod normalnimi pogoji je sinteza kolicinov utišana z represorjem LexA v večini celic populacije, pojavi se samo v majhnem delu populacije kot rezultat naključne aktivacije sistema SOS, ki je neodvisna od poškodb DNA in nastane npr. zaradi porušjenja replikacijskih vilic (Šmarda in Šmajš, 1998; Mulec in sod., 2003; Mrak in sod., 2007; Kamenšek in sod., 2010). Po indukciji sinteze kolicinov z dejavnikom, ki inducira SOS, pa se lahko sinteza kolicina v proizvodni kulturi poveča tudi do tisočkrat in kolicin postane večinski protein v celici (Herschman in Helinski, 1967; Salles in sod., 1987; Šmarda in Šmajš, 1998). Kolicini se iz proizvodni celice sprostijo z lizo celice, zaradi česar mora biti sinteza zelo močno in natančno uravnana. Po indukciji kolicinov, ki imajo zapis za protein lize, z dejavnikom kot je mitomicin C, začne število viabilnih celic takoj padati, medtem ko količina kolicina narašča (Herschman in Helinski, 1967; Cavard, 1991).

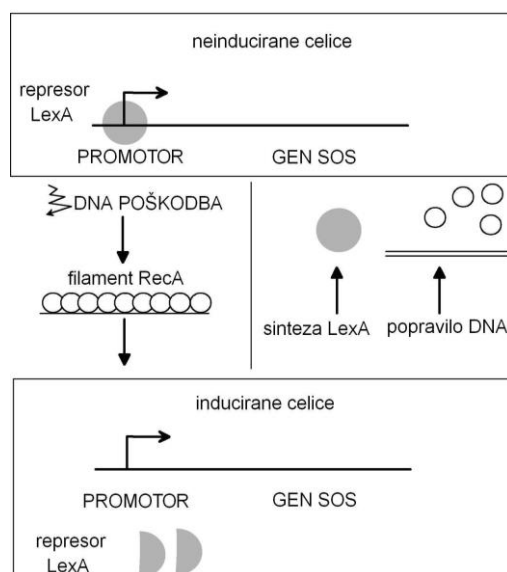
Uravnavanje izražanja kolicinskih operonov je zelo kompleksno in se razlikuje od kolicina do kolicina. Čeprav je LexA ključni regulator transkripcije kolicinskih operonov, tudi drugi represorji in aktivatorji v povezavi z okoljskimi signali uravnavajo izražanje nekaterih kolicinskih operonov. Bakterije lahko proizvajajo kolicine kot odziv na pomanjkanje hranil (angl. stringent response) (Lotz, 1978; Kuhar in Žgur-Bertok, 1999), pri katabolni represiji (Ebina in Nakazawa, 1983; Salles in sod., 1987), v stacionarni fazi rasti (Salles in sod., 1987; Eraso in sod., 1996; Kuhar in Žgur-Bertok, 1999), pri anaerobiozi (Eraso in Weinstock, 1992), in ob spremembi temperature (Kennedy, 1971; Cavard, 1995; Kuhar in Žgur-Bertok, 1999; Butala in sod., 2008).

Razlike v uravnavanju izražanja kolicinskih operonov so lahko ekološko pomembne, saj je sinteza posameznih kolicinov inducirana z različnimi signali. Kolicinogeni sevi z zapisom za različne kolicine bi lahko imeli kompetitivno prednost v različnih ekoloških nišah (Kuhar in Žgur-Bertok, 1999).

2.6.1 Uravnavanje izražanja kolicinskih genov s sistemom SOS

2.6.1.1 Mehanizem indukcije SOS

Odziv SOS pri *E. coli* uravnava na ravni transkripcije izražanje več kot 40 neodvisnih genov, katerih produkti so vpleteni pri zaščiti, popravilu, podvojevanju, mutagenizi in presnovi DNA ter kontroli celične delitve (Fernández De Henestrosa in sod., 2000; Courcelle in sod., 2001; Friedberg in sod., 2005). Med drugim uravnava tudi transkripcijo kolicinskih operonov (Little in Mount, 1982). Ključno vlogo v regulaciji odziva SOS imata 2 proteina: represor LexA in induktor RecA (Walker, 1996). Med normalno rastjo je transkripcija genov SOS utišana z LexA vezanim na specifično LexA vezavno zaporedje (angl. SOS box), prisotno v promotorski regiji obeh *lexA* in *recA* ter vseh ostalih genov, ki pripadajo sistemu SOS (Lewis in sod., 1994). RecA deluje kot senzor poškodb DNA. Ob poškodbi DNA, ki prekine podvojevanje, nastanejo enoverižni konci DNA (ssDNA) na katere se veže RecA in nastane nukleoproteinski filament RecA-ssDNA s proteazno aktivnostjo (Little, 1991). V takšni aktivni obliki RecA* stimulira avtocepitev prostega LexA (Butala in sod., 2011). Ob sprostitvi LexA iz LexA vezavnih zaporedij se prične transkripcija (Giese in sod., 2008). Ko koncentracija necepljenega represorja LexA v celici pade, sledi derepresija genov SOS, med drugim tudi gena *lexA*, saj je ta avtoreguliran (Little in sod., 1980; Little, 1991). Konstantna produkcija LexA med odzivom SOS zagotavlja, da takoj, ko je DNA poškodba popravljena in inducirajoči dejavnik odstranjen, ter količina aktivnega RecA vezanega na ssDNA pade, se LexA ponovno nakopiči in utiša gene SOS (Slika 8) (Friedberg in sod., 2005; Michel, 2005). Med odzivom SOS se v velikih količinah sintetizira protein Sula, ki inhibira celično delitev z vezavo na protein FtsZ. Slednji je s tvorbo obroča na mestu septuma ključen za celično delitev (Huisman in sod., 1984). Zato je tipična morfološka sprememba med odzivom SOS filamentozna rast bakterijskih celic (Robin in sod., 1990).



Slika 8: Potek dogajanj med odzivom SOS (Michel, 2005: e255).

Figure 8: Course of events during SOS response (Michel, 2005: e255).

Sistem SOS lahko poleg fizikalnih in kemijskih dejavnikov, ki poškodujejo DNA, kot so UV, mitomicin C, nekateri antibiotiki in druge kemikalije (Friedberg in sod., 2005; Kelley, 2006; Erill in sod., 2007), sprožijo tudi različna fiziološka stanja, kot so spremembe pH (Dri in Moreau, 1994), povišan tlak (Aertsen in sod., 2004), prehod iz eksponentne v stacionarno rast in stradanje celic ter določene endogene motnje (Taddei in sod., 1995; Koch in Woodgate, 1998).

2.6.1.2 Lastnosti vezave represorja LexA na DNA

Na LexA vezavno zaporedje se veže dimer LexA (Schnarr in sod., 1991). LexA vezavno zaporedje pri *E. coli* je 16 nt dolgo ohranjeno palindromsko zaporedje CTG(N)₁₀CAG (Lewis in sod., 1994; Erill in sod., 2003), nameščeno blizu ali v promotorski regiji gena inducirane s SOS. Vezava LexA fizično ovira vezavo RNA polimeraze in s tem učinkovito blokira iniciacijo transkripcije.

Vsi geni SOS imajo v promotorski regiji ohranjeno LexA vezavno zaporedje. Vendar sama pozicija in majhne razlike v nukleotidnem zaporedju povzročajo, da se LexA veže na različne promotorje z različno afiniteto, kar pomeni, da je transkripcija tudi časovno uravnana (Berg in von Hippel, 1987; Schnarr in sod., 1991). Najbolj kritični za vezavo LexA sta mesti CTG in CAG, saj sta najbolj ohranjeni, vendar so tudi ostali nt pomembni (Schnarr in sod., 1991).

Pod normalnimi pogoji rasti so geni SOS izraženi v osnovni ravni. Osnovna raven izražanja genov SOS (Sassanfar in Roberts, 1990) in izražanje po indukciji se med geni razlikuje (Janion, 2001; Ronen in sod., 2002) in je odvisna od ohranjenosti LexA vezavnih zaporedij, od pozicije v promotorski regiji in števila LexA vezavnih zaporedij, ki jih je v večini primerov eno, redko dve (*ydjM*, *lexA*, *cxn*) ali tri (le *recN*) (Schnarr in sod., 1991).

2.6.1.3 Uravnavanje transkripcije kolicinskih genov z LexA

Transkripcija kolicinskih operonov je močno utišana s proteinom LexA (Little in Mount, 1982). Kolicinski promotor ima dve zaporedni delno prekrivajoči LexA vezavni zaporedji, ki se nahajata navzdol od -10 regije promotorja. LexA se veže na distalno zaporedje z večjo afiniteto kot na proksimalno (Lewis in sod., 1994). Na zaporedji se vežeta dva dimera LexA kooperativno zaradi prekrivajočega mesta, kar učinkovito ovira transkripcijo (Llobès in sod., 1991; Schnarr in sod., 1991; Lu in Chak, 1996). Poleg tega vezava dveh dimerov povzroči upogibanje DNA, kar še dodatno prispeva k oviranju transkripcije (Llobès in sod., 1988b; Butala in sod., 2009).

Kolicini pod normalnimi pogoji niso sintetizirani zaradi učinkovite represije z LexA, vendar je majhna količina kolicina vedno prisotna v kulturi kolicinogenih celic in se tekom rasti v nekaterih celicah povečuje (Mulec in sod., 2003; Mrak in sod., 2007; Kamenšek in sod., 2010). Ob sprožitvi odziva SOS z dejavnikom, ki poškoduje DNA, količina kolicina eksponentno naraste z zakasnitvijo, po t. i. lag fazi, glede na indukcijo odziva SOS (Herschman in Helinski, 1967; Salles in sod., 1987; Ronen in sod., 2002; Butala in sod., 2012). Večina promotorjev genov SOS je induciranih takoj po poškodbi DNA, medtem ko se izražanje kolicinskih genov začne z 20–30 minutnim zamikom v primerjavi z ostalimi geni sistema SOS. Lag faza oz. zakasnitev pri izražanju kolicinskih genov omogoči, da pri omejenih poškodbah DNA celica pridobi čas, da popravi poškodbe in ponovno utiša sistem, še preden se pojavi indukcija sinteze letalnega proteina lize. Pri večjih poškodbah popravilo napak v času lag faze ni končano in ne pride do represije kolicinskega operona. Tako je produkcija kolicina omejena na celice, ki zaradi obsežnih poškodb DNA ne bi preživele (Salles in sod., 1987).

Kolicinski geni so med zadnjimi izraženimi po indukciji odziva SOS (Herschman in Helinski, 1967; Salles in sod., 1987). Različna afiniteta LexA za promotorje genov odziva SOS dopušča, da so različni geni različno inducirani pri neki stopnji poškodbe DNA. Večja afiniteta vezave LexA je pri bolj konsenznem zaporedju, in dveh prekrivajočih zaporedjih, zato so tudi razlike v izražanju genov kolicinov in ostalih genov odziva SOS (Friedman in sod., 2005; Mrak in sod., 2007).

2.6.2 Uravnavanje izražanja z okoljskimi dejavniki

Tekom ravnega cikla se pojavijo v gojišču, naravnem okolju ter v celicah spremembe, kot so pomanjkanje hranil, sprememba pH, anaerobioza, produkcija metabolitov ali visoka celična gostota, pogostost redkih AK in spremembe v sintezi proteinov, vključno z regulatorji transkripcije. Vse omenjeno vpliva na uravnavanje izražanja genov, tudi kolicinskih (Kuhar in Žgur-Bertok, 1999).

2.6.2.1 Odvisnost od faze rasti in posledice pomanjkanja hranil

Pri preučevanju izražanja različnih kolicinov tekom rasti je bilo ugotovljeno, da je transkripcija odvisna od faze rasti in da je največje izražanje kolicinskih genov v stacionarni fazi rasti, ko pride do primanjkanja hranil. Tako je bilo za kolicina K in E1 dokazano inducirano izražanje v kulturi v stacionarni fazi (Eraso in sod., 1996; Kuhar in Žgur-Bertok, 1999). Mulec in sod. (2003) so pokazali, da v odsotnosti dejavnikov, ki poškodujejo DNA, le 3 % kolicinogene populacije močno izraža *cka* v stacionarni fazi zaradi pomanjkanja hranil (Mulec in sod., 2003). Tudi za kolicin A, N, E1 in E7 je bilo pokazano, da je v stacionarni fazi majhen del populacije močno izražal kolicinske gene (Kamenšek in sod., 2010). Prav tako je gen za kolicin Ia induciran pri splošnem pomanjkanju hranil, kot se pojavi npr. v spodnjem delu prebavnega trakta (Gordon in O'Brien, 2006).

2.6.2.1.1 Odziv na težavne razmere (angl. stringent response)

Ko celice izrabijo hranila, se zaradi pomanjkanja AK poveča število deaciliranih tRNA in nastanejo prazna akceptorska mesta na ribosomu, zaradi česar se le-ti ustavijo. To vodi v povečanje sinteze efektorske molekule gvanozin tetrafosfata, ppGpp, ki jo uravnava proteina RelA in SpoT. ppGpp se veže na RNA polimerazo in zavre prepisovanje genov potrebnih za rast in delitev celic in pozitivno uravnava odziv na pomanjkanje aminokislin in s tem transkripcijo biosinteznih genov za aminokislino. Pozitivno uravnava še številne druge odzive za preživetje daljšega stradanja in virulenco (Magnusson in sod., 2005; Traxler in sod., 2008), vključno z izražanjem nekaterih kolicinov (Lotz, 1978; Kuhar in Žgur-Bertok, 1999; Kuhar in sod., 2001).

Pokazano je bilo, da ppGpp poveča raven transkripcije kolicina E1 in E3 3 do 4-krat (Lotz, 1978). Pri kolicinu K je bilo ugotovljeno, da prisotnost nekaj redkih kodonov v mRNA kolicina K omogoča ppGpp, da pozitivno uravnava sintezo kolicina K, in da posredno uravnava translacijo mRNA kolicina K (Kuhar in Žgur-Bertok, 1999; Kuhar in sod., 2001).

2.6.2.1.2 Katabolna represija

Ko celice rastejo v gojišču z glukozo kot preferenčnim virom ogljika, je sinteza encimov, ki razgrajujejo druge vire, inhibirana, kar imenujemo katabolna represija. RNA polimeraza se veže na promotorje genov teh encimov le v prisotnosti aktivatorskega proteina CRP (angl. cAMP receptor protein) v kompleksu s cAMP (ciklični adenozin monofosfat). cAMP nastane iz ATP z adenilat ciklazo ob pomanjkanju glukoze. Ko je glukoza v izobilju, inhibira nastanek cAMP in stimulira njegov transport iz celice. Za transkripcijo genov uravnanih s katabolno represijo mora biti dovolj cAMP, da se lahko protein CRP veže na CRP vezavno mesto (Madigan in sod., 2003). Katabolna represija pa uravnana tudi sintezo nekaterih kolicinov.

Pri nizki koncentraciji glukoze kolicinogene celice povečajo sintezo cAMP, ki v kompleksu s CRP stimulira izražanje strukturnega gena za kolicin z vezavo na DNA v bližini promotorja in morda sodeluje pri odstranjevanju LexA z regulatorne regije, kakor je bilo predlagano za izražanje gena za kolicin E1 (Salles in sod., 1987). V bližini promotorja gena za kolicina E1 sta dve vezavni mesti za kompleks CRP-cAMP (Ebina in Nakazawa, 1983; Salles in Weinstock, 1989), vendar le bližnje močno veže kompleks (Shirabe in sod., 1985). Medtem ko je izražanje gena za kolicin E1 odvisno od CRP-cAMP kompleksa, izražanje gena za kolicin K ni (Kuhar in Žgur-Bertok, 1999).

2.6.2.2 Anaerobioza

Escherichia coli je fakultativni anaerob in se v naravnem okolju, še posebej v prebavnem traktu, lahko pojavi v anaerobnem okolju. Protein FNR je globalni transkripcijski regulator genov za anaerobno respiracijo in sorodnih poti v odzivu na pomanjkanje kisika. Količina proteina FNR je v vseh fazah rasti konstantna, a je v aerobnih pogojih v neaktivni obliki zaradi oksidacije skupine 4Fe-4S v senzorni domeni v Fe-S in se posledično ne more vezati na tarčne promotorje. V aktivni obliki je le pod anaerobnimi pogoji, ko se lahko veže na promotorje tarčne DNA in spodbudi njihovo transkripcijo (Unden in Bongaerts, 1997; Grainger in sod., 2007). Produkcija nekaterih kolicinov je lahko stimulirana tudi z anaerobiozo.

Pod anaerobnimi pogoji transkripcijo nekaterih kolicinov inducira protein FNR z vezavo aktivne oblike v območju promotorja. Za kolicin E1 je bilo pokazano, da je po indukciji odziva SOS v anaerobnih pogojih znatno zmanjšana lag faza in je sinteza kolicina v primerjavi z aerobnimi pogoji tudi do 45-krat večja (Eraso in Weinstock, 1992). Anaerobioza prav tako delno tudi vpliva na transkripcijo kolicina K (Kuhar in Žgur-Bertok, 1999).

2.6.2.3 Temperatura

Temperatura vpliva na izražanje nekaj pomembnih virulentnih dejavnikov (Coote, 1991; Leimeister-Wachter in sod., 1992; Puente in sod., 1996), kot tudi močno vpliva na sintezo kolicinov. Za kolicin K je bilo dokazano močno povečano izražanje gena *cka* pri 37 °C v primerjavi z 22 °C in temperaturna odvisnost izražanja kolicina K kaže na indukcijo v toplokrvnem gostitelju (Kuhar in Žgur-Bertok, 1999). Tudi za kolicina E1 in E2 je bila dokazana povečana sinteza pri višji temperaturi (Kennedy, 1971) in zmanjšana za kolicin A pri nižji temperaturi (Cavard, 1995). Vpliv temperature na sintezo kolicinov E1, K, N in E7 so pokazali tudi Butala in sod. (2008), saj je bilo v stacionarni fazi pri 37 °C 16-krat več kolicina kot pri 22 °C. Za kolicin K so dokazali, da se temperaturno odvisno uravnavanje vrši na nivoju transkripcije, kot je možno tudi za ostale preučene kolicine. Ob indukciji *cka* z mitomicinom C je bila pri 22°C 2-kratna indukcija transkripcije, medtem ko je bila pri 37 °C 9-kratna, in ker temperatura na izražanje drugih genov odziva SOS ni vplivala, je pri od temperature odvisnem uravnavanju izražanja kolicina K poleg LexA verjetno vpleten še dodatni dejavnik (Butala in sod., 2008).

2.6.2.4 Izražanje kolicinov v odvisnosti od globalnega regulatorja IscR

Pri preučevanju kolicina K so se pojavljala namigovanja, da bi lahko bili v izražanju gena *cka* poleg LexA vpleteni še dodatni regulatorni proteini, katerih koncentracije nihajo kot odgovor na okoljske signale. Ti bi lahko odstranili LexA iz promotorjev ali aktivirali transkripcijo brez odmaknitve LexA (Kuhar in Žgur-Bertok, 1999; Mulec in sod., 2003; Mrak in sod., 2007; Butala in sod., 2008). Pred kratkim je bilo ugotovljeno, da je izražanje gena *cka* kolicina K poleg LexA močno uravnano z regulatorjem IscR, ki pomaga pri stabilizaciji LexA na LexA vezavnih zaporedjih in je odgovoren za zamik v transkripciji po indukciji odziva SOS. Izmed preučevanih protovornih kolicinov N, K, E1 in A, imajo le slednji trije IscR vezavno zaporedje, ki se prekriva z -35 promotorskim elementom, in so le ti kazali odvisnost izražanja od IscR po indukciji odziva SOS. Koncentracija IscR se tekom rastne faze zmanjšuje, kar olajša sprostitev LexA iz promotorjev pri poškodbi DNA (Butala in sod., 2012). IscR je protein s Fe-S centrom (angl. iron-sulphur cluster regulator), ki deluje kot represor ali aktivator za uravnavanje izražanja več kot 40 genov *E. coli*. IscR je regulator transkripcije genov vpletenih v nastanek in popravilo železo-žveplovih centrov Fe-S proteinov in drugih genov, ki kodirajo proteine s Fe-S (Nesbit in sod., 2009).

2.6.3 Uravnavanje izražanja kolicinskega operona z drugimi mehanizmi

2.6.3.1 Uravnavanje sinteze proteina lize na nivoju translacije s proteinom CsrA

Poleg uravnavanja izražanja gena aktivnosti je tudi uravnavanje sinteze proteina lize kompleksno in ni omejeno zgolj s predčasno terminacijo transkripcije zaradi prisotnosti transkripcijskega terminatorja v medcistronski regiji *cei* in *cel* (Sabik in sod., 1983; Llobès in sod., 1988a; Chak in sod., 1991). Kljub temu, da je protein lize nujen za sprostitvev kolicinov, je preveliko izražanje gena lize letalno za proizvodnjsko celico (van der Wal in sod., 1995), zato mora biti regulacija skrbno nadzorovana. Nedavno je bilo ugotovljeno, da je izražanje gena za protein lize kolicina E7, LysE7, dodatno uravnano še na posttranskripcijskem nivoju. Yang in sod. (2010) so ugotovili, da se globalni regulator CsrA, represor presnove glikogena, specifično veže na sprednji nekodirajoči del *ce7l* mRNA in s preprečitvijo vezave ribosoma prepreči translacijo (Yang in sod., 2010). Aktivnost CsrA je negativno uravnana s CsrB in CsrC, majhnima regulatornima RNA, ki z vezavo na CsrA preprečujeta interakcijo s tarčnimi mRNA (Liu in sod., 1997). Med odzivom SOS je izražanje CsrB in CsrC zmanjšano, kar poveča biološko aktivnost CsrA in represijo translacije proteina Lys. CsrA deluje kot modulator, ki preprečuje prekomerno translacijo, ne da bi v celoti preprečil sintezo proteina lize. Primerjali so tudi medcistronske regije *cei-cel* kolicinov skupine E (E2, E3 in E6 do E9) in ugotovili 99 % podobnost med njimi, zato so postavili hipotezo, da protein CsrA verjetno uravnava tudi sintezo proteinov lize drugih kolicinov skupine E. Regulacija s CsrA zagotavlja, da po indukciji odziva SOS pri populacijah s temi kolicini ne pride do predčasnega propada celic zaradi prevelike sinteze proteina Lys (Yang in sod., 2010).

2.6.3.2 Avtoregulacija izražanja kolicinskega operona z njegovimi produkti

Avtoregulacija translacije s proteinom imunosti je bila predlagana za operon kolicina E7. Dimer ImmE7 naj bi imel RNazno aktivnost, ki cepi lastno policistronsko mRNA v sekundarni strukturi kodirajoče regije gena *cE7i* in tako inducira razgradnjo 5' konca mRNA gena *cE7a* ter hkrati prepreči translacijo 3' konca mRNA gena *cE7l*. Ker se ImmE7 sintetizira konstitutivno, je proteina imunosti dovolj, da s kontrolo translacije vzdržuje sintezo proteina lize pod letalno koncentracijo ob kratkotrajni indukciji odziva SOS. Ob dolgotrajni SOS indukciji količina dimera ImmE7 ni več zadostna in zato zvišanje ravni izražanja gena *cel* povzroči lizo celic (Hsieh in sod., 1997).

Izgleda, da tudi proteini lize igrajo vlogo v izražanju pripadajočih kolicinov in v lastnem izražanju. Cavard (1997) je pokazal, da bi protein lize kolicina A lahko imel vlogo aktivatorja transkripcije lastnega kolicinskega operona in tako samega sebe. Predlagal je tudi, da bi ta regulacija lahko bila skupna vsem proteinom lize (Cavard, 1997). Podobna vloga regulacije s proteinom lize je bila predlagana za izražanje

operona kolicina E8, kjer je zaradi prisotnosti transpozona v genu lize bila signifikantno zmanjšana sinteza kolicina E8 (Lawrence in James, 1984).

Nekateri kolicini so sposobni avtoinducirati izražanje kolicinskega operona zaradi indukcije odziva SOS v bližnjih občutljivih celicah. Za DNazni kolicin E2 so ugotovili, da ne samo v občutljivih celicah, ampak tudi v proizvodnih celicah stimulira omejeno aktivacijo odziva SOS zaradi povzročitve zarez v DNA. Razlog bi naj bil, da je proteina imunosti premalo, da bi preprečil omejeno endonukleazno aktivnost. Ga je pa še vedno dovolj, da prepreči letalni učinek (Pugsley, 1983). Za DNazni kolicin E9 je bilo ugotovljeno, da inducira odziv SOS v tretiranih celicah *E. coli*, medtem ko ga 16S rRNaza E3 ni inducirala (Walker in sod., 2004; Vankemmelbeke in sod., 2005). Abraham in sod. (2011) so pri preučevanju vpliva supernatantov, ki so vsebovali DNazne kolicine E2, E7 in E8, RNazne kolicine E3, E4, E5, E6 in D ter porotvorne kolicine A, B, E1, Ia in Ib na indukcijo odziva SOS v sevu *E. coli* ugotovili, da le DNazni kolicini inducirajo odziv SOS (Abraham in sod., 2011). Dokazano je bilo, da kolicin E2 in E7 inducirata transkripcijo en drugega, ravno na račun indukcije odziva SOS (Majeed in sod., 2011).

2.7 EVOLUCIJA KOLICINOV IN PLAZMIDOV pCol

Kolicinogene celice imajo lahko zapis za 2 kolicina na enem plazmidu (kolicin B in M) (Šmarda in Šmajš, 1998), ali dodatne gene za protein imunosti. Tako imata operona kolicinov E3 in E6 na plazmidih pColE3-CA38 in pColE6-CT18 še dodatni gen za protein imunosti proti kolicinu E8 (Chak in James, 1984; Masaki in Ohta, 1985; Akutsu in sod., 1989). Prav tako imajo lahko proizvodne celice hkrati zapis za več različnih plazmidov pCol, katerih selekcija je določena z inkompatibilnostnimi skupinami (Šmarda in Šmajš, 1998). Te ugotovitve kažejo na možnost intra- in intergenskih rekombinacij med evolucijo kolicinskih genov in celih plazmidov pCol in na skupni izvor in evolucijo kolicinskih operonov (Watson in sod., 1985; Riley, 1993a). Evolucijska diferenciacija genov za kolicine, proteine imunosti in lize, kot tudi evolucija samih plazmidov pCol, je posledica mutacij, transpozicij in rekombinacij (Riley, 1993a; James in sod., 1996). Analiza zaporedij citotoksičnih domen ni pokazala nobenih sorodnosti z znanimi celičnimi proteini in izgleda, da kolicini izvirajo neodvisno od njih (Braun in sod., 1994). Tudi proteini lize imajo zelo podobno AK sestavo, kar prav tako kaže na njihov skupni izvor (Riley, 1993a; Braun in sod., 1994).

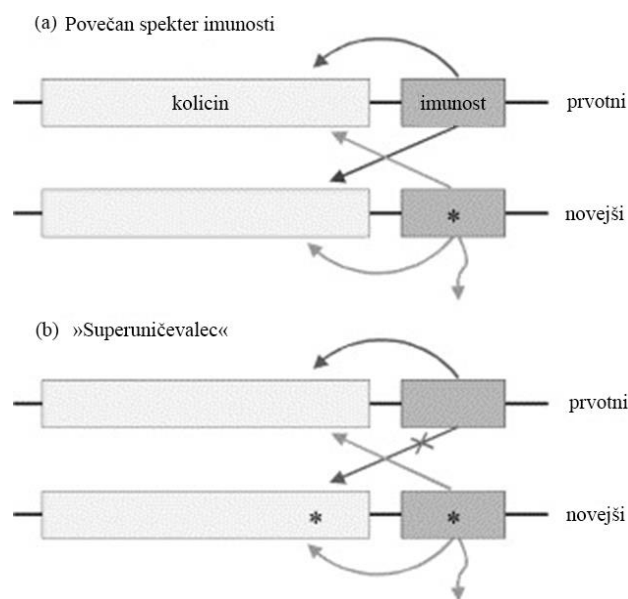
Na podlagi študij DNA in proteinskih zaporedij (Riley, 1993a; Braun in sod., 1994), eksperimentalne evolucije in matematičnega modeliranja (Cascales in sod., 2007) sta bila predlagana dva primarna načina evolucije kolicinov: pozitivna selekcija in rekombinacija (Tan in Riley, 1997). Ta delita kolicine na dve glavni evolucijski liniji, ki razlikujeta kolicine po načinu delovanja na porotvorne in nukleazne (Riley, 1993a).

2.7.1 Evolucija z rekombinacijo

Porotvorni kolicini se pojavljajo pogosteje kot nuklezni kolicini. Različni porotvorni kolicini naj bi se razvijali z rekombinacijami, saj si zaporedja DNA delijo eno ali več regij z veliko podobnostjo. Pojavljajo se pasovi podobnih in različnih zaporedij, vendar podobnost celotnega proteinskega zaporedja redko preseže 40 %. Pogosto ti različni pasovi predstavljajo različne funkcionalne domene in mešanje domen z rekombinacijo je odgovorno za nastanek novih kolicinov (Riley, 1998).

2.7.2 Evolucija s selekcijo

Drugi način evolucije je odgovoren za trenutno raznolikost nukleaznih kolicinov. Ti kolicini si delijo nedavnega skupnega prednika. Njihova zaporedja DNA so 50 do 97 % podobna, vendar pa kažejo številni kolicini večjo raznolikost v delu vezave proteina imunosti. Ta različnost izhaja iz procesa v dveh korakih, mutacije in pozitivne selekcije (Slika 9) (Riley, 1993a; Tan in Riley, 1997), ki omogoči nastanek novih funkcij imunosti in delovanja. Najprej pride do mutacije v genu imunosti, kar omogoči proizvajalskemu sevu s to mutacijo razširjeno imunost. Še vedno je imun proti kodirajočemu kolicinu, hkrati pa pridobi imunost proti podobnim kolicinom. Razširjena imunost poveča sposobnost preživetja proizvajalskega seva v populaciji z večimi kolicini (Riley in Gordon, 1992; Gordon in sod., 1998). V nadaljevanju nastane mutacija v kolicinskem genu, ki odgovarja mutaciji v genu za protein imunosti. Tako nastanejo novi kolicini, proti katerim prvotni sev ni več imun, in zaradi velike selektivne prednosti tak sev lahko hitro nadomesti prvotnega (Riley in Wertz, 2002a). Opisani proces nastajanja novih kolicinov se ponavlja in nastane družina ozko sorodnih proteinov, ki se najbolj razlikuje v regiji vpleteni v vezavo imunosti in delovanja, kot je vidno pri nukleaznih kolicinih (Riley, 1993b).



Slika 9: Hipoteza o evoluciji s selekcijo vključuje dva koraka v nastanku nove imunosti. (a.) Točkovna mutacija v genu proteina imunosti (zvezdica) omogoči širšo imunost: pred prvotnim, lastnim in ozko sorodnim kolicinom (sive puščice), medtem ko prvotni protein imunosti ščiti le pred lastnim in novim kolicinom (črne puščice). (b.) Nato se pojavi mutacija v delu kolicinskega gena (druga zvezdica), vpletenem v vezavo s proteinom imunosti in nastane »superuničevalec«. Novi sev je imun proti lastnemu kolicinu, prvotnemu in drugim, vendar predhodni sev na novi kolicin ni več imun (označeno z x) (Riley in Wertz, 2002a: 360).

Figure 9: The hypothesis of diversifying selection invokes two steps in the generation of a novel immunity function. (a.) A point mutation in the immunity gene (asterisk) generates a broadened immunity function: immunity to its own producer, its ancestor, and to other closely related colicin producers (marked with gray arrows). The ancestral colicin encoding strain is immune to its colicin and to the evolved colicin (noted with black arrows). (b.) A paired mutation occurs in the immunity-binding portion of the evolved colicin gene that generates a »super-killer« (a second asterisk). The evolved strain is immune to itself, its ancestor, and other colicins. However, the ancestral strain is now no longer immune to the evolved strain (noted with x) (Riley in Wertz, 2002a: 360).

2.7.3 Evolucija kolicina M

Kolicin M je edini kolicin, ki inhibira sintezo celične stene. Analiza nt zaporedja kolicina je pokazala podobnost regije kolicina M, ki ji je pripisana fosfatazna aktivnost, s štirimi bakteriocini patogenih bakterij vrst rodu *Pseudomonas* in *Burkholderia*, katerih odprti bralni okvirji so homologni kolicinu M (Zeth in sod., 2008). Osrednja in N-terminalna domena nista podobni tistim homolognih bakteriocinov, kar potrjuje, da imajo različne bakterijske vrste drugačne sisteme za vstop v celice. Različna stopnja podobnosti med receptorskimi in translokacijskimi in fosfataznimi domenami podpira hipotezo, da so se kolicini razvili s horizontalnimi genskimi prenosi plazmidov in izmenjavami funkcijskih domen (Roos in sod., 1989; Braun in sod., 2002; Zeth in sod., 2008). Fosfatazna domena je nastala iz enega predniškega gena, ki je bil združen z drugačno receptorsko in translokacijsko domeno (Zeth in sod., 2008).

2.8 EKOLOGIJA KOLICINOV

Ekološka vloga kolicinov še vedno ni jasna, zato se raziskavam tega posveča veliko pozornosti. Produkcija substanc s protimikrobnimi lastnostmi, kot so kolicini, je eden od številnih mehanizmov, ki omogočajo bakterijam, da se odzovejo na izzive okolja. (Campbell, 1981). Najboljši dokaz za njihovo ekološko vlogo je velika pogostnost kolicinogenih sevov v naravnem okolju, kar kaže, da so pomemben dejavnik v populacijski dinamiki in ohranjanju mikrobne pestrosti (Czárán in sod., 2002; Kerr in sod., 2002). Kolicini so pomembni v kompetitivnih interakcijah članov mikrobne združbe, saj omogočijo vdor seva v vzpostavljeno mikrobno združbo in preprečujejo vdor sevov drugih vrst v zasedeno nišo in omejujejo napredovanje bližnjih celic (Dykes, 1995; Gordon in Riley, 1999). Ker je delovanje kolicinov omejeno na iste ali zelo sorodne vrste, imajo verjetno večji pomen v znotrajvrstnih kot medvrstnih kompetitivnih interakcijah bakterij (Czárán in sod., 2002; Majeed in sod., 2011).

Populacijske študije kažejo, da velik del bakteriocinogenih sevov *E. coli* proizvaja več kot en tip bakteriocinov. Proizvodnja več bakteriocinov zagotavlja, da imajo ti sevi širši razpon delovanja, saj lahko sev z dvema kolicinoma uniči občutljivi sev in tistega, ki ima zapis za samo enega od teh dveh, ker ni imun proti drugemu kolicinu. Poleg tega ima tak sev kompetitivno prednost pod različnimi okoljskimi pogoji (Gordon in O'Brien, 2006).

Od 30 do 50 % človeških izolatov sevov *E. coli* je kolicinogenih, vendar je malo znanega o dejavnikih, ki določajo pogostost kolicinogenosti v naravnih populacijah. Študije kažejo, da je kolicinogenost veliko pogostejša med patogenimi kot komezalnimi izolati in je bolj razširjena med človeškimi (50 %) kot živalskimi izolati (16 %) (Riley in Gordon, 1992). Ni jasno ali je kolicinogenost samostojen neodvisni dejavnik patogenosti ali je marker povezan z drugimi dejavniki virulence. Veliko patogenih sevov ima tudi zapise za kolicine, npr. kolicin V (sedaj klasificiran kot mikrocin B), ki ima na plazmidu še zapis za virulentne dejavnike, kot so prevzem železa ter povečano odpornost proti serumu in fagocitozi (Waters in Crosa, 1991). Poleg tega je bila opisana povezava med kolicinogenostjo in patogenezo pri uropatogenih sevih *E. coli* (O'Brien in sod., 1996; Šmajš in sod., 2010).

2.8.1 Modeli znotrajvrstne populacijske dinamike

Na osnovi teoretičnih in praktičnih študij so bili opredeljeni pogoji za ohranjanje kolicinogene bakterije v bakterijski združbi. Chao in Levin (1981) sta pokazala, da je možnost vdora kolicinogenega seva v prostorsko strukturiranem okolju veliko večja kot v nestrukturiranem (Chao in Levin, 1981). V nestrukturiranem okolju, kot je dobro premešano tekoče gojišče, majhna populacija producentov ne more vdreti v vzpostavljeno populacijo občutljivih celic, ker imajo energijsko breme dodatnega zapisa

in letalnost produkcije. Hranila, pridobljena z uničenjem občutljivih bakterij, so razporejena naključno in dostopna vsem bakterijam. Producent izumre, ker je hitrost rasti občutljivih celic kljub uničenju dela populacije še vedno večja kot pri producentu, ki nosi breme produkcije (Nakamaru in Iwasa, 2000). Če je okolje fizično strukturirano, kot na agarški plošči, kolicin difundira iz proizvajalske kolonije in uniči občutljive bližnje bakterijske celice. Hranila tako postanejo dostopna producentu, ki se lahko številčno poveča, tudi če ga je bilo na začetku malo (Kerr in sod., 2002).

Poskusi matematičnega modeliranja so vpeljali poleg proizvajalskega in občutljivega še odporen sev, ki ne proizvaja kolicina (Durrett in Levin, 1997; Nakamaru in Iwasa, 2000). Nastala je hipoteza o interakcijah med temi tremi sevi po pravilih igre »kamen-škarje-papir«. Pri tem je proizvajalski sev uspešnejši od občutljivega, saj je le-ta inhibiran zaradi kolicina. Občutljivi sev je uspešnejši od odpornega, katerega energijski strošek je večji kot pri občutljivem zaradi porabe energije za zagotovitev imunosti ali počasnejše rasti zaradi okvar v sistemu translokacije kolicina in zmanjšanja možnosti pridobivanja esencialnih hranil. Odporni sev pa je uspešnejši od proizvajalskega, ker je strošek odpornosti manjši kot strošek produkcije in sproščanja bakteriocina. V nestrukturiranem okolju ta medsebojna nadvlada omogoča, da v periodičnih ciklih obstajajo vsi trije tipi, nedoločen čas, v spreminjajoči pogostosti. V strukturiranem okolju pa se pojavi navidezno stabilno globalno ravnovesje v katerem je delež vseh treh sevov skoraj konstanten (Lenski in Riley, 2002). Kolicini v naravnem okolju, kjer dobro premešanih (nestrukturiranih) sistemov praktično ni, mikrobnost raznolikost povečujejo po modelu »kamen-škarje-papir« (Kerr in sod., 2002). To dinamično pojavno proizvajalskega, občutljivega in odpornega seva je potrdila tudi *in vivo* študija na mišjem debelem črevesu (Kirkup in Riley, 2004).

Vsi navedeni modeli in eksperimentalni testi so bili omejeni na populacije z enim proizvajalskim sevom enega kolicina. Zato so Czárán in sod. (2002) v model »kamen-škarje-papir« vključili še dejstvo, da v sistemu obstaja več različnih kolicinov in dodal učinek evolucije, ki omogoča veliko raznolikost znotraj vrste. Po tem modelu veliko kolonij ne proizvaja kolicina, številne proizvajajo enega, nekaj pa več. Vse kolonije so odporne proti večini ali vsem kolicinom. To stanje je doseženo, če se sistem začne z dovolj raznolikosti, da že večina kolonij proizvaja več kolicinov in je odpornih proti več kolicinom (Czárán in sod., 2002). Številne populacijske študije kažejo, da je produkcija kolicinov v naravnih populacijah podobna napovedim tega modela. Od 10 do 50 % sevov *E. coli* je kolicinogenih. Odporni sevi so še bolj pogosti, 50 do 98 %, in večina je odpornih proti vsem najdenim kolicinom. Le majhna populacija celic je občutljivih (Gordon in sod., 1998). Model napoveduje takšno razporeditev fenotipov kot posledico pogostih horizontalnih prenosov rezistenc in velikega bremena produkcije kolicinov ali z drugimi besedami, izguba produkcije kolicina in pridobitev odpornosti omogoča večjo uspešnost (Czárán in sod., 2002).

2.9 UPORABA KOLICINOV IN OBETI

Kolicini in njihovi zapisi se že vrsto let uporabljajo v biotehnologiji in molekularni biologiji ter so neprecenljivo orodje za študije celičnih funkcij. Raziskave iznosa kolicinov iz proizvajalske celice in vstopa v občutljivo celico omogoča sledenje molekularnih mehanizmov teh procesov, pomembnih tudi za razvoj novih zdravil (Šmarda in Šmajs, 1998). Bakteriocini zaradi svojega protimikrobnega delovanja kažejo velik potencial za uporabo v medicini in živilski industriji, tako kot antibiotiki, sevi, ki jih proizvajajo pa kot probiotiki (Šmarda in Šmajs, 1998; Riley in Wertz, 2002b; Gillor in sod., 2005; Diez-Gonzalez, 2007; Gillor in sod., 2008a).

2.9.1 Kolicini kot laboratorijska orodja

Plazmid pColE1 je bil eden prvih vektorjev za kloniranje izdelanih na začetku dobe genetskega inženiringa leta 1974 (Hershfield in sod., 1974). Zaporedje *ori* plazmida pColE1 je pogosto uporabljeno za razvoj plazmidov v velikem številu kopij (Armstrong in sod., 1977).

Kolicin so uporabili tudi v poskusu bioremediacije, kjer so kolicinsko aktivnost uporabili v naravnem okolju za kontrolo in ustavitev širjenja rekombinantne bakterije *Pseudomonas putida* z biotehnološko lastnostjo razgradnje toluena. Gen za kolicin E3 so vstavili pod strogo nadzorovano uravnava izražanja v kromosom *P. putida*, tako da pride do indukcije kolicina E3, ko ni toluena; zato so bakterije uničene le, ko je toluen popolnoma razgrajen. Tehnika je obetajoča za produkcijo samomorilskih vektorjev z genom za kolicin na plazmidu in za njegovo imunost v kromosomu (Munthali in sod., 1996). Sevi s fuzijami promotorjev kolicinskih genov z *gfp* pa se uporabljajo kot celični biosenzorji za genotoksičnost z detekcijo povečanja aktivnosti promotorjev pri tretiranju z genotoksičnimi dejavniki. Test s promotorjem kolicina D je veliko bolj občutljiv in daje višji odziv kot drugi promotorji *sulA*, *recA*, *umuDC* odziva SOS (Norman in sod., 2005; Abraham in sod., 2011).

V biotehnologiji se sistem Tol, kolicini in protein lize uporabljajo za izboljšanje čiščenja proteinov, za produkcijo stabilnih in topnih proteinov v supernatantu (Wan in Baneyx, 1998; Anderluh in sod., 2003). Inducibilna produkcija proteina lize omogoča sproščanje velikega števila topnih in stabilnih rekombinantnih periplazemskih in citoplazemskih proteinov v zunajcelični medij (van der Wal in sod., 1995).

2.9.2 Kolicini v zdravstvu in živalih

Zaradi pretirane uporabe širokospektralnih antibiotikov prihaja do večanja in širjenja rezistenc v patogenih in komenzalnih bakterijah (Neu, 1992; Walker in Levy, 2001). Še posebej so pogoste rezistence pri vrstah družine *Enterobacteriaceae* (Lautenbach in sod., 2001; Paterson, 2006; Kumarasamy in sod., 2010). Zato se v zadnjem času posveča velika pozornost razvoju alternativnih antibiotikov v živalih za zdravljenje in preprečevanje bakterijskih infekcij, ki bi zmanjšale širjenje rezistenc proti antibiotikom. Eno možnost predstavljajo kolicini in ostali bakteriocini zaradi relativno ozkega spektra delovanja (Gillor in sod., 2004) in možnostjo izboljšanja njihove aplikacije in delovanja z genetskim inženiringom (Gillor in sod., 2005).

Zelo razširjena in preučevana je ideja o uporabi kolicinov v živalih. Svinje, govedo in perutnina so lahko okuženi s številnimi enteropatogenimi bakterijami, ki lahko pri živalih in ljudeh povzročijo črevesne in zunajčrevesne okužbe. Te okužbe se širijo s hrano in okuženo vodo, zato živali potrebujejo protimikrobno terapijo. Primer uporabe različnih kolicinov v *in vitro* poskusih je uspešno zaviranje virulentne enterohemoragične *E. coli* O157:H7 v govedu, ki je njen največji rezervoar (Jordi in sod., 2001). S proizvodnjo šigovih toksinov je glavni vzrok za pojav hemoragičnega kolitisa in hemoragičnega uremičnega sindroma pri ljudeh. Ob uporabi klasičnih antibiotikov se poveča tudi sproščanje šigovih toksinov, kar še poveča bakterijsko virulenco in povzroča dodatne težave (Walterspiel in sod., 1992). *In vivo* raziskave kažejo, da vsakodnevno dodajanje kolicinogenega seva z zapisom za ColE7 krmi, zmanjša kolonizacijo in fekalno razširjanje enterohemoragične *E. coli* O157:H7 med govedom (Schamberger in sod., 2004; Diez-Gonzalez, 2007). Predlagana je bila uporaba kolicina kloniranega v krmi, zato so razvili transgeno koruzo sposobno izražanja kolicina E7, kar kaže, da so za protimikrobno uporabo kolicini lahko klonirani v rastline (Schamberger in sod., 2004). Kolicin B in E se prav tako komercialno uporabljata za preventivo in zdravljenje patogenih sevov *E. coli* v novorojenih svinjah in žrebetih (Gillor in sod., 2005). *In vitro* so dokazali, da kolicinogeni sevi zavirajo tudi seve vrste *Salmonella* (Zihler in sod., 2009).

Zaradi protimikrobnih lastnosti in relativno ozkega razpona delovanja bi lahko kolicine uporabljali v zdravstvu za zatiranje specifičnega bakterijskega patogena in zaviranje bakterij odpornih proti več antibiotikom. Posledično kolicini predstavljajo manjšo nevarnost za komenzale in mikrobioto kot širokospektralni antibiotiki (Riley in Wertz, 2002b). Kolicine bi lahko uporabljali tudi pri preprečevanju kolonizacije katetrov z uropatogenimi sevi *E. coli* (Trautner in sod., 2005). Za nekatere kolicine so potrdili tudi protitumorski učinek tako *in vitro* kot *in vivo*, zato bomo morda v prihodnosti kolicine lahko uporabili tudi pri zdravljenju nekaterih tipov tumorjev (Farkas-Himsley in Cheung, 1976; Šmarda in sod., 1978; Šmarda, 1983; Chumchalova in Šmarda, 2003; Lancaster in sod., 2007).

2.9.2.1 Uporaba kolicina M

Kolicin M je edinstven kolicin, ki hidrolizira peptidoglikanski prekursor lipid II (Cascales in sod., 2007). V genomih nekaterih patogenih vrst rodu *Pseudomonas* in *Burholderia* so opisani geni, ki kodirajo proteine z zelo podobno C-terminalno regijo kot pri kolicinu M. *In vitro* testi so pokazali, da cepijo lipid II na isti poziciji kot ColM. Kot kolicini imajo ozek spekter delovanja na sorodne vrste zaradi koriščenja receptorjev in translokacijskih mehanizmov, ki so lahko vrstno specifični (Barreteau in sod., 2009). Dejstvo, da je lipid II esencialen za rast in najden v vseh bakterijah, je odprlo pot k razmišljanju o izkoriščanju ColM in njegovih ortologov kot širokospektralnih antibiotikov. Predpogoj za to je dostop do lipida II iz zunanje strani citoplazemske membrane v odsotnosti transporterjev in hidroliza heterologov lipida II ne glede na medvrstne strukturne variacije. Dokazano je, da ima sama katalitična domena ColM veliko večjo katalitično aktivnost pri *E. coli* kot cel protein in da za vstop in aktivacijo ne potrebuje drugega proteina (Barreteau in sod., 2010). Poleg tega je bilo dokazano *in vitro*, da ColM lahko hidrolizira različice lipida II Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterij, vendar učinka na Gram pozitivne bakterije *in vivo* ni bilo, verjetno zaradi debelejšega sloja peptidoglikana (Patin in sod., 2012). Zaradi načina delovanja in zmožnosti hidrolize lipida II strukturnih različic peptidoglikanov bakterij se ColM smatra za odličnega kandidata za razvoj nekonvencionalnih protibakterijskih agensov, ki bi jim s proteinskim inženiringom lahko omogočili dostop do zunanje strani citoplazemske membrane Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterij (Barreteau in sod., 2012; Patin in sod., 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Laboratorijski sevi bakterije *Escherichia coli*

Preglednica 2: Laboratorijski sevi *E. coli*.

Table 2: Laboratory *E. coli* strains.

sev	genotip in lastnosti	vir
DH5 α	Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen Life Technologies, ZDA
RW118	<i>thr-1 araD139</i> Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>lacY1 tsx-33 supE44 galK2 hisG4 rpsL31 xyl-5 mtl-1 argE thi-1 sulA211</i>	R. Woodgate
RW464	RW118 <i>recA</i>	R. Woodgate
RW542	RW118 <i>lexA51</i> (Def)	R. Woodgate
BL21(DE3)	F^- <i>dcm lon ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i> λ (DE3) Sev ima v gen <i>int</i> vstavljen gen za RNA polimerazo faga T7, ki je pod kontrolo promotorja <i>lacUV5</i> in represorja <i>lacI</i> . Za indukcijo izražanja RNA polimeraze T7 je uporabljen IPTG. Sev omogoči visoko učinkovito sintezo proteinov in enostavno indukcijo katerega koli gena, ki je pod kontrolo T7 promotorja in ima ribosomsko vezavno mesto. Nima <i>lon</i> proteaze in <i>ompT</i> proteaze zunanje membrane, ki lahko razgradita proteine med izolacijo.	G. Anderluh
BL21(DE3) pLysS	Sev BL21(DE3) s plazmidom pLysS, ki ima zapis za lizocim faga T7, inhibitorja polimeraze T7, ki zmanjša oz. odpravi nespecifično izražanje tarčnega gena pod kontrolo T7 promotorja, na katerega se veže RNA polimeraza T7 na transformiranem plazmidu, ko ni indukcije.	G. Anderluh
ENZ1257	fuzija <i>sulA-lacZ</i> na kromosomu	Moreau, 2004
MG1655	F^- <i>lambda- ilvG- rfb-50 rph-1</i>	laboratorijska zbirka Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov
MG1655 U-66	MG1655 s pSC101 brez lastnega promotorja	Zaslaver in sod., 2006
CL127	<i>trp^- pro^- phe^- his^- nal^R Hy^- ex^- Tn^3 (Ap^R) pHly152-T8</i>	W. Goebel
BW25113	F^- Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), <i>lambda^-</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba in sod., 2006
JW2515	BW25113 Δ <i>iscR</i>	Baba in sod., 2006
JW3721	BW25113 Δ <i>asnC</i>	Baba in sod., 2006
JW5567	BW25113 Δ <i>yihW</i>	Baba in sod., 2006

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 2: Laboratorijski sevi *E. coli*.

sev	genotip in lastnosti	vir
JW3386	BW25113 Δ <i>glpR</i>	Baba in sod., 2006
JW0824	BW25113 Δ <i>deoR</i>	Baba in sod., 2006
JW0494	BW25113 Δ <i>allR</i>	Baba in sod., 2006
JW2676	BW25113 Δ <i>srlR</i>	Baba in sod., 2006
JW1149	BW25113 Δ <i>ycgE</i>	Baba in sod., 2006
JW1586	BW25113 Δ <i>dgsA</i>	Baba in sod., 2006
JW2947	BW25113 Δ <i>glcC</i>	Baba in sod., 2006
JW1759	BW25113 Δ <i>ydjF</i>	Baba in sod., 2006
JW5698	BW25113 Δ <i>frlR</i>	Baba in sod., 2006
JW2776	BW25113 Δ <i>fucR</i>	Baba in sod., 2006
JW2088	BW25113 Δ <i>yegW</i>	Baba in sod., 2006
JW0142	BW25113 Δ <i>sfsA</i>	Baba in sod., 2006
JW5946	BW25113 Δ <i>gntR</i>	Baba in sod., 2006
JW3579	BW25113 Δ <i>lldR</i>	Baba in sod., 2006
JW0719	BW25113 Δ <i>mngR</i>	Baba in sod., 2006
JW5114	BW25113 Δ <i>ybjK</i>	Baba in sod., 2006
JW3368	BW25113 Δ <i>ompR</i>	Baba in sod., 2006
JW2642	BW25113 Δ <i>ygaV</i> (ali <i>hlyU</i>)	Baba in sod., 2006
JW2092	BW25113 Δ <i>rcnR</i> (ali <i>yohL</i>)	Baba in sod., 2006
JW3468	BW25113 Δ <i>arsR</i>	Baba in sod., 2006
JW2705	BW25113 Δ <i>ygbI</i>	Baba in sod., 2006
JW0612	BW25113 Δ <i>citB</i> (ali <i>dpiA</i>)	Baba in sod., 2006
JW3883	BW25113 Δ <i>cpxR</i>	Baba in sod., 2006
JW5627	BW25113 Δ <i>dgoR</i>	Baba in sod., 2006
JW0797	BW25113 Δ <i>dps</i>	Baba in sod., 2006
JW0980	BW25113 Δ <i>torR</i>	Baba in sod., 2006
JW2644	BW25113 Δ <i>stpA</i>	Baba in sod., 2006

3.1.1.2 Kolicinogeni sevi bakterije *Escherichia coli* Pugsleyeve zbirke

Preglednica 3: Kolicinogeni sevi Pugsleyeve zbirke.

Table 3: Colicinogenic strains from Pugsley's collection.

sev	plazmid	zapis za kolicin
BZB2103	bakterijski sev K-12 s pColD-CA23	D
BZB2125	bakterijski sev K-12 s pColE2-P9 Nal ^r	E2
BZB2108	bakterijski sev K-12 s pColE5-099	E5
BZB2109	bakterijski sev K-12 s pColE6-CT14 Nal ^r	E6
BZB2110	bakterijski sev K-12 s pColE7-K317	E7
BZB2116	bakterijski sev K-12 s pColK-K235	K
PAP1	bakterijski sev K-12 s pCHAP1	M
PAP247	bakterijski sev K-12 s pPC101	E8-J

3.1.2 Plazmidi

Preglednica 4: Plazmidi.

Table 4: Plasmids.

plazmid	pomembne lastnosti	vir
pJET1.2	Majhen plazmid (2974 bp), izpeljanka pUC19 z Ap ^r . Plazmid ima gen <i>eco47IR</i> za restrikcijsko endonukleazo, ki razgradi gostiteljsko DNA. V zaporedje gena <i>eco47IR</i> je vstavljeno poliklonsko mesto in vstavitev DNA fragmenta prekine zapis za restrikcijsko endonukleazo. Mehanizem služi za selekcijo transformant, ki so prejele plazmid z vključkom DNA. Plazmid je primeren za vstavljanje fragmentov z lepljivimi in topimi konci.	Fermentas, Litva
pET8c	Plazmidni vektor za izražanje genov pET8c omogoča visoko raven izražanja rekombinantnih proteinov pod kontrolo promotora T7. Vektor na N-terminalni del vstavljenega gena vpelje Met, 6 His in 2 Ser. His-tag omogoča enostavno izolacijo rekombinantnih proteinov z uporabo nikljeve afinitetne kromatografije.	G. Anderluh
pColM-imm	Vektor za izražanje genov pET8c z vstavljenima genoma <i>cma</i> in <i>cmi</i> za izolacijo kolicina M.	M. Rijavec
pBR322	Plazmid v velikem številu kopij, Tc ^r , Ap ^r .	laboratorijska zbirka Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov
pATC400	Izpeljanka plazmida pBR322 z <i>rcaA</i> ⁺ . Dodatna produkcija pozitivnega regulatorja kolanske kisline RcsA ⁺ omogoči konstitutivno produkcijo kolanske kisline in mukoidni fenotip. RcsA je sicer zelo hitro razgrajen s proteazo Lon in sev z dodatno produkcijo RcsA ⁺ poveča število tarč za Lon.	S. Gottesman
pColK-JA533	<i>cka cki ckl</i>	Kuhar in Žgur-Bertok, 1999
pKCT1	pColK-JA533 z vstavljenim fragmentom <i>TaqI</i> plazmida pUC19 z Ap ^r	Mulec in sod., 2003
pKCT2	pKCT1 z vstavljenim <i>KpnI</i> mestom v začetku <i>cka</i>	Mulec in sod., 2003
pKCT3	pKCT2 s <i>cka-gfp</i> z Ap ^r , Km ^r	Mulec in sod., 2003
pKCT4	pColK-JA53 s <i>cki-gfp</i> , Km ^r	Mulec in sod., 2003
pKCT10	pKCT2 s <i>cka-rfp</i> (<i>DsRed-Express2</i>), Ap ^r	Kamenšek in sod., 2010
pDsRed-Express2-N1	plazmid z <i>rfp</i> (<i>DsRed-Express2</i>) s poročevalskim genom, Km ^r	B. Glick
izpeljanka pSC101	plazmid v majhnem številu kopij s poročevalskim genom <i>gfp</i> (<i>GFPmut3</i>) brez lastnega promotora, Km ^r	U. Alon
pSC200	izpeljanka pSC101 z <i>lexA-gfp</i> , Km ^r	Ronen in sod., 2002
pSC202	izpeljanka pSC101 z <i>umuD-gfp</i> , Km ^r	Ronen in sod., 2002

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 4: Plazmidi.

plazmid	pomembne lastnosti	vir
pSC304	izpeljanka pSC101 s <i>cmgfp</i> , Km ^r fragment <i>cmg</i> vključuje 205 bp navzgor od start kodona, ter 95 bp navzdol od start kodona	Kamenšek in sod., 2010
pHly152-T8	konjugativni plazmid s Tn3 z Ap ^r	Noegel in sod., 1981
pColD-CA23	<i>cda cdi cdl</i>	A. P. Pugsley
pColE2-P9	<i>ce2a ce2i ce2l</i>	A. P. Pugsley
pColE5-099	<i>ce5a ce5i ce5l</i>	A. P. Pugsley
pColE6-CT14	<i>ce6a ce6i ce6l</i>	A. P. Pugsley
pColE7-K317	<i>ce7a ce7i ce7l</i>	A. P. Pugsley
pCHAP1	<i>cmg cmi</i>	A. P. Pugsley
pPC101	<i>ce8a ce8i ce8l</i>	A. P. Pugsley
pColD-Tn3	pColD-CA23 s Tn3 z Ap ^r	S. Kamenšek
pColE2-Tn3	pColE2-P9 s Tn3 z Ap ^r	S. Kamenšek
pColE5-Tn3	pColE5-099 s Tn3 z Ap ^r	S. Kamenšek
pColE6-Tn3	pColE6-CT14 s Tn3 z Ap ^r	S. Kamenšek
pColE7-Tn3	pColE7-K317 s Tn3 z Ap ^r	B. Jerman
pColE8-Tn3	pPC101 s Tn3 z Ap ^r	S. Kamenšek
pRW50	vektor s poročevalskim genom <i>lacZ</i> brez lastnega promotorja, za vstavljanje promotorjev na <i>EcoRI-HindIII</i> mestih; ima RK2 mesto začetka podvojevanja, Tc ^r	Lodge in sod., 1992
pRW50 <i>ce2a</i>	pRW50 s promotorjem gena <i>ce2a</i>	S. Kamenšek
pRW50 <i>ce5a</i>	pRW50 s promotorjem gena <i>ce5a</i>	S. Kamenšek
pRW50 <i>ce6a</i>	pRW50 s promotorjem gena <i>ce6a</i>	S. Kamenšek
pRW50 <i>ce7a</i>	pRW50 s promotorjem gena <i>ce7a</i>	S. Kamenšek
pRW50 <i>ce8a</i>	pRW50 s promotorjem gena <i>ce8a</i>	S. Kamenšek
pRW50 <i>cda</i>	pRW50 s promotorjem gena <i>cda</i>	S. Kamenšek
pRW50 <i>cka</i>	pRW50 s promotorjem od -256 do +85 gena <i>cka</i> iz pKCT1	Butala in sod., 2012
pRW50 <i>cka1</i>	pRW50 z <i>EcoRI-HindIII</i> promotorskim področjem <i>cka1</i> iz pUC57 <i>cka1</i>	Butala in sod., 2012
pRW50 <i>cka2</i>	pRW50 z <i>EcoRI-HindIII</i> promotorskim področjem <i>cka2</i> iz pUC57 <i>cka2</i>	Butala in sod., 2012
pRW50 <i>sulA1</i>	pRW50 z <i>EcoRI-HindIII</i> promotorskim področjem <i>sulA1</i> iz pUC57 <i>sulA1</i>	Butala in sod., 2012
pUC57 <i>cka1</i>	pUC57 z <i>EcoRI-HindIII</i> promotorskim področjem -256 do +85 gena <i>cka</i> , z ločenima zaporedjima SOS (zaporedje v Prilogi B), Ap ^r	M. Butala
pUC57 <i>cka2</i>	pUC57 z <i>EcoRI-HindIII</i> promotorskim področjem -256 do +85 gena <i>cka</i> , z ločenima in konsenznima zaporedjima SOS (zaporedje v Prilogi B), Ap ^r	M. Butala

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 4: Plazmidi.

plazmid	pomembne lastnosti	vir
pUC57 <i>sulA1</i>	pUC57 z <i>EcoRI-HindIII</i> promotorskim področjem od -272 do +58 gena <i>sulA</i> , z vstavljenim vezavnim mestom IscR promotorja <i>cka</i> TGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAATGC na mesto -52 do -22 (zaporedje v Prilogi B), Ap ^r	M. Butala
pRW50 <i>cka</i> p-44G	fragment promotorja <i>cka</i> iz pKCT1 z nt zaporedjem <i>cka</i> od -256 do +85 in substitucijama p-44G na mestu vezave IscR	Butala in sod., 2012

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)

Tekoče gojišče LB, ki vsebuje 25 g LB (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasnega ekstrakta) na 1 l destilirane vode, smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min.

3.1.3.2 Tekoče gojišče LB z dodanimi antibiotiki

Tekoče gojišče z antibiotiki smo pripravili enako kot tekoče gojišče LB, le da smo po avtoklaviranju in pred uporabo gojišču dodali ustrezno količino antibiotika.

Preglednica 5: Delovne koncentracije antibiotikov v gojišču LB.

Table 5: Final antibiotic concentrations in LB medium.

antibiotik	delovna koncentracija (µg/ml)
Ampicilin (Ap)	120
Kanamicin (Km)	50
Tetraciklin (Tc)	12,5
Streptomycin (Sm)	150
Nalidiksična kislina (Nal)	25

3.1.3.3 Trdno gojišče LB

Trdno gojišče LB vsebuje poleg 25 g LB še 15 g agarja v 1 l destilirane vode. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min, in ga po ohladitvi na 55 °C aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.3.4 Trdno gojišče LB z antibiotiki

Trdno gojišče z antibiotiki smo pripravili po enakem postopku kot smo pripravili trdno gojišče LB brez antibiotika, le da smo po avtoklaviranju in pred razlivanjem plošč v primerno ohlajeno gojišče (55 °C) dodali ustrezno količino antibiotika (Preglednica 5).

3.1.3.5 Mehki LB agar

Gojišče mehki LB agar vsebuje LB v koncentraciji 25 g/l in 6 g/l agarja v destilirani vodi. Pred avtoklaviranjem smo gojišče segreti v mikrovalovni pečici tako, da se je ves agar raztopil ter ga razpipetirali v epruvete po 4 ml. Avtoklavirali smo pri 121°C, 15 min.

3.1.4 Kemikalije

agarozna Ni-NTA	Qiagen, ZDA
absolutni alkohol	Merck, Nemčija
aceton	Roth, Nemčija
agar	DIFCO Laboratories, ZDA; Fluka, Švica
agarozna	Sigma, ZDA; Roth, Nemčija
ampicilin	Sigma, ZDA
Baza Tris	Sigma, ZDA
benzamidin	Sigma, ZDA
boroava kislina	Sigma, ZDA
bromfenol modro	Kemika, Hrvaška
BSA	Pierce, ZDA
β-merkaptotanol	Merck, Nemčija; Sigma, ZDA
CaCl ₂	Merck, Nemčija
D+glukoza	Kemika, Hrvaška
DNA virusa Lambda	Fermentas, Litva
ditiotreitrol (DTT)	Sigma, ZDA
dNTP	Fermentas, Litva
dNTP	Invitrogen Life Technologies, ZDA
dATP	Fermentas, Litva
dCTP	Fermentas, Litva
dGTP	Fermentas, Litva
dTTP	Fermentas, Litva
dUTP	Fermentas, Litva
etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	Sigma, ZDA
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	Invitrogen Life Technologies, ZDA
etanol 96-odstotni	Merck, Nemčija; Kefo, Slovenija

etidijev bromid	Sigma, ZDA
glicerol	Sigma, ZDA
glukoza	Kemika, Hrvaška
Hepes	Sigma, ZDA
HCl	Merck, Nemčija
HCl 1 N	Fluka, Švica
imidazol	Sigma, ZDA
IPTG	Roth, Nemčija
izopropanol	Merck, Nemčija,
India Ink barvilo	Becton, Dickinson and Company, ZDA
kanamicin	Roth, Nemčija
KCl	Merck, Nemčija
kloramfenikol	Sigma, ZDA
kloroform	Merck, Nemčija
kristal vijolično	Sigma, ZDA
LB	Sigma, ZDA; Roth, Nemčija
L-(-)-fukoza	Sigma, ZDA
lizocim	Sigma, ZDA; Merck, Nemčija
MgCl ₂	Fermentas, Litva; Merck, Nemčija
MgSO ₄	Merck, Nemčija
mitomicin C	Sigma, ZDA
NaCl	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
NaOH 1 N	Fluka, Švica
Na ₂ CO ₃	Merck, Nemčija
NaDS	Sigma, ZDA
Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	Merck, Nemčija
nalidiksična kislina	Sigma, ZDA
naključni oligonukleotidi	Invitrogen Life Technologies, ZDA
<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galaktopiranozid (ONPG)	Merck, Nemčija
poly-L-lizin	Sigma, ZDA
Roche complete protease inhibitor	Rosche, Nemčija
coctail tablet (EDTA free)	
saharoza	KEMIKA, Hrvaška
SOB	Roth, Nemčija
streptomycin	Sigma, ZDA
tetraciklin	Sigma, ZDA
TCA	Merck, Nemčija
Tris-HCl	Sigma, ZDA
Tris-EDTA pufer (100 ×)	Sigma, ZDA

Triton-X	Sigma, ZDA
Tween-20	Sigma, ZDA
voda, sterilna, brez nukleaz	Ambion, ZDA; Qiagen, ZDA; Sigma, ZDA
»GeneChip DNA Labeling Reagent«	Affymetrix, ZDA
»Contol Oligo B2, 3 nM«	Affymetrix, ZDA

3.1.5 Začetni oligonukleotidi

cma pF, cma pR	Jena Bioscience, Nemčija
Rd f, Rd r	Jena Bioscience, Nemčija
pJET1.2 Forward	Fermentas, Litva
colD beta F, colD beta R	Sigma, ZDA
colE2/E5/E6 beta F, col E2/E5/E6 beta R	Sigma, ZDA
colE7 beta F, colE7 beta R	Sigma, ZDA
colE8 beta F, colE8 beta R	Sigma, ZDA
Bio-Pull_F E8, Pull_R E8	Sigma, ZDA
Keio1Kn	Jena Bioscience, Nemčija
iscR P1	Sigma, ZDA
ckaPK	Jena Bioscience, Nemčija
asnC pre, yihW pre, glpR pre, deoR pre, allR pre, srlR pre, ycgE pre, dgsA pre, glcC pre, ydjF pre, frlR pre, fucR pre, gntR pre, lldR pre, mngR pre, ybjK pre, ompR pre, hlyU pre, yohL pre, arsR pre, dpiA pre, cpxR pre, dps pre, torR pre, stpA pre	Integrated DNA Technologies, ZDA
wzxC-F, wzxC-R; wza-F, wza-R; wcaD-F, wcaD-R; rcsA-F, rcsA-R; yjbE-F, yjbE-R; ycfJ-F, ycfJ-R; rprA-F, rprA-R; spy-F, spy-R; pspC-F, pspC-R; flgM-F, flgM-R; glnG-F, glnG-R; ydeI-F, ydeI-R; cpxP-F, cpxP-R; opgB-F, opgB-R; gapA-F, gapA-R; lpp-F, lpp-R; mdh-F, mdh-R; pgi-F, pgi-R; aroE-F, aroE-R; gyrA-F, gyrA-R; rplE-F, rplE-R	Sigma, ZDA
S1	Sigma, ZDA

3.1.6 Encimi in njihovi reakcijski pufri

Fast digest (FD) <i>Bam</i> HI	Fermentas, Litva
FD <i>Bam</i> HI	Fermentas, Litva
FD <i>Eco</i> RI	Fermentas, Litva
FD <i>Hind</i> III	Fermentas, Litva
FD <i>Kpn</i> I	Fermentas, Litva
<i>Mlu</i> I	NEW ENGLAND BIOLABS, ZDA
<i>Xho</i> I	Fermentas, Litva
FastDigest Green Buffer (10 ×)	Fermentas, Litva
DNA-ligaza T4	Fermentas, Litva
puffer za DNA-ligazo T4 Rapid Ligation (5 ×)	Fermentas, Litva
DNA-polimeraza <i>Taq</i> v PCR Master Mix (2×)	Fermentas, Litva
DNA-polimeraza <i>DreamTaq</i> v DreamTaq Green PCR Master Mix (2×)	Fermentas, Litva
Power SYBR Green PCR Master Mix (2 ×)	Applied Biosystems, ZDA
DNA-polimeraza <i>Pfu</i>	Fermentas, Litva
puffer za polimerazo <i>Pfu</i> z MgSO ₄ (10 ×)	Fermentas, Litva
Proteinaza K	Fermentas, Litva
Reverzna transkriptaza SuperScriptII	Invitrogen Life Technologies, ZDA
Inhibitor RNaz SUPERase·In	Ambion, ZDA
DNazal	Pierce Biotechnology, ZDA
DNazal	Fermentas, Litva
DnaseI Buffer (10 ×)	USB, ZDA
Encim za označevanje DNA »Terminal Deoxynucleotidyl Transferase«	Promega, ZDA
RNazal	Fermentas, Litva
alkalna fosfataza rakov (angl. shrimp alkaline phosphatase) SAP	Fermentas, Litva
reakcijski puffer za alkalno fosfatazo SAP (10 ×)	Fermentas, Litva

3.1.7 Raztopine

3.1.7.1 Raztopine za agarozno gelsko elektroforezo

- puffer TBE (10 ×): 0,9 M Tris-borat, 20 mM EDTA
- agarozni gel: agaroz (0,35 g agaroze za 1-odstotni gel) smo dodali 35 ml pufra 0,5× TBE, segreli, da se je agaroz raztopila, ohladili ter nato v gel dodali 1,3 μl etidijevega bromida (10 mg/ml)
- DNA nanašalni puffer (6 ×): 0,25 % bromfenol modro (m/v), 30 % (m/v) glicerol, 60 mM EDTA
- puffer TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

- lestvica velikosti nukleinskih fragmentov 1-kb lestvica λ /*Pst*I (Fermentas, Litva)
- 100-bp Plus lestvica (Fermentas, Litva)

3.1.7.2 Rastopine za NaDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo

- PageBlue Protein Staining Solution barvilo za barvanje proteinov v gelu (Fermentas)
- elektroforezni pufer NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20 ×) (Invitrogen Life Technologies, ZDA)
- nanašalni pufer NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 ×) (Invitrogen Life Technologies, ZDA)
- lestvica molekulske mase proteinov PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)
- 1 M reducent DTT

3.1.7.3 Rastopine za pripravo kompetentnih celic

- 0,1 M CaCl₂
- rastopina za shranjevanje kompetentnih celic: 10 mM Tris (pH 7,0), 50 mM CaCl₂, 10 % (v/v) glicerol

3.1.7.4 Rastopine za β -galaktozidazni test

- pufer Z (pH 7,0): 60 mM Na₂HPO₄ × 7 H₂O, 40 mM NaH₂PO₄ × H₂O, 10 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM β -merkaptetoanol
- start reagent: 4 mg/ml *orto*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG)
- stop reagent: 1 M Na₂CO₃
- kloroform
- 0,1-odstotni NaDS

3.1.7.5 Pufer za izolacijo RNA

- 30 mM Tris-Cl
- 1 mM EDTA (pH 8,0)
- 15 mg/ml lizocim
- 10 μ l proteinaze K /100 μ l pufra

3.1.7.6 Pufer za SPR

- 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 50 mM KCl
- 4 mM MgCl₂
- 0,5 mM EDTA
- 5 mM DTT
- 0,005 % surfaktanta P20

Pufer pred uporabo segreješ na sobno temperaturo, prefiltriraš in odzračuješ 10 min.

