

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ana REMS

**INTERAKCIJA REPRESORJA LexA IN
REKOMBINAZE RecA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ana REMS

INTERAKCIJA REPRESORJA LexA IN REKOMBINAZE RecA

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

INTERACTION OF LexA REPRESSOR AND RecA RECOMBINASE

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko 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 dr. Mateja Butala in za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Somentor: dr. Matej Butala

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: Prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: Prof. dr. Gregor Anderluh
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: Dr. Matej Butala
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Rems

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25:577.112(043)=163.6
KG	genetika mikroorganizmov/ <i>Escherichia coli</i> /odziv SOS/LexA/RecA/Izolacija/Interakcija LexA in RecA
AV	REMS, Ana
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/BUTALA, Matej (somentor)/ANDERLUH, Gregor (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	INTERAKCIJA REPRESORJA LexA IN REKOMBINAZE RecA
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 47 str., 4 pregl., 30 sl., 44 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Represor LexA bakterije <i>Escherichia coli</i> je glavni regulator odziva SOS. Slednji se v bakterijah sproži ob poškodbah DNA. LexA je sestavljen iz dveh domen, DNA vezavne N-terminalne domene (NTD) in C-terminalne domene (CTD), ki je odgovorna za dimerizacijo in cepitev LexA. LexA opravlja funkcijo represorja v obliki dimera. Dejavniki, ki sprožijo odziv SOS, aktivirajo RecA. Ta je drugi ključni regulator odziva SOS. Glavni korak odziva SOS je specifična proteolitska cepitev represorja LexA. Reakcijo cepitve LexA sproži filament RecA-ssDNA, ki je aktivna oblika RecA. RecA deluje kot ko-proteaza, ki stimulira avto-katalitsko cepitev LexA. LexA se cepi med Ala-84 in Gli-85, ki ležita v C-terminalni domeni. Cepitev ne uniči DNA vezavne domene, temveč odcepi DNA vezavno domeno od CTD, zaradi česar je vezava LexA na DNA manj stabilna. V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, ali aktivni filament RecA sproži avto-katalitsko cepitev LexA, ko je LexA vezan na tarčna zaporedja DNA. Ugotovili smo, da je zelo verjetno, da RecA sproži avto-katalitsko cepitev LexA, ko LexA ni specifično vezan na tarčno zaporedje DNA. Tako je za z RecA sproženo avto-katalitsko cepitev LexA najprej potrebna njegova disociacija z operatorja. Ugotovili smo še, da se LexA na različna operatorska zaporedja veže z različno afiniteto.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.25:577.112(043)=163.6
CX genetics of microorganisms/*Escherichia coli*/SOS response/LexA/RecA/Isolation/Cleavage of LexA/Interaction of LexA and RecA
AU REMS, Ana
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/ANDERLUH, Gregor (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI INTERACTION OF LexA REPRESSOR AND RecA RECOMBINASE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 47 p., 4 tab., 30 fig., 44 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB The LexA repressor of *Escherichia coli* regulates the cellular SOS response to DNA damage. LexA is made up of two domains, an N-terminal DNA binding domain and a C-terminal domain that provides both LexA dimerization and cleavage activity. LexA acts as a repressor in its dimeric form. SOS inducing treatments activate another regulatory protein, RecA. A critical step in the SOS response of *Escherichia coli* is the specific proteolytic cleavage of the LexA repressor. The cleavage reaction is catalyzed by the RecA-ssDNA filament, which is the activated form of RecA. RecA acts as a co-protease to stimulate the self-cleavage activity of LexA. LexA cleavage occurs between Ala-84 and Glu-85 which lie in the cleavage site region within the catalytic CTD. Although cleavage does not destroy the DNA binding domain, it separates it from the CTD, weakening DNA binding. The goal of the presented graduation thesis was to study, how the activated RecA triggers self-cleavage of LexA. Our results show, that it is most likely that RecA triggers self-cleavage of LexA, when LexA is not specifically bound to the DNA target site. Therefore, dissociation of LexA from operators is required for the RecA-dependent cleavage of LexA dimers. We also found that LexA has different binding affinities for different operators.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ODZIV SOS BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.1 Povezava med bakterijsko virulenco in odzivom SOS.....	3
2.2 REPRESOR LexA	4
2.2.1 Vezava proteina LexA na DNA.....	5
2.2.2 Cepitev proteina LexA	6
2.2.3 Dimerizacija proteina LexA	9
2.3 REKOMBINAZA RecA.....	10
2.3.1 Nastanek filamenta RecA-ssDNA	10
2.4 Z RecA SPROŽENA AVTO-KATALITSKA CEPITEV LexA.....	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Bakterijski sevi	14
3.1.2 Začetni oligonukleotidi	14
3.1.3 Plazmidi.....	15
3.1.4 Protitelesa.....	15
3.1.5 Kemikalije	15
3.1.6 Oprema.....	16
3.1.7 Gojišča	17
3.1.8 Raztopine.....	17
3.2 METODE	20
3.2.1 Izolacija plazmidne DNA.....	20
3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza	20
3.2.3 Čiščenje DNA iz agarognega gela	20
3.2.4 Etanolna precipitacija DNA	20
3.2.5 Priprava kompetentnih celic DH5α in BL21(DE3)	20
3.2.6 Transformacija kompetentnih celic DH5α in BL21(DE3).....	21
3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	21
3.2.8 Priprava plazmidov pLexA in pRecA	21
3.2.9 Izražanje in čiščenje rekombinantnih proteinov	22
3.2.10 Določanje koncentracije proteinov	23
3.2.11 NaDS-poliakrilamidna elektroforeza (NaDS-PAGE)	23
3.2.12 Vezava LexA na DNA	23

