

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja ĐAPA

**IDENTIFIKACIJA NEPOZNANIH PROTEINOV, KI
URAVNAVAJO ODZIV SOS BAKTERIJE
*Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja ĐAPA

**IDENTIFIKACIJA NEPOZNANIH PROTEINOV, KI URAVNAVAJO
ODZIV SOS BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF UNKNOWN PROTEINS, WHICH REGULATE
THE SOS RESPONSE OF BACTERIA *Escherichia coli***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

POPRAVKI:

Sapere audē – drzni si biti moder ...

(Horace)

... ***sapere gracie*** – drzni si biti nor.

(3 Gracije)

V življenju je potrebno oboje.

Dapa T. Identifikacija nepoznanih proteinov, ki uravnavajo odziv SOS bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur-Bertok, za somentorja asist. dr. Mateja Butala in za recenzentko doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentor: asist. dr. Matej Butala

Recenzentka: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: Prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: Dr. Matej Butala

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Đapa

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

SD	Dn
DK	UDK 579.25:577.112(043)=163.6
KG	genetika mikroorganizmov/ <i>Escherichia coli</i> /poškodbe DNA/odziv SOS/LexA/proteini/identifikacija proteinov/uravnavanja odziva SOS
AV	ĐAPA, Tanja
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/BUTALA, Matej (somentor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	IDENTIFIKACIJA NEPOZNANIH PROTEINOV, KI URAVNAVVAJO ODZIV SOS BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 65 str., 3 pregl., 36 sl., 142 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Repressor LexA je glavni regulator odziva SOS bakterije <i>Escherichia coli</i> . Odziv se sproži ob poškodbah DNA. Slednje zazna aktivator odziva SOS, RecA. Informacijo o poškodovani DNA posreduje represorju LexA, kar sproži proteolitsko samocepitev represorja. Derepresija omogoči prepis genov odziva SOS. Geni se prepisujo v točno določenem časovnem zaporedju. Eden izmed zadnjih genov, ki se prepiše, je gen <i>cka</i> za kolicin K. Njegova sinteza vodi v celično smrt, zato ekspresijo <i>cka</i> uravnavata 2 dimera LexA. V diplomskem delu smo želeli dokazati, da represor LexA ni edini regulator v odzivu SOS, ki vpliva na pozno izražanje genov za kolicine. Ugotovili smo, da je najverjetnejši, od LexA neodvisni, dodatni regulator izražanja gena <i>cka</i> , protein OxyR. Poleg tega smo želeli dokazati, da se med odzivom SOS, kromosom veže z mestom <i>oriC</i> in s pomočjo RecA na membranski protein YdjM. Da bi to dokazali, smo uporabili svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.25:577.112(043)=163.6
CX genetics of microorganisms/*Escherichia coli*/DNA damage/response
SOS/LexA/proteins/identification of proteins/regulate SOS response
AU ĐAPA, Tanja
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/BUTALA, Matej (co-advisor)/ HERZOG
VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2010
TI IDENTIFICATION OF UNKNOWN PROTEIN, WHICH REGULATE THE
SOS RESPONSE OF BACTERIA *Escherichia coli*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 65 p., 3 tab., 36 fig., 142 ref.
LA SI
AL sl/en
AV The LexA repressor of *Escherichia coli* regulates the cellular SOS response induced upon DNA damage. DNA damage is detected by the SOS activator, RecA. After RecA activation repressor LexA is autocatalytically cleaved. Genes of the SOS response are synthesized in a specific time sequence. One of the last expressed genes is *cka*, encoding colicin K. Colicin synthesis leads to cell death and therefore it is regulated by two dimers of repressor LexA. In this graduation thesis we wanted to prove, that LexA is not the only repressor of the SOS response. We discovered that the most probable, LexA independent regulator of the gene *cka*, is the OxyR protein. In addition, we wanted to prove, that during the SOS response, chromosome through the *oriC* binds, with protein RecA, to the membrane protein YdjM. To prove this we used the light and fluorescent microscopy.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNI HIPOTEZI	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZBIRKA Keio SEVOV <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.1 Inaktivacija kromosomskih genov bakterije <i>Escherichia coli</i> z uporabo produktov PCR	2
2.2 ODZIV SOS BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.1 Represor LexA	7
2.2.1.1 Cepitev proteina LexA	8
2.2.1.2 Z RecA sprožena samo-katalitska cepitev LexA	10
2.3 ODZIV NA OKSIDATIVNI STRES PRI BAKTERIJI <i>Escherichia coli</i>	12
2.3.1 Regulon OxyR	14
2.4 LOČITEV SESTRSKIH KROMOSOMSKIH DNA MED CELIČNO DELITVIJO BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>	16
2.4.1 Celična delitev bakterije <i>Escherichia coli</i>	16
2.4.2 Model nukleoidne okluzije	17
2.4.3 Sistem MinCDE	18
2.4.4 Protein FtsZ	19
2.4.5 Podvajanje kromosomske DNA ter ločitev podvojenega kromosoma pri bakteriji <i>Escherichia coli</i>	20
2.4.6 Produkt gena SulA prepreči delitev celic med odzivom SOS	24
2.4.7 Vezava kromosoma na bakterijsko membrano med odzivom SOS	25
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 MATERIALI	26
3.1.1 Plazmidi	26
3.1.2 Začetni oligonukleotidi	26
3.1.3 Bakterijski sevi	27
3.1.4 Kemikalije	28
3.1.5 Oprema	28
3.1.6 Gojišča	29
3.1.6.1 Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)	28
3.1.6.2 Tekoče gojišče z ustreznimi antibiotiki	29
3.1.6.3 Trdno gojišče LB	29
3.1.6.4 Trdno gojišče LB z ustreznimi antibiotiki	30
3.1.6.5 Mehko gojišče LB	30

3.1.6.6	Tekoče gojišče SOB	30
3.1.6.7	Tekoče gojišče SOC	30
3.1.7	Raztopine	30
3.1.7.1	Raztopine za agarozno gelsko elektroforezo	30
3.1.7.2	Raztopine za pripravo kompetentnih celic	30
3.1.7.3	Raztopine za izvedbo beta galaktozidaznega testa	31
3.2	METODE	32
3.2.1	Izolacija plazmidne DNA	32
3.2.2	Agarozna gelska elektroforeza	32
3.2.3	Čiščenje DNA iz agarognega gela	32
3.2.4	Priprava kompetentnih celic	32
3.2.5	Transformacija kompetentnih celic	32
3.2.6	Detekcija fluorescence GFP (Green fluorescent protein) v plazmidu s fuzijo cka-gfp	33
3.2.7	Določanje sinteze kolicinov	33
3.2.8	β – Galaktozidazni test	34
3.2.9	Priprava elektrokompotentnih celic	35
3.2.10	Elektroporacija	35
3.2.11	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	36
3.2.12	Inaktivacija kromosomskih genov bakterije <i>Escherichia coli</i> z uporabo produktov PCR	37
3.2.13	Svetlobna in fluorescenčna mikroskopija	37
4	REZULTATI	38
4.1	IDENTIFIKACIJA DODATNEGA DEJAVNIKA TRANSKRIPCIJE, KI POLEG LexA URNAVNA IZRAŽANJE GENA <i>cka</i>	38
4.2	VPLIV PROTEINA OxyR NA SINTEZO KOLICINOV	41
4.3	β – GALAKTOZIDAZNI TEST	42
4.3.1	Aktivnost promotorja gena <i>cka</i> v sevu divjega tipa in sevu <i>oxyR</i>, ob induciranim odzivu SOS	42
4.3.2	Indukcija z mitomicinom C in vodikovim peroksidom (H_2O_2)	44
4.3.3	Indukcija z vodikovim peroksidom (H_2O_2)	45
4.4	INAKTIVACIJA KROMOSOMSKIH GENOV <i>Escherichia coli</i> Z UPORABO PRODUKTOV PCR	46
4.5	IDENTIFIKACIJA PROTEINA, KI OMOGOČI REORGANIZACIJO KROMOSOMA OB SPROŽITVI ODZIVA SOS	46
4.5.1	Svetlobna mikroskopija	46
4.5.2	Fluorescenčna mikroskopija	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1	IDENTIFIKACIJA PROTEINOV, KI URNAVNAVOJO ODZIV SOS	53
5.1.1	Identifikacija dejavnikov transkripcije, ki uravnavajo prepis genov SOS	53
5.1.2	Vpliv proteina OxyR na izražanje gena <i>cka</i>	54
5.2	IDENTIFIKACIJA DEJAVNIKA, KI OMOGOČI BAKTERIJAM REORGANIZACIJO KROMOSOMA MED ODZIVOM SOS	55
5.3	SKLEPA	56
6	POVZETEK	57
7	VIRI	58
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Plazmidi	26
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi	26
Preglednica 3: Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Inaktivacija kromosomskih genov bakterije <i>Escherichia coli</i> z uporabo produktov PCR (Baba in sod., 2000)	3
Slika 2: Plazmid, ki ima zapis za rekombinazo λ Red (Datsenko in Wanner, 2000)	4
Slika 3: Posredni in neposredni sprožilci odziva SOS (Erill in sod., 2007)	5
Slika 4: Izražanje genske fuzije <i>cka–lacZ</i> ob indukciji z nalidiksično kislino	6
Slika 5: Primarna in sekundarna struktura monomera LexA (Butala in sod., 2009)	7
Slika 6: Predlagana konformacijska sprememba, ki je potrebna za vezavo proteina LexA na DNA (Butala in sod., 2007)	8
Slika 7: Različni konformaciji cepitvene regije represorja LexA in prikaz aktivnega centra (Little, 1991)	9
Slika 8: Prepoznavna mesta za proteazo ClpXP na monomeru LexA (Naher in sod., 2003)	10
Slika 9: Model regulacije odziva SOS bakterije <i>E. coli</i> (Rems, 2009)	11
Slika 10: Mehanizmi poškodb celic zaradi oksidativnega stresa (Storz in Imlay, 1999)	13
Slika 11: Struktura katalitične domene proteina OxyR (Choi in sod., 2001)	15
Slika 12: Prikaz dveh neodvisnih mehanizmov, odgovornih za nastanek septuma na sredini celice bakterije <i>E. coli</i> (Thanbichler, 2009)	17
Slika 13: Sistem MinCDE in mesto za tvorbo septuma pri vegetativnih bakterijah <i>E. coli</i> (Barák in Wilkinson, 2007)	19
Slika 14: Shematski prikaz kromosomske DNA v bakteriji <i>E. coli</i> (Toro in Shapiro, 2010)	20
Slika 15: Podvajanje kromosomske DNA v bakteriji <i>E. coli</i> (Toro in Shapiro, 2010)	21
Slika 16: Vloga od zaporedja KOPS reguliranega prenosa DNA s FtsK in končni koraki ločitve sestrskih kromosomov (Thanbichler, 2009)	23
Slika 17: Model delovanja SulA <i>in vivo</i> (Dajkovic in sod., 2008)	24
Slika 18: Elektronska mikroskopija <i>E. coli</i> (Levin-Zaidman in sod., 2000)	25
Slika 19: Plazmid pKCT1, z operonom za kolicin K ter determinanto za odpornost proti tetraciklinu (Tc^R)	33
Slika 20: Plazmid pRW50, vektor za <i>in vivo</i> preiskave	34
Slika 21: Izražanje promotorja gena <i>cka</i> , spojenega s poročevalskim genom <i>gfp</i> brez lastnega promotorja	40
Slika 22: Občutljivost indikatorskega seva <i>E. coli</i> DH5 α pBR322 na kolicin K	41
Slika 23: Izražanje fuzije <i>cka–lacZ</i> pri indukciji z mitomicinom C (250 μ g/mL)	42
Slika 24: Izražanje fuzije <i>cka–lacZ</i> pri indukciji z mitomicinom C (500 μ g/mL)	43
Slika 25: Izražanje fuzije <i>cka–lacZ</i> pri indukciji z mitomicinom C (500 μ g/mL) in H_2O_2	44
Slika 26: Izražanje fuzije <i>cka–lacZ</i> pri indukciji z vodikovim peroksidom (H_2O_2)	45
Slika 27: Potrditev inaktivacije kromosomskega gena <i>ydjM</i> s kontrolno PCR v sevu RW118	46
Slika 28: Sevi <i>E. coli</i> posneti s svetlobno mikroskopijo, 15 minut po indukciji	47
Slika 29: Sevi <i>E. coli</i> posneti s svetlobno mikroskopijo, 30 minut po indukciji	47
Slika 30: Sevi <i>E. coli</i> posneti s svetlobno mikroskopijo, 60 minut po indukciji	47
Slika 31: Sevi <i>E. coli</i> posneti s svetlobno mikroskopijo, 90 minut po indukciji	48
Slika 32: Sevi <i>E. coli</i> posneti s svetlobno mikroskopijo, 120 minut po indukciji	48
Slika 33: Sevi <i>E. coli</i> posneti s fluorescenčno mikroskopijo, 15 minut po indukciji	49
Slika 34: Sevi <i>E. coli</i> posneti s fluorescenčno mikroskopijo, 30 minut po indukciji	50
Slika 35: Sevi <i>E. coli</i> posneti s fluorescenčno mikroskopijo, 60 minut po indukciji	51
Slika 36: Mikroskopski posnetki seva JW5281, 30 minut po dodatku nalidiksične kisline	52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
bp	bazni par
CFU	kolonije tvorbena enota (ang. »Colony Forming Unit«)
CTD	C-terminalna domena
Cys	cistein
Da	Dalton – enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase izotopa ^{12}C
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
dNTP mix	mešanica deoksiribonukleozid trifosfata
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FLP	rekombinaza flipaza (ang. »Flippase Recombination Enzyme«)
FRT	FLP prepoznavno mesto (ang. »Flippase Recognition Target (FRT) Sites«)
G	gvanin
GFP	zeleni fluorescenčni protein (ang. »Green Fluorescent Protein«)
Gln	glutamin
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
Gojišče LB	gojišče Luria-Bertani
h	ura
His	histidin
kb	kilo baze (število baz $\times 1000$)
Leu	levcin
Lys	lizin
min	minuta
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. »Messenger RNA«)
ms	milisekunda
m/v	razmerje masa / volumen
NaDS	natrijev dodecil sulfat

NTD	N-terminalne domene
OD ₆₀₀	optična gostota (ang. »Optical Density«) pri 600 nm
ONPG	<i>ortho</i> -nitrofenil-β-D-galaktopranosid
ORF	odprt bralni okvir (ang. »Open-Reading Frame«)
<i>oriC</i>	mesto začetka podvajanja (ang. »Origin of Replication«)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. »Polymerase Chain Reaction«)
ROS	reakтивne zvrsti kisika (ang. »Reactive Oxygen Species«)
s	sekunda
Ser	serin
ssDNA	enoverižna DNA (ang. »Single Stranded DNA«)
TBE	tris-boratni elektroforezni pufer
UV	ultravijolično
VIS	vidna svetloba

1 UVOD

1.1 NAMEN DELA

Identifikacija nepoznanih proteinov, ki uravnavajo odziv bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) na poškodbe DNA, imenovan odziv SOS. Uporabiti seve bakterije *E. coli* iz zbirke Keio (Baba in sod., 2006), ter dokazati njihov vpliv na vrstni red izražanja genov in njihovo funkcijo v odzivu SOS.

1.2 DELOVNI HIPOTEZI

- Poleg proteina LexA, dodatni dejavnik transkripcije vpliva na pozno izražanje genov za kolicine. Predpostavljam, da gre za dejavnik transkripcije, ki nastaja predvsem v eksponentni fazì bakterijske rasti.
- Reorganizacijo kromosoma med odzivom SOS omogoči še nepoznani protein membrane, katerega nastajanje utiša protein LexA med normalno rastjo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZBIRKA Keio SEVOV *Escherichia coli*

Zbirko Keio so ustvarili na Japonskem, v okviru projekta funkcionalne genomike, z namenom: (1) ustvariti nove eksperimentalne vire; (2) iznajti nove analitske metode; (3) razviti nove računalniške pristope; (4) izboljšati podatkovne baze ter (5) za analizo genov, metod, pristopov in podatkovnih baz (Mori in sod., 2000). Poleg zbirke Keio, so znotraj istega projekta, ustvarili še dve banki plazmidov *E. coli* K-12 s skoraj vsemi odprtimi bralnimi okvirji (ang. »ORF - Open-Reading Frame«) – zbirko klonov ASKA (ang. »A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive«), (Kitagawa in sod., 2005), ter obširno zbirko transpozonov, ki prekinjajo gene ter tako povzročajo mutacije (Mori in sod., 2000).

V zbirki Keio sevov *E. coli*, je skoraj 4000 sevov, ki imajo okvarjen en, točno določen, neesencialni gen bakterije *E. coli* K-12. Odprte bralne okvirje so nadomestili z geni za odpornost proti kanamicinu, obdanimi s prepoznavnimi mesti FLP. Od vseh 4288 genov *E. coli* so uspeli inaktivirati 3985 (Baba in sod., 2006). Produkti esencialnih genov, katerih niso uspeli inaktivirati, sodelujejo pri translaciji, transkripciji, tvorbi ribosomov, celični biogenezi, celični delitvi, ter metabolizmu lipidov. Primera esencialnih genov sta npr. *rpoE* in *rpoH*, ki kodirata podenote RNA polimeraze - sigma faktorja E in H (Baba in sod., 2006).

V zbirki Keio so kromosomske gene bakterijskega seva *E. coli* K-12 inaktivirali z neposredno enostopenjsko metodo, pri kateri se uporabi produkte PCR (Datsenko in Wanner, 2000). Pri slednji metodi gene v bakterijah inaktiviramo s pomočjo plazmida v majhnem številu kopij, ki ima zapis faga λ za rekombinazo λ Red. Slednji nato sproži rekombinacijo, pri kateri se v kromosom vključujejo produkti PCR (Datsenko in Wanner, 2000). Prednosti metode so, da lahko gene v celoti deletiramo natančno in brez težav. Mutante nato neposredno izoliramo na gojišču z dodatkom antibiotika, saj imajo novonastali sevi determinanto rezistence proti kanamicinu (Km^R) (Baba in sod., 2006).

2.1.1 Inaktivacija kromosomskih genov bakterije *Escherichia coli* z uporabo produktov PCR

Metoda inaktivacije kromosomskih genov bakterije *E. coli* s produkтом PCR je enostavna in visoko učinkovita metoda za delecijo točno določenih genov. Za dosego slednjega se uporabi začetne oligonukleotide, ki imajo na enem delu nukleotidna zaporedja, ki so homologna zaporedjem tarčnega gena, na drugem delu pa zaporedje kanamicinske kasete, obdane s prepoznavnima zaporedjema FRT za FLP. Fagna rekombinaza λ Red omogoči rekombinacijo pomnožka PCR kanamicinske kasete s tarčnim genom. Rekombinaza λ Red je pod kontrolo inducibilnega promotorja v plazmidu, s katerim transformiramo celico in je v majhnem številu kopij v celici (Datsenko in Wanner, 2000).

Z razliko od gliv in nekaterih naravno kompetentnih bakterij, večina bakterij ne more sprejeti linearne DNA, saj ima eksoneukleazo V, encime kompleksa RecBCD, ki ob vstopu linearne dvoverižne DNA v celico sprožijo njeno razgradnjo. Med bakterije s tako aktivnostjo, spada tudi *E. coli* (Lorenz in Wackernagel, 1994). Bakterije z mutiranim

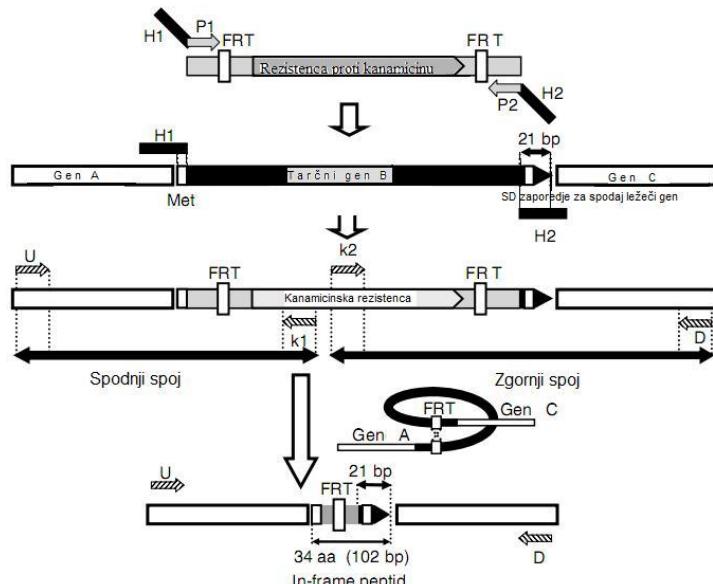
Dapa T. Identifikacija nepoznanih proteinov, ki uravnavajo odziv SOS bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2010

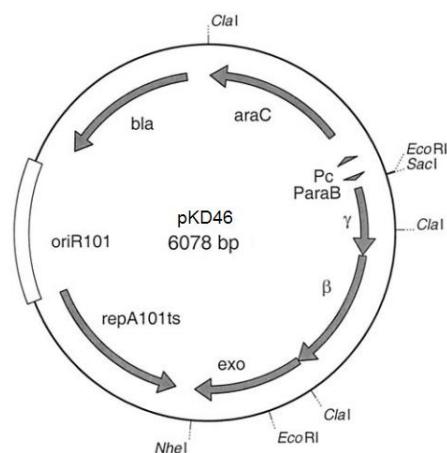
kompleksom RecBCD, so torej sposobne sprejeti tudi linearno DNA (Cosloy in Oishi, 1973). V plazmidu je poleg zapisa za rekombinazo λ Red tudi zapis za sintezo proteina Gam, ki prepreči delovanje RecBCD, torej prepreči razgradnjo dvooverižnih odsekov DNA (Datsenko in Wanner, 2000).

Metoda inaktivacije kromosomskih genov bakterije *E. coli* s produktom PCR temelji na zamenjavi tarčnega kromosomskega gena (Slika 1, gen označen z B) z genom za odpornost proti antibiotiku kanamicinu. Produkt PCR, ki ima gen za odpornost proti kanamicinu, sintetiziramo z uporabo 56 bp dolgih začetnih oligonukleotidov, ki imajo 36 bp dolgo homologijo zaporedja tarčnega gena (Slika 1, H1 in H2) ter 20 bp dolgo zaporedje za pomnožitev kanamicinske kasete (Slika 1, P1 in P2). Gen za antibiotično rezistenco pomnožimo z odseka plazmida pKD4. S plazmidno DNA pKD46 pa transformiramo bakterijo, v kateri želimo inaktivirati kromosomski gen, saj ima zapis za sistem λ Red (Slika 2).

Po selekciji seva z že inaktiviranim tarčnim genom, lahko gen za odpornost proti kanamicinu odstranimo s še eno kopijo plazmidne DNA, preko prepoznavnega mesta FLP z rekombinazo FLP (slika 1). Plazmidno DNA, ki ima sistem λ Red ter rekombinazo FLP odstranimo z inkubacijo kulture pri 37 °C, saj sta oba občutljiva na visoko temperaturo (Datsenko in Wanner, 2000).



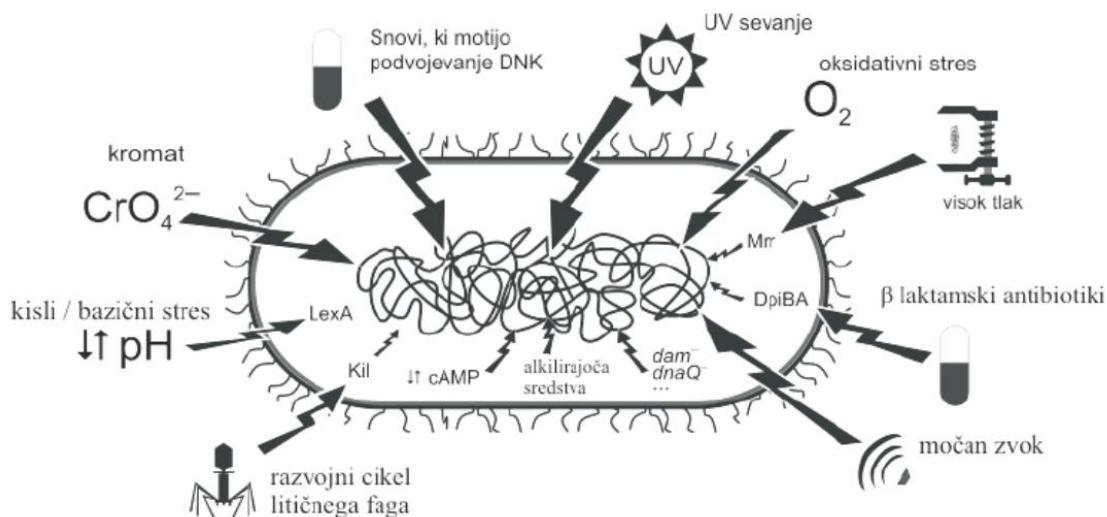
Slika 1: Inaktivacija kromosomskih genov bakterije *Escherichia coli* z uporabo produktov PCR. V prvem koraku s PCR pomnožimo kanamicinsko kaseto, z začetnima oligonukleotida, ki sta komplementarna z 20 bp gena za odpornost proti kanamicinu, ter s 36 bp tarčnega kromosomskega gena, katerega želimo inaktivirati. Dela začetnega oligonukleotida, ki prilegata na kanamicinsko kaseto, sta označena s P1 ter P2, dela, ki nalegata na kromosomski gen pa H1 ter H2. Ko produkt PCR vstavimo v sev, kateremu želimo inaktivirati kromosomski gen, se gen za antibiotično rezistenco, z rekombinacijo usede na tarčni gen B, saj ima 36 bp dolgo homologno zaporedje (H1 in H2). Rezistenčni gen lahko odstranimo s pomočniško plazmidno DNA, ki ima zapis za rekombinazo FLP, ki omogoči rekombinacijo med prepoznavnima mestoma FRT, ki obdajata gen za odpornost proti kanamicinu (Baba in sod., 2000).



Slika 2: Plazmid, ki ima zapis za rekombinazo λ Red. Geni sistema λ Red, γ , β in *exo*, so uravnavani z operonom za razgradnjo arabinoze. Za njihov prepis, smo bakterije, transformirane s pKD46, gojili v prisotnosti L-arabinoze. Za selekcijo transformant ima plazmid pKD46 zapis za odpornost proti antibiotiku ampicilinu (Datsenko in Wanner, 2000).

2.2 ODZIV SOS BAKTERIJE *Escherichia coli*

V sredini sedemdesetih let je Miroslav Radman prvi opisal usklajen odziv bakterijske celice na poškodbe DNA. Odziv je poimenoval odziv SOS (Radman, 1974). Odziv pri bakteriji *E. coli* sprožijo številni posredni ter neposredni dejavniki (Slika 3, Erill in sod., 2007).



Slika 3: Posredni in neposredni sprožilci odziva SOS (Erill in sod., 2007).

Do sedaj znana regulatorja odziva SOS pri bakteriji *E. coli* sta produkta genov *lexA* ter *recA*. Protein LexA je represor, RecA pa aktivator odziva SOS (Little in Mount, 1982).

Tekom rasti bakterije deluje protein LexA kot represor prepisovanja skupine genov, katerih produkti sodelujejo pri preprečitvi celične delitve in popravljanju poškodbe DNA. Protein LexA se veže na promotorska področja genov, vključenih v odziv SOS. Z vezavo LexA sterično onemogoči vezavo od DNA odvisne RNA-polimeraze in tako prepreči začetek prepisovanja genov SOS (Walker, 1984).