3.1.7.7 Raztopine za izolacijo rekombinantnih proteinov z afinitetno kromatografijo Ni-NTA

- pufer za lizo: 50 mM fosfatni pufer (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 20 mM merkaptotanol, z 10 µg/ml DNaze I, 20 µg/ml RNaze A, 1 mg/ml lizocima, 1 mM benzamidina, 2 µl/ml PEFABLOCa
- pufer za spiranje nevezanih proteinov: 50 mM fosfatni pufer (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 20 mM merkaptotanol
- pufer za elucijo vezanih proteinov: 50 mM fosfatni pufer (pH 8,0), 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 20 mM merkaptotanol
- pufer za dializo: 5 mM fosfatni pufer (pH 7,2), 300 mM NaCl

3.1.7.8 Raztopine uporabljene za izolacijo proteinov vezanih na promotorsko regijo kolicina E8 na magnetnih kroglicah

- pufer za lizo: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 pri 4 °C), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 tablete Roche complete protease inhibitor cocktail tablet (EDTA free)/10 ml, 20 µg/ml RNaze A, 1 mg/ml lizocima
- pufer B&W (2 ×): 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl
- pufer B&W (1 ×): 50 ml 2× pufer B&W, 50 ml dH₂O
- LexA vezavni pufer (1 ×): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
- pufer za spiranje: 20 mM HepesNa (pH 7,5 pri 4 °C), 100 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20
- pufer za elucijo: 20 mM HepesNa (pH 7,5 pri 4 °C), 800 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20

3.1.8 Kompleti

Komplet za izolacijo plazmidne DNA

- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Litva)
- QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, ZDA)

Komplet za ekstrakcijo DNA iz agaroznega gela

- GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas, Litva)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, ZDA)

Komplet za čiščenje produktov PCR

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, ZDA)
- GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas, Litva)
- MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, ZDA)

Komplet za pripravo kompetentnih celic in transformacijo

- TransformAid Bacterial Transformation Kit (Fermentas, Litva)

Komplet za kloniranje

- CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, Litva)

Komplet za izolacijo RNA

- RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen, ZDA)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, ZDA)

Komplet za odstranjevanje DNA

- RNase-Free Dnase Set (Qiagen, ZDA)

Komplet za določanje koncentracije proteinov

- BCA Protein Assay Reagent A/B (Pierce, ZDA)

Komplet za preverjanje kvalitete in integritete RNA

- Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, ZDA)

Komplet za preverjanje občutljivosti in natančnosti izvedbe mikromrež

- GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, ZDA)

Komplet za reverzno transkripcijo

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, ZDA)

Komplet za hibridizacijo, spiranje in barvanje mikromrež

- GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, ZDA)
Hybridization Module, Box 1: 2× hibridizacijska mešanica, DMSO, voda brez nukleaz
Stain Module, Box 1: Stain Coctail 1, Stain Coctail 2, Array Holding Buffer
Wash Buffers A in B, Box 2: Wash Buffers A, Wash Buffers B

Komplet za študije proteinov in DNA

- Dynabeads Streptavidin Trial Kit (Invitrogen Life Technologies, ZDA):
Dynabeads M-280 Streptavidin

3.1.9 Laboratorijska oprema in drobni material

Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
Aparatura za PCR v realnem času ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA)
Aparat refraktometer Biacore X (GE Healthcare, Švedska)
Aparatura za PCR GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Kanada)
Aparatura za PCR Biometra UNO II (Biometra, Nemčija)
Aparatura za PCR MyCycler Thermal Cycler (BioRad, ZDA)
Aparatura za elektroforezo 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Švedska)
Centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Švica)
Centrifuga Sorvall RC-2B (Sorvall Products, ZDA)
Čitalec mikrotitrskih plošč Spectra MR Scanning Spectrophotometer (DYNEX Technologies, Nemčija)
Elektronske pipete (Biohit, Finska)
Hibridizacijska pečica 640 (Affymetrix, ZDA)
Invertni mikroskop Eclipse TE300 z digitalno kamero DXM 1200 (Nikon, ZDA)
Kapilarna elektroforeza Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, ZDA)
Konfokalni mikroskop Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Nemčija)
Liofilizator ALPHA 2-4 LCS (CHRIST, Nemčija)
Mikroskop Opton Axioskop (Carl Zeiss, Nemčija)
Mikrotekočinski sistem GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix, ZDA)
Namizna centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Nemčija)
Namizna centrifuga Eppendorf 5415R (Eppendorf, Nemčija)
Rotirajoče kolo
Sistem za dokumentiranje gelov UVitec (UVitec, Velika Britanija)
Sistem za dokumentiranje gelov G:BOX Chemi (SYNGENE, Velika Britanija)
Stresalna kopel The Belly Dancer (Stovall Life Science, ZDA)
Sistem za NaDS-PAGE elektroforezo XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen Life Technologies, ZDA)
Spektrofotometer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio (Perkin Elmer, Kanada)
Spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA)
Stresalnik Infors HT (Infors HT, Švica)
Stresalnik Innova 2300 (New Brunswick Scientific, USA)
Termostatirana kopel ISOTEMP 215 (Fischer Scientific, ZDA)
Termostatirana kopel LKB 2219 Multitemp II (Pharmacia Biotech, ZDA)
Termostatirana kopel Ministat 125-cc (Huber, Nemčija)
Termoblok Constantemp (Technilab, ZDA)
Transiluminator UXDT-20ML-15R (Biostep, Nemčija)
Ultrazvočni razbijalec Vibra-Cell VCX 750 (Sonics & Materials, ZDA)
Vibracijski stresalnik VIBROMIX 10 (Tehtnica, Slovenija)
Večlaserski optični čitalec GeneChip Scanner 7G (Affymetrix, ZDA)

Dializne celulozne vrečke MWCO 3500 Spectra/Por (Spectrum Laboratories, ZDA)
Dializne celulozne vrečke MWCO 12-14K Spectra/Por (Spectrum Laboratories, ZDA)
Mikromreža GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array (Affymetrix, ZDA)
Mikrotitrna ploščica za PCR v realnem času MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, ZDA)
Mikrotitrna ploščica s 96-jamicami (Greiner bio-one, Nemčija)
NaDS NuPage 12-odstotni Bis-TRIS gel (Invitrogen Life Technologies, ZDA)
Streptavidinski senzorni čip SA (GE Healthcare, Švedska)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava transkripcijskih fuzij s poročevalskima genoma *gfp* in *rfp* v plazmidih pSC304 in pKCT10

3.2.1.1 Priprava fragmenta promotorja gena kolicina M, *pcma*, in vektorja pSC101

3.2.1.1.1 Pomnoževanje promotorja gena aktivnosti kolicina M, *pcma*, z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Za spremljanje transkripcijske aktivnosti gena *cma* kolicina M s pomočjo izražanja poročevalskega gena smo v vektorju pSC101 pripravili transkripcijsko fuzijo promotorja gena aktivnosti kolicina M z genom za zeleni fluorescirajoči protein – *pcma-gfp*. V Preglednici 6 so prikazani začetni oligonukleotidi, pogoji PCR in sestava reakcijske mešanice za pomnožitev *pcma*. Kot matrično DNA smo uporabili plazmid pCHAP1, izoliran iz kolicinogenega seva PAP1. Začetna oligonukleotida imata dodani *XhoI* in *BamHI* restrikcijski mesti za pripravo fuzije. Uspešnost pomnoževanja fragmenta smo preverili na 1,5-odstotnem agaroznem gelu.

Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev promotorske regije kolicina M za pripravo *pcma-gfp*.

Table 6: Primers, PCR conditions and reaction mixture used for colicin M promoter region amplification for cloning *pcma-gfp*.

Gen oz. odsek	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Velikost produkta (bp)	Pogoji verižne reakcije
<i>pcma</i>	cma pF TCCTCGAGGAGTTCTCAATATATATTTCCAGT	314	94 °C 4 min 94 °C 30 sek 55 °C 30 sek 30 ×
	cma pR TCGGATCCCAGGAACATGCGGTGCTGAA		72 °C 30 sek 72 °C 7 min
Reakcijska mešanica			
začetni oligonukleotid cma pF (vodilni)		1 µl (100 pmol/µl)	
začetni oligonukleotid cma pR (povratni)		1 µl (100 pmol/µl)	
plazmid pCHAP1		0,4 µl	
2× PCR Master Mix s polimerazo <i>Taq</i>		25 µl	
destilirana voda		22,6 µl	

*podčrtana nukleotidna zaporedja so prepoznavna zaporedja restrikcijskih encimov *XhoI* in *BamHI*

3.2.1.1.2 Restrikcija fragmenta *pcma* in vektorja pSC101

Za pripravo vektorja pSC101 za vključitev promotorja kolicina M, *pcma*, smo plazmid pSC202 z *umuD-gfp* cepili z restrikcijskima endonukleazama *XhoI* in *BamHI*. Z istima encimoma smo cepili tudi *pcma* pomnožen s PCR in predhodno očiščen s kompletom za čiščenje produktov PCR GeneJET (Fermentas). Restriksijska mešanica za pripravo

vektorja izpeljanke pSC101 je podana v Preglednici 7 in za pripravo fragmenta *pcma* v Preglednici 8. Po restrikciji smo vektor ločili od izrezanega fragmenta *umuD* na 1-odstotnem agaroznem gelu in ga izrezali ter očistili iz gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNA GeneJET (Fermentas). Cepljen fragment *pcma* smo očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR GeneJET (Fermentas).

Preglednica 7: Restriksijska mešanica za pripravo vektorja izpeljanke pSC101.

Table 7: Composition of restriction mixture for vector pSC101 preparing.

pSC202 z <i>umuD-gfp</i>	26 μ l
10 \times pufer FastDigest Green	2 μ l
FD <i>Xho</i> I	1 μ l
FD <i>Bam</i> HI	1 μ l
skupaj	30 μ l

*Restrikcija je potekala 20 min pri 37 °C.

Preglednica 8: Restriksijska mešanica za pripravo promotorske regije kolicina M, *pcma*.

Table 8: Composition of restriction mixture for *pcma*, colicin M promoter region, preparing.

<i>pcma</i> produkt PCR	13 μ l
10 \times pufer FastDigest Green	2 μ l
FD <i>Xho</i> I	1 μ l
FD <i>Bam</i> HI	1 μ l
bidestilirana voda	3 μ l
skupaj	20 μ l

*Restrikcija je potekala 15 min pri 37 °C.

3.2.1.2 Priprava fragmenta gena *rfp* in vektorja pKCT2

3.2.1.2.1 Pomnoževanje gena *rfp* s PCR

Za spremljanje transkripcijske aktivnosti gena *cka* smo pripravili transkripcijsko fuzijo promotorja gena kolicina K, *cka*, s poročevalskim genom *rfp* za rdeči fluorescirajoči protein – *cka-rfp*. Kot matrično DNA za pomnožitev gena *rfp* smo uporabili plazmid pDsRed-Express2-N1. V Preglednici 9 so prikazani začetni oligonukleotidi, pogoji PCR in sestava reakcijske mešanice za pomnožitev gena *rfp*. Začetna oligonukleotida imata dodani *Kpn*I restriksijski mesti za vstavitve fragmenta *rfp* v plazmid pKCT2. Slednji je naravni kolicin K kodirajoči plazmid pColK-K235 z dodanima Ap^r in *Kpn*I restriksijskim mestom v začetku gena *cka*. Uspešnost pomnoževanja gena *rfp* smo preverili na 1-odstotnem agaroznem gelu, iz katerega smo produkt PCR izrezali in ga očistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Preglednica 9: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev gena *rfp* za pripravo fuzije *cka-rfp*.

Table 9: Primers, PCR conditions and reaction mixture used for *rfp* amplification for preparing *cka-rfp* fusion.

Gen oz. odsek	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Velikost produkta (bp)	Pogoji verižne reakcije
<i>rfp</i>	Rd f ACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCAC	722	94 °C 4 min 94 °C 30 sek 73 °C 30 sek 30 ×
	Rd r TCGGTACCCTACTGGAACAGGTGGTGGC		72 °C 2 min 72 °C 7 min
Reakcijska mešanica			
začetni oligonukleotid Rd F (vodilni)		1 µl 100 pmol/µl	
začetni oligonukleotid Rd R (povratni)		1 µl 100 pmol/µl	
plazmid pDsRed-Express2-N1		0,3 µl	
dNTP (10 mM)		2 µl	
10× pufer za polimerazo <i>Pfu</i> z MgSO ₄		5 µl	
DNA-polimeraza <i>Pfu</i>		0,5 µl	
bidestilirana voda		40,2 µl	

*podčrtana nukleotidna zaporedja so prepoznavna zaporedja restrikcijskega encima *KpnI*

3.2.1.2.2 Ligacija s PCR pomnoženega fragmenta *rfp* v pJET1.2

Ker nam s PCR pomnoženega fragmenta *rfp* ni uspelo cepiti z restrikcijskim encimom *KpnI* za direktno kloniranje v vektor pKCT2, zaradi premalo končnih nukleotidov potrebnih za vezavo encima, smo s PCR pomnožen fragment *rfp* najprej vstavili v vektor pJET1.2. Ligacija produkta PCR gena *rfp* z dodanima *KpnI* restrikcijskima mestoma v pJET1.2 plazmidni vektor (Fermentas) je potekala po navodilih za tope konce priročnika kompleta za kloniranje CloneJET (Fermentas) (*Pfu* polimeraza dela tope konce). Reakcijska mešanica za ligacijo je bila naslednja v skupno 10 µl: 5 µl 2× reakcijskega pufera, 0,5 µl DNA-ligaze T4, 3 µl MgSO₄, 0,5 µl vektorja pJET1.2, 1 µl s PCR pomnoženega gena *rfp*. Ligacija je potekala pri 16 °C preko noči. Ligacijsko mešanico smo nato transformirali v DH5α in z reakcijo PCR preverili vsebnost in pravo orientiranost vključenega fragmenta.

3.2.1.2.3 Preverjanje vsebnosti in orientiranosti fragmenta *rfp* v vektorju pJET1.2 s PCR

V Preglednici 10 so prikazani začetni oligonukleotidi, pogoji PCR in sestava reakcijske mešanice za potrditev vsebnosti in prave orientiranosti vključenega fragmenta *rfp* najprej v vektorju pJET1.2 z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 Forward in *ckaPK* ter nato v vektorju pKCT2 z začetnima oligonukleotidoma Rd r in *ckaPK*. Reakcija je potekala na DNA kolonij transformant DH5α (angl. colony PCR).

Preglednica 10: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za potrditev vsebnosti in pravilne orientacije *rfp*.

Table 10: Primers, PCR conditions and reaction mixture used for verifying the *rfp* presence and correct orientation.

Gen oz. odsek	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Pogoji verižne reakcije
<i>rfp</i>	pJET1.2 Forward CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	94 °C 4 min
	ckaPK TCCGGCAGCCAACAAGGGTGTGCGAGAAGT	94 °C 30 sek 73 °C 30 sek 30 ×
	Rd r TCGGTACCCTACTGGAACAGGTGGTGGC	72 °C 1 min 72 °C 7 min
Reakcijska mešanica		
začetni oligonukleotid pJET1.2 Forward/ckaPK (vodilni)		0,4 µl 10 µpmol/µl/ 100 pmol/µl
začetni oligonukleotid Rd r (povratni)		0,4 µl 100 pmol/µl
kolonija DH5α s pJET1.2rfp/ DH5α s pKCT10		/
2× PCR Master Mix s polimerazo <i>Taq</i>		10 µl
bidestilirana voda		9,2 µl

3.2.1.2.4 Restrikcija pJET1.2 z *rfp* in vektorja pKCT2

Plazmidno DNA pJET1.2 z ustreznim vključkom *rfp* smo izolirali iz transformante (Fermentas). Temu je sledila restrikcija fragmenta s *KpnI* in njegova izolacija za vstavitev v vektor pKCT2. V Preglednici 11 je podana restriksijska mešanica za pripravo fragmenta *rfp*. Fragment *rfp* smo izrezali iz 1-odstotnega agaroznega gela in očistili s kompletom za ekstrakcijo DNA iz agaroznega gela QIAquick (Qiagen).

Preglednica 11: Restriksijska mešanica za pripravo fragmenta *rfp*.

Table 11: Composition of restriction mixture for *rfp* preparing.

pJET1.2 <i>rfp</i>	17 µl
10× pufer FastDigest Green	2 µl
FD <i>KpnI</i>	1 µl
skupaj	20 µl

*Restrikcija je potekala 15 min pri 37 °C.

Plazmidni vektor pKCT2, v katerega smo želeli vstaviti gen *rfp*, smo pripravili s cepitvijo pKCT3 s *KpnI*, s čemer smo odcepili kaseto *gfp-kan* iz plazmida in jo nato zamenjali z genom *rfp*. Restriksijska mešanica je podana v Preglednici 12. Po restrikciji smo vektor pKCT2 ločili od odcepljenega fragmenta *gfp-kan* na 0,8-odstotnem agaroznem gelu, ga izrezali iz gela in očistili s kompletom za ekstrakcijo DNA GeneJET (Fermentas). Da bi preprečili samoligacijo, smo defosforilirali 5' konec vektorja. Reakcijska mešanica je podana v Preglednici 13. Po defosforilaciji smo vektor pKCT2 očistili s kompletom za čiščenje produktov DNA QIAquick (Qiagen).

Preglednica 12: Restriksijska mešanica za pripravo vektorja pKCT2.

Table 12: Composition of restriction mixture for vector pKCT2 preparing.

pKCT3	17 μ l
10 \times pufer FastDigest Green	2 μ l
FD <i>Kpn</i> I	1 μ l
skupaj	20 μ l

*Restrikcija je potekala 20 min pri 37 °C.

Preglednica 13: Defosforilacijska mešanica za pripravo defosforiliranega vektorja pKCT2.

Table 13: Composition of dephosphorilation mixture for vector pKCT2 preparing.

pKCT2 vektorja	30 μ l
10 \times reakcijski pufer SAP	5 μ l
alkalna defosforilaza SAP	1 μ l
bidestilirana voda	14 μ l
skupaj	50 μ l

*Reakcija defosforilacije je potekala 30 min pri 37 °C in prekinitiv 15 min pri 65 °C.

3.2.1.3 Ligacija fragmenta *pcma* v pSC101 in *rfp* v pKCT2

Ligacijo pridobljenega fragmenta promotorjev *pcma* v vektor pSC101 (Km^r) in fragmenta *rfp* v defosforiliran vektor pKCT2 (Ap^r) smo izvedli po spodaj opisanem postopku. Ustvarjena plazmida z vstavljenima vključkoma smo poimenovali pSC304 (fuzija *pcma-gfp*) in pKCT10 (fuzija *cka-rfp*). Klonirani zaporedji *pcma* in *rfp* sta bili sekvencirani (Macrogen), nukleotidno zaporedje je podano v Prilogi A.

3.2.2 Ligacija

Ligacija fragmentov v plazmidni vektor je potekala v reakcijski mešanici v skupno 5 μ l: lineariziran plazmid in cepljen fragment DNA v razmerju 1:3, 0,3 μ l DNA-ligaze T4 (Fermentas) ter 1 μ l 5 \times ligacijskega pufru Rapid Ligation (Fermentas). Ligacijsko mešanico smo inkubirali 5 min na ledu in nato je ligacija potekala preko noči pri 16 °C. Ligacijsko mešanico smo transformirali v sev DH5 α in gojili na ploščah LB z ustreznim antibiotikom. Nato smo plazmidne DNA z vstavljenimi vključki izolirali.

3.2.3 Čiščenje PCR produktov in menjava pufru

Komplet GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas) smo po navodilih proizvajalca uporabili za menjavo pufru po reakciji PCR ali za menjavo pufru po restrikciji. Komplet MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) smo po navodilih proizvajalca uporabili za koncentriranje cDNA pri pripravi tarč za vezavo oz. hibridizacijo na DNA mikromreže.

3.2.4 Izolacija plazmidne DNA

Plazmid pRW50 smo izolirali s kompletom QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen), ostale plazmide uporabljene pri raziskavi smo izolirali s kompletom GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) po navodilih proizvajalca.

3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Za preverjanje izolacije plazmidne DNA, velikosti in čistosti fragmentov DNA ter za čiščenje fragmentov določene velikosti iz gela smo uporabljali agarozni gel, z dodanim etidijevim bromidom v končni koncentraciji 0,5 µg/ml. Elektroforeza je potekala v 0,5× pufru TBE. Kot označevalec velikosti smo uporabljali lestvico znanih velikosti fragmentov DNA λ/PstI ali 100-bp in 100-bp Plus lestvico fragmentov nukleinskih kislin (Fermentas). V žepke smo vnesli vzorec DNA redčen v DNA nanašalnem pufru. Napetost med elektrodama je znašala 100–120 V.

3.2.6 Čiščenje DNA iz agaroznega gela

Cepljeno DNA ustrezne velikosti smo iz agaroznega gela izrezali in očistili s kompletom GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas) po navodilih proizvajalca.

3.2.7 Priprava kompetentnih celic

V 5 ml gojišča LB smo vcepili kolonijo izbranega seva in preko noči inkubirali pri 37 °C in 200 obr./min. 150 µl prekonočne kulture smo vnesli v 50 ml gojišča LB in inkubirali pri 37 °C in 200 obr./min do optične gostote OD₆₀₀ 0,4–0,6. Kulturo smo nato hladili v ledeni kopeli 10 min. Celice smo ločili od supernatanta s centrifugiranjem 10 min pri 4000 × g in 4 °C. Usedlino celic smo resuspendirali v 8 ml ledeno mrzlega 0,1 M CaCl₂ in inkubirali 10 min na ledu. Ponovno smo centrifugirali 10 min pri 4000 × g in 4 °C, odstranili supernatant, centrifugirali 1 min ter odstranili preostanek supernatanta. Usedlino celic smo resuspendirali v 1,8 ml raztopine za shranjevanje kompetentnih celic s CaCl₂ in Tris-glicerolom. Dobljeno suspenzijo kompetentnih celic smo razdelili v mikrocentrifugirke po 50 µl, zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri –80 °C.

3.2.8 Transformacija kompetentnih celic

50 µl kompetentnih celic smo dodali 5 µl ligacijske mešanice ali 1 µl plazmidne DNA. Mešanico smo inkubirali 30 min na ledu, nato 90 sek pri temperaturi 42 °C, da so se pore odprle in celice sprejele DNA. Sledila je inkubacija 2–3 min na ledu. Mešanici smo nato dodali 200 µl gojišča LB ter inkubirali 1 h pri 37 °C in 200 obr./min. Po

100 µl transformacijske mešanice smo razmazali na plošče LB z ustreznim antibiotikom. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

Transformacijo smo izvajali tudi s kompletom TransformAid Bacterial Transformation Kit (Fermentas) po navodilih proizvajalca, s katerim se v prvem delu pripravijo kompetentne celice, medtem ko v drugem delu sledi transformacija.

3.2.9 Mikroskopiranje z invertnim fluorescenčnim in konfokalnim mikroskopom

Izražanju fuzij *pcma-gfp*, *cka-rfp*, *lexA-gfp*, *umuD-gfp* smo sledili na podlagi izražanja poročevalskega gena *gfp* ali *rfp*. Plazmid s fuzijo promoterja preučevanega gena s poročevalskim genom smo transformirali v preiskovani sev RW118 in/ali RW464.

3.2.9.1 Vzorčenje za preučevanje izražanja fuzij *pcma-gfp*, *cka-rfp* in *lexA-gfp*

Bakterijske celice kultur smo vzorčili v stacionarni fazi rasti. 1 ml kulture smo dodali 5 µl kloramfenikola (10 mg/ml), za prekinitev sinteze proteinov. Vzorec smo do naslednjega dne, ko smo mikroskopirali, hranili pri 4 °C, da se je razvila svetilnost GFP-ja. Rastne krivulje in vzorčenje smo izvedli v ponovitvah (Kamenšek, 2007).

3.2.9.2 Priprava preparata

7 µl poli-L-lizina smo kanili na objektnik in ga z drugim objektnikom razmazali po površini. Ko se je poli-L-lizin posušil, smo 10 µl vzorca bakterijskih celic nanegli na objektnik, pokrili s krovnikom in stisnili skupaj, da so se celice dobro prilepile na objektnik (Kamenšek, 2007).

3.2.9.3 Svetlobna in fluorescenčna mikroskopija

Število in obliko fluorescirajočih bakterijskih celic sevov s transkripcijskimi fuzijami *pcma-gfp* in *umuD-gfp* smo pregledovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Preparate smo pregledovali z inverzno mikroskopijo pri povečavi 1000 ×. Slike smo posneli z digitalno kamero DXM 1200, Nikon, priključeno na mikroskop Eclipse TE300, Nikon, in jih shranjevali s pomočjo programske opreme LUCIA (System for Image Processing and Analysis LUCIA 4,60, Laboratory Imaging Ltd.). Slike v določenem vidnem polju smo najprej fotografirali pri vidni svetlobi, nato pri fluorescenčni osvetlitvi z živosrebreno žarnico (Super high pressure mercury lamp power supply, Nikon) z uporabo širokospektralnega modrega filtra B2A (λ_{ex} 450–590, Nikon), ki prepušča zeleno svetlobo (Kamenšek, 2007).

3.2.9.4 Mikroskopiranje s konfokalnim mikroskopom

Sočasno izražanje fuzije *cka-rfp* na plazmidu pKCT10 in *lexA-gfp* na plazmidu pSC200 v posameznih celicah preučevanega seva RW118 smo opazovali z uporabo konfokalnega mikroskopa Zeiss LSM 510 META. Preparate smo osvetljevali z dvema različnima laserjema in opazovali fluorescenco oz. izražanje GFP in RFP v istih celicah (Jacob Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University, Izrael).

3.2.10 Izražanje in čiščenje rekombinantnega kolicina M

Plazmid pColM-imm, za izražanje rekombinantnega kolicina M, je predhodno pripravil M. Rijavec. Zaporedje DNA z zapisom za gen aktivnosti in imunosti kolicina M je bilo pomnoženo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (Preglednica 14) iz naravnega plazmida pCHAP1 seva PAP1 iz zbirke Pugsley. Pomnoženi odsek je bil cepljen z restrikcijskima endonukleazama *XhoI* in *MluI* in vstavljen v vektor za izražanje genov pET8c (Ap^r) s promotorjem T7 in poimenovan pColM-imm (Rijavec, 2010; Budič in sod., 2011). Vektor pET8c vpelje na N-terminalni del vstavljenega gena histidinski repek (His-tag), kar omogoča enostavno izolacijo rekombinantnih proteinov z uporabo nikljeve afinitetne kromatografije (Anderluh in sod., 2003).

Preglednica 14: Uporabljeni začetni oligonukleotidi ter pogoji PCR za pomnoževanje gena za sintezo kolicina M in njegove imunosti (Rijavec, 2010: 51).

Table 14: Primers and PCR conditions used for amplification of colicin M and immunity genes (Rijavec, 2010: 51).

Oznaka začetnega oligonukleotida	Gen oz. odsek	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Velikost produkta (bp)	Pogoji verižne reakcije s polimerazo
ColM1	<i>cm</i> in <i>imm</i>	TCACTCGAGCATGGAAACCT TAACTGTTTCATGCA	1321	94 °C 4 min 1× 94 °C 1 min
ColM2		CCACGCGTCCACTTCACAGT ATGCTCACATTG		50 °C 1 min 30× 72 °C 2,5 min 72 °C 10 min 1×

Plazmid pColM-imm smo transformirali v kompetentne celice seva BL21(DE3)pLysS, ki je primeren za izražanje rekombinantnih proteinov v večji količini. Sev ima v gen *int* vstavljen gen za RNA polimerazo faga T7, ki je pod kontrolo promotorja *lacUV5*. Za indukcijo izražanja gena za RNA polimerazo T7 je zato uporabljen IPTG. Plazmid pLysS ima zapis za lizocim faga T7, ki zmanjša nespecifično izražanje tarčnega gena, kateri je pod kontrolo promotorja T7. BL21(DE3)pLysS omogoči visoko sintezo rekombinantnih proteinov zaradi enostavne indukcije kateregakoli gena, ki je pod kontrolo promotorja T7 ter ima mesto vezave ribosoma. Sev BL21 nima proteaze *lon* in proteaze zunanje membrane *ompT*, ki lahko razgradita proteine med izolacijo (Stratagene).

Kolonijo BL21(DE3)pLysS s pColM-imm smo vcepili v 20 ml gojišča LB z Ap ter inkubirali pri 37 °C in 200 obr./min preko noči. 5 ml prekonočne kulture smo precepili v 500 ml gojišča LB z Ap in inkubirali pri 37 °C in 180 obr./min. Kulturo smo gojili do OD₆₀₀ med 0,6 in 0,8 in inducirali promotor polimeraze T7 z dodatkom IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid), končne koncentracije 0,8 mM. Po indukciji smo kulturo gojili še 4 ure. Kulturo smo nato ohladili na ledu in celice ločili od gojišča s centrifugiranjem 10 min, pri 4500 × g in 4 °C, in jih resuspendirali v 25 ml ledeno mrzlega pufra TSE in ponovno centrifugirali 10 min pri 4500 × g in 4 °C. Stehtali smo maso celic, zamrznili v tekočem dušiku in jih hranili pri –80 °C.

Celice smo lizirali v 50 mM fosfatnem pufru za lizo (pH 8,0), s 300 mM NaCl, 10 mM imidazolom, 20 mM merkaptoetanolom, DNazo, RNazo, lizocimom, proteinskimi inhibitorji, z rahlim stresanjem 1 h pri 4 °C. Dokončno smo jih lizirali s soniciranjem na ledu 3 min, v 20 sek intervalih, pri 40-odstotni moči. Lizat smo nato dvakrat centrifugirali 30 min pri 17000 × g in 4 °C. Supernatantu smo dodali agarozo Ni-NTA in inkubirali ob rahlem stresanju 1 h pri 4 °C ter proteine očistili z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po navodilih proizvajalca kromatografskega nosilca (Qiagen). Ni-NTA agarozo z vezanim kolicinom M smo nanegli na kolono in dodatno spirali za preprečitev nespecifične vezave 3-krat s 3 ml 50 mM fosfatnega pufra (pH 8,0), s 300 mM NaCl, 10 mM imidazolom, 20 mM merkaptoetanolom. Nato smo nespecifično vezane proteine sprali 5-krat s 3 ml pufra za spiranje nevezanih proteinov (50 mM fosfatni pufer (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM merkaptoetanol, 20 mM imidazol) in z enakim pufrom s 300 mM imidazolom, pufrom za elucijo vezanih proteinov, eluirali vezane proteine 3-krat s 3 ml in zbrali 3 frakcije.

Z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu NaDS-PAGE smo preverili prisotnost kolicina M v različnih frakcijah. Ustrezne frakcije smo dializirali 3-krat proti 5 mM fosfatnem dializnem pufru (pH 7,2) s 300 mM NaCl in v celulozni vrečki z MWCO 12-14 kDa (Spectrum Laboratories). Po zaključku dialize smo oborjene proteine odstranili s centrifugiranjem 30 min pri 17000 × g in 4 °C (Rijavec, 2010). Z NaDS-PAGE smo preverili uspešnost izolacije in čistost kolicina M na 12-odstotnem Bis-Tris poliakrilamidnem gelu (Invitrogen Life Technologies), določili koncentracijo kolicina M s kompletom BCA Protein Assay (Pierce) in spektrofotometrom Nanodrop in ekstinkcijskim koeficientom (ϵ) 33475 M⁻¹cm⁻¹ ter ga shranili pri –80 °C.

3.2.11 Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z NaDS (NaDS-PAGE)

Vzorci smo pripravili tako, da smo zmešali proteinski vzorec in 4× nanašalni pufer NuPAGE LDS (Invitrogen Life Technologies) ter 20 mM DTT, inkubirali 5 min v vreli vodi ter nato ohladili na ledu.

Elektroforeza je potekala v predpripravljenih NuPage 12-odstotnih Bis-Tris gelih (Invitrogen Life Technologies) in $1\times$ elektroforeznem pufru MES NuPage MES SDS (Invitrogen Life Technologies) 1 h pri 180 V, 60 mA. Kot označevalec velikosti smo uporabljali 3,75 μ l lestvice molekulske mase proteinov PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas). Po končani elektroforezi smo proteine v gelih barvali preko noči z barvilom Coomassie Brilliant Blue v PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas) in nato razbarvali gel v dH_2O .

3.2.12 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracije proteinov v vzorcih smo določili spektrofotometrično z uporabo kompleta BCA Protein Assay (Pierce) po navodilih proizvajalca. Umeritveno krivuljo smo pripravili z govejim serumskim albuminom – BSA v založni koncentraciji 2 mg/ml (Pierce). Pripravljene mešanice smo inkubirali 30 min pri 37 °C in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 562 nm. S pomočjo umeritvene krivulje smo izračunali koncentracijo proteina pri dobljeni vrednosti A_{562} .

Koncentracijo smo določili tudi z uporabo spektrofotometra Nanodrop z merjenjem absorbance pri 280 nm in uporabo ekstinkcijskega koeficienta za $A_{280} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, izračunanega iz števila triptofanov in tirozinov v zaporedju in molekulske mase proteina.

3.2.13 Določanje aktivnosti in stabilnosti kolicina M z metodo nakapljane plošče

V 5 ml gojišča LB smo vcepili kolonijo indikatorskega seva *E. coli* DH5 α občutljivega za kolicin in v drugih 5 ml gojišča LB kolonijo seva *E. coli* MG1655 na katerem smo želeli testirati učinkovitost kolicina M ter inkubirali preko noči na stresalniku pri 200 obr./min in 37 °C. Naslednji dan smo v 4 ml mehkega agarja, ogretega na 46 °C, dodali 200 μ l prekončne kulture indikatorskega seva, premešali ter prelili ploščo LB. Enako smo storili za sev MG1655. Ko se je mehki agar strdil, smo na plošči nakapljali po 5 μ l kolicina M različnih redčitev v gojišču LB ter inkubirali preko noči pri 37 °C. Na podlagi prisotnosti con lize smo ovrednotili občutljivost ter določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) na trdnem gojišču. Testirane koncentracije kolicina M so bile sledeče: 3 μ g/ml, 500 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml in 1 ng/ml.

Za preverjanje stabilnosti kolicina M pri temperaturi 37 °C, pri kateri smo izvajali nadaljne poskuse, smo iste redčitve inkubirali 24 h pri 37 °C in aktivnost določili po enakem postopku kot prej.

3.2.14 Določitev subinhibitorne koncentracije kolicina M za tretiranje *E. coli* v tekočem gojišču

V 5 ml gojišča LB smo vcepili kolonijo preiskovanega seva *E. coli* MG1655, občutljivega za kolicin M, ter inkubirali preko noči na stresalniku pri 200 obr./min pri 37 °C. Naslednji dan smo v več erlenmajeric z 20 ml gojišča LB dodali po 60 µl prekonočne kulture, ter inkubirali na stresalniku pri 200 obr./min in 37 °C. Ko so kulture dosegle OD₆₀₀ 0,6, smo dodali kolicin M v koncentracijah 0, 10, 20, 30, 50 in 100 ng/ml, ter stresali naprej. Vsakih 30 min smo merili OD₆₀₀ ter primerjali rast med tretiranimi in netretirano kulturo. Na podlagi izrisanih rastnih krivulj smo določili subinhibitorno koncentracijo in čas vzorčenja za izolacijo RNA.

3.2.15 Testiranje vpliva kolicina M na odziv SOS

3.2.15.1 Izražanje fuzije *umuD-gfp* (mikroskopiranje)

Vpliv kolicina M na indukcijo genov odziva SOS smo testirali na sevu MG1655 s plazmidom pSC202 s fuzijo *umuD-gfp*. Sintezo GFP smo spremljali v posameznih celicah s fluorescenčno mikroskopijo z invertnim mikroskopom. Za kontrolo indukcije odziva SOS smo uporabili 0,5 µg/ml mitomicina C.

20 ml kulture seva MG1655 s plazmidom pSC202 smo gojili pri 200 obr./min in 37 °C do OD₆₀₀ 0,6, ko smo jo tretirali z različnimi koncentracijami kolicina M (0, 10, 100 ng/ml) in mitomicinom C (0,5 µg/ml) ter stresali naprej. Po 1 h in po 3 h smo vzorčili 1 ml kulture, jo sprali z 1 ml svežega mrzlega gojišča LB in resuspendirali v 50 µl LB ter takoj mikroskopirali.

3.2.15.2 Izražanje fuzije *sulA-lacZ* (test aktivnosti β-galaktozidaze)

Za spremljanje aktivnosti promotorja gena *sulA* občutljive kulture *E. coli*, ob tretiranju s subinhibitornimi koncentracijami kolicina M, smo uporabili test aktivnosti β-galaktozidaze. Sledili smo aktivnosti promotorja gena *sulA*, spojenega s poročevalskim genom *lacZ* na kromosomu seva ENZ1257 (P.L. Moreau).

Po 20 ml kulture seva ENZ1257 smo gojili pri 200 obr./min in 37 °C do OD₆₀₀ 0,5, ko smo jo tretirali z različnimi koncentracijami kolicina M (0, 10, 20, 30 ng/ml) ter gojili naprej. Po 1 h, 2 h, 3 h, 4 h in po 20 h smo izmerili OD₆₀₀ in vzorčili 1 ml kulture, katero smo zamrznili pri -20 °C do meritve aktivnosti β-galaktozidaze.

3.2.16 Izolacija RNA

Za spremljanje izražanja genov bakterijske kulture seva *E. coli* MG1655 po tretiranju s kolicinom M, smo za analizo z genomskimi mikromrežami in PCR v realnem času izolirali celotno celično RNA (totRNA) iz tretirane in netretirane kulture.

V 5 ml gojišča LB smo vcepili kolonijo seva *E. coli* MG1655 ter inkubirali preko noči na stresniku pri 200 obr./min pri 37 °C. Naslednji dan smo v 50 ml tekočega LB vcepili 80 µl prekonočne kulture ter inkubirali na stresniku pri 200 obr./min pri 37 °C. Ko je kultura dosegla OD₆₀₀ 0,6, smo jo razdelili v 2 erlenmajerici po 20 ml kulture. Eni smo dodali 30 ng/ml kolicina M, medtem ko je druga služila kot kontrola, in gojili dalje. Po 30 min in 60 min smo izmerili OD₆₀₀ bakterijskih kultur in vzorčili 2 ml za izolacijo totRNA. Vzorcem smo takoj dodali 4 ml reagenta za zaščito RNA (RNAProtect Bacteria Reagent, Qiagen), vorteksirali in inkubirali pri sobni temperaturi 5 min. Po 10-minutnem centrifugiranju pri 5000 × g smo supernatant odstranili ter usedlino bakterijskih celic shranili pri –80 °C do izolacije RNA. Poskus gojenja in izolacije RNA smo ponovili večkrat, da smo pridobili RNA ustrezne kvalitete. Za nadaljne poskuse smo izbrali vzorce RNA izolirane iz 5. ponovitev.

RNA smo izolirali z uporabo kompleta za izolacijo RNA po navodilih proizvajalca (Qiagen), pri čemer smo bakterijske celice lizirali s pomočjo 15 mg/ml lizocima (Merck) in proteinaze K (Fermentas) v pufru TE (Sigma), s sestavo 30 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA (pH 8,0). Ostanke genomske DNA smo odstranili z uporabo kompleta za odstranjevanje DNA (Qiagen). Uspešnost izolacije RNA smo preverili na 1-odstotnem agaroznem gelu. Koncentracijo izolirane totRNA smo izmerili s pomočjo spektrofotometra Nanodrop (Thermo Scientific) in kvaliteto določili z uporabo kompleta RNA 6000 Nano Lab Kit (Agilent Technologies) v kombinaciji s kapilarno elektroforezo bioanalizatorja Agilent 2100 (Agilent Technologies). Izolirano RNA smo do preiskave z mikromrežami ali PCR v realnem času hranili pri –80 °C.

3.2.17 DNA mikromreže

Za analizo sprememb v izražanju genov bakterije *E. coli* MG1655 po tretiranju s kolicinom M, v dveh časovnih točkah treh bioloških ponovitev, smo uporabili DNA mikromreže GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Arrays (Affymetrix). Te mikromreže omogočajo preučevanje vzorcev izražanja genov pri *E. coli* pod različnimi pogoji za boljše razumevanje bioloških poti in vsebujejo sonde za detekcijo transkriptov seva *E. coli* K-12 in treh patogenih sevov *E. coli*. To omogoča raziskave izražanja genov patogenih sevov ali samo seva K-12. Te DNA mikromreže vsebujejo 10208 sond za 20366 genov, prisotnih v vseh štirih sevih *E. coli*. Zaradi velike podobnosti genov med sevi, če je le mogoče, je za vse štiri ortologe na čipu le ena sonda. Sonde so dolge 22 nt in vsak gen predstavlja mreža sond.

Za analizo z DNA mikromrežami smo tarčno cDNA pripravili po navodilih priročnika Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual. Po navodilih smo izvedli tudi hibridizacijo, spiranje, barvanje in skeniranje mikromrež. Pridobljeni neobdelani podatki so bili normalizirani in naknadno je bila narejena analiza diferenčnega genskega izražanja.

3.2.17.1 Priprava tarče

cDNA (komplementarno verigo DNA) smo sintetizirali iz 10 µg izolirane totRNA z uporabo naključnih heksamernih oligonukleotidov (Invitrogen Life Technologies) in reverzne transkriptaze SuperScript II (Invitrogen Life Technologies). Za spremljanje občutljivosti in izvedbe testa smo v reakcijsko mešanico za reverzno transkripcijo kot eksterno kontrolo dodali mešanico poly-A RNA kontrol (Affymetrix), ki producirajo kontrolne prepise. Sonde za kontrolne gene so prekrite po mikročipu. Po sintezi cDNA smo RNA razgradili z NaOH in cDNA očistili ter koncentrirali z uporabo kompleta MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) in fragmentirali z DNazo I (Pierce Biotechnology). Fragmenti so bili označeni na 3' s terminalno deoksinukleotidil transferazo (Promega) in reagentom za biotilacijo GeneChip DNA Labeling Reagent (Affymetrix). Nato smo fragmentirano in označeno cDNA, imenovano tarčo, hibridizirali na mrežo sond po navodilih proizvajalca (Affymetrix).

3.2.17.2 Hibridizacija tarče na mikromreže

Hibridizacija, barvanje in spiranje mikromrež je potekalo s kompletom GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) po navodilih proizvajalca. Pripravili smo hibridizacijsko mešanico, ki je vsebovala tarčo in hibridizacijske kontrole Control Oligo B2 (Affymetrix). Hibridizacija tarče je potekala v hibridizacijski pečici Affymetrix 640 (Affymetrix) 16 h pri 45 °C in 60 obr./min. Mreže smo sprali in obarvali s fikoeritrinom v mikrotekočinskem sistemu (GeneChip Fluidics Station 450, Affymetrix), nakar smo hibridizacijski signal odčitali z večlaserskim optičnim čitalcem (angl. scanner) GeneChip Scanner 7G (Affymetrix).

3.2.17.3 Analiza podatkov

Z uporabo programa Affymetrix GeneChip Command Console smo pridobili slike čipov in preverili kvaliteto podatkov. Podatki so bili obdelani na Centru za funkcijsko genomiko, Medicinske fakultete UL. Obdelani so bili z večimi različnimi paketi R/Bioconductor. Vrednosti intenzitet signalov so bile normalizirane z uporabo RMA algoritma iz XPS paketa. Podatki so deponirani v NCBI-jevi podatkovni bazi Gene Expression Omnibus database (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, 26. nov. 2012) pod dostopno kodo GSE37026.

Anotacije oz. pripisane funkcije genov in prikaz podatkov so bili urejeni s paketi AnnotationDbi in *ecoliK12.db0* ter ANNAFFY in AFFYCORETOOLS. Normalizirane vrednosti intenzitete signala za vsak gen so bile spremenjene v \log_2 vrednosti. Izmed vseh sond na čipu so bile na podlagi ENTREZ anotacij za analizo izbrane le sonde seva *E. coli* K-12. Izbrani podatki so bili z uporabo paketa LIMMA testirani za diferencialno izražanje (DE) vsakega gena med tretiranimi in netretiranimi vzorci po 30 min po dodatku kolicina M ter tretiranimi in netretiranimi vzorci po 60 min po dodatku kolicina M. Diferenčno izražanje je bilo določeno z uporabo dvofaktorske analize variance (ANOVA) in verjetnostno napako $p \leq 0,05$ s popravkom za testiranje večjega števila hipotez za posamezne p-vrednosti (Benjamini in Hochberg, 1995). Pri tem je bilo izračunano povprečje razlik \log_2 vrednosti intenzitet signalov med tretiranimi in netretiranimi kontrolnimi vzorci oz. \log_2FC , ki pove kolikokrat je povečana ali zmanjšana raven izražanja nekega gena po tretiranju, v primerjavi s kontrolo. Torej \log_2FC je \log_2 razmerja intenzitet signalov med tretirano in netretirano kulturo ($\log_2FC = \log_2(A) - \log_2(B) = \log_2(A/B)$); kjer sta A – intenziteta signala pri tretiranju, B – intenziteta signala pri kontroli. Narejena je bila tudi analiza večstopenjskega lestvičenja normaliziranih vrednosti intenzitet signalov – MDS (angl. multidimensional scaling), s katero smo ugotavljali ujemanje ponovitev. Analiza MDS prikaže razporeditev vzorcev v geometrijskem prostoru tako, da geometrijske razdalje med vzorci odražajo razlike med vzorci in pokaže, kateri vzorci so si podobni. Ker je ena ponovitev poskusa odstopala od ostalih, je bila odstranjena iz analize diferencialnega izražanja. Diferenčno izražanje genov smo predstavili kot \log_2 razmerja intenzitet signalov med tretiranimi in kontrolnimi vzorcema dveh bioloških ponovitev ob dveh časovnih točkah. Diferenčno izraženi geni, katerih \log_2FC je večji od 1 ali manjši od -1 (kar pomeni več kot 2-kratno spremembo) in vrednost $p \leq 0,05$, so bili izbrani za interpretacijo (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013). Izražanje skupine izbranih genov smo validirali s PCR v realnem času.

3.2.18 Reverzna transkripcija za pripravo cDNA za PCR v realnem času

Izolirano totRNA smo prepisali v cDNA z uporabo kompleta z reverzno transkriptazo MultiScribe (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca. 50 μ l reakcijske mešanice je vsebovalo 2,5 μ g RNA, dNTP-je, heksamerne začetne oligonukleotide, reverzno transkriptazo MultiScribe, vodo brez RNaz (Qiagen) in pufer za reverzno transkripcijo. Reakcijo reverzne transkripcije smo izvedli na aparaturi za PCR (BioRad) pri naslednjih pogojih: 25 °C 10 min (naleganje začetnih oligonukleotidov), 37 °C 120 min (reverzna transkripcija), 85 °C 5 min (inaktivacija reverzne transkriptaze), ohlajanje reakcijske mešanice pri 4 °C. Pridobljeno cDNA smo do uporabe hranili pri -20 °C. Za preverjanje kontaminacije reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo smo uporabili dve negativni kontroli reverzne transkripcije brez RNA.

3.2.19 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Za potrditev rezultatov mikromrež smo izvedli PCR v realnem času (qPCR) in uporabili metodo zaznavanja pomnoženih produktov s SYBR Green I. Za analizo smo izbrali 7 referenčnih genov (*gapA*, *lpp*, *mdh*, *pgi*, *aroE*, *gyrA*, *rplE*) in 14 genov iz različnih genskih funkcijskih skupin, s signifikantno spremenjenim izražanjem. Uporabili smo cDNA vzorcev 60-minutnega tretiranja iz 5 bioloških ponovitev. Od tega so bile 3 iste kot pri mikromrežah, kasneje smo eno izločili. V Preglednici 15 so prikazani začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za qPCR.

Začetne oligonukleotide za izbrani gen smo načrtovali v območju nukleotidnega zaporedja sonde. Nukleotidna zaporedja sond oz. tarčnih zaporedij pritrjenih na mikromrežah so dostopna na internetni strani centra NetAffyx Analysis (<http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>, 10. okt. 2010). Specifične začetne oligonukleotide smo načrtovali s pomočjo programov za iskanje začetnih oligonukleotidov Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, 10. okt. 2010) in Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). Dolžina amplikona in njegova temperatura tališča (T_m) sta podani v Preglednici 15. Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov smo upoštevali naslednje pogoje navedene v navodilih proizvajalca (Power SYBR Green PCR Master Mix Protocol, Applied Biosystems): optimalna dolžina začetnih oligonukleotidov 20 nt, delež nukleotidov G in C 30–80 %, T_m med 58 in 60 °C.

Preglednica 15: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za pomnoževanje cDNA izbranih genov s qPCR. V tabeli so podani tarčni geni, nukleotidno zaporedje za vodilni (F) in povratni (R) začetni oligonukleotid, dolžina amplikona (nt), T_m amplikona in koncentracija začetnega oligonukleotida.

Table 15: PCR primers used for target genes cDNA amplification by qPCR. Table includes target genes, nucleotide sequences for forward (F) and reverse (R) primers, amplicon size and T_m and primer concentration.

Tarčni gen	Oznaka začetnih oligonukleotidov	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Dolžina amplikona (nt)	T_m amplikona (°C)	Koncentracija (nM)
<i>wzxC</i>	wzxC-F	TCGGGCTAATGGTGGTGTC	141	80,2	300
	wzxC-R	CCATCAGCAGCGAACCAAT			300
<i>wza</i>	wza-F	TTCCGCCTGCAACCTTATG	124	80,3	300
	wza-R	CGCTGGCTGTATCCGTCAT			300
<i>wcaD</i>	wcaD-F	GGCATGGTGTGGAGTATTCGT	84	73,8	300
	wcaD-R	CCCGACCACCAGATAAAAGAAAC			300
<i>rcsA</i>	rcsA-F	TGCCGACGTTATCATTGAGC	115	77,6	300
	rcsA-R	GATGAAACGGTCTTGGCTTTG			300
<i>yjbE</i>	yjbE-F	TTGCCATATCTGCGCTTG	191	87,0	300
	yjbE-R	GGTGGTCCCGGTATTAGAAC			300
<i>yefJ</i>	yefJ-F	ACGCTCAGGTTGTTTCTGCAA	120	80,3	300
	yefJ-R	ACCCGGTAATGCGATTTTCA			300
<i>rprA</i>	rprA-F	CCCTGAGTGAAACAACGAATTG	53	73,4	300
	rprA-R	ATCGTGGGAGATGGGCAA			300

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 15: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za pomnoževanje cDNA izbranih genov s qPCR. V tabeli so podani tarčni geni, nukleotidno zaporedje za vodilni (F) in povratni (R) začetni oligonukleotid, dolžina amplicona (nt), T_m amplicona in koncentracija začetnega oligonukleotida.

Tarčni gen	Oznaka začetnih oligonukleotidov	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Dolžina amplicona (nt)	T _m amplicona (°C)	Koncentracija (nM)
<i>spy</i>	spy-F	CAGCGTGACCAGATGAAACG	183	80,3	300
	spy-R	CGGCGTCAGGATGTTGTAAA			300
<i>pspC</i>	pspC-F	TGGTGGTGCTGTCGATTTTC	106	78,6	300
	pspC-R	TCACCAAAGGCCATGTTGTC			300
<i>flgM</i>	flgM-F	CGCCTCTGAAGCCTGTAAGC	200	84,4	300
	flgM-R	ACCGTTACGAATCGCCAGTT			300
<i>glnG</i>	glnG-F	CGGAGAGTACTTCGCAAATGC	99	82,7	600
	glnG-R	CGGAAAGCAGATTTTGATGA			600
<i>ydeI</i>	ydeI-F	AGGAGAGGACCGTTACGTTTTTC	90	77,1	150
	ydeI-R	GGCTGAACTTCTCGTCCATCA			150
<i>cpxP</i>	cpxP-F	TGAAGTCGGTTCAGGCGATAA	75	78,4	300
	cpxP-R	TCGAACATATGGCTCTGCGTACT			300
<i>opgB</i>	opgB-F	CAAGAGACGCTGGCAGTGAA	97	80,1	300
	opgB-R	TGCTACGACCAAGTCCGAGAT			300
<i>gapA</i>	gapA-F	TCGTCTGGAAAAAGCTGCAA	87	78,2	600
	gapA-R	TAGCCCAGAACGCCTTTCAT			600
<i>lpp</i>	lpp-F	CTCCAGCAACGCTAAAATCG	122	79,5	300
	lpp-R	CGTCATCTTTAGCAGCCTGAAC			300
<i>mdh</i>	mdh-F	GCTGCACGTTTTGGTCTGTCT	90	81,2	300
	mdh-R	GTACTGACCGTCGCCTTCAAC			300
<i>pgi</i>	pgi-F	AAGCTCTGCGTCCGTACAAAA	114	78,4	300
	pgi-R	CCAAGAACAGCGTGGTTTCC			300
<i>aroE</i>	aroE-F	GATCCCCTCATCGCTCATTC	90	74,5	300
	aroE-R	TGCTCACACCATGCCAGAAA			300
<i>gyrA</i>	gyrA-F	CGCAGACATCAACCTGGAAGA	139	80,9	300
	gyrA-R	ACGTGCGGCAGATTTACCTTT			300
<i>rplE</i>	rplE-F	CGCATGTGGGAGTTCTTTGA	118	80,4	300
	rplE-R	CACGGACACCCATGCTGTAG			300

qPCR smo izvedli na aparatu ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) v optični mikrotitrski ploščici s 384 vdolbinicami. Reakcijski pogoji za pomnoževanje tarčne cDNA so bili naslednji: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min (aktivacija polimeraze), v 40 ciklih so sledile stopnje 95 °C 15 sek (denaturacija DNA), 60 °C 1 min (naleganje začetnih oligonukleotidov in polimerizacija) in analiza talilne krivulje iz 60 °C do 95 °C.

Za analizo qPCR smo na podlagi vzorca cDNA, ki je vseboval cDNA združeno iz vseh vzorcev v enaki količini, najprej optimizirali koncentracijo cDNA in začetnih oligonukleotidov za analizo ter preverili specifičnost in učinkovitost pomnoževanja začetnih oligonukleotidov. Pripravili smo 10 µl reakcijske mešanice PCR, ki je vsebovala 2 µl ustrezno redčene cDNA, 5 µl mešanice Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), ustrezno količino 6 µM začetnih oligonukleotidov in vode

brez nukleaz (Qiagen). Testirali smo 4-krat, 20-krat in 400-krat redčeno cDNA in začetne oligonukleotide v koncentracijah 150, 300 in 600 nM. Preverjali smo tudi negativno kontrolo reverzne transkripcije kot tudi negativno kontrolo qPCR za vsak par začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici brez cDNA. Ploščice z napipetiranimi reakcijskimi mešanicami, smo pokrili z lepljivo folijo (Applied Biosystems) in ploščico centrifugurali 1 min pri $1000 \times g$ ter jo vstavili v aparat za qPCR.

Za posamezne amplikone cDNA genov smo z analizo krivulje pomnoževanja določili optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov, t.j. tisto kjer je prazni cikel C_t najnižji in ΔR_n (velikost nastalega signala) najvišji. Izbrana koncentracija je skupaj z zaporedjem začetnih oligonukleotidov podana v Preglednici 15.

Specifičnost začetnih oligonukleotidov smo potrdili s pregledom talilnih krivulj. Učinkovitost pomnoževanja z izbranimi začetnimi oligonukleotidi smo preverili tako, da smo z optimalnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov pomnoževali serijo 5 desetkratnih redčin združene cDNA. Iz podatkov intenzitet fluorescence smo izrisali umeritveno krivuljo in izračunali učinkovitost pomnoževanja. Učinkovitost pomnoževanja je bila med 90 % in 110 %. Določili smo tudi rang kvantifikacije, ki pomeni kakšno koncentracijo cDNA uporabiti za pomnoževanje, da dobimo produkte z vrednostjo C_t med 15 in 30. Določili smo, da 20-krat in 400-krat redčena cDNA ustreza.

Po končani reakciji PCR v realnem času smo podatke o intenziteti fluorescence obdelali s programom SDS 2.3 (Applied Biosystems) in dobili podatke o praznih ciklih C_t . Program je beležil podatke o intenziteti fluorescence kot posledice nastanka pomnožkov med vsakim ciklom reakcije PCR ter jih prikazal v krivulji pomnoževanja kot intenziteto fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pomnoževanja. Vrednosti C_t smo prenesli v program Microsoft Excell, kjer smo za vsak gen vsakega vzorca izračunali relativno izražanje gena iz vrednosti C_t z metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($\Delta\Delta C_t = [(C_{t \text{ tarčni gen}} - C_{t \text{ referenčni gen}})_{\text{tretiran vzorec}} - (C_{t \text{ tarčni gen}} - C_{t \text{ referenčni gen}})_{\text{netretiran vzorec}}]$) (Livak in Schmittgen, 2001).

Izražanje genov v tretirani in netretirani kulturi smo normalizirali glede na povprečno vrednost C_t treh referenčnih genov *lpp*, *aroE*, *gap*, ki smo jih določili s pomočjo programa GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>, 15. nov. 2011) (Vandesompele in sod., 2002). Testirali smo 7 referenčnih (gospodinjskih) genov *gapA*, *lpp*, *mdh*, *pgi*, *aroE*, *gyrA*, *rplE* in izbrali tri najbolj stabilne referenčne gene.

n-kratno povečanje ali zmanjšanje izražanja genov bakterijske kulture izpostavljene kolicinu M 60 min smo izrazili relativno glede na neizpostavljeno bakterijsko kulturo. Izračunane vrednosti $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vsake biološke ponovitve smo pretvorili v \log_2 razmerja vrednosti izražanja gena med tretirano in netretirano kulturo in izračunali povprečje treh ali štirih ponovitev.

3.2.20 Barvanje kapsule

Morebitno povečanje količine zunajceličnih polisaharidov (EPS) pri sevu *E. coli* MG1655, tretiranem s kolicinom M, smo opazovali z barvanjem kapsule. 80 μ l prekonočne kulture seva MG1655 smo precepili v 50 ml gojišča LB in stresali pri 200 obr./min in 37 °C. Ko je kultura dosegla OD₆₀₀ 0,6 smo jo razdelili na 2 dela in enega tretirali s 30 ng/ml kolicina M in stresali dalje. Po 60 min smo vzorčili 1 ml tretirane in netretirane kulture, centrifugirali in resuspendirali v majhnem volumnu fiziološke raztopine. Kapljico bakterijske kulture smo na objektnem stekelcu zmešali s kapljico barvila India Ink, ki obarva medcelični prostor črno, in razmazali s potegom z drugim stekelcem. Razmaz smo posušili na zraku. Nato smo celice fiksirali z absolutnim alkoholom za 2 min, odlili alkohol in počakali, da se je objektnik posušil. Dodali smo barvilo kristal vijolično za 2 min, ki obarva celice vijolično, kapsula pa ostane prozorna. Sprali smo z vodo in počakali, da se preparat posuši, ter pregledali celice pod vidno svetlobo pod imerzijskim objektivom mikroskopa Opton Axioskop.

3.2.21 Izolacija in kvantifikacija kolanske kisline

3.2.21.1 Izolacija zunajceličnih polisaharidov

Nastanek zunajceličnega polisaharida kolanska kislina (angl. colanic acid, CA), po tretiranju bakterijske kulture seva *E. coli* MG1655 s kolicinom M, smo dokazovali z izolacijo zunajceličnih polisaharidov in kvantifikacijo CA. Za pozitivno kontrolo produkcije CA smo uporabili sev *E. coli* MG1655 s pATC400 z genom *rcsA*⁺, ki konstitutivno proizvaja CA. Prekonočno kulturo bakterije *E. coli* MG1655 smo redčili 1:625 v 120 ml gojišča LB in gojili pri 200 obr./min in 37 °C do OD₆₀₀ 0,6. Takrat smo kulturo razdelili v 2 erlenmajerici po 50 ml kulture in eno tretirali s subinhibitornimi koncentracijami izoliranega kolicina M (30 ng/ml), netretirana kultura je služila kot negativna kontrola. Gojili smo naprej pri 200 obr./min in 37 °C. Zunajcelične polisaharide smo izolirali iz 40 ml vzorcev neodvisno gojenih bakterijskih kultur 60 min, 90 min in 120 min od takrat, ko so kulture dosegle OD₆₀₀ 0,6.

40 ml vzorcev kultur smo ohladili na ledu in nato 15 min kuhali v vreli vodi, da so se sprostil zunajcelični polisaharidi in denaturirali encimi, ki razgrajujejo EPS-e. Ko se je lizirana kultura ohladila na sobno temperaturo, smo jo centrifugirali 30 min pri 13200 \times g in 4 °C in supernatant shranili pri -20 °C. Polisaharide iz supernatanta smo z dodatkom treh volumnov (120 ml) ohlajenega 96-odstotnega etanola precipitirali preko noči. Nato smo mešanico centrifugirali 30 min pri 13200 \times g in 4 °C. Usedlino smo raztopili v 5 ml mrzle dH₂O, dializirali 2 dni pri 4 °C v celulozni vrečki z MWCO 3500 Da (Spectrum Laboratories) v dH₂O in nato liofilizirali 2 dni. Liofilizirane EPS-e smo raztopili v 5 ml 10-odstotne (v/v) triklorocetne kisline, s čimer smo precipitirali ostanke polipeptidov, in centrifugirali 30 min pri 13200 \times g in 4 °C. Supernatant z EPS-i smo

dializirali 5 dni pri 4 °C v dH₂O in nato vsebino ponovno liofilizirali. Nastali prah smo raztopili v 1 ml bidestilirane vode in kvantificirali kolansko kislino. Postopek izolacije CA temelji na objavljenem postopku, ki smo ga prilagodili (Kang in Markovitz, 1967; Bergmaier in sod., 2001; Obadia in sod., 2007).

3.2.21.2 Kvantifikacija kolanske kisline

Kolansko kislino smo določili z merjenjem količine metilpentoze ω -deoksiheksoze (L-fukoze), ki je komponenta kolanske kisline, s kolorimetrično reakcijo. Kot standard za umeritveno krivuljo smo uporabili komercialno L-fukozo (Sigma) s koncentracijami med 5 $\mu\text{g/ml}$ in 100 $\mu\text{g/ml}$. Za kvantifikacijo CA smo sočasno analizirali tretiran in netretiran vzorec iz enega poskusa. Raztopine standarda in po 100 μl raztopine EPS-ov smo v epruvetah redčili z mrzlo bidistilirano vodo do 1 ml in dodali 4,5 ml raztopine H₂SO₄/H₂O (6:1, v/v) ter premešali. Za slepo reakcijo smo uporabili 1 ml mrzle bidistilirane vode. Reakcijske mešanice smo pripravljali na ledu. Tako pripravljene vzorce smo nato kuhali 20 min v vreli vodi in ohladili na sobno temperaturo. Vsakemu vzorcu smo odvzeli 1 ml in izmerili absorbanco pri 396 nm (A_{396-0}) in 427 nm (A_{427-0}) in preostanku dodali 82 μl 3-odstotne raztopine cisteina, ter ponovno po 1 h izmerili absorbanco (A_{396-cy} in A_{427-cy}). Ker biološki ekstrakti pogosto vsebujejo komponente, ki pri gretju s H₂SO₄ tvorijo rjave produkte, ki absorbirajo med 396 nm in 427 nm, smo odšteli to nespecifično absorbcijo ΔA_{427} ($A_{427-cy} - A_{427-0}$) od celotne absorbcije vzorca ΔA_{396} ($A_{396-cy} - A_{396-0}$). Z umeritveno krivuljo smo pridobili vrednosti $\Delta A_{396} - \Delta A_{427}$ in odčitali koncentracijo CA v preučevanih vzorcih (Obadia in sod., 2007). Količino CA smo preračunali v μg ω -deoksiheksoze/ na enoto A_{600} / na ml kulture (Meredith in sod., 2007) in določili razmerje produkcije med tretirano in netretirano kulturo. Izračunali smo povprečje vrednosti najmanj dveh neodvisnih poskusov.

3.2.22 Kvantifikacija biofilma

Možnost nastanka biofilma po dodatku subinhibitornih koncentracij kolicina M kulturi seva MG1655 smo spremljali v mikrotitrskih ploščicah z barvanjem s kristal vijoličnim, kot je bilo opisano (Rijavec, 2008). Prekonočno kulturo seva MG1655 gojeno v LB pri 200 obr./min in 37 °C smo redčili 1:100 v gojišču LB in po 200 μl razpipetirali v sterilno polistirensko mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami in dodali kolicin M v koncentracijah od 100 ng/ml in v serijah 10-kratnih redčitev do 10⁻¹² ng/ml ter inkubirali 24 h in 48 h brez stresanja pri 37 °C. Za kontrolo smo imeli netretirano kulturo. Nepritrjene bakterijske celice smo odstranili z odstranitvijo gojišča in biofilm barvali z 0,2-odstotno raztopino barvila kristal vijolično za 15 min. Prebitek barvila smo odstranili s 3-kratnim spiranjem z bidistilirano vodo. Za sprostitvev barvila iz pritrjenih celic smo v jamice dodali 200 μl 96-odstotnega etanola in 125 μl vzorca prenesli v novo

mikrotitrsko ploščico in izmerili absorbanco pri 595 nm (DYNEX Technologies), da smo ocenili količino nastalega biofilma. Poskus smo ponovili najmanj trikrat.

3.2.23 Resonanca površinskih plazmonov SPR

Z analizo resonance površinskih plazmonov (SPR) (angl. surface plasmon resonance) smo preučevali vpliv deoksiribonukleotid trifosfatov dGTP, dATP, dCTP, dUTP, dTTP (Fermentas) na *in vitro* vezavo IscR na promotorsko zaporedje *cka*.

Metoda SPR omogoča meritve interakcij med biološkimi molekulami v realnem času, kot so protein-protein, protein-DNA, encim-substrat ali inhibitor, receptor-zdravilo, membrana-protein, itd. Je orodje za merjenje hitrosti asociacije in disociacije, ter s tem afinitete interakcij med molekulami na osnovi resonance površinskih plazmonov. Tehnologijo Biacore sestavljajo senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem. Molekule, ki se vežejo na površino čipa, spremenijo lomni količnik odbite polarizirane svetlobe, ker del energije vpadne svetlobe laserskega žarka privzame tanek sloj zlata. To povzroči upad in premik kota odbite svetlobe in fizikalni pojav imenujemo resonanca površinskih plazmonov (SPR). Spremembo kota, kjer se pojavi SPR, lahko izmeri optični detektor in ga prevede v spremembo odziva. Krivuljo, ki nam podaja spremembo odziva v času imenujemo senzorgram (Površinska..., 2009).

3.2.23.1 Priprava liganda

Na senzorski čip pripeto molekulo imenujemo ligand, v našem primeru DNA. Vezavni partner, ki ga s pomočjo mikrotekočinskega sistema spuščamo preko površine, pa analit, v našem primeru protein IscR. Za vezavo fragmenta DNA na čip je bil pripravljen 15 nt dolg začetni oligonukleotid S1, t. i. DNA sidro, na 3' koncu označen z biotinom. Njegovo zaporedje je podano v Preglednici 16 (Butala in sod., 2012). DNA sidro smo redčili 10000-krat v pufru SPR.