3.2.13	Test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA-Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	25
3.2.14	Prenos western in imunodetekcija	25
3.2.15	Cepitev proteina LexA s tripsinom.....	26
3.2.16	Priprava aktivnega filamenta RecA-ssDNA	27
3.2.17	Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA.....	27
4	REZULTATI.....	29
4.1	IZRAŽANJE IN ČIŠČENJE PROTEINOV LexA IN RecA	29
4.2	PRENOS WESTERN	29
4.3	TEST ZAMIKA ELEKTROFOREZNE MOBILNOSTI (EMSA)	30
4.4	CEPITEV LexA S TRIP SINOM	32
4.5	Z RecA SPROŽENA AVTO-KATALITSKA CEPITEV LexA.....	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	38
5.1	IZRAŽANJE IN ČIŠČENJE PROTEINOV LexA in RecA	38
5.2	ZAMIK ELEKTROFOREZNE MOBILNOSTI (EMSA)	38
5.3	PRENOS WESTERN	39
5.4	CEPITEV LexA S TRIP SINOM	39
5.5	Z RecA SPROŽENA AVTO-KATALITSKA CEPITEV LexA.....	41
5.6	SKLEPI.....	43
6	POVZETEK.....	44
7	VIRI	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	14
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi.....	14
Preglednica 3: Plazmidi	15
Preglednica 4: Protitelesa	15

KAZALO SLIK

Slika 1: Neposredni in posredni sprožilci odziva SOS.....	2
Slika 2: Primarna in sekundarna struktura monomera LexA	4
Slika 3: Predlagana konformacijska sprememba, ki je potrebna za vezavo proteina LexA na specifična zaporedja DNA.....	5
Slika 4: Različni konformaciji cepitvene regije represorja LexA in prikaz aktivnega centra	7
Slika 5: Cepitveno zmožna in cepitveno nezmožna konformacija CTD LexA.....	7
Slika 6: ClpXP-prepoznavno mesto na monomeru LexA	8
Slika 7: Dimerizacija LexA	9
Slika 8: Struktura filimenta RecA.....	10
Slika 9: Struktura enega zavoja filimenta RecA-ssDNA, ki je sestavljen iz 6 monomerov RecA	11
Slika 10: Nastanek filimenta RecA na DNA	11
Slika 11: Različni strukturi filimenta RecA-ssDNA.....	12
Slika 12: Model uravnavanja odziva SOS bakterije <i>E. coli</i>	13
Slika 13: Mesto cepitve LexA s proteazo tripsin.....	26
Slika 14: NaDS-PAGE analiza izoliranih proteinov RecA in LexA	29
Slika 15: Odtis western.....	30
Slika 16: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje gena <i>recA</i>	30
Slika 17: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje gena <i>umuD</i>	31
Slika 18: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje gena <i>cka</i>	31
Slika 19: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje "cka L box".....	31
Slika 20: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na operator gena <i>recA</i>	32
Slika 21: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na operator gena <i>umuD</i>	32
Slika 22: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na operator gena <i>cka</i>	33
Slika 23: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na zaporedje "cka L box".....	33
Slika 24: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na zaporedje "cka UP3"	33
Slika 25: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko mesto gena <i>recA</i>	34
Slika 26: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko mesto gena <i>umuD</i>	35
Slika 27: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko mesto gena <i>cka</i>	36
Slika 28: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko zaporedje "cka L box"	37