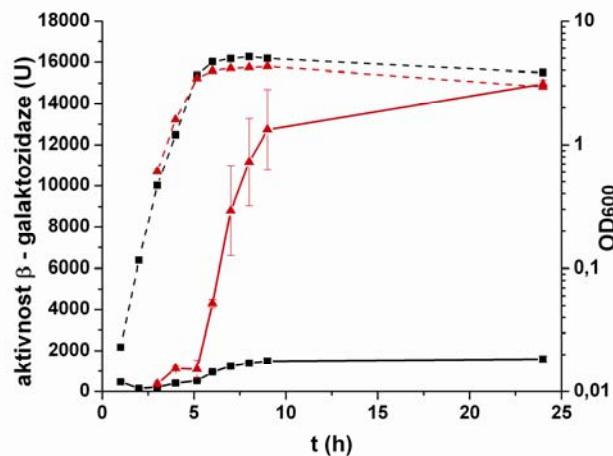
Protein RecA deluje kot senzor odziva SOS. Veže se na enoverižne konce DNA na mestih poškodb DNA. Protein RecA vezan z molekulo ATP, se veže kot filament na enoverižne konce DNA in preide v aktivno obliko, katera sproži samo-katalitsko cepitev proteina LexA. Samo-katalitska cepitev proteina onemogoči vezavo LexA na specifična zaporedja DNA. Slednje privede do aktivacije odziva SOS (Shingawa, 1996).

Derepresija genov, ki so vključeni v odziv SOS, sproži prepisovanje le-teh. Proteini dereprimiranih genov sodelujejo pri popravljanju poškodb DNA in drugih sprememb, ki nastanejo kot posledica poškodovanja DNA. Eden od prvih razlogov za sprožitev odziva SOS je zaustavitev napredovanja podvojevalnih vilic. Najprej pride do prepisovanja skupine genov *recA* in *ssb*, ki zaščitijo in stabilizirajo podvojevalne vilice oz. mesta podvojevanja DNA. Z zamikom se nato prepiše druga skupina genov SOS: *uvrA*, *uvrB*, *ydjQ*, *uvrD* in *recN*. Produkti te skupine genov popravljajo poškodovano DNA z dvema

mehanizmoma: popravljanje DNA z izrezovanjem nukleotidov in popravljanje z rekombinacijo (Walker, 1984). Kasneje v odzivu se prepišejo geni *polB*, *dinB* in *umuDC*. Ti geni imajo zapis za tri alternativne DNA-polimeraze, ki omogočajo napredovanje zaustavljenih podvojevalnih vilic preko poškodb DNA, tudi na račun mutageneze. Na ta način se celica izogne poškodbam, katere popravljalni mehanizmi še niso popravili in bi lahko preprečevale napredovanje podvojevalnih vilic.

Odziv SOS ima pomemben vpliv tudi na celično delitev. V odzivu na stres se kromosom reorganizira, zaščiti ter se s pomočjo proteina RecA pripne na celično membrano. Protein, na katerega se kromosom pripne, je še neznan. Poleg tega se med odzivom SOS sintetizira protein SulA, ki reagira s proteinom FtsZ ter tako prepreči tvorbo septuma. Tako bakterije zaustavijo delitev celice, dokler poškodbe DNA niso odstranjene (Miller in sod., 2004).

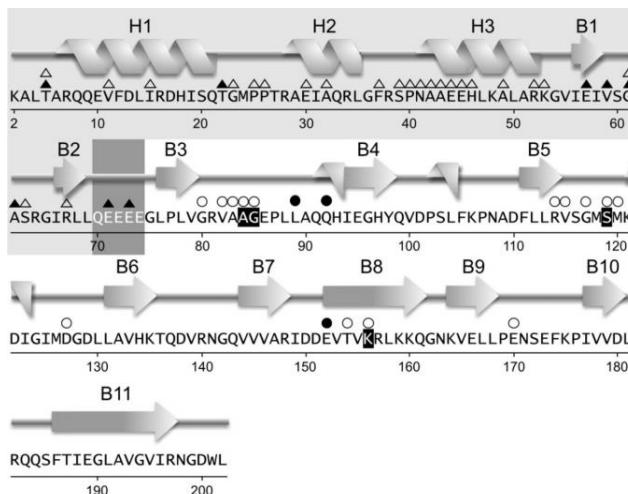
Zadnji so v odzivu SOS prepisani geni za sintezo bakterijskih toksinov, bakteriocinov (pri bakterijski vrsti *E. coli* so to kolicini). Do prepisa slednjih pride po dolgotrajni (nepopravljeni) poškodbi DNA, njihov prepis pa vodi v propad celice, saj se sprostijo ob lizi bakterijske celice. Naravni izolati *E. coli* imajo pogosto zapise za sintezo kolicinov, zato jih tudi zelo pogosto proizvajajo. Opisanih je bilo že več kot 20 vrst bakteriocinov (Riley in Wertz, 2002). Kolicini povečujejo raznovrstnost sevov *E. coli*. Zaradi kolicinov se povečuje število sevov, ki jih proizvajajo, prav tako pa se povečuje število sevov, ki so razvile rezistenco proti njim (Kirkup in Riley, 2004). Kakor drugi geni odziva SOS, so tudi geni za sintezo kolicinov uravnavani z represorjem LexA (Friedberg in sod., 1995). Eden izmed kolicinov je kolin K. Operon kolinina K je iz treh genov: *cka*, gen za kolin K, *cki*, gen za protein imunosti ter *ckl*, gen za protein lize (Pilsl in Braun, 1995), ki omogoči sprostitev kolinina iz celice (Mrak in sod., 2006). Ker produkcija kolinina K vodi v propad celice, ga v stacionarni fazni sintetizira zgolj 3-odstotki populacije (Mulec in sod., 2003). Na Sliki 4 je prikazano izražanje genske fuzije *cka-lacZ* ob sprožitvi odziva SOS.



Slika 4: Izražanje genske fuzije *cka-lacZ* ob indukciji z nalidksično kislino. Na primarni navpični osi je prikazana aktivnost β-galaktozidaze v Millerjevih enotah, na sekundarni optična gostota pri 600 nm. Na vodoravni osi je prikazan čas rasti bakterij v urah. Aktivnost neinducirane kulture je označena s črno, neprekinjeno črto, inducirana pa z rdečo neprekinjeno črto. S prekinjeno črto je prikazana rastna krivulja neinducirane kulture (črna prekinjena črta) in inducirane kulture (prekinjena rdeča črta). Indukcija z nalidksično kislino je bila izvedena pri OD₆₀₀ 0,3. Dve uri po dodatku nalidksične kisline je aktivnost promotorja gena *cka* pri sevu z induciranim odzivom SOS 10× višja, kakor pri neinduciranemu sevu.

2.2.1 Represor LexA

Monomer proteina LexA bakterije *E. coli* (22,4 kDa) je iz dveh strukturno raznolikih domen, N-terminalne domene (NTD) in C-terminalne domene (CTD). Domeni med seboj povezuje hidrofilni povezovalec. Primarna in sekundarna struktura monomera LexA (Little in sod., 1981; Luo in sod., 2001; Hurstel in sod., 1988) sta razvidni iz Slike 5 (Butala in sod., 2009).



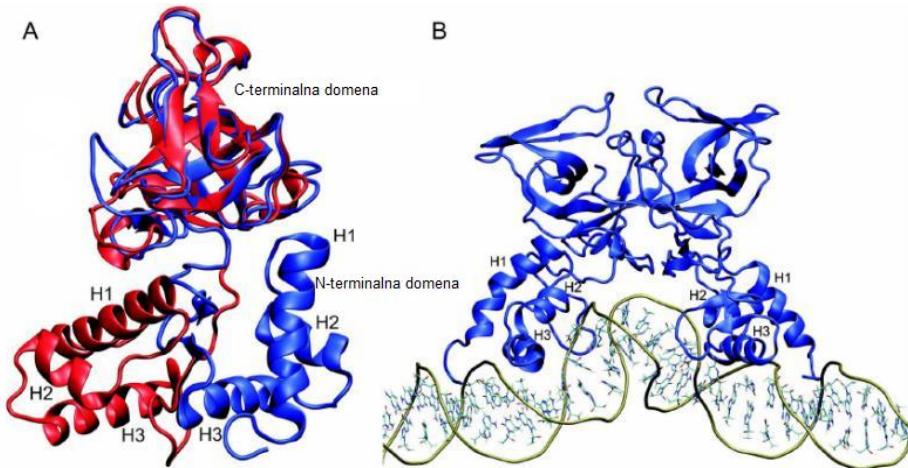
Slika 5: Primarna in sekundarna struktura monomera LexA. Spirale predstavljajo alfa vijačnice, puščice pa beta trakove. NTD je obarvana svetlo sivo, povezovalna regija temno sivo in sledi ji CTD, ki ni obarvana. V črnih okvirčkih so aminokislinski ostanki, ki tvorijo katalitska mesta. Trikotniki nad aminokislinskimi ostanki prikazujejo mesta, ki so odgovorna za interakcijo med DNA ter LexA. Prazni trikotniki prikazujejo mesta, kjer vezava LexA ni mogoča, polni trikotniki pa mesta, kjer je vezava omogočena. Podobno krogi označujejo aminokisline katerih sprememba vodi v preprečitev/pospešitev samo-cepitve (Butala in sod., 2009).

Protein LexA se z NTD, na katerem se nahajajo specifične aminokisline, veže na 16 bp dolgo konsenzno zaporedje CTGTATATATACAG, ki je ohranjeno pri po Gram negativnih bakterijah. Nukleotidno zaporedje vezave LexA se nahaja v bližini ali znotraj promotorja. Protein z vezavo sterično onemogoči vezavo RNA-polimeraze na promotorje genov in tako prepreči njihovo prepisovanje (Walker, 1984; Wade in sod., 2005).

NTD del LexA je iz treh vijačnic alfa z aminokislinskimi ostanki od 1 do 69. Vijačnica I vsebuje ostanke od Ala-6 do Gln-21, vijačnica II od Arg-28 do Leu-35 in vijačnica III od Asn-41 do Arg-52. Sledita jima dva antiparalelna trakova beta (Fogh in sod., 1994). Trakova beta z vijačnicama II in III tvorita motiv vijačnica-obrat-alfa-vijačnica, ki je DNA vezavni motiv in reagira s specifičnim nukleotidnim zaporedjem DNA (Fogh in sod., 1994). Za specifično prepoznavanje zaporedja DNA so odgovorni aminokislinski ostanki, ki se nahajajo v vijačnici III. Vsidrajo se v veliki žleb DNA in tam reagirajo s specifičnimi bazami. Krajsa vijačnica II se uleže vzdolž velikega žleba in reagira s fosfatnim ogrodjem (Knegtel in sod., 1995; Dumoulin in sod., 1995; Thliveris in Mount, 1992).

Model specifično vezanega proteina LexA na DNA predpostavlja, da je za specifično in stabilno vezavo proteina na DNA, potrebna konformacijska sprememba proteina LexA.

Kakor je razvidno iz Slike 6, naj bi prišlo do rotacije NTD glede na CTD (Slika 6, Butala in sod., 2007).

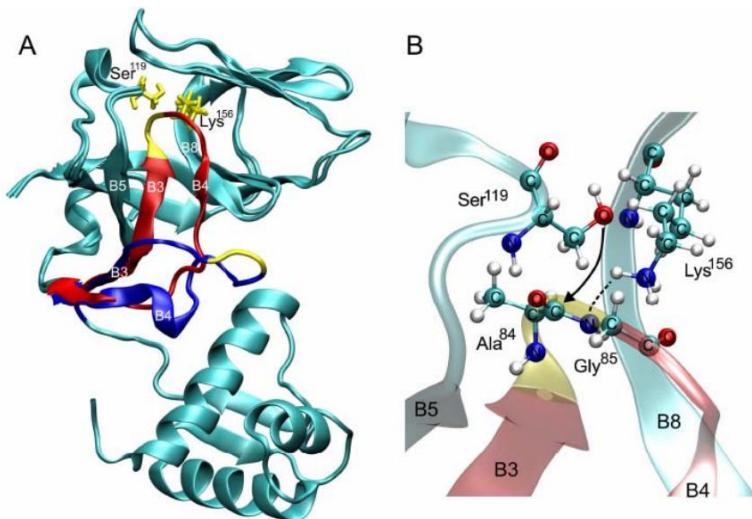


Slika 6: Predlagana konformacijska sprememba, ki je potrebna za vezavo proteina LexA na DNA. **A:** Kristalna struktura monomera LexA. Rdeče je obarvana struktura LexA, nevezanega na DNA (Luo in sod., 2001). Modro je obarvan model strukture LexA, vezanega na DNA (Butala in sod., 2007). **B:** Predlagan model vezanega represorja LexA na operator gena *cka*. Na operatorsko zaporedje *cka* se sicer vežeta dva dimera proteina LexA (Butala in sod., 2007).

2.2.1.1 Cepitev proteina LexA

Inaktivacija proteina LexA sproži prepis genov odziva SOS. V celici sproži samo-katalitsko cepitev LexA aktivni filament RecA*, intramolekularna samo-katalitska cepitev pa lahko *in vitro* poteče tudi spontano, pri visoki vrednosti pH (Little in Mount, 1982; Kim in Little, 1992). Pri intramolekularni samo-katalitski cepitvi se cepi ista vez kot pri sproženi cepitvi z RecA. Do take cepitve pride lahko ob prisotnosti EDTA ali ionov Ca^{2+} , Co^{2+} ali Mg^{2+} . Hitrost cepitve je višja v primerih, ko so prisotni ioni, je pa neodvisna od koncentracije proteina LexA (Little, 1983). Posledica intramolekularne samo-katalitske cepitve LexA je ločitev NTD od CTD, kar za 10- do 1000- krat zmanjša moč vezave LexA na DNA (Little in Mount, 1982; Kim in Little, 1992).

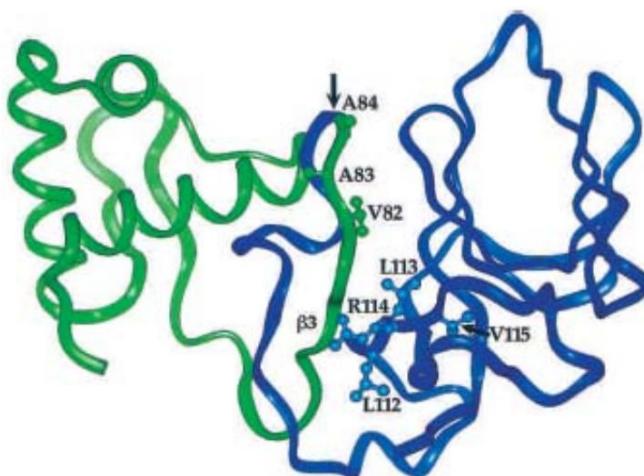
Aktivno mesto za cepitev proteina LexA je v njegovi CTD. Glavna aminokislinska ostanka, ki tvorita katalitsko jedro za njegovo cepitev, sta Ser-119 ter Lys-156. Ostanka Ser-Lys sprožita cepitev vezi med Ala-84 in Gli-85. Aminokislinska ostanka Ala-84 ter Gly-85 sta v zanki, zaradi česar je C-terminalni del proteina LexA obstojen v dveh konformacijskih oblikah, cepitveno zmožni in cepitveno nezmožni konformaciji. Pri cepitveno zmožni obliki je zanka izpostavljena katalitskemu jedru oz. ostankoma Ser-Lys, pri cepitveno nezmožni pa je zanka obrnjena v nasprotno smer, stran od katalitskega jedra (Slika 7). Poleg tega je v cepitveno nezmožni konformaciji Lys-156 zakrit v strukturi proteina in se nahaja v okolju, kjer pozitivni naboj aminokislinskega ostanka ni stabilen (Luo in sod., 2001).



Slika 7: Različni konformaciji cepitvene regije represorja LexA in prikaz aktivnega centra. **A:** Kristalna struktura monomera LexA. CTD je v cepitveno nezmožni konformaciji (cepitvena regija je obarvana modro). Prekrita je s CTD, ki je v cepitveno zmožni konformaciji (cepitvena regija je obarvana rdeče) (Luo in sod., 2001). **B:** Predlagan model samo-katalitske cepitve LexA. Prikazana sta katalitska ostanka Ser-119 in Lys-156, ter mesto cepitve Ala-84 in Gly-85. Nevtralna baza Lys-156 aktivira Ser-119. Hidroksilna skupina aktiviranega Ser-119 deluje kot nukleofil in napade vez med Ala-84 in Gly-85 (črna puščica). Sledi prenos protona k novo nastali aminokislini, ki je prikazan s prekinjeno črto (Little, 1991).

Intramolekularna samo-katalitska cepitev proteina LexA poteče le v primerih, ko je vrednost pH visoka, zato je za cepitev LexA potrebna deprotonacija Lys-156. Po modelu, ki so ga leta 1992 predlagali Roland in sod., deprotonacija povzroči konformacijsko spremembo LexA iz protonirane v deprotonirano konformacijo. Pri vrednosti pH 7 ima le približno 0,01-odstotkov molekul proteina LexA C-terminalno domeno v cepitveno zmožni, deprotonirani, konformaciji, ostale molekule pa imajo CTD v cepitveno nezmožni konformaciji. Dokazov, o obstoju protonirane in deprotonirane konformacije ni, zato se smatra, da gre za enaki strukturi (protonirana konformacija je enaka cepitveno nezmožni ter deprotonirana cepitveno zmožni konformaciji).

Po cepitvi proteina LexA pride do izpostavitve določenih aminokislinskih regij, ki so bila prej skrita. Slednja zaporedja nato prepoznajo celične proteaze, ki razgradijo produkte cepitve LexA. To je pomembno zato, da se DNA-vezavne regije NTD razgradijo in ne kopijo v celici, kjer bi lahko utišale odziv SOS. Proteaza bakterije *E. coli* ClpXP razgradi tako NTD kot CTD. Razpolovna doba za obe domeni je manj kot 4 minute, zaradi česar razgradnja poteče zelo hitro (Kim in Little, 1992; Neher in sod., 2003).

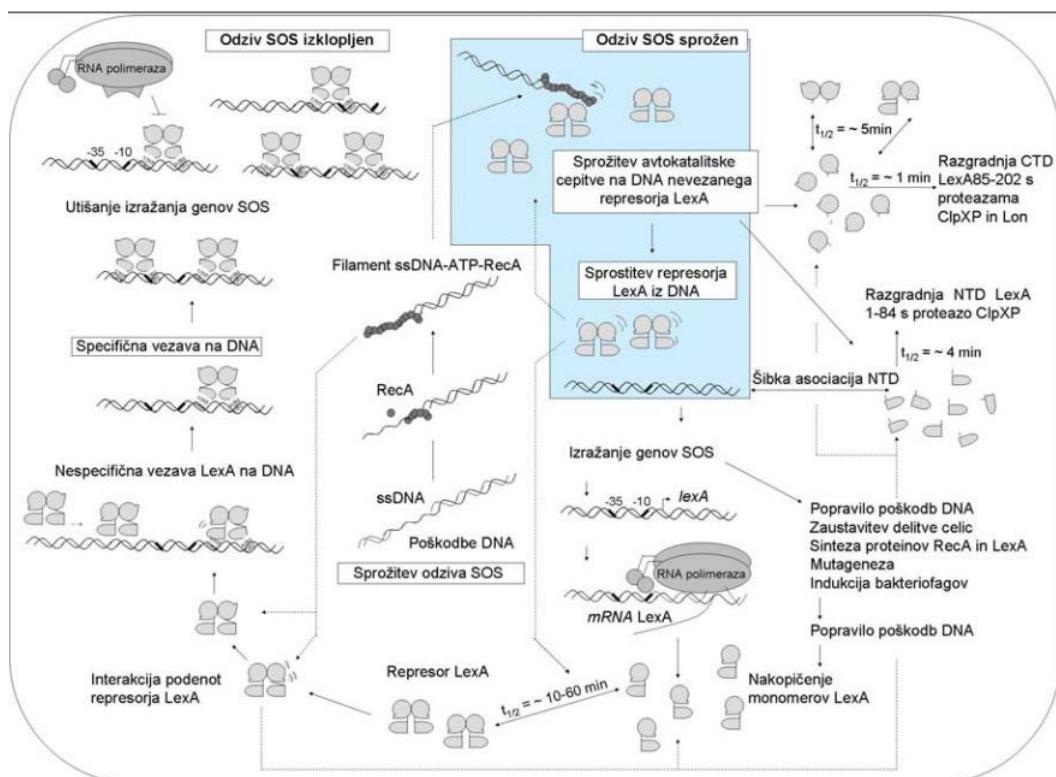


Slika 8: Prepoznavna mesta za proteazo ClpXP na monomeru LexA. Z modro je označena CTD, z zeleno pa NTD. Predlagano prepoznavno mesto v CTD je označeno s puščico (Naher in sod., 2003).

2.2.1.2 Z RecA sprožena samo-katalitska cepitev LexA

RecA, ki je v obliki aktivnega filimenta, deluje kot ko-proteaza, saj sproži cepitev proteina LexA. Približno 7200 molekul RecA ter 1300 LexA je prisotnih v normalno rastoči celici bakterije *E. coli* (Sassanfarls in sod., 1990). Na DNA je nespecifično/specifično vezanih 80-odstotkov vseh molekul LexA, ostale so proste v celici. Večino nevezanega LexA ima CTD v cepitveno nezmožni konformaciji, zato njegova razgradnja poteka zelo počasi, indukcija odziva SOS pa njegovo razgradnjo pospeši kar za 50×. Po indukciji odziva SOS in nastanku aktivnega filimenta RecA se nivo LexA v celici zniža kar za 10×, iz začetne koncentracije 2 µM na končnih 0,2 µM (Little, 1983).

Kako naj bi aktivni filament RecA vplival na samo-katalitsko cepitev LexA še ni popolnoma znano, bilo pa je postavljenih kar nekaj modelov. Že leta 1987 sta Slilaty in Little predpostavila, da je za aktivacijo Ser-119 potrebna deprotonacija Lys-156. Na podlagi teh ugotovitev so predlagali model, po katerem naj bi RecA znižal pK_a Lys-156 in tako omogočil deprotonacijo Lys-156 pri nevtralni vrednosti pH (Little, 1991). Leto kasneje so predlagali, da interakcija z aktivnim filamentom RecA, poleg deprotonacije Lys-156, spremeni tudi konformacijo LexA (Roland in sod., 1992). Domneve, da RecA preferenčno reagira z LexA, ki ima CTD v cepitveno zmožni konformaciji, se nanjo veže in jo stabilizira (Luo in sod., 2001), so ne dolgo nazaj ovrgli. RecA lahko reagira z obema oblikama CTD LexA, cepitveno zmožno ter cepitveno nezmožno konformacijo, kar najverjetneje pomeni, da RecA sproži alosterično spremembo v LexA (Giese in sod., 2008).



Slika 9: Model regulacije odziva SOS bakterije *E. coli*. Represor LexA je vezan na operatorska mesta genov SOS odziva in tako prepreči njihovo transkripcijo. Endogene ter eksogene poškodbe DNA sprožijo nastanek aktivnega filamenta RecA, ki katalizira samo-katalitsko cepitev LexA, čemur sledi derepresije genov SOS. Ko celica popravi poškodovano DNA, odziv SOS ni več induciran (Rems, 2009).

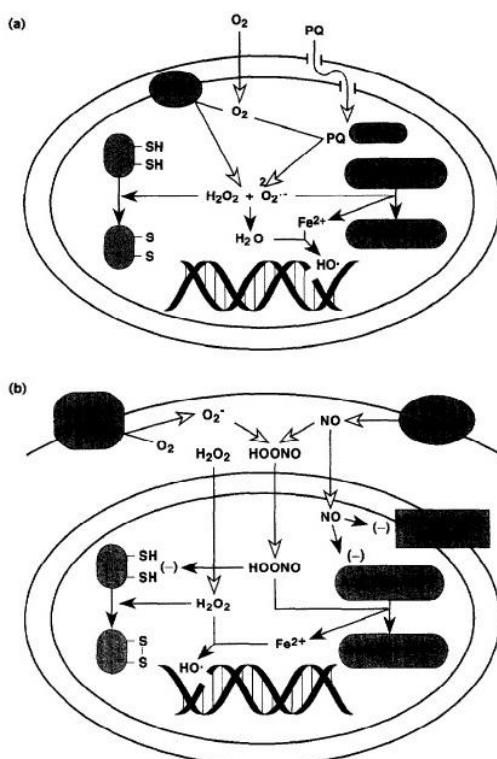
Ni še povsem jasno, ali aktivni filament RecA sproži samo-katalitsko cepitev LexA, ko je slednji vezan na tarčna zaporedja ali ko je prost v celici, nevezan na DNA. Po hipotezi Little in Mount (1982) pride do cepitve LexA šele, ko ta ni več vezan na DNA. Po tej hipotezi torej velja, da je za cepitev represorja LexA potrebna njegova disociacija z DNA, kateri sledi njegova cepitev. Toda hipoteza še ni bila dokazana in temelji na opažanju, da dodatek DNA z operatorskim zaporedjem za LexA upočasni z RecA sproženo samo-katalitsko cepitev LexA.

2.3 ODZIV NA OKSIDATIVNI STRES PRI BAKTERIJI *Escherichia coli*

Znotrajcelične ravni reaktivnih zvrsti kisika (ROS) so ključni dejavniki celične redoks homeostaze. Motnje homeostaze, do katere pride ob zvišani ravni ROS, povzročijo poškodbe bakterijskih celic (Halliwell in Gutteridge, 1999). Celični odzivi na oksidativni stres zato vključuje proteine, katerih aktivnost je urejena z oksidacijo. To velja za visoko, kot tudi za nizko raven ROS (Storz in sod., 1990; Denu in Tanner, 1998; Lee in sod., 1998; Zheng in sod., 1998; Jakob in sod., 1999; Mannick in sod., 1999).

Oksidativni stres je opisan kot višek oksidantov v bakterijski celici. Molekule aktivnega kisika povzročajo poškodbe v DNA, RNA, v proteinih in lipidih. ROS nastanejo kot stranski produkti normalnega aerobnega metabolizma, zato so za aerobne organizme neizbežni (Farr in Kogoma, 1991). Vsi aerobni organizmi so zato tekom evolucije razvili različne obrambne in popravljalne mehanizme, s katerimi ublažijo škodljiv vpliv aktivnih oblik kisika (McCord in Fridovich, 1988; McCord in sod., 1971). V odziv na oksidativni stres pri aerobnih organizmih je vključenih več operonov (Bol in Yasbin, 1990).

SoxRS ter OxyR sta dva ključna faktorja transkripcije, odgovorna za pravočasni odziv na oksidativni stres. Njuna naloga je sprožiti prepis genov, ki so vključeni pri obrambi oz. popravilu poškodb, povzročenih s superoksidnim anionom ($O_2^{\cdot-}$) ali vodikovim peroksidom (H_2O_2). Mehanizmi poškodb celic se razlikujejo glede na različne vrste aktivnih oblik kisika (Slika 10, Storz in Imlay, 1999).



Slika 10: Mehanizmi poškodb celic zaradi oksidativnega stresa. Na sliki bele puščice nakazujejo vir reaktivnega kisika in dušika, črne pa označujejo poškodbe, povzročene s slednjimi. **A:** Poškodba celice z endogenimi oksidanti. Molekularni kisik pasivno difundira v celico, kjer se spremeni v superoksidni anion in vodikov peroksid. Pretvorba poteka z neposredno oksidacijo s flavoproteinimi, vključno z NADH dehidrogenazo (NdhII). Redoks molekule, vključno s parakvatom (PQ), pospešujejo nastanek aktivnih oblik kisika s katalizo prenosa elektronov iz redoks encimov, kot na primer iz sulfit reduktaze (SiRase), na kisik. Superoksidni anion preko oksidacije razgradi železov sulfat. Železo nato reagira z vodikovim peroksidom in tvori vodikov radikal (HO^\bullet), ki direktno poškoduje DNA. **B:** Prikaz verjetne poškodbe celice z reaktivnimi oblikami kisika in dušika med fagocitozo. $\text{O}_2^{\bullet-}$ in NO^\bullet nastaneta z NADPH oksidazo in NO^\bullet sintazo na fagolizosomalni membrani. NO^\bullet pasivno difundira v celico, kjer inhibira delovanje akonitaze (Acn) in citokrom oksidaze. Zunajcelična reakcija med $\text{O}_2^{\bullet-}$ in NO^\bullet povzroči nastanek HOONO , ki preide v celico in tam reagira s cisteinskimi ostanki in železo-žveplovimi centri. H_2O_2 , ki ravno tako nastane izven celice, oksidira cisteinske ostanke in v reakciji s prostim železom tudi DNA. Toksičnost reakcij so testirali na bakterijskih celicah v kulturi (Storz in Imlay, 1999).