Specifična dvoverižna DNA promotorja *cka*, ki zajema IscR vezavno zaporedje in nespecifična DNA z mutiranim IscR vezavnim zaporedjem, ki ne veže IscR, sta bili pripravljene iz komplementarnih začetnih oligonukleotidov podanih v Preglednici 16. Komplementarna začetna oligonukleotida IscR_F in IscR_R ter IscR2m_F in IscR2m_R sta bila zmešana v razmerju 1 : 1,5 (mol : mol) v 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufru z 0,1 mM NaCl in združena pri temperaturnem gradientu od 94 °C do sobne temperature, v približno 1,5 h, v aparaturi PCR. Nastala sta fragmenta DNA dolžine 31 bp s 15 nt štrlečim koncem, komplementarnim DNA sidru (Butala in sod., 2012). DNA smo redčili v pufru SPR (1,5 µl DNA in 50 µl pufra SPR).

Preglednica 16: Začetni oligonukleotidi za pripravo liganda (DNA) (Butala in sod., 2012). Podčrtana sta mutirana nukleotida.

Table 16: Primers for DNA ligand preparing (Butala in sod., 2012). Mutated nucleotids are underlined.

S1	CGCTCGAGTAGTAAC-Bio
IscR_F	GTTACTACTCGAGCGGCATTGTCCATGTCAAGAGCATGGATTTTCA
IscR_R	TGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAATGC
IscR2m_F	GTTACTACTCGAGCGGCATTGT <u>G</u> CATGTCAAGAGCATG <u>C</u> ATTTTCA
IscR2m_R	TGAAAAT <u>G</u> CATGCTCTTGACATG <u>C</u> ACAATGC

3.2.23.2 Meritve SPR

Meritve SPR smo izvedli pri 25 °C na aparatu Biacore X (GE Healthcare) v Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete UL. Streptavidinski senzorni čip SA (GE Healthcare), ki ima 2 merilni celici in molekule streptavidina vezane na dekstran na površini celic, in mikrotekočinski sistem smo uravnotežili v pufru SPR (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,005-odstotni surfaktant P20 (GE Healthcare)). Čip smo pred nanosom DNA sidra sprali s 50 mM NaOH z 0,5 M NaCl pri pretoku 100 µl/min. DNA sidro smo injicirali pri pretoku 2 µl/min preko obeh merilnih celic in po približno 1,5 min na senzorni čip imobilizirali 30 odzivnih enot (RU) sidra. Nato smo na DNA sidro vezali fragmenta DNA preko 15 nt dolgega štrlečega konca. Preko celice 2 smo imobilizirali približno 80 RU specifičnega fragmenta DNA in preko celice 1 80 RU nespecifične DNA v 1–5 min pri pretoku 2 µl/min. Čip z nevezano DNA in kasneje tudi protein vezan na DNA, smo spirali z 0,75 M NaCl.

Za spremljanje vezave proteina IscR na DNA v odvisnosti od deoksiribonukleotid trifosfatov smo pripravili reakcijske mešanice s 162 µg IscR in posameznimi deoksiribonukleotid trifosfati končne koncentracije 2 mM v pufru SPR in jih inkubirali 5 min. Preko obeh celic čipa smo injicirali inkubirane mešanice pri pretoku 100 µl/min za 1 min, čemur je sledila 3 minutna disociacija proteina IscR iz DNA. Za kontrolo vezave samih deoksiribonukleotid trifosfatov smo, namesto z IscR, pripravili mešanice s pufrom, v katerem je shranjen IscR (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 40-odstotni glicerol, 0,2-odstotni Triton-X). Senzorni čip smo regenerirali z injiciranjem 0,75 M NaCl. S 50 mM NaOH smo iz čipa sprali hibridizirano DNA na sidrih.

Rezultate vezave smo analizirali s programom BIAevaluation Version 3.2 (Biacore AB, Švedska). Od odzivnih enot (RU) senzogramov vezave IscR na specifično DNA v kombinaciji z deoksiribonukleotid trifosfati na celici 2 so bile odštete RU senzogramov iz celice 1 z nespecifično DNA. Tako smo dobili senzogramove vezave IscR v različnih kombinacijah deoksiribonukleotid trifosfatov in jih primerjali s senzogramom brez deoksiribonukleotid trifosfatov in z le samimi deoksiribonukleotid trifosfati brez IscR.

3.2.24 Priprava plazmidov pCol z odpornostjo proti ampicilinu

V naravne plazmide z zapisom za kolicine iz zbirke Pugsley (Preglednica 4) pColD-CA23 (kolicin D), pColE2-P9 (kolicin E2), pColE5-099 (kolicin E5), pColE6-CT14 (kolicin E6), pPC101 (kolicin E8) smo s transpozicijo prenesli transpozon Tn3 z zapisom za odpornost proti ampicilinu (Ap^r). Kot donorski sev smo uporabili sev CL127 NaI^r s konjugativnim plazmidom pHly152-T8, ki ima zapis za transpozon Tn3. Ker sta kolicinogena seva BZB2125 in BZB2109 (z zapisom za kolicin E2 in E6) bila tako kot donor odporna proti NaI, je bilo za selektivnost transkonjugant potrebno izbrati vmesni donorski sev z odpornostjo proti drugemu antibiotiku. Ker vsi izbrani kolicinogeni sevi niso bili NaI^r, smo še ostale pripravili NaI^r. Za vmesni donorski sev smo izbrali RW118 z zapisom za odpornost proti streptomycinu (Sm^r).

3.2.24.1 Preverjanje odpornosti kolicinogenih sevov proti nalidiksični kislini in priprava odpornih sevov

Posamezne kolonije kolicinogenih sevov Pugslejeve zbirke BZB2103 (kolicin D), BZB2125, (kolicin E2), BZB2108 (kolicin E5), BZB2109 (kolicin E6) in PAP247 (kolicin E8) (Preglednica 3) smo iz plošč LB, inkubiranih preko noči pri 37 °C, precepili na plošče LB z NaI in inkubirali preko noči pri 37 °C. Od sevov BZB2103, BZB2108, PAP247, ki na plošči LB z NaI niso zrasli, smo po eno kolonijo iz plošče LB vcepili v 5 ml gojišča LB in preko noči stresali pri 200 obr./min in 37 °C. 200 µl prekonočne kulture smo razmazali na ploščo LB z NaI, inkubirali preko noči pri 37 °C in naslednji dan zrasle odporne kolonije precepili na novo ploščo LB z NaI ter inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.24.2 Preverjanje kolicinogenosti z metodo točkovnega nanašanja kolicinogenih sevov in prelivanja plošč

S sterilnimi zobotrepci smo na plošči LB z NaI v duplikatu napikirali že odporne in novo pripravljene kolicinogene seve z NaI^r. V 5 ml gojišča LB smo vcepili kolonijo indikatorskega seva DH5α, občutljivega za kolicine. Napikirane plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C, prav tako indikatorsko kulturo, ki smo jo stresali pri 200 obr./min. Naslednji dan smo eno ploščo izpostavili hlapom kloroforma za 15 min, da so kolonije lizirale, ter 15 min prezračevali. Nato smo v 4 ml mehkega agarja ogretega na 46 °C dodali 200 µl prekonočne kulture indikatorskega seva DH5α ter prelili preko liziranih kolonij. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Na podlagi con lize smo določili prisotnost kolicina. Kolonije iz duplikatne plošče smo uporabili za nadaljne delo.

3.2.24.3 Konjugativni prenos pHly152-T8 in transpozicija Tn3

Sev CL127 s konjugativnim plazmidom pHly152-T8 z zapisom za Ap^r na transpozonom Tn3 smo nacepili na ploščo LB z Ap. Sev RW118 s Sm^r smo nacepili na ploščo LB s Sm in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo postrgali nekaj kolonij CL127 in jih razmazali na ploščo LB brez antibiotika, čez smo razmazali nekaj kolonij seva RW118 in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo del konjugirane kulture precepili na ploščo LB z Ap, Sm za selekcijo transkonjugant RW118 Sm^r s pHly152-T8 Ap^r in inkubirali preko noči pri 37 °C.

Zrasle kolonije novega donorja RW118 s pHly152-T8 smo precepili na LB z Ap, Sm in inkubirali preko noči pri 37 °C in naslednji dan postrgali nekaj kolonij ter jih razmazali na plošče LB brez antibiotika. Čez smo razmazali nekaj kolonij posameznega recipientskega kolicinogenega seva (Nal^r) BZB2103, BZB2125, BZB2108, BZB2109 in PAP247. Konjugacija je potekala preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo del konjugirane kulture precepili na ploščo LB z Ap, Nal za selekcijo transkonjugant – kolicinogenih sevov, ki so prejeli konjugativni plazmid pHly152-T8.

3.2.24.4 Transpozicija Tn3

Za transpozicijo Tn3 v plazmid pCol smo del transkonjugant kolicinogenih sevov postrgali iz plošč in resuspendirali v 15 ml LB z Ap, Nal. Kulture smo inkubirali preko noči pri 30 °C brez stresanja in naslednji dan inkubirali še 8 h s stresanjem pri 200 obr./min in 30 °C. Nato smo iz kultur izolirali plazmidne DNA (Fermentas). Plazmidne DNA smo nato transformirali v sev DH5 α (Fermentas), s selekcijo transformant s plazmidi pCol z vstavljenim Tn3 na ploščah LB z Ap. Kolonije zraslih transformant smo precepili v 20 ml LB Ap, inkubirali preko noči pri 37 °C in 200 obr./min ter izolirali pDNA. Plazmidne DNA smo transformirali v sev BW25113 (Keio wt) in izbrali nekaj kolonij iz vsake transformacije za preverjanje kolicinogenosti po prej opisani metodi točkovnega nanašanja kolicinogenih sevov in prelivanja plošč. Tn3 bi se namreč lahko vključil na nepravo mesto in prekinil gene aktivnost, imunost ali lizo kolicina. Na podlagi kolicinogenosti kolonij smo za nadaljne delo izbrali plazmide pCol s transpozonom Tn3 in jih poimenovali pColD-Tn3, pColE2-Tn3, pColE5-Tn3, pColE6-Tn3, pColE8-Tn3. Plazmidno DNA smo za določitev promotorskih zaporedij kolicinov poslali sekvencirat (Macrogen) in zaporedja promotorjev podali v Prilogi A.

3.2.25 Priprava grobih kolicinskih ekstraktov in test kvantifikacije sinteze kolicinov s conami lize po indukciji odziva SOS

Da bi preverili, ali je izražanje genov izbranih nukleaznih kolicinov poleg proteina LexA odvisno tudi od transkripcijskega regulatorja IscR, kot je bilo predhodno ugotovljeno za nekatere porotvorne kolicine (Butala in sod, 2012), smo sintezo kolicinov spremljali v sevih BW25113 (Keio wt) in JW2515 (Keio Δ iscR).

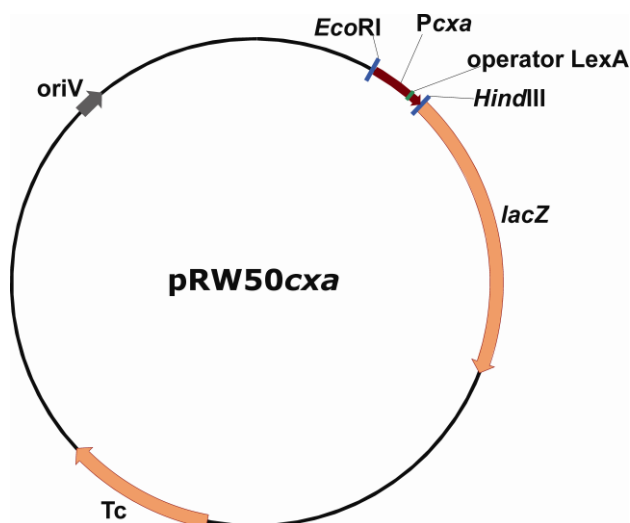
Plazmide z zapisom za kolicine pColD-Tn3, pColE2-Tn3, pColE5-Tn3, pColE6-Tn3, pColE7-Tn3, pColE8-Tn3 in pKCT1 smo transformirali v seva BW25113 (Keio wt) in JW2515 (Keio Δ iscR). Kolonijo transformante smo vcepili v 5 ml LB z Ap in preko noči stresali pri 200 obr./min in 37 °C. 100 μ l prekonočne kulture smo vcepili v 30 ml LB z Ap in inkubirali pri 200 obr./min in 37 °C. Ko so kulture dosegle OD₆₀₀ 0,3, smo dodali subinhibitorno koncentracijo 37 μ M Nal (Butala in sod, 2012), ki inducira odziv SOS in transkripcijo kolicinskih genov. Po 1 ml kulture smo vzorčili tik pred dodatkom Nal ter 1, 2 in 3 h po dodatku Nal, ter spremljali rast še naprej. Vzorke kultur smo ob odvzemu redčili do OD₆₀₀ 0,3 v 1-mililitrske vzorce, da je bilo v vseh vzorcih približno enako število celic in jih takoj zamrznili pri -20 °C do uporabe.

Grobe kolicinske ekstrakte smo pripravili z ultrazvočnim razbijanjem celic odmrznjenih vzorcev za 30 sek pri 40-odstotni moči na ledu in jih uporabili za test kvantifikacije sinteze kolicinov. 200 ml trdnega gojišča LB s Tc (za protiselekcijo kolicinogenih bakterij) v stekleni petrijevki (R = 19 cm) smo prelili s 120 ml raztopljenega in na 46 °C ohlajenega mehkega agarja z dodanimi 800 μ l prekonočne kulture indikatorskega seva DH5 α s pBR322 (Ap^rTc^r). Ko se je agar strdil smo z luknjačem izdoblili 4 mm žepke, ki smo jih napolnili do vrha s približno 120 μ l kolicinskih ekstraktov in inkubirali ploščo preko noči pri 37 °C. Poskus smo ponovili dvakrat.

Za natančnejšo oceno razlik količine sintetiziranih kolicinov med sevoma z in brez IscR smo naredili serije 10-kratnih redčitev kolicinskih ekstraktov. Po 5 μ l vzorcev smo nakapljali na plošče LB s Tc, prelite z indikatorsko kulturo DH5 α v mehkem agarju po prej opisani metodi nakapljane plošče, in določili pri kateri redčitvi se še pojavi cona lize.

3.2.26 Priprava transkripcijskih fuzij promotorjev genov z lacZ v pRW50

Plazmidni vektor pRW50, z zapisom za poročevalski gen *lacZ* brez lastnega promotorja, se pogosto uporablja za študije izražanja genov s testom β -galaktozidaze. Zaradi majhnega števila kopij in velikosti plazmida je izražanje genov na tem plazmidu primerljivo z izražanjem genov na bakterijskem kromosomu. Promotorske regije preučevanih genov smo vstavili v mesto *EcoRI*–*HindIII* in spojili z *lacZ* v plazmidu pRW50 kot je prikazano v shemi Slike 10.



Slika 10: Shema plazmida pRW50 z vstavljenim fragmentom regije promotorjev preučevanih kolicinov. *cxa* – gen aktivnosti določenega kolicina, *Pcx* – promotor tega kolicina, restrikcijski mesti *EcoRI* in *HindIII*.

Figure 10: Plasmid pRW50 with inserted promoter region of the studied colicins. *cxa* – colicin gene, *Pcx* – belonging colicin promoter, *EcoRI* and *HindIII* restriction sites.

V plazmidni vektor pRW50 smo vstavili promotorske regije izbranih nukleaznih kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D; promotorsko regijo gena *sulA* z dodanim vezavnim mestom represorja IscR promotorja gena *cka* – *psulA1*; in različici promotorja *cka*, z oslABLJENO vezavo LexA zaradi vstavljenega bp, ki loči prekrivajoči vezavni zaporedji LexA – *pcka1* in *pcka2* (Butala in sod., 2012), poleg tega je pri *pcka2* spremenjeno tandemsko zaporedje v konsenzno.

3.2.26.1 Priprava fragmentov promotorjev za kloniranje

3.2.26.1.1 Pomnoževanje promotorjev genov za kolicine s PCR

V Preglednici 17 so prikazani začetni oligonukleotidi, pogoji PCR in sestava reakcijske mešanice za pomnožitev regij promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8 in D za pripravo fuzij z *lacZ* v pRW50. Začetni oligonukleotidi imajo dodana *EcoRI* in *HindIII* restrikcijska mesta. Kot matrično DNA smo uporabili naravne kolicin kodirajoče plazmide z dodano Ap^r , in sicer pColE2-Tn3, pColE5-Tn3, pColE6-Tn3, pColE7-Tn3, pColE8-Tn3 in pColD-Tn3. Uspešnost pomnoževanja fragmentov smo preverili na 1,2-odstotnem agaroznem gelu.

Preglednica 17: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev regij promotorjev kolicinov za pripravo fuzij z *lacZ* v pRW50.

Table 17: Primers, PCR conditions and reaction mixture used for colicin promoter regions amplification for preparing *lacZ* fusions in pRW50.

Gen oz. odsek	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Velikost produkta (bp)	Pogoji verižne reakcije
<i>pcda</i>	colD beta F CTCGAATTCGCGTCGCTTTGTTTCCT	418	94 °C 4 min 94 °C 30 sek 67 °C 30 sek 30 × 72 °C 30 sek 72 °C 7 min
	colD beta R CCCAAGCTTCCTTCGTAATCACTCATA		
<i>pce2a</i> <i>pce5a</i> <i>pce6a</i>	colE2/E5/E6 beta F CTCGAATTCTCAACTCGGTTTAATCAGA	366	
	colE2/E5/E6 beta R CCTAAGCTTCATCGCCACCGCTCATAA		
<i>pce7a</i>	colE7 beta F CTCGAATTCTAAACTGGCGGAGAAACCTGT	301	
	colE7 beta R CTCAAGCTTCCATCTCCACCGCTCATAAA		
<i>pce8a</i>	colE8 beta F CTCGAATTCCTTTTTGCTGCCATCAACA	413	
	colE8 beta R CTCAAGCTTTCTCCACCGCTCATAAAAG		
Reakcijska mešanica			
začetni oligonukleotid 1 (vodilni)		0,5 µl 100 pmol/µl	
začetni oligonukleotid 2 (povratni)		0,5 µl 100 pmol/µl	
plazmidna DNA		0,3 µl	
2× PCR Master Mix s polimerazo <i>Taq</i>		25 µl	
bidestilirana voda		23,7 µl	

*podčrtana nukleotidna zaporedja so prepoznavna zaporedja restrikcijskih encimov *EcoRI* in *HindIII*.

3.2.26.1.2 Restrikcija s PCR pomnoženih fragmentov promotorjev kolicinov

S PCR pomnožene regije promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D smo cepili z restrikcijskima endonukleazama *EcoRI* in *HindIII* v reakcijski mešanici v Preglednici 18. PCR pomnožke smo pred in po restrikciji očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR (Fermentas).

Preglednica 18: Restrikcijska mešanica za pripravo fragmentov promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D.

Table 18: Composition of colicin E2, E5, E6, E7, E8, D promoter region fragment restriction mixture.

PCR pomnožek promotorja kolicina	10 µl
10× pufer FastDigest Green	3 µl
FD <i>EcoRI</i>	1 µl
FD <i>HindIII</i>	1 µl
bidestilirana voda	15 µl
skupaj	30 µl

*Restrikcija je potekala 15 min pri 37 °C.

3.2.26.1.3 Restrikcija promotorjev *sulA1*, *cka1* in *cka2* iz pUC57

Plazmide pUC57 s skonstruiranimi različicami promotorjev *psulA1*, *pcka1*, *pcka2* (GeneScript) smo cepili z restriksijskima endonukleazama *EcoRI* in *HindIII* v reakcijski mešanici v Preglednici 19. Fragmente *sulA1*, *cka1*, *cka2* smo ločili na 1,5-odstotnem agaroznem gelu in iz gela izrezali ustrezne fragmente. Fragmente smo očistili iz gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNA (Fermentas).

Preglednica 19: Restriksijska mešanica za pripravo fragmentov promotorskih regij *sulA1*, *cka1* in *cka2*.

Table 19: Composition of restriction mixture for *sulA1*, *cka1* and *cka2* promoter region fragment preparing.

pUC57 <i>cka1/ cka2/ sulA1</i>	25 µl
10× pufer FastDigest Green	3 µl
FD <i>EcoRI</i>	1 µl
FD <i>HindIII</i>	1 µl
skupaj	30 µl

*Restrikcija je potekala 20 min pri 37 °C.

3.2.26.2 Priprava vektorja pRW50

Plazmid pRW50*cka* smo cepili z restriksijskima endonukleazama *EcoRI* in *HindIII* v reakcijski mešanici podani v Preglednici 20. Cepljen vektor pRW50 smo ločili od fragmenta *cka* na 1-odstotnem agaroznem gelu in ga izrezali iz gela. Vektor smo očistili iz gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNA (Fermentas).

Preglednica 20: Restriksijska mešanica za pripravo vektorja pRW50.

Table 20: Composition of restriction mixture for vector pRW50 preparing.

pRW50 <i>cka</i>	10 µl
10× pufer FastDigest Green	2 µl
FD <i>EcoRI</i>	1 µl
FD <i>HindIII</i>	1 µl
bidestilirana voda	6 µl
skupaj	20 µl

*Restrikcija je potekala 25 min pri 37 °C.

3.2.26.3 Ligacija fragmentov promotorjev v pRW50

Ligacijo pridobljenih fragmentov promotorjev *pce2a*, *pce5a*, *pce6a*, *pce7a*, *pce8a*, *pcda*, *psulA1*, *pcka1*, *pcka2* v plazmidni vektor pRW50 (Tc^r) smo izvedli po prej opisanem postopku ligacije. Novo nastali plazmidi so bili poimenovani pRW50*ce2a*, pRW50*ce5a*, pRW50*ce6a*, pRW50*ce7a*, pRW50*ce8a*, pRW50*cda* ter pRW50*sulA1*, pRW50*cka1*, pRW50*cka2*. Ustreznost vstavljenih vključkov je bila določena s sekvenciranjem (Macrogen). Nukleotidna zaporedja so podana v Prilogi A in Prilogi B.

3.2.27 Rastni pogoji za spremljanje aktivnosti promotorjev v pRW50

3.2.27.1 Izražanje *cka* v prisotnosti in odsotnosti proteina IscR ob izobilju hranil

Plazmid pRW50*cka* smo transformirali v kompetentne celice sevov BW25113 (Keio wt) in JW2515 (Keio Δ *iscR*). Da bi preverili, ali je derepresija transkripcije *cka* z IscR v SOS-induciranih celicah v stacionarni fazi rasti povezana s pomanjkanjem hranil, smo gojili SOS-inducirane celice kultur Keio wt s pRW50*cka* in Keio Δ *iscR* s pRW50*cka* v okolju bogatem s hranili in spremljali, ali pride do derepresije. Ko sta sveže vcepljeni kulturi dosegli OD₆₀₀ 0,3, smo celice tretirali s 37 μ M Nal. Celice smo ohranjali pri celični gostoti do OD₆₀₀ 0,4, v okolju bogatem s hranili, s periodičnim dodajanjem svežega gojišča z Nal. Ko je kultura dosegla OD₆₀₀ 0,4, smo jo redčili 2x s svežim gojiščem LB s Tc in subinhibitorno koncentracijo Nal, kar je bilo na približno 30 min oz. odvisno od rasti kulture. Tik pred redčenjem smo vzorčili 1 ml kulture za merjenje aktivnosti β -galaktozidaze. Poskus smo ponovili trikrat.

3.2.27.2 Izražanje *cka*, *cka1*, *cka2* in *sulA1* in genov nukleaznih kolicinov v prisotnosti in/ali odsotnosti proteina IscR

Za preučevanje vloge proteina IscR pri regulaciji transkripcije kolicina K smo plazmide pRW50*cka*, pRW50*sulA1*, pRW50*cka1* in pRW50*cka2* transformirali v seva BW25113 (Keio wt) in JW2515 (Keio Δ *iscR*) ter spremljali izražanje preučevanih genov ob indukciji odziva SOS z Nal.

Za spremljanje aktivnosti promotorjev izbranih nukleaznih kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D in protovornega kolicina K ob indukciji odziva SOS ali brez indukcije smo plazmide pRW50*ce2a*, pRW50*ce5a*, pRW50*ce6a*, pRW50*ce7a*, pRW50*ce8a*, pRW50*cda* in pRW50*cka* transformirali v sev BW25113 (Keio wt).

Kolonije svežih transformant smo vcepili v 5 ml gojišča LB s Tc in stresali preko noči pri 200 obr./min in 37 °C. 100 μ l prekonočnih kultur smo precepili v 30 ml tekočega gojišča LB s Tc in stresali pri 200 obr./min in 37 °C. Ko so kulture dosegle OD₆₀₀ 0,3, smo jih tretirali s 37 μ M Nal/ ali jih nismo, ter nadaljevali z gojenjem. Vsako uro smo izmerili OD₆₀₀ in vzorčili 1 ml kulture, katerega smo zamrznili pri -20 °C. Vzorce smo uporabili za ovrednotenje β -galaktozidazne aktivnosti. Poskus smo ponovili večkrat.

3.2.27.3 Izražanje *ce8a* v odsotnosti različnih transkripcijskih regulatorjev

Za DNazni kolicin E8, ki je kazal največji zamik v sintezi in transkripciji v sevu Keio wt, smo določali morebitne transkripcijske regulatorje s testom »pull down« in masno spektrometrijo. Da bi spremljali aktivnosti promotorja kolicina E8 ob odsotnosti teh regulatorjev transkripcije, smo plazmid pRW50*ce8a* transformirali (Fermentas) v

izbrane seve Keio: BW25113 (wt), JW2515 (Δ *iscR*), JW3721 (Δ *asnC*), JW5567 (Δ *yihW*), JW3386 (Δ *glpR*), JW0824 (Δ *deoR*), JW0494 (Δ *allR*), JW2676 (Δ *srlR*), JW1149 (Δ *ycgE*), JW1586 (Δ *dgsA*), JW2947 (Δ *glcC*), JW1759 (Δ *ydjF*), JW5698 (Δ *frlR*), JW2776 (Δ *fucR*), JW2088 (Δ *yegW*), JW0142 (Δ *sfsA*), JW5946 (Δ *gntR*), JW3579 (Δ *lldR*), JW0719 (Δ *mngR*), JW5114 (Δ *ybjK*), JW3368 (Δ *ompR*), JW2642 (Δ *ygaV* ali *hlyU*), JW2092 (Δ *rcnR* ali *yohL*), JW3468 (Δ *arsR*), JW2705 (Δ *ygbI*), JW0612 (Δ *citB* ali *dpiA*), JW3883 (Δ *cpXR*), JW5627 (Δ *dgoR*), JW0797 (Δ *dps*), JW0980 (Δ *torR*), JW2644 (Δ *stpA*), katerih ustreznost smo preverili z metodo PCR. Preliminarni poskus transkripcijske aktivnosti smo naredili tako, da smo transformante precepili v 10 ml LB s Tc in stresali do OD₆₀₀ ca. 0,3, ko smo dodali 37 μ M Nal in stresali preko noči. Naslednji dan smo vzorčili 1 ml kulture in izmerili aktivnost β -galaktozidaze. Na podlagi tega preliminarnega pregleda aktivnosti transkripcije smo za natančnejši pregled transkripcijske aktivnosti ob indukciji odziva SOS izbrali Keio sev wt in seve s posameznimi delecijami *asnC*, *yihW*, *yegW*, *mngR*, *ybjK*, *stpA*, ki so kazali višjo transkripcijsko aktivnost promotorja kolicina E8. Gojili smo po rastnih pogojih opisanih v prejšnjem odstavku.

3.2.27.3.1 Preverjanje ustreznosti sevov zbirke Keio z metodo PCR

V Preglednici 21 so prikazani začetni oligonukleotidi, pogoji PCR in sestava reakcijske mešanice za potrditev ustreznosti preučevanih sevov zbirke Keio, oz. delecije gena. Začetnik Keio1Kn je povratni oligonukleotid, ki nalega v vstavljeni kanamicinski kaseti (*kan*), ostali vodilni oligonukleotidi nalegajo 200–150 bp navzgor od mesta ATG gena. Če sev ustreza, nastane pri PCR produkt dolžine med 600 in 800 bp. Za matrično DNA smo uporabili kar DNA lizatov kolonij.

Preglednica 21: Začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za potrditev ustreznosti sevov zbirke Keio.

Table 21: Primers, PCR conditions and reaction mixture used for Keio collection strains confirmation.

Gen oz. odsek	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Pogoji verižne reakcije
<i>kan</i>	Keio1Kn CAGTCATAGCCGAATAGCCT	94 °C 4 min 94 °C 30 sek 55 °C 30 sek 30 × 72 °C 1 min 72 °C 7 min
<i>iscR</i>	iscR P1 CGCATCCGACAACAGGTAC	
<i>asnC</i>	asnC pre CTGCGTCCTGTTGCTTATGA	
<i>yihW</i>	yihW pre GCAACAAGTGGGGATTTAGC	
<i>glpR</i>	glpR pre TCCGCAAAGTGGCATTAC	
<i>deoR</i>	deoR pre GGATTGCTGGCAGGTATGAT	
<i>allR</i>	allR pre GTCTGGCATCACCCACTTTT	
<i>srlR</i>	srlR pre AGCCCAGATGTGATCTTTCC	
<i>ycgE</i>	ycgE pre TCAGCACATTCTTTCACATGATT	
<i>dgsA</i>	dgsA pre TGCTCTCAGGTGAGGGAA	
<i>glcC</i>	glcC pre GGGCTTTTCGTTTTTCGTCTA	

se nadaljuje

nadaljevanje

<i>ydjF</i>	ydjF pre	CAGACGCAACATTGATGAGG	
<i>fliR</i>	fliR pre	GGCGAAAACCATTTCAGTACC	
<i>fucR</i>	fucR pre	CTGACATCATCCGCATCAAT	
<i>gntR</i>	gntR pre	CGTGCTGATGTACGCTTCC	
<i>lldR</i>	lldR pre	GATGATCTCCCCGCAATCTA	
<i>mngR</i>	mngR pre	TGGGTCAGAGTCGTCAGATTC	
<i>ybjK</i>	ybjK pre	CCAGGACGCCATTAACAG	
<i>ompR</i>	ompR pre	CGCACATTGGGTATAACGTG	
<i>hlyU</i>	hlyU pre	CTCCAGAAACCCATATGTACTCC	
<i>yohL</i>	yohL pre	GATGAAGAACCAGGCGTTTC	
<i>arsR</i>	arsR pre	CGTCCTGATTCAGACCTCCTT	
<i>dpiA</i>	dpiA pre	GAGCAGGGGTCAGTACG	
<i>cpxR</i>	cpxR pre	CTGCAAACATGCGTCAGG	
<i>dps</i>	dps pre	TGGCGAGCAGATAAATAAGAA	
<i>torR</i>	torR pre	CGTAGCGGTTCCAGAGT	
<i>stpA</i>	stpA pre	GCCGCTCTGTTACCAAT	
Reakcijska mešanica			
začetni oligonukleotid (vodilni)			0,4 µl 100 pmol/µl
začetni oligonukleotid Keio1Kn (povratni)			0,4 µl 100 pmol/µl
kolonija seva Keio			/
2× <i>DreamTaq</i> Green PCR Master Mix			10 µl
bidestilirana voda			9,2 µl

3.2.28 Test aktivnosti β-galaktozidaze

β-galaktozidazni test je klasični kolorimetrični test, s katerim spremljamo izražanje preučevanega gena s sledenjem izražanja poročevalskega gena *lacZ* z zapisom za β-galaktozidazo brez lastnega promotora. Encimsko aktivnost β-galaktozidaze, ki hidrolizira substrat *o*-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid (ONPG) v brezbarvno galaktozo in rumeni *o*-nitrofenol, izmerimo s hitrostjo nastanka rumene barve in s spektrofotometričnim merjenjem OD₄₂₀. Količina nastalega *o*-nitrofenola je proporcionalna količini β-galaktozidaze v času reakcije. Reakcijo ustavimo z dodatkom Na₂CO₃, ki zviša pH reakcijske mešanice na pH 11, pri katerem je večina *o*-nitrofenola spremenjena v rumeno obarvano anionsko obliko in β-galaktozidaza inaktivirana. Ker so prisotne v reakciji celotne celice, ki so permeabilizirane, da vstopi ONPG v celice, absorbirajo pri 420 nm tudi celice. Zato merimo optično gostoto še pri 550 nm, kjer absorbirajo le celice in ne *o*-nitrofenol. Sipanje pri 420 nm je 1,75-krat več kot pri 550 nm, zato je absorbanca *o*-nitrofenola določena z odštevanjem $1,75 \times OD_{550}$. β-galaktozidazna aktivnost podana v enotah U je izračunana po enačbi $U = OD_{420} - (1,75 \times OD_{550})/t \times \text{redčitev} \times OD_{600}$ (Miller, 1972).

1-mililitrske vzorce bakterijskih kultur smo odmrznili in ločili celice od gojišča s centrifugiranjem 5 min pri 13000 obr./min. Usedlino celic smo 2-krat sprali v 1 ml pufra Z. Celice smo nato v suspenziji v pufri Z lizirali z dodatkom 28 µl kloroforma in

14 µl 0,1-odstotnega NaDS-a ob vorteksiranju za 15 sek. Lizate smo ustrezno redčili (2-krat, 10-krat, 50-krat) v pufru Z do 1 ml v epruveti, inkubirali 5 min pri 28 °C, dodali 200 µl substrata ONPG (4 mg/ml), ter merili čas reakcije do spremembe barve v rumeno. Takrat smo reakcijo ustavili z dodatkom 500 µl razopine Na₂CO₃ (1 M). Nato smo izmerili vrednost OD pri 420 in 550 nm. Za negativno kontrolo smo uporabili namesto 1 ml vzorca lizata 1 ml pufru Z (Sambrook in sod., 1989).

3.2.29 Izolacija proteinov vezanih na promotorsko regijo kolicina E8 s testom »pull down«

Na podlagi rezultatov transkripcije in sinteze kolicinov E2, E5, E6, E7, E8 in D v sevu Keio wt smo izmed kolicinov, ki so kazali največji zamik v sintezi in transkripciji, izbrali kolicin E8 za nadaljne raziskave možnih regulatorjev transkripcije s testom »pull down«, ki je metoda lovljenja proteinov na DNA in njihova izolacija.

3.2.29.1 Priprava z biotinom označene promotorske regije kolicina E8 z metodo PCR

V Preglednici 22 so prikazani začetni oligonukleotidi, pogoji PCR in sestava reakcijske mešanice za pomnožitev regije promotorja kolicina E8 za vezavo na magnetne kroglice (Invitrogen Life Technologies). Regijo promotorja kolicina E8, dolgo 179 bp, smo pomnožili iz plazmida pColE8-Tn3 in med samo reakcijo PCR označili produkt na 5' z molekulo biotina. Uspešnost pomnoževanja smo preverili na 1,8-odstotnem agaroznem gelu. V 50 reakcijskih mešanicah PCR smo pridobili približno 50 µg biotinilirane DNA. PCR produkte smo očistili in skoncentrirali s kompletom za čiščenje produktov PCR (Fermentas).

Preglednica 22: Uporabljeni začetni oligonukleotidi s pogoji in reakcijsko mešanico PCR za pomnožitev biotinilirane regije promotorja kolicina E8.

Table 22: Primers, PCR conditions and reaction mixture used for amplification of biotinylated colicin E8 promoter region.

Gen oz. odsek	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Velikost produkta (bp)	Pogoji verižne reakcije
<i>pce8a</i>	Bio-Pull_F E8 [Btn]GCTCTGCGTTTTCTAAGTGTTATC	179	94 °C 4 min 94 °C 30 sek 59 °C 30 sek 30 ×
	Pull_R E8 CACCGCTCATAAAAGTCCCTCTTT		72 °C 15 sek 72 °C 7 min
Reakcijska mešanica			
začetni oligonukleotid Bio-Pull_F E8 (vodilni)		0,25 µl 100 pmol/µl	
začetni oligonukleotid Pull_R E8 (povratni)		0,25 µl 100 pmol/µl	
plazmid pColE8-Tn3		0,25 µl	
2× PCR Master Mix s polimerazo <i>Taq</i>		25 µl	
bidestilirana voda		24,25 µl	

3.2.29.2 Vezava biotinitirane regije promotorja kolicina E8 na magnetne kroglice

10 mg magnetnih kroglic M-280 Streptavidin Dynabeads smo pripravili in sprali z $1\times$ pufrom B&W po navodilih proizvajalca (Invitrogen Life Technologies). 5 mg magnetnih kroglic smo uporabili za kontrolo vezave proteinov na kroglice brez DNA. Na drugih 5 mg magnetkov smo za poskuse vezave proteinov na DNA vezali 50 μg biotinitirane regije promotorja kolicina E8. Na rotirajočem kolesu smo pri sobni temperaturi mešanico magnetkov in DNA inkubirali z nežnim obračanjem 15 min in nato magnetke sprali po navodilih proizvajalca (Invitrogen Life Technologies).

3.2.29.3 Priprava grobega celičnega ekstrakta, vezava celičnih proteinov na DNA na magnetnih kroglicah in elucija vezanih proteinov

Kolonijo seva *E. coli* Keio wt s pRW50*ce8a* smo vcepili v 20 ml LB s Tc in stresali pri 200 obr./min in 37 °C. Po 2,5 ml prekonočne kulture smo precepili v 4 erlenmajerice s 500 ml LB in spektrofotometrično spremljali rast pri 180 obr./min in 37 °C. Ko so kulture dosegle OD₆₀₀ 0,5, smo v treh kulturah inducirali SOS z Nal (37 μM), ena je ostala neinducirana kontrola. Kulture smo pod enakimi pogoji gojili še 45 min, nakar smo jih ohladili v ledeni vodi in centrifugirali 20 min pri $4000\times g$ in 4 °C. Supernatant smo odstranili in celice sprali v 30 ml ledeno mrzle 0,9-odstotne NaCl. Po ponovnem centrifugiranju smo supernatant odstranili in celice zamrznili v tekočem dušiku ter jih do uporabe hranili pri -80 °C. Celice smo nato resuspendirali v 11 ml 50 mM Tris-HCl pufra za lizo (pH 7,5 pri 4 °C), s 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, inhibitorji proteaz brez EDTA, RNazoA, lizocimom, in 10 min inkubirali pri sobni temperaturi ter ohladili na ledu. Celice smo dokončno lizirali z ultrazvočnim razbijanjem na ledu 3-krat po 20 sek, pri 40-odstotni moči. Lizat smo nato dvakrat centrifugirali 30 min pri $17000\times g$ in 4 °C, da smo dobili bistri celični ekstrakt.

Proteine celičnih ekstraktov smo na magnetne kroglice vezali v štirih kombinacijah. (1) Ekstrakt tretirane kulture smo vezali na same magnetne kroglice. (2) Ekstrakt tretirane kulture smo vezali na magnetne kroglice z DNA. (3) Ekstrakt tretirane kulture smo vezali na magnetne kroglice z vezano DNA in LexA. 60 μg čistega proteina LexA koncentracije 5,25 mg/ml (M. Butala) smo vezali na DNA na magnetnih kroglicah v 1 ml $1\times$ LexA vezavnega pufra (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) s 5-minutno inkubacijo na ledu. Magnetne kroglice smo zbrali in odvečni LexA sprali z 1 ml pufra za spiranje (20 mM HepesNa, 100 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20). (4) Ekstrakt netretirane kulture smo vezali na magnetne kroglice z DNA.

Celični ekstrakt smo dodali magnetnim kroglicam in v 50 ml-centrifugirki v vodoravnem položaju inkubirali na ledu 10 min z rahlim mešanjem. Magnetne kroglice smo zbrali na steni centrifugirke in supernatant prelili v novo 50 ml-centrifugirko ter zbrali ostanke magnetnih kroglic in odstranili supernatant. V vsako centrifugirko smo

dodali po 1 ml pufra za spiranje (20 mM HepesNa, 100 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20), resuspendirali magnetke in jih prenesli v mikrocentrifugirko, kjer smo jih še 4× sprali z 1 ml pufra za spiranje, da smo odstranili nevezane proteine.

Vežane proteine smo eluirali z visoko koncentracijo soli. Magnetne kroglice smo resuspendirali v 500 µl pufra za elucijo (20 mM HepesNa, 800 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween) in inkubirali pri sobni temperaturi 5 min z rahlim obračanjem na rotirajočem kolesu. Magnetne kroglice smo zbrali na steni in iz DNA eluirane proteine v supernatantu oborili s TCA. Magnetne kroglice smo nato za naslednjo uporabo sprali 3× z 1× pufrom B&W po navodilih proizvajalca (Invitrogen Life Technologies).

3.2.29.4 Obarjanje iz DNA eluiranih proteinov s TCA

Vzorcu proteinov smo dodali 50-odstotno TCA do končne koncentracije 10-odstotne TCA: k 500 µl elucijske frakcije smo dodali 125 µl 50-odstotne TCA in inkubirali na ledu 10 min. Nato smo centrifugirali 20 min pri 14000 obr./min in 4 °C, ter odstranili supernatant. Usedlino smo sprali v 300 µl ledeno hladnega acetona s 3-kratnim obračanjem mikrocentrifugirke. Nato smo centrifugirali 20 min pri 14000 obr./min in 4 °C, ter odstranili aceton. Usedlino smo posušili v 15 min pri 37 °C ter jo do analize s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z NaDS shranili pri -20 °C.

3.2.30 Analiza proteinov vezanih na promotorsko regijo kolicina E8 z masno spektrometrijo

S TCA oborjene proteine, vezane na promotorsko regijo kolicina E8, smo ločili z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu z NaDS. Oborine smo raztopili v 15 µl dH₂O, dodali 5 µl nanašalnega pufra 4× NuPAGE LDS Sample buffer in reducent DTT v 50 mM končni koncentraciji. Vzorce v reakcijski mešanici smo kuhali 5 min v vreli vodi, ohladili na ledu in nanесли na predpripravljen poliakrilamidni gel NuPAGE Bis-Tris 12-odstotni gel z 10 žepki. Za kontrolo smo na gel nanесли 3 µl proteina LexA in ga enako pripravili kot vzorce. Elektroforezo in barvanje gela smo izvedli po prej opisanem postopku. Primerjali smo proteinske profile in iskali razlike v profilu celičnih proteinov, če je bila kultura inducirana ali ne, in če je na DNA predhodno bil vezan LexA ali ne.

Zanimive lise smo previdno izrezali iz gela, vsako z novim skalpelom, in zapakirali v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami, ki smo jo zamrznili pri -20 °C do pošiljanja na analizo za identifikacijo proteinov z masno spektrometrijo, ki so jo opravili na Advanced Mass Spectrometry Facility, School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham. Vzorca so bili cepljeni s tripsinom, aminokislinsko zaporedje določeno s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo LC-MS/MS na aparaturi Orbitrap in podatki analizirani.

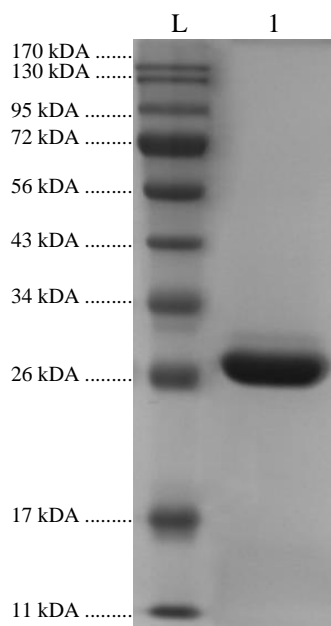
4 REZULTATI

4.1 ODZIV *E. coli* MG1655 NA TRETIRANJE S KOLICINOM M

Za preučevanje sprememb v izražanju genov občutljivega bakterijskega seva *E. coli* MG1655 ob tretiranju s subinhibitorno koncentracijo kolicina M z analizo z DNA mikromrežami smo najprej izolirali čisti kolicin M. Kolicinu M smo določili aktivnost na trdnem gojišču in stabilnost ter subinhibitorno koncentracijo za tekočo kulturo seva *E. coli* MG1655. Določili smo, kdaj bomo vzorčili kulturo za izolacijo RNA za preučevanje diferenčnega izražanja genov z DNA mikromrežami po tretiranju s kolicinom M. Rezultate DNA mikromrež smo validirali s PCR v realnem času. Da bi razjasnili, ali spremembe v izražanju genov vodijo v fiziološke oz. morfološke spremembe celic, smo kvantificirali sintezo zunajceličnih polisaharidov in nastanek biofilma.

4.1.1 Izolacija kolicina M

Vir genov *cma* in *cmi* za aktivnost in imunost kolicina M, ki smo ju klonirali v plazmid za izražanje genov, je bil kolicinogeni sev Pugsleyeve zbirke PAP1. Priprava plazmida pColM-imm za izražanje genov *cma* in *cmi* in izolacija kolicina M sta opisani v poglavju Materiali in metode. pColM-imm smo transformirali v kompetentne celice seva BL21(DE3)pLysS, ki je omogočil sintezo velike količine kolicina M. Kolicin M smo zaradi dodanega histidinskega repka (His-tag) lahko izolirali s pomočjo nikljeve afinitetne kromatografije. Čistost in ustreznost velikosti kolicina M smo preverili z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu z NaDS (NaDS-PAGE) in sliko gela podali v Sliki 11. Izražanje in izolacija kolicina sta bili uspešni, saj smo izolirali protein ustrezne velikosti (29,5 kDa) in čistosti, kot je razvidno iz Slike 11. Koncentracijo kolicina M, ki je znašala 3,4 mg/ml, smo določili spektrofotometrično z Nanodropom in s kompletom BCA.



Slika 11: Slika gela NaDS-PAGE prikazuje čistost in velikost izoliranega kolicina M. (L) lestvica molekulske mase proteinov PageRuler, (1) kolicin M.

Figure 11: SDS-PAGE gel showing purity and molecular weight of used isolated colicin M. (L) Molecular weight ladder PageRuler, (1) colicin M.

4.1.2 Aktivnosti kolicina M na trdnem gojišču in subinhibitorna koncentracija v tekočem gojišču

4.1.2.1 Aktivnost in stabilnost kolicina M

Aktivnost in stabilnost kolicina M smo določali z metodo nakapljanih plošč. Čisti kolicin M smo redčili v gojišču LB in ga nakapljali na plošči LB z indikatorskima kulturama bakterijskih sevov *E. coli* DH5 α in MG1655. Rezultati nastalih con lize so podani v Preglednici 23 in kažejo, da je kolicin M zelo aktiven, in da je sev MG1655 le malo manj občutljiv kot sev DH5 α . Na trdnem gojišču so bile subinhibitorne koncentracije kolicina M za tretiranje seva MG1655 nižje od koncentracije 50 ng/ml, ki smo jo določili za minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC).

Preglednica 23: Cone lize pri tretiranju sevov *E. coli* DH5 α in MG1655 s kolicinom M na ploščah LB. (čista cona: ++, motna cona: +, komaj vidna cona: - +, cone ni: -)

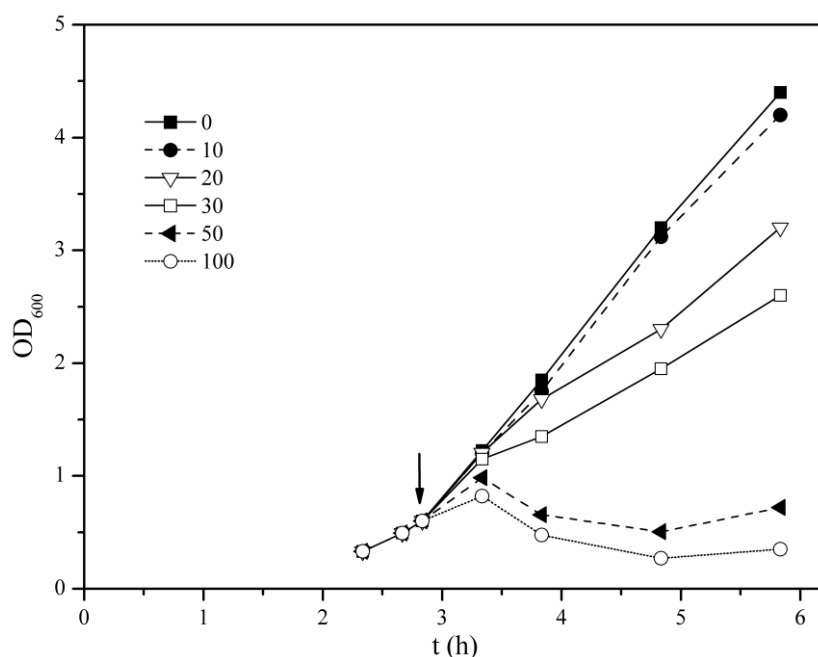
Table 23: Zone of inhibition of *E. coli* strains DH5 α and MG1655 after colicin M treatment. (clear zone: ++, opaque zone: +, hardly visible zone: - +, no zone: -)

koncentracija kolicina M	DH5 α	MG1655
3 μ g/ml	++	++
500 ng/ml	++	++
50 ng/ml	++	+
10 ng/ml	+	- +
5 ng/ml	- +	-
1 ng/ml	-	-

Preverili smo tudi, ali je kolicin M stabilen v gojišču LB in pri daljši inkubaciji pri 37 °C, kar je pomembno za nadaljnje poskuse. Iste redčitve kolicina M kot prej smo inkubirali 24 h pri 37 °C in jih nakapljali na ploščo LB z indikatorsko kulturo seva *E. coli* MG1655. Inkubiran kolicin M je kazal enako aktivnost kot sveže pripravljene redčitve, torej kolicin M je stabilen pri 37 °C in v gojišču LB.

4.1.2.2 Določitev subinhibitorne koncentracije v tekočem gojišču

Za preučevanje vpliva kolicina M na izražanje genov občutljivega bakterijskega seva *E. coli* MG1655 smo določili subinhibitorno koncentracijo kolicina M tekoče bakterijske kulture gojene pri 37 °C in izbrali časovne točke za vzorčenje kulture po tretiranju. Tekočo kulturo seva MG1655 smo pri OD₆₀₀ 0,6 tretirali z več koncentracijami kolicina M in vsake 30 min izmerili OD₆₀₀. Iz rasti krivulj na Sliki 12 je razvidno, da je za inhibicijo rasti kulture potrebna zelo nizka koncentracija kolicina M, saj je že 50 ng/ml povzročilo padec v rasti kulture. Za subinhibitorno koncentracijo kolicina M smo izbrali koncentracijo 30 ng/ml, pri kateri se je rast bakterij le upočasnila. Rast se 30 minut po izpostavljanju subinhibitorni koncentracije kolicina M ni spremenila, medtem ko se je po 60 minutah v primerjavi s kontrolo upočasnila. Zato smo ti dve časovni točki izbrali za izolacijo RNA za študijo izražanja genov z mikromrežami in qPCR.



Slika 12: Rastna krivulja seva MG1655 tretiranega z različnimi koncentracijami kolicina M. Koncentracije v legendi so v ng/ml, puščica kaže čas ob dodatku kolicina (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013).

Figure 12: Growth curves of strain MG1655 treated with different concentrations of colicin M. Concentration unit in legend is ng/ml, the arrow denotes time of colicin addition (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013).

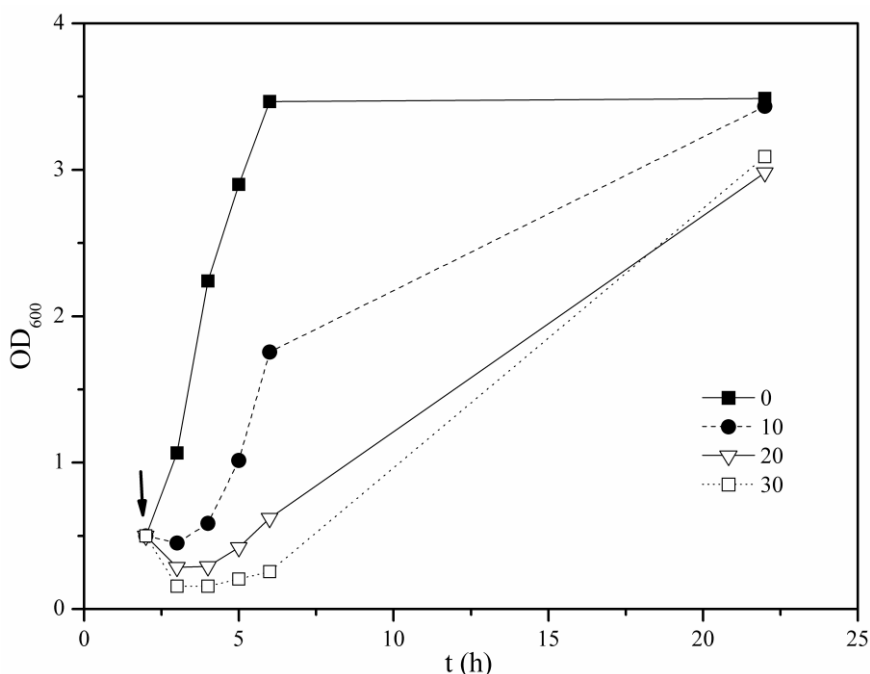
4.1.3 Vpliv kolicina M na odziv SOS

Vpliv kolicina M na indukcijo odziva SOS v občutljivih bakterijskih celicah smo najprej preverili s hitrim testom z uporabo fuzije promotorja gena odziva SOS, *umuD*, in poročevalskega gena *gfp* brez lastnega promotorja na plazmidu pSC202 v sevu *E. coli* MG1655. Aktivaciji promotorja po dodatku kolicina M smo sledili na podlagi sinteze GFP na ravni posameznih celic s fluorescenčno mikroskopijo.

Za kontrolo indukcije SOS smo uporabili mitomicin C. Kulturo seva MG1655 s pSC202 smo ob OD_{600} 0,6 tretirali z 0, 10 in 100 ng/ml kolicina M in 0,5 μ g/ml mitomicina C ter mikroskopirali vzorce kultur odvzetih 1 h in 3 h po tretiranju. Opazovali smo obliko in fluorescenco bakterijskih celic. Pri indukciji odziva SOS z mitomicinom C so po 1 h bile vse celice dolge zaradi aktivacije gena *sulA*, katerega produkt prekine delitev celic ob poškodbah DNA, in po 3 h so fluorescirale. Oboje kaže na indukcijo odziva SOS. Netretirane bakterijske celice in tretirane z 10 in 100 ng/ml kolicina M so bile po 1 h nespremenjenih oblik in niso fluorescirale. Kolicin M v koncentraciji 100 ng/ml je povzročil obsežno lizo kulture. Po 3 h so bile celice netretiranih in s kolicinom M tretiranih kultur normalne velikosti, z le nekaj izjem podaljšanih celic, ki so fluorescirale. Ker ni bilo razlik v obliki in fluorescenci celic med netretirano in s kolicinom M tretirano kulturo sklepamo, da kolicin M ne sproži odziva SOS.

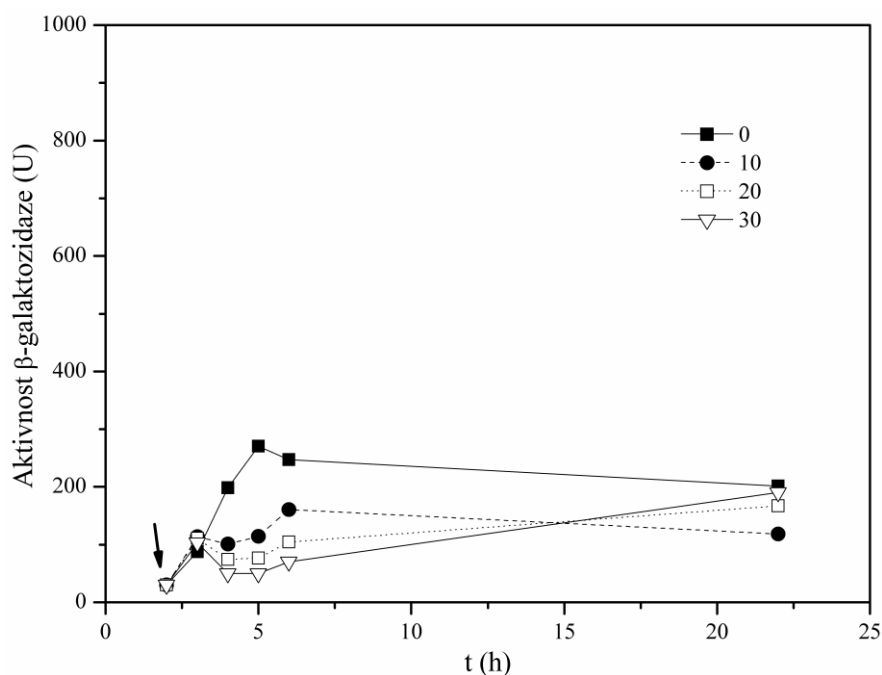
Da kolicin M ne sproži odziva SOS, smo dodatno dokazovali z metodo spremljanja aktivnosti β -galaktozidaze seva *E. coli* ENZ1257 s transkripcijsko fuzijo promotorja gena *sulA* z *lacZ* na kromosomu. Kulturo seva ENZ1267 smo pri optični gostoti OD_{600} 0,5 tretirali z nizkimi koncentracijami kolicina M, za katere smo ugotovili, da so bile subinhibitorne za sev MG1655. Kulturi smo dodali 0, 10, 20 ali 30 ng/ml kolicina M in merili β -galaktozidazno aktivnost vzorcev odvzetih po 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h in 20 h po dodatku kolicina M.

Na Sliki 13 so prikazane rastne krivulje seva ENZ1257 ob tretiranju s kolicinom M v nizkih koncentracijah. Iz krivulj optičnih gostot je razvidno, da so bile te koncentracije za sev ENZ1257 inhibitorne zaradi večje občutljivosti celic kot pri sevu MG1655. Pri koncentraciji 20 in 30 ng/ml kolicina M optična gostota kultur po tretiranju pada do 2 h in se šele po 4–5 h dvigne nazaj do vrednosti OD_{600} 0,5 in po 20 h skoraj do optične gostote netretirane kulture. Koncentracija 10 ng/ml je manj inhibitorna, saj optična gostota ne pade, se ustavi in po 2 h začne strmo naraščati in po 20 h doseže vrednosti netretirane kulture. Kljub temu, da so bile uporabljene koncentracije kolicina M za sev ENZ1257 inhibitorne, so bile za namen opazovanja vpliva na odziv SOS zadovoljive. Iz Slike 14, kjer so prikazane vrednosti β -galaktozidaze tekom rasti po tretiranju s kolicinom M, je razvidno, da se aktivnost β -galaktozidaze ni povečala nad osnovni nivo netretirane kulture. S tem smo pokazali, da promotor gena *sulA* ni bil aktiven in potrdili, da kolicin M ne inducira odziva SOS.



Slika 13: Rast bakterije *E. coli* ENZ1257 s transkripcijsko fuzijo *sulA-lacZ* na kromosomu ob tretiranju s kolicinom M v koncentracijah 0, 10, 20 in 30 ng/ml. Puščica kaže čas ob dodatku kolicina.

Figure 13: Growth of *E. coli* strain ENZ1257 harbouring chromosomal transcriptional *sulA-lacZ* fusion after treatment with colicin M at 0, 10, 20 and 30 ng/ml. The arrow denotes time of colicin M addition.



Slika 14: Aktivnost β -galaktozidaze v sevu *E. coli* ENZ1257 s transkripcijsko fuzijo *sulA-lacZ* na kromosomu ob tretiranju s kolicinom M v koncentracijah 0, 10, 20 in 30 ng/ml. Puščica kaže čas ob dodatku kolicina.

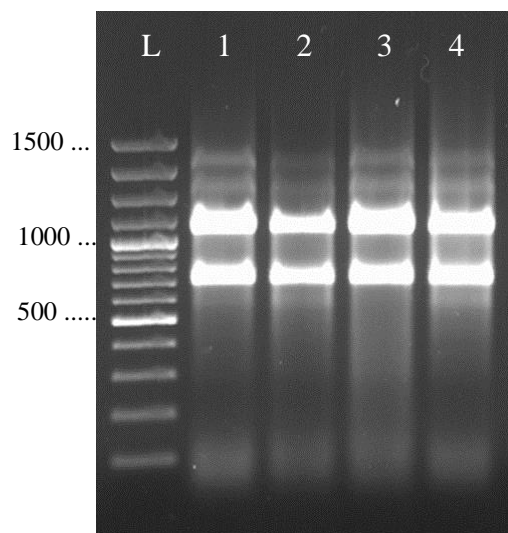
Figure 14: β -galactosidase activity of the *E. coli* strain ENZ1257 harbouring a chromosomal transcriptional *sulA-lacZ* fusion following treatment with colicin M at 0, 10, 20 and 30 ng/ml. The arrow denotes time of colicin M addition.

4.1.4 Analiza transkriptoma seva *E. coli* MG1655 ob izpostavljanju subinhibitorni koncentraciji kolicina M

4.1.4.1 Izolacija RNA

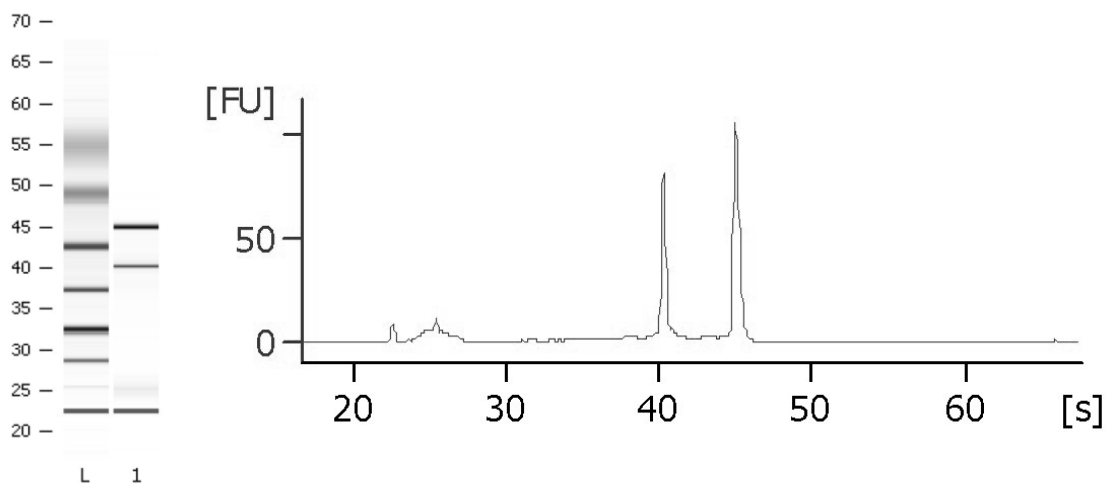
Za analizo diferenčnega izražanja genov smo izolirali RNA iz bakterijskih kultur seva MG1655, ki smo jih tretirali s subinhibitorno koncentracijo kolicina M (30 ng/ml) in iz netretiranih kultur, iz vzorcev odvzetih po 30 in 60-minutnem izpostavljanju. Izolacijo in kvaliteto izolirane RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo in kapilarno elektroforezo. Koncentracijo smo določili s spektrofotometrom Nanodrop.

Na Sliki 15 je reprezentativni primer potovanja vzorcev izolirane celotne RNA (totRNA) na 1-odstotnem agaroznem gelu. Na Sliki 16 pa sta prikazana slika gela in elektroferogram določena s kapilarno gelsko elektroforezo z bioanalizatorjem (Agilent Technologies). Na obeh slikah sta dobro vidni 16 in 23 S rRNA, kar pomeni, da je kvaliteta celotne izolirane RNA zelo dobra, da ni fragmentirana (RIN številka je visoka, nad 8,5), in da ni prisotne genomske DNA (gDNA). Kvaliteta vseh vzorcev totRNA je bila zelo dobra, s koncentracijami v povprečju nad 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.



Slika 15: Primer vzorcev izoliranih totRNA ločenih z agarozno gelsko elektroforezo na 1-odstotnem gelu. L – 100 bp DNA standard, 1– 30 min tretiran, 2 – 30 min netretiran, 3 – 60 min tretiran, 4 – 60 min netretiran.

Figure 15: Samples of isolated totRNAs separated by agarose gel electrophoresis on 1% gel. L - 100 bp DNA Plus Ladder, 1– 30 min treated, 2 – 30 min untreated, 3 – 60 min treated, 4 – 60 min untreated.

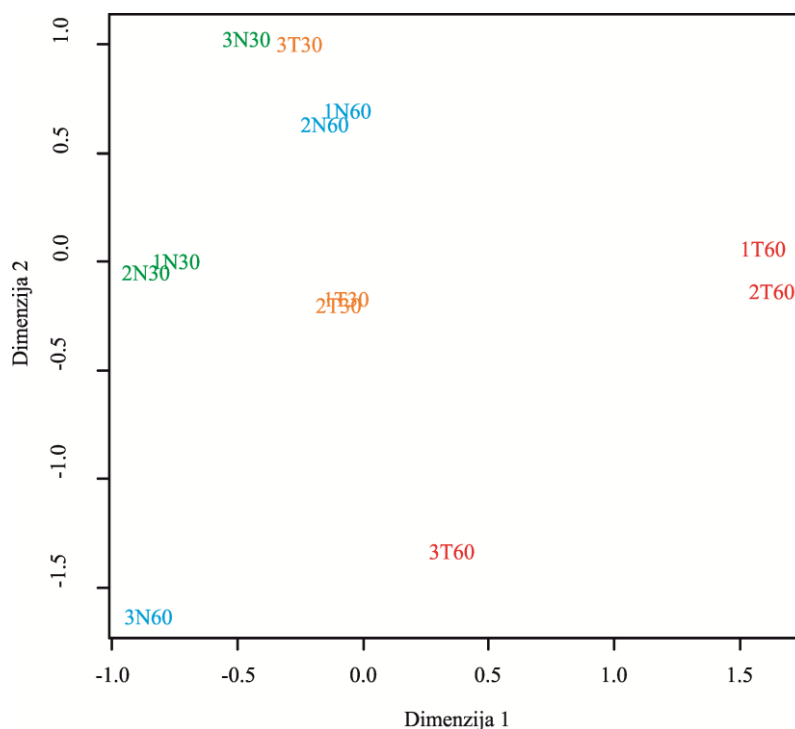


Slika 16: Primer elektroferograma in pripadajoče slike gela vzorca totRNA iz analize s kapilarno elektroforezo (Agilent BioAnalyzer). FU – fluorescenca, s – sekunda, L – standard, 1 – vzorec.

Figure 16: Sample electropherogram and belonging gel photo of totRNA sample from capillary electrophoresis analysis (Agilent Bioanalyser). FU – fluorescence, s – second, L – standard, 1 – sample.

4.1.4.2 Diferenčno izražanje genov

Za preučevanje vpliva subinhibitornih koncentracij kolicina M na profil izražanja genov občutljive bakterije *E. coli* MG1655 smo izbrali metodo z DNA mikromrežami in pri tem uporabili mikromreže GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Arrays (Affymetrix). Za analizo smo uporabili RNA izolirano iz tretiranih (30 ng/ml kolicina M) in netretiranih kultur dveh časovnih točk (30 in 60 min) v treh bioloških ponovitvah poskusov. V enem poskusu smo pridobili 4 vzorce: netretiran in tretiran po času 30 min (30 0-N, 30 30-T) ter netretiran in tretiran po času 60 min (60 0-N, 60 30-T). Skupno smo torej uporabili 12 vzorcev RNA in 12 DNA mikromrež. Pri izvedbi analize z DNA mikromrežami smo podatke o izražanju genov v obliki slike s signali posameznih točk na DNA mikromreži pridobili s skeniranjem čipov z uporabo programa Affymetrix GeneChip Command Console in preverili kvaliteto podatkov, ki je bila dobra. Podatki so bili normalizirani in obdelani z večimi različnimi paketi R/Bioconductor. Analiza večrazsežnostnega lestvičenja MDS (multidimensional scailing) normaliziranih podatkov je pokazala (Slika 17), da se podatki izražanja genov iz 3. biološke ponovitve poskusa zelo razlikujejo od ostalih, zato je bila cela ponovitev, se pravi podatki štirih DNA mikromrež, izključena iz analize diferenčnega izražanja in ponovna analiza diferenčnega izražanja izvedena iz podatkov osmih DNA mikromrež.



Slika 17: Graf večstopenjskega lestvičenja (MDS) za 500 najbolj diferenčno izraženih (DE) genov. Prikazana je razporeditev vzorcev v geometrijskem prostoru, tako da geometrijske razdalje med vzorci čim bolj odražajo rezlike med vzorci, in pokaže, kateri objekti so si med seboj podobni.

Figure 17: Multidimensional scailing (MDS) graph for top 500 differentially expressed (DE) genes. MDS shows geometrical arrangement of similar samples.

Normalizirane vrednosti intenzitet signalov posameznih točk na DNA mikromreži dveh bioloških ponovitev poskusa smo podali v NCBI-jevi podatkovni bazi Gene Expression Omnibus database (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, 26. nov. 2012) pod dostopno kodo GSE37026. Normalizirane vrednosti so bile pretvorjene v \log_2 vrednosti in le sonde seva *E. coli* K-12 izbrane za analizo diferenčnega izražanja s testom dvofaktorske analize variance (ANOVA). Pri tem je bil izračunan \log_2 razmerja intenzitet signalov med tretiranima in netretiranima kulturama – \log_2FC , ki pove kolikokrat je povečana ali zmanjšana raven izražanja nekega gena po tretiranju v primerjavi s kontrolo. Za diferenčno izražene gene smo izbrali tiste z \log_2FC večjim od 1 ali manjšim od -1 (kar pomeni več kot 2-kratno spremembo v izražanju genov) in vrednostjo $p \leq 0,05$. Seznam vseh diferenčno izraženih genov dveh bioloških ponovitev po 30-minutnem in 60-minutnem tretiranju je podan v Prilogi C.