Slika 29: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko zaporedje "cka UP3"	37
Slika 30: Model uravnavanja odziva SOS bakterije <i>E. coli</i>	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
ATP	adenozin-3-fosfat
Ala	alanin
APS	amonijev persulfat
Arg	arginin
Asn	asparagin
BSA	goveji serumski albumin (ang. "Bovine Serum Albumine")
Bp	bazni par
Da	Dalton – enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase izotopa ^{12}C
dH ₂ O	destilirana voda
DNaza	deoksiribonukleaza (encim, ki cepi molekule DNA)
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EMSA	test zamika elektroforezne mobilnosti (ang. "Electrophoretic Mobility Shift Assay")
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (ang. "Fast Protein Liquid Chromatography")
G	gvanin
Gln	glutamin
Glu	glutaminska kislina
Gli	glicin
gojišče LB	gojišče Luria-Bertani
His	histidin
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
kb	kilo baze (število baz \times 1000)
Leu	levcin
Liz	lizin
m/v	razmerje masa / volumen
NaDS	natrijev dodecil sulfat
OD ₆₀₀	optična gostota (ang. "Optical Density") pri 600 nm
PCR	verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain Reaction)
PVDF	polivinil-difluorid
RNaza	ribonukleaza (encim, ki cepi molekule RNA)
Ser	serin
SSB	protein, ki se vežejo na enoverižno DNA (ang. "Single-Strand Binding proteins")
ssDNA	enoverižna DNA (ang. "Single Stranded DNA")
TBE	Tris-boratni elektroforezni pufer
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilen diamin
UV	ultravijolično
VIS	vidna svetloba

1 UVOD

1.1 NAMEN DELA

- Izraziti in očistiti rekombinantna proteina LexA in RecA.
- Proučiti stabilnost vezave represorja LexA na tarčna zaporedja DNA.
- Ugotoviti, ali aktivni filament RecA sproži cepitev LexA, ko je LexA specifično vezan na tarčno zaporedje DNA.

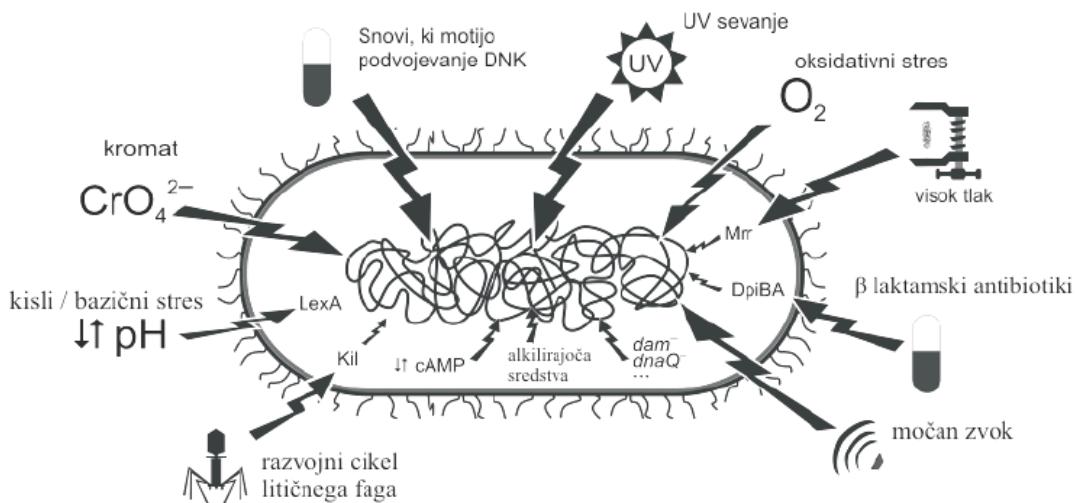
1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- LexA se na različna operatorska zaporedja veže z različno afiniteto in zato z DNA disociira različno hitro.
- Aktivni filament RecA ne sproži avto-katalitske cepitve LexA, ko je LexA specifično vezan na tarčno zaporedje DNA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ODZIV SOS BAKTERIJE *Escherichia coli*

Odziv SOS je koordiniran odziv celice na poškodbe genomske DNA, ki ga je prvi opisal in poimenoval Miroslav Radman v sredini sedemdesetih let (Radman, 1974). Odziv SOS pri bakteriji *E. coli* sprožijo številni endogeni ali eksogeni dejavniki, ki poškodujejo DNA bakterij (slika 1, Erill in sod., 2007).



Slika 1: Neposredni in posredni sprožilci odziva SOS (Erill in sod., 2007).

Odziv SOS pri bakteriji *E. coli* uravnavata produkta genov *lexA* in *recA*. Protein LexA je represor, protein RecA pa aktivator SOS odziva (Little in Mount, 1982).