V odzivu na povišano koncentracijo peroksidov ali organskih peroksidnih skupin sodeluje vsaj 30 proteinov. V bakteriji *E. coli* OxyR pospeši prepis vsaj devetih proteinov, tekom oksidativnega stresa. OxyR aktivira prepis gena za katalazo, ki omogoči bakteriji odpornost proti H_2O_2 (Demple in Halbrook, 1983).

Odziva na oksidativni stres izvvana s H_2O_2 ter $\text{O}_2^{\bullet-}$ se med seboj razlikujeta. Celice, tretirane s H_2O_2 in celice z $\text{O}_2^{\bullet-}$ ne razvijejo navzkrižne rezistence. Iz tega je razvidno, da je prepis faktorja transkripcije OxyR ter drugega dejavnika odziva na oksidativni stres, SoxS, uravnavan z dvema različnima regulatorjema (Farr in sod., 1985).

2.3.1 Regulon OxyR

Regulon OxyR je aktivator vsaj devetih genov, ki omogočijo bakteriji preživetje peroksidnega stresa (Christman in sod., 1985).

Nukleotidno zaporedje gena *oxyR* je dolgo 918 bp (Christman in sod., 1989; Tao in sod., 1989). Protein OxyR je velikosti 34kDa, katerega zaporedje je homologno zaporedju družine regulatornih proteinov bakterije, ki sestavlja družino LysR (Henikoff in sod., 1988). Izražanje gena *oxyR* je negativno samo-uravnano (Christman in sod., 1989; Tao in sod., 1989).

Nukleotidna zaporedja vezave OxyR so v bližini mest, katera prepozna promotor σ^{70} , kar nakazuje na to, da protein OxyR reagira z RNA-polimerazo in aktivira transkripcijo (Tartaglia in sod., 1989).

Ob povišanih koncentracijah H_2O_2 protein OxyR aktivira transkripcijo skupine od OxyR uravnnavanih genov. Obdelava celic s H_2O_2 ne povzroči spremembe v sintezi proteina OxyR (Storz in sod., 1990). Predlagano je, da redukcija/oksidacija cisteinskih ostankov uravnava funkcijo proteina OxyR. Dokazano je, da je OxyR inaktiviran, če je izoliran iz bakterij, ki rastejo v anaerobnih okoljih, a preide v aktivno obliko, ko bakterije rastejo v okolju s kisikom (Storz in sod., 1990). V aerobnih pogojih se OxyR oksidira, najverjetneje s H_2O_2 , ki je v teh pogojih prisoten.

Protein OxyR vsebuje šest cisteinskih ostankov (Christman in sod., 1989). Vodikov peroksid aktivira OxyR s tvorbo intramolekularne disulfidne vezi med Cys-199 in Cys-208 (Zheng in sod., 1998).

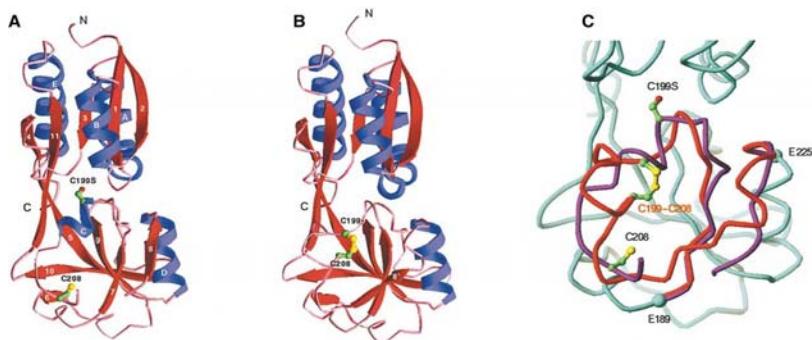
Oksidirana oblika tetramera OxyR se razlikuje od reducirane. Pri vezavi na DNA oksidirana oblika zasede štiri zaporedne velike žlebove DNA, medtem ko se reducirana oblika veže na dva velika žleba, ločena z enim zavojem viačnice DNA (Toledano in sod., 1994). Z redukcijo disulfidnega mostička Cys-199 – Cys-208 se oksidirana oblika OxyR inaktivira, kar nakazuje, da ta protein deluje kot stikalo, ki prepozna redoks stanje v celici (Zheng in sod., 1998). Redukcija proteina je znatno počasnejša kakor proces oksidacije, kar omogoča oksidirani oblici OxyR, da ostane dlje časa tudi v reduciranem okolju citoplazme *E. coli* (Åslund in sod., 1999; Tao, 1999).

Protein OxyR je iz 305 aminokislinskih ostankov. NTD se veže na DNA, sestavlja jo DNA vezavni motiv viačnica-zanka-viačnica. CTD je pomembna pri uravnavanju aktivnosti proteina in za oligomerizacijo proteina (od 80 do 305 aminkislinskega ostanka). CTD sestavlja cisteina (Cys-199 in Cys-208), ki zaznata redoks potencial okolja in deluje kot stikalo za aktivacijo proteina (Kullik in sod., 1995a, 1995b).

Kristalna struktura proteina OxyR je razkrila, da disulfinda vez med cisteinoma Cys199 ter Cys208, uvede veliko strukturno spremembo proteina. Protein v reducirani obliki ima Cys-199 v pozitivno nabitem okolju povečano reaktivnost žveplovega atoma cisteina, kar pojasnjuje občutljivost proteina OxyR na vodikov peroksid (Choi in sod., 2001).

Regulatorna domena monomera OxyR je sestavljena iz dveh domen α/β , povezanih z dvema interdomenskima vezama. Aminokislinski ostanki od 87 do 162 (vez $\beta1-\beta4$, vijačnica $\alpha A-\alpha B$) oblikujejo večji del NTD α/β (domena I). CTD α/β (domena II) je iz aminokislinskih ostankov od 164 do 260 (vez $\beta5-\beta10$, vijačnica $\alpha C-\alpha D$). Preostanek CTD je iz 30 aminokislinskih ostankov proti domeni I ter tako tvori konec domene (vez $\beta11$ in vijačnice αE). Redoks-aktivni Cys-199 ostanek, ki direktno reagira s H_2O_2 , je v ožini hidrofobnega žepka med dvema domenoma α/β . Drugi redoks-aktivni cistein (Cys-208) je lociran na najnižjem delu domene II in je od Cys-199 ločen z veliko razdaljo (Slika 8, Choi in sod., 2001).

V oksidirani obliki OxyR sta Cys-199 in Cys-208 povezana v disulfidno vezjo. Na ta način urejata zavoj domene II, kar se izkaže za pomembno preureditev sekundarne strukture (Slika 11, Choi in sod., 2001).



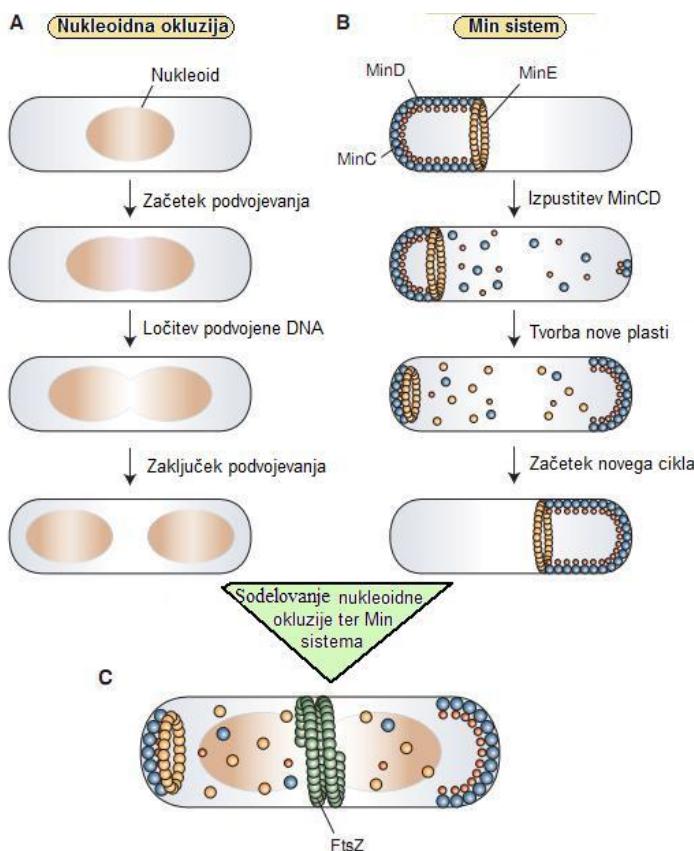
Slika 11: Struktura katalitične domene proteina OxyR. **A:** Shema reducirane oblike monomera OxyR. Prikazana sta redoks-aktivna centra Cys-199 in Cys-208. Z rdečim so označene β vez, z modrim pa α vijačnice. **B:** Shema oksidirane oblike monomera OxyR. Prikazana je novo nastala vez med Cys-199 – Cys-208 med oksidacijo, β vez ($\beta89$). **C:** Prikaz prekrivanja reducirane in oksidirane oblike monomera OxyR. Na prikazu je povečana domena II. Ostanki 189-225 reducirane oblike so prikazani z vijolično barvo, oksidirane pa rdečo. Preostali del molekule monomera ima zelo dobro prileganje oksidirane na reducirano obliko, zato je na sliki prikazana le reducirana oblika proteina OxyR. Redoks-aktivna cisteina sta prikazana ločeno (reducirana oblika) ter povezana (oksidirana oblika) (Choi in sod., 2001).

2.4 LOČITEV SESTRSKIH KROMOSOMOV MED CELIČNO DELITVIJO BAKTERIJE *Escherichia coli*

2.4.1 Celična delitev bakterije *Escherichia coli*

Proces celične delitve na molekularnem nivoju se preučuje že desetletja. Mehanizem celične delitve je najbolje preučen v vrstah bakterij *E. coli* in *Bacillus subtilis* (Barák in Wilkinson, 2007).

Osnovni proces celične delitve je oblikovanje delitvenega septuma med dvema, nedavno podvojenima, kromosomoma. Za dokončno delitev se mora citoplazemska membrana zavihati navznoter ter sintetizirati peptidoglikan (Barák in Wilkinson, 2007). Oblikovanje septuma se začne s tvorbo obroča FtsZ (v nadaljevanju obroč Z). Obroč Z se tvori na mestu, kjer se nato tvori septum. FtsZ je visoko ohranjena GTPaza, podobna tubulinom in spominja na evkariontske proteine citoskeleta. Dva različna mehanizma skrbita za to, da se delitev začne na pravem mestu: nukleoidna okluzija in sistem Min. Njuna naloga je, da preprečita delitev celice v bližini nukleoida ter na polih celice. Homologi sistema Min so prisotni še v mnogih drugih prokariontskih organizmih (Barák in Wilkinson, 2007).



Slika 12: Prikaz dveh neodvisnih mehanizmov, odgovornih za nastanek septuma na sredini celice bakterije *E. coli*. Prvi od dveh mehanizmov je nukleoidna okluzija, ki s svojo lokacijo (rjav ovalni krog) onemogoča delitev v njegovi bližini ter tako pušča prostor za delitev celice na sredini ali na njenih polih. Drugi mehanizem, sistem Min, preprečuje delitev celice na polih. Visoke koncentracije kompleksa MinCD so označene kot modre in rumene kroglice na notranji strani membrane. **A:** Prikaz regulacije celične delitve s sistemom nukleoidne okluzije med različnimi fazami celičnega cikla. Od zgoraj navzdol: prvi je prikazan primer celice pri kateri celični cikel ne poteka. Nukleoid se nahaja na sredini celice. Na drugi sliki je prikazana faza začetka podvojevanja kromosoma. Sledi faza ločitve sestrskih kromosomov ter na zadnje še zaključek podvojevanja kromosomske DNA. **B:** Prikaz inhibicije celične delitve na polih celice s sistemom Min. Tako kot v primeru sistema nukleoidne okluzije so tudi tu prikazane različne faze celičnega cikla. Na začetku je MinD povezan z inhibitorjem MinC, kjer v citoplazemski membrani tvorita polimerno plast, katera preprečuje tvorbo obroča FtsZ na polih celice. Min E je organiziran v obročasto strukturo, ki postopoma izriva MinCD iz membrane. Ob začetku podvajanja kromosoma se MinCD sprosti z membrane in začne nabirati na nasprotnem polu, kjer tvori novo plast. **C:** Prikaz sodelovanja sistema Min in nukleoidne okluzije pri preprečitvi tvorbe obroča Z izven sredine celice (Thanbichler, 2009).

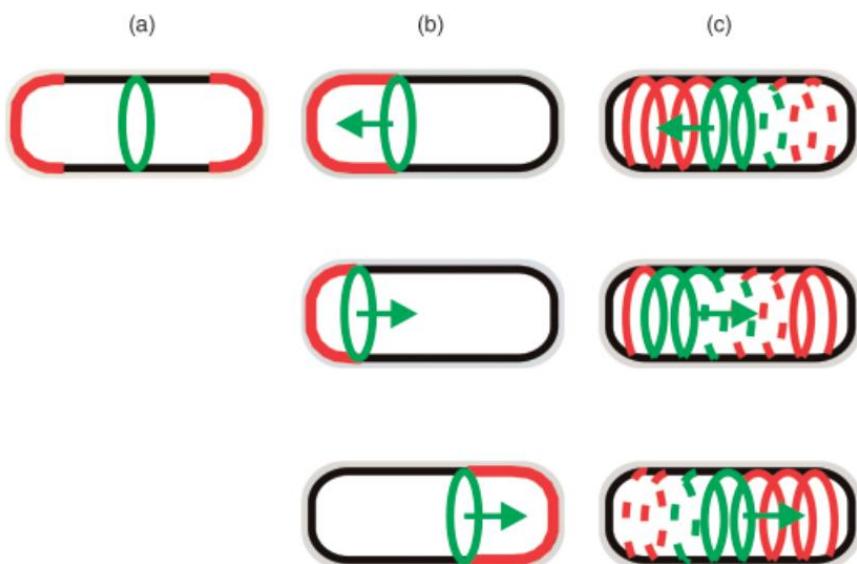
2.4.2 Model nukleoidne okluzije

Povezava mesta tvorbe obroča Z in cone ločitve bakterijskega nukleoida je pripeljala do hipoteze, da je bakterijski nukleoid pogojen z nastankom in pozicijo delitvenega septuma. Model nukleoidne okluzije so prvotno predstavili Woldringh in sodelavci leta 1990. Po omenjenem modelu nukleoid inhibira delitev celice na vseh delih le-te, kjer se nukleoid nahaja. Sredina celice, kjer se navadno tvori septum, se pojavlja in izginja ciklično med vegetativno rastjo celice, enakomerno s cikлом kromosomskega podvojevanja (Errington in sod., 2003).

V zgodnji fazici celičnega cikla nukleoid preprečuje delitev celice na sredini, medtem ko je tvorba obroča Z na polih celice, kjer nukleoid ni prisoten, onemogočena s sistemom MinCDE. Kljub temu, da je model nukleoidne okluzije zelo zanimiv, pa je slabo definiran in ne dovolj natančno opredeljen, da bi z njim sredino celice definirali kot mesto delitve v bakteriji *E. coli* (Koch, 1990; Margolin, 2000). V sevu *E. coli* z dvojno mutacijo v genih *ftsA* in *dnaAts* (preprečitev začetka podvajanja DNA) ni mogoče zaslediti povezave med mestom septuma ter pozicijo nukloida. Pri teh celicah se tvorijo dolgi filamenti z brez nukleoidnimi conami. Ko pride do obnovitve delitve celice, se septum tvori na konstantni razdalji od obeh polov, približno 5 µm stran, ne glede na oddaljenost najbližjega nukleoida (Cook in Rothfield, 1999). Protein SlmA so določili kot z nukleoidom povezan inhibitor delitve celice, ki lahko posreduje pri modelu nukleoidne okluzije (Bernhardt in De Boer, 2005).

2.4.3 Sistem MinCDE

V bakterijskih celicah, kjer je pomanjkanje proteinov MinCDE, se obroči Z pogosto tvorijo blizu polov celice, kar vodi do nastanka celic brez DNA (Slika 13A). Lahko pa prevelika vsebnost proteinov MinCDE vodi k nastanku filamentozne celične rasti. Osnovna vloga sistema MinCDE je v bakteriji *E. coli* preprečiti delitev celic na njenih polih. MinC je inhibitor delitve, katerega aktivira z membrano-povezana ATPaza MinD, ki ima več vlog (De Boer in sod., 1991). Prva vloga MinD je, da tvori kompleks MinC-MinD, ki inhibira polimerizacijo FtsZ in celično delitev v odsotnosti drugih regulatorjev (Raskin in De Boer, 1997). Poleg tega povzroči občutljivost inhibitorja MinC na protein MinE (De Boer in sod., 1990) ter vpliva na lokalizacijo proteina MinE na sredini celice (Bernhardt in De Boer, 2005). Za MinE se je izkazalo, da je dejavnik topologije DNA, ki razbremenji inhibicijo delitve celice v njenem središču (De Boer in sod., 1992). NTD, 88 aminskih ostankov velikega proteina MinE, je odgovoren za nasprotno vlogo MinCD in tako nastanek filamentov (Pichoff in sod., 1995). Mehanizem delovanja sistema MinCDE so preučevali s fluorescenčno mikroskopijo. Na Sliki 13B je prikazano, da se fuzija MinE-gfp lokalizira kot obroč na sredini celice ter da slednji zahteva sočasno izražanje *minD* (Raskin in De Boer, 1997). Dodatne raziskave so pokazale, da med delitvijo celice protein MinD niha med poloma (Slika 13C) s periodo med 10 in 20 sekund (Pichoff in sod., 1995; Rothfield in Zhao, 1996). Inhibitor delitve MinC se veže na MinD in z njim deluje pri sonihaju (Hu in Lutkenhaus, 1999; Raskin in De Boer, 1999a, b). Dodatne študije so potrdile, da je v živih celicah MinE tudi podvržen hitremu sonihaju skupaj z MinD (Fu in sod., 2001). Delecija MinE je pokazala, da je nihanje MinD ter MinE povezano. Ta mutacija je povzročila neenakomerno porazdelitev MinD okoli citoplazemske membrane (Rowland in sod., 2000). Posledica nihanja proteinov je, da je koncentracija inhibitorja celične delitve MinC najnižja na celični sredini in najvišja na celičnih polih. Proses nihanja torej preprečuje delitev celice na njenih polih, ne pa tudi na sredini celice (Barák in Wilkinson, 2007).



Slika 13: Sistem MinCDE in mesto za tvorbo septuma pri vegetativnih bakterijah *E. coli*. Na sliki so prikazani trije modeli delovanja sistema Min. **A:** Obroč MinE (zeleno obarvan) je postavljen v bližini sredine celice, kompleks MinCD (rdeče obarvan) pa v bližini celičnih polov. **B:** Nihanje MinE od pola do pola je soodvisno od nihanja kompleksa MinCD na polih celice. **C:** Najnovejši model. Tako kot v predhodnem modelu, tudi v tem proteini MinCDE nihajo, toda kot spirale. Prekinjajoča črta predstavlja razkrojen MinE (zeleno) oz. kompleks MinCD (rdeče) (Barák in Wilkinson, 2007).

Sistem Min ima ključno vlogo pri natančni določitvi mesta delitve v bakteriji *E. coli*. Sistem Min naj bi omogočal določiti razdaljo med poloma celice, z uporabo nihanja proteinov Min vzdolž njihove spiralne poti (Addinall in Holland, 2002). Pred delitvijo celice sta nukleoida vsak na svojem polu celice, poleg mesta za podvajanje, ter tako oblikujeta simetrično merilno napravo (Koch, 1990). Ta model vključuje obstoj območij na vsakem polu za določanje začetka podvajanja *oriC*.

2.4.4 Protein FtsZ

Protein FtsZ je najbolj ohranjen med proteini, ki sodelujejo v procesu bakterijske celične delitve (Barák in Wilkinson, 2007). Tvorba obroča Z določa mesto celične delitve in uravnava citokinezno. Začetek sestavljanja obroča Z mora biti usklajen s podvojevanjem DNA. Poleg sistema Min in nukleoidne okluzije, koncentracija proteina FtsZ pred začetkom podvojevanja DNA vpliva na nastanek obroča Z (Addinall in Holland, 2002; Romberg in Levin, 2003). Razmerje med celično maso in koncentracijo FtsZ se tekom celotnega celičnega cikla ne spreminja, kar nakazuje, da sestavljanje obroča Z ni pogojeno s spremembjo koncentracije proteina FtsZ (Rueda in sod., 2003).

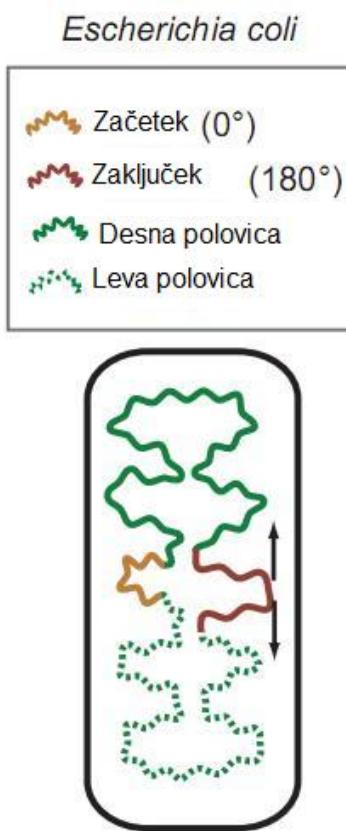
Ker se obroč Z tvori približno na mestu predhodnega *oriC*, je mogoče, da isti mehanizem, ki postavi *oriC* zaporedje in kompleks DNA polimeraze na sredino celice, sodeluje pri izbiri pravšnjega položaja za tvorbo obroča Z.

Protein FtsZ je homolog tubulina, ki je del evkariotskega citoskeleta. FtsZ sodeluje pri mnogih esencialnih procesih, vključno s procesom mitoze (Erickson, 1997). Neposredno in

posredno na polimerizacijo FtsZ ter tvorbo obroča Z na sredini celice vpliva vsaj osem različnih proteinov: MinC, FtsA, ZipA, EzrA, ZapA, Noc, SlmA in SulA. S svojim delovanjem lahko inhibirajo polimerizacijo FtsZ, vplivajo na kraj nastanka obroča Z ali spremenijo samo dinamiko strukture obroča Z (Barák in Wilkinson, 2007).

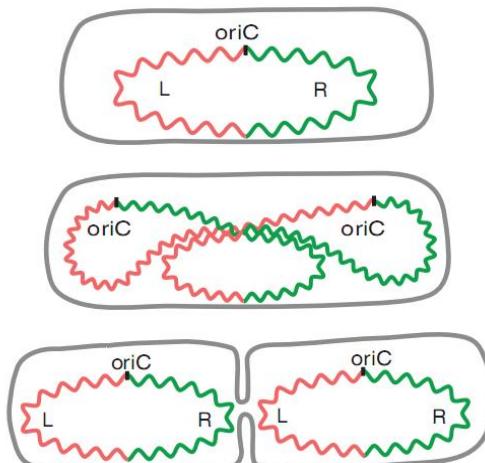
2.4.5 Podvajanje kromosomske DNA ter ločitev podvojenega kromosoma pri bakteriji *Escherichia coli*

Na začetku celičnega cikla je v počasi rastoči celici *E. coli* mesto *oriC* na sredini celice, kromosom pa je levo (L) in desno (D) od njega (Nielsen in sod., 2006; Wang in sod., 2006). Regije zaključka podvojevanja DNA sta enakomerno na levi in desni polovici sredine celice (Slika 14, Wang in sod., 2006).



Slika 14: Shematski prikaz kromosomske DNA bakterije *E. coli*. Mesto začetka podvojevanja DNA je lociran na sredini celice, polovici kromosoma pa sta razporejeni na dve nasprotni polovici celice. Zaključna regija je locirana po celotni celični sredini (Toro in Shapiro, 2010).

Po podvojitvi DNA se obe mesti *oriC* prestavita na svojo četrtnico celice in kromosom zavzame specifično obliko (Slika 15, Nielsen in sod., 2006; Wang in sod., 2006). Za dosego takega stanja morata biti vodilni verigi ločeni na nasprotnih polih celice, medtem ko morata biti zaostajajoči verigi na sredini celice (White in sod., 2008).



Slika 15: Podvajanje kromosomske DNA v bakteriji *E. coli*. Začetek podvajanja, *oriC* je postavljen na sredino celice, dve polovici kromosoma pa sta locirani vsaka na svoji polovici celice. Po podvojevanju ima vsak izmed hčerinskih kromosomov svoj *oriC*, ki je ločen na celični četrtni. Ko je podvajanje končano, hčerinska kromosoma zavzameta simetrično obliko, konformacijo L-R-L-R (Toro in Shapiro, 2010).

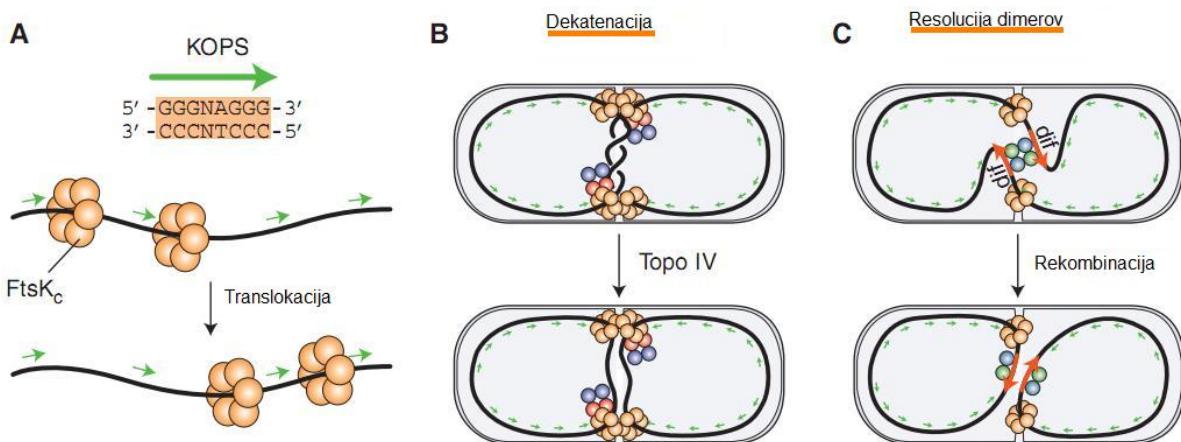
Najverjetnejša hipoteza o ločitvi bakterijske DNA izvira iz leta 1963 (Jacob in sod., 1963) in slednja pravi, da se sestrška kromosoma po podvojitvi pritrdirta na celično membrano, rast pa se nadaljuje med dvema mestoma pritrditve. V nadaljevanju so želeli dokazati, da se *oriC* pripne na membrano, kot so že dokazali za številne bakterijske vrste (Sueoka in Quinn, 1968; Fielding in Fox, 1970; Bowman in sod., 2008; Ebersbach in sod., 2008), ob tem pa je občasno prisotna neenakomerna celična rast, odvisno od organizma (Cole in Hahn, 1962; Mobley in sod., 1984; Aaron in sod., 2007).