Po 30-minutnem tretiranju je bila raven izražanja zvišana pri 49 genih in znižana pri 2, medtem ko je po 60-minutnem tretiranju bila raven izražanja zvišana pri 210 genih in znižana pri 51. Ker je 30-minutno tretiranje spremenilo izražanje le posameznih genov različnih genskih funkcijskih skupin, smo se osredotočili na diferenčno izražene gene po 60-minutnem tretiranju. V Preglednici 24 je podan \log_2 razmerja izražanja genov pri 30 in 60 min po tretiranju za gene, pomembne za razpravo. Diferenčno so bili izraženi nekateri geni dvokomponentnih sistemov prenosa signalov, ki so vpleteni pri odzivu na stres ovojnice, in sicer *rcaA*, ki kodira regulator RcsA v sistemu Rcs; *cpxP*, ki kodira CpxP vpleten v uravnavanju odziva Cpx; in geni operona *psp* sistema Psp. Zlasti je bila zvišana raven izražanja genov operona *wca* za sintezo zunajceličnega polisaharida kolanska kislina in operona *yjbEFGH* za sintezo zunajceličnega polisaharida drugačnega od kolanske kisline. Povečana je bila tudi raven izražanja genov vpletenih pri osmotskem in drugih stresih, kot so geni dvokomponentnega sistema CreBC, in nekaj genov vpletenih pri uravnavanju nastanka biofilma. Znižana pa je bila raven izražanja genov za bakterijsko gibljivost in nekaterih genov vpletenih v prenos aminokislin/ odpornost proti kislem pH. Več kot 100 genov s povečanim izražanjem je uvrščenih v slabo karakterizirane gene, izmed katerih so mnogi produkti domnevni membranski proteini in lipoproteini.

Preglednica 24: Izbrani geni z diferencialnim izražanjem po tretiranju s kolicinom M po 30 in 60 min. Prikazani so rezultati dveh bioloških ponovitev (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013: 3). (odebeljene številke kažejo gene z \log_2 razmerjem ≥ 1 in ≤ -1 in s $p \leq 0,05$, poševna pisava števil označuje vrednosti, kjer je $p \geq 0,05$)

Table 24: Genes with differential expression after exposure to colicin M over time, 30 and 60 min. Results are based on two biological replicates (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013: 3). (bold indicates genes with gene expression \log_2 ratio ≥ 1 and ≤ -1 and with $p \leq 0.05$, and italic indicates genes with $p \geq 0.05$)

Gen	ID št. gena	Genski produkt	30 min \log_2 razmerja	60 min \log_2 razmerja
Regulatorji odzivov na stres ovojnice (angl. envelope stress regulators/systems)				
<i>rcsA</i>	946467	DNA-vezavni transkripcijski aktivator, koregulator z RcsB	3,38	6,13
<i>cpXP</i>	2847688	inhibicija odziva Cpx, periplazemski protein	1,57	2,61
<i>pspA</i>	945887	regulatorni protein za operon proteinov fagnega šoka	1,35	1,18
<i>pspB</i>	945893	DNA-vezavni transkripcijski regulator operona <i>psp</i>	1,32	1,47
<i>pspC</i>	945499	DNA-vezavni transkripcijski aktivator	1,14	1,52
<i>pspD</i>	945635	protein fagnega šoka notranje membrane	<i>0,83</i>	1,78
<i>pspG</i>	948557	protein fagnega šoka, protein G	1,55	2,29
Proces biosinteze kolanske kisline (angl. colanic acid biosynthetic process)				
<i>wza</i>	946558	lipoprotein potreben za translokacijo kapsularnih polisaharidov preko zunanje membrane	3,59	7,12
<i>wzb</i>	946564	protein-tirozin fosfataza	2,44	6,33
<i>wzc</i>	946567	protein-tirozin fosfataza	1,52	6,72
<i>wcaA</i>	946570	napovedana glikozil transferaza	<i>0,93</i>	5,7
<i>wcaB</i>	946573	napovedana acil transferaza	<i>0,69</i>	5,73
<i>wcaC</i>	946579	napovedana glikozil transferaza	<i>0,56</i>	5,47
<i>wcaD</i>	946550	napovedana polimeraza kolanske kisline	<i>0,78</i>	7,23
<i>wcaE</i>	946543	napovedana glikozil transferaza	1,25	7,26
<i>wcaF</i>	946578	napovedana acil transferaza	<i>0,97</i>	7,21
<i>gmd</i>	946562	dehidrataza GDP-D-manoze, NAD(P)-vezavni protein	<i>0,71</i>	6,65
<i>fcl</i>	946563	bifunkcionalna sintetaza GDP-fukoze: epimeraza GDP-4-dehidro-6-deoksi-D-manoze/ reduktaza GDP-4-dehidro-6-L-deoksigalaktoze	<i>0,32</i>	6,57
<i>gmm</i>	946559	manozil hidrolaza GDP-manoze	<i>0,3</i>	6,15
<i>wcaI</i>	946588	napovedana glikozil transferaza	<i>0,3</i>	5,92
<i>cpsG</i>	946574	fosfomanomutaza	<i>0,09</i>	5,15
<i>cpsB</i>	946580	gvniltransferaza manoze-1-fosfata	<i>0,26</i>	5,1
<i>wcaJ</i>	946583	napovedana transferaza, prenašalni lipid UDP-glukoze	<i>0,11</i>	4,82
<i>wzxC</i>	946581	napovedan protein za iznos kolanske kisline	<i>0,1</i>	4,45
<i>wcaK</i>	946569	protein za biosintezo kolanske kisline	<i>-0,12</i>	4,45
<i>wcaL</i>	946565	napovedana glikozil transferaza	<i>-0,13</i>	3,63
<i>manA</i>	944840	izomeraza manoze-6-fosfata	<i>0,19</i>	1,05
<i>ugd</i>	946571	dehidrogenaza UDP-glukoza 6	<i>0,46</i>	4,36
<i>wcaM</i>	946561	protein za biosintezo kolanske kisline	<i>-0,01</i>	2,71
<i>galU</i>	945730	uridiltransferaza glukoze-1-fosfata	<i>0,44</i>	1,4

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 24: Izbrani geni z diferenčnim izražanjem po tretiranju s kolicinom M po 30 in 60 min. (odebeljene številke kažejo gene z \log_2 razmerjem ≥ 1 in ≤ -1 in s $p \leq 0,05$, poševna pisava števil označuje vrednosti, kjer je $p \geq 0,05$)

Gen	ID št. gena	Genski produkt	30 min \log_2 razmerja	60 min \log_2 razmerja
Od kolanske kisline drugačni zunajcelični polisaharid (angl. extracellular polysaccharide distinct from colanic acid)				
<i>yjbE</i>	948534	napovedan lipoprotein	1,55	5,74
<i>yjbF</i>	948533	napovedan lipoprotein	1,73	5,67
<i>yjbG</i>	948526	ohranjen protein	0,67	4,29
<i>yjbH</i>	948527	napovedan porin	0,66	5,23
Sinteza peptidoglikana (angl. peptidoglycan synthesis)				
<i>anmK</i>	946810	kinaza anhidro-acetilmuraminske kisline	0,16	1,17
<i>mrcB</i>	944843	glikozil transferaza in transpeptidaza	0,47	1,01
<i>ycfS</i>	945666	L,D-transpeptidaza, ki poveže Lpp na murein	0,77	2
Odziv na osmotski stres (angl. osmotic stress response)				
<i>osmB</i>	945866	lipoprotein	2,41	2,95
<i>osmC</i>	946043	membranski protein, inducibilen z osmozo in stresom	0,44	1,15
<i>opgB</i>	948888	fosfoglicerol transferaza I in II	0,12	1,27
<i>opgC</i>	946944	Membranski protein potreben za sukcinilacijo osmoreguliranih periplazemskih glukanov (OPG)	0,31	1,85
<i>ivy</i>	946530	inhibitor C-lizocimov vretenčarjev	1,55	1,26
<i>mliC</i>	946811	inhibitor C-lizocima, membransko-vezani; napovedani lipoprotein	2,17	3,92
<i>ybdG</i>	946243	napovedan mehansko občutljiv kanal	0,69	1,26
<i>dppB</i>	948063	prenašalec dipeptidov/hema	-0,29	3,29
<i>dppF</i>	948056	prenašalec dipeptidov	-0,1	2,33
<i>dppC</i>	948064	prenašalec dipeptidov/hema	-0,09	2,33
<i>dppD</i>	948065	prenašalec dipeptidov/hema	-0,09	2,1
<i>dppA</i>	948062	prenašalec dipeptidov	0,02	1,13
Drugi odzivi na stres (angl. other stress responses)				
<i>ydeI</i>	946068	ohranjen protein	1,99	3,96
<i>treR</i>	948760	DNA-vezavni transkripcijski represor	0,65	1,88
<i>ibpA</i>	948200	šaperon pri toplotnem šoku	-0,01	1,78
<i>ibpB</i>	948192	šaperon pri toplotnem šoku	0,02	2,9
<i>hslJ</i>	946525	lipoprotein inducibilen s toploto, lipoprotein vpleten v odpornost proti novobiocinu	2,33	3,32
<i>yhbO</i>	947666	napovedana znotrajcelična proteaza	2,29	2,67
<i>iraM</i>	945729	stabilizator RpoS-a med stradanjem Mg, anti-RssB faktor	0,33	1,6
<i>creD</i>	948868	protein notranje membrane	5,66	4,96
<i>cbrB</i>	948231	protein notranje membrane, regulon <i>creBC</i>	5,2	4,29
<i>cbrA</i>	948197	napovedana oksidoreduktaza z FAD/NAD(P)-vezavno domeno	4,3	3,35
<i>cbrC</i>	948230	ohranjen protein, družine UPF0167	3,77	2,8
<i>spy</i>	946253	periplazemski protein induciran pri stresu ovojnice	1,71	2,99
<i>htpX</i>	946076	napovedana endopeptidaza	0,27	1,01
<i>yggG</i>	945173	protein toplotnega šoka, ki se veže na protein Era; napovedana peptidaza	1,01	1,82

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 24: Izbrani geni z diferenčnim izražanjem po tretiranju s kolicinom M po 30 in 60 min. (odebeljene številke kažejo gene z \log_2 razmerjem ≥ 1 in ≤ -1 in s $p \leq 0,05$, poševna pisava števil označuje vrednosti, kjer je $p \geq 0,05$)

Gen	ID št. gena	Genski produkt	30 min \log_2 razmerja	60 min \log_2 razmerja
Oblikovanje biofilma (angl. biofilm formation)				
<i>ycfJ</i>	945977	napovedan protein	4,77	5,8
<i>rprA</i>	2847671	ncRNA – nekodirajoča RNA	3,86	4,85
<i>omrA</i>	2847746	ncRNA – nekodirajoča RNA	0,36	1,76
<i>omrB</i>	2847747	ncRNA – nekodirajoča RNA	0,77	1,74
<i>bdm</i>	946041	protein za oblikovanje biofilma	4,49	4,21
<i>ydeH</i>	946075	digvanilat ciklaza, potrebna za indukcijo <i>pgaD</i>	1,38	1,68
Bakterijska gibljivost (angl. cell motility)				
<i>fliZ</i>	946833	antagonist RpoS-a; napovedan regulator aktivnosti FliA	-0,41	-1,05
<i>fliE</i>	946446	komponenta bazalnega telesca flagela	-0,66	-1,07
<i>fliG</i>	946451	komponenta za preklop flagelarnega motorja in napajanje energije	-0,28	-1,07
<i>flgN</i>	945634	šaperon za iznos FlgK and FlgL	-0,29	-1,12
<i>flgA</i>	946300	protein za sestavljanje P-obročja bazalnega telesca	-0,09	-1,17
<i>flgF</i>	945639	komponenta celici bližnjega dela palčke bazalnega telesca flagela	-0,29	-1,21
<i>flgM</i>	946684	anti-sigma faktor za FliA (Sigma 28)	-0,27	-1,23
<i>fliA</i>	948824	RNA polimeraza, factor Sigma 28 (Sigma F)	-0,21	-1,45
<i>flgD</i>	945813	protein za sestavljanje kavlja flagela	-0,33	-1,61
<i>flgE</i>	945636	protein kavlja flagela	-0,05	-1,72
<i>flgC</i>	946687	komponenta celici bližnjega dela palčke bazalnega telesca flagela	-0,04	-2,14
<i>flgB</i>	945678	komponenta celici bližnjega dela palčke bazalnega telesca flagela	-0,19	-2,4
<i>flhC</i>	947280	DNA-vezavni transkripcijski dvojni regulator s FlhD	-0,76	-2,54
<i>flhD</i>	945442	DNA-vezavni transkripcijski dvojni regulator s FlhC	-0,76	-2,54
Prenos aminokislin/ odpornost proti kislem pH (angl. amino acid transport / acid resistance)				
<i>glnP</i>	945621	podenota transporterja glutamina	-0,23	-1,17
<i>gadB</i>	946058	B dekarboksilaza glutamata, PLP-odvisna	0,03	-1,18
<i>glnQ</i>	945435	podenota transporterja glutamina	-0,15	-1,25
<i>glnG</i>	948361	DNA-vezavni regulator združen z GlnL, v dvokomponentnem regulatornem sistemu: odzivni regulator/ protein v interakciji s Sigma54	-0,15	-1,32
<i>gadA</i>	948027	A dekarboksilaza glutamata, PLP-odvisna	-0,23	-1,64
<i>gadE</i>	948023	DNA-vezavni transkripcijski aktivator	0,13	-1,38
<i>slp</i>	948022	lipoprotein zunanje membrane	-0,18	-1,91
<i>hdeB</i>	948026	protein za odpornost proti kislem pH	0,13	-1,17
<i>hdeD</i>	948024	protein za odpornost proti kislem pH	-0,01	-1,04
Slabo karakterizirani (angl. poorly characterized)				
<i>yngD</i>	945732	napovedan protein	3,45	3,65
<i>yngG</i>	945728	ohranjen protein, družine UPF0757	3,87	3,55
<i>yfdC</i>	944801	napovedan protein notranje membrane	1,02	2,25
<i>yjbJ</i>	948553	ohranjen protein, družine UPF0337	0,97	1,19

se nadaljuje

nadaljevanje

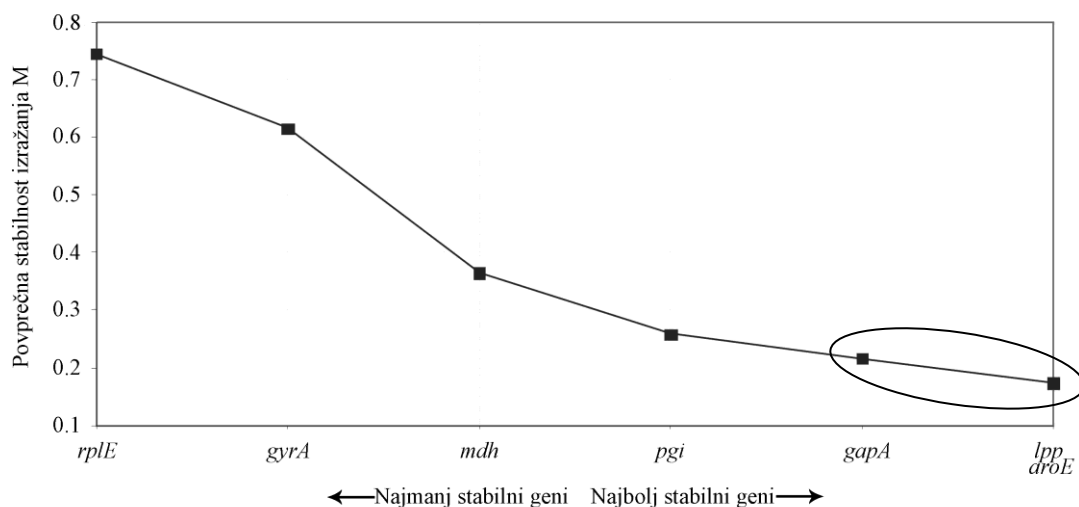
Preglednica 24: Izbrani geni z diferenčnim izražanjem po tretiranju s kolicinom M po 30 in 60 min. (odebeljene številke kažejo gene z \log_2 razmerjem ≥ 1 in ≤ -1 in s $p \leq 0,05$, poševna pisava števil označuje vrednosti, kjer je $p \geq 0,05$)

Gen	ID št. gena	Genski produkt	30 min \log_2 razmerja	60 min \log_2 razmerja
Slabo karakterizirani (angl. poorly characterized)				
<i>yaaX</i>	944747	napovedan protein	1,59	4,12
<i>yegS</i>	946626	fosfatidilglicerol kinaza, odvisna od kovinskega iona	0,81	1,65
<i>yaiY</i>	945223	protein notranje membrane, družine DUF2755	3,94	5,22

4.1.5 Validacija rezultatov mikromrež s PCR v realnem času (qPCR)

Rezultate diferenčnega izražanja genov, pridobljene z DNA mikromrežami, smo validirali z metodo PCR v realnem času, pri čemer smo uporabili metodo zaznavanja pomnoženih produktov z barvilom SYBR Green I. Ker so pri DNA mikromrežah geni kazali večjo diferenčno izražanje 60 min po tretiranju, smo se odločili za validacijo rezultatov pri tem času. RNA vzorcev istih treh bioloških ponovitev kot so bili uporabljeni za analizo z DNA mikromrežami smo prepisali v cDNA s koncentracijo 100 ng/ μ l z metodo reverzne transkripcije. Ker smo ugotovili, da je tretja biološka ponovitev pri DNA mikromrežah odstopala, smo poleg RNA vzorcev teh treh bioloških poskusov izbrali za prepis v cDNA še RNA vzorcev, pridobljenih iz dveh dodatnih bioloških poskusov. Odstopajočo ponovitev smo vključili v analizo, da smo tudi z metodo qPCR potrdili odstopanje.

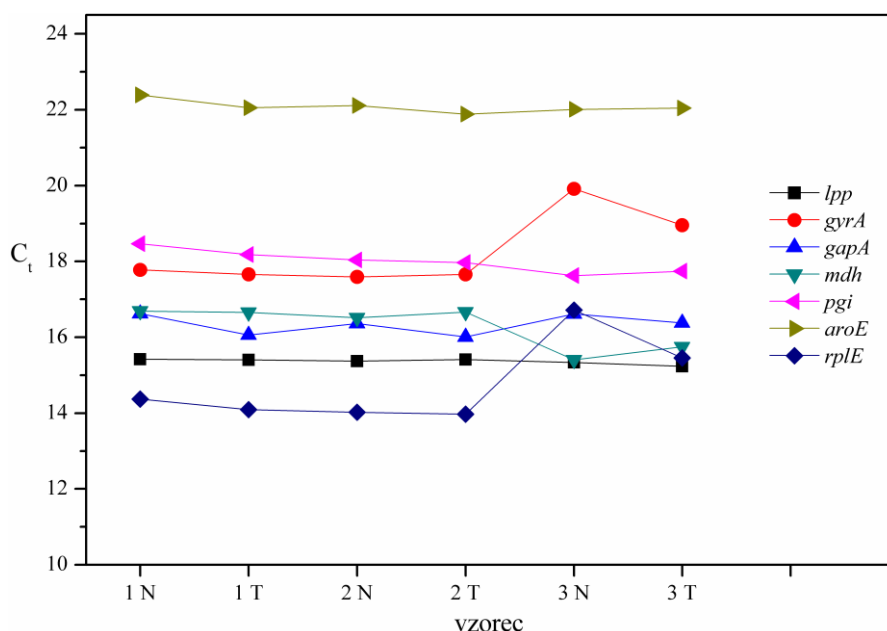
Za izbor referenčnih gospodinjskih genov za normalizacijo podatkov smo pregledali 7 genov: *gapA*, *lpp*, *mdh*, *pgi*, *aroE*, *gyrA*, *rplE*. S pomočjo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>, 15. nov. 2011) (Vandesompele in sod., 2002) smo izbrali tri najbolj stabilne referenčne gene, in sicer *lpp*, *aroE*, *gapA*, katerih izražanje je bilo med ponovitvami najmanj spremenjeno (Slika 18).



Slika 18: GeNorm graf s povprečno stabilnostjo izražanja M. Obkroženi so 3 najbolj stabilni geni.

Figure 18: GeNorm plot with average expression stability values of the remaining control genes. Three reference genes with highest stability are encircled.

Ustreznost izbora referenčnih genov smo preverili tudi z grafičnim prikazom spreminjanja vrednosti C_t izbranih genov med istimi tremi ponovitvami kot pri DNA mikromrežah (Slika 19). Iz krivulj lahko opazimo, da je nihanje vrednosti C_t izbranih referenčnih genov *lpp*, *aroE* in *gapA* najmanjše (Slika 19).



Slika 19: Graf spreminjanja vrednosti C_t izbranih genov med vzorci treh ponovitev (1, 2, 3 – ponovitev, N – netretiran vzorec, T – tretiran vzorec)

Figure 19: Plot with C_t values of selected genes over the triplicate samples (1, 2, 3 – repeat, N – untreated sample, T – treated sample)

Za validacijo rezultatov mikromrež smo izbrali 14 genov: *ydeI*, *pspC*, *opgB*, *rprA*, *cpxP*, *ycfJ*, *rcaA*, *yjbE*, *wcaD*, *spy*, *wzcC*, *wza*, *glnG* in *flgM*, ki so v poskusu z mikromrežami po času 60 min kazali signifikantno spremenjeno izražanje genov ($\log_2FC > 1$, $p \leq 0,05$) in so iz različnih genskih funkcijskih skupin. qPCR reakcije smo izvajali kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Pri tem smo najprej potrdili specifičnost začetnih oligonukleotidov s pregledom talilnih krivulj amplikonov in določili učinkovitost pomnoževanja. Učinkovitost pomnoževanja parov začetnih oligonukleotidov med posameznimi cikli pomnoževanja smo določili z umeritveno krivuljo, izrisano na podlagi Ct vrednosti produktov cDNA, redčene v seriji 5 desetkratnih redčin, in določili rang kvantifikacije, pri katerem so vrednosti C_t med 15 in 30. Določili smo, da je učinkovitost med 90 % in 110 %, in da testirana 20-krat in 400-krat redčena cDNA daje produkte v rangu kvantifikacije. Ker je učinkovitost pomnoževanja z izbranimi začetnimi oligonukleotidi bila med 90 % in 110 %, smo za diferencialno izražanje genov uporabili metodo relativne kvantifikacije $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak in Schmittgen, 2001).

V validacijo rezultatov mikromrež s qPCR smo vključili tudi RNA iz ponovitve, ki je pri mikromrežah odstopala. Tudi pri qPCR je bilo veliko odstopanje v izražanju genov od ostalih ponovitev, zato smo to ponovitev izključili iz analize in za potrjevanje rezultatov mikromrež in uporabili vzorce RNA še dveh novih bioloških ponovitev. V Preglednici 25 so podani rezultati diferencialnega izražanja genov istih treh bioloških ponovitev kot pri DNA mikromrežah (ponovitev 1, 2 in 3), ter štirih bioloških ponovitev, med katerima sta dve isti kot pri mikromrežah ter dve novi. Iz standardnih odklonov med biološkimi ponovitvami vidimo, da so veliki, če je vključena biološka ponovitev 3, ki tudi sicer odstopa pri poskusu z DNA mikromrežami.

Povečano ali zmanjšano izražanje genov zaradi tretiranja bakterijske kulture s kolicinom M je relativno glede na nivo izražanja referenčnih genov v času 60 min po dodatku kolicina M. Diferenčno izražanje je bilo določeno s pretvorbo dobljenih vrednosti $2^{-\Delta\Delta CT}$ v \log_2 in je prikazano kot \log_2 razmerja vrednosti izražanja genov med tretirano in netretirano kulturo.

Preglednica 25: Sprememba v izražanju genov z \log_2 razmerji in standardnimi odkloni vrednosti izražanja genov kot povprečje treh (isti kot pri mikromrežah) ali štirih bioloških ponovitev poskusov.

Table 25: Gene expression fold change of \log_2 ratio values with standard deviations of three (same as in DNA microarray) or four biological replicates of experiment.

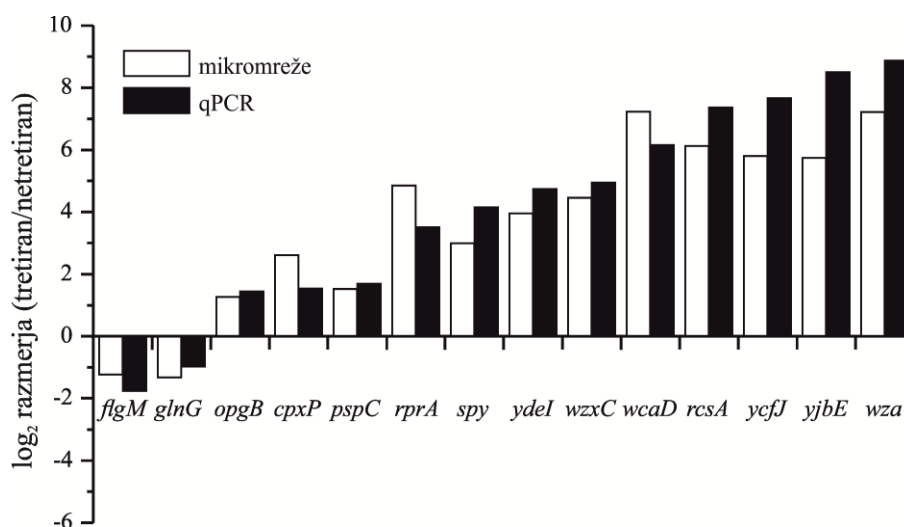
Gen	Genski produkt	\log_2 razmerja (ponovitev 1, 2, 3)	\log_2 razmerja (ponovitev 1, 2, 4, 5)
Regulatorji odzivov na stres ovojnice			
<i>rcaA</i>	DNA-vezavni transkripcijski aktivator, koregulator z RcsB	$6,467 \pm 1,751$	$7,366 \pm 0,314$
<i>cpxP</i>	inhibicija odziva Cpx, periplazemski protein	$1,379 \pm 0,681$	$1,529 \pm 0,494$

se nadaljuje

nadaljevanje

Gen		log₂ razmerja (ponovitev 1, 2, 3)	log₂ razmerja (ponovitev 1, 2, 4, 5)
<i>pspC</i>	DNA-vezavni transkripcijski regulator	1,773 ± 0,065	1,698 ± 0,307
Proces biosinteze kolanske kisline			
<i>wza</i>	lipoprotein potreben za translokacijo kapsularnih polisaharidov preko zunanje membrane	7,594 ± 2,285	8,872 ± 0,302
<i>wzxC</i>	napovedan protein za iznos kolanske kisline	4,249 ± 1,734	4,941 ± 0,392
<i>wcaD</i>	napovedana polimeraza kolanske kisline	5,254 ± 2,054	6,146 ± 0,369
Od kolanske kisline drugačni zunajcelični polisaharid			
<i>yjbE</i>	napovedan lipoprotein	7,653 ± 1,975	8,504 ± 0,404
Odziv na osmotski stres			
<i>opgB</i>	fosfoglicerol transferaza I in II	1,318 ± 0,393	1,441 ± 0,285
Drugi odzivi na stres			
<i>ydeI</i>	ohranjen protein	4,167 ± 1,205	4,734 ± 0,286
<i>spy</i>	periplazemski protein inducirani pri stresu ovojnice	3,735 ± 1,167	4,148 ± 0,394
Prenos aminokislin/ odpornost proti kislem pH			
<i>glnG</i>	DNA-vezavni regulator združen z GlnL, v dvokomponentnem regulatornem sistemu: odzivni regulator/ protein v interakciji s Sigma54	-1,702 ± 0,103	-1,387 ± 0,587
Oblikovanje biofilma			
<i>rprA</i>	ncRNA – nekodirajoča RNA	3,123 ± 1,048	3,506 ± 0,489
<i>ycfJ</i>	napovedan protein	7,410 ± 0,527	7,652 ± 0,354
Bakterijska gibljivost			
<i>flgM</i>	anti-sigma faktor za FliA (Sigma 28)	-1,559 ± 0,705	-1,747 ± 0,288

Z rezultati relativnega izražanja genov, pridobljenimi s qPCR, smo potrdili rezultate diferenčnega izražanja genov, pridobljene z mikromrežami. Na Sliki 20 je grafikon, ki prikazuje diferenčno izražanje izbranih genov *E. coli* MG1655 po 60-minutnem tretiranju pri analizi z DNA mikromrežami in pri analizi s qPCR. Spremembe v izražanju genov so predstavljene kot log₂ razmerja med izražanjem genov med tretirano in netretirano kulturo štirih bioloških ponovitev pri qPCR in dveh pri mikromrežah.



Slika 20: Validacija rezultatov DNA mikromrež s qPCR. Graf prikazuje \log_2 razmerja (tretiran/netretiran) izražanja 14 izbranih genov 60 minut po tretiranju s kolicinom M pri analizi z DNA mikromrežami in s qPCR (mikromreže – beli stolpci; qPCR – črni stolpci) (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013: 8). Pozitivne vrednosti pomenijo večje, negativne pa manjše izražanje gena v tretiranem vzorcu.

Figure 20: Validation of the microarray results by qPCR. Plot presents expression analysis of the 14 selected genes determined by microarray (open bars) and validated by qPCR (solid bars) as \log_2 ratios following 60 min exposure to colicin M (Kamenšek in Žgur-Bertok, 2013: 8). Positive value means gene upregulation and negative gene downregulation in treated sample.

4.1.6 Kvantifikacije zunajceličnih polisaharidov

Ker se je ob tretiranju s kolicinom M povečala transkripcija genov za sintezo zunajceličnih polisaharidov EPS, kot so geni vpleteni pri sintezi kolanske kisline in operon *yjbEFGH* za sintezo zunajceličnega polisaharida drugačnega od kolanske kisline, ter tudi nekaj genov vpletenih pri nastanku biofilma, smo želeli s fiziološkimi testi dokazati povečanje sinteze zunajceličnih polisaharidov.

4.1.6.1 Kvantifikacija kapsule

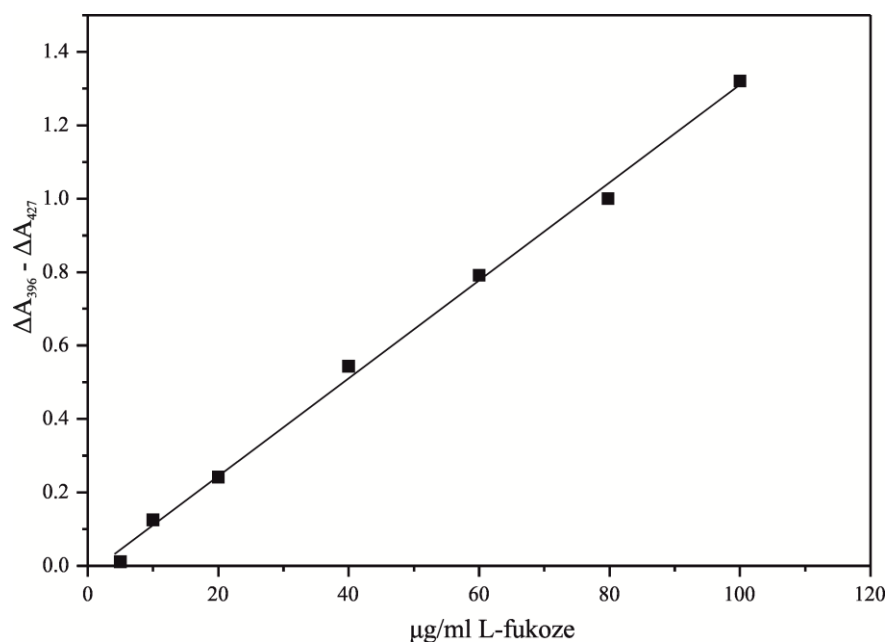
Predvidevali smo, da se bo zaradi indukcije genov za sintezo EPS-ov po tretiranju s kolicinom M povečala tudi kapsula oz. zunajcelična plast polisaharidov. Zato smo kapsulo barvali in jo opazovali pod mikroskopom. V ta namen smo kulturo seva *E. coli* MG1655 tretirali s subinhibitorno koncentracijo kolicina M (30 ng/ml), prav tako smo vključili netretirano kontrolno kulturo. Po 60 min gojenja po tretiranju smo kulturi vzorčili in preparate barvali z barvilom India ink in kristal vijoličnim. Preparata tretirane in netretirane bakterijske kulture smo pregledali pod vidno svetlobo in imerzijskim objektivom mikroskopa Axioskop. V obeh primerih je bila vidna le neizrazita kapsula, zato smo se odločili kvantificirati komponento kapsule, kolansko kislino (angl. colanic acid, CA).

4.1.6.2 Kvantifikacija kolanske kisline

Ker so rezultati DNA mikromrež pokazali povečano transkripcijo genov vpletenih pri nastanku kolanske kisline, smo izolirali zunajcelične polisaharide in kvantificirali samo kolansko kislino.

Kolansko kislino smo izolirali in kvantificirali iz tretirane in netretirane kulture *E. coli* MG1655 po 60 min, 90 min in 120 min po dodatku subinhibitornih koncentracij kolicina M kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Za pozitivno kontrolo samega postopka kvantifikacije CA smo uporabili vzorec seva *E. coli* MG1655 s plazmidom pATC400 z zapisom za RcsA, ki proizvaja maksimalno količino CA zaradi večjega števila kopij gena *rcaA*. Pri tem smo kvantificirali produkcijo CA tretirane in netretirane kulture seva MG1655 pATC400 po 120-minutnem gojenju.

Količino nastale CA v vzorcih izoliranih EPS-ov smo določili z ovrednotenjem količine L-fukoze, ki je komponenta CA. Vzorcem izoliranih EPS-ov, ki smo jih obdelali kot je opisano v poglavju Materiali in metode, smo dodali cistein. Le-ta reagira s fukozo in nastali produkt absorbira pri 396 nm. Med obdelavo vzorcev pa nastanejo tudi nespecifični produkti, ki absorbirajo med 396 nm in 427 nm, zato smo to nespecifično absorbanco upoštevali pri izračunu. A_{427} in A_{396} smo izmerili pred ter po dodatku cisteina, ter izračunali vrednosti $\Delta A_{396} - \Delta A_{427}$ kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Te vrednosti smo korelirali s koncentracijo L-fukoze iz umeritvene krivulje, prikazane na Sliki 21. Za umeritveno krivuljo smo uporabili čisto L-fukozo (Sigma) v koncentraciji od 5 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$. Količino CA smo izračunali kot μg metilpentoze ω -deoksiheksoze (L-fukoze)/ OD_{600} / na ml kulture in jo podali v Preglednici 26. Poleg tega smo izračunali tudi razmerje v količini producirane CA med tretirano in netretirano kulturo iz istega poskusa gojenja (Preglednica 26 in graf Slike 22), ki pove kolikokrat je več CA v tretirani v primerjavi z netretirano kulturo.



Slika 21: Umeritvena krivulja z L-fukozo kot standardom za izračun koncentracije kolanske kisline.

Figure 21: Calibration curve with L-fucose as standard for colanic acid content calculation.

Preglednica 26: Količina in razmerje produkcije CA med tretiranimi in netretiranimi kulturami. Skupaj so označene vrstice sočasno kvantificiranih vzorcev iz enega poskusa.

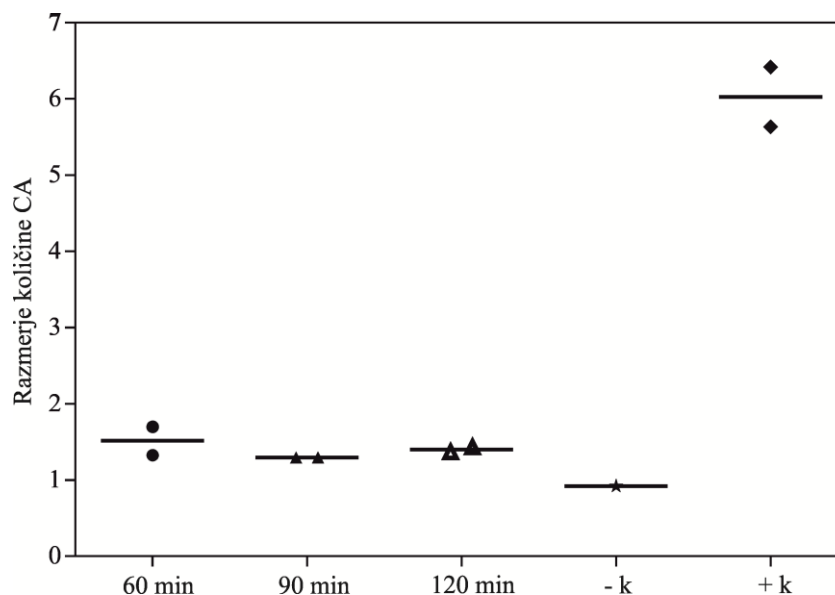
Table 26: Amount and ratio of CA production among treated and untreated cultures. Rows placed together are samples from same experiment and quantified at the same time.

Sev, tretiranje, čas izolacije	µg/ml CA	razmerje
MG1655, netretiran, 60 min	3,7459	1,49
MG1655, tretiran, 60 min	5,5977	
MG1655, netretiran, 90 min	2,4900	1,29
MG1655, tretiran, 90 min	3,2227	
MG1655, netretiran, 120 min	2,1336	1,41
MG1655, tretiran, 120 min	2,9987	
MG1655, netretiran, 120 min	2,8588	5,63
MG1655 pATC400, netretiran, 120 min	16,1074	
MG1655 pATC400, tretiran, 120 min	18,3450	

*razmerje kultura MG1655 pATC400 tretirana 120 min/ netretirana kultura 120 min

Razlika v količini kolanske kisline med tretirano in netretirano kulturo je bila ob vseh časih izolacije le ~ 1,35-kratna in statistično ni signifikantna. Pri netretirani pozitivni kontroli, sevu *E. coli* MG1655 pATC400, ki čezmerno izraža CA, je bilo približno 5,6-krat več CA kot pri netretiranem izogenem sevu *E. coli* MG1655 brez plazmida. Ob tretiranju pozitivne kontrole se je količina CA le minimalno povečala, ~ 1,1-krat. Pozitivna kontrola nam pove, kakšno je maksimalno povečanje kolanske kisline pri delovnih pogojih naših poskusov in potrjuje uspešnost same metode izolacije CA.

Negativna kontrola predstavlja razmerje v količini CA netretiranih kultur in ima vrednost 1. Rezultati razmerij količine CA med tretiranimi in netretiranimi kulturami na Sliki 22 prikazujejo, da se po tretiranju kulture s kolicinom M produkcija CA bistveno ne poveča.



Slika 22: Razmerje v količini CA med tretirano in netretirano kulturo po času 60, 90 in 120 min. Negativna kontrola (- k) predstavlja netretirano kulturo seva MG1655, medtem ko pozitivna kontrola (+ k) razmerje v količini CA med tretiranim sevom MG1655 pATC400 in netretiranim sevom MG1655.

Figure 22: CA amount ratio of treated and untreated cultures after 60, 90 and 120 min. Negative control (- k) represents untreated culture MG1655, while positive control (+ k) represents ratio of CA amount of treated MG1655 pATC400 and untreated MG1655 strains.

4.1.6.3 Kvantifikacija nastanka biofilma

Ker je analiza transkriptoma po dodatku subinhibitornih koncentracij kolicina M pokazala povečanje izražanja nekaterih genov vpletenih pri nastanku biofilma, smo predvideli, da bodo subinhibitorne koncentracije kolicina M pri tretiranem sevu sprožile nastanek biofilma. V ta namen smo kulturo seva *E. coli* MG1655 tretirali z začetno inhibitorno koncentracijo kolicina M 100 ng/ml in v serijah 10-kratnih redčitev do 10^{-12} ng/ml. Po 24 h in 48 h inkubaciji brez stresanja pri 37 °C smo z barvilom kristal vijolično barvali nastale biofilme. Ugotovili smo, da dodatek kolicina M ni vplival na tvorbo biofilma, saj so bile vrednosti tretiranih in netretiranih kultur primerljive.

4.2 URAVNAVANJE TRANSKRIPCIJE GENA AKTIVNOSTI KOLICINA M

Zapis za kolicin M se nahaja na velikem konjugativnem plazmidu pColBM z zapisom za kolicin B (Sasarmann in sod., 1980; Olschläger in sod., 1984). Gena za kolicin B in M se prepisujeta v eno smer, medtem ko se gena imunosti prepisujeta konstitutivno v drugo smer (Olschläger in sod., 1984). Izražanje genov aktivnosti obeh kolicinov uravnava isti SOS-inducibilni promotor, ki se nahaja navzgor od gena aktivnosti kolicina B, *cba* (Olschläger in sod., 1984; Gillor in sod., 2008b). Na številnih plazmidih pColBM je prišlo do izgube gena aktivnosti *cba* in s tem tudi promotorja SOS navzgor od *cba*. Kljub temu, da indukcija sinteze ColM v teh primerih ni SOS-inducibilna, je bilo predhodno ugotovljeno, da verjetno pride do konstitutivne nizke ravni sinteze kolicina M (Christenson in Gordon, 2009). Zato nas je zanimalo, ali bi transkripcijo gena aktivnosti kolicina M, *cma*, v tem primeru lahko uravnaval potencialni lastni promotor.

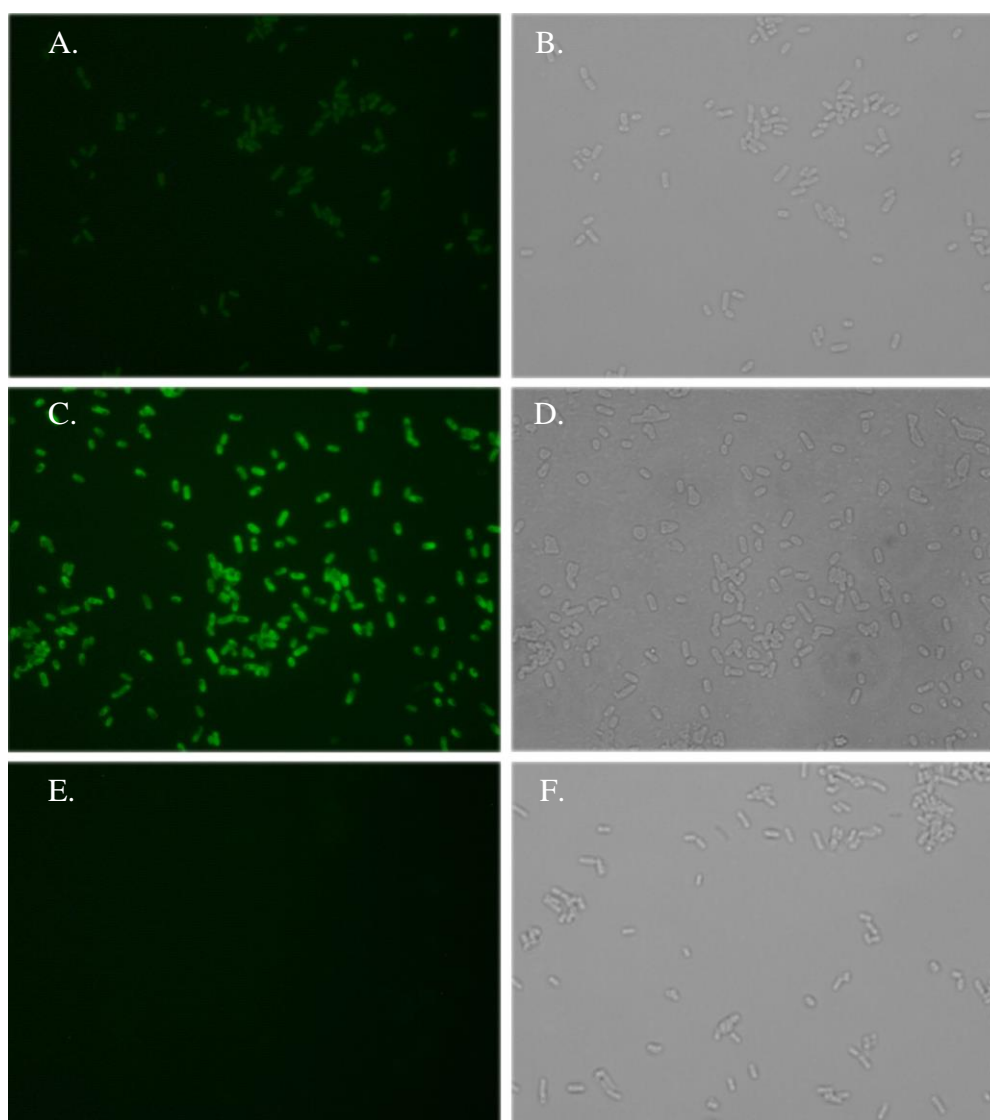
Analiza nukleotidnega zaporedja promotorske regije gena aktivnosti kolicina M, *cma*, oz. regije navzgor z uporabo internetnega orodja Virtual Footprint (Münch in sod., 2005) je nakazala potencialna mesta naleganja nekaterih regulatorjev, a zaporedij vezave proteina LexA, niti tipičnega promotorskega zaporedja z ohranjenimi promotorskimi elementi -35 in -10 nismo našli. Izgleda pa, da se na poziciji Shine-Dalgarnovega zaporedja (**AAAGAGG**) nahaja zaporedje, ki ni ohranjeno (**TAAGGAG**). Poleg tega smo v nukleotidnem zaporedju promotorja *cma* zasledili regijo bogato z AT. Pri nekaterih genih po Gramu negativnih bakterij se ta regija nahaja 15–30 nt navzgor od start kodona in je lahko tudi odgovorna za vezavo ribosoma (Boni in sod., 1991). Zaporedje regije navzgor od *cma* je podano v Prilogi A.

Z namenom, da bi ugotovili, ali je izražanje kolicina M uravnano z regijo navzgor od gena aktivnosti in odvisno od odziva SOS, smo opazovali izražanje fuzije *cma-gfp* plazmida pSC304 v posameznih celicah populacije seva *E. coli* RW118 in izogenega seva *E. coli* RW464 *recA*, v katerem aktivacija SOS s cepitvijo LexA ni možna. Fuzijo *cma-gfp* smo pripravili tako, da smo s PCR pomnožili regijo 205 bp navzgor od start kodona kolicina M s 95 bp navzdol in jo spojili z *gfp* v vektorju pSC101 (Kamenšek in sod., 2010). Plazmid smo transformirali v kompetentne celice sevov RW118 in RW464 in z invertnim fluorescenčnim mikroskopom opazovali izražanje *gfp* v transformantah, gojenih v tekočem gojišču LB v stacionarni fazi. Na sliki Sliki 23 A.B. vidimo, da so vse celice populacije seva RW118 enakomerno fluorescirale s šibkejšo fluorescenco. Ker smo enako fluorescenco zasledili tudi pri sevu RW464 *recA*, ki sicer ni zmožen indukcije odziva SOS, sklepamo, da izražanje *cma*, uravnano s tem promotorjem, ni odvisno od odziva SOS.

Za pozitivno kontrolo fluoresciranja celic z veliko konstitutivno aktivnostjo promotorja, smo izbrali plazmid pKCT4 s *cki-gfp* in ga transformirali v kompetentne celice seva

RW118 ter opazovali fluorescenco kulture v stacionarni fazi rasti. Promotor gena proteina imunosti kolicina K, *cki*, je močno aktiven in je zaradi konstitutivnega izražanja produkcija GFP bila velika, kar je prikazano na Sliki 23 C.D.

Da bi potrdili, da fluorescenca celic seva RW118 s pSC304 ni le posledica nekontroliranega izražanja *gfp*, smo za negativno kontrolo fluorescence transformirali plazmid pSC101 brez promotorja v kompetentne celice seva RW118. Plazmid pSC101 smo izolirali iz seva MG1655 U-66. Slika 23 E.F. potrjuje, da ni nekontroliranega izražanja *gfp* plazmida pSC101, saj nismo zaznali fluorescence celic.



Slika 23: Izražanje gena aktivnosti kolicina M, *cma*, na ravni posameznih celic v RW118. Prikazane so izbrane slike fluorescence celic (A.) s fuzijo *cma-gfp*; (C.) s fuzijo *cki-gfp* kot pozitivno kontrolo; in (E.) s pSC101 brez promotorja kot negativna kontrola; ter pripadajoče slike pod vidno svetlobo (B., D., F.).

Figure 23: Colicin M activity gene expression at single cell level in RW118. Presented are selected fluorescence images of cells (A.) with *cma-gfp* fusion; (C.) with *cki-gfp* fusion expression as positive control; and with promoterless pSC101 cells as a negative control; and the same visible light images (B., D., F.).

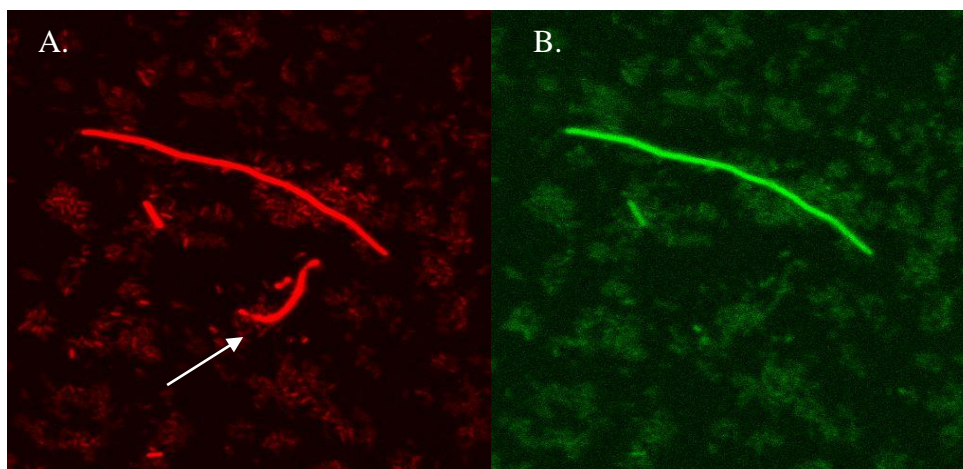
4.3 URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENA AKTIVNOSTI POROTVORNEGA KOLICINA K

4.3.1 Transkripcija gena *cka* kolicina K v odsotnosti indukcije SOS

Znano je, da v stacionarni fazi rasti, ko primanjkuje hranil, pride do izražanja gena aktivnosti kolicina K, *cka*, v 3 % celic populacije (Mulec in sod., 2003). Zanimalo nas je, ali je to izražanje povezano z indukcijo odziva SOS. Zato smo sočasno spremljali aktivnost promotorjev genov *cka* in *lexA* v istih celicah s sledenjem izražanja poročevalskih genov *rfp* in *gfp*. Gen *lexA* kodira represor odziva SOS in je zaradi avtoregulacije njegovo izražanje ob odzivu SOS inducirano. V kompetentne celice RW118 smo kotransformirali plazmida pSC200 z *lexA-gfp* (Km^r) in pKCT10 s *cka-rfp* (Ap^r) ter opazovali fluorescenco GFP in RFP v celicah stacionarne faze s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo z uporabo konfokalnega mikroskopa Zeiss LSM 510 META z dvema različnima laserjema.

Plazmid pKCT10 s transkripcijsko fuzijo *cka-rfp* smo pripravili z zamenjavo kasete *gfp-kan* v plazmidu pKCT3 z genom *rfp* brez lastnega promotorja. Sekvenco *rfp* v pKCT10 smo preverili s sekvenciranjem (MacroGen) z začetnima oligonukleotidoma *cka*PK in Rd r in jo podali v Prilogi A. Pri pomnoževanju fragmenta *rfp* je prišlo do zamenjave 1 nt, a zaradi tega ni prišlo do zamenjave AK.

Na Sliki 24 je prikazana fluorescenca posameznih celic seva RW118 s *cka-rfp* in *lexA-gfp*. Rezultati mikroskopije kažejo, da je večina celic z močno aktivnostjo promotorja gena *lexA* kazala tudi močno aktivnost promotorja gena *cka*. Opazili pa smo, da je v posameznih celicah (približno 0,1 % populacije) prišlo do močne aktivacije *cka* tudi, ko aktivacije *lexA* ni bilo. Kljub temu, da so te celice filamentozne, kar je znak inducirane odziva SOS, v teh celicah SOS ni bil inducirano. Na podlagi tega sklepamo, da izražanje *cka* ni odvisno le od cepitve represorja LexA in da majhen del populacije izraža gen aktivnosti kolicina K v odsotnosti odziva SOS.



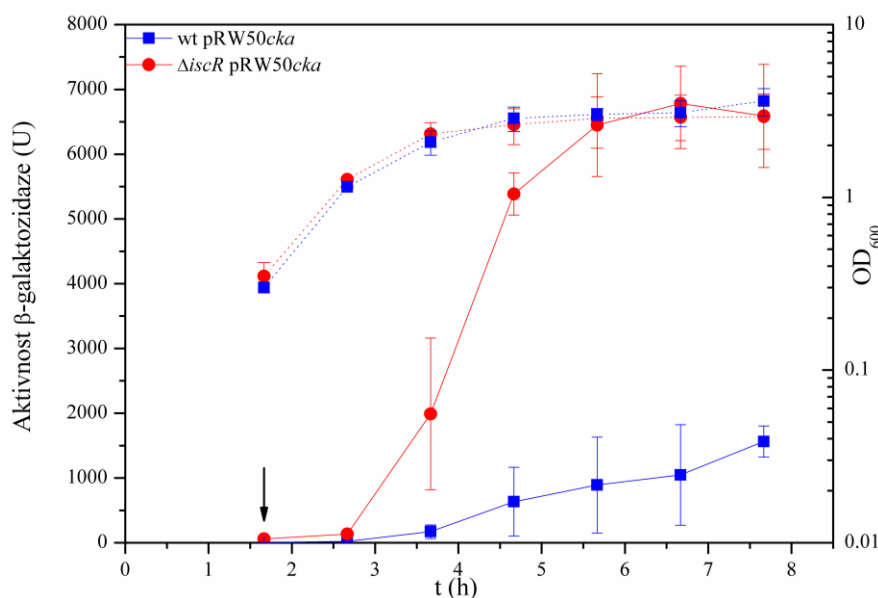
Slika 24: Fluorescenčni sliki prikazujeta sočasno izražanje transkripcijskih fuzij (A.) *cka-rfp* in (B.) *lexA-gfp* v RW118. Puščica kaže na celico z velikim izražanjem *cka*, a ne *lexA* (Kamenšek in sod., 2010: 7).

Figure 24: Fluorescence images showing simultaneous expression of the (A.) *cka-rfp* and (B.) *lexA-gfp* transcriptional fusions in RW118. The arrow indicates a cell with high level expression of *cka*, but not *lexA* (Kamenšek in sod., 2010: 7).

4.3.2 IscR uravnava izražanje kolicina K

Poleg transkripcijskega represorja LexA, transkripcijo gena *cka* kolicina K uravnava še en represor, in sicer IscR, katerega vezavno mesto se prekriva z -35 elementom promotorja (Butala in sod., 2012).

Na Sliki 25 aktivnosti β -galaktozidaze SOS-induciranih kultur sevov Keio wt in Keio Δ *iscR* s fuzijo *cka-lacZ* na pRW50*cka* kažejo, da je uravnavanje transkripcije *cka* odvisno od IscR, saj je pri sevu z delecijo Δ *iscR* bila aktivnost β -galaktozidaze močno povečana. Opazen je tudi časovni zamik v indukciji transkripcije *cka*, ki pa je v odsotnosti IscR manjši.

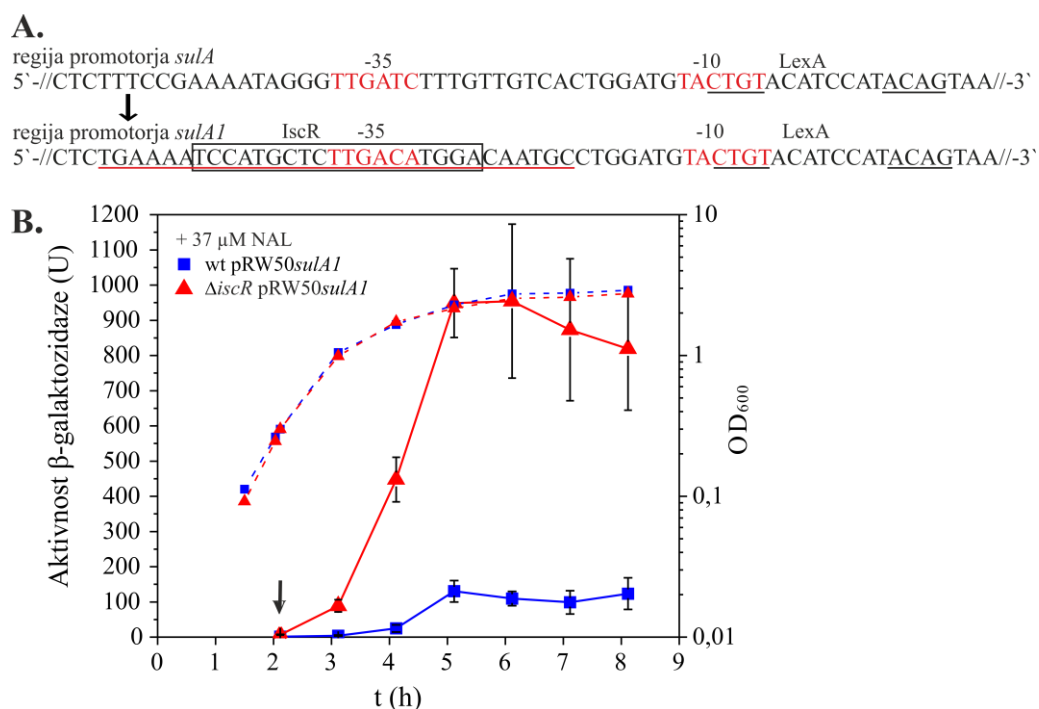


Slika 25: Izražanje gena *cka* kolicina K je odvisno od IscR. Aktivnost β-galaktosidaze (neprekinjene črte) z Nal tretiranih sevov Keio wt in Keio Δ *iscR* s plazmidom pRW50*cka* ter optična gostota pri 600 nm (prekinjene črte) v odvisnosti od časa. Puščica prikazuje čas ob dodatku Nal (37 μM). Odkloni od povprečja dveh ponovitev so prikazani s standardno deviacijo.

Figure 25: Colicin K expression depends of IscR. β-galactosidase activity (solid lines) of Nal treated Keio wt and Keio Δ *iscR* strains harbouring pRW50*cka* and optical density at 600 nm (dotted lines) as functions of time. The arrow indicates the time of addition of Nal. Each value is the average ± SEM of duplicate experiments.

4.3.3 IscR in LexA delujeta neodvisno

Da bi potrdili, da je transkripcija gena *cka* hkrati uravnana z dvema transkripcijskima represorjema, IscR in LexA, je bil izdelan umetni promotor SOS *sulAI* z dodanim vezavnim zaporedjem IscR. Promotorju gena *sulA*, ki ima eno LexA vezavno zaporedje, je bilo dodano vezavno zaporedje represorja IscR iz promotorja gena *cka* kolicina K (Slika 26 A., nt zaporedje je v Prilogi B). S kloniranjem modificiranega promotorja v plazmid pRW50 smo pripravili fuzijo *sulAI-lacZ*. Transkripcijsko aktivnost fuzije *sulAI-lacZ* smo spremljali z merjenjem aktivnosti β-galaktosidaze tekom rasti v sevu BW25113 (Keio wt) in Keio Δ *iscR* ob indukciji z Nal. Rezultati aktivnosti β-galaktosidaze prikazani v Sliki 26 B. kažejo, da je aktivnost promotorja *sulAI* v sevu wt utišana celo po indukciji odziva SOS zaradi dodanega mesta IscR. S tako spremenjenim, sicer od IscR neodvisnim promotorjem, smo ugotovili, da IscR in LexA skupaj utišata transkripcijo gena *cka*.



Slika 26: IscR utiša *sulA1* različico promotorja *sulA*. (A) Promotorska regija *sulA* in spremenjena različica *sulA1* z dodanim IscR vezavnim zaporedjem. Označena sta -35 in -10 promotorska elementa, LexA vezavno zaporedje s podčrtanimi SOS zaporedji (angl. SOS boxes), vstavljeno IscR vezavno mesto (podčrtano z rdečo) s palindromskim zaporedjem v kvadratku. (B) Izmerjena aktivnost β -galaktozidaze v sevu BW25113 (wt) ali sevu Δ *iscR*, ki imata plazmid pRW50 s promotorjem *sulA1*. Puščica kaže čas ob dodatku Nal. Vsaka vrednost je povprečje najmanj treh ponovitev s podano standardno deviacijo. Optična gostota pri 600 nm je prikazana kot prekinjene črte (Butala in sod., 2012: 133).

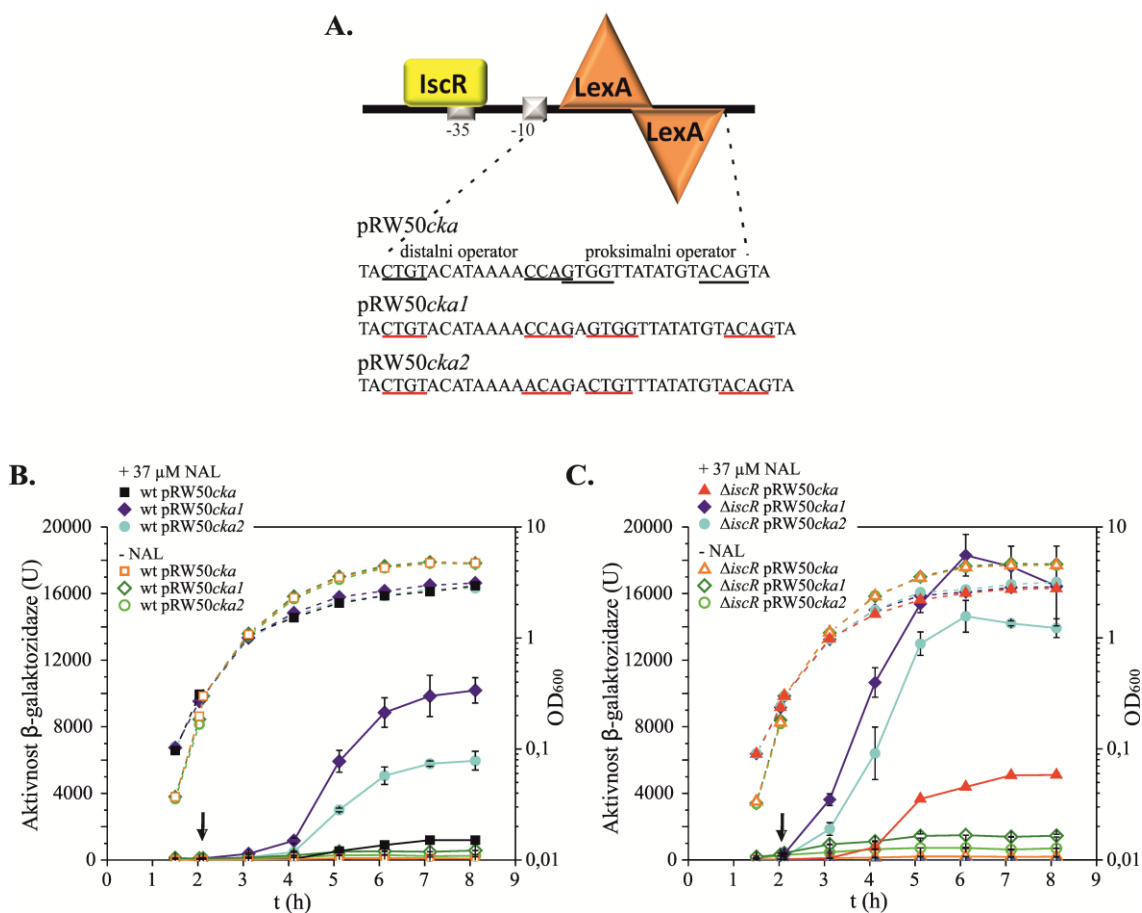
Figure 26: IscR represses the *sulA1* promoter variant. (A) The wild-type *sulA* and the altered promoter region, *sulA1*. Marked are the -35 and -10 promoter elements, the LexA binding site (SOS boxes are underlined), inserted IscR target site (underlined with red line) with the palindromic sequence denoted by box. (B) Measured β -galactosidase activities in BW25113 (wt) or the Δ *iscR* mutant derivative carrying *sulA1* promoter region subcloned into pRW50. The arrow indicates the time of addition of NAL. Each value is the average \pm SEM of at least triplicate experiments and the optical density measured at 600 nm is shown as dashed lines (Butala in sod., 2012: 133).

4.3.4 IscR stabilizira LexA in povzroči zamik v transkripciji gena aktivnosti kolicina K po poškodbi DNA

Da bi potrdili, da IscR stabilizira vezavo LexA na promotor gena aktivnosti kolicina K, *pcka*, in s tem po indukciji SOS podaljša čas potreben za disociacijo LexA iz vezavnih zaporedij, smo spremljali aktivnost *pcka* in različic promotorja *pcka* s slabšo vezavo proteina LexA v sevih BW25113 (wt) in z delecijo gena *iscR* (Δ *iscR*). Da bi preprečili močno kooperativno vezavo dveh dimerov LexA na prekrivajoči vezavni zaporedji, smo ustvarili dve različici *pcka*: i) z ločenima LexA vezavnima zaporedjima z vstavljenim enim bp (Slika 27 A., glej pRW50*cka1*), ii) z ločenima ter s konsenznima SOS zaporedjima (Slika 27 A., glej pRW50*cka2*). S konsenznima SOS zaporedjima je afiniteta vezave LexA na ločeni zaporedji močnejša. Promotorski zaporedji različic

(podani v Prilogi B) sta bili klonirani v pRW50 za spremljanje aktivnosti promotorjev s testom β -galaktozidaze.

Rezultati aktivnosti β -galaktozidaze na Sliki 27 kažejo, da je protein LexA med normalno bakterijsko rastjo utišal promotorja *cka* obeh izpeljank (Slika 27 B., glej -Nal celice). Po pričakovanju je bila ob poškodbah DNA aktivnost promotorja največja v sevu s pRW50*cka1*, manjša v sevu s pRW50*cka2* in najmanjša v sevu s pRW50*cka* (Sliki 27 B. in C., glej +Nal celice). V sevu z Δ *iscR* je bila aktivnost promotorjev veliko večja kot v sevu BW25113 (wt). Pri obeh različicah promotorja je po indukciji poškodbe DNA v sevu BW25113 (wt) bil opazen zamik v indukciji ali t. i. lag faza (Slika 27 B., glej +Nal celice), medtem ko v sevu z Δ *iscR* zamika ni bilo (Slika 27 C., glej +Nal celice). Časovni zamik v aktivnosti promotorjev po poškodbi DNA v odsotnosti IscR je izginil le, če je vstavljen bp med vezavnimi mesti vezave LexA (*pcka1* in *pcka2*) in ne pri nespremenjenem promotorju *pcka*. Iz tega sklepamo, da ima kooperativna vezava dveh dimerov LexA na promotor veliko vlogo pri močnem utišanju promotorja *cka*, in da IscR stabilizira LexA na promotorju gena *cka*. Soodvisnost med transkripcijskima faktorjema nadzira časovno indukcijo promotorja *pcka* po poškodbi DNA. IscR stabilizira LexA na *pcka* po indukciji odziva SOS in podaljša čas potreben za disociacijo LexA iz vezavnih zaporedij.



Slika 27: IscR in LexA soodvisno utišata *pcka* po poškodbi DNA. (A) Shematski prikaz pomembnih elementov vpletenih pri regulaciji promotornja *cka*. Označena sta -35 in -10 elementa promotornja, vezavno zaporedje IscR in prekrivajoča zaporedna mesta vezave LexA, distalno in proksimalno zaporedje LexA. Navedene so izpeljanke vezavnih zaporedji promotornja *cka*, vstavljene v pRW50. Zaporedja SOS in modificirane tarče so podčrtane s črno in rdečo črto. (B.) Izmerjena aktivnost β -galaktozidaze v sevu BW25113 (wt) in (C.) Δ *iscR* mutanti seva s plazmidi pRW50*cka*, pRW50*cka1*, pRW50*cka2*. Vsaka vrednost je povprečje vsaj treh eksperimentov s podano standardno deviacijo in OD₆₀₀ prikazano kot prekinjene črte. Puščica kaže čas ob dodatku nalidiksične kisline (NAL) (Butala in sod., 2012: 135).

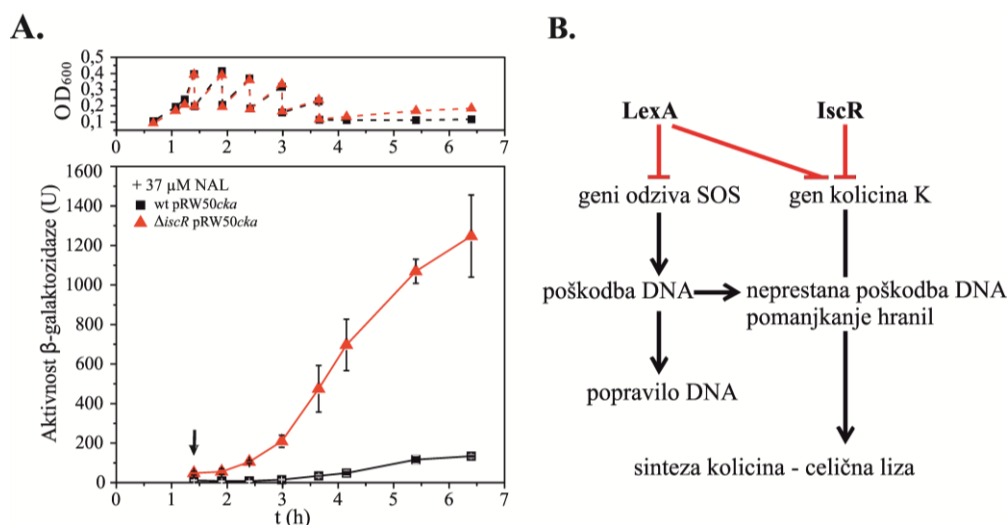
Slika 27: IscR and LexA co-dependently repress *pcka* after DNA damage. (A) A schematic representation of the important elements involved in regulation of the *cka* promoter. Marked are the -35 and the -10 promoter elements, IscR binding site and the overlapping tandem DNA sites for LexA. The LexA binding sites of the *cka* promoter inserted in pRW50 and the derivatives are indicated. The SOS boxes and the modified targets are underlined with black and red lines respectively. (B.) Measured β -galactosidase activities of BW25113 (wt) and the (C.) Δ *iscR* mutant strain carrying either pRW50*cka*, pRW50*cka1* or the pRW50*cka2* variant. Each value is the average \pm SEM of at least triplicate experiments and OD₆₀₀ is shown as dashed lines. The arrow indicates the time of addition of nalidixic acid (NAL) (Butala in sod., 2012: 135).