Tekom rasti bakterij deluje protein LexA kot represor prepisovanja skupine genov, katerih produkti sodelujejo pri inhibiciji celične delitve in popravljanju poškodovane DNA. Protein LexA se veže na promotorska področja genov, vključenih v odziv SOS. Sterično onemogoči vezavo od DNA odvisne RNA-polimeraze in s tem prepreči začetek prepisovanja genov SOS. Protein RecA deluje kot senzor odziva SOS tako, da se veže na enoverižne konce DNA. Ti lahko nastanejo endogeno tekom podvojevanja poškodovane DNA, ali pa so posledica procesiranja enoverižnih koncov DNA z eksonukleazami. Ob nespecifični vezavi proteina RecA na enoverižne konce DNA, preide RecA v aktivno obliko, ki sproži avto-katalitsko cepitev LexA. Avto-katalitska cepitev onemogoči proteinu LexA vezavo na specifična zaporedja DNA in tako pride do sprožitve odziva SOS (Walker, 1984; Shingawa, 1996).

Derepresija genov, ki so vključeni v odziv SOS, sproži prepisovanje le-teh. Nastali produkti sodelujejo pri popravljanju poškodovane DNA in drugih sprememb, ki nastanejo kot posledica poškodovane DNA. Glavni povod za sprožitev odziva SOS je zaustavitev napredovanja podvojevalnih vilic. Zaradi tega hitro pride do prepisovanja prve skupine

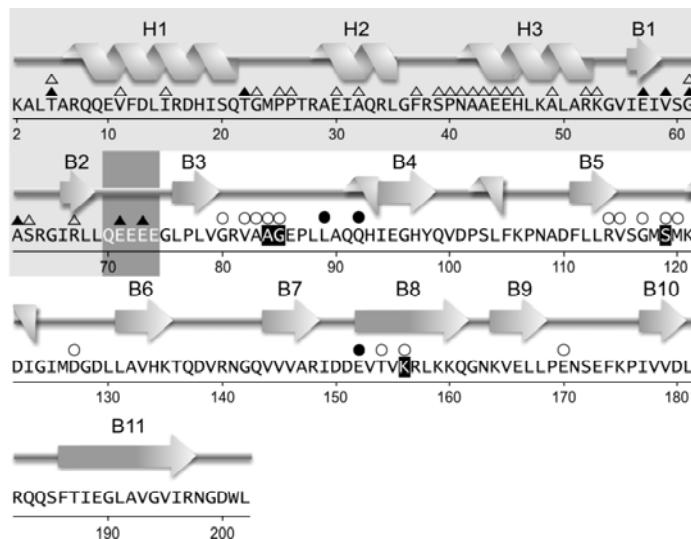
genov, npr. *recA* in *ssb*, ki zaščitijo in stabilizirajo vilice oz. mesta podvojevanja. Nato se z zamikom prepiše še druga skupina genov SOS, ki vključuje gene *uvrA*, *uvrB*, *ydjQ*, *uvrD*, *recN* in *uvrAB*. Njihovi produkti popravljajo poškodovano DNA z različnimi mehanizmi. Najpogostejsa sta popravljanje z izrezovanjem nukleotidov in popravljanje z rekombinacijo (Walker, 1984). Naknadno se prepišejo še geni *polB*, *dinB* in *umuDC*. Ti geni imajo zapis za tri alternativne DNA-polimeraze, ki omogočijo napredovanje zaustavljenih podvojevalnih vilic preko poškodb DNA tudi na račun mutageneze. Tako se celica izogne poškodbam, ki še niso bile popravljene in bi lahko preprečevale napredovanje podvojevalnih vilic. Odziv SOS vpliva tudi na delitev celice. Pri tem ima glavno vlogo produkt gena *sulA*, ki reagira s produkтом gena *ftsZ* in prepreči tvorbo septuma. Tako bakterije zaustavijo delitev celice vse dokler so prisotne poškodbe na DNA (Courcelle in sod., 2001).

2.1.1 Povezava med bakterijsko virulenco in odzivom SOS

Sevi bakterije *E. coli* so del normale črevesne flore pri ljudeh. Nekateri sevi bakterije *E. coli* imajo zapise za virulentne dejavnike, kot so npr. adhezini, toksini, invazini, kapsule, dejavniki mobilnosti, s katerimi se izognejo obrambnim mehanizmom gostitelja in povzročijo bolezenska stanja. Nekateri antibiotiki, posredno s protimikrobnim delovanjem na bakterije, povzročijo poškodbe DNA in sprožijo odziv SOS. Slednje lahko pripelje do prepisovanja bakterijskih genov virulence in pospešitve širjenja genov za odpornost proti antibiotikom (Miller in sod., 2004).

2.2 REPRESOR LexA

Monomer represorja LexA bakterije *E. coli* (22,4 kDa) je sestavljen iz dveh strukturno raznolikih domen, N-terminalne domene (NTD) in C-terminalne domene (CTD). Domeni sta med seboj povezani s hidrofilnim povezovalcem. S slike 2 je razvidna primarna in sekundarna struktura monomera LexA (Little in sod., 1981; Luo in sod., 2001; Hurstel in sod., 1988).