Ločitev podvojenih sestrških kromosomov je večstopenjski proces, ki vključuje ločitev novo sinteziranih *oriC*, kondenzacijo ter ločitev podvojenih kromosomov (Lau in sod., 2003). Kompleks proteinov vpletene pri celični delitvi, zlasti protein FtsK, igrajo pomembno vlogo tako pri končni vlogi ločitve dveh sestrških kromosomov kot pri sami celični delitvi.

Domene molekularnega motorja FtsK se povežejo v heksamerni obroč, katerega odprtina je dovolj velika, da se skoznjo namesti dvovijačna DNA (Massey in sod., 2006). Kompleks deluje kot črpalka, ki aktivno premakne kromosomsko DNA v hčerinsko celico s hitrostjo 7 kb/s (Saleh in sod., 2004; Pease in sod., 2005). Za pravilno razdelitev kromosomov v hčerinski celici so v pomoč molekularni kažipoti, KOPS (ang. FtsK-orienting polar sequences), (Slika 16A). Gre za kratke, ohranjene zaporedne motive, ki so zelo številčno prisotni v genomu z različno usmerjeno orientacijo v terminalni regiji (Bigot in sod., 2005; Levy in sod., 2005). Smer njihove orientacije nakazuje lego C-terminalnega topnega dela FtsK ($FtsK_C$) na molekuli DNA in posledično smer procesa prenosa kromosoma in s tem zagotovitve premika $FtsK_C$ na terminalno regijo podvojene DNA (Bigot in sod., 2006). Ločitev terminalnih regij ne le sprosti ločitveno mesto na DNA, temveč tudi prepreči preveliko prepletanje sestrških kromosomov, kar olajša njihovo razdelitev v hčerinski celici in njuno dekatenacijo s topoizomerazo (Topo) IV (Adams in sod., 1992; Peng in Marians 1993; Zechiedrich in Cozzarelli 1995; Ullsperger in Cozzarelli 1996).

Topo IV je heterotetramer, iz dveh različnih podenot, ParC in ParE (Kato in sod., 1990). ParC je skupaj z replisomom, ParE pa razporejen znotraj bakterijske celice (Espeli in sod., 2003b; Wang in Shapiro, 2004). Dokazali so, da FtsK_C reagira s ParC, ter tako stimulira aktivnost Topo IV *in vitro* (Espeli in sod., 2003a; Espeli in sod., 2003b). Najverjetneje pride do osvoboditve ParC iz replisoma in posledične interakcije med podenotama ParC, ter ParE, kar povzroči nastanek funkcionalnega kompleksa Topo IV (Slika 16B, Espeli in sod., 2003b). Stimulativna vloga FtsK_C pa, kakor kaže, nima esencialne vloge pri aktivnosti Topo IV (Liu in sod., 1998; Yu in sod., 1998).

Za dokončno kromosomsko ločitev je odgovoren specializiran aparat iz dveh tirozinskih rekombinaz, XerC ter XerD. Proteina sodelujeta pri katalizi mestno specifične rekombinacije med dvema terminalnima mestoma *dif* in s tem dokončno ločita sestrska kromosoma (Blakely in sod., 1993). FtsK_C pomaga usmeriti rekombinazi XerCD, ki na delitvenem mestu *dif* pospešuje nastanek rekombinacijskih sinaps (slika 16C). Poleg tega lahko FtsK_C inducira topološke spremembe v bližini *dif*, ki so pomembne za pravilno rekombinacijo (Perals in sod., 2000; Aussel in sod., 2002; Capiaux in sod., 2002; Ip in sod., 2003; Massey in sod., 2004) in reagira direktno s XerD. Tako FtsK_C stimulira XerD da s svojo aktivnostjo spremeni prvi par v nizu zamenjav in s tem nastanek strukture Holliday. Ta začasna struktura se nato spremeni v prekrižanje (ang. crossover) z drugim parom v nizu zamenjav, ki ga katalizira s XerC in je od FtsK_C neodvisno (Grainge in Sherratt 1999; Barre in sod., 2000; Aussel in sod., 2002; Massey in sod., 2004; Yates in sod., 2006). Sestrska kromosoma se sedaj lahko razdružita. FstK ima lahko direkten vpliv na kromosomsko deaktivacijo, neodvisno od interakcije s Topo IV (Ip in sod., 2003; Grainge in sod., 2007). Zanimivo je, da je za rekombinacijo v *dif* potrebno zapiranje septuma in da se slednje zgodi malo pred celično delitvijo (Steiner in Kuempel, 1998; Kennedy in sod., 2008). Povečanje lokalne koncentracije FtsK torej pokaže obliko ločevanja sestrskih kromosomov in je verjetno potrebno za prenos DNA in učinkovito stimulacijo aktivnosti XerCD (Thanbichler, 2009).



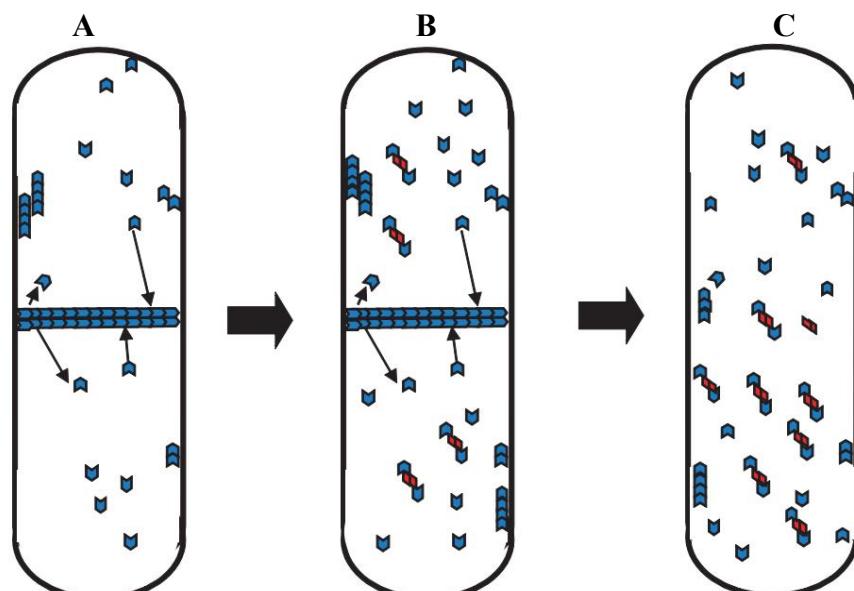
Slika 16: Vloga od zaporedja KOPS reguliranega prenosa DNA s FtsK in končni koraki ločitve sestrskih kromosomov. **A:** Vpliv zaporedja KOPS na smer premika FtsK. Prikazano je zaporedje KOPS pri *E. coli*. Heksamerni obroč FtsK_C obda DNA in jo prestavi v smeri, določeni s polarnostjo elementov KOPS (zelene puščice). **B:** Stimulacija kromosomske dekatenacije s FtsK. FtsK_C se prestavi proti končnemu mestu *dif* in mestu celične delitve. Razdružitev dveh kromosomov katalizira encim, sestavljenim iz proteina ParC (rdeče kroglice) ter ParE (modre kroglice). FtsK direktno reagira s ParC, s čimer poveča aktivnost Topo IV v bližini mesta celične delitve. **C:** Vloga FtsK pri ločitvi kromosomov. S premikom aktivnosti na dve mesti *dif* kromosomskega dimera na mesto celične delitve se spodbudi nastanek rekombinacijske sinapse. Poleg tega FtsK_C direktno reagira z rekombinazo XerD (zelene kroglice), kar spodbudi prvi par v nizu zamenjave. Rekombinaza XerC (modre kroglice) nato dokonča rekombinacijo s končno ločitvijo dveh kromosomov (Thanbichler, 2009).

2.4.6 Produkt gena SulA prepreči delitev celic med odzivom SOS

SulA je protein bakterije *E. coli*, ki med odzivom SOS reagira s proteinom FtsZ in posledično prepreči celično delitev.

Gen *sulA* se tako kot *umuDC* začne v odzivu SOS pozno izražati (Kuzminov, 1999). Protein SulA inhibira delitev celic in povzroči filamentozno rast celic. Tako SulA podaljša čas, ki ga ima celica na razpolago za popravo poškodb DNA (Janion, 2008). Posledično je delitev celic uravnana tudi ob poškodbi DNA. Razpolovna doba proteina SulA je ~1 min, razgradi pa ga proteaza Lon (Mizusawa in Gottesman, 1983).

Obstajata dva modela, ki pojasnjujeta inhibicijo proteina FtsZ. Prvi predlaga inhibicijo FtsZ s pokrivanjem FtsZ s SulA (Trusca in sod., 1998), drugi pa z odstranitvijo proteina FtsZ (Slika 17) (Mukherjee in sod., 1998).



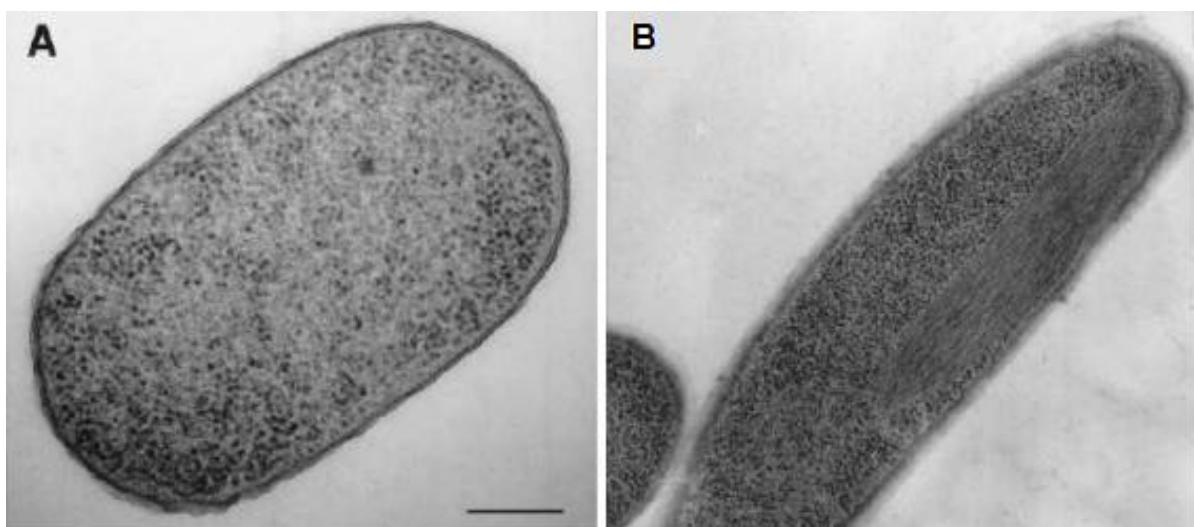
Slika 17: Model delovanja SulA *in vivo*. **A:** Pod normalnimi pogoji so podenote FtsZ v obroču Z v koncentracijskem ravnotežju s podenotami, lokaliziranimi v citoplazmi ali na membrani celice. **B:** Poškodbe DNA vodijo do derepresije regulona SOS, posledica je sinteza proteina SulA, ki tvori kompleks SulA-FtsZ v citoplazmi. Zato je manj razpoložljivega FtsZ za tvorbo obroča Z. **C:** Ko doseže molarno razmerje SulA proti FtsZ med 0,1 ter 0,5, se obroč Z razgradi, še vedno pa so prisotni polimeri proteina FtsZ (Dajkovic in sod., 2008).

Dajkovic in sodelavci (2008) so dokazali, da je verjetnejši model delovanja SulA odtranitev FtsZ. Za ugotovitev slednjega so preučevali spremenjanje koncentracije MalE-SulA ob kritični koncentraciji FtsZ. Določeno količino MalE-SulA so inkubirali z naraščajočo količino FtsZ. Predvidevali so, da će SulA inhibira FtsZ z odstranitvijo, mora vezati monomere FtsZ, kar bi vodilo v povečevanje količine FtsZ do kritične koncentracije, pri kateri se obroč Z še tvori. V mešanici standardne koncentracije MalE-SulA, ter povečane koncentracije FtsZ, je rezultat, ki kaže na model z odstranitvijo FtsZ, linearno povečanje tvorbe polimerov in prav to kažejo rezultati.

2.4.7 Vezava kromosoma na bakterijsko membrano med odzivom SOS

Med odzivom SOS se kromosom reorganizira, zaščiti pred poškodbo DNA v celici ter omogoči pospešeno popravljanje poškodovane DNA. Aktivni filament RecA se pritrdi na celično membrano s še nepoznanim proteinom in tako uravnava lokalizacijo in podvajanje kromosoma v celici (Slika 18). Med odzivom SOS se sintetizira le en protein membrane, protein YdjM, katerega vloga v celici še ni poznana. Fernández de Henestrosa s sodelovci je leta 2000 dokazal, da je izražanje gena *ydjM* reprimirano s proteinom LexA. Dva dimera LexA se vežeta na promotorsko področje gena *ydjM*.

YdjM je doslej edini znani protein, ki se najverjetneje nahaja v membrani bakterijske celice in njegovo sintezo uravnava glavni regulator odziva SOS, LexA. Ali je protein YdjM odgovoren za vezavo podvojenega kromosoma na membrano, še ni znano.



Slika 18: Elektronska mikroskopija *E. coli*. **A:** Sev AB1157 v logaritemski fazi rasti. Temne pike so ribosomi. Na območjih brez ribosomov se nahaja kromosom. **B:** Celice seva AB1157, tretirane z nalidiksično kislino, 30 min po indukciji SOS. Kromosom se reorganizira in pripne na membrano (Levin-Zaidman in sod., 2000).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Plazmidi

Preglednica 1: Plazmidi.

Plazmid	Pomembne genotipske lastnosti	Reference
pKCT1	Fragment <i>TaqI</i> plazmida pCU19 (<i>Ap</i> ^r), kloniran v pColK-K235. pColK-K235 ima gen za kolicin K. <i>Ap</i> ^r je bila zamenjana s <i>Tc</i> ^r .	Mulec in sod., 2003
pKCT3	Plazmid ima gene <i>cka-gfp</i> , <i>cki</i> , <i>ckl</i> , <i>Ap</i> ^r ter restriksijsko mesto <i>KpnI</i> .	Mulec in sod., 2003
pKCT3-Up2	pKCT1 z restriksijskim mestom <i>KpnI</i> , delecijo sekvenc <i>IS2</i> ter mutacijo na 5' in 3' vezavnih mestih proteina LexA.	Mrak in sod., 2007
pKCT3-Up3	pKCT1 z restriksijskim mestom <i>KpnI</i> , delecijo sekvenc <i>IS2</i> ter mutacijo na vseh treh vezavnih mestih proteina LexA.	Mrak in sod., 2007
pRW50	Vektor s fuzijo <i>lacZ</i> za kloniranje promotorjev. Vsebuje restriksijska mesta <i>EcoRI</i> in <i>HindIII</i> . Geni <i>lac</i> so pod ekspresijo promotorja, ki se nahaja poleg mesta <i>HindIII</i> . V našem primeru je bil to gen <i>cka</i> .	Lodge in sod., 1992
pRW50cka	pRW50 s promotorskim področjem gena <i>cka</i> , spojenim s poročevalskim genom <i>lacZ</i> brez lastnega promotorja.	Butala, 2009
pKD46	pINT z <i>araC-P_{araB}</i> ter geni rekombinaze bakteriofaga λ , λ Red: γ , β in <i>exo</i> .	Datsenko in Wanner, 2000
pKD4	pANTS s <i>kan</i> , povezano s FRT	Datsenko in Wanner, 2000

3.1.2 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi. Podčrtani deli zaporedij prilegajo na kromosomske gen, katerega smo želeli inaktivirati z uporabo metode produktov PCR – sistema λ Red.

Začetni oligonukletidi	Nukleotidno zaporedje 5'-3'
YdjM_UP_Red	<u>GCCGAGCTGACGCCGTGCTGGCACAGGGTGACTGGGTGTAGGCT</u> GGAGCTGCTTC
YdjM_DOWN_Red	<u>CATCCATACCGACCAGACAAATAATGCCATGCAGATCATATGAAT</u> ATCCTCCTTAG
YdjM_PCR	GAAAGAGTTACACCGTCACC
Keio2kn	CGGTGCCCTGAATGAAGTGC

3.1.3 Bakterijski sevi

Preglednica 3: Laboratorijski sevi *E. coli*.

Sev	Pomembne genotipske lastnosti	Referenca
DH5α	Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1	Novagen, pET System Manual, 2005
JW0780	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔybiH768::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW0797	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ Δdps-784::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Keio in sod., 2009
JW1889	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔaraF751::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW2669	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔrecA774::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW3196	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔdcuD755::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW3368	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔompR739::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW3579	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔlldR788::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW3877	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 ΔrhaR766::kan hsdR514	Baba in sod., 2006
JW3933	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 ΔoxyR749::kan hsdR514	Baba in sod., 2006
JW4361	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔcreB723::kan	Baba in sod., 2006
JW5281	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔydiM727::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW5702	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ Δcrp-765::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
JW5946	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(:rrnB-3) λ ⁻ ΔgntR769::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Baba in sod., 2006
RW 118	thr-1 araD139Δ(gpt-proA)62 lacYI tsx-33 supE44 galK2 hisG4 rpsL31 xyl-5 mtl-1 argE thi-1 sulA211	Page in sod., 1990

3.1.4 Kemikalije

agar	Merck, Nemčija
agaroza	Roth, Nemčija
ampicilin	Sigma, ZDA
CaCl ₂	Merck, Nemčija
ciprofloksacin	Sigma, ZDA
dinatrijev hidrogen fosfat – anhidrat Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
dNTP mix	MBI Fermentas, Litva
etanol	Merck, Nemčija
etidijev bromid	Sigma, ZDA
glicerol	Sigma, ZDA
glukoza	Sigma, ZDA
gojišče LB	Roth, Nemčija
kalijev klorid KCl	Merck, Nemčija
kanamicin	Sigma, ZDA
kloroform	Sigma, ZDA
lestvica 1 kb	Fermentas, Litva
lestvica 100 bp	Fermentas, Litva
LB	Roth, Nemčija
magnezijev sulfat – heptahidrat MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck, Nemčija
mitomicinC	Sigma, ZDA
Na ₂ CO ₃	Merck, Nemčija
NaDS	Sigma, ZDA
nalidiksična kislina	Sigma, ZDA
natrijev dihidrogen fosfat – monohidrat NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Merck, Nemčija
»PCR Master Mix (2×)«	Fermentas, Litva
poli-L-lizin	Sigma, ZDA
SOB	Roth, Nemčija
tetraciklin	Sigma, ZDA
β-merkaptoetanol	Merck, Nemčija

3.1.5 Oprema

- Aparatura za PCR:
 - Biometra UNO II (Biometra, Nemčija)
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Kanada)
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga (BECKMAN J2-21 MIE Centrifuge, Beckman Coulter, ZDA)
- Centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Švica)

- Elektroforeza 2301Macrodrive 1 (LKB Bromma, Švedska)
- Elektroporator 2510 (Eppendorf, Nemčija)
- Kopel-stresalnik The Belly Dancer (Stovall, Life Science, inc., ZDA)
- Mikroskop Axio Imager Z.1 (Zeiss, Nemčija)
- Mikroskop Carl Zeiss Axiovert 135 (Zeiss, Nemčija)
- Namizna centrifuga (Eppendorf centrifuge 5417C, Eppendorf, Nemčija)
- Shimadzu UV-201 PC UV/VIS Scanning Spectrometer (SHIMADZU, Japonska)
- Stresalna kopel (Stoval Life Science, ZDA)
- Stresalnik (Infors H, Švica)
- Ultrazvočni razbijalec VCX 130 (Sonics & Materials, ZDA)
- UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer, Kanada)
- Vibracijski stresalnik EV 100 (Tehtnica, Slovenija)
- Vibracijski stresalnik Lab dancer (IKE-WERKE, Nemčija)
- Vroča kopel LKB – »Multi temp II« (Pharmacia Biotech, ZDA)

3.1.6 Gojišča

3.1.6.1 Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)

Tekoče gojišče LB vsebuje 10 g triptona, 10 g NaCl, 10 g kvasnega ekstrakta na 1 L destilirane vode. Uporabili smo LB proizvajalca Roth (Nemčija). Po navodilih slednjega smo v 1 L vode dali 25 g LB. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min.

3.1.6.1 Tekoče gojišče z ustreznimi antibiotiki

Postopek priprave tekočega gojišča LB z ustreznimi antibiotiki je enak postopku priprave tekočega gojišča LB, le da smo po avtoklaviraju LB gojišču dodali ustrezno količino določenega antibiotika. Delovne koncentracije uporabljenih antibiotikov v LB gojišču:

- Ampicilin [Ap] 100 µg/mL
- Kanamicin [Km] 50 µg/mL
- Tetraciklin [TC] 25 µg/mL

3.1.6.2 Trdno gojišče LB

Trdno gojišče LB vsebuje poleg vseh sestavin tekočega gojišča LB (v enakih koncentracijah) še agar (15 g agarja na 1 L destilirane vode). Sterilizirali smo z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min. Po ohladitvi na 55 °C smo gojišče aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.6.3 Trdno gojišče LB z ustreznimi antibiotiki

Postopek priprave trdnega gojišča LB z ustreznimi antibiotiki je enak postopku priprave tekočega gojišča LB, le da smo po avtoklaviraju LB gojišču dodali ustrezno količino določenega antibiotika. Delovne koncentracije uporabljenih antibiotikov v LB gojišču so enake kot koncentracije antibiotikov v tekočih gojiščih.

3.1.6.4 Mehko gojišče LB

Mehko gojišče LB vsebuje enake sestavine kot trdo gojišče LB, razlika je v koncentraciji agarja. Za pripravo mehkega gojišča LB smo dali namesto 15 g le 6 g agarja na 1 L destilirane vode. Pred avtoklaviranjem smo gojišče segreli tako, da se je ves agar raztopil ter ga razpipetirali v epruvete po 3,5 mL.

3.1.6.5 Tekoče gojišče SOB

Tekoče gojišče smo pripravili iz že pripravljenega SOB, proizvajalca Roth, Nemčija. Po navodilih slednjega smo v 1 L vode dali 30,7 g SOB. Gojišče je vsebovalo sestavine v sledečih koncentracijah: 2-odstotni tripton, 10 mM NaCl, 0,5-odstotni kvasni ekstrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min.

3.1.6.6 Tekoče gojišče SOC

Postopek priprave tekočega gojišča SOC je enak postopku priprave tekočega gojišča SOB, le da smo po avtoklaviraju tekočemu gojišču SOC dodali glukozo v končni koncentraciji 20 mM.

3.1.7 Raztopine

3.1.7.1 Raztopine za agarozno gelsko elektroforezo

Pufer TBE (5×)

0,45 M Tris-borat

10 mM EDTA

Nanašalni elektroforezni pufer (6×)

0,25-odstotni bromfenol modro (m/v)

0,25-odstotni ksilen cianol (m/v)

30-odstotni glicerol (m/v)

3.1.7.2 Raztopine za pripravo kompetentnih celic

CaCl₂, Tris-glicerol

10 mM Tris-HCl (pH 7,0)

50 mM CaCl₂

10-odstotni glicerol (m/v)

Dapa T. Identifikacija nepoznanih proteinov, ki uravnavajo odziv SOS bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2010

3.1.7.3 Raztopine za izvedbo beta galaktozidaznega testa

<u>Z pufer (pH 7.0)</u>	<u>Start reagent</u>	<u>Stop reagent</u>
60 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4-odstotni <i>ortho</i> -nitrofenil-β-	1M Na ₂ CO ₃
40 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	D-galaktopranosid (ONPG)	
10 mM KCl	(m/v)	
1 mM MgSO ₄		
50 mM β-merkaptopetanol		

<u>Kloroform</u>	<u>NaDS</u>
	0,1-odstotni NaDS

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija plazmidne DNA

Za izolacijo plazmidne DNA smo uporabili komplet »GenJET Plasmid Miniprep Kit« (Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca.

3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Velikost, čistost in izolacijo pridobljenih vzorcev DNA smo preverili v 1-odstotnem agaroznem gelu, kateremu smo dodali etidijev bromid v končni koncentraciji 0,5 µg/mL. Elektroforeza je tekla v 0,5× pufru TBE. Uporabili smo lestvico znanih velikosti fragmentov DNA λ/PstI. Pripravili smo jo z DNA bakteriofaga λ; le-temu smo dodali encim PstI (1 U encima PstI/mg DNA). Zmes smo inkubirali 2 uri pri 37 °C. Poleg lestvice DNA λ/PstI smo uporabili tudi lestvici fragmentov 100 bp in 1 kb (Fermentas, Litva).

3.2.3 Čiščenje DNA iz agaroznega gela

Za čiščenje DNA iz agaroznega gela smo uporabili komplet »QIAQuick Gel Extraction Kit« (Qiagen, ZDA). DNA smo očistili po navodilih proizvajalca, čiščeno DNA smo do uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.4 Priprava kompetentnih celic

V 10 mL tekočega gojišča LB smo nacepili kolonijo izbranega seva (za transformacijo) in nacepljeno gojišče inkubirali na stresalniku (250 obr./min) pri 37 °C preko noči. Naslednji dan smo z 200 µL prekonočne kulture inokulirali 50 mL svežega tekočega gojišča LB. Inokulirano gojišče smo stresali pri 37 °C pri 250 obr./min in vsako uro merili optično gostoto pri 600 nm (OD₆₀₀). Ko je bila vrednost OD₆₀₀ med 0,3 in 0,5, smo 34 mL kulture odpipetirali v ohlajene centrifugirke, ter jih inkubirali 10 min na ledu. Nato smo centrifugirali 10 min pri 4000 obr./min in 4 °C, da so se celice usedle na dno centrifugirke. Supernatant smo odstranili in usedlino resuspendirali v 7 mL ledeno hladnega 0,1M CaCl₂. Po 10 minutni inkubaciji na ledu smo ponovno centrifugirali 10 min pri 4000 obr./min in 4 °C. Po odstranitvi supernatanta smo usedlino ponovno resuspendirali v 1,4 mL ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂. Suspenzijo celic smo razdelili v eppendorfove epruvetke, v vsako po 100 µL, ter suspenziji dodali 23 µL 87-odstotni glicerol, ki je krioprotektant. Do uporabe smo pripravljene kompetentne celice hranili pri -80 °C.

3.2.5 Transformacija kompetentnih celic

V 100 µL kompetentnih celic smo dodali med 2 do 5 µL izolirane plazmidne DNA. Transformacijsko mešanico smo inkubirali 30 min na ledu in jo nato za 90 s izpostavili temperaturi 42 °C. Sledila je ponovna inkubacija na ledu za 2-3 min. Mešanici smo dodali 400 µL segretega tekočega gojišča LB, inkubirali na stresalniku pri 37 °C med 45 min in 1 h. Čas inkubacije smo določili glede na odpornost proti antibiotiku – transformante z

odpornostjo proti ampicilinu smo gojili 45 min, transformante s preostalimi odpornostmi pa 1 h. Po inkubaciji smo transformante razmazali na plošče z gojiščem LB z ustreznim antibiotikom (glede na gen za rezistenco, prisoten v plazmidni DNA). Preko noči smo plošče inkubirali pri 37 °C.

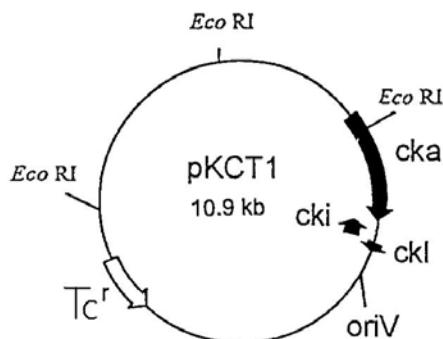
3.2.6 Detekcija fluorescence GFP (Green fluorescent protein) v plazmidu s fuzijo *cka-gfp*

S tremi različicami plazmida, v katerih je gen *cka* spojen z GFP (pKCT3, pKCT3-Up2 ter pKCT3-Up3), smo transformirali različne seve bakterije *E. coli*, ter jih nato nacepili na selekcijska gojišča (LB Ap) in selekcijska gojišča z dodatkom 4 ng/mL ciproflokacinom (LB Ap Cipro), ki deluje kot induktor odziva SOS. Z UV svetlobo smo nato ugotavliali, katere transformante sintetizirajo »zeleno fluorescenčni protein« ter kako močno fluorescirajo. Fluorescencija je znak za prepis *cka-gfp* ter posledično aktivnost odziva SOS.