4.3.5 Uravnavanje aktivacije promotorja kolicina K z IscR je odvisno od hranil

Tekom rasti bakterij *E. coli* v gojišču se količina IscR v celicah, ko te vstopijo v pozno eksponentno ali zgodnjo stacionarno fazo rasti, zmanjša 3-krat. To kaže, da je transkripcija gena aktivnosti kolicina K, *cka*, v SOS-induciranih celicah aktivirana, ko raven IscR pade pod prazno raven (Butala in sod., 2012). Zato nas je zanimalo, ali se derepresija *cka* v SOS-induciranih celicah pojavi zaradi zmanjšanja količine IscR povezanega s pomanjkanjem hranil. V ta namen smo SOS-inducirani kulturi sevov BW25113 (wt) in $\Delta iscR$ s pRW50*cka* gojili v s hranili bogatem okolju in spremljali aktivnost β -galaktozidaze. Kulturama smo periodično dodajali sveže gojišče LB z Nal in tako vzdrževali gostoto kulture do OD₆₀₀ 0,4. Ko je kultura dosegla OD₆₀₀ 0,4, kar je bilo na približno 30 min, smo jo 2-krat redčili s svežim gojiščem. Poskušali smo vzdrževati OD₆₀₀, vendar kot je razvidno iz Slike 28 A., se je rast ustavljala, morda zaradi kopičenja Nal.

Rezultati aktivnosti β -galaktozidaze na Sliki 28 A. kažejo, da je zaradi izobilja hranil promotor *cka* v sevu BW25113 (wt) ostal utišán, medtem ko je bil v sevu z delekcijo $\Delta iscR$ aktiven. Na podlagi rezultatov sklepamo, da ko je hranil dovolj, IscR utiša promotor *cka* v celicah z induciranim odzivom SOS, in da hranila vplivajo na znotrajcelično koncentracijo IscR.

Slika 28 B. prikazuje model zakasnjene izražanja *cka*, ki smo ga postavili na podlagi rezultatov aktivnosti promotorja *cka* v odvisnosti od hranil in indukcije SOS zaradi poškodb DNA. Model prikazuje, da sta med normalno rastjo IscR in LexA vezana na promotor *cka* in utišata transkripcijo. Po poškodbi DNA se inducira odziv SOS, znotrajcelična koncentracija LexA pade in začne se popravilo DNA. Do derepresije promotorja *cka* po dlje časa trajajoči poškodbi DNA pride zaradi zmanjšanja ravni IscR odvisne od nižanja hranil. Izgleda, da IscR zadrži LexA ob indukciji SOS na promotorju le do pomajkanja hranil, nakar pride do produkcije letalnega kolicina.



Slika 28: IscR uravnava izražanje kolicina K v odvisnosti od hranil. (A.) Zgornji graf prikazuje rast bakterijskih kultur ob periodičnem dodajanju svežega LB gojišča z Nal, da gostota celic ni preseгла OD₆₀₀ 0,4. Spodnji graf prikazuje aktivnost β-galaktosidaze v sevu BW25113 (wt) ali Δ*iscR* s pRW50*cka*. Puščica kaže čas dodatka Nal. Vrednosti so povprečja treh ponovitev s podanimi standardnimi deviacijami. (B) Model zakasnjene izražanja *cka* (Butala in sod., 2012: 134).

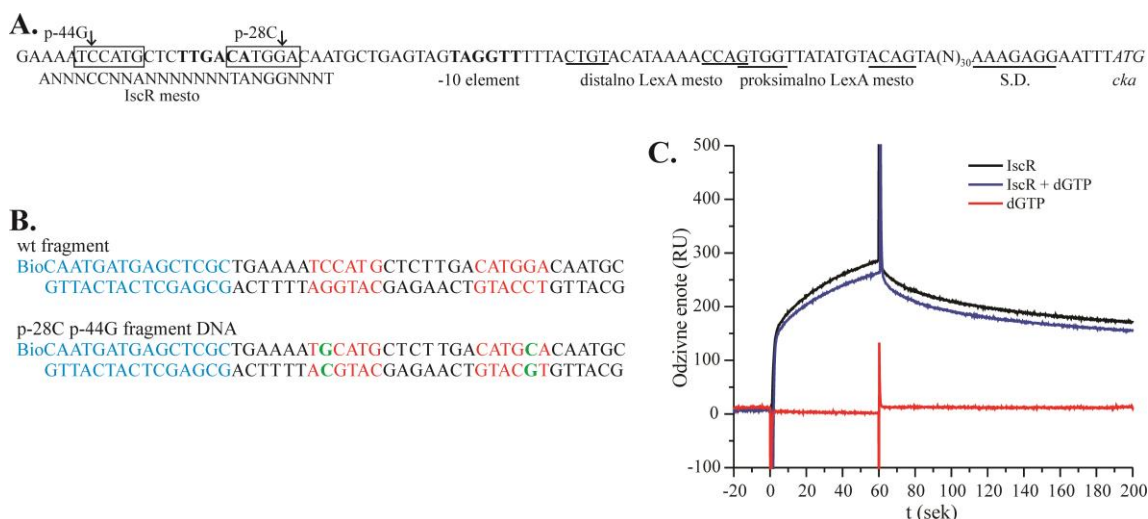
Figure 28: Deactivation of IscR control is driven by a decline of cellular nutritional status. (A) Above, bacterial cultures were maintained in a nutritionally rich environment by periodic subculturing in fresh LB media supplemented with NAL thus, not allowing the cell density to exceed 0.4 OD₆₀₀. Below, β-galactosidase activities in BW25113 (wt) or Δ*iscR* cells carrying pRW50*cka*. The arrow indicates the time of addition of NAL. Values are the average ± SEM of triplicate experiments. (B) Model for the delayed expression of *pcka* (Butala in sod., 2012: 134).

4.3.5.1 Ali IscR stabilizira LexA na *pcka* v odvisnosti od kofaktorjev?

Z analizo površinske resonance plazmonov SPR smo testirali odvisnost vezave IscR na zaporedje promotorja *cka* od različnih deoksiribonukleotid trifosfatov: dGTP, dATP, dCTP, dUTP, dTTP. Ti bi lahko bili morebitni kofaktorji pri vezavi IscR na DNA, kot je bilo predhodno ugotovljeno za GTP, ki stabilizira vezavo CodY represorja pri *Bacillus subtilis* (Ratnayake-Lecamwasam in sod., 2001; Handke in sod., 2008).

Meritve SPR smo izvedli pri 25 °C na aparatu Biacore X (GE Healthcare) v Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco. Na streptavidinski senzorni čip SA (GE Healthcare) smo vezali približno 80 odzivnih enot (RU) DNA, ki zajema mesto vezave IscR promotorske regije kolicina K. Vezali smo tako specifično kot nespecifično zaporedje IscR z mutacijama na mestih p-44 in p-28, ki je služilo za negativno kontrolo. Specifično in nespecifično IscR zaporedje sta podani na Sliki 29 B., širša regija promotorja *cka* z označenima mestoma mutacij v zaporedju IscR je podana na Sliki 29 A. Interakcije vezave IscR na DNA v odvisnosti od različnih deoksiribonukleotid trifosfatov smo preučevali z injiciranjem mešanice IscR in posameznih deoksiribonukleotid trifosfatov tako, da smo opazovali hitrost asociacije in disociacije, ter število odzivnih enot.

Rezultate smo analizirali s programom BIAevaluation Version 3.2 (Biacore AB, Švedska). Od odzivnih enot (RU) senzogramov vezave IscR v kombinaciji z deoksiribonukleotid trifosfati na specifično DNA iz celice 2 so bile odštete RU senzogramov iz celice 1 z nespecifično DNA, ki ne veže IscR. Tako smo dobili senzogramove poskusov vezave IscR v kombinacijah različnih deoksiribonukleotid trifosfatov in jih primerjali s senzogramom vezave IscR brez deoksiribonukleotid trifosfatov. Za kontrolo smo analizirali vezavo samih deoksiribonukleotid trifosfatov v pufru brez IscR. Ugotovili smo, da deoksiribonukleotid trifosfati ne vplivajo na vezavo IscR na *pcka* in da niso kofaktorji vezave. Slika 29 C. prikazuje primerjavo senzogramov pri testiranju vezave IscR na DNA v prisotnosti dGTP. Tako za dGTP kot ostale deoksiribonukleotid trifosfate rezultati kažejo primerljivo asociacijo in disociacijo IscR s fragmenta promotorja *cka* v prisotnosti in odsotnosti posameznih deoksiribonukleotid trifosfatov.



Slika 29: Vezava IscR na fragment promotorja *cka* z metodo SPR v odvisnosti od dGTP. (A.) Regulatorni elementi promotorske regije *cka*. Kvadratka označujeta palindromsko tarčno mesto vezave IscR, ki je konsenzno (Nesbit in sod., 2009). Promotorska elementa -35 in -10 sta v debelem tisku, označeni sta še tarčni LexA vezavni mesti, Shine-Dalgarno zaporedje (S.D.) in mesto začetka translacije (*cka*). p-44G in p-28C sta mesti, ki sta bili v nespecifičnem fragmentu DNA mutirani (Butala in sod., 2012: 132). (B.) Biotinilirana DNA fragmenta uporabljena pri analizi SPR. DNA sidro preko katerega je pritrjen fragment DNA na površino čipa je označen z modro barvo, palindromsko zaporedje z rdečo in točkovni mutaciji z zeleno (Butala in sod., 2012: 132). (C.) SPR senzogram interakcije IscR s specifičnim in nespecifičnim – mutiranim mestom vezave IscR na fragmentu DNA v odvisnosti od dGTP. **Figure 29:** IscR binding to *cka* promoter fragment in dependency of different dXTP analysed by SPR. (A.) Regulatory elements of the *cka* promoter region. The boxes indicate the predicted palindromic target for IscR binding which corresponds to the consensus (Nesbit in sod., 2009). The promoter -10 and -35 elements are in bold type, and the SOS box targets for LexA, the Shine Dalgarno sequence (S.D.) and the translation start site (*cka*) are also indicated. p-44G in p-28C are mutated in unspecific target DNA (Butala in sod., 2012: 132). (B.) Biotinylated DNA fragments used in the SPR analysis. The DNA linker by which fragments were attached to the chip surface is indicated in blue font, the palindromic sequence in red and the point mutations in green (Butala in sod., 2012: 132). (C.) SPR sensorgram of IscR interacting with either wt DNA fragments or derivative with mutations in the predicted IscR site in the presence of dGTP.

4.4 URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV NUKLEAZNIH KOLICINOV

4.4.1 Kvantifikacija sinteze kolicinov ob indukciji odziva SOS v odsotnosti IscR

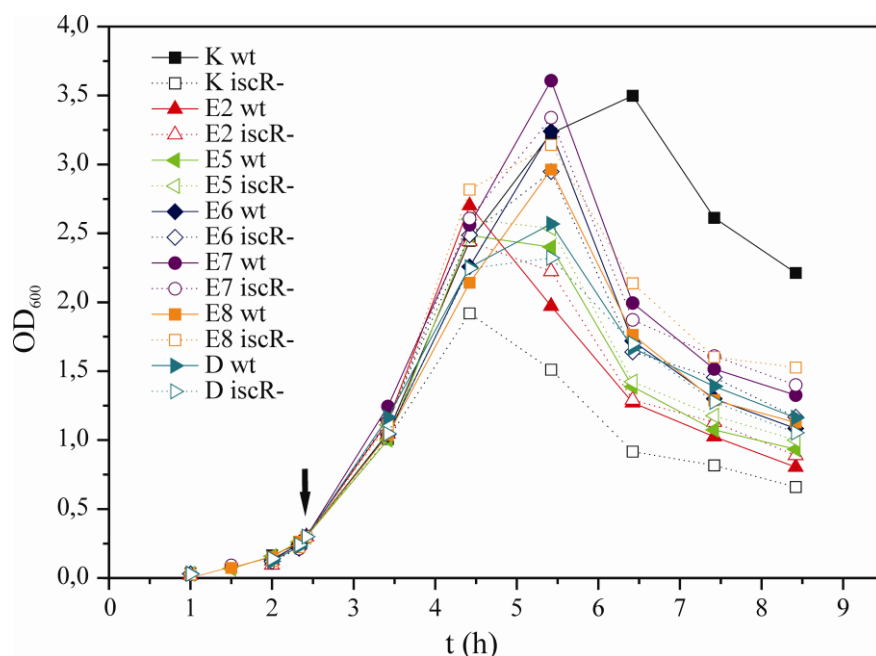
Da bi preverili, ali je tudi izražanje genov nukleaznih kolicinov odvisno od transkripcijskega regulatorja IscR, kot je bilo predhodno ugotovljeno za kolicin K in še nekaj drugih porotvornih kolicinov (Butala in sod., 2012), smo najprej spremljali sintezo izbranih kolicinov v sevih BW25113 (Keio wt) in JW2515 (Keio $\Delta iscR$) ob indukciji odziva SOS.

Za preučevanje smo izbrali kolicina D in E5 (tRNazi), kolicine E2, E7 in E8 (DNaze) in kolicin E6 (16S rRNaza). Najprej smo na naravne plazmide z zapisom za kolicine iz zbirke Pugsley dodali gen za odpornost proti ampicilinu (Ap^r), za selekcijo transformacije plazmidov v preučevana seva. Zapis za odpornost proti ampicilinu (Ap^r), zapisano na transpozonu Tn3 smo na plazmide prenesli s konjugacijo in transpozicijo kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Promotorskim regijam genov aktivnosti kolicinov je bilo določeno nukleotidno zaporedje (Macrogen) in je podano v Prilogi A.

Za spremljanje sinteze kolicinov po indukciji odziva SOS smo pripravljene plazmide pColD-Tn3, pColE2-Tn3, pColE5-Tn3, pColE6-Tn3, pColE7-Tn3, pColE8-Tn3 in plazmid pKCT1 transformirali v seva BW25113 (Keio wt) in JW2515 (Keio $\Delta iscR$). Plazmid pKCT1 smo uporabili za kontrolo, saj vemo, da se sinteza kolicina K v sevu brez IscR pojavi po indukciji odziva SOS prej kot v sevu wt. Prekonočne kulture transformant s posameznim plazmidom pCol smo precepili v sveže gojišče LB in v celicah inducirali odziv SOS z dodatkom subinhibitornih koncentracij Nal (37 μ M) v zgodnji eksponentni rasti pri OD_{600} 0,3. Vzorce kultur smo za spremljanje sinteze kolicina odvzeli tik pred dodatkom Nal in še nadaljne 3 h po indukciji SOS. Vzorce smo redčili do OD_{600} 0,3, da je bilo v vseh vzorcih približno enako število celic in pripravili celične lizate oz. grobe kolicinske ekstrakte. Nanesli smo jih v žepke na agarne plošči z LB s Tc, ki je bila prekrita z indikatorsko kulturo seva, občutljivega za kolicine, in opazovali velikost nastalih con lize indikatorskega seva, ki so odražale količino nastalega kolicina. Na podlagi velikosti nastalih con lize smo ugotavljali, ali se sinteza kolicinov v sevu brez IscR pojavi prej.

Na Sliki 30 so prikazne rastne krivulje kolicinogenih kultur sevov Keio wt in $\Delta iscR$ (*iscR*-) tretiranih z Nal. Iz rastnih krivulj je razvidno, da je viabilnost obeh sevov 2 h ali 3 h po dodatku Nal drastično padla zaradi inducirane sinteze kolicinov in posledično lize celic. Razlike v optični gostoti med sevi wt in $\Delta iscR$ z zapisi za nukleazne kolicine so zelo majhne, medtem ko je med sevoma wt in $\Delta iscR$ z zapisom za kolicin K ta razlika zelo velika. Pri tretiranju z grobim ekstraktom kolicina K je optična gostota v sevu wt začela padati šele po 4 h, medtem ko je v sevu $\Delta iscR$ že 2 h po indukciji odziva

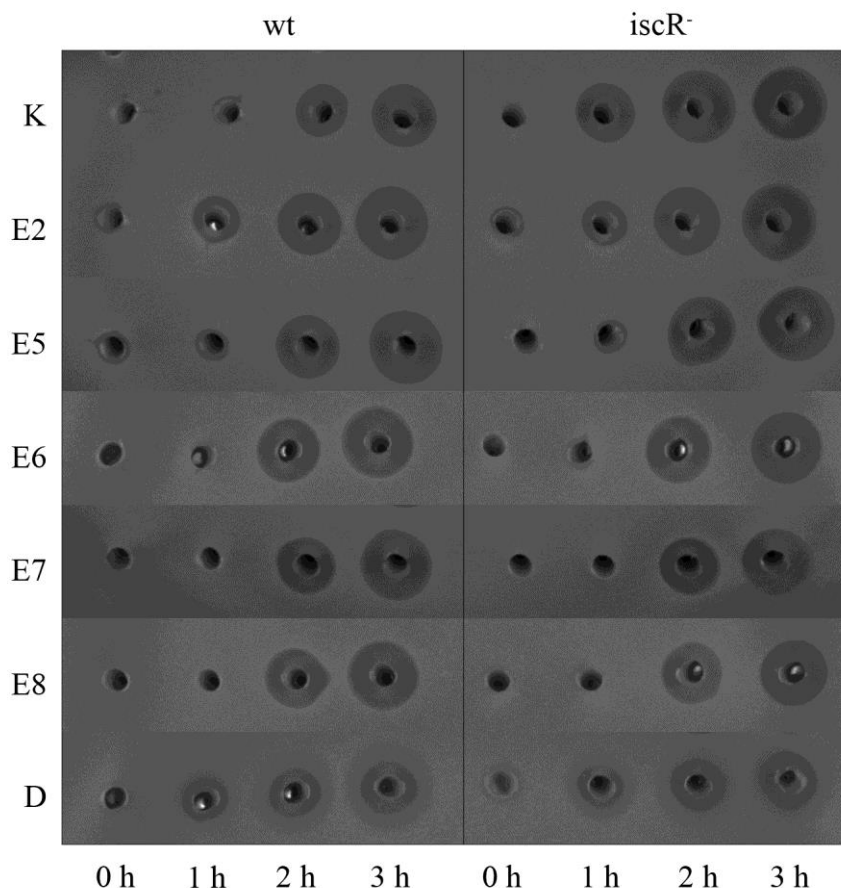
SOS. Padec optične gostote nakazuje na povečano lizo seva zaradi sinteze kolicina K in proteina lize.



Slika 30: Rastne krivulje sevov Keio wt in $\Delta iscR$ (*iscR*-) s plazmidi z zapisi za kolicin K, E2, E5, E6, E7, E8, D po indukciji SOS z Nal ($37 \mu\text{M}$). Puščica prikazuje čas ob dodatku nalidiksične kisline.

Figure 30: Growth curve of Keio wt and $\Delta iscR$ (*iscR*-) cells harbouring naturally occurring plasmids encoding colicins K, E2, E5, E6, E7, E8, D after SOS induction with Nal ($37 \mu\text{M}$). The arrow indicates the time of addition of nalidixic acid.

Slika 31 prikazuje cone lize indikatorskega seva DH5 α s pBR322 (Ap^rTc^r), nastale po dodatku kolicinov grobih lizatov kolicinogenih kultur sevov Keio wt in $\Delta iscR$ (*iscR*-), ki smo jih vzorčili 0 h, 1 h, 2 h in 3 h po indukciji odziva SOS z Nal. Na podlagi nastalih con lize opazimo, da je bila tako v sevu Keio wt kot $\Delta iscR$ za 2 h zakasnjena produkcija vseh nukleaznih kolicinov, razen E2 in D, kjer tako velikega časovnega zamika ni bilo v nobenem sevu. Pri pozitivni kontroli – pri kolicin K kodirajočem sevu $\Delta iscR$ se je zamik v produkciji kolicina zmanjšal in je že 1 h po dodatku Nal bilo bistveno več nastalega kolicina K kot v sevu Keio wt. To potrjuje, da IscR uravnava izražanje kolicina K. Iz rezultatov con lize sklepamo, da je sinteza nukleaznih kolicinov neodvisna od proteina IscR, saj se v odsotnosti proteina IscR ob indukciji odziva SOS produkcija nukleaznih kolicinov ni pojavila že po 1 h, kakor je to vidno pri pozitivni kontroli.

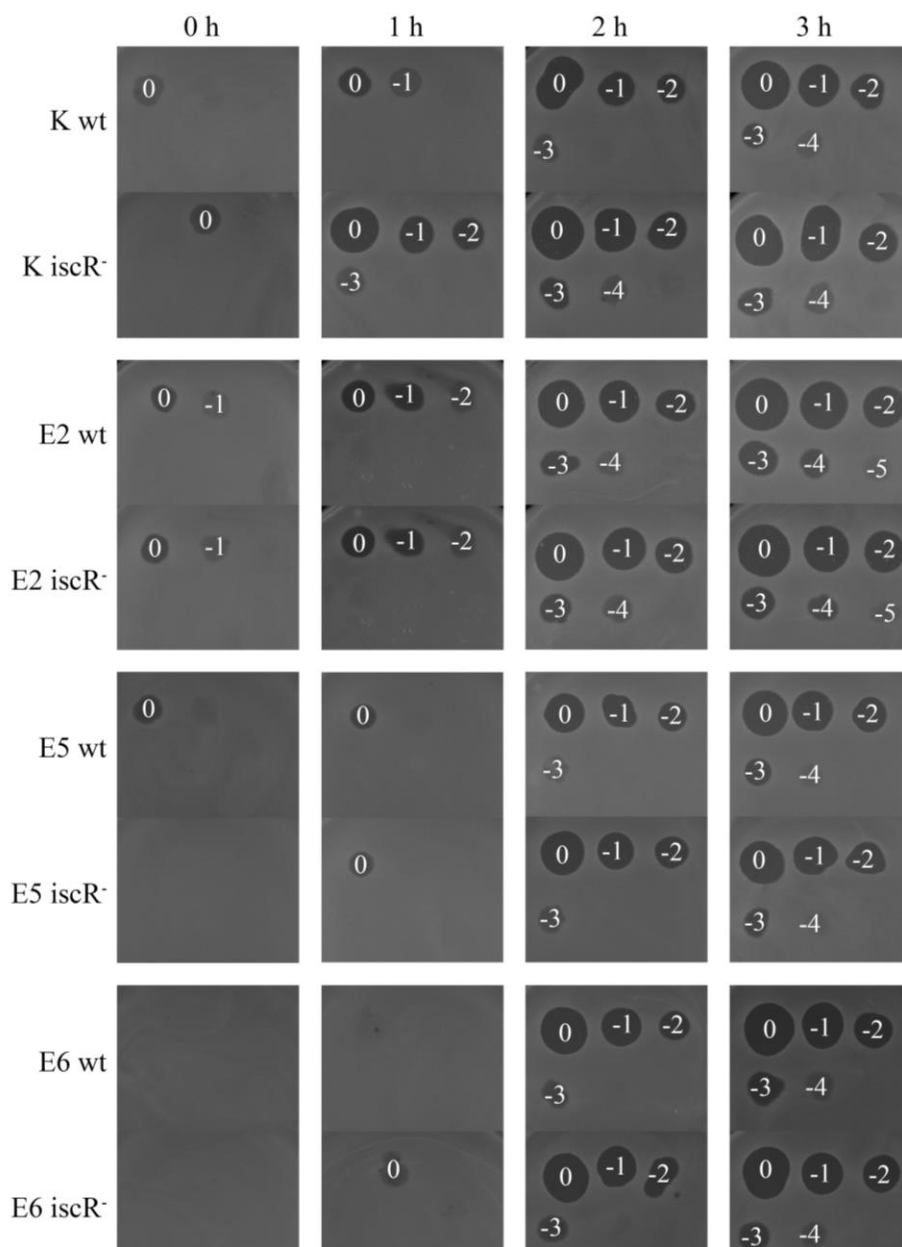


Slika 31: Produkcija kolicinov, prikazana s conami lize indikatorskega seva DH5 α s pBR322, po dodatku grobih kolicinskih ekstraktov kolicinogenih kultur sevov Keio wt in $\Delta iscR$ (*iscR*-). V žepke agarne plošče LB s Tc so bili nanešeni lizati enake količine celic, zbrane po 0, 1, 2 in 3 h po indukciji odziva SOS z Nal.

Figure 31: Assays of colicin production in cells harbouring colicin encoding plasmids with indicator strain DH5 α pBR322 lysis zones. In the LB Tc agar plate pockets were applied cell lysates from equal amounts of cells collected at 0, 1, 2 and 3 h after induction of the SOS response with Nal.

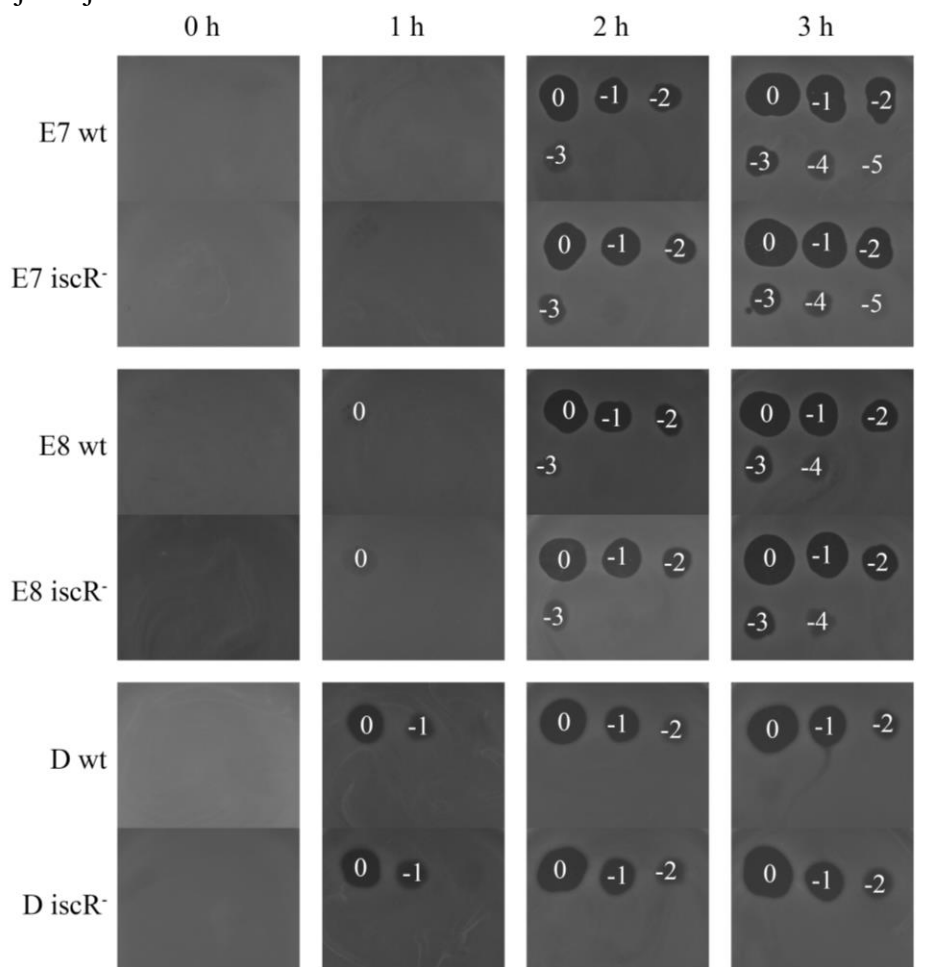
Da bi natančneje določili razlike v količini produciranih kolicinov med kolicinogenima sevoma Keio wt in $\Delta iscR$ (*iscR*-) v posameznih časovnih točkah po indukciji odziva SOS, smo pripravili serije 10-kratnih redčitev grobih kolicinskih ekstraktov in jih po 5 μ l nakapljali na plošče LB Tc, prekrte z indikatorsko kulturo DH5 α pBR322 (Slika 32). Določili smo redčitev, pri kateri se še pojavi cona lize zaradi kolicinske aktivnosti in primerjali redčitev pri zadnji coni lize med ekstraktoma kolicinov sevov Keio wt in $\Delta iscR$. Na Sliki 32 so prikazane cone lize indikatorskega seva z nakapljanimi redčitvami kolicinskih ekstraktov. Razvidno je, da je v kolicin K kodirajočem sevu $\Delta iscR$ že 1 h po dodatku Nal bilo 100-krat več nastalega kolicina K kot v izogenem sevu Keio wt. Med sevi Keio wt in $\Delta iscR$ z zapisi za nukleazne kolicine razlik v količini nastalih kolicinov

ni bilo, razen pri kolicin E6 kolicinogenem sev $\Delta iscR$ je po 1 h vidna cona lize pri neredčenem lizatu, ki pa je lahko posledica minimalne delovne napake.



se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 32: Produkcija kolicinov kvantificirana z metodo nakapljanih plošč. Prikazane so cone lize s serijami 10-kratnih redčitev kolicinskih ekstraktov sevov Keio wt in $\Delta iscR$ (*iscR*⁻) s plazmidi z zapisi za kolicine K, E2, E5, E6, E7 in E8. Uporabili smo indikatorski sev DH5 α s pBR322. Kulture smo vzorčili tik pred in 1, 2, 3 h po indukciji odziva SOS z Nal.

Figure 32: Colicin production quantified by plate assay. Presented are lysis zones of a tenfold dilution series of colicin extracts of the Keio wt in $\Delta iscR$ (*iscR*⁻) strains harbouring plasmids encoding colicin K, E2, E5, E6, E7 and E8. The indicator used was DH5 α carrying pBR322. Culture samples were taken immediately before and 1, 2, 3 h after induction of the SOS response with the Nal.

4.4.1.1 Pregled promotorskih zaporedij preučevanih nukleaznih kolicinov za IscR vezavno zaporedje

Z namenom ugotoviti, ali imajo promotorji preučevanih nukleaznih kolicinov E2, E5, E6, E7, E8 in D IscR vezavno zaporedje, smo jih analizirali in primerjali z zaporedjem promotorja gena *cka* porotvornega kolicina K (Preglednica 27). Primerjava je pokazala, da promotorji preučevanih nukleaznih kolicinov nimajo IscR vezavnega zaporedja, in s tem smo potrdili, da je sinteza nukleaznih kolicinov res neodvisna od proteina IscR.

Preglednica 27: Regije promotorskih zaporedij kolicinov K, E2, E5, E6, E7, E8, D. Z rdečo je podčrtano IscR vezavno zaporedje promotorja kolicina K, ki se prekriva z mestom -35 promotorja. Naslednje podčrtano in odebeljeno je -10 mesto, sledi podčrtano LexA vezavno zaporedje in Shine-Dalgarnoovo zaporedje.

Table 27: Colicin K, E2, E5, E6, E7, E8, D promoter regions. IscR site in colicin K promoter is underlined with red, and overlaps with -35 promoter element. The following underlined and bold is -10 element, followed by underlined LexA binding sequence and the Shine-Dalgarno sequence.

Kolicin K :
TGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAATGCTGAGTAGTAGGTTTTACTGTACATAAAACCAGTGGTTATATGTAC AGTATATTGTTTTAATTTATTGTTTTAATTATCAAAGAGGAATTTATG
Kolicin E2:
ATTTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAACGATGACGGGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTA CAGTATTAATCATGTAATTAATTGTTTTAACGCTTAAAGAGGGAATTTTTATG
Kolicin E5:
ATTTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAACGATGACGGGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTA CAGTATTAATCATGTAATTAATTGTTTTAACGCTTAAAGAGGGAGTTTTTATG
Kolicin E6:
ATTTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAAAGATGACGAGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTA CAGTATTAATCATGTAATTAATTGTTTTAACGCTTAAAGAGGGAATTTTTATG
Kolicin E7:
ATATCCCTCCCTGACTTGACAGAGAAAAATAATGGCGAGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTA CAGTATTAATCATGTAATTAATTGTTTTAACGCTTAAAGAGGGAATTTTTATG
Kolicin E8:
ATTTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAACGATGACGGGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTA CAGTATTAATCATGTAATTAATTGTTTTAACGCTTAAAGAGGGACTTTTTATG
Kolicin D:
GTAAATCCAGTGGGTTGACAGGATTTACGAGGTGACGTAACTTTTCACTGTATATAAAACCAGTGGTTTTATATACA GTTTGTGTTTTAACGCATTGTTTTAAAAGTCAAAGAGGTGTTTTTATG

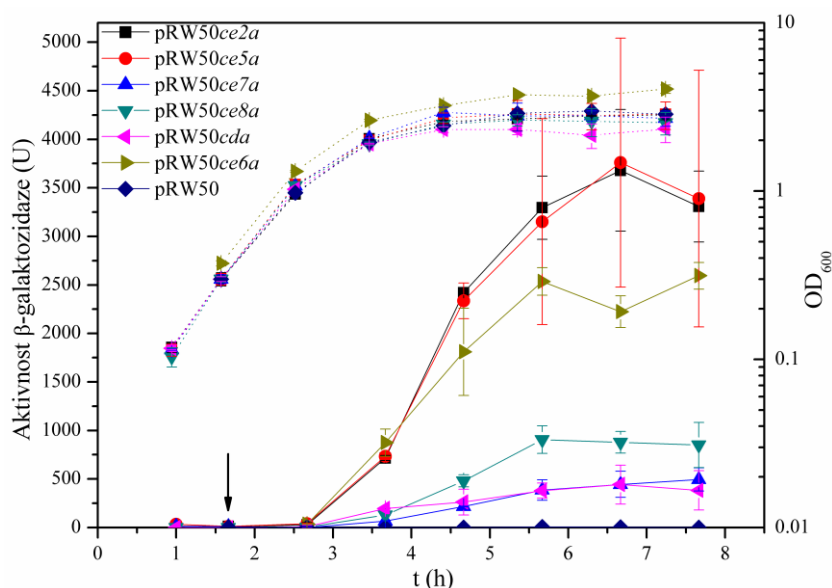
4.4.2 Izražanje genov nukleaznih kolicinov na nivoju transkripcije

V poskusu kvantifikacije sinteze kolicinov smo pokazali, da so kolicini E5, E6, E7, E8 sintetizirani 2 h po indukciji odziva SOS z Nal, kolicina E2 in D že nekoliko prej in neodvisno od uravnavanja s proteinom IscR. Zato nas je zanimalo, ali je tako zamik kot pri sintezi kolicinov tudi v transkripciji genov kolicinov. Če zamika ne bi bilo, bi pomenilo, da je sinteza preučevanih nukleaznih kolicinov uravnana na posttranskripcijskem nivoju.

Da bi dokazali, da je zamik v izražanju nukleaznih kolicinov tudi na nivoju transkripcije, smo spremljali transkripcijsko aktivnost promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D s testom β -galaktozidazne aktivnosti. V ta namen smo pripravili fuzije približno 400 nt dolgih regij promotorjev genov aktivnosti preučevanih kolicinov s poročevalskim genom *lacZ* na plazmidu pRW50 in spremljali aktivnost β -galaktozidaze v sevu Keio wt. Pripravljene plazmide smo poimenovali pRW50*ce2a*, pRW50*ce5a*, pRW50*ce6a*, pRW50*ce7a*, pRW50*ce8*-Ja, pRW50*cda*. Zaporedja promotorskih regij so podana v Prilogi A.

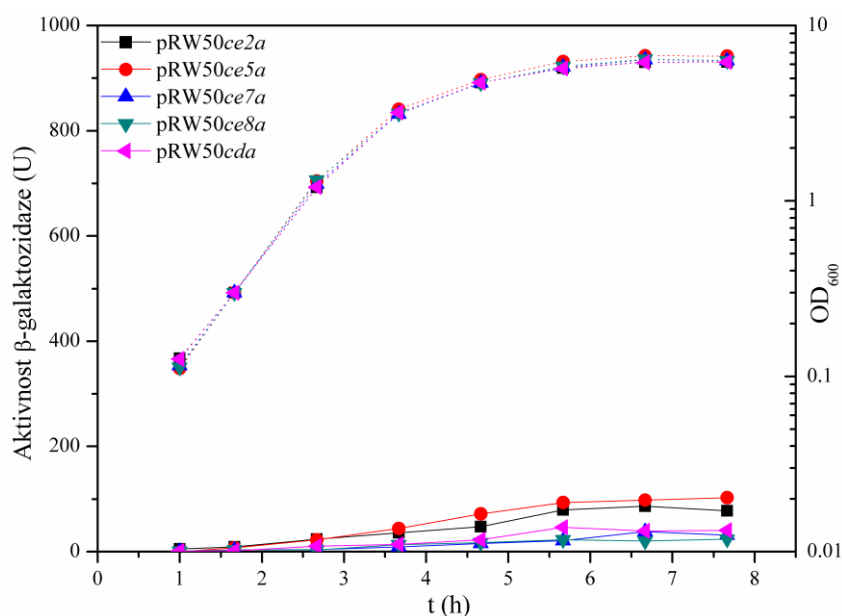
V kulturah sevov Keio wt s preiskovanimi plazmidi smo z dodatkom subinhibitornih koncentracij Nal (37 μ M) inducirali odziv SOS v zgodnji eksponentni rasti pri OD₆₀₀ 0,3 in spremljali aktivnosti β -galaktozidaze. Za negativno kontrolo izražanja genov preučevanih kolicinov smo spremljali tudi aktivnost promotorjev v neinduciranih kulturah. Rezultati aktivnosti β -galaktozidaze po indukciji SOS so prikazani na Sliki 33 in kažejo, da je transkripcija genov aktivnosti kolicinov v sevu Keio wt inducirana po časovnem zamiku, kakor smo prej dokazali tudi za sintezo. Sklepamo, da sinteza preučevanih kolicinov ni uravnana na posttranskripcijskem nivoju, ampak na nivoju transkripcije z neznanim transkripcijskim regulatorjem.

Kot je razvidno na Sliki 33 sta bila prisotna največja transkripcijska aktivnost in tudi najmanjši transkripcijski zamik pri sevu s promotorji kolicinov E2, E5 in E6, medtem ko sta bila največji zamik in manjša transkripcijska aktivnost prisotna pri sevu s promotorji kolicinov E8, E7 in D. Transkripcijska aktivnost genov kolicinov brez indukcije odziva SOS je bila zanemarljiva in je prikazana na Sliki 34.



Slika 33: Aktivnost β -galaktozidaze (neprekinjene črte) z Nal tretiranega seva Keio wt s plazmidi pRW50 s fuzijami promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8, D z genom *lacZ* in OD_{600} (prekinjeni črti) v odvisnosti od časa. Puščica prikazuje čas ob dodatku nalidiksične kisline Nal ($37 \mu\text{M}$). Poskus smo izvedli v dveh ponovitvah, odkloni od povprečja so prikazani s standardno deviacijo.

Figure 33: β -galactosidase activity (solid line) of Keio wt strain carrying plasmids pRW50 with colicin E2, E5, E6, E7, E8, D and *lacZ* transcriptional fusions and optical density measured at 600 nm (dotted line) as a function of time. The arrow indicates the time of addition of nalidixic acid Nal ($37 \mu\text{M}$). Each value represents the mean of two independent measurements with \pm SEM.



Slika 34: Aktivnost β -galaktozidaze (neprekinjene črte) netretiranega seva Keio wt s plazmidi pRW50 s fuzijami promotorjev kolicinov E2, E5, E7, E8, D z genom *lacZ* in OD_{600} (prekinjeni črti) v odvisnosti od časa.

Figure 34: β -galactosidase activity (solid line) of Keio wt strain carrying plasmids pRW50 with colicin E2, E5, E7, E8, D and *lacZ* transcriptional fusions and optical density measured at 600 nm (dotted line) as a function of time.

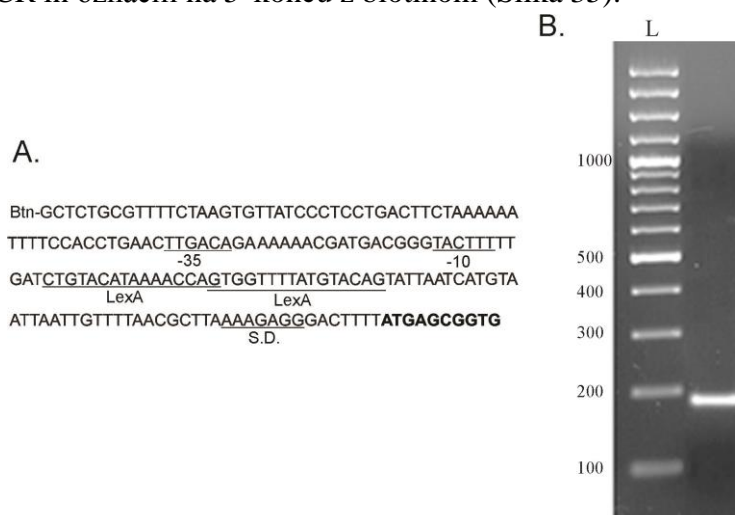
4.4.3 Iskanje transkripcijskih regulatorjev kolicina E8

Ker je transkripcija genov nukleaznih kolicinov bila po indukciji odziva SOS zakasnjena in neodvisna od proteina IscR, smo sklepali, da je poleg LexA vpleten še nek dodaten regulator transkripcije, katerega smo v nadaljevanju želeli razkriti.

Na podlagi rezultatov sinteze kolicinov smo za potencialne kandidate za iskanje transkripcijskega regulatorja določili kolicine E5, E6, E7 in E8, ker so kazali največji zamik v sintezi. Ker je promotor kolicina E8 v sevu Keio wt pri spremljanju transkripcije s testom β -galaktozidazne aktivnosti izmed preučevanih promotorjev kolicinov E2, E5, E6, E7, E8 in D kazal srednjo transkripcijsko aktivnost in največji zamik v transkripciji, smo kolicin E8 izbrali za preučevanje vezave transkripcijskih regulatorjev. Proteine, ki se vežejo na promotorsko regijo kolicina E8 smo izolirali s testom »pull down« in jih identificirali z masno spektrometrijo. Nato smo preučevali transkripcijo gena kolicina E8 v prisotnosti in odsotnosti izbranih potencialnih transkripcijskih regulatorjev.

4.4.3.1 Priprava z biotinom označenega promotorskega zaporedja kolicina E8

Za test »pull down« smo pripravili promotorsko zaporedje kolicina E8, označeno z biotinom, da smo ga pri testu lahko vezali na magnetne kroglice s pritrjenimi streptavidinskimi molekulami. Promotorsko zaporedje kolicina E8, dolgo 179 nt, smo pomnožili s PCR in označili na 5' koncu z biotinom (Slika 35).



Slika 35: PCR pomnožek promotorske regije kolicina E8. (A.) Nukleotidno zaporedje promotora kolicina E8, označeno z biotinom na 5' koncu. Podčrtani sta mesti -35 , -10 , konsenzni LexA vezavni zaporedji in Shine-Dalgarno zaporedje (S.D.). V krepkem tisku je označen 5' konec gena aktivnosti *ce8a*. (B.) PCR pomnožek na 1,8-odstotnem agaroznem gelu in 100-bp Plus lestvica velikosti nukleinskih kislin.

Figure 35: Colicin E8 promoter region PCR product. (A.) Nucleotide sequence of colicin E8 promoter region and labeled on 5' end with biotin. Underlined are -35 , -10 elements, LexA binding sites and Shine-Dalgarno region. *ce8a* gene is in bold. (B.) PCR product on 1.8 % agarose gel and 100-bp Plus DNA Ladder.

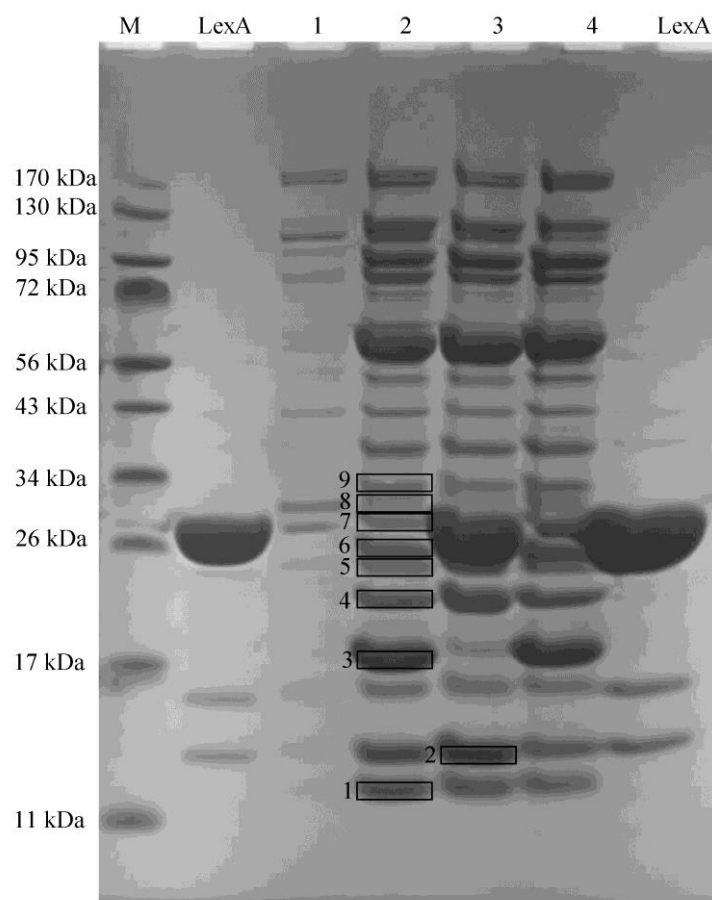
4.4.3.2 Profil proteinov vezanih na promotorsko zaporedje kolicina E8

Z metodo afinitetnega čiščenja proteinov z uporabo magnetnih kroglic (test »pull down«) smo izolirali proteine, ki se vežejo na promotorsko zaporedje kolicina E8 kot potencialni transkripcijski regulatorji. Pri testu smo tarčno DNA, biotinilirano zaporedje promotorja kolicina E8, preko streptavidina vezali na magnetne kroglice (Invitrogen Life Technologies) in lovili DNA-vezavne proteine iz lizatov bakterijskih kultur seva *E. coli* MG1655, ki smo jih vse, razen ene, med gojenjem tretirali z Nal za indukcijo odziva SOS. Izvedli smo 4 zaporedna afinitetna čiščenja:

- za kontrolo vezave proteinov na same magnetke, smo izolirali proteine iz lizata kulture, tretirane s subinhibitorno koncentracijo Nal, ki so se vezali na magnetke brez tarčne DNA;
- izolirali smo proteine iz lizata kulture, tretirane s subinhibitorno koncentracijo Nal, ki so se vezali na magnetke s tarčno DNA;
- izolirali smo proteine iz lizata kulture, tretirane s subinhibitorno koncentracijo Nal, ki so se vezali na magnetke s tarčno DNA in predhodno vezanim LexA;
- izolirali smo proteine iz lizata netretirane kulture, ki so se vezali na magnetke s tarčno DNA.

Specifično vezane proteine smo eluirali iz magnetnih kroglic, jih oborili s TCA in jih ločili z NaDS-PAGE. Na poliakrilamidnem gelu na Sliki 36 smo primerjali proteinske profile in iskali razlike v profilu vezanih proteinov, če je bila kultura SOS-inducirana ali ne in če je na DNA predhodno bil vezan LexA ali ne.

Na poliakrilamidnem gelu na Sliki 36 vidimo, da so se nekateri proteini v manjši meri vezali na same magnetne kroglice (linija 1). Med tretirano (linija 2) in netretirano kulturo (linija 4) ni bilo opaznih razlik v proteinskem profilu. Če smo na DNA predhodno vezali LexA v prebitku (linija 3) opazimo, da je lisa pri velikosti ca. 18 kDa znatno manjša, kar lahko pomeni tekmovanje za vezavo LexA in tega proteina. Zanimive lise (9 lis), označene na gelu, smo izrezali iz gela in jih poslali na proteinsko analizo z masno spektrometrijo, ki so jo opravili v Advanced Mass Spectrometry Facility, School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham. Vzorci so bili cepljeni s tripsinom, aminokislinsko zaporedje določeno s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo LC-MS/MS na aparaturi Orbitrap. Podatki so bili analizirani in določeni proteinski kandidati. Vsi proteinski kandidati so podani v Prilogi D. Med njimi smo izbrali možne kandidate za transkripcijske regulatorje kolicina E8 in jih podali v Preglednici 28. Izbrani so bili proteini: YohL, HlyU, ArsR, StpA, AsnC, Dps, IscR, YbjK, LexA, EngB, DpiA, LldR, dgoR, YcgE, OmpR, GntR, SfsA, FrlR, MngR, CpxR, TorR, GlpR, DeoR, YihW, AllR, SrlR, YegW, GlcC, YdjF, FucR.



Slika 36: 12-odstotni NaDS PAGE gel z ločenimi izoliranimi proteini, ki so bili vezani na zaporedje promotorja kolicina E8. M, lestvica molekulske mase proteinov Page Ruller; LexA, očiščeni protein LexA; 1, elucija proteinov tretirane kulture (Nal) iz magnetkov brez DNA; 2, elucija proteinov tretirane kulture (Nal) iz magnetkov z DNA; 3 elucija proteinov tretirane kulture (Nal) iz magnetkov z DNA in LexA; 4, elucija proteinov netretirane kulture iz magnetkov z DNA. Označene so izrezane lise.

Figure 36: 12% NaDS PAGE gel with isolated proteins that bind to colicin E8 promoter region. M, protein marker Page Ruller; LexA, isolated protein LexA; 1, protein elution of treated culture from beads (Nal) without DNA; 2, protein elution of treated culture from beads (Nal) with DNA; 3, protein elution of treated culture from beads (Nal) with DNA and LexA; 4, protein elution of untreated culture from beads with DNA. Marked bands were excised.

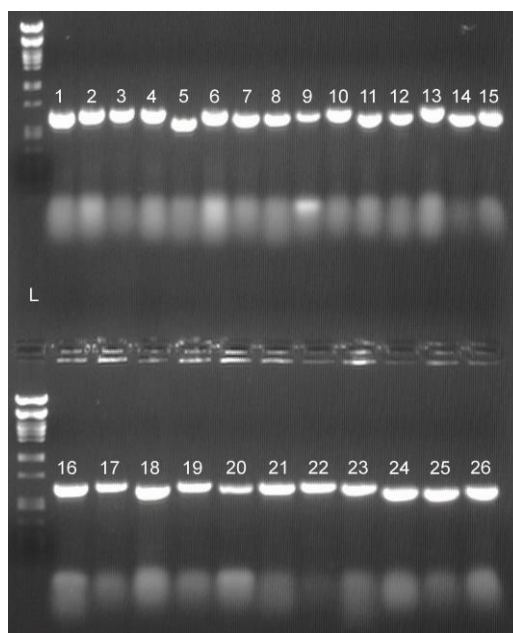
Preglednica 28: Izbrani potencialni transkripcijski regulatorji kolicina E8, določeni z masno spektrometrijo. Številke lis se ujemajo s številkami izrezanih lis na Sliki 36; % ujemanja – ujemanje z AK zaporedjem proteina; MW (kDa) – molekulska masa proteina (kDa).

Table 28: Selected protein candidates as transcriptional regulators for colicin E8 identified by mass spectrometry. Band numbers are the same as in Figure 36; % match – matching with protein AK sequence; MW (kDa) – protein molecular weight.

Lisa	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
1	yohL gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933] (synonim rcnR)	76,67	10,1
	transcriptional activator hlyU [<i>Escherichia coli</i> 3431]	39,71	7,3
2	DNA-binding transcriptional repressor ArsR [<i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401]	15,38	13,3
3	DNA-binding protein stpA [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	75,57	15,0
	DNA-binding transcriptional regulator AsnC [<i>Escherichia coli</i> OP50]	36,91	16,5
4	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	97,01	18,7
	iscR transcriptional regulator IscR transcriptional dual regulator [<i>Shigella flexneri</i> 2930-71]	74,50	15,9
5	transcriptional regulator YbjK [<i>Escherichia coli</i> 536]	10,67	20,4
6	LexA repressor [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	88,12	22,3
	putative GTP-binding protein EngB [<i>Escherichia coli</i> EPECa12]	48,99	22,2
7	dpiA -phosphorylated DNA binding transcriptional dual regulator [<i>Escherichia coli</i> DEC5A] (synonim citB)	50,23	24,7
	DNA-binding transcriptional repressor LldR [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 01-09591]	32,47	21,9
	galactonate operon transcriptional repressor [<i>Escherichia coli</i> MS 79-10] dgoR	27,31	25,8
8	repressor of blue light-responsive genes [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655] ycgE	67,08	28,2
	ompR gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	71,13	27,3
	GntR family transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	52,42	28,2
	sfsA gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	37,18	26,2
	DNA-binding transcriptional regulator FrlR [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	28,40	27,8
	DNA-binding transcriptional repressor MngR [<i>Escherichia coli</i> HS]	40,42	28,2
	cpxR gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	27,59	26,3
	TorR [<i>Escherichia coli</i> K-12]	23,04	26,2
	glpR transcriptional repressor [<i>Escherichia coli</i> DEC10E]	12,86	26,2
	DNA-binding transcriptional repressor DeoR [<i>Escherichia coli</i> 536]	36,51	28,5
9	yihW gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	55,39	29,5
	transcriptional regulator AllR [<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5]	29,69	27,6
	DNA-binding transcriptional repressor [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655] srIR	35,41	28,2
	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> ED1a] yegW	46,77	28,3
	DNA-binding transcriptional regulator GlcC [<i>Escherichia coli</i> 536]	28,74	28,8
	ydjF gene product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	35,83	26,9
	DNA-binding transcriptional activator FucR [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	20,58	27,3

4.4.3.3 Aktivnost promotorka gena kolicina E8 v odsotnosti regulatorjev transkripcije

Transkripcijo gena aktivnosti kolicina E8 smo preučevali v odsotnosti potencialnih transkripcijskih regulatorjev, ki smo jih določili s testom »pull down« in masno spektrometrijo. Za preučevanje smo uporabili seve Keio z delecijami izbranih transkripcijskih regulatorjev s plazmidom pRW50*ce8a* in transkripcijsko aktivnost spremljali s testom β -galaktozidazne aktivnosti. Najprej smo s PCR potrdili ustreznost delecij genov v izbranih sevih Keio kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Iz izbranih sevov smo pomnožili ustrezne produkte, velikosti 600–800 bp, kot je prikazano na Sliki 37.



Slika 37: Potrditveni PCR za izbrane Keio seve. L – 1-kb λ PstI lestvica velikosti nukleinskih kislin; 1 – Δ lldR, 2 – Δ allR, 3 – Δ iscR, 4 – Δ ompR, 5 – Δ cpxR, 6 – Δ deoR, 7 – Δ yihW, 8 – Δ torR, 9 – Δ glcC, 10 – Δ stpA, 11 – Δ asnC, 12 – Δ dgsA, 13 – Δ gntR, 14 – Δ friR, 15 – Δ ybjK, 16 – Δ ydjF, 17 – Δ dps, 18 – Δ dpiA, 19 – Δ hlyU, 20 – Δ yohL = Δ rcnR, 21 – Δ mngR, 22 – Δ ycgE, 23 – Δ glpR, 24 – Δ arsR, 25 – Δ srlR, 26 – Δ fucR.

Figure 37: Confirmational PCR for selected Keio strains. L – 1-kb λ PstI DNA Ladder; 1 – Δ lldR, 2 – Δ allR, 3 – Δ iscR, 4 – Δ ompR, 5 – Δ cpxR, 6 – Δ deoR, 7 – Δ yihW, 8 – Δ torR, 9 – Δ glcC, 10 – Δ stpA, 11 – Δ asnC, 12 – Δ dgsA, 13 – Δ gntR, 14 – Δ friR, 15 – Δ ybjK, 16 – Δ ydjF, 17 – Δ dps, 18 – Δ dpiA, 19 – Δ hlyU, 20 – Δ yohL = Δ rcnR, 21 – Δ mngR, 22 – Δ ycgE, 23 – Δ glpR, 24 – Δ arsR, 25 – Δ srlR, 26 – Δ fucR.

Za spremljanje aktivnosti promotorka DNaznega kolicina E8 v odsotnosti potencialnih transkripcijskih regulatorjev smo plazmid pRW50*ce8a* transformirali v kompetentne celice seva BW25113 (Keio wt) in izbranih sevov Keio z delecijami transkripcijskih regulatorjev (TransformAid, Fermentas): JW2515 (Δ iscR), JW3721 (Δ asnC), JW5567 (Δ yihW), JW3386 (Δ glpR), JW0824 (Δ deoR), JW0494 (Δ allR), JW2676 (Δ srlR), JW1149 (Δ ycgE), JW1586 (Δ dgsA), JW2947 (Δ glcC), JW1759 (Δ ydjF), JW5698 (Δ friR), JW2776 (Δ fucR), JW2088 (Δ yegW), JW0142 (Δ sfsA), JW5946 (Δ gntR), JW3579 (Δ lldR), JW0719 (Δ mngR), JW5114 (Δ ybjK), JW3368 (Δ ompR), JW2642 (Δ ygaV ali hlyU), JW2092 (Δ rcnR ali yohL), JW3468 (Δ arsR), JW2705 (Δ ygbI),

JW0612 (*ΔcitB* ali *dpiA*), JW3883 (*ΔcpxR*), JW5627 (*ΔdgoR*), JW0797 (*Δdps*), JW0980 (*ΔtorR*), JW2644 (*ΔstpA*).

V preliminarnem poskusu smo vcepili sveže transformante Keio sevov s pRW50*ce8a* v LB gojišče in ko je kultura dosegla približno OD₆₀₀ 0,3, smo inducirali odziv SOS z Nal (37 μM) ter gojili preko noči. Naslednji dan smo vzorčili kulture in določili transkripcijsko aktivnost promotorja *ce8a* s testom β-galaktozidazne aktivnosti in izračunali razmerje aktivnosti *ce8a* med sevom BW25113 (Keio wt) in sevom z delecijo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili seva BW25113 (Keio wt) in *ΔiscR* s plazmidom pRW50*cka*, za katera vemo, da je med njima velika razlika v transkripcijski aktivnosti *cka* po indukciji SOS, saj je izražanje gena aktivnosti porotvornega kolicina K, *cka*, uravnano na nivoju transkripcije poleg LexA tudi s proteinoma IscR. Za dodatno pozitivno kontrolo smo uporabili sev Keio *ΔiscR* s plazmidom pRW50*cka* p-44G, ki naj bi po indukciji SOS kazal največjo aktivnostjo β-galaktozidaze, ker zaporedje vezave IscR ni več konsenzno, prav tako pa sinteze IscR ni.

Aktivnosti β-galaktozidaze, z razmerji aktivnosti med sevom Keio z delecijo in sevom wt, so podane v Preglednici 29. Proti pričakovanju so bile v vseh sevih dokaj nizke. Vzrok je lahko nenatančno doziranje Nal ob OD₆₀₀, ki ni nujno bil 0,3, saj smo ga le približno ocenili. Drugi vzrok je lahko predolgo gojenje. Kljub temu smo na podlagi razmerij v izražanju promotorja gena *ce8a* v sevih z delecijami v primerjavi z wt izbrali nekaj potencialnih genov. Izbrali smo seve, kjer je bila razlika v aktivnosti β-galaktozidaze med mutanto in wt ca. več kot 3-kratna. Pri pozitivni kontroli s plazmidom pRW50*cka* je bila razlika le 2,2-kratna in pozitivni kontroli s pRW50*cka* p-44G 2,6-kratna. Na podlagi tega preliminarnega pregleda transkripcijske aktivnosti smo za natančnejši pregled izbrali seve BW25113 (Keio wt), JW3721 (*ΔasnC*), JW5567 (*ΔyihW*), JW2088 (*ΔyegW*), JW0719 (*ΔmngR*), JW5114 (*ΔybjK*), JW2644 (*ΔstpA*). Leti so imeli največjo aktivnost β-galaktozidaze v primerjavi s sevom Keio wt in so v Preglednici 29 označeni v odebeljenem tisku.

Preglednica 29: Aktivnost β-galaktozidaze v preliminarnem iskanju potencialnih transkripcijskih regulatorjev kolicina E8. Aktivnost β-galaktozidaze je predstavljena v Miller-jevih enotah. V debelem tisku so potencialni kandidati za nadaljne poskuse.

Table 29: β-galactosidase activity in preliminary screen of potential colicin E8 transcriptional regulators. β-galactosidase activity is in Miller units (MU). Bold are potential candidates for further analysis.

Bakterijski sev	Aktivnost β-galaktozidaze (MU)	β-galaktozidazno razmerje
<i>ΔallrR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	74	1,0
<i>ΔasnC</i> pRW50 <i>ce8a</i>	225	3,2
<i>ΔglpR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	117	1,6
<i>ΔstpA</i> pRW50 <i>ce8a</i>	234	3,3
<i>ΔglcC</i> pRW50 <i>ce8a</i>	105	1,5

se nadaljuje

nadaljevanje

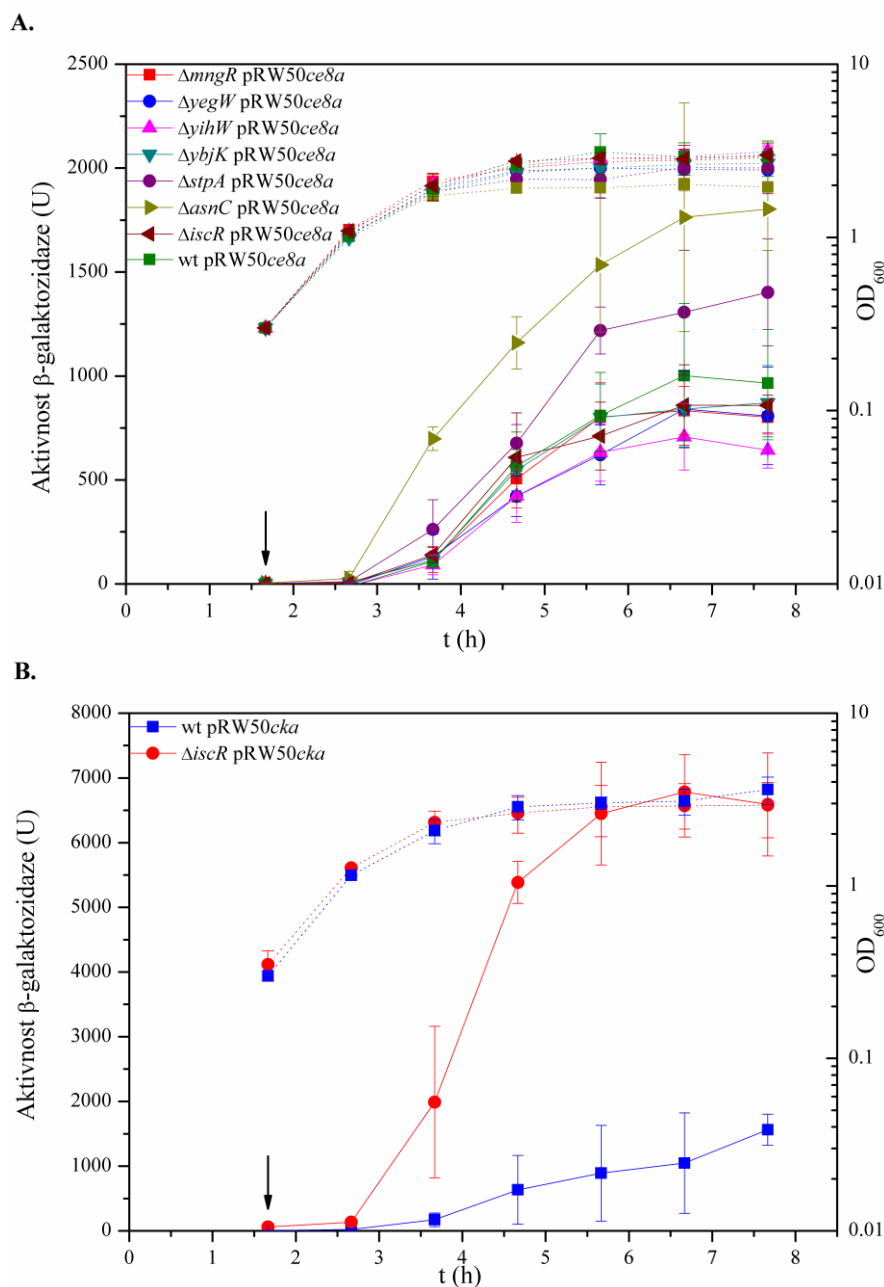
Bakterijski sev	Aktivnost β -galaktozidaze (MU)	β -galaktozidazno razmerje
<i>ΔarsR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	107	1,5
<i>ΔlldR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	135	1,9
<i>ΔdgoR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	99	1,4
<i>ΔompR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	206	2,9
<i>ΔydfF</i> pRW50 <i>ce8a</i>	121	1,7
<i>ΔtorR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	148	2,1
<i>ΔfrlR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	1867	2,6
<i>ΔgntR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	86	1,2
<i>ΔygbI</i> pRW50 <i>ce8a</i>	219	3,1
<i>ΔdgsA</i> pRW50 <i>ce8a</i>	110	1,5
<i>ΔybjK</i> pRW50 <i>ce8a</i>	344	4,8
<i>ΔdpiA</i> pRW50 <i>ce8a</i>	49	0,7
<i>ΔycgE</i> pRW50 <i>ce8a</i>	134	1,9
<i>ΔyohL</i> pRW50 <i>ce8a</i>	176	2,5
<i>ΔhlyU</i> pRW50 <i>ce8a</i>	82	1,2
<i>ΔfucR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	85	1,2
<i>ΔcpxR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	62	0,9
<i>ΔdeoR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	91	1,3
<i>ΔsfsA</i> pRW50 <i>ce8a</i>	73	1,0
<i>ΔyihW</i> pRW50 <i>ce8a</i>	222	3,1
<i>ΔyegW</i> pRW50 <i>ce8a</i>	248	3,5
<i>ΔsrlR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	95	1,3
<i>ΔmngR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	542	7,6
<i>Δdps</i> pRW50 <i>ce8a</i>	117	1,6
<i>ΔyohL</i> pRW50 <i>ce8a</i>	181	2,5
wt pRW50 <i>ce8a</i>	71	
<i>ΔiscR</i> pRW50 <i>ce8a</i>	115	1,6
<i>ΔiscR</i> pRW50 <i>cka</i> p-44G	406	2,6 (primerjava z wt pRW50 <i>cka</i>)
wt pRW50 <i>cka</i>	154	
<i>ΔiscR</i> pRW50 <i>cka</i>	334	2,2

Za natančnejše spremljanje transkripcijske aktivnosti promotorja kolicina E8 smo kulture izbranih sevov Keio s plazmidom pRW50*ce8a* gojili do OD₆₀₀ 0,3, ko smo dodali Nal (37 μ M) in sledili aktivnosti β -galaktozidaze tekom rasti. Poskus smo ponovili večkrat.

Rezultati transkripcijske aktivnosti so podani na Sliki 38. Iz krivulj aktivnosti β -galaktozidaze Keio sevov s pRW50*ce8a* na Sliki 38 A. ne opazimo drastičnega povečanja aktivnosti β -galaktozidaze po dodatku Nal kot je to vidno pri sevu *ΔiscR* s pRW50*cka* na Sliki 38 B. Je pa časovni zamik v transkripciji *ce8a* po dodatku Nal pri sevu brez *AsnC* manjši, saj je že 1 h po indukciji aktivnost β -galaktozidaze strmo narasla in je bila po 2 h 6,5-krat večja kot v sevu wt. Nekoliko večja aktivnost je bila tudi pri sevu *ΔstpA*, in sicer 2,4-kratna, medtem ko je bila pri kolicinu K razlika v

aktivnosti *cka* med sevoma wt in $\Delta iscR$ po 2 h že 11,6-kratna. 4 h po indukciji SOS je bila aktivnost *ce8a* pri sevih $\Delta asnC$ in $\Delta stpA$ v primerjavi z ostalimi sevi večja kot pri wt, in sicer je bila pri sevu $\Delta asnC$ 1,9-kratna in pri $\Delta stpA$ 1,5-kratna. Medtem ko je pri kolicinu K bila razlika v aktivnosti *cka* med sevoma wt in $\Delta iscR$ 7,2-kratna. Trend aktivnosti promotorja kolicina E8 v prisotnosti in odsotnosti transkripcijskega regulatorja AsnC in kolicina K v prisotnosti in odsotnosti transkripcijskega regulatorja IscR je zelo podoben.

Če povežemo transkripcijsko aktivnost promotorskega zaporedja kolicina E8 s sliko afinitetnega čiščenja – vezanih proteinov na promotor *ce8a* (Slika 36, lisa 3), je videti, kot da AsnC in LexA tekmujeta za vezavo na promotorsko zaporedje kolicina E8.



Slika 38: Transkripcijska aktivnost kolicina E8 in K v sevih z delecijami transkripcijskih regulatorjev ob tretiranju z Nal. Aktivnost β -galaktozidaze (neprekinjene črte) z Nal tretiranih sevov Keio z delecijami transkripcijskih regulatorjev (A.) s plazmidom pRW50ce8a in (B.) s plazmidom pRW50cka in optična gostota pri 600 nm (prekinjene črte) v odvisnosti od časa. Puščica prikazuje čas ob dodatku Nal (37 μ M). Okloni od povprečja 5 ponovitev poskusa so prikazani s standardno deviacijo.