Slika 2: Primarna in sekundarna struktura monomera LexA. Spirale predstavljajo alfa vijačnice, puščice predstavljajo beta trekove. NTD je obarvana svetlo sivo, povezovalna regija je obarvana temno sivo, sledi ji CTD, ki ni obarvana. Aminokislinski ostanki, ki tvorijo katalitska mesta, so v črnih okvirčkih. Trikotniki nad aminokislinskimi ostanki prikazujejo mesta, ki so odgovorna za interakcijo LexA z DNA. Prazni trikotniki pomenijo, da mesta preprečujejo vezavo LexA na DNA, polni trikotniki pa pomenijo mesta, ki vezavo omogočijo (Butala in sod., 2009).

NTD proteina LexA je DNA vezavna domena, ki vsebuje tri vijačnice alfa z aminokislinskimi ostanki od 1 do 69. Vijačnica I vključuje aminokislinske ostanke od Ala-6 do Gln-21, vijačnica II od Arg-28 do Leu-35, vijačnica III pa od Asn-41 do Arg-52. Sledita jim dva antiparalelna trakova beta (Fogh in sod., 1995).

Povezovalec med CTD in NTD je sestavljen iz aminokislinskih ostankov od Gln-70 do Glu-74. Povezovalec ni le povezava med domenama, saj je pomemben tudi za vzpostavitev specifičnega stika med LexA in DNA. Kristalne strukture različnih mutant proteina LexA so pokazale, da je povezovalec izpostavljen raztopni, v kateri se nahaja protein (Luo in sod., 2001).

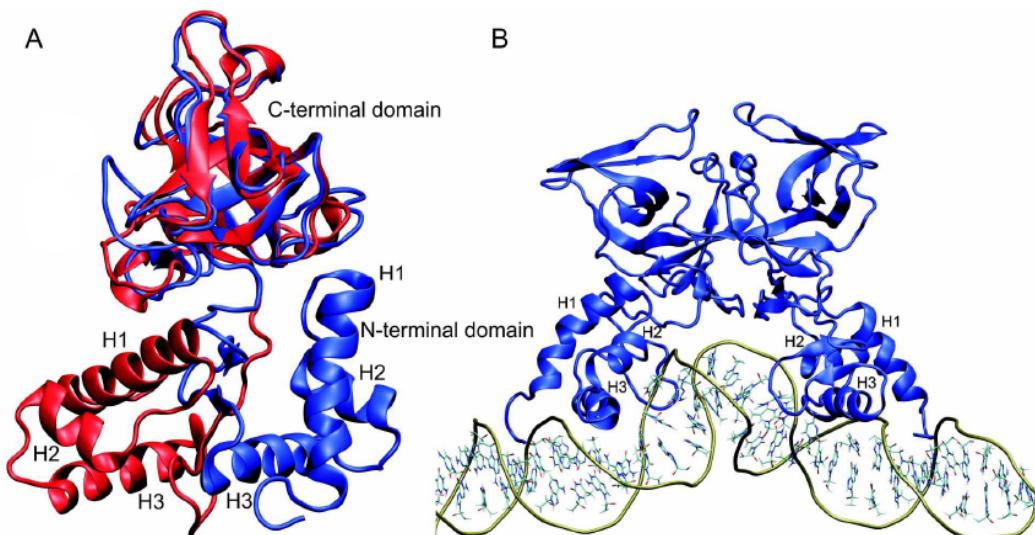
CTD je sestavljena iz trakov beta. Domena je odgovorna za oligomerizacijo in avto-katalitsko cepitev proteina LexA. Monomera LexA se v dimer povežeta izključno s CT-domensama. Način dimerizacije preko CTD, opažen v kristalnih strukturah nekaterih mutant proteina LexA, se ohrani tudi, ko je represor vezan na operator (Chattopadhyaya in Pal, 2004; Luo in sod., 2001).

2.2.1 Vezava proteina LexA na DNA

LexA bakterije *E. coli* se z N-terminalnim delom veže na 16 bp dolgo konsenzusno zaporedje CTGTATATATATACAG, ki je ohranjeno pri Gram-negativnih bakterijah. Zaporedja, kamor se veže protein LexA, se običajno nahajajo blizu ali znotraj operatorja. Tako protein LexA sterično onemogoči vezavo RNA-polimeraze na promotorje genov in s tem prepreči začetek prepisovanja genov (Walker, 1984; Wade in sod., 2005).