3.2.7 Določanje sinteze kolicinov

Za test smo uporabili plazmid pKCT1 (Slika 19), v katerem je operon kolicina K (*cka*, *ckl*, *cki*). Izražanje gena za kolin K (*cka*) je uravnavano z represorjem LexA, *cka* se izrazi tekom odziva SOS. Ker sinteza kolicinov vodi v sintezo proteina lize (*ckl*) - celično smrt, bakterije začno sintetizirati kolicine kot zadnje produkte odziva SOS.

Transformante s plazmidom pKCT1, smo nacepili v tekoče gojišče LB. Po prekonočni inkubaciji s stresanjem pri 37 °C, smo kulturo precepili v sveže tekoče gojišče LB. Pri OD₆₀₀ ~ 0,3 smo kulture inducirali s ciproflokacinom [4 ng/mL]. Po prekonočni inkubaciji smo odvzeli 1 mL bakterijske kulture, ter celice razbili s sonikatorjem (40-odstotni Ampl, 20 s). Nato smo vzorce 5 min centrifugirali pri 14000 obr./min in tako ločili razbite celice, ki so se posedle na dno, od kolicina, ki je ostal v supernatantu.



Slika 19: Plazmid pKCT1, z operonom za kolin K ter determinanto za odpornost proti tetraciklinu (Tc^R).

Plošče LB smo prelili z mehkim agarjem, v katerega smo nacepili 200 µL indikatorskega seva DH5α pBR322, ki je občutljiv za kolin K in ima plazmid pBR322 z odpornostjo proti antibiotikoma Ap ter Tc. Nato smo na ploščo nakapljali 5 µL različnih redčitev supernatanta. Nanesli smo 0×, 2×, 4×, 8×, 100×, ter 10.000× redčen supernatant. Redčitve smo pripravili v tekočem gojišču LB. Plošče smo preko noči inkubirali pri 37 °C.

Dapa T. Identifikacija nepoznanih proteinov, ki uravnavajo odziv SOS bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2010

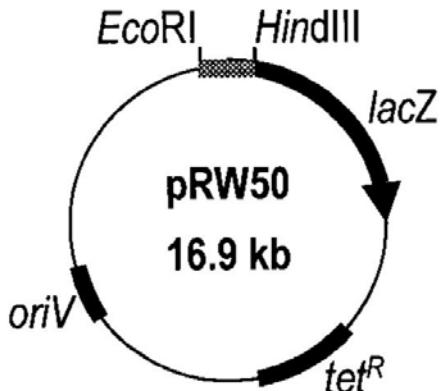
Istočasno smo naredili test števila bakterij. Redčitve 10^{-7} , 10^{-8} in 10^{-9} smo nacepili na trdo gojišče LB z ustreznimi antibiotiki in kasneje izračunali CFU.

3.2.8 β – Galaktozidazni test

β -galaktozidazni test je eden od klasičnih kolorimetričnih testov, s katerim preučujemo izražanje poročevalskega gena *lacZ* z zapisom za β -galaktozidazo brez lastnega promotorja. To metodo je kot prvi opisal Miller (1972), mi pa smo uporabili malo spremenjeno različico, saj smo celice spirali z pufrom Z in tako preprečili, da bi različni viri ogljika iz gojišča, v katerem smo gojili bakterije, vplivali na naše rezultate. S testom na neposreden in enostaven način merimo encimsko aktivnost. β -galaktozidaza je encim, ki hidrolira β -D-galaktozidazo. Molekule β -D-galaktozidaze pretvorí v eno molekulo glukoze in eno molekulo galaktoze, s katerima so bakterije sposobne rasti.

V tem testu smo namesto β -D-galaktozidaze uporabili kromogenično spojino *o*-nitrofenil- β -D-galaktopranosid (ONPG); le-to encim pretvorí v galaktozo in *o*-nitrofenol. ONPG je brezbarven, medtem ko je njegov produkt, *o*-nitrofenol, rumene barve, katero izmerimo pri OD 420 nm.

Za izvedbo slednjega testa, smo bakterijska seva JW1889 ter JW3933 transformirali s plazmidom pRW50cka (Slika 20). Slednji ima restriktionski mesti za *Eco*RI in *Hind*III ter poročevalski gen *lacZ* brez lastnega promotorja. V našem primeru je ob mestu *Hind*III bilo spojeno promotorsko področje gena *cka*, ki je uravnaval izražanje poročevalskega gena *lacZ*.



Slika 20: Plazmid pRW50 je vektor za *in vivo* preiskave. Plazmid ima dve restriktionski mesti *Eco*RI in *Hind*III, gen *lacZ*, mesto za začetek podvajanja *oriV*, ter odpornostjo proti tetraciklinu. V našem primeru je bil v plazmid kloniran promotor gena *cka*, ki se je aktiviral ob odzivu SOS, ter tako sprožil prepis gena *lacZ*.

Transformante, s plazmidom pRW50cka, smo nacepili v tekoče gojišče LB. Za rastno krivuljo smo prekonočno kulturo precepili v 30 mL tekočega gojišča LB s tetraciklinom. Pri OD₆₀₀ ~ 0,2 smo v eni izmed vzporednih kultur inducirali odziv SOS z mitomicinom C v končni koncentraciji 250 µg/mL, 500 µg/mL, vodikovim peroksidom ali obojem hkrati. Vzorčke smo odvzemali na uro od točke OD₆₀₀ ~ 0,2, sedem ur, ter po prekonočni

inkubaciji. Vzorčkom smo izmerili OD₆₀₀, ter jih pred uporabo zamrznili. Ob uporabi smo vzorčke odtalili in centrifugirali 5 min pri 13000 obr./min. Odstranili smo supernatant in usedlino resuspendirali v pufru Z. Ponovili smo spiranje z pufom Z. Suspenziji smo dodali 28 µL kloroforma in 14 µL 0,1-odstotni NaDS-a ter mešali na vorteksu 15 sekund. Lizate smo 10× ali 50× redčili, inkubirali 5 min pri 28 °C, dodali začetni reagent, 200 µL OMPG, ter merili čas reakcije. Ko se je barva spremenila v rumeno, smo reakcijo ustavili z dodatkom 500 µL 1 M Na₂CO₃. Slednji dvigne vrednost pH v mešanici na 11 in s tem inaktivira encim β-galaktozidazo. Nato smo izmerili OD pri 420 nm ter 550 nm. Za kontrolo smo uporabili 1 mL pufra Z. Do končnega rezultata smo prišli z izračunom po enačbi:

$$U = \frac{OD_{420} - (1,75 \times OD_{550})}{t \times redčitev \times OD_{600}} \quad \dots(1)$$

- OD₄₂₀ in OD₅₅₀ reakcijske mešanice
- OD₆₀₀ optična gostota bakterijske kulture
- t čas reakcije v sekundah
- redčitev je vrednost, ki smo jo uporabili za pripravo reakcijske mešanice

3.2.9 Priprava elektrokompotentnih celic

V 50 mL svežega tekočega LB smo nacepili prekonočno kulturo do končne koncentracije 1-odstoka in jo pustili rasti do OD₆₀₀ ~ 0,5 pri 37 °C. Nato smo celice inkubirali na ledu 15 min, jih centrifugirali 15 min pri 4000 obr./min pri 4 °C. Usedlino smo resuspendirali v 50 mL ledeno hladne destilirane vode in spiranje ponovili še dva krat. Celice smo po spiranju resuspendirali v 80 µL 10-odstotnega glicerola. Razpipetirali smo jih po 40 µL (končna koncentracija celic je bila 10¹¹ cel./mL) v sterilne eppendorf epruvetke in jih do uporabe shranili pri -80 °C.

3.2.10 Elektroporacija

40 µL elektrokompotentnih celic smo dodali 1 µL DNA (10 pg v vodi), s katero smo želeli transformirati celice ter jih nežno premešali s pipetiranjem. Mešanico smo prestavili v sterilno kiveto za elektroporacijo in jo vstavili v elektroporator, ter jih izpostavili napetosti 1,700 V za 5 ms. Nato smo celicam dodali 1 mL svežega segretega tekočega gojišča SOC in inkubirali 1 h pri 37 °C s stresanjem. Transformante smo razmazali na plošče LB z ustreznim antibiotikom.

3.2.11 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Sestava zmesi za verižno reakcijo s polimerazo – DNA-polimeraza *Pfu*:

1 µL plazmidne DNA (100 ng)
 po 1 µL začetni oligonukleotidi (0,1 nM)
 2 µL dNTP (0,2 µL nM, Fermentas, Litva)
 0,5 µL DNA-polimeraze *Pfu* (Promega, ZDA)
 5 µL 2×Pufer za polimerazo *Pfu* (Promega, ZDA)
39,5 µL dH₂O
 50 µL

Sestava zmesi za verižno reakcijo s polimerazo – mešanica master mix:

1 µL plazmidne ali kromosomske DNA (100 ng)
 po 1 µL začetni oligonukleotidi (0,1 nM)
 25 µL 2×PCR master mix Dream TaqTM Green (Fermentas, Litva)
22 µL dH₂O
 50 µL

Pomnoževanje 1,6 kb dolgega odseka plazmida pKD4 (Datsenko in Wanner, 2000):

začetna denaturacija	94 °C	3 min	} 30 ciklov
	94 °C	30 s	
	55 °C	30 s	
	72 °C	3 min 30 s	
zaključno podaljševanje	72 °C	7 min	
shranjevanje produkta	4 °C	∞	
do uporabe			

Kontrola uspešnosti inaktivacije kromosomskih genov:

začetna denaturacija	97 °C	3 min	} 30 ciklov
	97 °C	30 s	
	55 °C	30 s	
	72 °C	60 s	
zaključno podaljševanje	72 °C	7 min	
shranjevanje produkta	4 °C	∞	
do uporabe			

3.2.12 Inaktivacija kromosomskih genov bakterije *Escherichia coli* z uporabo produktov PCR

Uporabili smo metodo inaktivacije kromosomskih genov bakterije *E. coli* s produktom PCR, saj smo žeeli sevu RW118 inaktivirati gen *ydjM* (začetni oligonukleotidi: YdjM_UP_Red in YdjM_DOWN_Red).

Seve smo transformirali s termosensibilnim plazmidom pKD46. Transformante smo gojili pri 28 °C. Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili kanamicinsko kaseto v plazmidu pKD4. Transformante s plazmidom pKD46 smo nato gojili v tekočem gojišču, pri 28 °C, z dodatkom ampicilina in L-arabinoze, do OD₆₀₀ ~ 0,6. Pripravili smo elektrokompetentne celice in jih transformirali s pomnoženim delom pKD4, katerega dolžino (1,6 kb) smo določili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze ter DNA izrezali iz gela ter jo očistili. Po elektroporaciji smo celice gojili na ploščah LB z dodatkom kanamicina v končni koncentraciji 25 µg/mL. Za kontrolo uspešnosti inaktivacije kromosomskih genov smo sestavili začetne oligonukleotide, ki so se z enim delom prilegali v gen za rezistenco proti kanamicinu, z drugim pa na spodnji del gena, katerega smo inaktivirali. Dobljene kolonije smo precepili v tekoče gojišče LB z dodatkom kanamicina v končni koncentraciji 50 µg/mL, ter jih testirali s PCR (za inaktivacijo gena *ydjM*: YdjM_PCR in Keio2kn).

3.2.13 Svetlobna in fluorescenčna mikroskopija

Fluorescenčno mikroskopijo celic bakterije *E. coli* smo opravili na mikroskopu Axio Imager Z.1 (Zeiss), s kamero HRc. Mikroskop je razširjen s sistemom ApoTome (Zeiss) za optimizacijo fluorescenčne mikroskopije. Za svetlobno mikroskopijo smo uporabili Carl Zeiss Axiovert 135 mikroskop (Zeiss).

Za fluorescenčno mikroskopijo smo uporabili fluorescenčno barvilo akridin oranž ter izbrali set filtrov FS09 za modro območje svetlobnega spektra.

Bakterijske celice *E.coli* smo po prekonočni rasti precepili v sveže gojišče LB. Ko so zrasle do OD₆₀₀ ~ 0,3, smo v bakterijskih celicah inducirali odziv SOS z dodatkom 100 µg/mL nalidiksične kisline. Vzorčili smo 1 mL kulture po 15 min, 30 min, 60 min, 90 min ter 120 min. Nato smo vzorce koncentrirali s centrifugiranjem (5 min, 14.000 obr./min), odstranili supernatant in usedlino resuspendirali v 100 µL tekočega gojišča LB. Na objektno stekelce smo nanesli 7 µL 0,1-odstotnega (m/v) poli-L-lizina, ki zaradi svojega pozitivnega naboja veže nase negativno nabite bakterijske celice in jih pritrdi na preparat. Na plast poli-L-lizina smo nanesli 5 µL bakterijske suspenzije, slednjo pa prekrili s krovnim stekelcem. Za fluorescenčno mikroskopijo smo uporabili 2,2 mM barvilo akridin oranž, katero smo pred mikroskopiranjem dodali na rob krovnega stekla (10 µL). Barvilo je s kapilarnim tokom prešlo v preparat.

4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA DODATNEGA DEJAVNIKA TRANSKRIPCIJE, KI POLEG LexA URAVNAVA IZRAŽANJE GENA *cka*

Za identifikacijo dodatnega dejavnika transkripcije, ki poleg LexA uravnava izražanje gena *cka* smo uporabili seve z okvarami v genih, ki nastajajo ob indukciji odziva SOS. Uporabili smo naslednje seve: JW1889 (*araF*), JW2669 (*recA*), JW0780 (*ybiH*), JW5946 (*gntR*), JW5702 (*crp*), JW3368 (*ompR*), JW3933 (*oxyR*), JW3877 (*rhaR*), JW3579 (*lldR*), JW0797 (*dps*), JW3196 (*dcuD*) in JW4361 (*creB*). Izrani sevi imajo okvarjene dejavnike transkripcije, katerih izražanje je inducirano tekom odziva SOS, posledično lahko uravnava izražanje SOS genov (Khil in Camerini-Otero, 2002). Ti dejavniki transkripcije niso neposredno uravnnavani z represorjem LexA. Seve smo transformirali s 3 plazmidji (pKCT3, pKCT3-Up2 in pKCT3-Up3) z različnimi promotorji, spojenimi s poročevalskim genom *gfp* brez lastnega promotorja. Pri transformantah omenjenih sevov smo pod UV opazovali izražanje fuzije *cka-gfp*.

Uporabili smo plazmid pKCT3, ki predstavlja osnovno različico plazmida, saj nima okvarjenih mest vezave dveh dimerov represorja LexA na operatorski mesti gena *cka*. Na operatorju plazmid pKCT3-Up2 se lahko veže en dimer represorja LexA, medtem ko ima plazmid pKCT3-Up3 okvarjena oba operatorja za vezavo LexA. Z dodanim antibiotikom ciprofloksacinom smo aktivirali odziv SOS. Pri plazmidih, z okvarjenima vezavnima mestoma represorja LexA, je izražanje gena *gfp* pod kontrolo promotorja gena *cka* konstitutivna, ter je tako pod UV svetlobo vidna prisotnost reporterskega proteina Gfp.

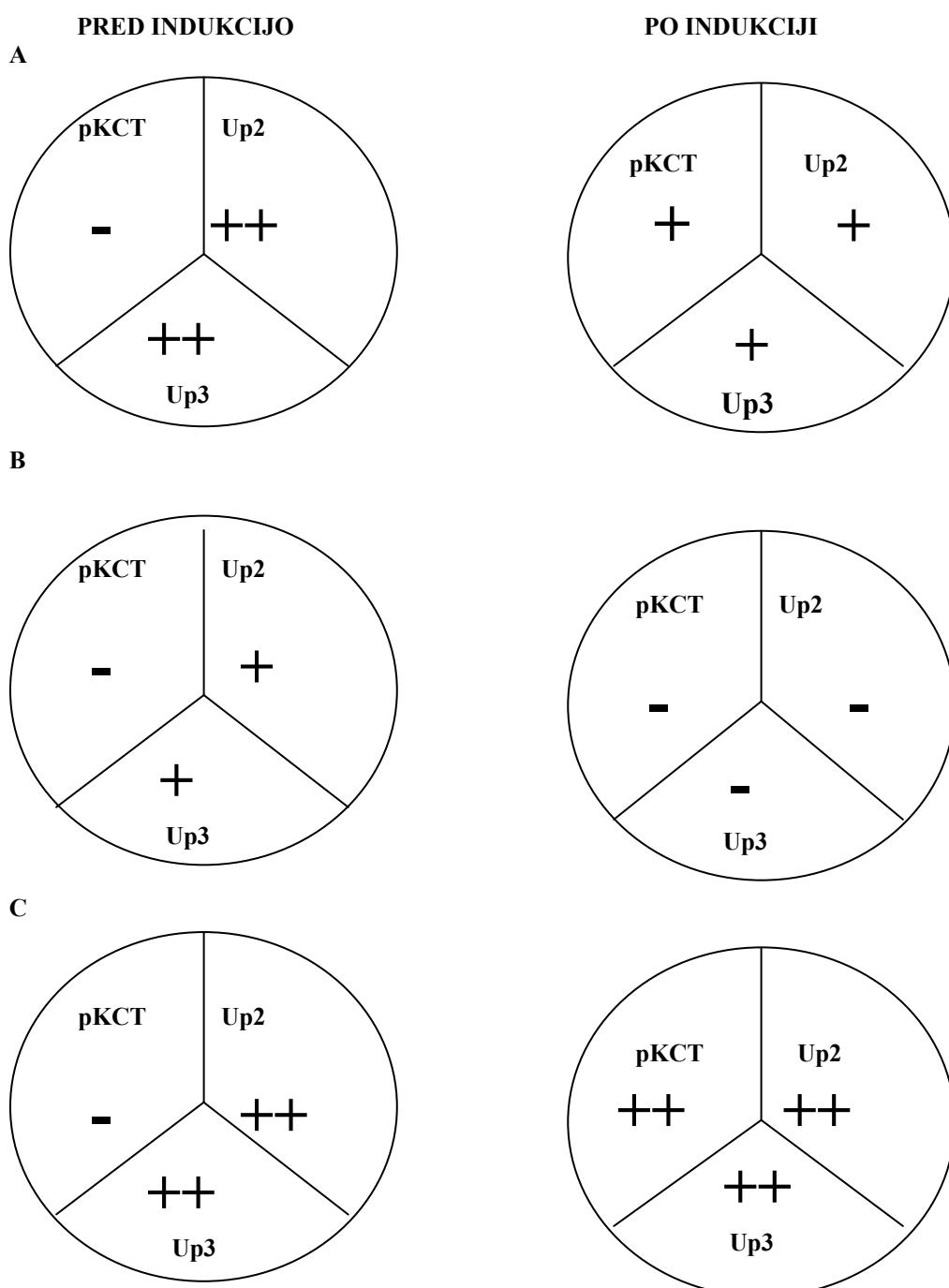
Kot sev divjega tipa smo uporabili sev iz zbirke Keio JW1889, ki smo ga transformirali z zgoraj opisanimi plazmidji. Pred indukcijo so pod UV svetlobo svetile kolonije s plazmidoma pKCT3-Up2 ter pKCT3-Up3, saj zaradi okvare vezavnih mest represorja LexA v genu *cka*, represor ni utišal gena *cka*. Po indukciji z aktivacijskim dejavnikom SOS, antibiotikom ciprofloksacinom (v subinhibitornih koncentracijah), so bakterije sevov JW1889 s pKCT3-Up2 ali pKCT3-Up3 sintetizirale občutno manj (Slika 21A) Gfp, šibko aktivnost promotorja gena *cka* pa zaznamo tudi v sevu JW1889 pKCT3. Represor LexA ne uravnava izražanja gena *cka* v konstraktu pKCT3-Up3, zato znižanje sinteze Gfp v tem konstraktu po indukciji odziva SOS nakazuje na prisotnost dodatnega proteina, ki uravnava izražanje gena *cka*. Predpostavili smo, da poleg LexA obstaja dodatni dejavnik transkripcije, ki se sintetizira med odziva SOS z LexA in utiša izražanje gena *cka*.

Kot kontrolo smo uporabili sev z okvarjenim genom *recA*, JW2669. RecA zazna enoverižno DNA in deluje kot senzor za sprožitev inaktivacije LexA, sprožitev odziva SOS. Razmerje aktivnosti promotorja *cka* v konstraktu pKCT3 in njegovima različicama je bilo pred indukcijo primerljivo s sevom divjega tipa, po indukciji, pa je bila utišana tudi fluorescensa pri kolonijah s plazmidom pKCT3 (Slika 21B). Slednji rezultati nakazujejo, da antibiotiki, ki poškodujejo DNA, vplivajo na izražanje gena *cka*, neodvisno od genov regulona LexA. Zato smo preučili dejavnike transkripcije, katerih sinteza se aktivira med stresnim odzivom SOS (Khil in Camerini-Otero, 2002).

Dapa T. Identifikacija nepoznanih proteinov, ki uravnavajo odziv SOS bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2010

Vsi testirani sevi razen JW3933 (*oxyR*) so imeli aktivnost promotorja gena *cka* pred in po indukciji primerljivo z rezultati prikazanimi na Sliki 21A in 21B. Rezultati za sev JW3933 z okvarjenim genom *oxyR* so prikazani na Sliki 21C. Rezultati kažejo na morebitno vlogo proteina OxyR pri uravnavanju izražanja gena *cka*. V primerih, ko LexA ne more utišati izražanje gena *cka*, saj imata plazmida pKCT3-Up2 ter pKCT-Up3 GFP okvarjeno vezavno mesto zanj, bi lahko OxyR ob indukciji njegove sinteze med odzivom SOS reprimiral izražanje gena za kolicin K.



Slika 21: Izražanje promotorja gena *cka*, spojenega s poročevalskim genom *gfp* brez lastnega promotorja. **A:** Sev JW1889 pred (levo) in po (desno) indukciji. **B:** Aktivnost promotorja gena *cka* v sevu JW2669 (*recA*). Za razliko od seva JW1889 je tu utišanje gena *cka* po indukciji še izrazitejše. **C:** Aktivnost promotorja gena *cka* v sevu JW3933 (*oxyR*). Po indukciji sev z vsemi tremi plazmidi močno izraža reporterski gen *gfp*, kar nakazuje aktivnost gena *cka*.

Legenda:

- ne fluorescira
- + fluorescira
- ++ močno fluorescira

4.2 VPLIV PROTEINA OxyR NA SINTEZO KOLICINOV

Z namenom razjasniti vlogo proteina OxyR pri izražanju gena *cka* smo uporabili test sinteze kolicinov. Sev divjega tipa JW1889 ter njegove razlike z mutiranim genom *oxyR* JW3933 smo transformirali s plazmidom pKCT1 z zapisom za kolin K. Pripravili smo grobe ekstrakte celic, ki so rasle v normalnih in SOS-induciranih pogojih. Določili smo število celic (cfu/ml). Redčitve grobih ekstraktov kolicina K smo nakapljali na predhodno razlite plošče z indikatorsko kulturo *E. coli* DH5 α pBR322. Sev DH5 α pBR322 je občutljiv za vse vrste kolicinov, zato smo opazovali velikost con lize, katere so nastale zaradi delovanja kolicina K.

Po prekonočni inkubaciji smo dobili različne velikosti con liz, katere so povzročili kolicini sintetizirani v sevih JW1889 in JW3933 (*oxyR*⁻). Cone lize so bile do redčitve 8 \times (kolin smo redčili 0 \times , 2 \times , 4 \times , 8 \times , 100 \times ter 10.000 \times , vsi rezultati niso prikazani) približno enake intenzitete pri grobih ekstraktih obeh sevov, pri redčini 100 \times pa smo opazili približno 100 \times močnejšo cono lize pri sevu JW3933 z okvarjenim genom *oxyR*, kot pri divjem tipu. Pri redčini 10.000 \times nismo zaznali con lize za nobenega od obeh sevov (Slika 22). V vseh primerih smo ekstrakt pridobili iz $\sim 10^9$ celic v mililitru kulture.



Slika 22: Občutljivost indikatorskega seva *E. coli* DH5 α pBR322 na kolin K. Na ploščo je bilo nakapljano po 5 μ L različnih redčin ekstrakta kulture s kolinom, pridobljenega iz s ciprofloksacinom induciranih sevov JW1889 pKCT1 in JW3933 (*oxyR*⁻) pKCT1. V zgornjem krogu je cona lize, grobega ekstrakta iz divjega seva JW1889 pKCT1, v spodnjemu krogu pa z grobim ekstraktom seva, ki ima okvarjen gen *oxyR*, JW3933 pKCT1. Grobi ekstrakt je bil redčen 100 \times . Na desnemu delu plošče je bil nakapljan ekstrakt kulture s kolinom, ki je bil redčen 10.000 \times , toda tu cona lize ni bila več opazna. Cona lize povzročena s 100 \times redčenim ekstraktom kulture s kolinom iz seva JW3933 (*oxyR*⁻) pKCT1 je približno 100 \times intenzivnejša kakor tista, povzročena s ekstraktom kulture s kolinom iz seva divjega tipa.

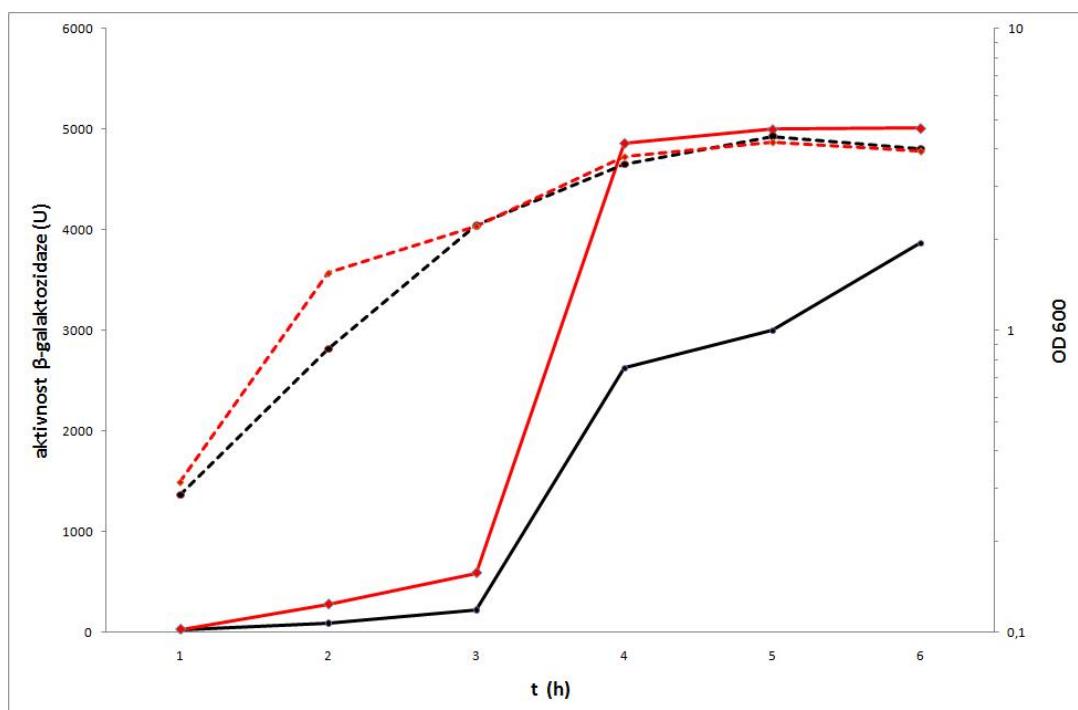
Rezultati sinteze kolin K, so v skladu z rezultati izražanja gena *cka* pridobljenih z detekcijo produkta reporterskega gena *gfp*. Rezultati potrjujejo našo hipotezo, da na izražanje gena za kolin K vpliva dodatni dejavnik transkripcije, morebiti OxyR.