Figure 38: Colicin E8 and K transcriptional activity in transcriptional regulator deletion strains. β -galactosidase activity (solid line) of Keio strains with transcriptional regulator deletions (A.) carrying plasmid pRW50ce8a and (B.) carrying plasmid pRW50cka, and optical density measured at 600 nm (dotted line). The arrow indicates the time of addition of nalidixic acid Nal (37 μ M) induction. Each value represents the mean of 5 independent measurements with \pm SEM.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen doktorskega dela je bil razjasniti vlogo kolicinov v naravnem okolju in njihovo kompleksnost uravnavanja izražanja. Kolicin M je eden najpogostejših kolicinov in je edini kolicin, ki prekine sintezo peptidoglikana občutljivih celic, kar vodi v lizo celic. Ker je celična stena nujna za preživetje bakterij, je pomembna tarča za antibiotike in kolicin M je s svojim protimikrobnim delovanjem pritegnil pozornost kot osnova za razvoj novega protimikrobnega sredstva. Vendar pa se bakterije zaščitijo v okolju proti neugodnim vplivom in znano je, da antibiotiki v subinhibitornih koncentracijah izzovejo spremembe v izražanju genov, kar omogoči prilagajanje bakterij. Problematici so geni odziva SOS, kakor tudi geni *rpoS* in *rpoE*, ki pripomorejo k porajanju in širjenju novih rezistenc proti antibiotikom. Pri pripravi novega antibiotika je torej zelo pomembno preveriti njegove negativne učinke. V ta namen smo preučevali vpliv subinhibitornih koncentracij kolicina M, ki se pojavijo v bližini proizvodnih celic, oz. bi se pojavile pri uporabi kolicina M oz. njegove izpeljanke kot potencialnega protimikrobnega sredstva, na izražanje genov bakterije *Escherichia coli*. Pri tem nas je zanimalo, ali kolicin M sproži odziv SOS in kakšni so morebitni odzivi in prilagoditve na stres, ki omogočajo bakterijam izhod iz stresne situacije, pri aplikativni uporabi kolicina M kot antibiotika. Ker je kolicin M najpogostejši kolicin nas je vpliv kolicina na izražanje genov zanimal tudi iz vidika znotrajvrstnih interakcij sevov bakterije *E. coli* v naravnem okolju. Raziskavo smo začeli s transkriptomsko analizo vpliva kolicina M na odziv SOS s poročevalskim genom *gfp*, nato smo se lotili globalne transkriptomске študije z DNA mikromrežami in rezultate izražanja genov validirali z metodo qPCR. Sledili so *in vivo* testi potrjevanja rezultatov diferenčnega izražanja genov na fiziološkem nivoju.

Velik del raziskave je bil posvečen preučevanju uravnavanja izražanja genov kolicinov. Sintezo kolicinov lahko sprožijo različni okoljski dejavniki, kot so temperatura, dostopnost kisika, hranil in tudi dejavniki, ki poškodujejo DNA oz. se vpletajo v podvojevanje DNA, kot so antibiotiki in druge spojine. Znano je, da je sinteza vseh kolicinov uravnana na nivoju transkripcije z represorjem odziva SOS, LexA. Vendar so pri sintezi kolicinov vpleteni še drugi regulatorji in mehanizmi, pomembni pri ekološki vlogi kolicinov, saj v različnem okolju lahko različni dejavniki in regulatorni proteini vplivajo na njihovo sintezo. Pri izražanju gena aktivnosti kolicina M, *cma*, se pojavlja vprašanje, ali in zakaj ob odsotnosti promotorja SOS, ki skupno uravnava sintezo kolicina B in M, pride do transkripcije *cma*. Zato smo transkripciji sledili na ravni posameznih celic s pomočjo reporterskega proteina GFP. Pri uravnavanju transkripcije gena kolicina K, *cka*, nas je zanimalo, ali se lahko izraža neodvisno od indukcije odziva SOS, kar smo preučevali na ravni posameznih celic s pomočjo reporterskih proteinov GFP in RFP. Pri uravnavanju izražanja *cka* je vpleten še regulatorni protein IscR in zanimalo nas je kakšno vlogo ima pri represiji. Pri tem smo preučevali transkripcijo *cka*

tekem rasti ob indukciji odziva SOS v odsotnosti IscR in hranil z metodo sledenja aktivnosti β -galaktozidaze. Z metodo SPR smo preučili vpliv potencialnih kofaktorjev, ki bi bili lahko vpleteni pri od IscR odvisni uravnavi. Kolicin K je protovorni kolicin, zato nas je zanimalo, ali na izražanje nukleaznih kolicinov vpliva tudi protein IscR ali kateri drugi regulatorni protein. Sintezo izbranih nukleaznih kolicinov smo spremljali v prisotnosti/odsotnosti IscR s pregledom con lize občutljivega seva in sledili aktivnosti transkripcije s testom β -galaktozidaze. Nazadnje smo določali regulator transkripcije kolicina E8 s testom »pull down« in masno spektrometrijo ter spremljanjem aktivnosti β -galaktozidaze v odsotnosti potencialnega transkripcijskega regulatorja.

5.1.1 Odziv bakterije *E. coli* na kolicin M – vloga kolicinov v okolju

Bakterije so v naravnem okolju pogosto izpostavljene različnim stresom, vključno protimikrobnim snovem. V naravnem okolju ima sinteza protimikrobnih snovi pomembno vlogo pri inhibiciji kompetitorjev. Koncentracije teh snovi so lahko različne in s tem je pogojena tudi njihova ekološka vloga. Visoke koncentracije, ki se pojavijo le v bližini producenta, uničijo bakterije, medtem ko nizke vodijo v spremenjeno izražanje genov, ki omogoča prilagoditve celice na stres (Goh in sod., 2002; Davies in sod., 2006). Kolicin M povzroči cepitev lipida II, lipidnega intermediata peptidoglikana, ki je skupen vsem bakterijam, in je zato obetaven kandidat za razvoj novega protimikrobnega sredstva (Patin in sod., 2012). Z namenom pridobiti večji vpogled v ekološko vlogo kolicina M, najpogostejšega kolicina, in v adaptivne odzive, ki jih izzove, smo preučili učinek subinhibitornih koncentracij kolicina M na *E. coli*. Adaptivni odzivi bi lahko bili škodljivi v času protimikrobne terapije. Znano je, da antibiotiki v subinhibitornih koncentracijah lahko vplivajo na spremembe v izražanju genov, ki vodijo v prilagajanje celic na okolje (Goh in sod., 2002; Davies in sod., 2006).

5.1.1.1 Spremembe v izražanju genov *E. coli* ob tretiranju s kolicinom M

Kolicin M prekine sintezo peptidoglikana občutljivih celic, kar vodi v lizo celic. Ugotovili smo, da je čisti kolicin M izredno učinkovit pri že zelo nizkih koncentracijah (ng/ml), kar je v skladu s predhodnimi izsledki (El Ghachi in sod., 2006). Zaradi velike aktivnosti kolicina M je bilo težko določiti subinhibitorno količino kolicina M, kajti že ob majhnem presežku je velik del kulture preučevanega seva *E. coli* propadel. Ker je subinhibitorna koncentracija kolicina M povzročila majhen upad hitrosti rasti 30 min po dodatku, smo transkriptomске spremembe celotnega genoma občutljivega seva *E. coli* preučevali z DNA mikromrežami 30 in 60 min po tretiranju. Predvidevali smo, da se v tem času bakterije že odzovejo s spremembami v izražanju genov. Ugotovili smo, da so bile pri tretiranju s kolicinom M spremembe v izražanju genov večje po 60 min kot po 30 min.

5.1.1.2 Kolicin M ni induciral sistema SOS

Pričakovali smo, da bo kolicin M sprožil odziv SOS – odziv na poškodbe DNA, saj je bilo ugotovljeno, da odziv SOS sprožijo antibiotiki, ki tako kot kolicin M inhibirajo sintezo peptidoglikana. SOS odziv sicer inducirajo antibiotiki, ki se vpletajo v podvojevanje DNA (Shaw in sod., 2003; Mesak in sod., 2008), kakor tudi antibiotiki, ki delujejo na sintezo peptidoglikana – β -laktamski antibiotiki, kot je ampicilin, in posledično pospešijo pogostost mutacij (Ohmori in sod., 2001; Miller in sod., 2004; Kohanski in sod., 2010; Thi in sod., 2011). Geni odziva SOS so problematični, saj pripomorejo k nastanku in širjenju novih rezistenc (Goh in sod., 2002; Davies in sod., 2006). Kolicin M odziva SOS ni sprožil, saj na globalnem transkripcijskem nivoju z mikromrežami nismo zaznali povečane ravni mRNA genov odziva SOS. Slednje smo dokazali tudi s sledenjem transkripcijske aktivnosti fuzije promotorja SOS gena *sulA* z *lacZ*. Po pregledu literature smo ugotovili, da vsi β -laktamski antibiotiki ne sprožijo odziva SOS. Odziv SOS naj bi sprožili antibiotiki, ki delujejo na PBP3 proteine vpletene pri sintezi peptidoglikana, pri čemer pride do aktivacije dvokomponentnega sistema DpiAB, ki nato aktivira odziv SOS (Laubacher in Ades, 2008).

5.1.1.3 Kolicin M vpliva na poti prenosa signala

Kolicin M ni aktiviral odziva SOS, je pa sprožil druge odzive, ki bi lahko vodili v prilagoditev občutljive bakterije *E. coli* na stres in bi bili lahko pomembni tudi pri znotrajvrstnih interakcijah v naravnem okolju. Kolicin M deluje na sintezo celične stene in bakterijska ovojnica ščiti celico pred zunanjimi stresi in vrši esencialne funkcije, kot je transport hranil, izločanje, respiracija, pritrjanje, virulenca in vzdrževanje bakterijske integritete. Pri po Gramu negativnih bakterijah celično ovojnico sestavlja zunanja membrana, periplazemski prostor s peptidoglikanom in notranja membrana (Bury-Moné in sod., 2009). Zunanja membrana deluje kot permeabilnostna bariera, s porini za transport, in kot zaščita proti fagocitozi (Nikaido, 1996). Medtem pa procesi za nastajanje energije in transport nutrientov potekajo na notranji membrani (Kadner, 1996). Za zaznavanje okoljskih signalov in hiter odziv bakterije primarno uporabljajo dvokomponentne sisteme prenosa signala, ki jih sestavlja histidinska kinaza na notranji membrani in citoplazemski odzivni regulator (MacRitchie in sod., 2008; Casino in sod., 2010). Peptidoglikan je glavna strukturna komponenta bakterijske celične stene s strukturno močjo in ščiti osmotsko občutljivo membrano pred lizo (Coyette in van der Ende, 2008). Po pričakovanjih je kolicin M z delovanjem na sintezo peptidoglikana induciral odziv na stres ovojnice. Pri *E. coli* je vključenih v nadzor stresa ovojnice nekaj odzivov, in sicer Rcs, Cpx, Psp, σ^E in Bae (Ruiz in Silhavy, 2005; Bury-Moné in sod., 2009). Različni stresni dejavniki lahko inducirajo različne in/ali skupne odzive na stres ovojnice, posledično en dejavnik stresa lahko izzove zaščito pred različnimi poškodbami (Bury-Moné in sod., 2009).

Nedavno je bilo pokazano, da motnje v petidoglikanu, povzročene z različnimi β -laktamskimi antibiotiki, sprožijo skupne kot tudi različne odzive. Vsem je skupna aktivacija sistema Rcs (Laubacher in Ades, 2008), ki je primarno poznan po vlogi regulacije sinteze kapsularnega polisaharida kolanske kisline (Majdalani in Gottesman, 2005), kar kaže, da je Rcs globalni odziv na peptidoglikanski stres (Laubacher in Ades, 2008). V tem odzivu pride do avtofosforilacije senzorne kinaze RcsC in nato RcsD prenese fosforilno skupino na transkripcijski regulator RcsB. Določeni promotorji potrebujejo še dodatni regulatorni protein RcsA, ki deluje skupaj z RcsB (Stout in sod., 1991). Sistem Rcs uravnava produkcijo zunajceličnih polisaharidov (Rahn in Whitfield, 2003), oblikovanje biofilma (Prigent-Combaret in sod., 2000; Ferrières in Clarke, 2003), bakterijsko gibljivost in kemotakso (Francez-Charlot in sod., 2005). Z analizo z mikromrežami smo pokazali, da ima regulon Rcs veliko vlogo v odzivu na stres ovojnice, induciranjem s kolicinom M. Opazili smo indukcijo gena *rcaA* in številnih z Rcs uravnanih genov, med katerimi sta najbolj očitna operona za sintezo EPS-ov, *wca* za sintezo kolanske kisline in *yjbEFGH*. Poleg tega je bila raven izražanja genov za bakterijsko gibljivost znižana, a o tem kasneje.

Kolicin M je induciral tudi izražanje gena *cpxP*, ki kodira periplazemski inhibitor stresnega odziva ovojnice Cpx. Predhodno je bilo prav tako dokazano, da izražanje *cpxP* inducirajo tudi nekateri β -laktamski antibiotiki (Laubacher in Ades, 2008), kot tudi drugi dejavniki (Bury-Moné in sod., 2009). Cpx sistem zaznava napačno zvite proteine celične ovojnice in ga uravnava senzorna kinaza CpxA, odzivni regulator CpxR, in periplazemski inhibitor CpxP. CpxP z vezavo inhibira CpxA in posledično sistem Cpx v odsotnosti signala. Poleg tega izgleda, da CpxP uravnava natančno aktivacijo sistema Cpx med stresom ovojnice s preprečevanjem njegove nepravilne aktivacije in omogoča hitro utišanje po zmanjšanju stresa z vezavo na CpxA (Raivio in sod., 1999). Med odzivom bi se lahko CpxP vezal na nepravilno zvite proteine in bi ga bilo manj za vezavo s CpxA. Po zmanjšanju stresa, ko je manj nepravilno zvitih proteinov, bi CpxP stres utišal z vezavo na CpxA (Raivio in sod., 1999). Zato je smiselno, da med stresom pride do povečanega izražanja *cpxP*, kot so pokazali rezultati mikromrež.

Tretiranje s kolicinom M je prav tako induciralo tretji sistem odziva na stres ovojnice, gene *psp*, ki kodirajo membranske proteine fagnega šoka (angl. phage shock): PspA, PspB, PspC, PspD in PspG. Regulon *psp* sestavlja operon *psp* z geni *pspA-E*, kot tudi gena *pspF* in *pspG*. Ta sistem je odgovoren za popravilo poškodb notranje membrane in vzdrževanje protonskega gradienta preko notranje membrane (angl. proton motive force) (Jovanovic in sod., 2006; Kobayashi in sod., 2007). Operon *pspA-E* je aktiviran s transkripcijskim regulatorjem PspF, kateri prav tako aktivira transkripcijo *pspG*, ki kodira notrajmembranski integralni protein. PspA se veže na protein PspF in inhibira transkripcijo operona *psp*. Gene *psp* inducira okužba s filamentoznimi fagi in drugi

stresi, kot so hiperosmotski stres, izpostavljanje etanolu in organskim hidrofobnim topilom, ki poškodujejo integriteto in napetost notranje membrane (Kobayashi in sod., 1998; Bury-Moné in sod., 2009; Joly in sod., 2010). Primerjava študij z antibiotiki, ki delujejo na celično membrano bakterije *E. coli*, je pokazala, da je le ampicilin inducirala gene *psp* (Kaldalu in sod., 2004).

5.1.1.4 Kolicin M inducira izražanje genov za sintezo zunajceličnih polisaharidov

Med najbolj induciranimi geni so bili geni operona *wca*, ki kodira proteine vpletene v sintezo zunajceličnega polisaharida, kolanske kisline (Gottesman in Stout, 1991), in geni operona *yjbEFGH*, ki je vpleten v sintezo še neidentificiranega eksopolisaharida (Ferrières in sod., 2007). Oba operona sta pod kontrolo sistema Rcs (Rahn in Whitfield, 2003). Nedavne študije so pokazale, da sta oba operona inducirana tudi pri osmotskem stresu (Ionescu in Belkin, 2009). Kolanska kislina je sproščena v zunajcelično okolje za zaščito celic pred osmotskim stresom, ki nastane zaradi motenj v celični ovojnici, vključno s poškodbo peptidoglikana ali izsuševanjem (Sledjeski in Gottesman, 1996). Poleg tega je vpletena v kasnejših fazah nastanka biofilma, pri nastajanju in zorenju kompleksne tridimenzionalne strukture biofilma (Prigent-Combaret in sod., 2000). Operon *wca* je sestavljen iz 19 genov, ki so vpleteni v sintezo kolanske kisline iz nukleozidnih difosfatnih sladkorjev: GDP-L-fukoze, UDP-D-glukoze, UDP-D-galaktoze in UDP-D-glukuronata (Stevenson in sod., 1996). Kolicin M je inducirala izražanje vseh 19 genov *wca*. Poleg teh so vpleteni v sintezo CA tudi geni *wcaL*, *manA*, *ugd*, *wcaM*, *galU*, ki jih je kolicin M prav tako inducirala. *galU* kodira glukoza-1-fosfat uridiltransferazo potrebno za UDP-glukozo, intermediat vpleten v sintezo kolanske kisline, trehaloze, lipopolisaharidov in membranskih oligosaharidov (Böhringer in sod., 1995). Podobno kot za kolicin M je bilo tudi za nekatere β -laktamske antibiotike, ki tudi inhibirajo sintezo peptidoglikana, pokazano, da inducirajo gene vpletene v sintezo CA pri *E. coli*, kar bi lahko povečalo možnost nastanka biofilma (Sailer in sod., 2003). Preučevanje transkripcijskega profila v odzivu na baktericidne koncentracije ampicilina je prav tako pokazalo indukcijo operona za sintezo CA, kot tudi indukcijo *rcaA*, transkripcijskega aktivatorja sinteze kolanske kisline in drugih odzivov na stres. Vendar pa avtorji niso detektirali indukcije dodatnega eksopolisaharidnega operona *yjbEFGH*, drugačnega od kolanske kisline (Kaldalu in sod., 2004).

5.1.1.5 Kolicin M inducira dodatne osmotske in druge odzive na stres

Kolicin M je poleg stresa ovojnice sprožil še druge stresne odzive. Z inhibicijo sinteze peptidoglikana je kolicin M oslabil zaščito membrane in sprožil osmotski stres. Zanimivo je, da so bili geni regulona dvokomponentnega sistema CreB/CreC, in sicer geni *creD*, *cbrA*, *cbrB* in *cbrC* močno inducirani že 30 min po izpostavitvi kolicinu M. Cre sistem je vpleten v preklopu iz aerobnih v anaerobne pogoje. CreC je senzor, ki

zaznava tudi spremembe v gojišču in raven metabolitov, medtem ko je CreB odzivni regulator (Cariss in sod., 2008). Dvokomponentni sistem CreBC pozitivno uravnava transkripcijo *cbrA*. Nedavno so za CbrA protein pokazali, da ščiti celice pred kolicinom M in osmotskim šokom, kar namiguje na funkcijo CbrA v strukturi zunanje membrane (Helbig in sod., 2010). Zato je bilo predlagano, da bi v naravnih okoljih z omejeno količino hranil, CbrA ščitil občutljive celice pred kolicinom M, ki ga sintetizira kompetitorski sev. Poleg tega je bilo pokazano, da CbrC, katerega gen je tudi bil induciran ob tretiranju s kolicinom M, ščiti celice tudi pred kolicinom E2 in izgleda, da je vpleten v nastajanje sprememb v strukturi zunanje membrane (Helbig in sod., 2010). Naši rezultati nakazujejo, da bi subinhibitorne koncentracije kolicina M v naravnih okoljih lahko inducirale zaščito občutljivih bakterijskih celic s sistemom CreBC pred kolicini, induciranimi po stradanju hranil (Eraso in sod., 1996; Kuhar in Žgur-Bertok, 1999). Torej kolicini, sintetizirani v mikrobnih združbah, bi lahko v občutljivih članih združbe inducirali zaščitni odziv. Nedavno so ugotovili, da aktivacija CreBC dvokomponentnega regulatornega sistema igra pomembno vlogo pri rezistenčnem odzivu proti β -laktamskim antibiotikom (Moya in sod., 2009), kar nakazuje, da subinhibitorne koncentracije kolicina M sprožijo širšo protimikrobno zaščito.

Kolicin M je povzročil povečano raven izražanja še drugih genov odziva na osmotski stres, kot so *osmB*, *osmC* (Jung in sod., 1990) in tudi *opgC*. Nadizraženi so bili geni operona *dppABCDEF*, permeaznega transportnega sistema za pridobivanje AK v obliki dipeptidov pri osmotskem šoku. Celice spreminjajo transport dipeptidov v odzivu na okoljske signale (Olson in sod., 1991). Inducirana sta bila tudi dva inhibitorja C-lizocima, *ivy* in membransko vezani napovedani lipoprotein *mliC*, ki sta pa tudi pod kontrolo Rcs sistema. Stres zaradi antibiotikov je tudi sprožil izražanje obeh genov (Callewaert in sod., 2009). Kolicin M je induciral tudi gene drugih odzivov, vključno z *ydeI*, vpletenim pri odzivu na vodikov peroksid (Lee in sod., 2010). Inducirani so bili tudi geni toplotnega šoka (angl. heat shock), in sicer *ibpA* in *ibpB*, ki kodirata šaperona, ki sodelujeta pri preprečevanju ireverzibilne agregacije proteinov (Ratajczak in sod., 2009); *hslJ*, ki kodira toplotno inducibilen lipoprotein (heat-inducible lipoprotein), ki je vpleten v odpornost proti novobiocinu; in *yhbO* predviden znotrajcelični proteazni gen. Omeniti je vredno tudi, da je več kot 100 nadizraženih genov uvrščenih med slabo karakterizirane gene ali z le predvideno funkcijo. Mnogi kodirajo domnevne membranske proteine in lipoproteine, kar kaže, da se za zaščito pred poškodbo peptidoglikana zaradi kolicina M inducirajo odzivi za ojačanje osmotsko občutljive membrane.

5.1.1.6 Kolicin M je zmanjšal izražanje flagelarnih biosinteznih genov

Med geni z zmanjšanim izražanjem zlasti izstopajo geni vpleteni v flagelarno gibljivost in geni vpleteni pri odpornosti proti kislem pH. Pri *E. coli* je izražanje flagelarnih genov in genov potrebnih za gibljivost, katerih je več kot 60, pod kontrolo kompleksa FlhDC. Sinteza flagelov in njihovo delovanje sta procesa, ki potrebujeta veliko energije in zato je izražanje flagelarnih genov strogo nadzorovano (Soutourina in Bertin, 2003). Za razliko od zunajceličnih polisaharidov je izražanje operona *flhDC* zmanjšano s številnimi okoljskimi signali, kot so visoka temperatura, visoka osmolarnost (povzročena z visoko koncentracijo soli, prisotnostjo ogljikovih hidratov ali nizkomolekularnih alkoholov) in ekstremni pH (Shi in sod., 1993; Soutourina in sod., 2002). Oba operona za sintezo zunajceličnih polisaharidov, *wca* in *yjBEFGH*, ter operon flagelarnih genov *flhDC*, so pod kontrolo fosforilacijskega sistema Rcs. Da je bilo izražanje flagelarnih genov ob tretiranju s kolicinom M zmanjšano ni nepričakovano, saj aktiviran sistem Rcs inducira izražanje genov za sintezo zunajceličnih polisaharidov, medtem ko zmanjša izražanje operona *flhDC* zaradi represije z RcsA, kofaktorjem regulatorja RcsB (Girgis in sod., 2007).

5.1.1.7 Kolicin M inducira gene povezane z biofilmom

V naravnih okoljih bakterije pogosto tvorijo biofilme, mikrobno skupnost, v kateri se bakterije pritrjujejo na žive in nežive podlage preko površinskega naboja kot tudi s tvorbo pilov, fimbrij in zunajceličnih polisaharidov. Bakterijske celice v biofilmih imajo drugačne lastnosti kot planktonske. Predvsem so bolj odporne proti antibiotikom, dezinfekcijskim sredstvom, strižnem stresu in imunskemu sistemu (Flemming in Wingender, 2010). Nastajanje biofilma poteka v več korakih: začetna pritrditev, tridimenzionalni razvoj mikrokolonije, zorenje biofilma in na koncu razpršitev ali odcepitev od podlage za kolonizacijo drugih površin. Na začetku flageli pomagajo pri gibanju proti površini, nato se izgubijo in adhezivni organeli, kot so fimbrije, omogočijo pritrditev. V zadnji fazi kolanska kislina sodeluje pri zorenju v tridimenzionalno strukturo biofilma (Costerton in sod., 1999; Danese in sod., 2000). Kolicin M je induciral nekaj genov vpletenih pri nastanku biofilma. Poleg indukcije genov za sintezo kolanske kisline, je kolicin M induciral gen *rprA*, ki kodira majhno regulatorno RNA. Izražanje *rprA* je prav tako aktivirano pod kontrolo sistema Rcs. RprA negativno uravnava izražanje gena *csgD*, ki kodira glavni transkripcijski regulator aktivacije fimbrijev in sinteze celuloze, ki sta vpletena v začetnih korakih oblikovanja biofilma (Boehm in Vogel, 2012). Domneva se, da RprA z vmešavanjem v translacijo mRNA za CsgD morda prepreči nezaželeno soizražanje kolanske kisline s fimbriji in celulozo (Mika in sod., 2012). Skladno s povečanim izražanjem operona genov za kolansko kislino smo določili tudi povečano izražanje genov *omrA* in *omrB*, ki kodirata dve majhni regulatorni RNA, za kateri je bilo nedavno pokazano, da prav tako kot RprA inhibirata translacijo CsgD (Holmqvist in sod., 2010).

Prisotnost kolicina M je povzročila povečano izražanje še enega gena, ki kodira protein vpleten v oblikovanju biofilma, in sicer *bdm* (angl. biofilm- dependent modulation protein). Izražanje *bdm* je pozitivno uravnano z RcsB v odzivu na osmotski šok (Francez-Charlot in sod., 2005) in je nedavno bilo pokazano, da poveča nastanek biofilma (Sim in sod., 2010). Kolicin M je povečal tudi izražanje gena *ydeH*, ki kodira digvanilat ciklazo za sintezo sekundarnega poročevalca c-di-GMP (ciklični digvanozin monofosfat). *ydeH* je pozitivno reguliran s CpxR in produkt inhibira gibljivost kot tudi pomaga pri oblikovanju adhezinov in biofilma (Yamamoto in Ishihama, 2006; Jonas in sod., 2008; Price in Raivio, 2009). Pri *E. coli* c-di-GMP uravnava sintezo dveh polisaharidov: celuloze in poly-GlcNAc (PGA), ki je virulentni dejavnik uropatogene bakterije *E. coli* (Wang in sod., 2004). Za aminoglikozidni antibiotik tobramicin je bilo pokazano, da pri *E. coli* in *Pseudomonas aeruginosa* sproži nastanek biofilma zaradi sprememb v ravni c-di-GMP (Hoffman in sod., 2005). Nastanek biofilma je bil prav tako induciran po izpostavitvi *P. aeruginosa* subinhibitornim koncentracijam antibiotikov tetraciklina in norfloksacina (Linares in sod., 2006). Ker je naša raziskava s subinhibitornimi koncentracija kolicina M pokazala, da je induciral stres ovojnice, ki bi lahko sprožil prehod iz planktonske v pritrjeno obliko, smo v nadaljevanju določali nastanek biofilma ob tretiranju s kolicinom M, vendar nismo opazili nobene indukcije nastanka biofilma.

5.1.1.8 Kolicin M ni induciral povečane sinteze zunajceličnih polisaharidov

Ker so bili geni vpleteni v sintezo kolanske kisline (CA) močno inducirani, smo izvedli funkcionalen test, s katerim bi potrdili, da povečano izražanje genov za CA dejansko vodi v povečano kapsulo. Vendar nam ni uspelo pokazati povečane kapsule zaradi premajhne izrazitosti. Lotili smo se natančnejše metode, izolacije same CA. Po 60 min po tretiranju je bilo izražanje genov za sintezo veliko večje kot pri 30 min, zato smo predvideli, da bi se moralo povečanje v količini mRNA, katerih produkti sodelujejo pri nastanku tega polisaharida, kmalu odraziti tudi v sintezi CA. Zato smo vzorčili s kolicinom M tretirano kulturo za izolacijo CA 60 min, 90 min in 120 min po tretiranju. Ugotovili smo, da je bila količina CA pri vseh časih vzorčenja zelo malo povečana, le 1,35-krat. Zato se je pojavilo vprašanje, zakaj ni bilo večjega povečanja količine CA, ki smo ga pričakovali. Vzrok bi lahko bila neuspešna izolacija, a smo se v uspešnost postopka izolacije prepričali z uporabo pozitivne kontrole, seva, ki čezmerno izraža operon *wca*. Povečanje CA kontrole je bilo 5,6-kratno v primerjavi z netretiranim normalnim sevom. Naslednji vzrok, bi bila lahko izguba aktivnosti kolicina M v gojišču pri daljši inkubaciji. Kot navaja Schaller in sod. (1981), kolicin M po 20 min hitro izgubi aktivnost (Schaller in sod., 1981) in zaradi tega kolicin po 1 ali 2 h v gojišču ne bi več deloval. Dokazali smo nasprotno. Kolicin M pri naših poskusih ni izgubil aktivnosti, saj je po 24 h inkubacije pri 37 °C aktivnost bila nespremenjena. Prav tako ne bi bile pri hitri izgubi aktivnosti kolicina M spremembe v izražanju genov med

tretirano in netretirano kulturo po 1 h toliko večje kot pri 30 min. Zato trdimo, da kolicin M še vedno vpliva na hitrost sinteze peptidoglikana po daljšem času. Menimo, da je vzrok za nepovečano količino CA, manjša dostopnost lipidnega prenašalca, ki je vpleten pri sintezi CA. Kolicin M namreč s hidrolizo peptidoglikanskega prekurzorja lipida II prepreči recikliranje lipidnega prenašalca baktoprenola C₅₅-OH v C₅₅-P za sintezo peptidoglikana in tudi omeji njegovo dostopnost za sintezo drugih eksopolisaharidov, vključno s CA. Predhodno je bilo dokazano, da kolicin M z vpletanjem v obnavljanje baktoprenola inhibira biosintezo peptidoglikana celične stene in O-antigena (Braun in sod., 1974; Schaller in sod., 1982; Harkness in Braun, 1989). Undekaprenil fosfat C₅₅-P je pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah nepogrešljivi lipidni prenašalec različnih polisaharidov celične stene (peptidoglikan, O-antigen, teihojska kislina, kapsularni polisaharidi) (Reeves in sod., 1996). Baktoprenol se ne more fosforilirati nazaj v C₅₅-P, ker *E. coli* nima ustreznih kinaz za fosforilacijo, zato se kopiči v celici (Coker in Palittapongarnpim, 2011).

5.1.1.9 Odzivi na stres igrajo pomembno vlogo v znotrajvrstni dinamiki kolicinov v naravnem okolju

Če povzamemo rezultate, tretiranje *E. coli* s kolicinom M povzroči hidrolizo lipidnega peptidoglikanskega prekurzorja, kar vodi v ustavitve koraka polimerizacije in povzroči stres ovojnice, ki aktivira Rcs in Cpx fosforilacijski sistem. Posledično je bakterijska gibljivost zmanjšana in povečana indukcija izražanja genov zunajceličnih polisaharidov *wca* in *yjbEFGH*. S tem ko kolicin hidrolizira lipid II, prepreči recikliranje baktoprenola za sintezo peptidoglikana in omeji njegovo dostopnost za sintezo EPS-ov, vključno s CA. Ponovna rast po začetnem zastoju rasti kultur, tretiranih s subinhibitorno koncentracijo kolicina M, kaže na adaptivne odzive na stres in aktivacijo stresa ovojnice ter drugih stresnih odzivov. Čeprav ni bilo povečanja ne v količini CA niti produkciji biofilma, bi lahko v naravnih okoljih, v primeru nenadnega padca koncentracije protimikrobne snovi ali pojava njene odsotnosti, aktivacija zgoraj opisanih stresnih odzivov omogočila hitro prilagoditev, vključno z oblikovanjem biofilma.

Kolicini bi naj imeli vlogo v obrambi ali vdoru v ekološko nišo in predhodne študije so pokazale, da so kolicini vpleteni v večanje mikrobne raznolikosti v populacijah *E. coli* v debelem črevesju (Kirkup in Riley, 2004; Majeed in sod., 2011). Kolicin M sicer ni sprožil odziva SOS, je pa bilo za kolicina E9 in E3 pokazano, da imata potencial za pospeševanje mikrobne genetske raznolikosti z indukcijo odziva SOS ali s povečano transkripcijo pridobljenih mobilnih elementov (Walker in sod., 2004). Še ena študija je pokazala, da lahko kolicini enega producenta inducirajo produkcijo drugega kolicina (Majeed in sod., 2011). Mi smo pokazali, da subinhibitorne koncentracije kolicina M inducirajo stres ovojnice in druge stresne odzive, vključno z dvokomponentnim sistemom CreBC, povezanim s povečano odpornostjo proti kolicinu M in E2 (Helbig in

sod., 2010). V naravnih okoljih bi lahko subinhibitorne koncentracije zato vplivale na bakterijsko združbo *E. coli* s spodbujanjem adaptacij, ki omogočajo nekolicinogenim celicam preživetje in tekmovanje s kolicinskim producentom. Zgoraj opisani pojavi bi lahko bili pomembni v naravnem okolju drugih bakterijskih vrst, saj so bili homologe kolicina M s hidrolitičnim delovanjem peptidoglikanskih prekurzorjev nedavno najdeni tudi pri človeških in rastlinskih patogenih vrstah *Pseudomonas* (Barreateau in sod., 2009). Poleg tega je bilo pokazano, da aktivacija sistema CreBC pri *P. aeruginosa* igra pomembno vlogo pri rezistenčnem odzivu proti β -laktamskim antibiotikom (Moya in sod., 2009).

5.1.1.10 Kolicin M kot antibiotik

Trenutno predstavljajo rezistence patogenih mikroorganizmov proti klinično pomembnim antibiotikom največji globalni zdravstveni problem. Zaskrbljuje je tudi pomanjkanje novih antibiotikov. Dokazano je bilo, da kolicin M hidrolizira peptidoglikanske prekurzorje, lipide II, po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (Patin in sod., 2012). Poleg tega je že sama katalitična domena kolicina M funkcionalna, zato bi lahko s proteinskim inženiringom pripravili različice za vezavo in translokacijo v različne po Gramu pozitivne in po Gramu negativne vrste (Barnéoud-Arnoulet in sod., 2010; Barreateau in sod., 2010). Za uničenje celice bakterije *E. coli* s kolicinom M so zadostne zelo nizke koncentracije in majhno razmerje kolicin/bakterija. Ciljanje lipida II je že bila nakazana kot potencialna protimikrobna strategija (Breukink in de Kruijff, 2006). Medtem ko je kolicin M sprožil adaptivne odzive za zaščito pred stresom ovojnice in drugimi, pa ni induciral tvorbe biofilma, ne genov odziva SOS ali drugih genov vpletenih v mutagenozo, kar je lahko neželeni učinek številnih klinično uporabljenih antibiotikov (Ohmori in sod., 2001; Hoffman in sod., 2005; Linares in sod., 2006; Kohanski in sod., 2010; Thi in sod., 2011). Zato mora del razvoja novih antibiotikov vključevati tudi predvidenje možnih negativnih posledic. Pri razvoju protimikrobnih snovi so študije odziva na transkripcijskem nivoju zelo pomembne, saj dajejo vpogled v možne posledice njihove uporabe. Naša raziskava zato potrjuje kolicin M kot potencialno protibakterijsko sredstvo.

5.1.2 Uravnavanje izražanja kolicinov

Bakterije sintetizirajo kolicine v stresnih pogojih, njihovo sintezo pa uravnana več mehanizmov. Vsem je skupno uravnavanje s proteinom LexA, represorjem sistema SOS, ki omogoča popravilo DNA po poškodbi (Schnarr in sod., 1991). Kolicini se iz proizvodilne celice sprostijo z lizo celice, zaradi česar mora biti sinteza zelo močno in natančno uravnana (Herschman in Helinski, 1967; Cavard, 1991). Dejavniki, ki časovno in natančno uravnavajo sintezo kolicinov niso dobro poznani. Regulacija kolicinskih operonov je zelo kompleksna in se razlikuje od kolicina do kolicina. Čeprav je LexA

ključni regulator transkripcije kolicinov, tudi drugi represorji in aktivatorji v povezavi z okoljskimi signali uravnavajo izražanja nekaterih kolicinskih operonov.

5.1.2.1 Uravnavanje izražanja gena aktivnosti kolicina M, *cmA*

Kolicin B in M sta med najpogostejšimi kolicini *E. coli* in zapis za njuno sintezo se skoraj vedno nahaja skupaj na istem velikem konjugativnem plazmidu (Sasarman in sod., 1980; Olschläger in sod., 1984). Študije kažejo, da njuno izražanje uravnava skupni promotor SOS, ki se nahaja navzgor od gena aktivnosti kolicina B, *cbA* (Olschläger in sod., 1984; Gillor in sod., 2008b). Gena za kolicin B in M se prepisujeta v eno smer, medtem ko se gena imunosti prepisujeta konstitutivno v drugo smer (Olschläger in sod., 1984). Študija izolatov *E. coli* Avstralskih vretenčarjev je pokazala, da se sevi z zapisom za kolicin M pojavljajo v kar 10 % kolicinogenih sevov in da je veliko teh sevov izgubilo zapis za *cbA*, ki kodira kolicin B (Christenson in Gordon, 2009). Zaporedje SOS v promotorski regiji kolicina B je prisotno le na plazmidih z intaktnim genom *cbA*, ni ga na plazmidih le z zapisom za kolicin M, njegovo imunost in imunost B. Zato obstaja možnost, da produkcija kolicina M v teh sevih ne bi bila možna (Christenson in Gordon, 2009). A vendarle sta Christenson in Gordon (2009) pokazala, da kolicinogeni sevi z zapisom za kolicin M in imunost B in M uničijo občutljiv sev. To nakazuje, da se sinteza kolicina M še vedno pojavlja v sevih, ki so izgubili gen aktivnosti kolicina B in da sintezo uravnava drugi promotor. Kot pravita, je možno, da je kolicin M konstitutivno sintetiziran v nizki ravni v sevu brez zapisa za kolicin B in ta nizka raven sinteze kolicina je dovoljšna za letalni učinek (Christenson in Gordon, 2009). Glede na to, da je sinteza kolicina M tudi v primerih, ko skupnega promotorja SOS ni, še vedno prisotna, se pojavi vprašanje, kako je transkripcija *cmA* uravnana.

Zanimalo nas je, ali ima promotor kolicina M oz. regija navzgor od gena aktivnosti kolicina M, *cmA*, vlogo pri uravnavanju izražanja gena. Zato smo regijo, ki se nahaja navzgor od gena *cmA* klonirali v vektor s poročevalskim genom *gfp* brez lastnega promotorja in na ravni posameznih celic bakterijske populacije opazovali aktivnost promotorja kolicina M oz. transkripcijo *gfp*. Opazili smo nizko raven izražanja *cmA-gfp* v veliki večini bakterijskih celic. Poleg tega smo dokazali, da je tudi v primeru manjkajočega promotorja SOS izražanje neodvisno od SOS, saj je v sevu brez RecA, ki ni zmožen aktivacije odziva SOS, bila raven transkripcije enaka kot v sevu wt. Rezultati so skladni z objavo Christensona in Gordona (2009), ki sta ugotovila konstitutivno sintezo kolicina M v odsotnosti promotorja SOS. Sklepamo, da izražanje gena *cmA* uravnava tudi lastni promotor.

Zato smo pregledali »promotorsko« regijo gena aktivnosti kolicina M, *cmA*, oz. nukleotidno zaporedje, ki se nahaja navzgor od gena aktivnosti, *cmA*. Regija nima LexA vezavnega zaporedja, niti značilnih promotorskih elementov. Kljub temu smo zaznali

nizko izražanje genske fuzije *cma-gfp* v vseh celicah, kar kaže, da vendarle pride do transkripcije. Pri pregledu nt zaporedja navzgor od gena *cma* smo našli zaporedje nekoliko podobno Shine-Dalgarnovemu za vezavo ribosoma na mRNA, poleg tega smo zasledili zaporedja bogata z AU. Za translacijo nekaterih genov po Gramu negativnih bakterij Shine-Dalgarnovo zaporedje ni nujno, kajti ribosom se lahko veže na regijo bogato z AU, ki se nahaja v številnih prokariotskih mRNA 15–30 nt navzgor od start kodona in spodbudi iniciacijo translacije (Boni in sod., 1991). Da nastane prepis mRNA za kolicin M, se morda RNA polimeraza veže s šibko afiniteto na »promotorsko« regijo in sledi nizka raven transkripcije. Lahko da je to nizko izražanje za kolicin M producirajoči sev pomembno, kajti kot smo ugotovili, so zelo učinkovite že zelo majhne koncentracije kolicina M, kar je pomembno za kompeticijo v ekološki niši. Ker kolicin M nima gena za protein lize, ni poznan mehanizem sproščanja (Harkness in Olschläger, 1991). Ravno zato bi lahko ta nizka raven izražanja bila pomembna pri vlogi kolicina M v naravnih populacijah bakterij.

5.1.3 Uravnavanje izražanja porotvornih kolicinov – kolicina K

5.1.3.1 Heterogenost izražanja kolicina K v odsotnosti odziva SOS

Pod normalnimi pogoji bakterijske rasti je sinteza kolicinov utišana z represorjem LexA v večini celic populacije. Sproži se samo v majhnem delu populacije kot posledica naključne aktivacije sistema SOS brez dejavnika, ki poškoduje DNA (Salles in sod., 1987; Mulec in sod., 2003; Mrak in sod., 2007; Kamenšek in sod., 2010). Mulec in sod. (2003) so ugotovili, da v stacionarni fazi, brez dodanega SOS-inducirajočega dejavnika, pride do indukcije gena aktivnosti kolicina K v 3 % celic bakterijske kulture *E. coli* (Mulec in sod., 2003). To se zgodi na račun indukcije odziva SOS brez zunanjih dejavnikov, ki bi inducirali poškodbo DNA. Predlagano je bilo, da bi lahko bili za to odgovorni znotrajcelični dogodki, ki bi aktivirali odziv SOS, kot npr. ustavitev replikacijskih vilic. Uravnavanje različnih genov lahko vključuje stohastične mehanizme (McAdams in Arkin, 1999; Ozbudak in sod., 2002), kot je v primeru uravnavanja izražanja *cka* nihanje koncentracije proteina LexA. V uravnavanje izražanja *cka* je vključen lahko še dodatni regulatorni protein (Mrak in sod., 2007). Pod fiziološkimi pogoji različni geni uravnani z LexA kažejo heterogeno izražanje (Kamenšek, 2007; Mrak in sod., 2007). Da bi podrobneje preučili, kako je to heterogeno izražanje *cka* povezano z izražanjem genov SOS, smo spremljali sočasno aktivnost promotorjev genov *cka* in *lexA*. Večina celic, ki je močneje izražala *lexA* je tudi izražala *cka*, vendar smo opazili, da so posamezne celice (približno 0,1 % populacije) močno izražale le *cka*. To nakazuje, da majhen del populacije izraža gen aktivnosti kolicina K v odsotnosti odziva SOS. V teh celicah se je prav tako pojavila lahko tudi filamentacija celic, ki je sicer znamenje indukcije odziva SOS zaradi vezave SulA na protein FtsZ. Za filamentacijo v odsotnosti odziva SOS bi bili lahko odgovorni

multimeri plazmida na katerem je zapisana fuzija *cka* s poročevalcem (Chant in Summers, 2007). Menimo, da je do indukcije *cka* verjetno prišlo zaradi naključnih dogodkov, katerih molekularni mehanizmi niso poznani in bi jih bilo potrebno preučiti. Izražanje genov za sintezo kolicinov pod fiziološkimi pogoji v majhnem delu populacije lahko poveča genetsko raznolikost seva in zaradi lize producirajoče celice lahko zagotovi vire hranil za rast bližnjih celic.

5.1.3.2 Indukcija *cka* med odzivom SOS

Izpostavitve populacije bakterijskih celic dejavniku, ki poškoduje DNA, inducira odziv SOS v vseh celicah. Geni za sintezo kolicinov se za razliko od drugih genov odziva SOS po indukciji odziva začnejo izražati kasneje, po t. i. lag fazi (Herschman in Helinski, 1967; Salles in sod., 1987; Ronen in sod., 2002). Zakasnitev v izražanju kolicinov je smiselna, saj celica s tem pridobi čas, da popravi poškodbe DNA in ponovno utiša sistem, še preden se sintetizira protein lize. Pri večjih poškodbah napake v času lag faze niso popravljene in ne pride do ponovne represije kolicinskega operona (Salles in sod., 1987). Za lag fazo bi lahko bili poleg proteina LexA odgovorni še drugi regulatorni proteini. Nedavno je bilo dokazano, da je pri uravnavanju izražanja gena *cka* vpleten še regulatorni protein IscR, ki sodeluje pri utišanju promotorja in da se vezavno mesto prekriva z -35 elementom promotorja *cka* (Butala in sod., 2012). IscR je transkripcijski regulator genov vpletenih v nastanek in popravilo železo-žveplovih centrov Fe-S proteinov in drugih genov, ki kodirajo proteine s Fe-S. Proteini s Fe-S sodelujejo pri mnogih celičnih procesih (Nesbit in sod., 2009).

5.1.3.3 IscR in LexA učinkovito reprimirata izražanje gena *cka*

Dokazano je bilo, da ima regulator transkripcije IscR pomembno vlogo pri utišanju gena *cka*, saj je zaradi mutacije IscR vezavnega zaporedja prišlo ob indukciji odziva SOS do hitre derepresije promotorja *cka* (Butala in sod., 2012). Prav tako je bil pri preučevanju kinetike indukcije promotorja gena *cka* in gena odziva SOS *sulA*, po indukciji odziva SOS opažen izrazit zamik v indukciji promotorja gena *cka* v primerjavi s promotorjem gena *sulA*, ki nima IscR vezavnega zaporedja. Gen *sulA* se je takoj po indukciji odziva SOS začel močno izražati (Butala in sod., 2012).

Da bi preverili, ali IscR skupaj z LexA uravnava aktivnost promotorja *cka*, smo promotorju gena *sulA* dodali IscR vezavno zaporedje promotorja gena *cka*. S tem smo ustvarili umetni promotor, katerega aktivnost je bila v sevu divjega tipa (wt) zavrta kljub indukciji odziva SOS. Na drugi strani je bila v sevu z okvarjenim IscR (*iscR-*) aktivnost močna in ni kazala zamika. S tem smo potrdili, da IscR in LexA tesno sodelujeta pri uravnavanju transkripcije, saj je bil sicer zelo aktiven promotor *sulA* po

dotatku IscR vezavnega zaporedja utišan kljub indukciji odziva SOS. Pri tem IscR po vsej verjetnosti stabilizira LexA pri vezavi na DNA.

5.1.3.4 IscR stabilizira LexA pri utišanju *pcka*

Vsi geni SOS imajo v promotorski regiji ohranjeno LexA vezavno zaporedje. Najbolj pomembni za vezavo dveh dimerov LexA sta ohranjeni CTG in CAG mesti palindromskega zaporedja CTG(N)₁₀CAG (Schnarr in sod., 1991; Lewis in sod., 1994; Erill in sod., 2003). V primerjavi z drugimi geni, uravnanimi z odzivom SOS, imajo kolicinski geni dve prekrivajoči LexA vezavni zaporedji navzdol od -10 regije promotorja. LexA se veže na distalno zaporedje z večjo afiniteto kot na proksimalno, ki na poziciji vezave prvega dimera LexA ni tako ohranjeno (Lewis in sod., 1994). Predlagano je bilo, da je afiniteta LexA za kolicinske promotorje veliko večja zaradi kooperativne vezave dveh LexA dimerov, kar učinkovito ovira transkripcijo (Lloubès in sod., 1991; Lu in Chak, 1996). Dokazano je bilo, da mutacija v ohranjenih LexA vezavnih nukleotidih prepreči specifično vezavo LexA, zaradi česar pride ne glede na indukcijo odziva SOS do takojšnje indukcije transkripcije *cka*. Poleg tega je tudi mutacija v IscR vezavnem zaporedju privedla do takojšnje aktivacije promotorja *cka* ob indukciji odziva SOS, kar kaže na njegov pomen pri uravnavanju izražanja *cka* (Butala in sod., 2012).

Ker smo že dokazali na primeru gena *sulA* z dodanim mestom vezave IscR, da IscR poleg LexA sodeluje pri uravnavanju transkripcije, smo želeli dokazati, da IscR pri uravnavanju izražanja *cka* podaljša čas potreben za sprostitvev LexA iz operatorskih mest. Sklepali smo, da je pri tem ključna kooperativnost vezave LexA. Zato smo ustvarili različici promotorja *cka* z oslABLJENO močjo vezave LexA in spremljali aktivnost različic promotorja v sevu z in brez IscR. Med prekrivajoči LexA vezavni zaporedji smo vstavili 1 nukleotid, ki je ločil zaporedji (*pcka1*) in onemogočil kooperativnost vezave LexA dimerov. Poleg tega smo v drugi različici spremenili še zaporedji v konsenzni, da bi povečali afiniteto LexA na ločeni zaporedji (*pcka2*). LexA je med normalno rastjo v sevu z IscR (wt) utišal promotor gena *cka* in promotorja obeh izpeljank. Po indukciji odziva SOS pa je, kot smo pričakovali, bil promotor *pcka1* najbolj aktiven zaradi najmanjše afinitete vezave LexA. Takoj mu je sledil *pcka2*, najmanjšo aktivnost pa je kazal *pcka*. Pri obeh različicah promotorja je IscR ob odzivu SOS v sevu z IscR povzročil zakasnjeno indukcijo, lag fazo. IscR je zadržal LexA ob indukciji SOS na promotorjih do pomanjkanja hranil kljub manjši afiniteti vezave LexA zaradi porušanja kooperativnosti. Vendar pa je lag faza izginila v sevu brez IscR pri obeh različicah *cka*, brez kooperativne vezave LexA. Zato trdimo, da IscR stabilizira LexA na promotor *pcka* in da zamik v transkripciji povzroči stabilizacija vezave LexA z IscR ter kooperativnost vezave LexA. To pomeni, da soodvisnost med transkripcijskima faktorjema zagotavlja časovno indukcijo promotorja *cka* po poškodbi DNA. IscR

stabilizira LexA na *pcka* po indukciji odziva SOS do pomanjkanja hranil in podaljša čas potreben za disociacijo LexA iz vezavnih mest.

5.1.3.5 Aktivnost IscR odraža stanje hranil v celici

Zanimalo nas je zakaj IscR stabilizira LexA na *pcka* po indukciji odziva SOS samo dokler ne zmanjka hranil. Količina proteina IscR se tekom rastne faze bakterij v tekoči kulturi zmanjšuje in ga je v stacionarni fazi 3-krat manj kot v zgodnji eksponentni rastni fazi. To nakazuje, da je transkripcija *cka* v celicah z induciranim odzivom SOS lahko aktivirana, ko količina IscR pade pod prazno raven in ne more več delovati pri stabilizaciji LexA na DNA (Butala in sod., 2012). Predhodno je bilo objavljeno, da sta gena aktivnosti kolicina K in kolicina E1 inducirana zaradi pomanjkanja hranil in ne zaradi induktorjev, sproščenih iz bližnjih celic (Eraso in sod., 1996; Kuhar in Žgur-Bertok, 1999). Da bi preverili, ali je derepresija z IscR v stacionarni fazi pogojena s pomanjkanjem hranil, smo bakterijske celice z induciranim odzivom SOS ohranjali v gojišču bogatem s hranili. Promotor *pcka* je ostal v izobilju hranil utišán kljub indukciji odziva SOS. Zato trdimo, da stanje hranil vpliva na aktivnost *pcka* v povezavi z znotrajcelično količino IscR. Pomanjkanje hranil je signal za deaktivacijo z IscR. Za indukcijo *cka* je potrebna hkrati trajna poškodba DNA in stradanje hranil. Postavili smo model represije z IscR in LexA, ki pravi: Med normalno rastjo sta IscR in LexA vezana na promotor *cka* in utišata transkripcijo. Po poškodbi DNA se začne SOS popravilo DNA zaradi znižanja znotrajcelične koncentracije LexA. Do derepresije promotorja *cka* po dlje časa trajajoči poškodbi DNA pride zaradi, od nižanja hranil odvisnega, zmanjšanja ravni IscR. IscR stabilizira vezan LexA na promotorju in povzroči zamik v transkripciji kolicina K po poškodbi DNA do pomanjkanja hranil.

Kako je dosežena stabilizacija vezave LexA z IscR ni znano. Pri bakteriji *Bacillus subtilis* je bilo ugotovljeno, da vezavo represorja CodY na DNA stabilizira GTP (gvanozin trifosfat) in dGTP (deoksi gvanozin trifosfat). CodY zazna znotrajcelično koncentracijo GTP-ja kot indikatorja stanja hranil in uravnava transkripcijo genov, izraženih v zgodnji stacionarni fazi in sporulaciji, do pomanjkanja hranil (Ratnayake-Lecamwasam in sod., 2001; Handke in sod., 2008). Pri *in vitro* vezavi IscR na promotor kolicina K v kombinaciji z različnimi deoksiribonukleotid trifosfati nismo zaznali večje vezave na DNA, kar pomeni, da ne vplivajo na stabilizacijo vezave IscR na promotorsko zaporedje gena *cka*.

5.1.4 Uravnavanje izražanja nukleaznih kolicinov je neodvisno od IscR

Dokazali smo, da protein IscR stabilizira vezavo LexA na promotorsko zaporedje *cka* in sodeluje pri časovno uravnani sintezi kolicina K po indukciji odziva SOS. IscR prav tako uravnava izražanje še nekaterih drugih porotvornih kolicinov (Butala in sod., 2012). Zato nas je zanimalo, ali IscR uravnava tudi izražanje nukleaznih kolicinov.

Za preučevanje sinteze nukleaznih kolicinov v odvisnosti od IscR smo izbrali kolicine E2, E5, E6, E7, E8 in D, med katerimi so predstavniki z DNazno, tRNazno in 16S rRNazno aktivnostjo. Kot kontrolo smo izbrali porotvorni kolicin K. Sintezo kolicinov smo spremljali tekom rasti tekočih kultur sevov *E. coli* z (wt) in brez proteina IscR (*iscR*-), v katerih smo inducirali odziv SOS z dodatkom nalidiksične kisline. Opazili smo, da se rast oz. optična gostota tekočih kultur z zapisom za posamezen nukleazni kolicin med sevoma z in brez IscR ni razlikovala. Viabilnost obeh sevov je 2 h ali 3 h po dodatku Nal drastično padla zaradi inducirane sinteze kolicinov in posledično lize celic. Na drugi strani je bila pri kontroli, kolicinu K, razlika v rasti med sevoma z in brez IscR očitna, saj se je liza kulture v odsotnosti IscR začela že po 2 h po indukciji odziva SOS, medtem ko v prisotnosti IscR šele po 4 h. Ta rezultat nakazuje, da IscR ni regulator transkripcije nukleaznih kolicinov. Enako smo potrdili s kvantifikacijo sintetiziranih kolicinov tekom rasti istih kultur s conami lize občutljivega seva, pri čemer nismo opazili razlik v količini sintetiziranih nukleaznih kolicinov med sevoma z in brez IscR.

Kljub temu, da smo dokazali, da IscR ne uravnava izražanja nukleaznih kolicinov, smo pri pregledu con lize občutljivega seve opazili 2 h zamik v sintezi kolicinov E5, E6, E7 in E8 po indukcija odziva SOS. Manj izrazit je bil zamik v sintezi kolicinov E2 in D. Prav tako nismo pri pregledu nukleotidnih zaporedij promotorjev izbranih nukleaznih kolicinov našli IscR vezavnega zaporedja. Zato smo sklepali, da je za časovno uravnavanje izražanja genov nukleaznih kolicinov odgovoren drugi regulatorni protein oz. mehanizem.

Da bi razjasnili, ali je zamik v izražanju genov nukleaznih kolicinov po indukciji odziva SOS uravnan na ravni transkripcije, smo pripravili transkripcijske fuzije promotorjev genov aktivnosti kolicinov E2, E5, E6, E7, E8 in D z genom *lacZ*. Z merjenjem aktivnosti β -galaktozidaze po indukciji odziva SOS smo potrdili zamik na nivoju transkripcije. Sklepamo, da sinteza preučevanih kolicinov ni uravnana na posttranskripcijskem nivoju, ampak, da je za zamik v sintezi odgovoren neznani regulator transkripcije.

5.1.4.1 Protein AsnC morda uravnava sintezo kolicina E8

Z namenom odkritja neznanega regulatorja transkripcije nukleaznih kolicinov smo za nadaljne študije izbrali DNazni kolicin E8, ker je kazal največji zamik v sintezi kolicina in na nivoju transkripcije gena *ce8a*. Celične proteine, ki se vežejo na promotorsko zaporedje kolicina E8 smo izolirali s testom »pull down«, pri katerem lovimo proteine, ki se vežejo na tarčno, z biotinom označeno zaporedje DNA. Ker smo predvideli, da bi lahko na vezavo proteinov vplival tudi LexA, smo na DNA vezali proteine lizata SOS-inducirane celične kulture v kombinaciji z in brez predhodno vezanega dodanega proteina LexA ter vezali lizat neinducirane celične kulture. Izolirane specifično vezane proteine smo ločili na poliakrilamidnem gelu in iskali razlike v profilu celičnih proteinov, če je bila kultura inducirana ali ne, in če je na DNA predhodno bil vezan LexA ali ne. Same magnetne kroglice so v manjši meri vezale proteine. Med netretirano in tretirano kulturo ni bilo opaznih razlik v proteinskem profilu proteinov, vezanih na DNA na magnetnih kroglicah. Je pa v primeru lizata tretirane kulture s predhodno vezanim LexA lisa pri velikosti ca. 18 kDa bila znatno manj opazna. To lahko pomeni, da LexA tekmuje z in ovira vezavo tega proteina, ki bi lahko bil tudi transkripcijski regulator izražanja kolicina E8. Poleg te lise smo izbrali še nekaj zanimivih za identifikacijo vezanih proteinov. Izmed identificiranih smo izbrali proteinske kandidate za možne transkripcijske regulatorje kolicina E8. V sevih zbirke Keio z delecijami genov za regulatorje transkripcije smo preučevali aktivnost promotorja kolicina E8 s testom β -galaktozidaze in ugotovili, da bi protein AsnC lahko bil regulator transkripcije in odgovoren za zamik v transkripciji in sintezi kolicina E8. Kinetika aktivnosti kolicina E8 in kolicina K v prisotnosti in odsotnosti transkripcijskih regulatorjev AsnC ali IscR je zelo podobna. AsnC je bil identificiran ravno iz lise velikosti 18 kDa, ki je bila manjša, če je bil na promotor predhodno vezan LexA, kar potrjuje, da bi AsnC bil lahko regulator transkripcije kolicina E8, ki morda tekmuje z LexA za vezavo na promotorsko zaporedje kolicina E8. Ob poškodbah DNA in sproščanju LexA iz promotorja gena *ce8a* bi AsnC lahko za krajši čas preprečil izražanje. Protein AsnC je transkripcijski regulator, ki aktivira gen *asnA*, vpleten v sintezo asparagina pri pomanjkanju le-tega (Kölling in Lothar, 1985). Potrebne so nadaljne študije za razjasnitev vloge proteina AsnC pri uravnavanju izražanja kolicina E8 in morebiti tudi drugih nukleaznih kolicinov.

5.2 SKLEPI

Kolicin M je zelo učinkovit baktericidni protein, saj zelo majhne koncentracije kolicina M uničijo občutljive bakterije *E. coli*.

Subinhibitorna koncentracija kolicina M pri občutljivem sevu *E. coli* inducira stres ovojnice in z njim povezane poglavitne odzive stresa Rcs, Cpx, Psp. Rcs regulon igra ključno vlogo pri globalnem odzivu *E. coli* na tretiranje s kolicinom M. Povečana je tudi raven izražanja genov vpletenih pri osmotskem in drugih stresih, kot so geni dvokomponentnega sistema CreBC, ki zagotavlja odpornost proti kolicinu M, in nekaj genov vpletenih pri uravnavanju nastanka biofilma.

Kolicin M v subinhibitorni koncentraciji zviša zlasti raven izražanja operonov za sintezo zunajceličnih polisaharidov, in sicer *wca* za sintezo zunajceličnega polisaharida kolanske kisline in operona *yjbEFGH* za sintezo še nekarakteriziranega zunajceličnega polisaharida. Zniža raven izražanja flagelarnih genov za bakterijsko gibljivost in nekaterih genov, vpletenih v prenos aminokislin in odpornost proti kislem pH.

V naravnem okolju so s kolicinom M inducirani stresni odzivi lahko pomembni v znotrajvrstni dinamiki, saj v občutljivi bakteriji inducirajo odzive, ki omogočijo nekolicinogenim celicam ekološko prilagoditev, preživetje in tekmovanje s kolicinogenim sevom.

Kolicin M ne inducira odziva SOS, ne povzroči povečanega nastanka biofilma in ne omogoči povečane sinteze zunajceličnega polisaharida kolanske kisline, zato ima velik potencial za nadaljni razvoj protimikrobnega sredstva.

Promotor kolicina M nima LexA vezavnega zaporedja in značilnih promotorskih elementov, a kljub temu kaže nizko aktivnost v veliki večini bakterijskih celic. Sklepamo, da se RNA polimeraza veže s šibko afiniteto za nizko raven transkripcije, kar ima lahko pomembno vlogo pri kompeticiji v ekološki niši.

Izražanje gena aktivnosti porotvornega kolicina K, *cka*, v populaciji genetsko identičnih celic je lahko v manjši meri neodvisno od LexA in indukcije odziva SOS, saj se izražanje gena aktivnosti kolicina K, *cka*, pojavi tudi v celicah, ki hkrati ne izražajo gena *lexA*, represorja odziva SOS.

IscR sodeluje pri vezavi LexA na promotor *cka*. Zamik v transkripciji *cka* povzroči stabilizacija vezave LexA z IscR in kooperativna vezava LexA. Stanje hranil vpliva na aktivnost promotorja *cka* in izgleda, da IscR zaznava to stanje. IscR stabilizira vezan LexA na promotorju po indukciji odziva SOS le do pomanjkanja hranil in podaljša čas potreben za sprostitvev LexA iz vezavnega zaporedja.

Sinteza nukleaznih kolicinov poleg proteina LexA ni uravnana s proteinom IscR, temveč z drugim regulatornim proteinom na nivoju transkripcije. Pri zamiku v izražanju gena aktivnosti nukleaznega kolicina E8 po indukciji poškodb DNA bi lahko bil vpleten protein AsnC.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Kolicini so proteini, katere sintetizirajo kolicinogeni sevi bakterije *Escherichia coli* in delujejo baktericidno na občutljive bakterije iste ali sorodne vrste. Občutljive bakterije lahko uničijo z enim od treh načinov delovanja: s tvorbo pore v citoplazemski membrani, z nukleazno aktivnostjo ali s prekinitvijo sinteze peptidoglikana. Izražanje kolicinskih genov ob odzivu SOS je zakasnjeno in vklopljeno po močni in dlje trajajoči poškodbi DNA. Kolicini se iz proizvodilne celice sprostijo z lizo celice, zaradi česar mora biti njihova sinteza natančno uravnana. Predpostavlja se, da kolicini igrajo pomembno vlogo pri znotrajvrstnih interakcijah, saj omogočajo kolicinogenim sevom tekmovalno z bakterijami, ki naseljujejo isto ekološko nišo. Ekološka vloga kolicinov je nejasna, na eni strani je uravnavanje njihove sinteze zelo kompleksno in njihova sinteza pomeni propad producirajoče celice, na drugi strani pa se postavi vprašanje, zakaj so tako pogosti. Njihovo vlogo pri znotrajvrstni dinamiki v populaciji bakterij smo poskušali razjasniti s preučevanjem transkriptomskih odzivov bakterij na kolicin in njihovo kompleksno sintezo s preučevanjem uravnavanja izražanja kolicinskih genov.

Kolicin M (ColM) je med najpogostejšimi kolicini kolicinogenih sevov najdenih v naravnem okolju in je edini kolicin, ki uniči bakterije s prekinitvijo sinteze peptidoglikana. Zaradi cepitve lipida II, peptidoglikanskega intermediata, ki je skupen vsem bakterijskim vrstam, ColM kaže potencial za razvoj antibiotika. Koncentracije protimikrobnih snovi so lahko v naravnem okolju različne in s tem je pogojena tudi njihova ekološka vloga. Visoka koncentracija, ki se pojavi le v bližini producenta, uniči bakterije, nizka pa spremeni izražanje genov in povzroči ekološko prilagajanje. Nobena raziskava do sedaj ni preučevala vpliva kolicina M na transkriptom občutljivih bakterij. Da bi pridobili večji vpogled v ekološko vlogo najbolj pogostega kolicina in vpogled v adaptivne odzive, ki bi lahko bili škodljivi med protimikrobno terapijo, smo preučili učinek subinhibitornih koncentracij ColM na občutljiv sev *E. coli*. Ker mnogi antibiotiki v subinhibitorni koncentraciji sprožijo odziv SOS, nas je zanimalo, ali ga tudi ColM. S sledenjem izražanja transkripcijske fuzije *sulA-lacZ* ob tretiranju s ColM smo ugotovili, da ne izzove odziva SOS. Nato smo se lotili globalne transkriptomске študije z DNA mikromrežami in rezultate izražanja genov potrdili z metodo qPCR. ColM uniči občutljive bakterije *E. coli* že v zelo majhni koncentraciji. V subinhibitorni koncentraciji je v občutljivi bakteriji sprožil odzive na stres ovojnice Rcs, Cpx, in Psp. Zlasti je bila zvišana raven izražanja genov operonov za sintezo zunajceličnih polisaharidov, in sicer operona *wca*, za sintezo kolanske kisline in operona *yjbEFGH*. Oba operona uravnava sistem Rcs. Povečana je bila tudi raven izražanja genov vpletenih pri osmotskem in drugih stresih, kot so geni dvokomponentnega sistema CreBC, in nekaj genov vpletenih pri uravnavanju nastanka biofilma. Geni

dvokomponentnega sistema CreBC so bili med prvimi nadizraženimi geni in znano je, da povečajo odpornost proti ColM. Znižana pa je bila raven izražanja genov za bakterijsko gibljivost. Sledili so *in vivo* testi potrjevanja rezultatov diferenčnega izražanja genov operona *wca* in biofilma z izolacijo kolanske kisline in preverjanjem nastanka biofilma. Ugotovitve, da kljub spremenjenem izražanju genov ni bilo povečanja zunajceličnih polisaharidov in biofilma ter, da kolicin M ne inducira odziva SOS, nakazujejo na potencial za nadaljni razvoj ColM kot protimikrobnega sredstva. S to študijo smo pridobili nov vpogled v ekologijo produkcije kolicina M v naravnih okoljih. Spremenjeno izražanje genov, vpletenih pri odzivih na stres, ima vlogo v znotrajvrstni dinamiki kolicinogenih sevov v naravnem okolju, saj subinhibitorna koncentracija ColM v občutljivi bakteriji inducira odzive, ki omogočijo nekolicinogenim sevom ekološko prilagoditev za preživetje in tekmovanje s kolicinogenim sevom, ko koncentracije kolicina niso uničujoče.

Bakterije sintetizirajo kolicine v stresnih pogojih, primarno je izražanje kolicinskih genov pod kontrolo odziva SOS. Čeprav je LexA ključni regulator kolicinske transkripcije, igrajo tudi drugi represorji in aktivatorji v povezavi z okoljskimi signali vlogo pri uravnavanju izražanja nekaterih kolicinskih operonov. Regulacija kolicinskih operonov je zelo kompleksna in se razlikuje od kolicina do kolicina. Razumevanje regulacije je pomembno pri razumevanju njihove ekologije, saj v različnem okolju lahko različni dejavniki in regulatorni proteini dirigira njihovo sintezo. Izražanje je natančno uravnano, vendar pa dejavniki, ki vodijo časovno in natančno uravnano sintezo, niso dobro poznani.

Kolicin M ni le izjema v načinu delovanja, ampak tudi v mehanizmi uravnavanja sinteze kolicina. Zapis za kolicin M se nahaja na plazmidu skupaj z zapisom za kolicin B in njuno izražanje je uravnano s skupnim promotorjem SOS gena aktivnosti kolicina B, *cba*. Veliko omenjenih plazmidov je izgubilo promotor SOS zaradi izgube gena *cba* in poraja se vprašanje kako je transkripcija gena aktivnosti kolicina M, *cma*, uravnana. S preučevanjem izražanja transkripcijske fuzije promotorske regije gena *cma*, ki nima tipičnih promotorskih elementov, z *gfp*, smo ugotovili, da je v veliki večini bakterijskih celic promotor gena *cma* aktiven, neodvisno od odziva SOS. Sklepamo, da se RNA polimeraza na to regijo veže šibko in posledično je raven transkripcije nizka. Nizka raven izražanja gena *cma* je lahko za kolicinogeni sev ekološko pomembna, kajti kolicin M se ne sprošča iz producirajočih celic s proteinom lize in je lahko nizko izražanje pomembno za kompeticijo v ekološki niši.

Znano je, da je pod normalnimi pogoji sinteza kolicinov utišana z represorjem LexA v večini celic kolicinogene populacije, pojavi se samo v majhnem delu populacije kot rezultat naključne aktivacije sistema SOS brez dejavnika, ki poškoduje DNA. Da bi preučili podrobneje, kako je uravnavanje povezano z izražanjem genov SOS, smo

spremljali sočasno izražanje genov *cka* in *lexA* v istih celicah s pomočjo transkripcijskih fuzij promotorjev s poročevalskima genoma *rfp* in *gfp* in konfokalno mikroskopijo. Večina celic v stacionarni fazi, ki je močnejše izražala gen *cka* je tudi izražala gen *lexA*, vendar smo opazili, da so redke posamezne celice močno izražale le gen *cka*. Majhen del populacije izraža gen aktivnosti kolicina K v odsotnosti odziva SOS verjetno zaradi naključnih dogodkov, katerih molekularni mehanizmi niso poznani.