Specifične aminokisline, s katerimi se protein LexA veže na DNA, se nahajajo na NTD. Trakova beta z vijačnicama II in III tvorita motiv alfa vijačica-obrat-alfa vijačica, ki je DNA vezavni motiv in reagira s specifičnim nukleotidnim zaporedjem DNA (Fogh in sod., 1994). N-terminalni del vijačnice III vključuje ostanke aminokislin, ki so odgovorni za specifično prepoznavanje DNA. Usidrajo se v veliki žleb in tam reagirajo s specifičnimi bazami v zaporedju DNA. Krajša vijačica II pa se uleže vzdolž velikega žleba in reagira predvsem s fosfatnim ogrodjem DNA (Knegtel in sod., 1995; Dumoulin in sod., 1996; Thliveris in Mount, 1992).

Zadnji predlagan model vezave proteina LexA na DNA predpostavlja, da je za specifično prepoznavanje DNA in stabilno vezavo proteina LexA na DNA potrebna konformacijska sprememba proteina LexA: rotacija NTD glede na CTD (slika 3, Butala in sod., 2007).



Slika 3: Predlagana konformacijska sprememba, ki je potrebna za vezavo proteina LexA na specifična zaporedja DNA. **A:** Kristalna struktura monomera LexA. Rdeče je obarvana struktura LexA, nevezane na DNA, ki so jo izdelali Luo in sod. (2001). Modro je obarvan model strukture LexA, vezanega na DNA, ki so ga predlagali Butala in sod. (2007). **B:** Predlagan model represorja LexA na *cka*. Na operatorsko zaporedje gena *cka* se sicer vežeta dva dimera (Butala in sod., 2007).

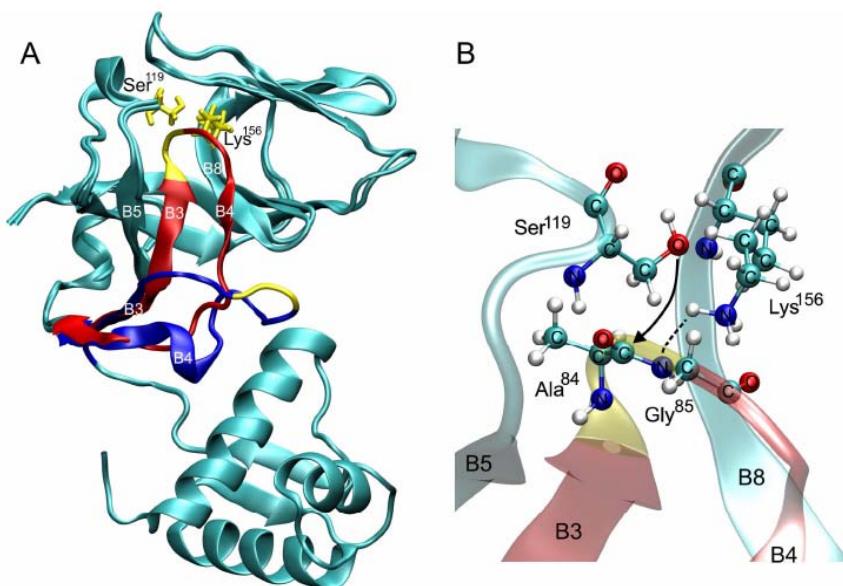
2.2.2 Cepitev proteina LexA

Cepitev proteina LexA je eden izmed prvih korakov derepresije odziva SOS bakterije *E. coli*. Posledica cepitve LexA je namreč njegova inaktivacija, saj je onemogočena vezava represorja LexA na DNA. Zato pride do derepresije genov SOS. Poznani sta dve možnosti cepitve LexA: a) intramolekularna avto-katalitska cepitev, ki poteče spontano pri visokem pH in b) z aktivnim filamentom RecA-ssDNA sprožena avto-katalitska cepitev. Slednja je bila dokazana tako *in vivo* kot *in vitro* (Little in Mount, 1982; Kim in Little, 1992).