4.3 β – GALAKTOZIDAZNI TEST

Z namenom spremeljanja izražanja promotorja gena *cka* v časovnih intervalih po indukciji odziva SOS smo uporabili test z β -galaktozidazo. Sledili smo aktivnosti promotorja gena *cka*, spojenega s poročevalskim genom *lacZ* brez lastnega promotorja, preko ovrednotenja aktivnosti encima β -galaktozidaze. Testirana seva (JW1889, JW3933) smo transformirali s plazmidom pRW50cka, ki ima gen *lacZ*, uravnан s promotorjem gena *cka*, ter s testom ugotavljal aktivnost promotorja. Test smo večkrat ponovili.

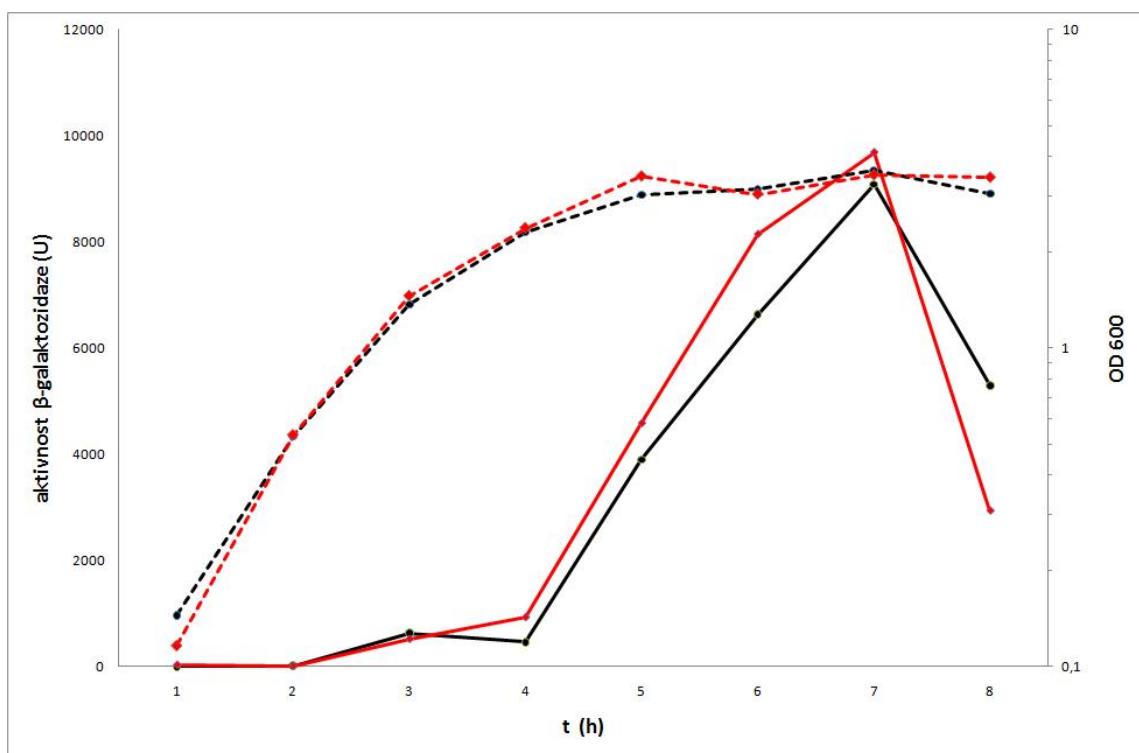
4.3.1 Aktivnost promotorja gena *cka* v sevu divjega tipa in sevu *oxyR*⁻, ob induciranim odzivu SOS

Aktivnost promotorja gena *cka* smo testirali pri dveh koncentracijah antibiotika mitomicina C. Pri nižji koncentraciji uporabljenega antibiotika je uravnavanje izražanja gena *cka* više v sevu z okvarjenim genom *oxyR*. Rezultati kažejo na vlogo gena *oxyR* pri odzivu SOS, kot so to pokazale tudi druge metode.



Slika 23: Izražanje genske fuzije *cka–lacZ* pri indukciji z mitomicinom C (250 µg/mL). Na primarni navpični osi je prikazana β -galaktozidazna aktivnost v Millerjevih enotah, na sekundarni optična gostota bakterijske kulture pri 600 nm. Na vodoravni osi je prikazan čas rasti kulture v urah. Aktivnost seva JW3933 (*oxyR*⁻) je označena z rdečo, neprekinjeno črto, JW1889 pa s črno neprekinjeno črto. S prekinjeno črto je prikazana rastna krivulja JW3933 (rdeča prekinjena črta) in JW1889 (prekinjena črna črta). Za indukcijo z mitomicinom C je bila gostota kulture OD₆₀₀ ~ 0,3.

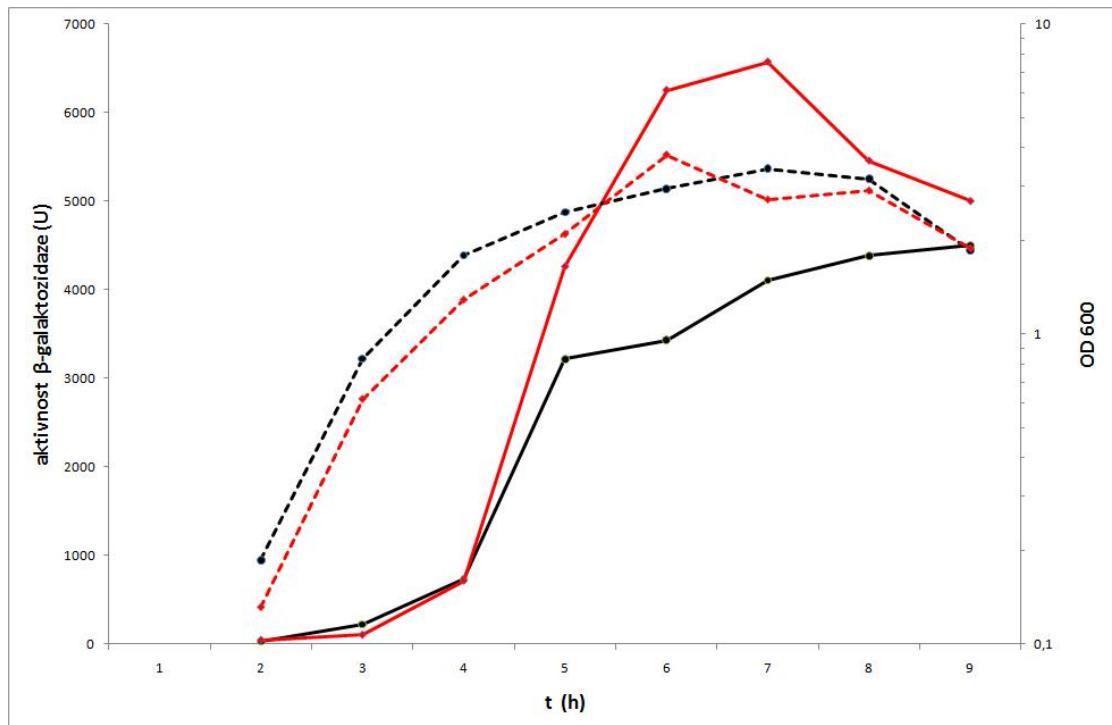
Sledili smo aktivnosti promotorja gena *cka* tudi pri višji koncentraciji mitomicinaC (Slika 24). Višja koncentracija antibiotika izzove več poškodb DNA in močnejšo indukcijo odziva SOS, zaradi tega je razlika v uravnavanju izražanja gena *cka* približno enako pri obeh sevih.



Slika 24: Izražanje genske fuzije *cka–lacZ* pri indukciji z mitomicinom C (500 µg/mL). Na primarni navpični osi je prikazana β -galaktozidazna aktivnost v Millerjevih enotah, na sekundarni optična gostota bakterijske kulture pri 600 nm. Na vodoravni osi je prikazan čas rasti kulture v urah. Aktivnost seva JW3933 (*oxyR*⁺) je označena z rdečo, neprekinjeno črto, JW1889 pa s črno neprekinjeno črto. S prekinjeno črto je prikazana rastna krivulja JW3933 (rdeča prekinjena črta) in JW1889 (prekinjena črna črta). Za indukcijo z mitomicinom C je bila gostota kulture OD₆₀₀ ~ 0,3.

4.3.2 Indukcija z mitomicinom C in vodikovim peroksidom (H_2O_2)

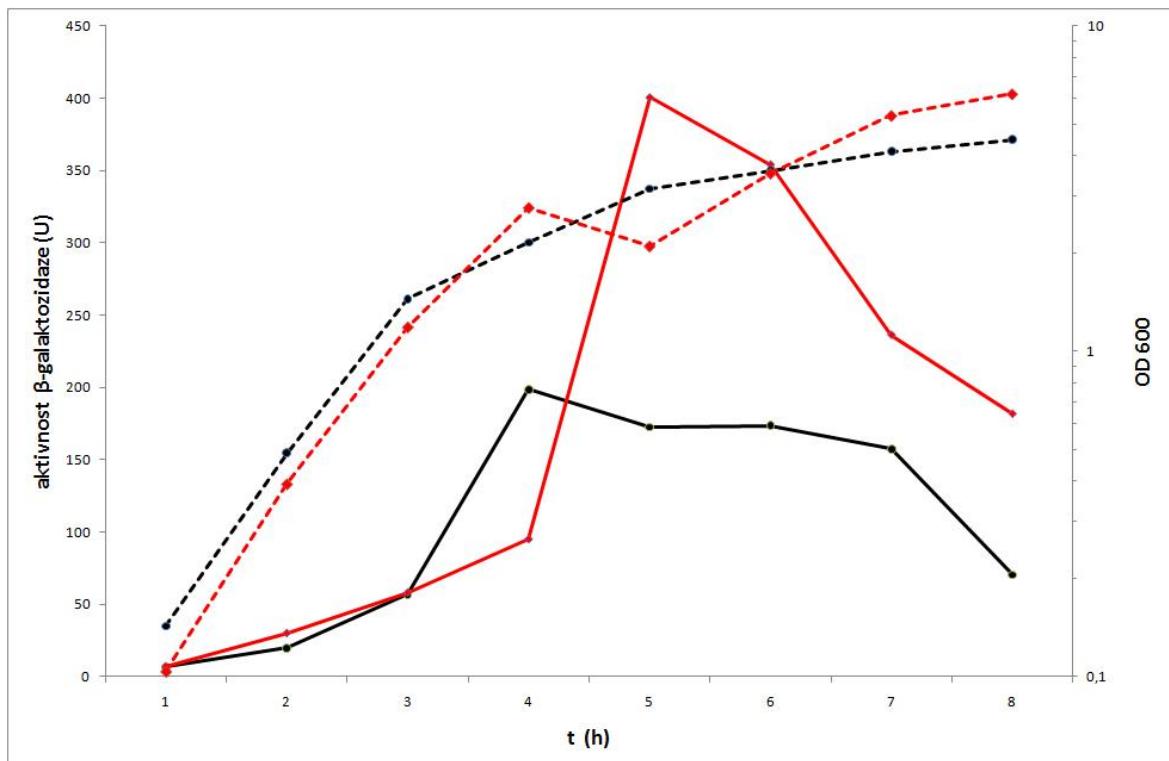
Po indukciji z mitomicinom C (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in vodikovim peroksidom se aktivnosti promotorja gena *cka* za eno tretjino poveča pri sevu JW3933 (*oxyR⁻*) v primerjavi s sevom JW1889 (Slika 25).



Slika 25: Izražanje genske fuzije *cka-lacZ* pri indukciji z mitomicinom C (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in H_2O_2 . Na primarni navpični osi je prikazana β -galaktozidazna aktivnost v Millerjevih enotah, na sekundarni optična gostota bakterijske kulture pri 600 nm. Na vodoravni osi je prikazan čas rasti kulture v urah. Aktivnost seva JW3933 (*oxyR⁻*) je označena z rdečo, neprekinjeno črto, JW1889 pa s črno neprekinjeno črto. S prekinjeno črto je prikazana rastna krivulja JW3933 (rdeča prekinjena črta) in JW1889 (prekinjena črna črta). Za indukcijo z mitomicinom C in H_2O_2 je bila gostota kulture $OD_{600} \sim 0,3$.

4.3.3 Indukcija z vodikovim peroksidom (H_2O_2)

Protein OxyR je ob prisotnosti H_2O_2 , pozitivni regulator vsaj devetih genov v *E. coli*. Žeeli smo proučiti ali lahko s H_2O_2 preko OxyR vplivamo na utišanje promotorja gena *cka*. S slike 26 je razvidno, da ob dodatku H_2O_2 aktivnost promotorja gena *cka* v sevu z okvarjenim genom *oxyR* naraste 2×, v primerjavi z izražanjem v sevu divjega tipa.



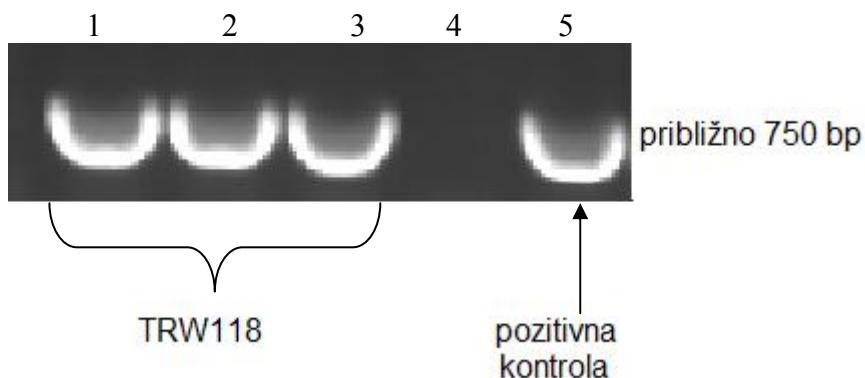
Slika 26: Izražanje genske fuzije *cka-lacZ* pri indukciji s H_2O_2 . Na primarni navpični osi je prikazana β -galaktozidazna aktivnost v Millerjevih enotah, na sekundarni optična gostota bakterijske kulture pri 600 nm. Na vodoravni osi je prikazan čas rasti kulture v urah. Aktivnost seva JW3933 (*oxyR*⁺) je označena z rdečo, neprekinjeno črto, JW1889 pa s črno neprekinjeno črto. S prekinjeno črto je prikazana rastna krivulja JW3933 (rdeča prekinjena črta) in JW1889 (prekinjena črna črta). Za indukcijo s H_2O_2 je bila gostota kulture OD₆₀₀ ~ 0,3.

H_2O_2 aktivira OxyR, in predpostavili smo, da aktivni OxyR v primeru uravnavanja izražanja gena *cka* deluje kot represor.

Rezultati prikazani na Slikah 23-26 kažejo, da ne moremo z gotovostjo reči, ali ima OxyR, oz. nima, direktne vloge na izražanje gena *cka*. Rezultati nakazujejo, da ima OxyR vlogo dodatnega represorja pri uravnavanju izražanja gena za kolicin K. Ne moremo izključiti, da je višja aktivnost promotorja gena *cka* v sevu z okvarjenim *oxyR* posledica obširnejših poškodb DNA v tem sevu. Za potrditev hipoteze, da je OxyR dodatni represor pri uravnavanju izražanja gena za kolicin K, smo poskušali izolirati protein OxyR, da bi ga vezali na tarčna mesta gena *cka*, toda izolacija proteina ni bila uspešna.

4.4 INAKTIVACIJA KROMOSOMSKIH GENOV *Escherichia coli* Z UPORABO PRODUKTOV PCR

Sevu RW118 (*sulA*⁻) smo z metodo inaktivacije kromosomskih genov *Escherichia coli* z uporabo produktov PCR inaktivirali gen *ydjM*. Uspešno inaktivacijo gena *ydjM* smo potrdili s PCR. Novonastali sev smo poimenovali TRW118 (*sulA*⁻ *ydjM*⁻).



Slika 27: Potrditev inaktivacije kromosomskega gena *ydjM* s kontrolno PCR v sevu RW118. **5.** jamica: pozitivna kontrola, testirali smo sev JW5281 iz zbirke Keio, kateremu so predhodno že inaktivirali gen *ydjM* z isto metodo. **4.** jamica: prazna jamica. **3., 2. in 1.** jamica: potrditev inaktivacije gena *ydjM* v sevu RW118, sev TRW118.

4.5 IDENTIFIKACIJA PROTEINA, KI OMOGOČI REORGANIZACIJO KROMOSOMA OB SPROŽITVI ODZIVA SOS

Ob sprožitvi odziva SOS se kromosom v bakteriji *E. coli* s pomočjo proteina RecA pripne na membrano in reorganizira. Predpostavili smo, da represor LexA uravnava izražanje gena (izrazi se le ob indukciji odziva SOS), katerega produkt se veže na membrano in omogoči reorganizacijo kromosoma. Izmed 57 genov *E. coli*, ki jih reprimira protein LexA, je skoraj polovica genov z neznano funkcijo. Med vsemi produkti genov SOS je le za produkt gena *ydjM* bilo dokazano, da je protein membrane. Vloga proteina YdjM še ni znana.

Za analizo vpliva proteina YdjM smo uporabili seve zbirke Keio, JW5281 (*ydjM*⁻), JW1889 (w.t.), JW2669 (*recA*⁻) ter v tej raziskavi pripravljen TRW118 (*sulA*⁻, *ydjM*⁻). Bakterije v začetku eksponentne faze rasti (~ 5×10^8 celic/ml) smo tretirali z nalidiksično kislino ter tako sprožili odziv SOS. V časovnih presledkih po indukciji (15 min, 30 min, 60 min, 90 min ter 120 min,) smo vzorčili. Lokalizacijo kromosoma v različnih sevih smo zaznavali z barvanjem preparatov z barvilom akridin oranž ter preparate mikroskopirali s svetlobno ali/in fluorescentno mikroskopijo.

4.5.1 Svetlobna mikroskopija

S svetlobno mikroskopijo smo proučili nastanek filamentoznih celic po indukciji z nalidiksično kislino, ker se produkt gena SOS SulA veže na FtsZ in prepreči delitev celic.

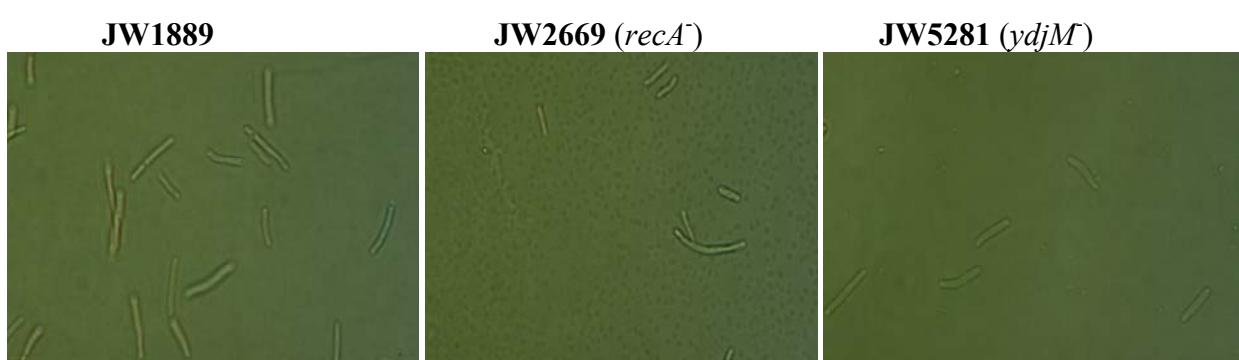
V sevu divjega tipa (JW1889) smo opazili filamentozno rast po 30 minutah po tretiranju z nalidiksično kislino, medtem ko so pri sevu JW2669 (*recA*⁻) le redke celice rastle filamentozno v času 15, 30 in 60 min po indukciji, kar je posledica mutiranega *recA* in zato do odziva SOS v JW2669 ni prišlo. Tudi celice seva JW5281 (*ydjM*⁻) so bile krajše v primerjavi s sevom divjega tipa in so postale filamentozne kasneje v odzivu SOS – po 90 minutah po indukciji. Razlog za to ni znan, rezultat pa nakazuje da ima verjetno produkt gena *ydjM* pomembno vlogo v odzivu SOS.



Slika 28: Sevi *E. coli* posneti s svetlobno mikroskopijo, 15 minut po indukciji.



Slika 29: Sevi *E. coli* posneti s svetlobno mikroskopijo, 30 minut po indukciji.



Slika 30: Sevi *E. coli* posneti s svetlobno mikroskopijo, 60 minut po indukciji.



Slika 31: Sevi *E. coli* posneti s svetlobno mikroskopijo, 90 minut po indukciji.



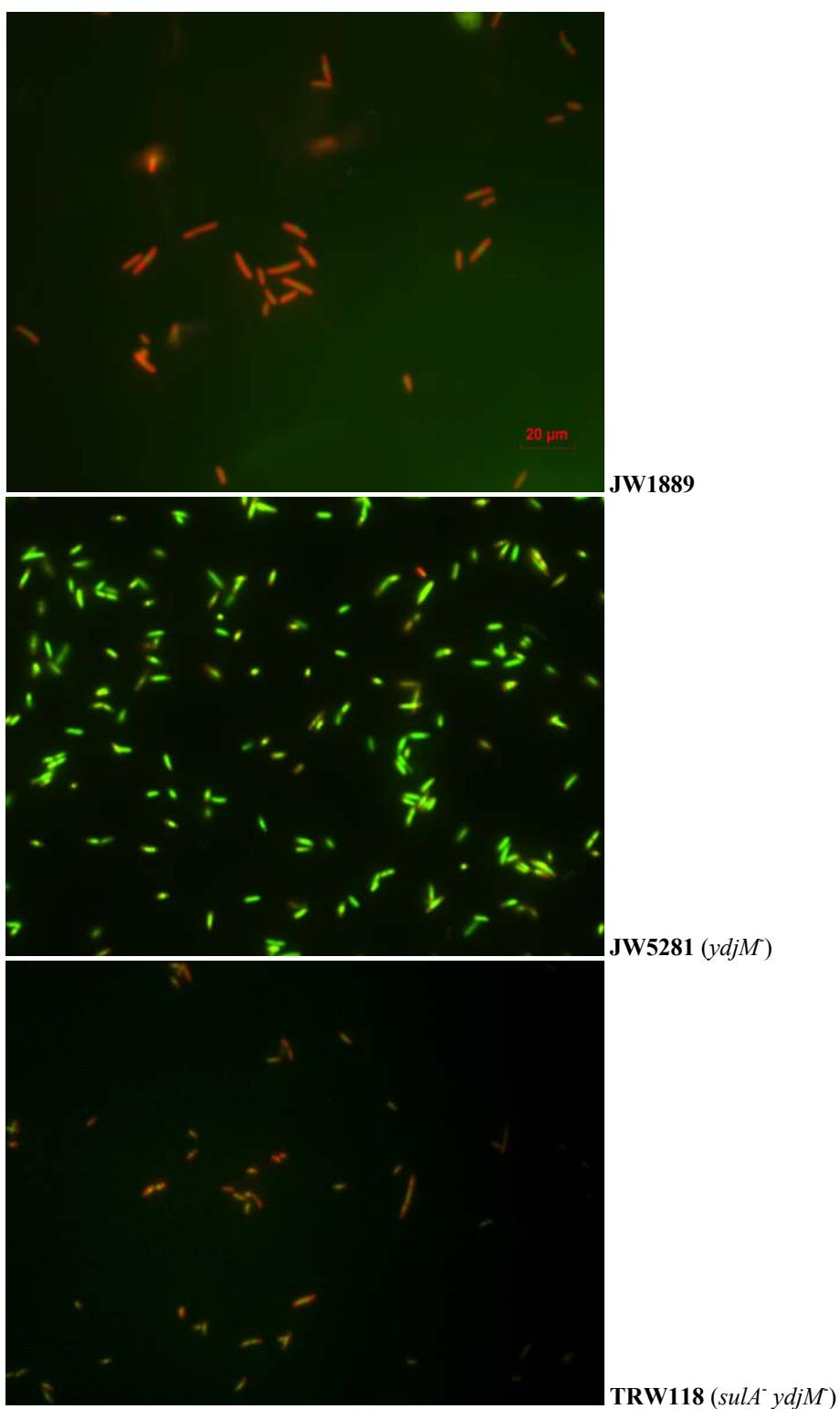
Slika 32: Sevi *E. coli* posneti s svetlobno mikroskopijo, 120 minut po indukciji.

4.5.2 Fluorescenčna mikroskopija

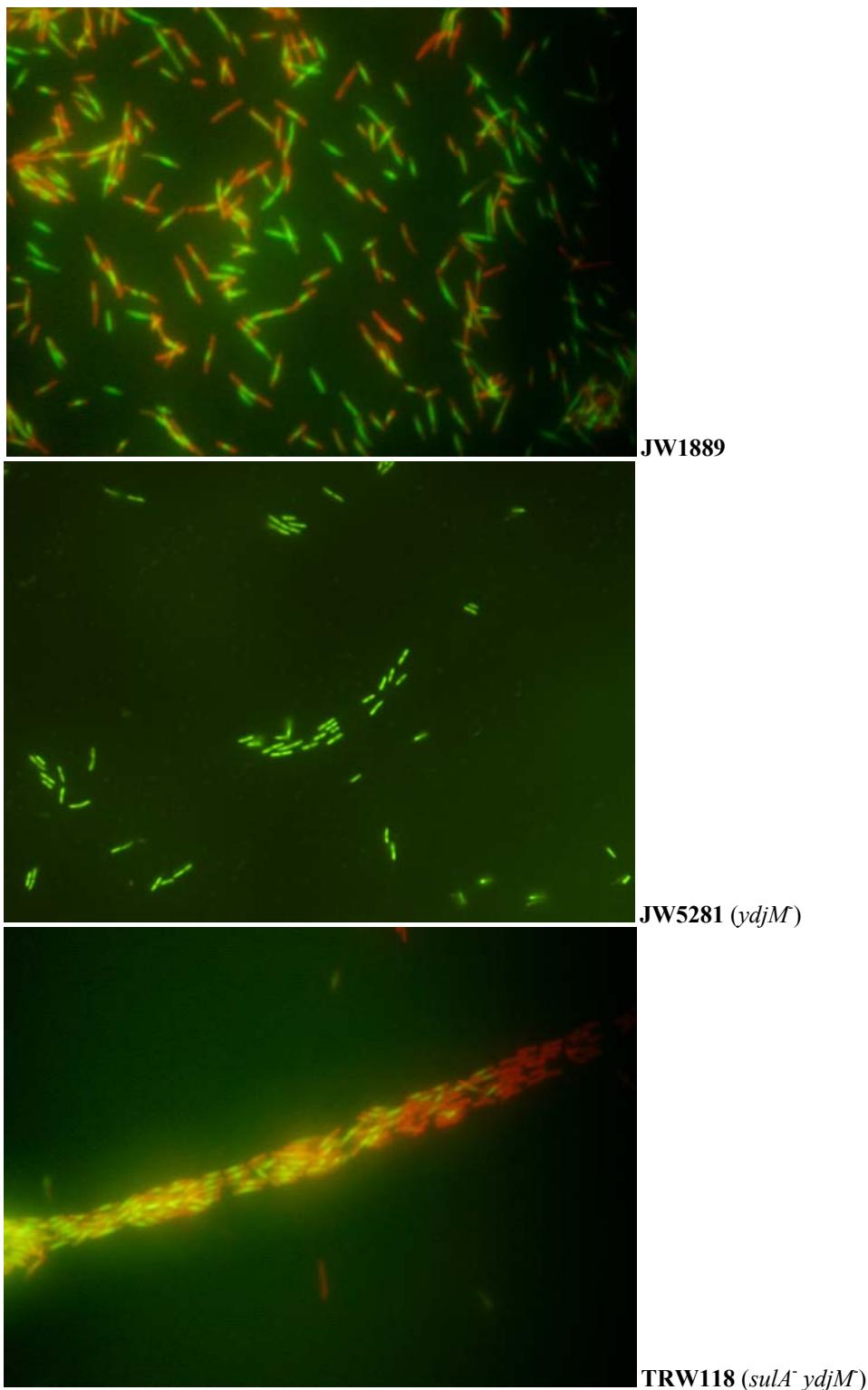
Na slikah od 33 do 35 so prikazani posnetki, narejeni s fluorescenčno mikroskopijo, barvani z barvilom akridin oranž. Kromosomska DNA je po barvanju z barvilom akridin oranže zelene barve, mRNA se po daljšem barvanju obarva rdeče. Slika 33 kaže, da se je 15 minut po indukciji v sevu divjega tipa (JW1889) kromosom skoncentriral v središču celice in celice so bile večje v primerjavi s sevoma JW5281 (*ydjM*) in TRW118 (*sulA*⁻, *ydjM*). Pri sevih JW5281 in TRW118 je opazno, da kromosom ni bil skoncentriran na sredini celice, večinoma je bil raztegnjen čez celotno bakterijsko celico ali pa je na različnih mestih.