Izpostavitev bakterijske populacije dejavniku, ki poškoduje DNA, inducira odziv SOS v vseh celicah. Geni za sintezo kolicinov se za razliko od drugih genov odziva SOS po indukciji začnejo izražati kasneje, po t. i. lag fazi. Nedavno je bilo odkrito, da je pri uravnavanju izražanja gena aktivnosti kolicina K, *cka*, poleg LexA vpleten še regulatorni protein IscR. Da bi preučili vlogo IscR pri utišanju aktivnosti promotorja *cka*, smo ustvarili umetni promotor SOS, kjer je bilo vezavno mesto represorja IscR dodano promotorju *sulA*. Pripravili smo tudi različici promotorja *cka* z oslABLjeno vezavo LexA, zaradi ločenih prekrivajočih zaporedij z vstavljenim 1 bp, kar prepreči kooperativno vezavo LexA dimerov na promotor. S testom aktivnosti β -galaktozidaze smo ugotovili, da zamik v transkripciji povzroči stabilizacija vezave LexA z IscR ter kooperativna vezava LexA na promotor *cka*. S preučevanjem transkripcijske aktivnosti *cka* v okolju bogatem s hranili smo ugotovili, da IscR zaznava stanje hranil in da stabilizira vezan LexA na promotorju po indukciji odziva SOS le dokler je dovolj hranil. Postavili smo model uravnavanja izražanja gena *cka* z IscR in LexA. Med normalno rastjo sta IscR in LexA vezana na promotor *cka* in utišata transkripcijo. Po poškodbi DNA se začne SOS popravilo DNA zaradi znižanja znotrajcelične koncentracije LexA. Do derepresije promotorja *cka* po dlje časa trajajoči poškodbi DNA pride zaradi odnižanja hranil odvisnega zmanjšanja ravni IscR.

Sinteza preučevanih nukleaznih kolicinov E2, E5, E6, E7, E8 in D ni uravnana z IscR, kar smo dokazali s kvantifikacijo sinteze kolicinov v sevih z in brez IscR. Kljub temu je po indukciji odziva SOS opazen zamik v sintezi, ki je največji pri kolicinogenih sevih z zapisom za kolicin E5, E6, E7 in E8. Do zamika v transkripciji, določenega s testom β -galaktozidazne aktivnosti, je prišlo pri vseh preučevanih nukleaznih kolicinih. Za kolicin E8 smo podrobneje preučili, kateri regulatorni protein bi lahko bil odgovoren za zamik v transkripciji. Z metodo »pull down« smo izolirali proteine vezane na promotor, jih identificirali z masno spektrometrijo in sledili aktivnosti promotorja gena kolicina E8, *ce8a*, v sevih zbirke Keio z delecijami genov za potencialne regulatorje transkripcije. Ugotovili smo, da bi pri zamiku v izražanju gena kolicina E8 po indukciji poškodb DNA lahko bil vpleten protein AsnC.

6.2 SUMMARY

Colicins are proteins produced by colicinogenic *Escherichia coli* strains. They exhibit bactericidal activity against sensitive bacteria of the same and related species. Colicins can destroy sensitive bacteria by one of several mechanisms: pore formation in the cytoplasmic membrane; nuclease activity; inhibition of peptidoglycan synthesis. Following SOS induction colicin gene expression is delayed and induced only after persistent DNA damage. While colicins are, following synthesis released from a producer cell by cell lysis, their synthesis is under strong and accurate regulation. Colicins are presumed to play an important role in interspecies interactions and enable competition of colicinogenic strains with other bacteria in the same ecological niche. Their ecological role is not clear. Their production is very complex and causes death of the producer however, colicin producers are very frequent. In our study we tried to further resolve the ecological role of colicins in population dynamics by studying responses of sensitive bacteria to colicin exposure and in addition, investigated their complex expression regulation.

Colicin M (ColM) is the most common colicin produced by colicinogenic strains and exhibits a unique mode of action. It destroys sensitive bacteria by inhibition of peptidoglycan synthesis. As it cleaves the peptidoglycan precursor lipidII, common to all bacterial species, it shows potential for new antibiotic development. Antimicrobial agents can vary in their concentrations in the natural environment and therefore, so can their ecological roles. High concentrations that are found only in the vicinity of the producer can kill sensitive bacteria, while low concentrations can modify gene expression for ecological adaptation. Up till now no research investigated the effect of colicin M on the transcriptome of sensitive bacteria. To further our knowledge on the ecological role of the most common colicin and the adaptive responses it provokes, that can be detrimental during antimicrobial therapy, we studied the effect of subinhibitory concentrations of ColM on *E. coli*. To elucidate if ColM can induce the SOS response at subinhibitory concentrations like many other antibiotics, we followed expression of a *sulA-lacZ* transcriptional fusion following ColM treatment and determined that ColM does not induce the SOS response. Further on we performed a global transcriptional study by using DNA microarrays and confirmed our results with qPCR validation. ColM is lethal for sensitive *E. coli* bacteria at very low concentrations while at subinhibitory concentrations provoked envelope stress responses, namely Rcs, Cpx and Psp. The highest level of upregulation was determined for genes of extracellular polysaccharide operons *wca* for colanic acid synthesis and *yjBEFGH* that are under Rcs control. ColM also upregulated genes involved in osmotic stress and others, like the CreBC two component system and a few genes involved in biofilm formation. Genes of the CreBC two component system were among the first upregulated genes and it has been previously shown that they confer ColM resistance. Among the downregulated were genes involved in cell motility. Further, we performed *in vivo* tests to confirm

results of differential gene expression of the *wca* operon and biofilm formation, by colanic acid and biofilm quantification. We found no increase neither in extracellular polysaccharide nor in biofilm formation. As ColM does not induce biofilm formation, ColM shows potential for further development as an antimicrobial agent. On the basis of our study we acquired novel insight into the ecology of ColM production in natural habitats. Differential expression of genes involved in stress responses affects intraspecies dynamics of colicinogenic strains in their natural environment. ColM at subinhibitory concentrations can induce responses in noncolicinogenic bacteria to adapt to survive and compete with colicinogenic strains.

Bacteria synthesize colicins in stress conditions. Primarily, expression of colicins is under SOS control with LexA as a key colicin transcriptional regulator. But other repressors and activators can also be involved in regulation of expression of some colicins in connection with environmental signals. Regulation of colicin operon expression is very complex and differs among colicins. To understand the ecological role of colicins it is important to understand their regulation, while in different environments different factors and regulatory proteins can regulate their synthesis. Expression is precisely controlled, but the agents that drive this temporal and accurate synthesis are not well known.

Colicin M is not unique only for its mode of action but also with regard to expression regulation. Colicin M and colicin B operons are tightly linked on the same plasmid and their expression is regulated by the SOS promoter of the colicin B activity gene, *cba*. As many of these plasmids have lost the SOS promoter due to *cba* gene loss it is unclear how colicin M expression is regulated on such plasmids. By observing expression of a transcriptional fusion of the *cma* gene upstream region, that does not contain typical promoter elements, with *gfp*, at a single cell level, we found that the large majority of cells exhibit constitutive activity of the promoter independent of the SOS response. RNA polymerase most probably binds with low affinity to this region for low levels of transcript. Low levels of colicin M in the environment can have an ecological significance as colicin M is not released by cell lysis and low level expression can be important for competition in the ecological niche.

It is known that under normal conditions colicin synthesis is repressed by LexA in the majority of the colicinogenic population. Under such conditions only a small part of the population produces colicins as a result of random SOS response activation in the absence of a DNA damaging agent. To resolve in greater detail how this regulation is connected with SOS gene expression, we followed the simultaneous expression of *cka* and *lexA* genes in the same cells on the basis of promoter fusions with reporter genes *rfp* and *gfp*, respectively. In the stationary growth phase the majority of cells that showed higher *cka* expression also expressed *lexA*. Nevertheless, we observed individual cells

that highly expressed only the *cka* gene. A small part of the population thus expresses the colicin K activity gene in the absence of an SOS response probably due to random events whose molecular mechanisms are currently unknown.

Exposure of a bacterial population to a DNA damaging agent induces the SOS response in all cells. Colicin genes are induced following induction of other SOS genes, after a so called lag phase. It was recently found that the colicin K activity gene, *cka*, expression is regulated in addition to LexA by another regulatory protein IscR. To elucidate its role in repression of the *cka* promoter we constructed an artificial SOS promoter of the SOS gene *sulA* with an additional IscR binding site, and two *cka* promoter variants with weakened LexA binding due to insertion of one bp between the tandem LexA binding sites to destroy cooperativity of LexA dimer binding. By using the β -galactosidase activity test we found that, the transcription lag is caused by IscR stabilisation of LexA together with cooperativity of LexA binding to the *cka* promoter. By investigating *cka* transcriptional activity in the abundance of nutrients we found that IscR senses the nutritional status. Following SOS induction IscR stabilises promoter bound LexA only until nutrients become scarce. We described a model of *cka* expression regulation by IscR and LexA. During normal growth, LexA and IscR bind and repress transcription from the *cka* promoter. Upon DNA damage, SOS DNA repair commences due to the decrease in intracellular LexA concentrations. The *cka* promoter is de-repressed after long-lasting DNA damage due to decreased IscR levels driven by a decline of cellular nutritional status.

Unlike poreforming colicin K, IscR does not regulate expression of the selected nuclease colicins E2, E5, E6, E7, E8 and D as shown by quantification of colicin synthesis in strains with and without IscR. Nevertheless, synthesis is still delayed and a greater delay was observed in colicinogenic strains with colicin E5, E6, E7 and E8 genes. Thus a delay in the transcriptional assay of β -galactosidase activity occurred in all studied nuclease colicins. We performed further tests to identify the additional regulatory protein provoking the colicin E8 transcriptional delay. By using the pull-down assay we isolated proteins bound to the promoter, identified them by mass spectrometry and followed activity of the colicin E8 promoter, *ce8a*, in strains of the Keio strain collection with deletions of genes for potential transcriptional regulators. We found that the AsnC protein could be responsible for the delay in colicin E8 expression after DNA damage induction.

7 VIRI

- Abraham, S., Chin, J., Brouwers, H.J., Turner, B., Zhang, R. and Chapman, T.A. 2011. Green fluorescent protein-based biosensor to detect and quantify stress responses induced by DNA-degrading colicins. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 18: 6691-6693
- Aertsen, A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K. and Michiels, C. . 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186, 18: 6133-6141
- Ahmer, B.M., Thomas, M.G., Larsen, R.A. and Postle, K. 1995. Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *Journal of Bacteriology*, 177, 16: 4742-4747
- Akutsu, A., Masaki, H. and Ohta, T. 1989. Molecular structure and immunity specificity of colicin E6, an evolutionary intermediate between E-group colicins and cloacin DF13. *Journal of Bacteriology*, 171, 12: 6430-6436
- Anderluh, G., Gökçe, I. and Lakey, J.H. 2003. Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression and Purification*, 28, 1: 173-181
- Armstrong, K.A., Hershfield, V. and Helinski, D.R. 1977. Gene cloning and containment properties of plasmid Col E1 and its derivatives. *Science*, 196, 4286: 172-174
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. and Mori, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006 0008
- Barnéoud-Arnoulet, A., Barreteau, H., Touzé, T., Mengin-Lecreulx, D., Llobès, R. and Duché, D. 2010. Toxicity of the colicin M catalytic domain exported to the periplasm is FkpA independent. *Journal of Bacteriology*, 192, 19: 5212-5219
- Barreteau, H., Bouhss, A., Fourgeaud, M., Mainardi, J.L., Touzé, T., Gérard, F., Blanot, D., Arthur, M. and Mengin-Lecreulx, D. 2009. Human- and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *Journal of Bacteriology*, 191, 11: 3657-3664
- Barreteau, H., Bouhss, A., Gérard, F., Duché, D., Boussaid, B., Blanot, D., Llobès, R., Mengin-Lecreulx, D. and Touzé, T. 2010. Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 16: 12378-12389
- Barreteau, H., El Ghachi, M., Barnéoud-Arnoulet, A., Sacco, E., Touzé, T., Duché, D., Gérard, F., Brooks, M., Patin, D., Bouhss, A., Blanot, D., van Tilbeurgh, H., Arthur, M., Llobès, R. and Mengin-Lecreulx, D. 2012. Characterization of colicin M and its orthologs targeting bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis. *Microbial Drug Resistance*, 18, 3: 222-229
- Baty, D., Frenette, M., Llobès, R., Geli, V., Howard, S.P., Pattus, F. and Lazdunski, C. 1988. Functional domains of colicin A. *Molecular Microbiology*, 2, 6: 807-811
- Beaber, J.W., Hochhut, B. and Waldor, M.K. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427, 6969: 72-74

- Bénédicti, H., Frenette, M., Baty, D., Knibiehler, M., Pattus, F. and Lazdunski, C. 1991. Individual domains of colicins confer specificity in colicin uptake, in pore-properties and in immunity requirement. *Journal of Molecular Biology*, 217, 3: 429-439
- Bénédicti, H., Llobès, R., Lazdunski, C. and Letellier, L. 1992. Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *The EMBO Journal*, 11, 2: 441-447
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 57, 1: 289-300
- Berg, O.G. and von Hippel, P.H. 1987. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Statistical-mechanical theory and application to operators and promoters. *Journal of Molecular Biology*, 193, 4: 723-750
- Bergmaier, D., Lacroix, C., Guadalupe Macedo, M. and Champagne, C.P. 2001. New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 3: 401-406
- Boehm, A. and Vogel, J. 2012. The *csgD* mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. *Molecular Microbiology*, 84, 1: 1-5
- Böhringer, J., Fischer, D., Mosler, G. and Hengge-Aronis, R. 1995. UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of sigma S and sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177, 2: 413-422
- Boni, I.V., Isaeva, D.M., Musychenko, M.L. and Tzareva, N.V. 1991. Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Research*, 19, 1: 155-162
- Bourdineaud, J.P., Boulanger, P., Lazdunski, C. and Letellier, L. 1990. *In vivo* properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 3: 1037-1041
- Braun, V. 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 415, 3: 335-377
- Braun, V. 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiology Reviews*, 16, 4: 295-307
- Braun, V., Frenz, J., Hantke, K. and Schaller, K. 1980. Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 142, 1: 162-168
- Braun, V., Patzer, S.I. and Hantke, K. 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, 84, 5-6: 365-380
- Braun, V., Pilsl, H. and Gross, P. 1994. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Archives of Microbiology*, 161, 3: 199-206
- Braun, V., Schaller, K. and Wabl, M.R. 1974. Isolation, characterization, and action of colicin M. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5, 5: 520-533
- Breukink, E. and de Kruijff, B. 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5, 4: 321-332
- Budič, M., Rijavec, M., Petkovšek, Ž. and Žgur-Bertok, D. 2011. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS One*, 6, 12: e28769

- Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A. and Bouloc, P. 2009. Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 5, 9:
- Butala, M., Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlesek, Z., Klare, J.P., Anderluh, G., Busby, S.J., Steinhoff, H.J. and Žgur-Bertok, D. 2011. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Research*, 39, 15: 6546-6557
- Butala, M., Podlesek, Z. and Žgur-Bertok, D. 2008. The SOS response affects thermoregulation of colicin K synthesis. *FEMS Microbiol Letters*, 283, 1: 104-111
- Butala, M., Sonjak, S., Kamenšek, S., Hodošček, M., Browning, D.F., Žgur-Bertok, D. and Busby, S.J. 2012. Double locking of an *Escherichia coli* promoter by two repressors prevents premature colicin expression and cell lysis. *Molecular Microbiology*, 86, 1: 129-139
- Butala, M., Žgur-Bertok, D. and Busby, S.J. 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 1: 82-93
- Callewaert, L., Vanoirbeek, K.G.A., Lurquin, I., Michiels, C.W. and Aertsen, A. 2009. The Rcs two-component system regulates expression of lysozyme inhibitors and is induced by exposure to lysozyme. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1979-1981
- Campbell, A. 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 35, 55-83
- Cariss, S.J.L., Tayler, A.E. and Avison, M.B. 2008. Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190, 11: 3930-3939
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. and Cavard, D. 2007. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 1: 158-229
- Casino, P., Rubio, V. and Marina, A. 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 20, 6: 763-771
- Cavard, D. 1991. Synthesis and functioning of the colicin E1 lysis protein: comparison with the colicin A lysis protein. *Journal of Bacteriology*, 173, 1: 191-196
- Cavard, D. 1995. Effects of temperature and of heat shock on the expression and action of the colicin A lysis protein. *Journal of Bacteriology*, 177, 17: 5189-5192
- Cavard, D. 1997. Role of the colicin A lysis protein in the expression of the colicin A operon. *Microbiology*, 143, 2295-2303
- Chak, K.F. and James, R. 1984. Localization and characterization of a gene on the ColE3-CA38 plasmid that confers immunity to colicin E8. *Journal of General Microbiology*, 130, 3: 701-710
- Chak, K.F., Kuo, W.S., Lu, F.M. and James, R. 1991. Cloning and characterization of the ColE7 plasmid. *Journal of General Microbiology*, 137, 1: 91-100
- Chant, E.L. and Summers, D.K. 2007. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Molecular Microbiology*, 63, 1: 35-43
- Chao, L. and Levin, B.R. 1981. Structured habitats and the evolution of anticompeteritor toxins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 10: 6324-6328

- Christenson, J.K. and Gordon, D.M. 2009. Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology*, 155, Pt 5: 1645-1655
- Chumchalova, J. and Šmarda, J. 2003. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiologica*, 48, 1: 111-115
- Coker, O.O. and Palittapongarnpim, P. 2011. Current understanding of de novo synthesis of bacterial lipid carrier (undecaprenyl phosphate): More enzymes to be discovered. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 18: 2555-2565
- Cooper, G.M. 1997. *The Cell, a molecular approach*. 1st edition. Washington, DC, ASM Press: 226-229
- Coote, J.G. 1991. Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *Journal of General Microbiology*, 137, 11: 2493-2503
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 5418: 1318-1322
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O. and Hanawalt, P.C. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 158, 1: 41-64
- Coyette, J. and van der Ende, A. 2008. Peptidoglycan: the bacterial Achilles heel. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 2: 147-148
- Czárán, T.L., Hoekstra, R.F. and Pagie, L. 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2: 786-790
- Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, 182, 12: 3593-3596
- Davies, J., Spiegelman, G.B. and Yim, G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 5: 445-453
- de Zamaroczy, M. and Buckingham, R.H. 2002. Importation of nuclease colicins into *E. coli* cells: endoproteolytic cleavage and its prevention by the immunity protein. *Biochimie*, 84, 5-6: 423-432
- Dekker, N., Tommassen, J. and Verheij, H.M. 1999. Bacteriocin release protein triggers dimerization of outer membrane phospholipase A *in vivo*. *Journal of Bacteriology*, 181, 10: 3281-3283
- Di Masi, D.R., White, J.C., Schnaitman, C.A. and Bradbeer, C. 1973. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*: common receptor sites for vitamin B12 and the E colicins on the outer membrane of the cell envelope. *Journal of Bacteriology*, 115, 2: 506-513
- Diez-Gonzalez, F. 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Current Issues of Intestinal Microbiology*, 8, 1: 15-23
- Dover, L.G., Evans, L.J., Fridd, S.L., Bainbridge, G., Raggett, E.M. and Lakey, J.H. 2000. Colicin pore-forming domains bind to *Escherichia coli* trimeric porins. *Biochemistry*, 39, 29: 8632-8637
- Dri, A.M. and Moreau, P.L. 1994. Control of the LexA regulon by pH: evidence for a reversible inactivation of the LexA repressor during the growth cycle of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12, 4: 621-629

- Duché, D., Frenkian, A., Prima, V. and Llobès, R. 2006. Release of immunity protein requires functional endonuclease colicin import machinery. *Journal of Bacteriology*, 188, 24: 8593-8600
- Duché, D., Izard, J., González-Mañas, J.M., Parker, M.W., Crest, M., Chartier, M. and Baty, D. 1996. Membrane topology of the colicin A pore-forming domain analyzed by disulfide bond engineering. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 26: 15401-15406
- Duché, D., Letellier, L., Géli, V., Bénédicti, H. and Baty, D. 1995. Quantification of group A colicin import sites. *Journal of Bacteriology*, 177, 17: 4935-4939
- Durrett, R. and Levin, S. 1997. Allelopathy in spatially distributed populations. *Journal Theoretical Biology*, 185, 2: 165-171
- Dykes, G.A. 1995. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 5: 186-189
- Ebina, Y. and Nakazawa, A. 1983. Cyclic AMP-dependent initiation and rho-dependent termination of colicin E1 gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 11: 7072-7078
- Ebina, Y., Takahara, Y., Kishi, F., Nakazawa, A. and Brent, R. 1983. LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 21: 13258-13261
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Barreteau, H., Touzé, T., Auger, G., Blanot, D. and Mengin-Lecreulx, D. 2006. Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 32: 22761-22772
- Eraso, J.M., Chidambaram, M. and Weinstock, G.M. 1996. Increased production of colicin E1 in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 178, 7: 1928-1935
- Eraso, J.M. and Weinstock, G.M. 1992. Anaerobic control of colicin E1 production. *Journal of Bacteriology*, 174, 15: 5101-5109
- Erill, I., Campoy, S. and Barbe, J. 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 6: 637-656
- Erill, I., Escribano, M., Campoy, S. and Barbe, J. 2003. *In silico* analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics*, 19, 17: 2225-2236
- Espeset, D., Duche, D., Baty, D. and Geli, V. 1996. The channel domain of colicin A is inhibited by its immunity protein through direct interaction in the *Escherichia coli* inner membrane. *The EMBO Journal*, 15, 10: 2356-2364
- Farkas-Himsley, H. and Cheung, R. 1976. Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agents of neoplasia. *Cancer Research*, 36, 10: 3561-3567
- Fernández De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H. and Woodgate, R. 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 35, 6: 1560-1572
- Ferrières, L., Aslam, S.N., Cooper, R.M. and Clarke, D.J. 2007. The *yjBEFGH* locus in *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding proteins involved in exopolysaccharide production. *Microbiology*, 153, 1070-1080

- Ferrières, L. and Clarke, D.J. 2003. The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Molecular Microbiology*, 50, 5: 1665-1682
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 9: 623-633
- Francez-Charlot, A., Castanié-Cornet, M.P., Gutierrez, C. and Cam, K. 2005. Osmotic regulation of the *Escherichia coli* *bdm* (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *Journal of Bacteriology*, 187, 11: 3873-3877
- Friedberg, E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A. and Ellenberg T. 2005. DNA repair and mutagenesis. 2nd edition., Washington, DC, American Society for Microbiology: 463-508
- Friedman, N., Vardi, S., Ronen, M., Alon, U. and Stavans, J. 2005. Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. *PLoS Biol*, 3, 7: e238
- Gerard, F., Brooks, M.A., Barreteau, H., Touze, T., Graille, M., Bouhss, A., Blanot, D., van Tilbeurgh, H. and Mengin-Lecreulx, D. 2011. X-ray structure and site-directed mutagenesis analysis of the *Escherichia coli* colicin M immunity protein. *Journal of Bacteriology*, 193, 1: 205-214
- Giese, K.C., Michalowski, C.B. and Little, J.W. 2008. RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *Journal of Molecular Biology*, 377, 1: 148-161
- Gillor, O., Etzion, A. and Riley, M.A. 2008a. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 4: 591-606
- Gillor, O., Kirkup, B.C. and Riley, M.A. 2004. Colicins and microcins: The next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 54, 54, 129-146
- Gillor, O., Nigro, L.M. and Riley, M.A. 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 8: 1067-1075
- Gillor, O., Vriezen, J.A. C. and Riley, M.A. 2008b. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiology*, 154, 1783-1792
- Girgis, H.S., Liu, Y., Ryu, W.S. and Tavazoie, S. 2007. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet*, 3, 9: 1644-1660
- Goh, E.B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G. and Davies, J. 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 26: 17025-17030
- Gordon, D.M. 2009. The potential of bacteriocin-producing probiotics and associated caveats. *Future Microbiology*, 4, 8: 941-943
- Gordon, D.M. and O'Brien, C.L. 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 152, 11: 3239-3244
- Gordon, D.M. and Riley, M.A. 1999. A theoretical and empirical investigation of the invasion dynamics of colicinogeny. *Microbiology*, 145, 3: 655-661

- Gordon, D.M., Riley, M.A. and Pinou, T. 1998. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiology*, 144, 8: 2233-2240
- Gottesman, S. and Stout, V. 1991. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Molecular Microbiology*, 5, 7: 1599-1606
- Graille, M., Mora, L., Buckingham, R.H., van Tilbeurgh, H. and de Zamaroczy, M. 2004. Structural inhibition of the colicin D tRNase by the tRNA-mimicking immunity protein. *The EMBO Journal*, 23, 7: 1474-1482
- Grainger, D.C., Aiba, H., Hurd, D., Browning, D.F. and Busby, S.J. 2007. Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein. *Nucleic Acids Research*, 35, 1: 269-278
- Gross, P. and Braun, V. 1996. Colicin M is inactivated during import by its immunity protein. *Molecular & General Genetics*, 251, 3: 388-396
- Handke, L.D., Shivers, R.P. and Sonenshein, A.L. 2008. Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *Journal of Bacteriology*, 190, 3: 798-806
- Hardy, K.G., Meynell, G.G., Dowman, J.E. and Spratt, B.G. 1973. Two major groups of colicin factors - their evolutionary significance. *Molecular & General Genetics*, 125, 3: 217-230
- Harkness, R.E. and Braun, V. 1989. Inhibition of lipopolysaccharide O-antigen synthesis by colicin M. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 25: 14716-14722
- Harkness, R.E. and Braun, V. 1990. Colicin-M is only bactericidal when provided from outside the cell. *Molecular & General Genetics*, 222, 1: 37-40
- Harkness, R.E. and Olschläger, T. 1991. The biology of colicin M. *FEMS Microbiology Reviews*, 8, 1: 27-41
- Helbig, S., Patzer, S.I., Schiene-Fischer, C., Zeth, K. and Braun, V. 2010. Activation of colicin M by the FkpA prolyl cis-trans isomerase/chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 8: 6280-6290
- Herschman, H.R. and Helinski, D.R. 1967. Comparative study of the events associated with colicin induction. *Journal of Bacteriology*, 94, 3: 691-699
- Hershfield, V., Boyer, H.W., Yanofsky, C., Lovett, M.A. and Helinski, D.R. 1974. Plasmid ColEI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 9: 3455-3459
- Hilsenbeck, J.L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K. and Kang, C. 2004. Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Molecular Microbiology*, 51, 3: 711-720
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A. and Miller, S.I. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436, 7054: 1171-1175
- Holmqvist, E., Reimegård, J., Sterk, M., Grantcharova, N., Römling, U. and Wagner, E.G. H. 2010. Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *The EMBO Journal*, 29, 11: 1840-1850
- Howard, S.P., Cavard, D. and Lazdunski, C. 1991. Phospholipase-A-independent damage caused by the colicin A lysis protein during its assembly into the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 137, 1: 81-89

- Hsieh, S.Y., Ko, T.P., Tseng, M.Y., Ku, W., Chak, K.F. and Yuan, H.S. 1997. A novel role of ImmE7 in the autoregulatory expression of the ColE7 operon and identification of possible RNase active sites in the crystal structure of dimeric ImmE7. *The EMBO Journal*, 16, 6: 1444-1454
- Huisman, O., D'Ari, R. and Gottesman, S. 1984. Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 14: 4490-4494
- Hullmann, J., Patzer, S.I., Romer, C., Hantke, K. and Braun, V. 2008. Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity. *Molecular Microbiology*, 69, 4: 926-937
- Ionescu, M. and Belkin, S. 2009. Overproduction of exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 rpoS mutant in response to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2: 483-492
- James, R., Kleanthous, C. and Moore, G.R. 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology*, 142, 7: 1569-1580
- James, R., Penfold, C.N., Moore, G.R. and Kleanthous, C. 2002. Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie*, 84, 5-6: 381-389
- Janion, C. 2001. Some aspects of the SOS response system – A critical survey. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 3: 599-610
- Johnson, T.J., Johnson, S.J. and Nolan, L.K. 2006. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *Journal of Bacteriology*, 188, 16: 5975-5983
- Joly, N., Engl, C., Jovanovic, G., Huvet, M., Toni, T., Sheng, X., Stumpf, M.P.H. and Buck, M. 2010. Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology. *FEMS microbiology reviews*, 34, 5: 797-827
- Jonas, K., Edwards, A.N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U. and Melefors, Ö. 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology*, 70, 1: 236-257
- Jordi, B.J., Boutaga, K., van Heeswijk, C.M., van Knapen, F. and Lipman, L.J. 2001. Sensitivity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 2: 329-334
- Josaitis, C.A., Gaal, T., Ross, W. and Gourse, R.L. 1990. Sequences upstream of the -35 hexamer of *rrnB* P1 affect promoter strength and upstream activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1050, 1-3: 307-311
- Jovanovic, G., Lloyd, L., Stumpf, M.P.H., Mayhew, A.J. and Buck, M. 2006. Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 30: 21147-21161
- Jung, J.U., Gutierrez, C., Martin, F., Ardourel, M. and Villarejo, M. 1990. Transcription of *osmB*, a gene encoding an *Escherichia coli* lipoprotein, is regulated by dual signals. Osmotic stress and stationary phase. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 18: 10574-10581

- Kadner R.J. 1996. Cytoplasmic membrane. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. Volume 1. 2nd edition. Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. (eds.). Washington, DC, ASM Press: 58-87
- Kaldalu, N., Mei, R. and Lewis, K. 2004. Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3: 890-896
- Kamenšek, S. 2007. Izražanje od proteina LexA odvisnih genov bakterije *Escherichia coli* na ravni posameznih celic. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana
- Kamenšek, S., Podlesek, Z., Gillor, O. and Žgur-Bertok, D. 2010. Genes regulated by the *Escherichia coli* SOS repressor LexA exhibit heterogeneous expression. *BMC Microbiology*, 10, 283
- Kamenšek, S. and Žgur-Bertok, D. 2013. Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 13, 42
- Kang, S. and Markovitz, A. 1967. Induction of capsular polysaccharide synthesis by rho-fluorophenylalanine in *Escherichia coli* wild type and strains with altered phenylalanyl soluble ribonucleic acid synthetase. *Journal of Bacteriology*, 93, 2: 584-591
- Kelley, W.L. 2006. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Molecular Microbiology*, 62, 5: 1228-1238
- Kennedy, C.K. 1971. Induction of colicin production by high temperature or inhibition of protein synthesis. *Journal of Bacteriology*, 108, 1: 10-19
- Kerr, B., Riley, M.A., Feldman, M.W. and Bohannan, B.J. 2002. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*, 418, 6894: 171-174
- Kirkup, B.C. and Riley, M.A. 2004. Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors *in vivo*. *Nature*, 428, 6981: 412-414
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of Lactic-Acid Bacteria. *Biochimie*, 70, 3: 337-349
- Kleanthous, C. 2010. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 12: 843-848
- Kleanthous, C., Kuhlmann, U.C., Pommer, A.J., Ferguson, N., Radford, S.E., Moore, G.R., James, R. and Hemmings, A.M. 1999. Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nature Structural Biology*, 6, 3: 243-252
- Kleanthous, C. and Walker, D. 2001. Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 10: 624-631
- Kobayashi, H., Yamamoto, M. and Aono, R. 1998. Appearance of a stress-response protein, phage-shock protein A, in *Escherichia coli* exposed to hydrophobic organic solvents. *Microbiology*, 144, 2: 353-359
- Kobayashi, R., Suzuki, T. and Yoshida, M. 2007. *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Molecular Microbiology*, 66, 1: 100-109
- Koch, W.H. and Woodgate, R. 1998. The SOS response. DNA damage and repair. Nickoloff, J.A. and Hoekstra, M.F. (eds.). Totowa, Humana Press Inc.: 107-134

- Kölling R. and Lothar H. 1985. AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 164, 1: 310-315
- Kohanski, M.A., DePristo, M.A. and Collins, J.J. 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell*, 37, 3: 311-320
- Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annual Review of Microbiology*, 36, 125-144
- Kuhar, I., van Putten, J.P., Žgur-Bertok, D., Gaastra, W. and Jordi, B.J. 2001. Codon-usage based regulation of colicin K synthesis by the stress alarmone ppGpp. *Molecular Microbiology*, 41, 1: 207-216
- Kuhar, I. and Žgur-Bertok, D. 1999. Transcription regulation of the colicin K *cka* gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *Journal of Bacteriology*, 181, 23: 7373-7380
- Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A.V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D.L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J.B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M.A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D.M. and Woodford, N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infectious Diseases*, 10, 9: 597-602
- Lancaster, L.E., Wintermeyer, W. and Rodnina, M. V. 2007. Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 38, 1: 15-18
- Landini, P., Bown, J.A., Volkert, M.R. and Busby, S.J. 1998. Ada protein-RNA polymerase sigma subunit interaction and alpha subunit-promoter DNA interaction are necessary at different steps in transcription initiation at the *Escherichia coli* *ada* and *aidB* promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 21: 13307-13312
- Lasater, L.S., Cann, P.A. and Glitz, D.G. 1989. Localization of the site of cleavage of ribosomal RNA by colicin E3. Placement on the small ribosomal subunit by electron microscopy of antibody – complementary oligodeoxynucleotide complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 36: 21798-21805
- Laubacher, M.E. and Ades, S.E. 2008. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190, 6: 2065-2074
- Lautenbach, E., Patel, J.B., Bilker, W.B., Edelstein, P.H. and Fishman, N.O. 2001. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 8: 1162-1171
- Lawrence, G.M.P. and James, R. 1984. Characterisation of the ColE8 plasmid, a new member of the group E colicin plasmids. *Gene*, 29, 1-2: 145-155
- Lazdunski, C., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Llobes, R. and Benedetti, H. 2000. Colicin import into *Escherichia coli* cells requires the proximity of the inner and outer membranes and other factors. *International Journal of Medical Microbiology*, 290, 4-5: 337-344

- Lazdunski, C.J., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Llobes, R. and Benedetti, H. 1998. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology*, 180, 19: 4993-5002
- Lazzaroni, J.C., Vianney, A., Popot, J.L., Benedetti, H., Samatey, F., Lazdunski, C., Portalier, R. and Geli, V. 1995. Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *Journal of Molecular Biology*, 246, 1: 1-7
- Lee, J., Hiibel, S.R., Reardon, K.F. and Wood, T.K. 2010. Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 6: 2088-2102
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E. and Chakraborty, T. 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *Journal of Bacteriology*, 174, 3: 947-952
- Lenski, R.E. and Riley, M.A. 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2: 556-558
- Lewis, L.K., Harlow, G.R., Gregg-Jolly, L.A. and Mount, D.W. 1994. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 241, 4: 507-523
- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F. and Martinez, J.L. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 51: 19484-19489
- Little, J.W. 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*, 73, 4: 411-421
- Little, J.W., Edmiston, S.H., Pacelli, L.Z. and Mount, D.W. 1980. Cleavage of the *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 6: 3225-3229
- Little, J.W. and Mount, D.W. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29, 1: 11-22
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D.P. and Romeo, T. 1997. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28: 17502-17510
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 4: 402-408
- Llobès, R., Baty, D. and Lazdunski, C. 1986. The promoters of the genes for colicin production, release and immunity in the ColA plasmid: effects of convergent transcription and LexA protein. *Nucleic Acids Research*, 14, 6: 2621-2636
- Llobès, R., Baty, D. and Lazdunski, C. 1988a. Transcriptional terminators in the *caa-cal* operon and *cai* gene. *Nucleic Acids Research*, 16, 9: 3739-3749
- Llobès, R., Granger-Schnarr, M., Lazdunski, C. and Schnarr, M. 1988b. LexA repressor induces operator-dependent DNA bending. *Journal of Molecular Biology*, 204, 4: 1049-1054
- Llobès, R., Granger-Schnarr, M., Lazdunski, C. and Schnarr, M. 1991. Interaction of a regulatory protein with a DNA target containing two overlapping binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 4: 2303-2312

- Lodge, J., Fear, J., Busby, S., Gunasekaran, P. and Kamini, N.R. 1992. Broad host range plasmids carrying the *Escherichia coli* lactose and galactose operons. *FEMS Microbiology Letters*, 74, 2-3: 271-276
- Lotz, W. 1978. Effect of guanosine tetraphosphate on *in vitro* protein synthesis directed by E1 and E3 colicinogenic factors. *Journal of Bacteriology*, 135, 2: 707-712
- Lu, F.M. and Chak, K.F. 1996. Two overlapping SOS-boxes in ColE operons are responsible for the viability of cells harboring the Col plasmid. *Molecular & General Genetics*, 251, 4: 407-411
- Luna-Chávez, C., Lin, Y.L. and Huang, R.H. 2006. Molecular basis of inhibition of the ribonuclease activity in colicin E5 by its cognate immunity protein. *Journal of Molecular Biology*, 358, 2: 571-579
- MacRitchie, D.M., Buelow, D.R., Price, N.L. and Raivio, T.L. 2008. Two-component signaling and Gram-negative envelope stress response systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 631, 80-110
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th edition. Upper Saddle River, Prentice Hall International: 219 str.
- Magnusson, L.U., Farewell, A. and Nystrom, T. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 13, 5: 236-242
- Majdalani, N. and Gottesman, S. 2005. The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology*, 59, 379-405
- Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B. and Riley, M.A. 2011. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *The ISME Journal*, 5, 1: 71-81
- Masaki, H. and Ogawa, T. 2002. The modes of action of colicins E5 and D, and related cytotoxic tRNases. *Biochimie*, 84, 5-6: 433-438
- Masaki, H. and Ohta, T. 1985. Colicin E3 and its immunity genes. *Journal of Molecular Biology*, 182, 2: 217-227
- McAdams, H.H. and Arkin, A. 1999. It's a noisy business! Genetic regulation at the nanomolar scale. *Trends in Genetics*, 15, 2: 65-69
- Meng, W., Belyaeva, T., Savery, N.J., Busby, S.J., Ross, W.E., Gaal, T., Gourse, R.L. and Thomas, M.S. 2001. UP element-dependent transcription at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter: positional requirements and role of the RNA polymerase alpha subunit linker. *Nucleic Acids Research*, 29, 20: 4166-4178
- Meredith, T.C., Mamat, U., Kaczynski, Z., Lindner, B., Holst, O. and Woodard, R.W. 2007. Modification of lipopolysaccharide with colanic acid (M-antigen) repeats in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 11: 7790-7798
- Mesak, L.R., Miao, V. and Davies, J. 2008. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on SOS and DNA repair gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 9: 3394-3397
- Michel, B. 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol*, 3, 7: e255
- Mika, F., Busse, S., Possling, A., Berkholz, J., Tschowri, N., Sommerfeldt, N., Pruteanu, M. and Hengge, R. 2012. Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 84, 1: 51-65

- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H. and Cohen, S. N. 2004. SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305, 5690: 1629-1631
- Miller, H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory
- Moreau, P.L. 2004. Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions. *Journal of Bacteriology*, 186, 21: 7364-7368
- Mosbahi, K., Walker, D., James, R., Moore, G.R. and Kleanthous, C. 2006. Global structural rearrangement of the cell penetrating ribonuclease colicin E3 on interaction with phospholipid membranes. *Protein Science*, 15, 3: 620-627
- Moya, B., Dötsch, A., Juan, C., Blazquez, J., Zamorano, L., Haussler, S. and Oliver, A. 2009. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathogens*, 5, 3: e1000353
- Mrak, P., Podlesek, Z., van Putten, J.P. and Žgur-Bertok, D. 2007. Heterogeneity in expression of the *Escherichia coli* colicin K activity gene *cka* is controlled by the SOS system and stochastic factors. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 4: 391-401
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M. and Jahn, D. 2005. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics*, 21, 22: 4187-4189
- Mulec, J., Podlesek, Z., Mrak, P., Kopitar, A., Ihan, A. and Žgur-Bertok, D. 2003. A *cka-gfp* transcriptional fusion reveals that the colicin K activity gene is induced in only 3 percent of the population. *Journal of Bacteriology*, 185, 2: 654-659
- Munthali, M.T., Timmis, K.N. and Diaz, E. 1996. Use of colicin E3 for biological containment of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 5: 1805-1807
- Nakamaru, M. and Iwasa, Y. 2000. Competition by allelopathy proceeds in traveling waves: colicin-immune strain aids colicin-sensitive strain. *Theoretical Population Biology*, 57, 2: 131-144
- Nesbit, A.D., Giel, J.L., Rose, J.C. and Kiley, P.J. 2009. Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe-S cluster ligation. *Journal of Molecular Biology*, 387, 1: 28-41
- Neu, H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257, 5073: 1064-1073
- Nikaido H. 1996. Outer membrane. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. Volume 1. 2nd edition. Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. (eds.). Washington, DC, ASM Press: 29-47
- Noegel, A., Rdest, U. and Goebel, W. 1981. Determination of the functions of hemolytic plasmid pHly152 of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 145, 1: 233-247
- Norman, A., Hestbjerg Hansen, L. and Sorensen, S.J. 2005. Construction of a Cold *cda* promoter-based SOS-green fluorescent protein whole-cell biosensor with higher sensitivity toward genotoxic compounds than constructs based on *recA*, *umuDC*, or *sulA* promoters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5: 2338-2346

- O'Brien, G.J., Chambers, S.T., Peddie, B. and Mahanty, H.K. 1996. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 20, 3: 185-190
- Obadia, B., Lacour, S., Doublet, P., Baubichon-Cortay, H.L.N., Cozzone, A.J. and Grangeasse, C. 2007. Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. *Journal of Molecular Biology*, 367, 1: 42-53
- Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T. and Masaki, H. 1999. A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science*, 283, 5410: 2097-2100
- Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C., Wang, Z.G. and Woodgate, R. 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Molecular Cell*, 8, 1: 7-8
- Ölschläger, T. and Braun, V. 1987. Sequence, expression, and localization of the immunity protein for colicin M. *Journal of Bacteriology*, 169, 10: 4765-4769
- Olschläger, T., Schramm, E. and Braun, V. 1984. Cloning and expression of the activity and immunity genes of colicin-B and colicin-M on ColBM plasmids. *Molecular & General Genetics*, 196, 3: 482-487
- Ölschläger, T., Turba, A. and Braun, V. 1991. Binding of the immunity protein inactivates colicin M. *Molecular Microbiology*, 5, 5: 1105-1111
- Olson, E.R., Duniak, D.S., Jurss, L.M. and Poorman, R.A. 1991. Identification and characterization of *dppA*, an *Escherichia coli* gene encoding a periplasmic dipeptide transport protein. *Journal of Bacteriology*, 173, 1: 234-244
- Ozbudak, E.M., Thattai, M., Kurtser, I., Grossman, A.D. and van Oudenaarden, A. 2002. Regulation of noise in the expression of a single gene. *Nat Genet*, 31, 1: 69-73
- Paterson, D.L. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control*, 34, 5: S20-S28
- Patin, D., Barreateau, H., Auger, G., Magnet, S., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Touze, T., Arthur, M., Mengin-Lecreulx, D. and Blanot, D. 2012. Colicin M hydrolyses branched lipids II from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 94, 4: 985-990
- Pommer, A.J., Cal, S., Keeble, A.H., Walker, D., Evans, S.J., Kühlmann, U.C., Cooper, A., Connolly, B.A., Hemmings, A.M., Moore, G.R., James, R. and Kleanthous, C. 2001. Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9. *Journal of Molecular Biology*, 314, 4: 735-749
- Pommer, A.J., Wallis, R., Moore, G.R., James, R. and Kleanthous, C. 1998. Enzymological characterization of the nuclease domain from the bacterial toxin colicin E9 from *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 334, 2: 387-392
- Postle, K. 2007. TonB system, *in vivo* assays and characterization. *Methods in Enzymology*, 422, 245-269
- Površinska plazmonska resonanca. 2009. Infrastrukturni center za površinsko plazmonske resonanco, Katedra za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani (24. avg. 2009).
<http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Tehnologija.html> (12. dec. 2012)
- Price, N.L. and Raivio, T.L. 2009. Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1798-1815

- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P. and Dorel, C. 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology*, 2, 4: 450-464
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W. and Schoolnik, G.K. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Molecular Microbiology*, 20, 1: 87-100
- Pugsley, A.P. 1983. Autoinduced synthesis of colicin E2. *Mol Gen Genet*, 190, 3: 379-383
- Pugsley, A.P. and Schwartz, M. 1983. Expression of a gene in a 400-base-pair fragment of colicin plasmid ColE2-P9 is sufficient to cause host cell lysis. *Journal of Bacteriology*, 156, 1: 109-114
- Pugsley, A.P. and Schwartz, M. 1984. Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *The EMBO Journal*, 3, 10: 2393-2397
- Qiu, X.Q., Jakes, K.S., Kienker, P.K., Finkelstein, A. and Slatin, S.L. 1996. Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *Journal of General Physiology*, 107, 3: 313-328
- Rahn, A. and Whitfield, C. 2003. Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. *Molecular Microbiology*, 47, 4: 1045-1060
- Raivio, T.L., Popkin, D.L. and Silhavy, T.J. 1999. The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *Journal of Bacteriology*, 181, 17: 5263-5272
- Ratajczak, E., Zietkiewicz, S. and Liberek, K. 2009. Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *Journal of Molecular Biology*, 386, 1: 178-189
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W. and Sonenshein, A.L. 2001. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes and Development*, 15, 9: 1093-1103
- Reeves, P.R., Hobbs, M., Valvano, M.A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, J., Maskell, D., Raetz, C.R. and Rick, P.D. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology*, 4, 12: 495-503
- Rijavec, M. 2010. Dejavniki virulence uroseptičnih sevov *Escherichia coli* ter možnost uporabe kolicinov - novih protimikrobnih snovi v boju proti okužbam urinarnega trakta. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Ljubljana
- Riley, M.A. 1993a. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 6: 1380-1395
- Riley, M.A. 1993b. Positive selection for colicin diversity in bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 5: 1048-1059
- Riley, M.A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, 32, 255-278
- Riley, M.A. and Gordon, D.M. 1992. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *Journal of General Microbiology*, 138, 7: 1345-1352
- Riley, M.A. and Gordon, D.M. 1996. The ecology and evolution of bacteriocins. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 3-4: 151-158

- Riley, M.A. and Gordon, D.M. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7, 3: 129-133
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002a. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84, 5-6: 357-364
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002b. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117-137
- Robin, A., Joseleau-Petit, D. and D'Ari, R. 1990. Transcription of the *ftsZ* gene and cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 3: 1392-1399
- Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B.I. and Alon, U. 2002. Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16: 10555-10560
- Roos, U., Harkness, R.E. and Braun, V. 1989. Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Molecular Microbiology*, 3, 7: 891-902
- Ruiz, N. and Silhavy, T.J. 2005. Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 2: 122-126
- Sabik, J.F., Suit, J.L. and Luria, S.E. 1983. *cea-kil* operon of the ColE1 plasmid. *Journal of Bacteriology*, 153, 3: 1479-1485
- Sailer, F.C., Meberg, B.M. and Young, K.D. 2003. β -lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 226, 2: 245-249
- Salles, B. and Weinstock, G.M. 1989. Interaction of the CRP-cAMP complex with the *cea* regulatory region. *Molecular & General Genetics*, 215, 3: 537-542
- Salles, B., Weisemann, J.M. and Weinstock, G. M. 1987. Temporal control of colicin E1 induction. *Journal of Bacteriology*, 169, 11: 5028-5034
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 edition. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory
- Sasarman, A., Massie, B., Zollinger, M., Gagnetellier, H., Shareck, F., Garzon, S. and Morisset, R. 1980. Naturally occurring R.ColBM plasmids belonging to the IncfIII incompatibility group. *Journal of General Microbiology*, 119, Aug: 475-483
- Sassanfar, M. and Roberts, J.W. 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *Journal of Molecular Biology*, 212, 1: 79-96
- Saul, F.A., Arie, J.P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J.M. and Bentley, G.A. 2004. Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *Journal of Molecular Biology*, 335, 2: 595-608
- Schaller, K., Dreher, R. and Braun, V. 1981. Structural and functional properties of colicin M. *Journal of Bacteriology*, 146, 1: 54-63
- Schaller, K., Holtje, J.V. and Braun, V. 1982. Colicin-M is an inhibitor of murein biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 152, 3: 994-1000
- Schamberger, G.P., Phillips, R.L., Jacobs, J.L. and Diez-Gonzalez, F. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 10: 6053-6060

- Schnarr, M., Oertel-Buchheit, P., Kazmaier, M. and Granger-Schnarr, M. 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie*, 73, 4: 423-431
- Shaw, K.J., Miller, N., Liu, X., Lerner, D., Wan, J., Bittner, A. and Morrow, B.J. 2003. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 5, 2: 105-122
- Shi, W., Li, C., Louise, C.J. and Adler, J. 1993. Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175, 8: 2236-2240
- Shi, Z., Chak, K.F. and Yuan, H.S. 2005. Identification of an essential cleavage site in ColE7 required for import and killing of cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 26: 24663-24668
- Shirabe, K., Ebina, Y., Miki, T., Nakazawa, T. and Nakazawa, A. 1985. Positive regulation of the colicin E1 gene by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. *Nucleic Acids Research*, 13, 13: 4687-4698
- Sidikaro, J. and Nomura, M. 1974. E3 immunity substance. A protein from E3-colicinogenic cells that accounts for their immunity to colicin E3. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 2: 445-453
- Sim, S.H., Yeom, J.H., Shin, C., Song, W.S., Shin, E., Kim, H.M., Cha, C.J., Han, S.H., Ha, N.C., Kim, S.W., Hahn, Y., Bae, J. and Lee, K. 2010. *Escherichia coli* ribonuclease III activity is downregulated by osmotic stress: consequences for the degradation of *bdm* mRNA in biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 75, 2: 413-425
- Slatin, S.L., Qiu, X. Q., Jakes, K.S. and Finkelstein, A. 1994. Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature*, 371, 6493: 158-161
- Sledjeski, D.D. and Gottesman, S. 1996. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 178, 4: 1204-1206
- Song, H.Y. and Cramer, W.A. 1991. Membrane topography of ColE1 gene products: the immunity protein. *Journal of Bacteriology*, 173, 9: 2935-2943
- Soutourina, O.A. and Bertin, P.N. 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 4: 505-523
- Soutourina, O.A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Hommais, F., Danchin, A. and Bertin, P.N. 2002. Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. *Microbiology*, 148, 5: 1543-1551
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M. and Reeves, P.R. 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology*, 178, 16: 4885-4893
- Stout, V., Torres-Cabassa, A., Maurizi, M.R., Gutnick, D. and Gottesman, S. 1991. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *Journal of Bacteriology*, 173, 5: 1738-1747
- Šmajš, D., Micenkova, L., Šmarda, J., Vrba, M., Ševčíková, A., Valisová, Z. and Woznicová, V. 2010. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*, 10, 288

- Šmarda, J. 1983. The action of colicins on eukaryotic cells. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 2, 1: 1-76
- Šmarda, J., Obdrzalek, V., Taborsky, I. and Mach, J. 1978. Cytotoxic and cytocidal effect of colicin-E3 on mammalian tissue-cells. *Folia Microbiologica*, 23, 4: 272-277
- Šmarda, J. and Šmajš, D. 1998. Colicins-exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 43, 6: 563-582
- Taddei, F., Matic, I. and Radman, M. 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 25: 11736-11740
- Tan, Y. and Riley, M.A. 1997. Positive selection and recombination: major molecular mechanisms in colicin diversification. *Trends in Ecology & Evolution*, 12, 9: 348-351
- Thi, D.T., López, E., Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Guelfo, J.R., Castañeda-García, A. and Blázquez, J. 2011. Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 3: 531-538
- Thumm, G., Olschlager, T. and Braun, V. 1988. Plasmid pColBM-CI139 does not encode a colicin lysis protein but contains sequences highly homologous to the D protein (resolvase) and the *oriV* region of the miniF plasmid. *Plasmid*, 20, 1: 75-82
- Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K. and Masaki, H. 2000. A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 15: 8278-8283
- Trautner, B.W., Hull, R.A. and Darouiche, R.O. 2005. Prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18, 1: 37-41
- Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T. and Conway, T. 2008. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 68, 5: 1128-1148
- Uden, G. and Bongaerts, J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1320, 3: 217-234
- van der Wal, F.J., Luirink, J. and Oudega, B. 1995. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiology Reviews*, 17, 4: 381-399
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7:
- Vankemmelbeke, M., Healy, B., Moore, G.R., Kleanthous, C., Penfold, C.N. and James, R. 2005. Rapid detection of colicin E9-induced DNA damage using *Escherichia coli* cells carrying SOS promoter-*lux* fusions. *Journal of Bacteriology*, 187, 14: 4900-4907

- Walker, D., Rolfe, M., Thompson, A., Moore, G.R., James, R., Hinton, J.C.D. and Kleanthous, C. 2004. Transcriptional profiling of colicin-induced cell death of *Escherichia coli* MG1655 identifies potential mechanisms by which bacteriocins promote bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 186, 3: 866-869
- Walker, E.S. and Levy, F. 2001. Genetic trends in a population evolving antibiotic resistance. *Evolution*, 55, 6: 1110-1122
- Walker, G. 1996. The SOS response of *Escherichia coli*. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhart, F. C. (ed.). Washington, DC, ASM Press: 1400-1416
- Walterspiel, J.N., Ashkenazi, S., Morrow, A.L. and Cleary, T.G. 1992. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection*, 20, 1: 25-29
- Wan, E.W. and Baneyx, F. 1998. TolAIII co-overexpression facilitates the recovery of periplasmic recombinant proteins into the growth medium of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 14, 1: 13-22
- Wang, X., Preston, J.F. and Romeo, T. 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186, 9: 2724-2734
- Waters, V.L. and Crosa, J.H. 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiological Reviews*, 55, 3: 437-450
- Watson, R.J., Vernet, T. and Visentin, L.P. 1985. Relationships of the Col plasmids E2, E3, E4, E5, E6, and E7: restriction mapping and colicin gene fusions. *Plasmid*, 13, 3: 205-210
- Yamamoto, K. and Ishihama, A. 2006. Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70, 7: 1688-1695
- Yang, T.Y., Sung, Y.M., Lei, G.S., Romeo, T. and Chak, K.F. 2010. Posttranscriptional repression of the *cel* gene of the ColE7 operon by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 38, 12: 3936-3951
- Zakharov, S.D. and Cramer, W.A. 2002. Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565, 2: 333-346
- Zakharov, S.D. and Cramer, W.A. 2004. On the mechanism and pathway of colicin import across the *E. coli* outer membrane. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1311-1317
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G. and Alon, U. 2006. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods*, 3, 8: 623-628
- Zeth, K., Romer, C., Patzer, S.I. and Braun, V. 2008. Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 37: 25324-25331
- Zhang, Y.L. and Cramer, W.A. 1993. Intramembrane helix-helix interactions as the basis of inhibition of the colicin E1 ion channel by its immunity protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14: 10176-10184
- Zihler, A., Le Blay, G., de Wouters, T., Lacroix, C., Braegger, C.P., Lehner, A., Tischler, P., Rattei, T., Hachler, H. and Stephan, R. 2009. *In vitro* inhibition activity of different bacteriocin-producing *Escherichia coli* against *Salmonella* strains isolated from clinical cases. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 1: 31-38

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok, da mi je omogočila vstop v raziskovalni svet, za vodenje pri laboratorijskem delu, nasvete in pomoč pri izdelavi doktorske disertacije in uspešno sodelovanje.

Predsednici prof. dr. Ireni Rogelj in članici komisije prof. dr. Maji Rupnik se zahvaljujem za zelo hiter in natančen pregled doktorske disertacije.

Zahvaljujem se Mateju za vso idejno in strokovno pomoč pri nastanku tega dela. Hvala Zdravku za nasvete in veliko pripravljenost pomagati pri reševanju raziskovalnih problemov. Hvala Gregorju za tehnično podporo in Mihi za pomoč pri slikah. Hvala Živi in ostalim sedanjim in bivšim cimrom iz pisarne za prijetno vzdušje.

Zahvaljujem se Centru za funkcijsko genomiko in bio-čipe Inštituta za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, ki mi je pomagal pri izvedbi in analizi DNA mikromrež.

Zahvaljujem se prof. dr. Osnat Gillor in Zuckerberg Institute for Water Research, The Jacob Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University, Izrael, da so mi omogočili raziskovanje v njihovem laboratoriju in me financirali tekom izmenjave.

Še posebej se zahvaljujem Damijanu za vso pomoč, spodbudo, optimizem in veliko potrpežljivost.

Velika zahvala gre mojima staršema, ki sta me podpirala tekom izobraževanja in omogočila, da sem danes postala to kar sem.

Zahvaljejem se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, ki me je financirala tekom doktorskega izobraževanja.

PRILOGE

Priloga A: Sekvence kloniranih zaporedij pomnoženih s PCR in sekvenciranih (Macrogen). Podčrtana so restrikcijska mesta.

Annex A: Cloned PCR sequences. Restriction sites are undelined.

rfp iz pDsRed-Express2-N1 s KpnI mestom (rdeče označen nt T je v originalni sekvenci C, AK se ne spremeni)

ACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCACTAGTCGCCACCATGGATAGCACTGAGAACGTCATCA
AGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATC
GAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTTACGAGGGCACCCAGACCAGCTGCAGGTGACC
AAGGGCGGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAA
GGTGTACGTGAAGCACCCCCGCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCT
TCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTC
CTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCATCGGCGTGAAGTTCCTCCG
ACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACCC
CCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGGCGTGAAGCTGAAGGGCGGCGGCCAC
TACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCTGCCCGGCTACTA
CTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCGTGGTGGAGCAG
TACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCTGTTCCAGTAGGGTACCGA

Kolicin M promotor oz. regija navzgor z dodanima XhoI, BamHI mestoma

TCCTCGAGGAGTCTCAATATATATTTCCAGTATTTAATGGAGTGTACAGATATATATCTTATAT
ATGGTAGTTCAGGTGCTTCCCTACCATTTTTAACGGCATATCCGGCAAACAATGTTATGGGG
AGCCTCTCTCATGGGGTTCGTTCCGGGTGTAAGCGTTAGCCAGCCGCGAACTCTATTATCTT
ATTAACCTTATAAGGAGTTATGTATGGAAACCTTAACTGTTTCATGCACCACCACCATCAACTA
ACTTACCAAGTTATGGCAATGGTGCATTTTCTCTTCAGCACCGCATGTTCTGGGATCCGA

Kolicin D promotor z EcoRI, HindIII mestoma

CTCGAATTCGCGTCGCTTTGTTTCTGCGGCATTTTGTCTTTTTCGTCAGCCCCATGGCACGAG
CTTCAGCGGCAATGGCTTCTGCCAGTCGGCGCTCTTCGGCTTCGGTCAGTCTATGGCGTTTCA
TGGTGGTCTCCGGGTGTTTCTCTGGTGTACATAACAGTTTAACTGTTGGCTCTCTCCTTATGCT
AATCAGCCTTCTTTCATGCCTGTTGCCATTGAGTTTAAAGAATGATTGGTTGTTTTTCTTGAGC
GTTTTCACAAAAACGTAAATCCAGTGGGTTGACAGGATTTACGAGGTGACGTAACCTTTTAC
TGATATAAAACCAGTGGTTTTATACAGTTTGTGTTTTTAAACGCATTGTTTTAAAAGTCA
AAGAGGTGTTTTATGAGTGATTACGAAGGAAGCTTGGG

Kolicin E2 promotor z EcoRI, HindIII mestoma

CTCGAATTCCTCAACTCGGTTTTAATCAGACCTGGCATGAGTGGAAGCGGGACGAACAGCACAGG
CAACAACAACGCCGCCCGGGCACTTCCGGGGCATGAGTATGTGATATCCGGGGCTGCACC
CCGGACCCCGCAACACATCACGGGCCACAAAATTTTTGTGGCCCGCTCTGCGTTTTCTAA
GTGTTATCCCTCCTGATTTCTAAAAAATTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAACGATGACG
GGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTACAGTATTAATCATGTAATTAAT
TGTTTTAACGCTTAAAAGAGGGAATTTTTATGAGCGGTGGCGATGAAGCTTAGG

Kolicin E5 promotor z EcoRI, HindIII mestoma

CTCGAATTCCTCAACTCGGTTTTAATCAGACCTGGCATGAGTGGAAGCGGGACGAACAGCACAGG
CAACAACAACGCCGCCCGGGCACTTCCGGGGCATGAGTATGTGATATCCGGGGCTGCACC
CCGGACCCCGCAACACATCACGGGCCACAAAATTTTTGTGGCCCGCTCTGCGTTTTCTAA
GTGTTATCCCTCCTGATTTCTAAAAAATTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAACGATGACG
GGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTACAGTATTAATCATGTAATTAAT
TGTTTTAACGCTTAAAAGAGGAGTTTTTATGAGCGGTGGCGATGAAGCTTAGG

Kolicin E6 promotor z *EcoRI*, *HindIII* mestoma

CTCGAATTCTCAACTCGGTTTTAATCAGACCTGGCATGAGTGGAAGCGGGACGAACAGCACAGG
CAACAACAACGCCGCCCGGGCACTTCCGGGGCATGAGTATGTGATATCCGGGGCTGCACC
CCGG
ACCCCGCCAACACATCACGGGCCACAAAATTTTTGTGGCCCGCTCTGCGTTTTCTAAGTGTT
ATCCCTCCTGATTTCTAAAAAATTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAAAGATGACGAGTAC
TTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTACAGTATTAATCATGTAATTAATTGTTT
TAACGCTTAAAAGAGGGAATTTTTATGAGCGGTGGCGATGAAGCTTAGG

Kolicin E7 promotor z *EcoRI*, *HindIII* mestoma

CTCGAATTCTAAACTGGCGGAGAAACCTGTCACGGGTAAGAGCCGGAAAACTGACGCGCTTC
GTTTGTCCAACGCCTCACGGACCGCGAAAGGATTCGCGAACC GTTCACCGTTCCATGAGT
GACTCCTCCGAACTGCCAAAAAATATCCCTCCCTGACTTGACAGAGAAAATAATGGCGAGTA
CTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTACAGTATTA ACTATGTAATTAATTGTT
TTAACGCTTAAAAGAGGGAATTTTTATGAGCGGTGGAGATGGAAGCTTGAG

Kolicin E8 promotor z *EcoRI*, *HindIII* mestoma

CTCGAATTCCTTTTTGCTGCCATCAACAAACCGGAAGAGATGCCGGATTATCTCTCCGTCAAC
TCGGATTTAATCAGACCTGGCATGAGTGGAAGCGGGAGGAACAGCGCAGGCAACAACAACG
CCGTCCC GGCACTTCCGGGGCATGAGTATGTGATGTCCGGGGCTGCACTCCGGACCCCGCC
AACACATCACGGGCCACAAAATTTTTGTGGCCCGCTCTGCGTTTTCTAAGTGTTATCCCTCC
TGACTTCTAAAAAATTTCCACCTGAACTTGACAGAAAAAACGATGACGGGTACTTTTTGAT
CTGTACATAAAACCAGTGGTTTTATGTACAGTATTAATCATGTAATTAATTGTTTTAACGCTT
AAAAGAGGGACTTTTATGAGCGGTGGAGAAAGCTTGAG

Priloga B: Nukleotidna zaporedja promotorske regije *sulA* in različice *sulA1*, IscR mesto pri promotorju *cka*, ter promotorske regije *cka* in različic *cka1* in *cka2* klonirane v pRW50.

Annex B: Nucleotide sequences of *sulA1* promoter region, and it's variant *sulA1*, IscR site on *cka* promotor and it's variants *cka1* and *cka2* cloned in pRW50.