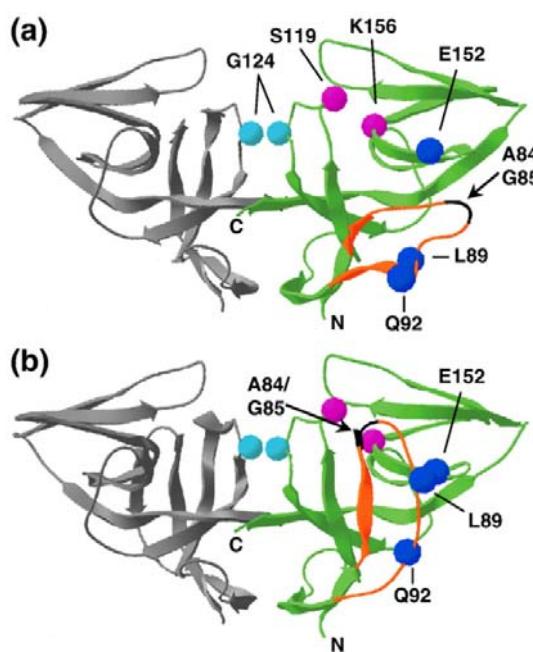
Pri avto-katalitski cepitvi LexA se cepi ista vez kot pri z RecA sproženi cepitvi. Do avto-katalitske cepitve lahko pride v prisotnosti EDTA, vendar je cepitev hitrejša v prisotnosti Ca^{2+} , Co^{2+} ali Mg^{2+} . Hitrost avto-katalitske cepitve je neodvisna od koncentracije LexA, kar dokazuje, da je ta reakcija intramolekularna (Little, 1984). Posledica avto-katalitske cepitve LexA je ločitev DNA-vezavne NTD od CTD, zaradi česar postane interakcija med LexA in DNA od 10- do 1000-krat šibkejša (Little in Mount, 1982; Kim in Little, 1992).

Aktivno mesto za cepitev proteina LexA je v CTD. Glavna aminokislinska ostanka, ki tvorita katalitsko jedro za cepitev LexA, sta Ser-119 in Liz-156. Diada Ser-Liz sproži cepitev vezi med Ala-84 in Gli-85. Predlagan model avto-katalitske cepitve LexA je prikazan na sliki 4. Aminokislinska ostanka Ala-84 in Gli-85 se nahajata v zanki. Ta lastnost omogoča C-terminalni domeni proteina LexA, da obstaja v dveh konformacijskih oblikah: cepitveno zmožni in cepitveno nezmožni konformaciji. Pri cepitveno zmožni konformaciji je zanka izpostavljena katalitskemu jedru oz. diadi Ser-Liz, pri cepitveno nezmožni konformaciji pa je zanka obrnjena stran od katalitskega jedra (sliki 4 in 5). Poleg tega je v cepitveno zmožni konformaciji Liz-156 zakrit v strukturi proteina in se nahaja v okolju, kjer pozitivni naboj aminokislinskega ostanka ni stabilen (Luo in sod., 2001).

Za cepitev proteina LexA je potrebna deprotonacija Liz-156, saj avto-katalitska cepitev poteče samo pri visokem pH. Roland in sod. (1992) so predlagali model, pri katerem deprotonacija povzroči konformacijsko spremembo LexA iz protonirane v deprotonirano konformacijo. Po tem modelu ima pri pH 7 le prib. 0,01 % molekul proteina LexA C-terminalno domeno v cepitveno zmožni in deprotonirani konformaciji, ostale molekule pa imajo CTD v cepitveno nezmožni konformaciji. Zaenkrat še ni dokazov o obstoju protonirane in deprotonirane konformacije, zato se smatra, da gre za enaki strukturi (protonirana konformacija je enaka cepitveno nezmožni, deprotonirana konformacija pa je enaka cepitveno zmožni).

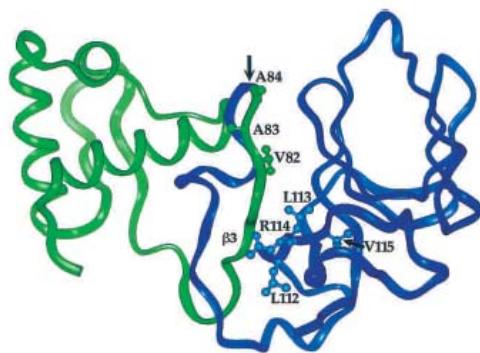


Slika 4: Različni konformaciji cepitvene regije represorja LexA in prikaz aktivnega centra. **A:** Kristalna struktura monomera LexA. CTD je v cepitveno nezmožni konformaciji (cepitvena regija je modro obarvana). Prekrita je s CTD, ki je v cepitveno zmožni konformaciji (cepitvena regija je rdeče obarvana) (Luo in sod., 2001). **B:** Predlagan model avto-katalitske cepitve LexA. Prikazana sta katalitska ostanka Ser-119 in Liz-156 ter mesto cepitve Ala-84 in Gli-85. Nevtralna baza Liz-156 aktivira Ser-119. Hidroksilna skupina aktiviranega Ser-119 deluje kot nukleofil in napade vez med Ala-84 in Gli-85, kar je prikazano s črno puščico. Sledi prenos protona k novo nastali amino skupini, kar je prikazano s prekinjeno črto (Little, 1991).



Slika 5: Cepitveno zmožna in cepitveno nezmožna konformacija C-terminalne domene LexA. Prikazana sta dimeri, pri katerih je en monomer sivo, drug pa zeleno. Na sliki (a) je CTD zelenega monomera v cepitveno nezmožni konformaciji, na sliki (b) pa sta CTD obej monomerov v cepitveno zmožni konformaciji. Z oranžno je označena cepitvena regija, s črno pa mesto cepitve (Giese in sod., 2008).