Slika 34 kaže, da so se celice divjega tipa podaljšale 30 minut po indukciji, medtem ko so celice ostalih dveh sevov bile skoraj normalne velikosti. Pri celicah seva JW5281 (*ydjM*) je opazna prisotnost dveh kopij kromosoma bližje polom. Rezultati nakazujejo na razlike med sevom divjega tipa JW1889 in sevom JW5281 z okvarjenim genom *ydjM* in sevom TRW118 z okvarjenima genoma *ydjM* in *sulA*.

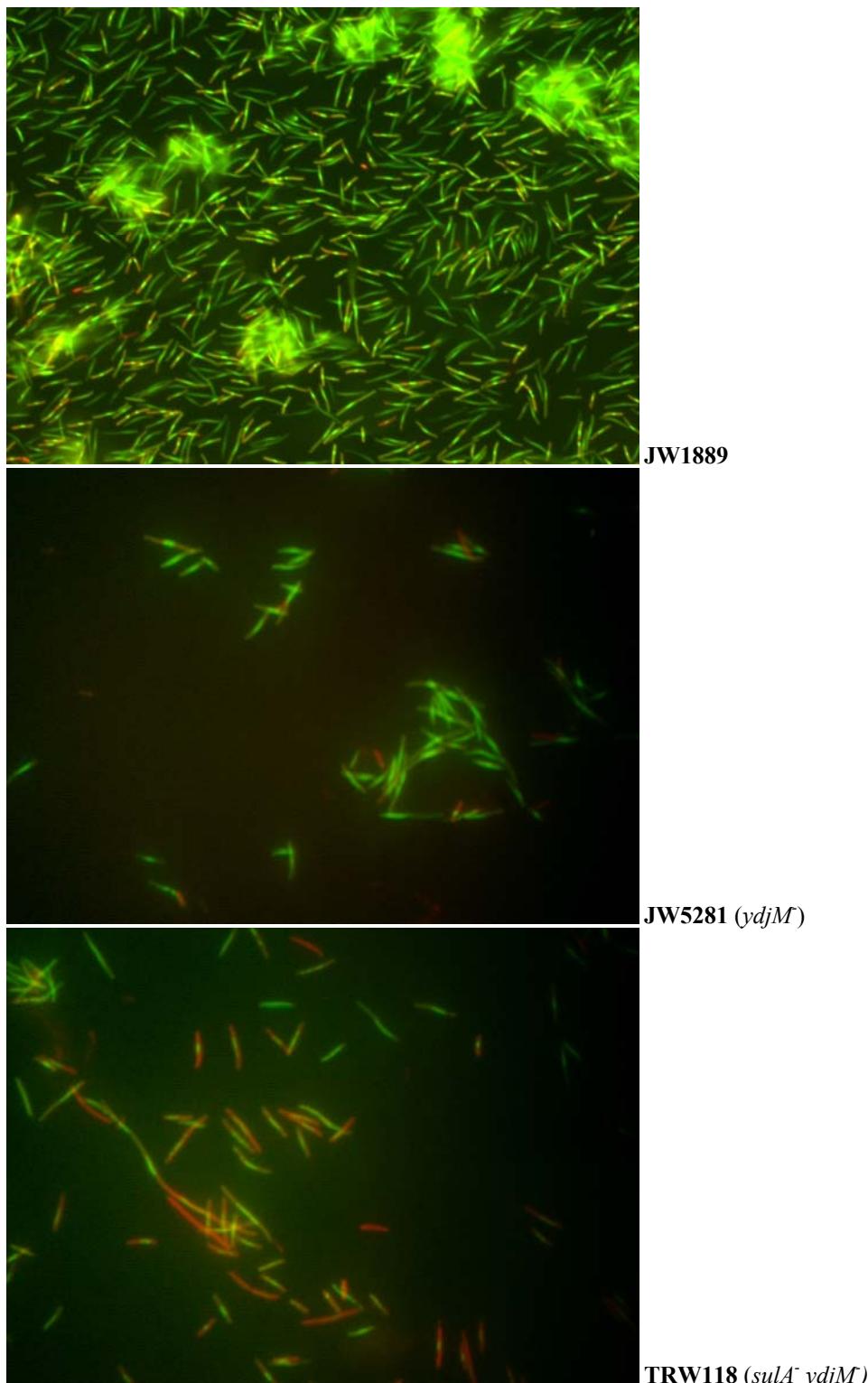
60 min po indukciji (slika 35) so celice JW1889 bile že neprimerno daljše, kot pri ostalih dveh sevih, kromosomi so še vedno močno skoncentrirani na sredini celice. Podaljšane so bile tudi celice sevov JW5281 in TRW118 in ni več opaznih dveh kromosomov na polih celice, kot smo opazili pri sevu JW5281 30 min po indukciji. Kromosom je bil pri sevih JW5281 in TRW118 v večini celic razpotegnjen po citoplazmi celic.



Slika 33: Sevi *E. coli* posneti s fluorescenčno mikroskopijo, 15 minut po indukciji.

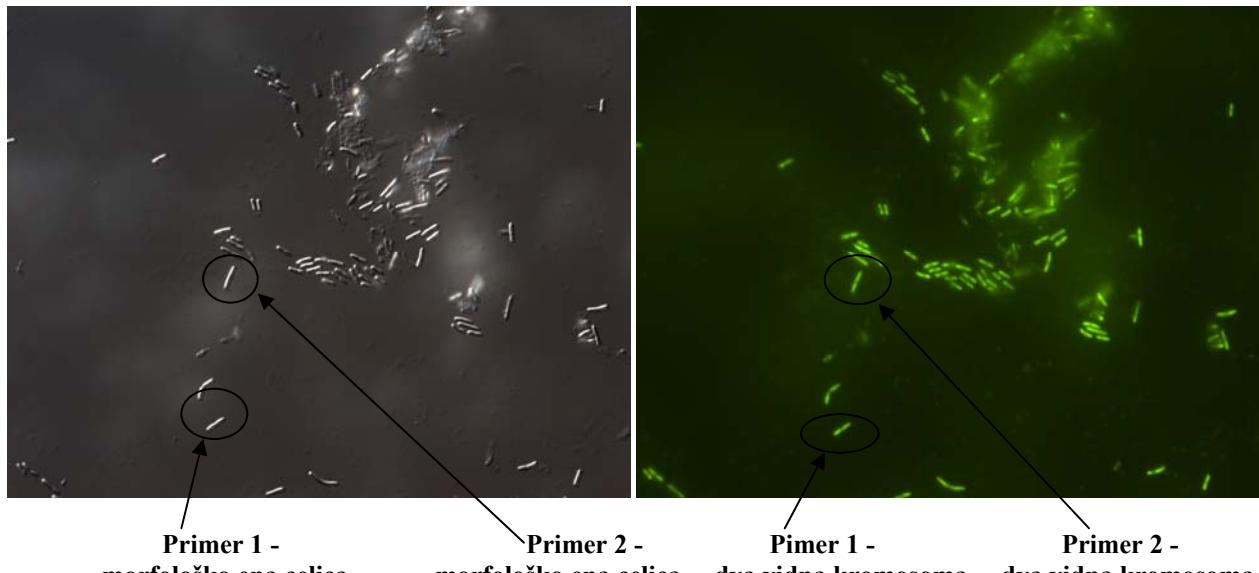


Slika 34: Sevi *E. coli* posneti s fluorescenčno mikroskopijo, 30 minut po indukciji.



Slika 35: Sevi *E. coli* posneti s fluorescenčno mikroskopijo, 60 minut po indukciji.

Na sliki 36 je prikazan sev JW5281 (*ydjM*) 30 minut po indukciji. Posnetka prikazujeta isti preparat, posnet na dva načina, levo z diferencialno kontrastnim mikroskopom - DIC (nativni preparat) ter desno s fluorescenčno mikroskopijo (barvilo akridin oranž). S posnetka DIC lahko opazimo morfologijo celic, s fluorescenčno mikroskopijo pa lego kromosoma v celici. Zelo jasno je videti, da ima ena celica, ki glede na njen morfološki izgled ni v fazi delitve, dve kopiji kromosoma, locirani na vsakemu polu celice po enega.



Slika 36: Mikroskopski posnetki seva JW5281, 30 minut po dodatu nalidiksične kisline. Posnetka prikazujeta isti preparat, leva slika je bila narejena z diferencialnim kontrastom, desna slika pa s fluorescenčno mikroskopijo. Preparat je barvan z barvilm akridin oranž. Iz obeh posnetkov je vidno, da se v eni celici večinoma nahajata dva kromosoma, locirana na polih. Obkrožena sta dva primera in prikazana s puščicama.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 IDENTIFIKACIJA PROTEINOV, KI URAVNAVAJO ODZIV SOS

Odziv SOS omogoči bakterijam, da se v stresnih pogojih zoperstavijo poškodbam DNA in ohranijo celovitost svojega dednega zapisa. Poglavitna proteina tega odziva sta protein RecA, ki deluje kot senzor in aktivator odziva ter represor LexA, ki uravnava prepis genov odziva SOS (Butala in sod., 2009). RecA se veže na enoveržne konce DNA, nastale na mestih poškodb, in sproži samo-cepitev represorja LexA in tako prepis genov regulona LexA. Pomembno vlogo pri uravnavanju odziva pa imajo tudi proteini, ki uravnava funkcije proteinov RecA ter LexA. Poznanih je osem proteinov bakterije *E. coli*, ki reagirajo s proteinom RecA in tako vplivajo na izgradnjo ter razgradnjo filimenta RecA, ki deluje kot senzor odziva SOS (Cox, 2007). Proteina Crp in ArcA pa sta edina do sedaj poznana proteina, ki se vežeta na promotorsko področje genov SOS in tako hkrati s proteinom LexA uravnavata dva izmed 57 genov odziva SOS pri bakteriji *E. coli*. Kot opisano v uvodu, se geni v sistemu SOS prepišejo v uskljenem vrstnem redu. Prvi v odzivu so sintetizirani proteini za popravljalne mehanizme, kasneje nizko specifične DNA-polimeraze ter nazadnje bakteriocini. Na vrstni red prepisovanja genov SOS vpliva afiniteta represorja LexA do DNA. Represor se lahko inaktivira le ob sprostitvi iz DNA.

Želeli smo identificirati do sedaj še nepoznane proteine bakterije *E. coli*, ki preko proteinov RecA ter LexA uravnava odziv SOS. Geni za bakteriocine, kolicine, se nazadnje prepišejo v odzivu SOS. Domnevali smo, da poleg represorja LexA, njihov prepis uravnava še dodatni dejavnik transkripcije, ki omogoči zakasneno prepisovanje teh genov. Razlog za pozno prepisovanje genov za kolicine je v tem, da sinteza kolicinov vodi v propad bakterijske celice, ki kolin proizvaja. Bakterija *E. coli* ima preko 400 dejavnikov transkripcije, ki uravnava okoli 4000 genov (Browning in Busby, 2004). Med temi dejavniki transkripcije so le redki, katerih izražanje je sproženo med odzivom SOS (Khil in Camerini-Otero, 2002) in ki bi lahko uravnivali izražanje genov SOS skupaj s proteinom LexA. Poleg dejavnikov transkripcije smo želeli identificirati tudi protein membrane, ki med odzivom SOS reagira s filamentom RecA in omogoči reorganizacijo kromosoma ter tako pomembno vpliva na celične funkcije.

5.1.1 Identifikacija dejavnikov transkripcije, ki uravnava prepis genov SOS

Naredili smo izbor okoli 10 genov bakterije *E. coli*, katerih produkti delujejo kot dejavniki transkripcije in katerih prepis je sprožen po poškodbi DNA. Želeli smo proučiti njihov vpliv na izražanje gena za kolin K (*cka*). Gen kolicina K je močno utišan z represorjem LexA, ki se veže kot dva dimera na promotorsko področje gena *cka*. Uporabili smo plazmidni konstrukt (pKCT3) s promotorskim področjem gena *cka*, spojenim s poročevalskim genom za zeleni fluorescentni protein (Gfp) brez lastnega promotorja (Mulec, 2003). Uporabili smo tudi različici plazmida z okvarjenim enim (pKCT3-Up2) ali obema (pKCT3-Up3) vezavnima mestoma za LexA. Ob indukciji z antibiotikom, ki sproži odziv SOS, se prične torej prepisovati tudi *cka*. Ker je slednji v fuziji *cka-gfp* povezan z genom za Gfp, se ob izražanju gena *cka* izraža tudi *gfp*. Izražanje gena *cka* tako zaznamo z zeleno fluorescentno svetlobo, za katero je odgovoren produkt gena *gfp*.

V primerih brez indukcije odziva SOS se na promotorsko področje gena *cka* v konstruktu pKCT3 veže represor LexA, prepreči izražanje *cka-gfp*, ter tako pod UV svetlobo ne zaznamo fluorescence. Ker je vezava LexA slabša, oziroma ni mogoča na operatorska zaporedja plazmidov pKCT3-Up2 in pKCT3-Up3, kolonije s temo plazmidoma v vseh uporabljenih bakterijskih sevih, močno fluorescirajo, tudi ko odziv SOS ni induciran.

Pri primerjavi pred in po indukciji seva divjega tipa (JW1889), smo po indukciji odziva SOS opazili povečano izražanje gena *cka* iz plazmidnega konstrukta pKCT3 in manj intenzivno izražanje pri mutiranih različicah konstrukov pKCT3-Up2, -Up3 (Slika 21A). To kaže na obstoj dodatnega represorja, ki med odzivom SOS nadomesti LexA (ki se sprosti s tarčnih zaporedij in se razgradi) in utiša prezgodnji prepis gena *cka*. Tekom normalne bakterijske rasti LexA zadostuje za represijo izražanja gena *cka*, zato smo domnevali, da se dodatni represor sintetizira med sproženim odzivom SOS. Primerljiv profil, a manj intenzivno aktivnost promotorja gena *cka*, smo opazili v sevu (JW2669) z mutiranim genom *recA* (Slika 21B). Ta sev ne more vklopiti odziva SOS, saj protein RecA ne more zaznati enoverižne, poškodovane DNA. Rezultati z mutantom *recA*⁻, nakazujejo, da dodatni represor ni del regulona LexA.

Z namenom identificirati dodatni represor, smo izbrali seve z mutiranimi dejavniki transkripcije, katerih prepis se sproži ob odzivu SOS, a je neodvisen od sistema LexA/RecA. V seve smo vstavili plazmidne konstrukte pKCT3 ali njegovi mutirani različici (pKCT3-Up2 in pKCT3-Up3) ter ovrednotili sintezo produkta poročevalskega gena *gfp*. Pri večini testiranih sevov z okvarjenim dejavnikom transkripcije, je bil profil aktivnosti promotorja gena *cka* tak, kot pri sevu divjega tipa. Edino sev z izbrisanim genom za OxyR (JW3933) je izkazoval identično, močno izražanje promotorja gena *cka*, ne glede na spremembe v vezavnem mestu LexA (Slika 21C). Rezultati nakazujejo, da je protein OxyR dodatni, od LexA neodvisni represor gena *cka*.

5.1.2 Vpliv proteina OxyR na izražanje gena *cka*

Z namenom preučiti vpliv proteina OxyR na sintezo kolicina K smo seva JW1889 (divji tip) ter JW3933 (*oxyR*⁻) transformirali s plazmidom pKCT1 z zapisom za operon kolicina K. V obeh sevih smo sprožili odziv SOS in iz primerljivega števila celic prekonočne kulture pripravili grobi celični ekstrakt ter z difuzijskim testom preverili sintezo kolicina. Producijo kolicina K smo ovrednotili iz con lize občutljivega seva *E. coli*. Sev JW3933 z okvarjenim genom *oxyR*, je sintetiziral približno 100× več kolicina K kot sev JW1889, pri katerem je, pri uporabljeni enaki redčini cona, komaj še opazna (Slika 22).

Poleg sinteze kolicina smo želeli proučiti promotorsko aktivnost gena *cka* v prisotnosti ali odsotnosti produkta gena *oxyR*. Uporabili smo plazmidni konstrukt pRW50cka s promotorskim področjem gena *cka*, spojenim z reporterskim genom *lacZ* brez lastnega promotorja. Sledili smo encimski aktivosti β-galaktozidaze v sevu divjega tipa in mutanti *oxyR*⁻. V kulturi bakterij smo inducirali odziv SOS z antibiotikom mitomicin C v dveh koncentracijah (Slike 23 in 24) ter vodikovim peroksidom (Slika 26) ali kombinacijo antibiotika in vodikovega peroksidu (Slika 25). Vodikov peroksid sproži aktivacijo oksidativnega stresa v celici, medtem ko se odziv SOS ne sproži. Njegovo aktivacijo sproži šele okvara DNA, kar pa se lahko zgodi v primeru, da vodikov peroksid okvari genom bakterije. Poleg tega tako mitomicin C kot tudi vodikov peroksid povzročita poškodbe

RNA, lipidov in proteinov. Bakterije kot odziv na vodikov peroksid ali organske peroksidne skupine, sprožijo odziv na oksidativni stres, v katerem se prepiše vsaj 30 genov, katerih produkti zaščitijo bakterijo tako, da reagirajo z aktivnimi oblikami kisika ter ga pretvorijo v za bakterijo neškodljive oblike spojin (Demple in Halbrook, 1983). Znano je, da vodikov peroksid pretvori protein OxyR v aktivno obliko proteina, ki se lahko veže na DNA in uravnava izražanje tarčnih genov (Zheng in sod., 1998, Storz in sod., 1990).

Primerljivo z rezultati testa sinteze kolicinov, je sev z okvarjenim genom *oxyR*, v vseh primerih imel večjo aktivnost fuzije *cka-lacZ* zaradi višje aktivnosti promotorja (Slike 23, 24, 25 in 25). V vseh primerih se promotor gena *cka* inducira približno 2h po sprožitvi stresa v celici. Rezultati se skladajo s testi produkcije kolicina K in nakazujejo na vlogo proteina OxyR pri uravnavanju izražanja gena *cka*. Izključimo pa lahko, da je OxyR tisti dejavnik, ki vpliva na zakasneno izražanje gena *cka*, saj ob sproženem odzivu SOS, bakterije tudi v njegovi odsotnosti z zakasnitvijo aktivirajo promotor gena *cka*. Protein OxyR je tako morebiten dejavnik, ki bakterijam v stacionarni fazi rasti prepreči prekomerno sintezo kolicina K, v kolikor poškodbe DNA v celici niso prekomerne. Rezultati ne izključujejo, da višje aktivnosti promotorja gena *cka* v sevu *oxyR* ne pogojuje večje število poškodb DNA, ki se zgodijo zaradi za celico nevarnih kisikovih substanc.

Z namenom proučitve direktne vloge proteina OxyR pri uravnavanju prepisa gena *cka* smo žeeli izolirati protein OxyR in izvesti *in vitro* teste vezave proteina OxyR na promotorsko področje gena *cka*, a smo imeli težave z izolacijo proteina.

5.2 IDENTIFIKACIJA DEJAVNIKA, KI OMOGOČI BAKTERIJAM REORGANIZACIJO KROMOSOMA MED ODZIVOM SOS

Ob poškodbi DNA, celice *E. coli* skondenzirajo kromosom na celični membrani (Levin-Zaidman in sod., 2000). Taka reorganizacija je potrebna za zaščito kromosoma in omogoči pospešeno popravljanje DNA z rekombinacijo ter prepreči ponovno podvajanje kromosoma. Preoblikovanje kromosoma omogočijo obsežna območja filamenta RecA, ki se najverjetneje s še neznanim proteinom pripnejo na celično membrano. Bakterije med normalno rastjo pogosto tvorijo filament RecA, ki jim omogoči popravilo manjših poškodb DNA (Cox, 2007), a slednje še ne vodijo do aktivacije odziva SOS in do reorganizacije kromosoma. Predvidevali smo, da obstaja gen za protein membrane v regulonu LexA, ki uravnava reorganizacijo kromosoma. Gen *ydjM* je eden redkih genov odziva SOS, ki ga uravnava 2 dimera represorja LexA (Fernández de Henestrosa in sod., 2000) in je edini membranski protein, ki nastane med odzivom SOS (Daley in sod., 2005). Protein YdjM je 196 aminokislin velik protein, nepozanane funkcije, čigar CTD je v periplazmi celice (Daley in sod., 2005). Želeli smo z enostavnim testom preveriti, ali protein YdjM res vpliva na reorganizacijo kromosoma v celici. Uporabili smo svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo bakterijskih sevov in pregledovali lokalizacijo kromosoma v celicah po 15 min, 30 min, 60 min, 90 min ter 120 min po indukciji odziva SOS z nalidiksično kislino. Uporabili smo sev divjega tipa JW1889, sev z inaktiviranim genom *ydjM* JW5281 ter sev JW2669 z okvarjenim genom *recA*. Želeli smo vplivati na celično filamentacijo, zato smo s sistemom λ Red v sevu RW118 (*sulA*⁻) inaktivirali gen *ydjM* (TRW118 *sulA*⁻ *ydjM*). Produkt gena *sulA* prepreči septacijo bakterij (Janion, 2008).

Celice seva JW1889 so se že 15 min po indukciji podaljšale (Slika 28), ker se med odzivom SOS SulA veže na protein FtsZ in posledično se celice ne delijo (Dajkovic in sod., 2008). Pri ostalih sevih se filamentacija začne kasneje, navadno 30-120 min po indukciji (Slike 29, 30, 31 in 32), razen v sevu z okvarjenim genom *recA*, kjer se odziv SOS ne sproži in zato ne pride do podaljševanja celic (Slika 31). S časom dolge celice propadejo in opazimo nastanek razpokanih celic, kar je pričakovano, saj celice ne uspejo popraviti vseh poškodb DNA.

Nepričakovano se tudi celice bakterijskega seva TRW118 z okvarjenim genom *sulA* ter bakterije z okvarjenim *recA* podaljšujejo (Slika 35). Filamentacija v omenjenih sevih se zgodi kasneje v odzivu SOS, kot pri celicah divjega tipa. Slednje nakazuje, da filamentacijo bakterij med stresnim odzivom SOS ne povzroči le protein SulA.

S fluorescenčno mikroskopijo smo sledili umestitvi kromosoma v celici. Akradin oranž obarva kromosom zeleno. Rezultati kažejo izredno raznolikost med sevom divjega tipa JW1889 ter sevoma z okvarjenim genom *ydjM* JW5281, in tistim, z okvarjenima genoma *ydjM* in *sulA* TRW118. V sevu divjega tipa se kromosom že po 15 minutah pritrdi na celično membrano čemur sledi podaljševanje celic. Med odzivom SOS se kromosom le še bolj skoncentrira na sredini celice in vse celice so podaljšane, v primerjavi s celicam normalne rasti (Slike 34, 35 in 36, JW1889). Pri sevih JW5281 in TRW118 opazimo, da kromosom ni skoncentriran na sredini celice, večinoma je raztegnjen čez celotno bakterijsko celico ali pa je na različnih mestih. Po 30 minutah imajo skoraj vse celice seva z okvarjenim *ydjM* po dva kromosoma na celico, locirana na polih celice (Sliki 34 JW5281 in 36). Kljub morfološkemu izgledu celice, ki nakazuje na to, da celica ni v fazi delitve, v njej opazimo dva kromosoma. V sevu z delecijo *ydjM* in *sulA* imajo celice po 30 minutah po indukciji, kromosom razpotegnjen po večji dolžini celice, v primerjavi z divjim tipom (Slika 34 TRW118). Rezultati nakazujejo, da je v lokalizacijo kromosoma (na polih, po celi dolžini celice) vključen tudi produkt gena *sulA*. Razlika je opazna tudi po 60 min. Celice JW1889 so izrazito dolge, kromosomi so še vedno opazno na sredini celice (Slika 35 JW1889). V tej fazi se začnejo podaljševati tudi celice sevov JW5281 in TRW118, vendar je njihova dolžina manjša, od tiste pri sevu JW1889 in kromosom je razpotegnjen čez večji del bakterijske celice. Kondenzacije kromosoma nismo zaznali.

Iz rezultatov je razvidno, da ima protein YdjM pomembno vlogo pri fiziologiji celice ter reorganizaciji kromosoma med odzivom SOS. Predvidevamo, da se ob odsotnosti proteina YdjM in ob indukciji odziva SOS z antibiotikom, kromosom ne veže na membrano v centru celice. Zato bakterije z okvarjenim genom *ydjM*, tudi v primerih brez indukcije, rastejo bistveno počasneje od divjega tipa.

5.3 SKLEPA

- Protein OxyR vpliva na izražanje gena za kolicin K, neposredno, ali posredno, z odstranjevanjem nevarnih kisikovih substanc in vplivom na nastanek poškodb DNA.
- Protein YdjM vpliva na morfologijo celic in lokalizacijo kromosoma bakterij *Escherichia coli* med odzivom SOS.

6 POVZETEK

Bakterije se na poškodbe DNA odzovejo z indukcijo odziva SOS. Pri bakteriji *E. coli* odziv SOS sprožijo številni endogeni in eksogeni dejavniki. Odziv SOS je koordiniran celični odziv, ki ga uravnava proteina LexA in RecA. Med celično rastjo deluje LexA kot represor prepisovanja genov SOS, katerih produkti sodelujejo pri inhibiciji celične delitve in popravljanju poškodb DNA. LexA z vezavo na promotorska področja genov, vključenih v odziv SOS, sterično onemogoči vezavo od DNA odvisne RNA-polimeraze in tako prepreči začetek prepisovanja genov SOS.

Derepresija genov, ki so vključeni v odziv SOS, sproži prepisanje le-teh. Nastali produkti sodelujejo pri popravljanju poškodb DNA in drugih sprememb, ki nastanejo kot posledica poškodb DNA. Glavni razlog za sprožitev odziva SOS je prekinitev napredovanja podvojevalnih vilic. Zaradi tega pride do prepisovanja prve skupine genov, npr. *recA* in *ssb*, ki zaščitijo in stabilizirajo vilice oz. mesta podvojevanja. Z zamikom se nato prepiše druga skupina genov SOS: *uvrA*, *uvrB*, *ydjQ*, *uvrD* in *recN*. Produkti te skupine genov popravljajo poškodovano DNA z različnimi mehanizmi. Dva najpogostejša načina popravljanja DNA sta popravljanje DNA z izrezovanjem nukleotidov in popravljanje z rekombinacijo. Naknadno se prepišejo še geni *polB*, *dinB* in *umuDC*. Ti geni imajo zapis za tri alternativne DNA-polimeraze, ki omogočajo napredovanje zaustavljenih podvojevalnih vilic preko poškodb DNA, tudi na račun vstavljanja nepravilnih nukleotidov. Na ta način se celica izogne poškodbam, katere še niso bile popravljene s popravljalnimi mehanizmi in bi lahko preprečevale napredovanje podvojevalnih vilic.