Promotorska regija *sulA* (wt): (-35 in -10 elementa sta rdeča, LexA mesto je podčrtano)

ACAATGATCGGTATTCAATTGTGCCAACGTTGCCAGGTATTCTTGTGATTTATAGATCCGCT
TATAGGAGAGGCTTTTCATAAAAATTCCTTTTAAAATCATAACATAAAAAGAATGATTCACATT
AACGGATCCGTTAACTACGAAAATAGGCAACTTATTCTTAAGGGGCAAGATTAATTTATGTT
TTCCCGTCACCAACGACAAAATTTGCGAGGCTCTTTCCGAAAATAGGGTTGATCTTTGTTGT
CACTGGATGTACTGTACATCCATACAGTAACTCACAGGGGCTGGATTGATTATGTACTTTC
AGGCTATGCACATCGTTCT

IscR mesto pri promotorju *cka*:

TGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAATGC

Promotorska regija *sulA1* v pRW50: (-35 in -10 elementa sta rdeča, LexA mesto je podčrtano, rumeno je označeno nt zaporedje spremenjeno v IscR mesto)

ACAATGATCGGTATTCAATTGTGCCAACGTTGCCAGGTATTCTTGTGATTTATAGATCCGCT
TATAGGAGAGGCTTTTCATAAAAATTCCTTTTAAAATCATAACATAAAAAGAATGATTCACATT
AACGGATCCGTTAACTACGAAAATAGGCAACTTATTCTTAAGGGGCAAGATTAATTTATGTT
TTCCCGTCACCAACGACAAAATTTGCGAGGCTCTGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAAT
GCCTGGATGTACTGTACATCCATACAGTAACTCACAGGGGCTGGATTGATTATGTACTTTC
AGGCTATGCACATCGTTCT

Promotorska regija *cka* v pRW50 (wt): (-35 in -10 elementa sta rdeča, LexA mesto je dvojno podčrtano)

CTTTGTCATGCTCATATCCGGCAGCAACAAGGGTGTGCGAGAAGTCGTTTGTCTGTTTTGTTTCA
GTTTATGGCGGGGTGATTTGCTCACATCGTTCTCCGTTTTTTTCATGATCCAACAGTTTTATATC
TCATCCTGATTTGCTCCGGTGTCTGTTTCGACGTTCTCAATGCCTGCCTCCCCATAGTGTGAT
CCTTATTGCAAAAATGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAATGCTGAGTAGTAGGTTTTTA
CTGTACATAAAAACCAGTGGTTATATGTACAGTATATTGTTTTAATTTATTGTTTTAATTATC
AAAGAGGAATTTATGGCTAAAGAAC

Promotorska regija *cka1* v pRW50*cka1*: (-35 in -10 elementa sta rdeča, LexA mesto je dvojno podčrtano, prekrivajoče mesto ločeno z nukleotidom A)

CTTTGTCATGCTCATATCCGGCAGCAACAAGGGTGTGCGAGAAGTCGTTTGTCTGTTTTGTTTCA
GTTTATGGCGGGGTGATTTGCTCACATCGTTCTCCGTTTTTTTCATGATCCAACAGTTTTATATC
TCATCCTGATTTGCTCCGGTGTCTGTTTCGACGTTCTCAATGCCTGCCTCCCCATAGTGTGAT
CCTTATTGCAAAAATGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAATGCTGAGTAGTAGGTTTTTA
CTGTACATAAAAACCAGAGTGGTTATATGTACAGTATATTGTTTTAATTTATTGTTTTAATTA
TCAAAGAGGAATTTATGGCTAAAGAAC

Promotorska regija *cka2* v pRW50*cka2*: (-35 in -10 elementa sta rdeča, LexA mesto je dvojno podčrtano, prekrivajoče mesto ločeno z nukleotidom A je označeno z rdečo spremenjeno v konsenzno mesto)

CTTTGTCATGCTCATATCCGGCAGCAACAAGGGTGTGCGAGAAGTCGTTTGTCTGTTTTGTTTCA
GTTTATGGCGGGGTGATTTGCTCACATCGTTCTCCGTTTTTTTCATGATCCAACAGTTTTATATC
TCATCCTGATTTGCTCCGGTGTCTGTTTCGACGTTCTCAATGCCTGCCTCCCCATAGTGTGAT
CCTTATTGCAAAAATGAAAATCCATGCTCTTGACATGGACAATGCTGAGTAGTAGGTTT
CTGTACATAAAAACAGACTGTTTATATGTACAGTATATTGTTTTAATTTATTGTTTTAATTA
TCAAAGAGGAATTTATGGCTAAAGAAC

Priloga C: Preglednica z diferenčno izraženimi geni po 30- in 60-minutnem izpostavljanju subinhibitornim koncentracijam kolicina M. ($p \leq 0,05$ pri \log_2 ratio v odebeljenem in normalnem tisku)

Annex C: Time course analysis of differentially expressed genes after 30 and 60 min exposure to subinhibitory concentrations of colicin M. ($p \leq 0,05$ when \log_2 ratio is in bold and normal)

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log ₂ ratio	60 min log ₂ ratio
<i>wcaE</i>	946543	predicted glycosyl transferase	1.25	7.26
<i>wcaD</i>	946550	predicted colanic acid polymerase	0.78	7.23
<i>wcaF</i>	946578	predicted acyl transferase	0.97	7.21
<i>wza</i>	946558	lipoprotein required for capsular polysaccharide translocation through the outer membrane	3.59	7.12
<i>wzc</i>	946567	protein-tyrosine kinase	1.52	6.72
<i>gmd</i>	946562	GDP-D-mannose dehydratase, NAD(P)-binding	0.71	6.65
<i>fcl</i>	946563	bifunctional GDP-fucose synthetase: GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose epimerase/ GDP-4-dehydro-6-L-deoxygalactose reductase	0.32	6.57
<i>ycfT</i>	945679	inner membrane protein	0.92	6.33
<i>wzb</i>	946564	protein-tyrosine phosphatase	2.44	6.33
<i>gmm</i>	946559	GDP-mannose mannosyl hydrolase	0.3	6.15
<i>rcsA</i>	946467	DNA-binding transcriptional activator, co-regulator with RcsB	3.38	6.13
<i>wcaI</i>	946588	predicted glycosyl transferase	0.3	5.92
<i>ycfJ</i>	945977	predicted protein	4.77	5.8
<i>yjbE</i>	948534	predicted protein	1.55	5.74
<i>wcaB</i>	946573	predicted acyl transferase	0.69	5.73
<i>wcaA</i>	946570	predicted glycosyl transferase	0.93	5.7
<i>yjbF</i>	948533	predicted lipoprotein	1.73	5.67
<i>wcaC</i>	946579	predicted glycosyl transferase	0.56	5.47
<i>yjbH</i>	948527	predicted porin	0.66	5.23
<i>yaiY</i>	945223	inner membrane protein, DUF2755 family	3.94	5.22
<i>cpsG</i>	946574	phosphomannomutase	0.09	5.15
<i>cpsB</i>	946580	mannose-1-phosphate guanyltransferase	0.26	5.1
<i>uhpT</i>	948201	hexose phosphate transporter	4.25	4.46
<i>wcaK</i>	946569	Colanic acid biosynthesis protein	-0.12	4.45
<i>wzxC</i>	946581	predicted colanic acid exporter	0.1	4.45
<i>ugd</i>	946571	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0.46	4.36
<i>yjbG</i>	948526	conserved protein	0.67	4.29

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log₂ ratio	60 min log₂ ratio
<i>cbrB</i>	948231	inner membrane protein, creBC regulon	5.2	4.29
<i>yiaB</i>	948152	inner membrane protein, YiaAB family	<i>0.16</i>	4.26
<i>ypeC</i>	946855	conserved protein	3.5	4.25
<i>bdm</i>	946041	biofilm-dependent modulation protein	4.49	4.21
<i>yaaX</i>	944747	predicted protein	1.59	4.12
<i>ydeI</i>	946068	conserved protein	1.99	3.96
<i>mliC</i>	946811	inhibitor of C-lysozyme, membrane-bound; predicted lipoprotein	2.17	3.92
<i>ymgD</i>	945732	predicted protein	3.45	3.65
<i>wcaL</i>	946565	predicted glycosyl transferase	<i>-0.13</i>	3.63
<i>ymgG</i>	945728	conserved protein, UPF0757 family	3.87	3.55
<i>yajI</i>	947233	predicted lipoprotein	1.89	3.47
<i>cbrA</i>	948197	predicted oxidoreductase with FAD/NAD(P)-binding domain	4.3	3.35
<i>yibD</i>	948140	predicted glycosyl transferase	<i>0.12</i>	3.33
<i>hslJ</i>	946525	heat-inducible lipoprotein involved in novobiocin resistance	2.33	3.32
<i>ygaC</i>	947156	predicted protein	2.39	3.52
<i>dppB</i>	948063	dipeptide/heme transporter	<i>-0.29</i>	3.29
<i>ypfG</i>	946828	predicted protein	3	3.08
<i>spy</i>	946253	envelope stress induced periplasmic protein	1.71	2.99
<i>osmB</i>	945866	lipoprotein	2.41	2.95
<i>ibpB</i>	948192	heat shock chaperone	<i>0.02</i>	2.9
<i>ygdI</i>	947276	novel lipoprotein	2.31	2.84
<i>cbrC</i>	948230	conserved protein, UPF0167 family	3.77	2.8
<i>yncJ</i>	945990	predicted protein	1.41	2.72
<i>wcaM</i>	946561	colanic acid biosynthesis protein	<i>-0.01</i>	2.71
<i>ydeJ</i>	946067	conserved protein	1.18	2.68
<i>ybdR</i>	949067	predicted oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-binding	1.94	2.67
<i>yhbO</i>	947666	predicted intracellular protease	2.29	2.67

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log₂ ratio	60 min log₂ ratio
<i>cpxP</i>	2847688	inhibitor of the cpx response; periplasmic adaptor protein	1.57	2.61
<i>yiaD</i>	948075	outer membrane lipoprotein	1.21	2.56
<i>galP</i>	947434	D-galactose transporter	0.7	2.53
<i>ysaB</i>	1450292	predicted protein	0.92	2.44
<i>dppF</i>	948056	dipeptide transporter	-0.1	2.33
<i>dppC</i>	948064	dipeptide/heme transporter	-0.09	2.33
<i>pspG</i>	948557	phage shock protein G	1.55	2.29
<i>yfdC</i>	944801	predicted inner membrane protein	1.02	2.25
<i>ykiA</i>	945423	pseudo	-0.01	2.2
<i>ygdR</i>	947304	novel lipoprotein	1.23	2.19
<i>ybiO</i>	945935	predicted mechanosensitive channel	0.71	2.17
<i>yigG</i>	948344	conserved inner membrane protein	0.02	2.15
<i>malZ</i>	949131	maltodextrin glucosidase	0.01	2.11
<i>dppD</i>	948065	dipeptide/heme transporter	-0.09	2.1
<i>yiaA</i>	948078	inner membrane protein, YiaAB family	-0.12	2.08
<i>ycfS</i>	945666	L,D-transpeptidase linking Lpp to murein	0.77	2
<i>yciE</i>	946871	predicted rubrerythrin/ferritin-like metal-binding protein	0.28	1.99
<i>yecT</i>	946511	predicted protein	-0.32	1.98
<i>lola</i>	948989	chaperone for lipoproteins	0.44	1.91
<i>rstB</i>	948870	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with RstA	0.53	1.88
<i>treR</i>	948760	DNA-binding transcriptional repressor	0.65	1.88
<i>yciG</i>	947489	predicted protein	0.5	1.87
<i>opgC</i>	946944	membrane protein required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs)	0.31	1.85
<i>iap</i>	947215	aminopeptidase in alkaline phosphatase isozyme conversion	0.77	1.83
<i>yqhG</i>	945919	conserved protein	0.4	1.82
<i>ydcF</i>	946215	conserved SAM-binding protein, DUF218 superfamily	0.54	1.82
<i>yggG</i>	945173	heat shock protein binding to Era protein; predicted peptidase	1.01	1.82

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log ₂ ratio	60 min log ₂ ratio
<i>ybdK</i>	947246	weak gamma-glutamyl:cysteine ligase	0.15	1.81
<i>yghA</i>	947478	predicted oxidoreductase	1.15	1.81
<i>ibpA</i>	948200	heat shock chaperone	-0.01	1.78
<i>ydhS</i>	945786	conserved protein with FAD/NAD(P)-binding domain	0.54	1.78
<i>pspD</i>	945635	peripheral inner membrane phage-shock protein	0.83	1.78
<i>paoA</i>	945330	PaoABC aldehyde oxidoreductase, 2Fe-2S subunit	0.7	1.77
<i>omrA</i>	2847746	ncRNA	0.36	1.76
<i>yehO</i>	945801	predicted invasin	0.4	1.75
<i>yciF</i>	947133	predicted rubrerythrin/ferritin-like metal-binding protein	0.49	1.75
<i>omrB</i>	2847747	ncRNA	0.77	1.74
<i>ybcI</i>	945155	inner membrane protein, DUF457 family	0.45	1.7
<i>tqsA</i>	946142	pheromone AI-2 transporter	0.62	1.7
<i>ybhN</i>	945410	conserved inner membrane protein	0.73	1.7
<i>yhhT</i>	947980	inner membrane protein, predicted membrane permease, UPF0118 family	0.45	1.69
<i>paoB</i>	945710	PaoABC aldehyde oxidoreductase, FAD-containing subunit	0.48	1.69
<i>ydeH</i>	946075	diguanylate cyclase, required for pgaD induction	1.38	1.68
<i>argC</i>	948455	N-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase, NAD(P)-binding	0.04	1.67
<i>yegS</i>	946626	phosphatidylglycerol kinase, metal-dependent	0.81	1.65
<i>yeeE</i>	946526	inner membrane protein, UPF0394 family	0.01	1.62
<i>yfbR</i>	946771	5'-nucleotidase	0.52	1.61
<i>iraM</i>	945729	RpoS stabilizer during Mg starvation, anti-RssB factor	0.33	1.6
<i>cysH</i>	947230	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase	-0.27	1.59
<i>nupG</i>	946282	nucleoside transporter	0.1	1.59
<i>rarA</i>	945505	recombination protein involved in processing recombination intermediates at replication forks	0.16	1.59
<i>ycjF</i>	945878	inner membrane protein, UPF0283 family	0.15	1.57
<i>yegL</i>	946602	conserved protein	0.17	1.57

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log ₂ ratio	60 min log ₂ ratio
<i>yidF</i>	948179	predicted DNA-binding transcriptional regulator	0.46	1.57
<i>lysA</i>	947313	diaminopimelate decarboxylase, PLP-binding	1.37	1.57
<i>ascB</i>	947460	cryptic 6-phospho-beta-glucosidase	0.53	1.54
<i>ybhO</i>	945409	cardiolipin synthase 2	0.93	1.53
<i>pspC</i>	945499	DNA-binding transcriptional activator	1.14	1.52
<i>alx</i>	947607	inner membrane protein, part of terminus	0.24	1.51
<i>yaeR</i>	944875	predicted lyase	0.5	1.55
<i>ybhP</i>	945408	conserved protein, endo/exonuclease/phosphatase family PFAM PF03372	0.99	1.5
<i>yigF</i>	948340	predicted inner membrane protein	-0.3	1.49
<i>ulaE</i>	948712	L-xylulose 5-phosphate 3-epimerase	-0.08	1.47
<i>rstA</i>	946199	multicopy supressor of yjeE, yeaZ or ygjD deletion lethality, predicted response regulator of two-component regulatory system with sensor protein RstB	0.49	1.47
<i>pspB</i>	945893	DNA-binding transcriptional regulator of psp operon	1.32	1.47
<i>artJ</i>	948981	arginine transporter subunit	-0.15	1.46
<i>ygiZ</i>	946450	inner membrane protein	0.04	1.46
<i>rhsB</i>	947994	rhsB element core protein RshB	0.39	1.44
<i>chbF</i>	946266	phospho-chitobiase; general 6-phospho-beta-glucosidase activity	-0.39	1.43
<i>srlA</i>	947575	glucitol/sorbitol-specific enzyme IIC component of PTS	-0.2	1.43
<i>ynfD</i>	946133	predicted protein	0.21	1.43
<i>yebE</i>	946355	inner membrane protein, DUF533 family	1.24	1.43
<i>glcA</i>	947259	glycolate transporter	0.17	1.41
<i>galU</i>	945730	glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.44	1.4
<i>cspI</i>	946099	Qin prophage; cold shock protein	0.05	1.37
<i>ycjX</i>	945872	conserved protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	0.1	1.37
<i>yeeD</i>	946539	conserved protein	-0.15	1.36
<i>ybhS</i>	945411	predicted transporter subunit: membrane component of ABC superfamily	-0.01	1.33
<i>ydiL</i>	946181	conserved protein	0.09	1.33

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log₂ ratio	60 min log₂ ratio
<i>yhhH</i>	947993	predicted protein	0.6	1.33
<i>fxsA</i>	948657	suppressor of F exclusion of phage T7	-0.01	1.32
<i>paoC</i>	944961	PaoABC aldehyde oxidoreductase, Moco-containing subunit	0.35	1.32
<i>mIaB</i>	947954	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, cytoplasmic STAS component	0.36	1.32
<i>yibJ</i>	948112	pseudo	-0.42	1.31
<i>ycbC</i>	945546	conserved protein, DUF218 superfamily	-0.12	1.31
<i>nanA</i>	947742	N-acetylneuraminase lyase	-0.15	1.3
<i>yhhA</i>	947956	conserved protein, DUF2756 family	0.97	1.29
<i>nanT</i>	947740	sialic acid transporter	-0.32	1.27
<i>yhiQ</i>	948005	predicted SAM-dependent methyltransferase	-0.1	1.27
<i>opgB</i>	948888	phosphoglycerol transferases I and II	0.12	1.27
<i>yaiW</i>	945038	probable lipoprotein required for swarming phenotype	0.48	1.26
<i>ybdG</i>	946243	predicted mechanosensitive channel	0.69	1.26
<i>ivy</i>	946530	inhibitor of vertebrate C-lysozyme	1.55	1.26
<i>yfcM</i>	946807	conserved protein	0.33	1.25
<i>ygbE</i>	947268	conserved inner membrane protein	0.45	1.25
<i>pheL</i>	947080	pheA gene leader peptide	-0.47	1.24
<i>fliR</i>	946464	flagellar export pore protein	-0.07	1.24
<i>yagF</i>	944928	CP4-6 prophage; predicted dehydratase	-0.1	1.23
<i>yceB</i>	947377	lipoprotein, DUF1439 family	0.85	1.23
<i>pagP</i>	946360	palmitoyl transferase for Lipid A	0.32	1.22
<i>yohN</i>	949080	predicted protein	0.69	1.22
<i>yibG</i>	948111	conserved protein	0.27	1.21
<i>chaA</i>	945790	calcium/sodium:proton antiporter	0.34	1.21
<i>nanC</i>	946843	N-acetylneuraminic acid outer membrane channel protein	-0.57	1.19
<i>chbR</i>	946247	rRepressor, chb operon for N,N'-diacetylchitobiose utilization	0.14	1.19
<i>ydeS</i>	946047	predicted fimbrial-like adhesin protein	0.32	1.19

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log₂ ratio	60 min log₂ ratio
<i>yjbJ</i>	948553	conserved protein, UPF0337 family	0.97	1.19
<i>ydeO</i>	945922	transcriptional activator for <i>mdtEF</i>	-0.06	1.18
<i>pspA</i>	945887	regulatory protein for phage-shock-protein operon	1.35	1.18
<i>mdtB</i>	946606	multidrug efflux system, subunit B	0.08	1.17
<i>anmK</i>	946810	anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	0.16	1.17
<i>mlaC</i>	947710	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry, periplasmic binding protein	0.31	1.17
<i>yehW</i>	949028	predicted transporter subunit: membrane component of ABC superfamily	0.09	1.16
<i>yeaO</i>	945675	conserved protein	0.15	1.16
<i>osmC</i>	946043	osmotically inducible, stress-inducible membrane protein	0.44	1.15
<i>sfmA</i>	945522	predicted fimbrial-like adhesin protein	0.1	1.14
<i>ldcC</i>	944887	lysine decarboxylase 2, constitutive	0.17	1.14
<i>dppA</i>	948062	dipeptide transporter	0.02	1.13
<i>yehX</i>	946659	predicted transporter subunit: ATP-binding component of ABC superfamily	0.06	1.13
<i>ycaP</i>	945525	inner membrane protein, UPF0702 family	0.27	1.13
<i>marB</i>	946184	predicted protein	0.69	1.13
<i>garP</i>	947642	predicted (D)-galactarate transporter	-0.35	1.12
<i>ybhR</i>	945403	predicted transporter subunit: membrane component of ABC superfamily	-0.03	1.12
<i>btuR</i>	945839	cob(I)alamin adenosyltransferase/cobinamide ATP-dependent adenosyltransferase	0.13	1.12
<i>ybjH</i>	945447	predicted protein	0.31	1.12
<i>leuL</i>	946072	leu operon leader peptide	-0.37	1.11
<i>ybeD</i>	945220	conserved protein, UPF0250 family	-0.1	1.11
<i>srlE</i>	948933	glucitol/sorbitol-specific enzyme IIB component of PTS	-0.1	1.1
<i>ydL</i>	948186	predicted transcriptional regulator, AraC family	0.13	1.1
<i>kefA</i>	945132	fused conserved protein	0.37	1.1
<i>cdd</i>	946663	cytidine/deoxycytidine deaminase	0.2	1.08
<i>cysP</i>	946883	thiosulfate transporter subunit	0.07	1.07
<i>yciK</i>	945838	predicted oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase, EmrKY-TolC system	0.18	1.07

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log ₂ ratio	60 min log ₂ ratio
<i>yjcE</i>	948577	predicted cation/proton antiporter	0.11	1.06
<i>yahA</i>	947459	c-di-GMP-specific phosphodiesterase	0.33	1.06
<i>rem</i>	946109	Qin prophage; predicted protein	-0.04	1.05
<i>ynjI</i>	946239	inner membrane protein	0.1	1.05
<i>yeaE</i>	946302	aldo-keto reductase, methylglyoxal to acetol, NADPH-dependent	0.13	1.05
<i>manA</i>	944840	mannose-6-phosphate isomerase	0.19	1.05
<i>yaiA</i>	945043	predicted protein	0.37	1.05
<i>ybgS</i>	945356	conserved protein	1.03	1.05
<i>yagE</i>	944925	CP4-6 prophage; predicted lyase/synthase	-0.17	1.04
<i>endA</i>	949092	DNA-specific endonuclease I	0.13	1.04
<i>wzxE</i>	948294	O-antigen translocase	-0.05	1.03
<i>srlD</i>	948937	sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	-0.01	1.03
<i>yehY</i>	946660	predicted transporter subunit: membrane component of ABC superfamily	0.09	1.03
<i>yidI</i>	948189	inner membrane protein	0.1	1.03
<i>ymdC</i>	947321	predicted hydrolase	0.43	1.03
<i>prlC</i>	948016	oligopeptidase A	-0.05	1.02
<i>hipX</i>	946076	predicted endopeptidase	0.27	1.01
<i>ybiH</i>	945421	predicted DNA-binding transcriptional regulator	0.46	1.01
<i>mrcB</i>	944843	fused glycosyl transferase and transpeptidase	0.47	1.01
<i>ygiM</i>	947555	SH3 domain protein	1.01	0.84
<i>marR</i>	945825	DNA-binding transcriptional repressor of multiple antibiotic resistance	1.28	0.64
<i>mdtD</i>	946601	predicted transporter with no MDR phenotype when mutated or cloned	0.27	1.01
<i>marA</i>	947613	DNA-binding transcriptional dual activator of multiple antibiotic resistance	1.04	0.39
<i>csgF</i>	945622	outer membrane protein involved in curlin assembly/transport	-1.05	-0.45
<i>csgE</i>	945711	curlin production assembly/transport componen	-1.05	-0.93
<i>yccT</i>	945577	conserved protein	-0.42	-1.02
<i>purM</i>	946975	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	-0.06	-1.02

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log ₂ ratio	60 min log ₂ ratio
<i>yfhL</i>	947031	predicted 4Fe-4S cluster-containing protein	-0.1	-1.03
<i>hdeD</i>	948024	acid-resistance membrane protein	-0.01	-1.04
<i>fliZ</i>	946833	RpoS antagonist; putative regulator of FliA activity	-0.41	-1.05
<i>purT</i>	946368	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	-0.03	-1.05
<i>ybaS</i>	946187	glutaminase	0.01	-1.06
<i>fliE</i>	946446	flagellar basal-body component	-0.41	-1.07
<i>fliG</i>	946451	flagellar motor switching and energizing component	-0.28	-1.07
<i>yiaG</i>	948071	predicted transcriptional regulator, HTH_CROC1 family	-0.03	-1.07
<i>yfjM</i>	947108	CP4-57 prophage; predicted protein	-0.16	-1.11
<i>yhiD</i>	948019	predicted Mg(2+) transport ATPase, inner membrane protein	-0.14	-1.11
<i>mdtE</i>	948031	multidrug resistance efflux transporter	-0.08	-1.11
<i>yhjY</i>	948073	conserved protein	0.04	-1.11
<i>flgN</i>	945634	export chaperone for FlgK and FlgL	-0.27	-1.12
<i>yafK</i>	944910	conserved protein	-0.47	-1.15
<i>glnL</i>	948360	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with GlnG	-0.24	-1.17
<i>glnP</i>	945621	glutamine transporter subunit	-0.23	-1.17
<i>flgA</i>	946300	assembly protein for flagellar basal-body periplasmic P ring	-0.09	-1.17
<i>hdeB</i>	948026	acid-resistance protein	0.13	-1.17
<i>gadB</i>	946058	glutamate decarboxylase B, PLP-dependent	0.03	-1.18
<i>flgF</i>	945639	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	-0.29	-1.21
<i>caiA</i>	949064	crotonobetaine reductase subunit II, FAD-binding	-0.13	-1.21
<i>flgM</i>	946684	anti-Sigma factor for FliA (Sigma 28)	-0.27	-1.23
<i>nac</i>	946501	DNA-binding transcriptional dual regulator of nitrogen assimilation	-0.07	-1.24
<i>glnQ</i>	945435	glutamine transporter subunit	-0.15	-1.25
<i>flxA</i>	947392	Qin prophage; predicted protein	-0.13	-1.29
<i>caiC</i>	944886	probable crotonobetaine/carnitine-CoA ligase	-0.29	-1.32

se nadaljuje

nadaljevanje

Gene symbol	Gene accession No.	Gene description	30 min log₂ ratio	60 min log₂ ratio
<i>glnG</i>	948361	fused DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with GlnL: response regulator/Sigma54 interaction protein	-0.15	-1.32
<i>yghJ</i>	2847716	predicted inner membrane lipoprotein	-0.11	-1.35
<i>gadE</i>	948023	DNA-binding transcriptional activator	0.13	-1.38
<i>amtB</i>	945084	ammonium transporter	-0.11	-1.42
<i>fliA</i>	948824	RNA polymerase, Sigma 28 (Sigma F) factor	-0.21	-1.45
<i>caiB</i>	948997	crotonobetainyl CoA:carnitine CoA transferase	-0.33	-1.47
<i>flgD</i>	945813	flagellar hook assembly protein	-0.33	-1.61
<i>phoH</i>	948010	conserved protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	0.34	-1.62
<i>gadA</i>	948027	glutamate decarboxylase A, PLP-dependent	-0.23	-1.64
<i>flgE</i>	945636	flagellar hook protein	-0.05	-1.72
<i>ypjF</i>	947131	CP4-57 prophage; toxin of the YpjF-YfjZ toxin-antitoxin system	-0.11	-1.8
<i>gfcA</i>	945029	predicted protein	-0.24	-1.84
<i>slp</i>	948022	outer membrane lipoprotein	-0.18	-1.91
<i>azuC</i>	7751642	expressed protein	-0.25	-1.94
<i>flgC</i>	946687	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	-0.04	-2.14
<i>ymiA</i>	1450256	hypothetical protein	-0.68	-2.18
<i>yciX</i>	1450257	hypothetical protein	-0.82	-2.27
<i>flgB</i>	945678	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	-0.19	-2.4
<i>dctR</i>	948021	predicted DNA-binding transcriptional regulator	-0.32	-2.47
<i>flhC</i>	947280	DNA-binding transcriptional dual regulator with FlhD	-0.76	-2.54
<i>flhD</i>	945442	DNA-binding transcriptional dual regulator with FlhC	-0.76	-2.54
<i>glnK</i>	945087	nitrogen assimilation regulatory protein for GlnL, GlnE, and AmtB	-0.13	-2.74
<i>yjiY</i>	948914	predicted inner membrane protein	0.31	-3.52

Priloga D: Preglednica s proteinskimi kandidati določenimi z masno spektrometrijo.

Annex D: Chart with protein candidates determined by mass spectrometry.

Lisa 1			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
15804591	transcriptional regulator HU subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	76.67	9.5
15800170	transcriptional regulator HU subunit beta [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	83.33	9.2
309787032	DNA-binding protein HU-beta [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	81.18	8.6
15800564	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	40.72	18.7
331662638	DNA-binding protein H-NS (Pathogenesis protein KcpA), partial [<i>Escherichia coli</i> TA143]	48.82	14.5
15802584	yohL gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	76.67	10.1
116667425	Chain P, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	61.54	8.8
309788161	ribosomal protein L32 [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	60.47	4.9
377943413	ribosomal protein S10, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4E]	38.37	10.0
315615054	transcriptional activator hlyU [<i>Escherichia coli</i> 3431]	39.71	7.3
195936567	phosphohistidinoprotein-hexose phosphotransferase component of PTS system (Hpr) [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4024]	15.85	8.7
116667447	Chain M, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	7.96	12.2
297521448	50S ribosomal protein L33 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	53.57	3.1
300922759	H-NS histone family protein [<i>Escherichia coli</i> MS 182-1]	17.09	13.5
116667444	Chain J, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	10.00	14.4
306815986	hypothetical protein ECNC101_05229 [<i>Escherichia coli</i> NC101]	3.64	38.6
116667456	Chain X, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	35.71	6.2
390676404	cytosol aminopeptidase [<i>Escherichia coli</i> PA5]	5.79	52.8
323939269	ribosomal protein L24 [<i>Escherichia coli</i> E482]	10.20	10.5
Lisa 2			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
312969741	integration host factor, alpha subunit [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	93.94	11.3
15800773	integration host factor subunit beta [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	90.43	10.6
332759234	integration host factor, alpha subunit [<i>Shigella flexneri</i> K-671]	88.04	10.6
215486037	ihfB gene product [<i>Escherichia coli</i> O127:H6 str. E2348/69]	86.17	10.6
15804636	LexA repressor [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	51.98	22.3
378044573	DNA-binding protein fis [<i>Escherichia coli</i> DEC8A]	42.71	10.9
15800564	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	58.08	18.7
15804591	transcriptional regulator HU subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	66.67	9.5
53793970	transcriptional regulator [uncultured bacterium]	73.27	11.3
116667425	Chain P, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	55.13	8.8
266618719	Chain E, Three-Dimensional Em Structure Of An Intact Activator- Dependent Transcription Initiation Complex	83.33	10.1
116667426	Chain Q, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	34.18	9.1
375321667	excinuclease ABC subunit A, partial [<i>Escherichia coli</i> O157:H43 str. T22]	31.30	12.8
388388126	leucyl aminopeptidase, partial [<i>Escherichia coli</i> KD2]	12.04	53.4
323939269	ribosomal protein L24 [<i>Escherichia coli</i> E482]	28.57	10.5

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 2			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
227883805	ribosomal protein L28 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	39.39	7.7
161616465	50S ribosomal protein L4 [<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Paratyphi B str. SPB7]	7.61	21.6
15802584	yohL gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	61.11	10.1
16130123	50S ribosomal subunit protein L25 [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	43.62	10.7
116667427	Chain R, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	43.48	8.2
224510722	Chain U, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	25.49	6.0
197364266	30S ribosomal subunit protein S11 [<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Paratyphi A str. AKU_12601]	14.55	11.7
342362458	methylated-DNA-[protein]-cysteine S-methyltransferase [<i>Escherichia coli</i> XH140A]	28.41	9.6
334359490	Chain W, Structures Of The Bacterial Ribosome In Classical And Hybrid States Of Trna Binding	29.33	8.2
116667450	Chain Q, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	42.45	11.7
116667424	Chain O, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	25.58	9.9
10120659	Chain C, Crystal Structure Of A Complex Between Thioredoxin Reductase, Thioredoxin, And The Nadp+ Analog, Aadp+	34.26	11.7
301050993	repeated sequence found in lipoprotein LPP [<i>Escherichia coli</i> MS 185-1]	32.56	4.3
309787032	DNA-binding protein HU-beta [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	25.88	8.6
383476159	sugar fermentation stimulation protein B [<i>Escherichia coli</i> W26]	30.95	5.1
15803720	RNA-binding protein YhbY [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	9.28	10.8
15801396	minE gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	23.86	10.2
116667412	Chain C, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	5.34	23.0
394398302	ProP expression regulator [<i>Escherichia coli</i> O111:H8 str. CVM9634]	10.93	20.4
116667447	Chain M, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	21.24	12.2
224510720	Chain S, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	13.92	9.0
297521280	electron transport complex protein RnfC [<i>Escherichia coli</i> OP50]	6.59	9.8
315288072	hypothetical protein HMPREF9539_01977 [<i>Escherichia coli</i> MS 110-3]	7.44	13.0
300906263	primosomal protein [<i>Escherichia coli</i> MS 84-1]	3.69	81.6
110807336	DNA-binding transcriptional repressor ArsR [<i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401]	15.38	13.3
116667456	Chain X, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	16.07	6.2
16128218	antitoxin of the YafO-YafN toxin-antitoxin system [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	27.84	11.2
323951267	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase [<i>Escherichia coli</i> H252]	9.26	23.5
194437954	protein ParD [<i>Escherichia coli</i> 101-1]	9.64	9.2
Lisa 3			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
15801465	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	97.08	15.5
297521159	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> OP50]	96.40	12.6
157162119	DNA binding protein, nucleoid-associated [<i>Escherichia coli</i> HS]	76.12	15.3
28373549	Chain A, Solution Structure Of The Oligomerization Domain Of The Bacterial Chromatin-Structuring Protein H-Ns	72.13	7.0

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 3			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
301050505	H-NS histone family protein [<i>Escherichia coli</i> MS 185-1]	67.91	15.3
218701162	DNA binding protein, nucleoid-associated [<i>Escherichia coli</i> IAI39]	76.12	15.4
312973120	DNA-binding protein stpA [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	75.57	15.0
15800564	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	52.10	18.7
313648633	ribosomal protein L11 [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T]	42.86	13.2
15804636	LexA repressor [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	31.68	22.3
297518532	DNA-binding transcriptional regulator AsnC [<i>Escherichia coli</i> OP50]	36.91	16.5
134104519	Chain A, Single Chain Integration Host Factor Protein (SciHf2) In Complex With Dna	29.41	22.8
49258308	Chain A, Crystal Structure Of The E.Coli SeqA Protein Complexed With N6-Methyladenine- Guanine Mismatch Dna	21.74	13.0
110640944	acyl-CoA thioester hydrolase [<i>Escherichia coli</i> 536]	25.37	15.6
297516328	transcriptional regulator HU subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> OP50]	61.90	6.8
197364266	30S ribosomal subunit protein S11 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A str. AKU_12601]	31.82	11.7
297516591	XRE family transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> OP50]	25.86	12.9
377956593	50S ribosomal subunit protein L10, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4E]	33.10	15.3
30749823	Chain A, Protein-Dna Recognition And Dna Deformation Revealed In Crystal Structures Of Cap-Dna Complexes	20.50	22.5
226898	P116 protein	18.97	13.1
115515464	single strand DNA-binding protein [<i>Escherichia coli</i> APEC O1]	18.27	21.2
300815495	ribosomal protein L17 [<i>Escherichia coli</i> MS 107-1]	30.56	12.1
312972426	ribosomal protein L16 [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	24.00	13.9
378106119	nsrR [<i>Escherichia coli</i> DEC10C]	17.05	10.2
33357915	Chain N, Real Space Refined Coordinates Of The 50s Subunit Fitted Into The Low Resolution Cryo-Em Map Of The Ef-G.Gtp State Of <i>E. coli</i> 70s Ribosome	43.86	13.0
390676404	cytosol aminopeptidase [<i>Escherichia coli</i> PA5]	10.33	52.8
116667450	Chain Q, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	28.30	11.7
386703906	tolR gene product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	30.00	11.7
227883805	ribosomal protein L28 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	15.15	7.7
297518838	Holliday junction DNA helicase RuvA [<i>Escherichia coli</i> OP50]	11.88	11.2
229581	protein S8	11.01	12.2
323939269	ribosomal protein L24 [<i>Escherichia coli</i> E482]	10.20	10.5
312966115	creA family protein [<i>Escherichia coli</i> 2362-75]	16.67	15.6
29726212	Chain A, Structure Of Ivy Complexed With Its Target, Hewl	10.37	14.9
116667418	Chain I, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	16.67	14.4
386179450	hypothetical protein EC32608_3451 [<i>Escherichia coli</i> 3.2608]	5.91	23.9
116667449	Chain O, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	14.78	13.2
378044573	DNA-binding protein fis [<i>Escherichia coli</i> DEC8A]	23.96	10.9
15799847	hypothetical protein Z0175 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	7.81	15.1
312973225	rrf2 family protein [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	6.71	15.9
386161183	phage major capsid protein, P2 family [<i>Escherichia coli</i> 1.2264]	3.24	37.0
300917973	conserved hypothetical protein [<i>Escherichia coli</i> MS 115-1]	10.00	10.2
297521927	hypothetical protein EcolOP_30088 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	24.30	12.0
377844592	ribosomal protein L21 [<i>Escherichia coli</i> DEC1B]	21.78	11.5
377943413	ribosomal protein S10, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4E]	24.42	10.0

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 3			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
386175478	hypothetical protein EC970259_0905 [<i>Escherichia coli</i> 99.0741]	1.70	92.1
110641550	glycosyl hydrolase [<i>Escherichia coli</i> 536]	4.37	84.8
Lisa 4			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
33357153	Chain A, Dna Protection And Binding By E. Coli Dps Protein	97.01	18.6
161486272	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	97.01	18.7
315617105	ribosomal protein S5 [<i>Escherichia coli</i> 3431]	74.83	15.8
332765883	iscR transcriptional regulator IscR transcriptional dual regulator [<i>Shigella flexneri</i> 2930-71]	74.50	15.9
15801465	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	55.47	15.5
390676404	cytosol aminopeptidase [<i>Escherichia coli</i> PA5]	21.07	52.8
309787529	lexA repressor [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	60.42	21.2
26246821	hypothetical protein c0931 [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	39.36	21.5
134104426	Chain A, Crystal Structure Of E. Coli Leucine-Responsive Regulatory Protein (Lrp)	64.42	18.7
15803765	50S ribosomal protein L13 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	50.70	16.0
309786266	DNA-binding protein stpA [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	51.69	13.5
345355296	helix-turn-helix domain, rpiR family protein [<i>Escherichia coli</i> 3030-1]	23.53	22.7
383476005	uracil DNA glycosylase family protein [<i>Escherichia coli</i> W26]	36.43	14.5
320199504	LSU ribosomal protein L3p (L3e) [<i>Escherichia coli</i> EC4100B]	27.14	21.2
312972426	ribosomal protein L16 [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	24.00	13.9
16130605	regulatory protein for RecA [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	24.10	19.4
53793916	conjugal transfer ATPase TrbB [uncultured bacterium]	4.39	35.0
378208576	ribosomal L1p/L10e family protein, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC13E]	21.31	12.9
388383402	spermidine N1-acetyltransferase, partial [<i>Escherichia coli</i> KD2]	23.85	12.7
378166894	50S ribosomal protein L5 [<i>Escherichia coli</i> DEC12C]	25.15	18.3
323153122	hypothetical protein ECEPECA14_4964 [<i>Escherichia coli</i> EPECa14]	17.53	16.7
30749823	Chain A, Protein-Dna Recognition And Dna Deformation Revealed In Crystal Structures Of Cap-Dna Complexes	6.00	22.5
378184869	ribosome maturation protein [<i>Escherichia coli</i> DEC13A]	20.00	10.1
378102090	structural transport element [<i>Escherichia coli</i> DEC10A]	20.43	10.4
375323123	integration host factor subunit beta, partial [<i>Escherichia coli</i> O157:H43 str. T22]	52.27	10.0
331661251	beta-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase FabZ [<i>Escherichia coli</i> TA206]	19.51	13.9
115515464	single strand DNA-binding protein [<i>Escherichia coli</i> APEC O1]	12.18	21.2
53793969	ParA equivalent protein [uncultured bacterium]	7.42	38.1
16129529	Qin prophage; predicted regulator for DicB [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	18.52	15.6
227883805	ribosomal protein L28 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	15.15	7.7
383474774	ribonuclease HI [<i>Escherichia coli</i> W26]	32.11	12.6
42992	unnamed protein product [<i>Escherichia coli</i>]	38.10	2.4
224510741	Chain L, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 50s Subunit.	16.08	14.8
378004785	maltodextrin phosphorylase [<i>Escherichia coli</i> DEC6D]	3.03	78.3
91268950	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase I [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	27.96	10.0
345386950	hypothetical protein ECSTECH18_0250 [<i>Escherichia coli</i> STEC_H.1.8]	2.01	40.3
116667426	Chain Q, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	10.13	9.1
377922623	hypothetical protein ECDEC4B_6116, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4B]	17.65	9.4

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 4			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
226898	P116 protein	7.76	13.1
224510743	Chain N, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 50s Subunit.	22.50	13.7
297517034	Holliday junction resolvase [<i>Escherichia coli</i> OP50]	8.89	9.7
345373538	transcription elongation factor greB [<i>Escherichia coli</i> STEC_H.1.8]	11.22	11.8
82407697	Chain B, Nmr Solution Structure Of The E.Coli F-Atpase Delta Subunit N-Terminal Domain In Complex With Alpha Subunit N-Terminal 22 Residues	17.91	14.7
116667439	Chain E, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	14.37	17.8
1633163	Chain A, <i>Escherichia coli</i> Beta-Hydroxydecanoyl Thiol Ester Dehydrase At Ph 5 And 21 Degrees C	10.53	18.8
110642710	hypothetical protein ECP_2550 [<i>Escherichia coli</i> 536]	1.28	123.6
Lisa 5			
GI številka	Opis proteina	odstpek ujemanja	MW (kDa)
15800564	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	82.04	18.7
15801465	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	40.15	15.5
134104519	Chain A, Single Chain Integration Host Factor Protein (SciHf2) In Complex With Dna	33.33	22.8
116667439	Chain E, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	29.94	17.8
51247433	Chain A, Crystal Structure Of Full Length E. Coli Ssb Protein	30.97	12.6
157162119	DNA binding protein, nucleoid-associated [<i>Escherichia coli</i> HS]	45.52	15.3
342162650	single-strand DNA-binding protein [<i>Escherichia coli</i>]	11.30	19.0
15800390	replication initiation regulator SeqA [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	19.89	20.3
309787032	DNA-binding protein HU-beta [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	20.00	8.6
390677865	integration host factor, beta subunit [<i>Escherichia coli</i> PA3]	56.18	10.1
15804591	transcriptional regulator HU subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	41.11	9.5
85544273	Chain B, Coordinates Of The N-Terminal Domain Of Ribosomal Protein L11,C-Terminal Domain Of Ribosomal Protein L7L12 AND A Portion Of The G' Domain Of Elongation Factor G, As Fitted Into Cryo-Em Map Of An <i>Escherichia coli</i> 70sEf- GGdpFusidic Acid Complex	33.82	6.9
15801998	spermidine N1-acetyltransferase [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	16.67	21.9
157831791	Chain A, Solution Structure Of The Lexa Repressor Dna Binding Determined By 1h Nmr Spectroscopy	28.57	9.2
110641048	transcriptional regulator YbjK [<i>Escherichia coli</i> 536]	10.67	20.4
323177001	hypothetical protein ECOK1180_4367 [<i>Escherichia coli</i> OK1180]	13.24	7.7
2098296	Chain A, Catabolite Gene Activator Protein (Cap)DNA COMPLEX + Adenosine-3',5'-Cyclic-Monophosphate	8.61	23.5
Lisa 6			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
15804636	LexA repressor [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	88.12	22.3
15988320	Chain A, Lexa S119a Mutant	88.12	22.3
2098296	Chain A, Catabolite Gene Activator Protein (Cap)DNA COMPLEX + Adenosine-3',5'-Cyclic-Monophosphate	63.64	23.5
386614201	mt gene product [<i>Escherichia coli</i> UMNK88]	63.72	23.5
331683160	ribonuclease T [<i>Escherichia coli</i> H299]	63.72	23.5
146386891	Chain A, Crystal Structure Of <i>Escherichia coli</i> Rnase T	54.42	23.4
15800564	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	65.87	18.7
345376795	holliday junction DNA helicase RuvA [<i>Escherichia coli</i> G58-1]	34.97	19.8
390676404	cytosol aminopeptidase [<i>Escherichia coli</i> PA5]	27.89	52.8

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 6			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
16128663	regulatory protein for replication initiation [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	48.62	20.3
116667439	Chain E, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	56.29	17.8
16129591	DNA glycosylase and apyrimidinic (AP) lyase (endonuclease III) [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	44.55	23.5
15801465	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	49.64	15.5
161616465	50S ribosomal protein L4 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B str. SPB7]	32.49	21.6
297518838	Holliday junction DNA helicase RuvA [<i>Escherichia coli</i> OP50]	31.68	11.2
377959988	uracil phosphoribosyltransferase [<i>Escherichia coli</i> DEC5A]	41.95	18.5
297517724	50S ribosomal protein L1 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	28.35	20.7
331683141	endonuclease III [<i>Escherichia coli</i> H299]	44.55	23.6
15804651	single-stranded DNA-binding protein [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	25.28	18.9
116667412	Chain C, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	28.64	23.0
391301187	putative GTP-binding protein EngB [<i>Escherichia coli</i> EPECa12]	48.99	22.2
300957529	excinuclease ABC subunit A [<i>Escherichia coli</i> MS 175-1]	6.58	102.3
116667444	Chain J, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	10.00	14.4
4377499	glycogen phosphorylase [<i>Escherichia coli</i>]	11.30	34.3
297520068	DNA helicase IV [<i>Escherichia coli</i> OP50]	7.97	66.9
312969893	SIS domain protein [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	17.48	16.0
342162650	single-strand DNA-binding protein [<i>Escherichia coli</i>]	11.30	19.0
312971952	bacterial regulatory s, gntR family protein [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	17.83	26.1
145881	3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase [<i>Escherichia coli</i>]	11.89	25.5
15801998	spermidine N1-acetyltransferase [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	25.81	21.9
297520077	Holliday junction DNA helicase RuvA [<i>Escherichia coli</i> OP50]	35.19	11.5
297517041	DNA-binding transcriptional repressor AcrR [<i>Escherichia coli</i> OP50]	21.77	14.2
300825618	ROK family protein [<i>Escherichia coli</i> MS 119-7]	6.56	27.0
85544273	Chain B, Coordinates Of The N-Terminal Domain Of Ribosomal Protein L11,C-Terminal Domain Of Ribosomal Protein L7L12 AND A Portion Of The G' Domain Of Elongation Factor G, As Fitted Into Cryo-Em Map Of An <i>Escherichia coli</i> 70sEF- GGdpFusidic Acid Complex	17.65	6.9
16128176	ribonuclease HII, degrades RNA of DNA-RNA hybrids [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	25.25	21.5
134104519	Chain A, Single Chain Integration Host Factor Protein (SciHf2) In Complex With Dna	14.71	22.8
297516928	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> OP50]	37.36	9.9
53793969	ParA equivalent protein [uncultured bacterium]	9.34	38.1
345373720	hypothetical protein ECSTech18_4436 [<i>Escherichia coli</i> STEC_H.1.8]	8.50	16.4
378122528	protein chain elongation factor EF-P [<i>Escherichia coli</i> DEC10E]	10.08	13.0
227883805	ribosomal protein L28 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	15.15	7.7
377956593	50S ribosomal subunit protein L10, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4E]	7.75	15.3
297520878	transcriptional regulator HU subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> OP50]	44.83	3.0
224510714	Chain M, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	11.50	12.5
323974774	deoR family protein regulatory protein [<i>Escherichia coli</i> TW10509]	11.11	28.0
300988550	ribosomal protein L9 [<i>Escherichia coli</i> MS 200-1]	9.30	13.6
378166894	50S ribosomal protein L5 [<i>Escherichia coli</i> DEC12C]	17.79	18.3

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 6			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
43011	unnamed protein product [<i>Escherichia coli</i>]	30.86	9.0
312973225	rrf2 family protein [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	14.77	15.9
24158833	Chain B, Structure Of The E. Coli Alpha C-Terminal Domain Of Rna Polymerase In Complex With Cap And Dna	15.48	9.3
386700026	hypothetical protein [<i>Escherichia coli</i> KO11FL]	9.86	8.5
388370408	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase [<i>Escherichia coli</i> O111:H11 str. CVM9545]	5.82	21.3
388360406	putative tail stability protein, partial [<i>Escherichia coli</i> O111:H8 str. CVM9570]	6.98	10.1
297521517	superoxide dismutase [<i>Escherichia coli</i> OP50]	6.43	15.6
386218703	PF10076 family protein [<i>Escherichia coli</i> 4.0967]	7.89	21.2
315617635	surface antigen family protein [<i>Escherichia coli</i> 3431]	2.08	64.8
386203464	site-specific recombinase, phage integrase family [<i>Escherichia coli</i> 5.0959]	5.46	47.1
33357915	Chain N, Real Space Refined Coordinates Of The 50s Subunit Fitted Into The Low Resolution Cryo-Em Map Of The Ef-G.Gtp State Of E. Coli 70s Ribosome	13.16	13.0
297520795	50S ribosomal protein L11 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	18.18	8.1
378097451	adhesin/invasin tibA autotransporter domain protein, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC9D]	3.99	31.1
Lisa 7			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
15804636	LexA repressor [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	88.61	22.3
15988320	Chain A, Lexa S119a Mutant	88.61	22.3
309703726	30S ribosomal subunit protein S3 [<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407]	61.64	25.8
15800564	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	65.87	18.7
16128961	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with TorS [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	54.78	26.2
85544021	Chain A, Crystal Structure Of The Receiver Domain Of Tmao Respiratory System Response Regulator Torr	45.90	13.7
301021164	ribosomal protein S4 [<i>Escherichia coli</i> MS 196-1]	56.44	23.0
15801465	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	68.61	15.5
297517724	50S ribosomal protein L1 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	49.48	20.7
320199504	LSU ribosomal protein L3p (L3e) [<i>Escherichia coli</i> EC4100B]	44.22	21.2
116667439	Chain E, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	47.90	17.8
157155667	endonuclease V [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	40.81	24.7
390676404	cytosol aminopeptidase [<i>Escherichia coli</i> PA5]	25.21	52.8
323152591	helix-turn-helix domain, rpiR family protein [<i>Escherichia coli</i> EPECa14]	26.83	31.7
309786266	DNA-binding protein stpA [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	66.95	13.5
156932236	50S ribosomal protein L2 [<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894]	31.37	27.9
377965496	dpiA-phosphorylated DNA binding transcriptional dual regulator [<i>Escherichia coli</i> DEC5A]	50.23	24.7
309788161	ribosomal protein L32 [<i>Shigella dysenteriae</i> 1617]	48.84	4.9
15801998	spermidine N1-acetyltransferase [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	34.95	21.9
297521415	fumarate/nitrate reduction transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> OP50]	42.95	16.7
386704634	Endonuclease III [<i>Escherichia coli</i> P12b]	35.68	22.4
340732256	DNA-binding transcriptional repressor LldR [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 01-09591]	32.47	21.9
53793969	ParA equivalent protein [uncultured bacterium]	8.24	38.1
134104519	Chain A, Single Chain Integration Host Factor Protein (SciHf2) In Complex With Dna	29.41	22.8
110644405	excinuclease ABC subunit A [<i>Escherichia coli</i> 536]	5.74	103.8
331667213	deoxyribose operon repressor [<i>Escherichia coli</i> TA271]	17.48	16.3

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 7			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
386707236	rpoC gene product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	3.19	151.9
375323123	integration host factor subunit beta, partial [<i>Escherichia coli</i> O157:H43 str. T22]	60.23	10.0
2098296	Chain A, Catabolite Gene Activator Protein (Cap)DNA COMPLEX + Adenosine-3',5'-Cyclic-Monophosphate	23.44	23.5
378145514	bacterial regulatory s, deoR family protein [<i>Escherichia coli</i> DEC11D]	16.33	16.3
312969902	ruvA N terminal domain protein [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	29.91	11.7
161616465	50S ribosomal protein L4 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B str. SPB7]	11.68	21.6
301024666	response regulator receiver domain protein [<i>Escherichia coli</i> MS 196-1]	33.64	25.2
195939852	30S ribosomal protein S5 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4024]	25.00	10.9
15803822	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	20.97	36.5
224195	phosphorylase,maltodextrin	7.20	72.8
293409533	conserved hypothetical protein [<i>Escherichia coli</i> B354]	23.72	25.0
85544273	Chain B, Coordinates Of The N-Terminal Domain Of Ribosomal Protein L11,C-Terminal Domain Of Ribosomal Protein L7L12 AND A Portion Of The G' Domain Of Elongation Factor G, As Fitted Into Cryo-Em Map Of An <i>Escherichia coli</i> 70sEF- GGdpFusidic Acid Complex	17.65	6.9
340732239	putative lyase [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 01-09591]	13.29	19.6
15803828	50S ribosomal protein L15 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	20.14	15.0
251837157	Chain H, Leishmania Tarentolae Mitochondrial Large Ribosomal Subunit Model	23.33	6.6
157156315	GntR family transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	4.78	26.0
16128663	regulatory protein for replication initiation [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	30.39	20.3
335329051	adenylate kinase [<i>Escherichia coli</i>]	10.00	13.2
146386891	Chain A, Crystal Structure Of <i>Escherichia coli</i> Rnase T	30.23	23.4
388400664	DNA topoisomerase I [<i>Escherichia coli</i> 576-1]	15.79	10.9
342926030	galactonate operon transcriptional repressor [<i>Escherichia coli</i> MS 79-10]	27.31	25.8
345384062	purine nucleoside phosphorylase [<i>Escherichia coli</i> G58-1]	9.57	25.0
378166894	50S ribosomal protein L5 [<i>Escherichia coli</i> DEC12C]	33.74	18.3
377955075	ribosomal protein S20 [<i>Escherichia coli</i> DEC5A]	18.33	6.6
313647474	tRNA (guanosine-2'-O-) methyltransferase [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T]	14.56	22.6
297520546	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> OP50]	8.57	18.9
388369183	hypothetical protein ECO9545_07853, partial [<i>Escherichia coli</i> O111:H11 str. CVM9545]	9.02	14.8
227883805	ribosomal protein L28 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	15.15	7.7
377851994	ssDNA-binding protein [<i>Escherichia coli</i> DEC1C]	9.71	11.4
384380873	stringent starvation protein A [<i>Escherichia coli</i> J53]	12.12	11.1
377956593	50S ribosomal subunit protein L10, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4E]	7.75	15.3
15804591	transcriptional regulator HU subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	25.56	9.5
110641728	short chain dehydrogenase [<i>Escherichia coli</i> 536]	16.67	26.3
16129596	pyridoxine 5'-phosphate oxidase [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	30.28	25.5
386700026	hypothetical protein [<i>Escherichia coli</i> KO11FL]	9.86	8.5
386596836	integrase family protein [<i>Escherichia coli</i> DH1]	2.95	50.0
378006035	cytR transcriptional dual regulator [<i>Escherichia coli</i> DEC6E]	4.50	22.2
43011	unnamed protein product [<i>Escherichia coli</i>]	9.88	9.0
391300453	transcriptional regulatory protein dcuR [<i>Escherichia coli</i> EPECa12]	6.43	15.8
116667785	Chain A, Crystal Structure Of The Catalytic Alpha Subunit Of E. Coli Replicative Dna Polymerase Iii	4.14	101.7
45556	TrbA [<i>Escherichia coli</i>]	56.52	2.7
297520795	50S ribosomal protein L11 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	18.18	8.1

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 7			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
16129122	e14 prophage; 5-methylcytosine-specific restriction endonuclease B [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	12.64	31.4
301304193	AraC-type transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> MS 124-1]	9.06	28.6
224510722	Chain U, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	23.53	6.0
224510720	Chain S, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	13.92	9.0
394400290	conjugal transfer protein TraV, partial [<i>Escherichia coli</i> O111:H8 str. CVM9634]	6.80	11.0
146052	g30k, partial [<i>Escherichia coli</i>]	15.28	8.0
386704228	unnamed protein product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	1.27	97.6
340731745	F0F1 ATP synthase subunit gamma [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 01-09591]	7.32	27.7
345363917	phenylacetic acid degradation operon negative regulatory protein PaaX [<i>Escherichia coli</i> STEC_EH250]	7.46	33.1
Lisa 8			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
309703726	30S ribosomal subunit protein S3 [<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407]	74.14	25.8
116667432	Chain 2, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	63.96	23.5
16129125	repressor of blue light-responsive genes [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	67.08	28.2
191166138	DNA protection during starvation protein [<i>Escherichia coli</i> B7A]	83.23	18.7
15803909	ompR gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	71.13	27.3
293414430	HTH-type transcriptional regulator ycgE [<i>Escherichia coli</i> B185]	58.02	28.3
91210371	transcriptional regulator YcgE [<i>Escherichia coli</i> UTI89]	58.02	28.2
331651074	ribosomal protein S2 [<i>Escherichia coli</i> M718]	53.92	34.3
15804636	LexA repressor [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	67.82	22.3
15988320	Chain A, Lexa S119a Mutant	67.82	22.3
188491959	transcriptional regulator, DeoR family [<i>Escherichia coli</i> 53638]	42.75	27.4
297521415	fumarate/nitrate reduction transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> OP50]	43.62	16.7
16130712	DNA-binding transcriptional activator [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	45.68	27.3
157159078	GntR family transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	52.42	28.2
390676404	cytosol aminopeptidase [<i>Escherichia coli</i> PA5]	45.25	52.8
300957529	excinuclease ABC subunit A [<i>Escherichia coli</i> MS 175-1]	13.16	102.3
15801465	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	49.64	15.5
377998389	proP effector [<i>Escherichia coli</i> DEC6C]	56.19	25.2
170680846	transcriptional regulator AllR [<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5]	25.39	27.6
331667213	deoxyribose operon repressor [<i>Escherichia coli</i> TA271]	24.48	16.3
15799830	sfsA gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	37.18	26.2
116667439	Chain E, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	61.08	17.8
16128257	CP4-6 prophage; predicted DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	26.19	27.8
390636214	HTH-type transcriptional regulator μ laR [<i>Escherichia coli</i> FRIK1996]	40.52	25.4
53793969	ParA equivalent protein [uncultured bacterium]	21.70	38.1
157157818	GntR family transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	35.59	26.9
16130614	DNA-binding transcriptional repressor [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	26.85	28.2
20664287	Chain A, Crystal Structure Of The Maltodextrin Phosphorylase Complexed With Glucose-1-Phosphate	13.82	90.4
332749559	sensory box protein [<i>Shigella flexneri</i> K-671]	30.70	25.5

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 8			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
300917249	glycerol-3-phosphate regulon repressor [<i>Escherichia coli</i> MS 115-1]	33.33	29.5
2098296	Chain A, Catabolite Gene Activator Protein (Cap)DNA COMPLEX + Adenosine-3',5'-Cyclic-Monophosphate	31.58	23.5
157155159	DNA-binding transcriptional regulator FriR [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	28.40	27.8
340732256	DNA-binding transcriptional repressor LldR [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 01-09591]	36.60	21.9
313648633	ribosomal protein L11 [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T]	42.86	13.2
315618491	tyrosine recombinase XerC [<i>Escherichia coli</i> 3431]	28.01	31.9
157160209	DNA-binding transcriptional repressor MngR [<i>Escherichia coli</i> HS]	40.42	28.2
15804502	cpxR gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	27.59	26.3
384378897	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> J53]	29.29	26.4
386596836	integrase family protein [<i>Escherichia coli</i> DH1]	9.75	50.0
1122858	TorR [<i>Escherichia coli</i> K-12]	23.04	26.2
15804577	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	3.80	150.5
15800390	replication initiation regulator SeqA [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	20.99	20.3
134104519	Chain A, Single Chain Integration Host Factor Protein (SciHf2) In Complex With Dna	24.51	22.8
881368	YebK, partial [<i>Escherichia coli</i>]	15.87	23.1
146386891	Chain A, Crystal Structure Of <i>Escherichia coli</i> Rnase T	11.63	23.4
52697942	aerobic respiratory control protein [<i>Shigella sonnei</i>]	35.22	18.3
71042520	Chain A, Structure Of The <i>E. coli</i> Parc C-Terminal Domain	10.16	27.5
224510741	Chain L, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 50s Subunit.	18.18	14.8
377943339	ribosomal L10 family protein, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4E]	26.13	12.0
300988550	ribosomal protein L9 [<i>Escherichia coli</i> MS 200-1]	24.81	13.6
15802039	oriC-binding nucleoid-associated protein [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	39.44	8.4
161616465	50S ribosomal protein L4 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B str. SPB7]	11.68	21.6
15801998	spermidine N1-acetyltransferase [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	13.98	21.9
388415868	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit, partial [<i>Escherichia coli</i> HM605]	5.13	26.3
21730426	Chain A, Crystal Structure Of <i>E.coli</i> Formamidopyrimidine-Dna Glycosylase (Fpg) Covalently Trapped With Dna	18.66	30.1
16130533	heat shock protein [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	14.21	21.8
386706539	rpsD gene product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	28.90	19.6
110642723	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> 536]	9.93	30.7
375323123	integration host factor subunit beta, partial [<i>Escherichia coli</i> O157:H43 str. T22]	39.77	10.0
156932236	50S ribosomal protein L2 [<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894]	16.86	27.9
195939852	30S ribosomal protein S5 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4024]	11.54	10.9
386704634	Endonuclease III [<i>Escherichia coli</i> P12b]	22.61	22.4
378124325	glpR transcriptional repressor [<i>Escherichia coli</i> DEC10E]	12.86	26.2
225733897	Chain A, Solution Structure Of E.Coli Slyd	5.26	18.8
157874482	Chain A, E.Coli Cofactor-Dependent Phosphoglycerate Mutase	13.65	28.4
388402268	glucan biosynthesis protein G, partial [<i>Escherichia coli</i> 576-1]	15.14	43.5
315616858	glutamine amidotransferases class-II family protein [<i>Escherichia coli</i> 3431]	17.27	28.0
312969902	ruvA N terminal domain protein [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	29.91	11.7
42992	unnamed protein product [<i>Escherichia coli</i>]	38.10	2.4
312972426	ribosomal protein L16 [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	12.80	13.9
227883805	ribosomal protein L28 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	15.15	7.7
41255	unnamed protein product [<i>Escherichia coli</i>]	80.00	1.7
394422943	elongation factor Tu, partial [<i>Escherichia coli</i> O26:H11 str. CVM9952]	9.24	13.1

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 8			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
301304193	AraC-type transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> MS 124-1]	7.09	28.6
116667456	Chain X, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	16.07	6.2
386706551	rplE gene product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	17.86	9.8
224510722	Chain U, Ternary Complex-Bound <i>E. coli</i> 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	60.78	6.0
224510728	Chain G, Ternary Complex-Bound <i>E. coli</i> 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	16.00	16.7
227885424	possible 30s ribosomal protein S6 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	9.21	8.5
300924454	transcriptional regulator, TetR family [<i>Escherichia coli</i> MS 182-1]	11.76	9.5
377943413	ribosomal protein S10, partial [<i>Escherichia coli</i> DEC4E]	11.63	10.0
320199504	LSU ribosomal protein L3p (L3e) [<i>Escherichia coli</i> EC4100B]	8.04	21.2
297521448	50S ribosomal protein L33 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	53.57	3.1
34811531	Chain C, Crystal Structure Of A Streptomycin Dependent Ribosome From <i>E. coli</i> , 30s Subunit Of 70s Ribosome. This File, 1pns, Contains The 30s Subunit, Two Trnas, And One Mma Molecule. The 50s Ribosomal Subunit Is In File 1pnu.	7.77	22.8
375320449	cell division protein MukB, partial [<i>Escherichia coli</i> O157:H43 str. T22]	2.58	119.7
341921781	hypothetical protein C22711_5411 [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. C227-11]	26.42	5.6
116667426	Chain Q, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	17.72	9.1
195935480	putative glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4024]	7.69	9.5
378006035	cytR transcriptional dual regulator [<i>Escherichia coli</i> DEC6E]	4.50	22.2
323173952	ribosomal protein S19 family protein [<i>Escherichia coli</i> LT-68]	17.39	5.2
226898	P116 protein	7.76	13.1
323963263	AraC family protein regulatory helix-turn-helix domain-containing protein [<i>Escherichia coli</i> H489]	3.60	29.1
110590832	Chain A, Solution Structure Of <i>E. coli</i> Sdia1-171	7.02	20.4
373246379	transcriptional regulator nanR [<i>Escherichia coli</i> 4_1_47FAA]	7.86	25.7
378122528	protein chain elongation factor EF-P [<i>Escherichia coli</i> DEC10E]	10.08	13.0
300815495	ribosomal protein L17 [<i>Escherichia coli</i> MS 107-1]	9.26	12.1
157834332	Chain A, C-Terminal Domain Of <i>Escherichia coli</i> Topoisomerase I	6.56	13.8
386212990	toprim domain protein [<i>Escherichia coli</i> 9.0111]	5.92	40.8
297516912	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase [<i>Escherichia coli</i> OP50]	6.20	28.0
41768	HU-2 protein [<i>Escherichia coli</i>]	35.71	3.0
161486258	DNA helicase IV [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	3.22	78.0
145292	AppY protein [<i>Escherichia coli</i>]	5.35	28.0
33357915	Chain N, Real Space Refined Coordinates Of The 50s Subunit Fitted Into The Low Resolution Cryo-Em Map Of The Ef-G.Gtp State Of <i>E. coli</i> 70s Ribosome	13.16	13.0
320661566	nickel transporter permease NikC [<i>Escherichia coli</i> O55:H7 str. USDA 5905]	13.00	30.3
388415372	phosphotransfer intermediate protein in two-component regulatory system with RcsBC, partial [<i>Escherichia coli</i> 576-1]	27.03	4.2
110640735	adenylate kinase [<i>Escherichia coli</i> 536]	9.81	23.5
15803765	50S ribosomal protein L13 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	25.35	16.0
134047133	conjugal transfer mating pair stabilization protein TraN [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL254]	0.97	101.0
218555133	hypothetical protein ECIAI1_2663 [<i>Escherichia coli</i> IA11]	3.83	25.2
386213352	type I secretion system ATPase [<i>Escherichia coli</i> 9.0111]	2.11	78.9
371595889	hypothetical protein ESQG_02244 [<i>Escherichia coli</i> H494]	5.08	27.4
377937426	ATP synthase F1, gamma subunit [<i>Escherichia coli</i> DEC4D]	4.68	18.6
371599482	putA protein [<i>Escherichia coli</i> TA124]	1.14	143.6

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 8			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
340732448	dipeptide transporter ATP-binding subunit [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 01-09591]	10.87	10.1
Lisa 9			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
345371124	glycerol-3-phosphate regulon repressor [<i>Escherichia coli</i> G58-1]	61.30	25.6
53793969	ParA equivalent protein [uncultured bacterium]	41.48	38.1
377998389	proP effector [<i>Escherichia coli</i> DEC6C]	67.70	25.2
90111660	predicted DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	55.94	28.5
110641042	DNA-binding transcriptional repressor DeoR [<i>Escherichia coli</i> 536]	36.51	28.5
297517986	putative solute/DNA competence effector [<i>Escherichia coli</i> OP50]	59.05	25.8
15804470	yihW gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	55.39	29.5
15800564	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	58.68	18.7
15804636	LexA repressor [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	68.81	22.3
390676404	cytosol aminopeptidase [<i>Escherichia coli</i> PA5]	35.54	52.8
309703726	30S ribosomal subunit protein S3 [<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407]	52.16	25.8
188491959	transcriptional regulator, DeoR family [<i>Escherichia coli</i> 53638]	30.98	27.4
15802966	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase I [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	40.14	31.4
116667439	Chain E, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	48.50	17.8
21730426	Chain A, Crystal Structure Of <i>E. coli</i> Formamidopyrimidine-Dna Glycosylase (Fpg) Covalently Trapped With Dna	47.76	30.1
170680846	transcriptional regulator AIIR [<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5]	29.69	27.6
16130614	DNA-binding transcriptional repressor [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	35.41	28.2
16129125	repressor of blue light-responsive genes [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655]	47.74	28.2
315616858	glutamine amidotransferases class-II family protein [<i>Escherichia coli</i> 3431]	46.99	28.0
300957529	excinuclease ABC subunit A [<i>Escherichia coli</i> MS 175-1]	14.13	102.3
297517724	50S ribosomal protein L1 [<i>Escherichia coli</i> OP50]	43.81	20.7
388363124	DNA-binding transcriptional repressor DeoR [<i>Escherichia coli</i> O111:H8 str. CVM9570]	25.25	22.9
323972056	ROK family protein [<i>Escherichia coli</i> TA007]	34.09	34.2
15801465	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	49.64	15.5
110642723	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> 536]	28.37	30.7
881368	YebK, partial [<i>Escherichia coli</i>]	33.65	23.1
297521415	fumarate/nitrate reduction transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> OP50]	42.95	16.7
224195	phosphorylase, maltodextrin	12.36	72.8
331647749	regulatory protein, GntR family [<i>Escherichia coli</i> M605]	52.42	28.3
2098296	Chain A, Catabolite Gene Activator Protein (Cap)DNA COMPLEX + Adenosine-3',5'-Cyclic-Monophosphate	24.40	23.5
218690166	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> ED1a]	46.77	28.3
110643212	DNA-binding transcriptional regulator GlcC [<i>Escherichia coli</i> 536]	28.74	28.8
345368946	primosomal protein N' [<i>Escherichia coli</i> G58-1]	24.18	41.4
224510723	Chain B, Ternary Complex-Bound <i>E. coli</i> 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	27.06	24.2
386704498	ydjF gene product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	35.83	26.9
300988550	ribosomal protein L9 [<i>Escherichia coli</i> MS 200-1]	25.58	13.6
5107487	Chain A, Structure Of <i>Escherichia coli</i> Rna Polymerase Alpha Subunit N-Terminal Domain	24.26	25.9
388402268	glucan biosynthesis protein G, partial [<i>Escherichia coli</i> 576-1]	17.49	43.5

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 9			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
15800390	replication initiation regulator SeqA [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	29.28	20.3
297521463	enoyl-(acyl carrier protein) reductase [<i>Escherichia coli</i> OP50]	25.20	26.5
315618491	tyrosine recombinase XerC [<i>Escherichia coli</i> 3431]	11.35	31.9
227883805	ribosomal protein L28 [<i>Escherichia coli</i> 83972]	27.27	7.7
157155159	DNA-binding transcriptional regulator FrIR [<i>Escherichia coli</i> E24377A]	15.64	27.8
116667426	Chain Q, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	34.18	9.1
134104519	Chain A, Single Chain Integration Host Factor Protein (SciHf2) In Complex With Dna	14.71	22.8
312972426	ribosomal protein L16 [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	24.00	13.9
320089959	Chain A, The Structure Of The Dimeric E.Coli Mind-Atp Complex	10.38	28.4
390636214	HTH-type transcriptional regulator μ laR [<i>Escherichia coli</i> FR1K1996]	17.67	25.4
384378897	putative DNA-binding transcriptional regulator [<i>Escherichia coli</i> J53]	29.29	26.4
386706539	rpsD gene product [<i>Escherichia coli</i> P12b]	9.25	19.6
373243814	zinc import ATP-binding protein ZnuC [<i>Escherichia coli</i> 4_1_47FAA]	24.04	11.4
344192585	single-stranded DNA-binding protein [<i>Escherichia coli</i> XH001]	12.36	18.9
297519550	transcriptional repressor IclR [<i>Escherichia coli</i> OP50]	9.76	13.2
161616465	50S ribosomal protein L4 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B str. SPB7]	19.29	21.6
386596836	integrase family protein [<i>Escherichia coli</i> DH1]	7.03	50.0
15804423	uridine phosphorylase [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	12.25	27.1
297520878	transcriptional regulator HU subunit alpha [<i>Escherichia coli</i> OP50]	44.83	3.0
388383402	spermidine N1-acetyltransferase, partial [<i>Escherichia coli</i> KD2]	11.01	12.7
375322483	putative DNA-binding transcriptional regulator, partial [<i>Escherichia coli</i> O157:H43 str. T22]	9.73	12.4
224510722	Chain U, Ternary Complex-Bound E.Coli 70s Ribosome. This Entry Consists Of The 30s Subunit, Trnas And The Ternary Complex.	35.29	6.0
15803327	DNA-binding transcriptional activator FucR [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	20.58	27.3
195939852	30S ribosomal protein S5 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4024]	11.54	10.9
53793913	transcriptional repressor protein [uncultured bacterium]	2.36	43.7
116667444	Chain J, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	10.00	14.4
313648633	ribosomal protein L11 [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T]	26.19	13.2
320199504	LSU ribosomal protein L3p (L3e) [<i>Escherichia coli</i> EC4100B]	8.04	21.2
312969902	ruvA N terminal domain protein [<i>Escherichia coli</i> 1827-70]	29.91	11.7
116667435	Chain A, Structure Of The 50s Subunit Of A Pre-Translocational <i>E. coli</i> Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	9.69	24.6
218555133	hypothetical protein ECIAI1_2663 [<i>Escherichia coli</i> IA11]	3.83	25.2
378078725	hypothetical protein ECDEC9A_1411 [<i>Escherichia coli</i> DEC9A]	22.50	4.6
331653020	putative cytoplasmic protein [<i>Escherichia coli</i> M718]	27.27	3.8
340732256	DNA-binding transcriptional repressor LldR [<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 01-09591]	5.67	21.9
373247185	ribosomal RNA small subunit methyltransferase E [<i>Escherichia coli</i> 4_1_47FAA]	12.22	9.8
388357984	hypothetical protein ECO9570_18666, partial [<i>Escherichia coli</i> O111:H8 str. CVM9570]	26.58	9.0
42992	unnamed protein product [<i>Escherichia coli</i>]	38.10	2.4
237704268	pyruvate dehydrogenase complex repressor [<i>Escherichia</i> sp. 3_2_53FAA]	20.75	30.6
195935480	putative glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4024]	7.69	9.5
293406777	LOW QUALITY PROTEIN: rpsO [<i>Escherichia coli</i> FVEC1412]	10.14	8.2

se nadaljuje

nadaljevanje

Lisa 9			
GI številka	Opis proteina	% ujemanja	MW (kDa)
334359490	Chain W, Structures Of The Bacterial Ribosome In Classical And Hybrid States Of Trna Binding	32.00	8.2
323155567	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit [<i>Escherichia coli</i> EPECa14]	2.84	105.4
323970831	deoxyribose-phosphate aldolase [<i>Escherichia coli</i> TA007]	12.24	10.4
33357915	Chain N, Real Space Refined Coordinates Of The 50s Subunit Fitted Into The Low Resolution Cryo-Em Map Of The Ef-G.Gtp State Of <i>E. coli</i> 70s Ribosome	13.16	13.0
377859025	hypothetical protein ECDEC1E_3596 [<i>Escherichia coli</i> DEC1E]	15.91	4.8
15803334	ygdL gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	9.70	28.5
297518568	cold shock protein CspE [<i>Escherichia coli</i> OP50]	38.71	3.5
378122528	protein chain elongation factor EF-P [<i>Escherichia coli</i> DEC10E]	10.08	13.0
388415372	phosphotransfer intermediate protein in two-component regulatory system with RcsBC, partial [<i>Escherichia coli</i> 576-1]	27.03	4.2
373246379	transcriptional regulator nanR [<i>Escherichia coli</i> 4_1_47FAA]	14.85	25.7
15803909	ompR gene product [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933]	15.48	27.3
300926195	PBS lyase HEAT-like repeat protein [<i>Escherichia coli</i> MS 182-1]	9.92	28.8
15803765	50S ribosomal protein L13 [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933]	20.42	16.0
249676	multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease, McrC=fraction IV protein [<i>Escherichia coli</i> , K-12, Peptide Plasmid Partial, 13 aa]	92.31	1.5
331669939	outer membrane protein TolC [<i>Escherichia coli</i> TA271]	3.04	53.7