Odziv SOS ima pomemben vpliv tudi na celično delitev. Med odzivom na stres se kromosom reorganizira, se tako zaščiti in s pomočjo preko proteina RecA pripne na celično membrano. Protein, na katerega se kromosom pripne, je še neznan. Poleg tega se med odzivom SOS sintetizira protein SulA, ki reagira s proteinom FtsZ in tako prepreči tvorbo septuma. Tako bakterije zaustavijo delitev celic, dokler poškodbe DNA niso odstranjene. Zadnji se v odzivu SOS prepišejo geni za sintezo bakterijskih toksinov, bakteriocinov (pri bakterijski vrsti *E.coli* so to kolicini). Do njihovega prepisa pride po dolgotrajni (nepopravljivi) poškodbi DNA, njihov prepis pa vodi v propad celice.

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, kateri je še drugi, od LexA neodvisni regulator, ki vpliva na zapozneli prepis gena *cka*. Z metodami za detekcijo fluorescenčne fuzije gena *cka-gfp* v plazmidu, za detekcijo produkcije kolicinov ter β-galaktozidaze smo dokazali, da je najverjetnejši protein, ki poleg LexA reprimira prepis *cka*, protein OxyR. OxyR je eden glavnih regulatorjev oksidativnega stresa. Ob prisotnosti vodikovega peroksida se protein OxyR oksidira in v taki obliki pretvori H_2O_2 v H_2O in O_2 . V sevu JW3933, ki ima okvarjen gen *oxyR*, smo zaznali povečano sintezo kolicina.

Poleg tega smo s svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo želeli dokazati, da je protein, na katerega se veže kondenziran kromosom z mestom *oriC* s pomočjo RecA med odzivom SOS protein YdjM. YdjM je edini membranski protein odziva SOS, katerega gen je uravnovan z dvema dimeroma represorja LexA. Njegova odsotnost se kaže kot neorganiziranost kromosoma med odzivom SOS. Kromosom ni skoncentriran na sredini celice, temveč je razpotegnjen čez celotno njeno dolžino, poleg tega pa v določeni fazì po indukciji z nalidiksično kislino zaznamo anomalijo, to je prisotnost dveh kromosomov v bakterijski celici, katere morfologija ne kaže bližnjo delitev celice.

7 VIRI

- Aaron M., Charbon G., Lam H., Schwarz H., Vollmer W., Jacobs-Wagner C. 2007. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, 64, 4: 938–952.
- Adams D. E., Shekhtman E. M., Zechiedrich E. L., Schmid M. B., Cozzarelli N. R. 1992. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, 71, 2: 277–288.
- Addinall S. G., Holland B. 2002. The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *Journal of Molecular Biology*, 318, 2: 219–236.
- Åslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11: 6161–6165.
- Aussel L., Barre F. X., Aroyo M., Stasiak A., Stasiak A. Z., Sherratt D. 2002. FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell*, 108, 2: 195–205.
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K. A., Tomita M., Wanner B. L., Mori H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008: 1 str.
- Barák I., Wilkinson J. 2007. Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 3: 311–326.
- Barre F. X., Aroyo M., Colloms S. D., Helfrich A., Cornet F., Sherratt D. J. 2000. FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Development*, 14, 23: 2976–2988.
- Bernhardt T. G., De Boer P. A. J. 2005. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Molecular Cell*, 18, 5: 555–564.
- Bigot S., Saleh O. A., Cornet F., Allemand J. F., Barre F. X. 2006. Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13, 11: 1026–1028.
- Bigot S., Saleh O. A., Lesterlin C., Pages C., El Karoui M., Dennis C., Grigoriev M., Allemand J. F., Barre F. X., Cornet F. 2005. KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO Journal*, 24, 21: 3770–3780.
- Blakely G., May G., McCulloch R., Arciszewska L. K., Burke M., Lovett S. T., Sherratt D. J. 1993. Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell*, 75, 1: 351–361.
- Bol D. K., Yasbin R. E. 1990. Characterization of an inducible oxidative stress system in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 172, 6: 3503–3506.
- Bowman G. R., Comolli L. R., Zhu J., Eckart M., Koenig M., Downing K. H., Moerner W. E., Earnest T., Shapiro L. 2008. A polymeric protein anchors the chromosomal origin - ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell*, 134, 6: 945–955.

- Browning D. F., Busby S. J. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 1 : 57-65.
- Butala M. 2009. Plazmid pRW50cka: lastni material. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: plazmid.
- Butala M., Hodošček M., Anderluh G., Podlesek Z., Žgur-Bertok D. 2007. Interdomain LexA rotation is a prerequisite of DNA binding specificity. *FEBS Letters*, 581, 25: 4816-4820.
- Butala M., Žgur-Bertok D., Busby S. J. W. 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 1: 82-93.
- Capiaux H., Lesterlin C., Perals K., Louarn J. M., Cornet F. 2002. A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Reports*, 3, 6: 532–536.
- Choi H. J., Kim S. J., Mukhopadhyay P., Cho S., Woo J. R., Storz G. 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*, 105, 1: 103-113.
- Christman M. F., Morgan R. W., Jacobson F. S., Ames B. N. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, 41, 3: 753-762.
- Christman M. F., Storz G., Ames B. N. 1989. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States od America*, 86, 10: 3484-3488.
- Cole R. M., Hahn J. J. 1962. Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science*, 135: 722–724.
- Cook W. R., Rothfield L. I. 1999. Nucleoid-independent identification of cell division sites in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 6: 1900–1905.
- Cosloy S. D., Oishi, M. 1973. Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States od America*, 70, 1: 84–87.
- Cox M. M. 2007. Regulation od bacterial RecA protein. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 1: 41-63.
- Dajkovic A., Mukherjee A., Lutkenhaus J. 2008. Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *Journal of Bacteriology*, 190, 7: 2513-2526.
- Daley D. O., Rapp M., Granseth E., Melén K., Drew D., von Heijne G.. 2005. Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science*, 308, 5726: 1321-1323.
- Datsenko K. A., Wanner B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States od America*, 97, 12: 6640-6645.
- De Boer P. A. J., Crossley R. E., Hand A. R., Rothfield L. I. 1991. The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *EMBO Journal*, 10, 13: 4371–4380.
- De Boer P. A. J., Crossley R. E., Rothfield L. I. 1990. Central role for the *Escherichia coli* *minC* gene product in two different cell division-inhibition systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States od America*, 87, 3: 1129–1133.

- De Boer P. A. J., Crossley R. E., Rothfield L. I. 1992. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by MinCDE system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174, 1: 63–70.
- Demple B., Halbrook J. 1983. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, 304, 5925: 446-448.
- Denu J. M., Tanner K. G. 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*, 37, 16: 5633-5642.
- Dumoulin P., Ebright R. H., Knegtel R., Kaptein R., Granger-Schnarr M., Schnarr M. 1995. Structure of the LexA repressor-DNA complex probed by affinity cleavage and affinity photo-cross-linking. *Biochemistry*, 35, 14: 4279-4286.
- Ebersbach G., Briegel A., Jensen G. J., Jacobs-Wagner C. 2008. A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell*, 134, 6: 956–968.
- Erickson H. P. 1997. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends in Cell Biology*, 7, 9: 362–367.
- Errington J., Daniel A., Scheffers D. J. 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 1: 52–65.
- Espeli O., Lee C., Marians K. J. 2003a. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 45: 44639–44644.
- Espeli O., Levine C., Hassing H., Marians K. J. 2003b. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Molecular Cell*, 11, 1: 189–201.
- Farr B. S., Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. 1991. *Microbiology Reviews*, 55, 4: 561-585.
- Farr S. B., Natvig D. O., Kogoma T. 1985. Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 164, 3: 1309-1316.
- Fernández de Henestrosa A. R., Ogi T., Aoyagi S., Chafin D., Hayes J. J., Ohmori H., Woodgate R. 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA. *Molecular Microbiology*, 35, 6: 1560-1572.
- Fielding P., Fox C. F. 1970. Evidence for stable attachment of DNA to membrane at the replication origin of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 41: 157–162.
- Fogh R. H., Ottleben G., Rüterjans H., Schnarr M., Boelens R., Kaptein R. 1994. Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by ¹H NMR spectroscopy. *EMBO Journal*, 13, 17: 3936-3944.
- Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W. 1995. DNA repair and mutagenesis. Washington DC, ASM Press: 696 str.
- Fu X. L., Shih Y. L., Zhang Y., Rothfield L. I. 2001. The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *E.coli* division cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States od America*, 98, 3: 980–985.
- Giese K. C., Michalowski C. B., Little J. W. 2008. RecA-dependent cleavage of LexA dimer. *Journal of Molecular Biology*, 377, 1: 148-161.

- Grainge I., Bregu M., Vazquez M., Sivanathan V., Ip S. C., Sherratt D. J. 2007. Unlinking chromosome catenanes *in vivo* by site-specific recombination. *EMBO Journal*, 26, 19: 4228–4238.
- Grainge I., Sherratt D. J. 1999. Xer site-specific recombination. DNA strand rejoicing by recombinase XerC. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 10: 6763–6769.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Henikoff S., Haughn G. W., Calvo J. M., Wallace J. C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 18: 6602–6606.
- Hu Z. L., Lutkenhaus J. 1999. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under control of MinD and MinE. *Molecular Microbiology*, 34, 1: 82–90.
- Hurstel S., Ganger-Schnarr M., Schnarr M. 1988. Contacts between the LexA repressor-or its DNA binding domain-and the backbone of the *recA* operator DNA. *EMBO Journal*, 7, 1: 269–275.
- Ip S. C., Bregu M., Barre F. X., Sherratt D. J. 2003. Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO Journal*, 22, 23: 6399–6407.
- Jacob F., Brenner S., Cuzin F. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 28: 329–348.
- Jakob U., Muse W., Eser M., Bardwell J. C. A. 1999. Chaper one activity with a redox switch. *Cell*, 96, 3: 341–351.
- Janion C. 2008. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 4, 6: 338–344.
- Kato J., Nishimura Y., Imamura R., Niki H., Hiraga S., Suzuki H. 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, 63, 2: 393–404.
- Kennedy S. P., Chevalier F., Barre F. X. 2008. Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 68, 4: 1018–1028.
- Khil P. P., Camerini-Otero R. D. 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 44, 1: 89–105.
- Kim B., Little J. W. 1992. Dimerization of a specific DNA-binding protein on the DNA. *Science*, 225, 5041: 203–206.
- Kirkup B. C., Riley M. A. 2004. Antibiotic mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors *in vivo*. *Nature*, 428, 6981: 412–414.
- Kitagawa M., Ara T., Nakamichi T., Inamoto E., Toyonaga H., Mori H. 2005. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli*: Unique resources for biological research. *DNA Research*, 12, 5: 291–299.
- Knegtel M. A., Fogh R. H., Ottleben G., Rüterjans H., Dumoulin P., Schnarr M., Boelens R., Kaptein R. 1995. A model for the LexA repressor DNA complex. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 21, 3: 226–236.
- Koch A. L. 1990. Additional arguments for the key role of “smart” autolysins in the enlargement of the wall of gram-negative bacteria. *Research in Microbiology*, 141, 5: 529–541.

- Kullik I., Stevens J., Toledano M. B., Storz G. 1995b. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: Regions important for DNA binding and multimerization. *Journal of Bacteriology*, 177, 5: 1285–1291.
- Kullik I., Toledano M. B., Tartaglia L. A., Storz G. 1995a. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: Regions important for oxidation and transcriptional activation. *Journal of Bacteriology*, 177, 5: 1275–1284.
- Kuzminov A. 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 4: 751–813.
- Lau I. F., Filipe S. R., Soballe B., Okstad O. A., Barre F. X., Sherratt D. J. 2003. Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Molecular Microbiology*, 49, 3: 731–743.
- Lee S. R., Kwon K. S., Kim S. R., Rhee S. G. 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 25: 15366–15372.
- Levin-Zaidman S., Frenkiel-Krispin D., Shimoni E., Sabanay I., Wolf S. G., Minsky, A. 2000. Ordered intracellular RecA-DNA assemblies: A potential site of *in vivo* RecA-mediated activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12: 6791–6796.
- Levy O., Ptacin J. L., Pease P. J., Gore J., Eisen M. B., Bustamante C., Cozzarelli N. R. 2005. Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 49: 17618–17623.
- Little J. W. 1983. The SOS regulatory system: control of its state by the level of RecA protease. *Journal of Molecular Biology*, 167, 5: 791–808.
- Little J. W. 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*, 73, 4: 411–422.
- Little J. W., Mount D. W. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29, 1: 11–22.
- Little J. W., Mount D. W., Yanisch-Perron C. R. 1981. Purified LexA protein is a repressor of recA and lexA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7: 4199–4203.
- Liu G., Draper G. C., Donachie W. D. 1998. FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 29, 3: 893–903.
- Lodge J., Fear J., Busby S., Gunasekaran P., Kamini N. R. 1992. Broad host range plasmids carrying the *Escherichia coli* lactose and galactose operons. *FEMS Microbiology Letters*, 74, 2/3: 271–276.
- Lorenz M. G., Wackernagel W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology Reviews*, 58, 3: 563–602.
- Luo Y., Pfuetzner R. A., Mosimann S., Paetzel M., Frey E. A., Cherney M., Kim B., Little J. W., Strynadka N. C. 2001. Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell*, 106, 5: 585–594.
- Mannick J. B., Hausladen A., Liu L., Hess D. T., Zeng M., Miao Q. X., Kane L. S., Gow A. J., Stamler, J. S. 1999. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 284, 5414: 651–654.

- Margolin W. 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. FEMS Microbiology Reviews, 24, 4: 531–548.
- Massey T. H., Aussel L., Barre F. X., Sherratt D. J. 2004. Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. EMBO Reports, 5, 4: 399–404.
- Massey T. H., Mercogliano C. P., Yates J., Sherratt D. J., Lowe J. 2006. Double-stranded DNA translocation: Structure and mechanism of hexameric FtsK. Molecular Cell, 23, 4: 457–469.
- McCord J. M., Keele B. B. Jr., Fridovich I. 1971. An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 68, 5: 1024–1027.
- McCord J.M., Fridovich I. 1988. Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988). Free Radical Biology and Medicine, 5, 5/6: 363-369.
- Miller C., Thomsen L. E., Gaggero C., Mosseri R., Ingmer H., Cohen S. N. 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. Science, 305, 5690: 1629-1631.
- Miller J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 352 str.
- Mizusawa S., Gottesman S. 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: the lon gene controls the stability of SulA protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80, 2: 358–362.
- Mobley H. L., Koch A. L., Doyle R. J., Streips U. N. 1984. Insertion and fate of the cell wall in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 158, 1: 169–179.
- Mori H., Isono K., Horiuchi T., Miki T.. 2000. Functional genomics of *Escherichia coli* in Japan. Research in Microbiology, 151, 2: 121–128.
- Mrak P., Podlesek Z., van Putten J. P., 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
- Mulec J., Podlesek Z., Mrak P., Kopitar A., Ihan A., 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: 654-9.
- Mukherjee A., Cao C., Lutkenhaus J. 1998. Inhibition of FtsZ polymerization by SulA, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 6: 2885–2890.
- Neher S. B., Flynn J. M., Sauer R. T., Baker T. A. 2003. Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. Genes and Development, 17, 9: 1084–1089.
- Novagen. 2005. pET System Manual. 11th ed. Darmstadt, Novagen, EMB Chemical Inc. <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB055.pdf> (10. junij 2009): 1-80.
- Nielsen H. J., Ottesen J. R., Youngren B., Austin S. J., Hansen F. G. 2006. The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. Molecular Microbiology, 62, 2: 331–338.
- Page L., Griffiths L., Cole A. J. 1990. Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. Archives of Microbiology, 154, 4: 349-354.

- Pease P. J., Levy O., Cost G. J., Gore J., Ptacin J. L., Sherratt D., Bustamante C., Cozzarelli N. R. 2005. Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science*, 307, 5709: 586–590.
- Peng H., Marians K. J. 1993. Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 18: 8571–8575.
- Perals K., Cornet F., Merlet Y., Delon I., Louarn J. M. 2000. Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: The *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Molecular Microbiology*, 36, 1: 33–43.
- Pichoff S., Vollrath B., Touriol C., Bouche J. P. 1995. Deletion analysis of gene *minE* which encodes the topological specificity factor of cell division in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 18, 2: 321–329.
- Pils H., Braun V. 1995. Strong function-related homology between the pore-forming colicins K and S. *Journal of Bacteriology*, 177, 23: 6973–6977.
- Radman M. 1974. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *E. coli*: SOS repair hypothesis. V: Molecular and environmental aspects of mutagenesis. Prakas L., Sherman F., Miller M. W., Lawrence C. W., Taber H. W. (eds.). Springfield, Charles C. Thomas: 128 str..
- Raskin D. M., De Boer P. A. 1997. The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of correct cell division site in *E. coli*. *Cell*, 91, 5: 685–694.
- Raskin D. M., De Boer P. A. J. 1999a. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9: 4971–4976.
- Raskin D. M., De Boer P. A. J. 1999b. MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 19: 6419–6424.
- Rems A. 2009. Interakcija represorja LexA in rekombinaze RecA. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 43 str.
- Riley M. A., Wertz J. E. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, 56: 117–137.
- Roland K. L., Smith M. H., Rupley J. A., Little J. W. 1992. In vitro analysis of mutant LexA proteins with an increased rate of specific cleavage. *Journal of Molecular Biology*, 228, 2: 395–408.
- Romberg L., Levin P. A. 2003. Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annual Review of Microbiology*, 57: 125–154.
- Rothfield L. I., Zhao C. R. 1996. How do bacteria decide where to divide? *Cell*, 84, 2: 183–186.
- Rowland S. L., Fu X., Sayed M. A., Zhang Y., Cook W. R., Rothfield L. I. 2000. Membrane redistribution of the *Escherichia coli* MinD protein induced by MinE. *Journal of Bacteriology*, 182, 3: 613–619.
- Rueda S., Vicente M., Mingorance J. 2003. Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. *Journal of Bacteriology*, 185, 11: 3344–3351.
- Saleh O. A., Perals C., Barre F. X., Allemand J. F. 2004. Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO Journal*, 23, 4: 2430–2439.

- Sassanfar M., 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.
- Shingava H. 1996. SOS response as an adaptive response to DNA damage in prokaryotes. *Exs*, 77: 221-235.
- Slilaty S. N., Little J. W. 1987. Lysine-156 and serine-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 12: 3987-3991.
- Steiner W. W., Kuempel P. L. 1998. Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the *dif* resolvase site. *Journal of Bacteriology*, 180, 23: 6269-6275.
- Storz G., Tartaglia L. A., Ames B. N. 1990. Transcriptional regulator of oxidative stress inducible genes: direct activation of oxidation. *Science*, 248, 4952: 189-194.
- Stroz G., Imlay J. A. 1999. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 2: 188-194.
- Sueoka N., Quinn W. G. 1968. Membrane attachment of the chromosome replication origin in *Bacillus subtilis*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 33: 695-705.
- Tao K. 1999. In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 457, 1: 90-92.
- Tao K., Makino K., Yonei S., Nakata A., Shinagawa H. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequencing of oxyR, the positive regulator gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: Homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Molecular Genetics and Genomics*, 218, 3: 371-376.
- Tartaglia L. A., Storz G., Ames B. N. 1989. Identification and molecular analysis of OxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *Journal of Molecular Biology*, 210, 4: 709-719.
- Thanbichler M. 2009. Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 2, 1: 1-15.
- Thliveris A. T., Mount D. W. 1992. Genetic identification of the DNA binding domain of *Escherichia coli* LexA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 10: 4500-4504.
- Toledano M. B., Kullik I., Trinh F., Baird P. T., Schneider T. D., Storz G. 1994. Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell*, 78, 5: 897-909.
- Toro E., Shapiro L. 2010. Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 2, 2: 1-15.
- Trusca D., Scott S., Thompson C., Bramhill D. 1998. Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *Journal of Bacteriology*, 180, 15: 3946-3953.
- Ullsperger C., Cozzarelli N. R. 1996. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 49: 31549-31555.
- Wade J. T., Reppas N. B., Church G. M., Struhl K. 2005. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target site. *Genes and Development*, 19, 21: 2619-2630.

- Walker G. C. 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews, 48, 1: 60-93.
- Wang S. C., Shapiro L. 2004. The topoisomerase IV ParC subunit colocalizes with the *Caulobacter* replisome and is required for polar localization of replication origins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 25: 9251-9256.
- Wang X., Liu X., Possoz C., Sherratt D. J. 2006. The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. Genes Development, 20, 13: 1727-1731.
- White M. A., Eykelenboom J. K., Lopez-Vernaza M. A., Wilson E., Leach D. R. 2008. Non-random segregation of sister chromosomes in *Escherichia coli*. Nature, 455, 7217: 1248-1250.
- Woldringh C. L., Mulder E., Valkenburg J. A., Wientjes F. B., Zaritsky A., Nanninga N. 1990. Role of the nucleoid in the toporegulation of division. Research in Microbiology, 141, 1: 39-49.
- Yates J., Zhekova I., Baker R., Eklund B., Sherratt D. J., Arciszewska L. K. 2006. Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. Molecular Microbiology, 59, 6: 1754-1766.
- Yu X. C., Weihe E. K., Margolin W. 1998. Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. Journal of Bacteriology, 180, 23: 6424-6428.
- Zechiedrich E. L., Cozzarelli N. R. 1995. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. Genes Development, 9, 22: 2859-2869.
- Zheng M., Åslund F., Storz G. 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. Science, 281, 5357, 279: 1718-1721.

Dapa T. Identifikacija nepoznanih proteinov, ki uravnavajo odziv SOS bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2010

ZAHVALA

Pred mano je zadnji in najtežji del moje diplome ... ker pa vem, da vsi vedno preberemo le slednjega, se bom toliko bolj potrudila! ☺ Največja zahvala za nastanek tega dela gre naslednjim petim osebam:

Ne zgolj najboljši (so)mentor na temu planetu (in še dlje), tudi neverjeten znanstvenik z vsak dan novimi idejami, predvsem pa pravi priatelj – **Matej**, za to neverjetno izkušnjo, za vse znanje, ki si ga tako nesebično delil z mano in za še mnogo več – HVALA!

Redki imajo čast sodelovat z legendami, katerim uspe ligacija tudi v primerih, ko v ligacijsko zmes ne dodajo ligaze, kaj šele biti poučevani z njihove strani - jaz sem jo imela. **Zdravko**, hvala za vso pomoč, za vse znanje, vse nasvete, dneve polne smeha, zabave in matičnega mlečka!!! Hvala da ste me sprejeli v svoj laboratorijski raj, kjer domujejo jodlarčki in najboljša zbirka magnetkov!

Vse znanje in nasvete pa v praksi nikoli ne bi mogla uporabiti, če ne bi za to imela vedno pri roki vseh kemikalij, sterilnih tipsov, epic, vedno pripravljene glukoze, prijaznega nasmeha in lepe besede za spodbudo – zahvala za vse spregledane ukradene mililitre antibiotikov, pripravljenosti vedno pomagati, družbo, prijaznost in še in še gre **Gregorju Bajcu in Barbari Kastelic Bokal**. Vsa »velika« znanost se začne z vama!

Nenazadnje hvala mentorici **prof.dr. Darji Žgur-Bertok**, da me je pod svoje okrilje sprejela skoraj tri leta nazaj in mi že takrat dala neverjetno možnost pridobivanja laboratorijskih izkušenj ter mi kasneje omogočila nastanek tega diplomskega dela ter z mano delila vse svoje znanje.

Za temeljito recenzijo dela gre zahvala **doc.dr. Blagajani Herzog Velikonja**, posebna hvala pa tudi predsedniku komisije, **prof.dr. Davidu Stoparju**, ki mi je tekom študija vedno stal ob strani in mi pomagal na tisoč in en način. V spodnje nadstropje, na Katedro za zoologijo, gre zahvala za neverjetne mikroskopske posnetke **doc.dr. Roku Kostanjšku**. V zgornje nadstropje, na Katedro za mikrobiologijo, gre zahvala **Tini** za pomoč pri »uničevanju genov«, **Maji in Tjaši** za krajanje dolgih inkubacijskih časov ter **Mihi**, za nasvete pri mikroskopiranju in posojanju PCRja. V našem nadstropju hvala prav **vsem**! Z vami sem preživel tri izjemno lepa leta, polna novih znanj in spoznanj, pa tudi gojenja rožic, piknikov, najbolj norih pustovanj, bio in ne bio žurov, koncertov in še marsičesa! Lepo mi je bilo z vami!

Vsem **članom mojega Študentskega sveta BF** – enostavno hvala! Od Zagreba do konference, od seje do poseje, od mučni pa do manj mučnih sestankov – bili ste del mojih najlepših študentskih dni!

Prijatelji so kot zvezde, čeprav jih včasih ne vidiš, veš, da so... in vedno, v vsakem slabem trenutku, ko ne gre vse po mojih začrtanih poteh, mi že sama misel na vas polepša dan! Hvala vam! In prav posebna hvala vam, ki ste moje morje, *ker poneki mornar možda ostane bez lađe, ali bez mora, to je izuzetan peh ... in tudi jaz bi bila kot mornar brez morja, če ne bi imela vas*: **g.Maš**, hvala za izjemno zmožnost prenašanja kar dvojne doze Tanj in za vse dolge ure presedene v Neptunu ob najboljši kavi na svetu z doooooosti pene! **Moh**, v življenju je potrebno tudi tu pa tam kakšno neumnost ušpičit – hvala, da z mano počneš neumnosti, katerim nato pravimo življenjske izkušnje. Le kaj bi brez njih? **Raz**, še ena mojih številnih življenjskih izkušenj iz katere pa sem dobila Prijatelja z veliko začetnico! Si moja dišeča žogica v izobilju kave ...iz Caffetina, seveda! ;) **Sta**, hvala za prijateljstvo, ki traja in traja, kljub mojim številnim trmastim muham in obsesijam že od časov Esmeralde in Ronald. **Tau**, si tista »naivna« polovica dueta Tanj, zaradi katerege ostajam optimistka in, neglede na vse, verjamem da je svet lep! *Hvala vam, da ste del mene, čeprav vem, da vam z mano ni vedno lahko! Veselim se že novih dni, ker vem, da ob meni boste VI!* ☺

Staršema, Aleksandru, bratom, sestričnam, bratrancem, zermanam, zermanom, tetam, ujki, barbam, tečotu ... ni besed, s katerimi bi se vam lahko zahvalila za vse leta ljubezni, podpore in vsega kar ste mi dali! Iz srca hvala!

Rabila bi vsaj še dodatnih 100 strani, pa ne bi imela dovolj prostora za zahvalo, katero opisati se ne da. Za ljubezen, prijateljstvo, potrežljivost, izpolnitve še tako bizarnih želja, finančno podporo ter omogočanje šolanja in še marsičesa drugega gre zahvala **moji mami Dadi**. Čisto zares, jaz imam najboljšo mamo na svetu!

In ne bi bila jaz, če ne bi zahvale končala na svoj način! Zato neizmerna hvala **meni** ☺ za vztrajnost, tudi ko se mi res ni dalo več, **mucu Atili & »kužku«Andiju** za pomoč pri pisanku diplome, **Kinder čokoladi**, za vso energijo v januarskih in junijskih (pa še kakšnem septembriskem) dneh ter **Red Bullu** za energijo v nočeh, hvala **Hondi Accordu** za »tisti« cilj v življenju ter hvala **vsem vam**, ki ste potrežljivo prebrali mojo, ne ravno kratko, zahvalo!

Osupljivo rada vas imam!!!☺