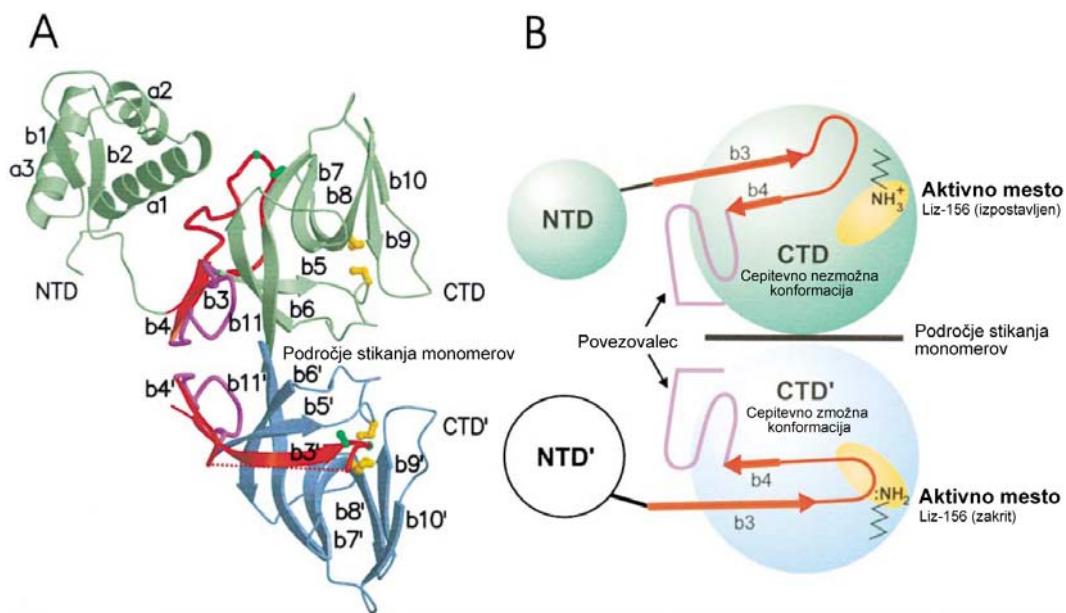
Po cepitvi proteina LexA pride do izpostavitve nekaterih aminokislinskih zaporedij, ki so bila prej skrita. Izpostavljeni zaporedji prepoznajo različne celične proteaze, ki razgradijo produkte cepitve LexA. Še posebej je pomembna razgradnja DNA-vezavnih N-terminalnih domen, ki bi se v nasprotnem primeru začele kopiti v celici in bi lahko utišale izražanje genov odziva SOS. Ena izmed proteaz bakterije *E. coli*, ki razgradi tako CTD kot tudi NTD je ClpXP. Razgradnja poteče zelo hitro, razpolovna doba obeh domen je le 4 minute (Kim in Little, 1992; Neher in sod., 2003).



Slika 6: ClpXP-prepoznavno mesto na monomeru LexA. Z modro je označena CTD, z zeleno je označena NTD. Predlagano prepoznavno mesto v CTD je označeno s puščico (Neher in sod., 2003).

2.2.3 Dimerizacija proteina LexA

Za dimerizacijo LexA je odgovorna izključno C-terminalna domena. Dva monomera LexA se med seboj povežeta preko dveh zank med naslednjimi aminokislinskim ostanki: med Gln-99 in Asp-110 ter med Ser-116 in Gli-128 (slika 7, Luo in sod., 2001).



Slika 7: Dimerizacija LexA. Kristalna struktura mutante LexA119, ki se ne cepi, ima namesto serina v katalitskem mestu 119 alanin. A: En monomer LexA je obarvan zeleno, drug monomer pa modro. Cepitveni mesti obeh monomerov sta obarvani rdeče, katalitsko jedro diada Ser-Liz rumeno. B: Shematski prikaz LexA119 dimera (Luo in sod., 2001).

Kim in Little (1992) sta predlagala model, po katerem se LexA v prvem koraku veže na DNA kot monomer, ki ima visoko specifičnost do polovice operatorskega mesta. Vezavi prvega monomera na DNA sledi vezava drugega monomera. Drug monomer se na DNA veže močneje, kooperativno, kot posledica interakcije protein-protein. V nasprotju s tem modelom pa so Mohana-Borges in sod. (2000) ugotovili, da je poglavitna oblika prostega LexA dimer, saj monomer LexA dimerizira že pri pikomolarni koncentraciji proteina. V celici se tako LexA veže na DNA in deluje kot represor prepisovanja v obliki dimerja.

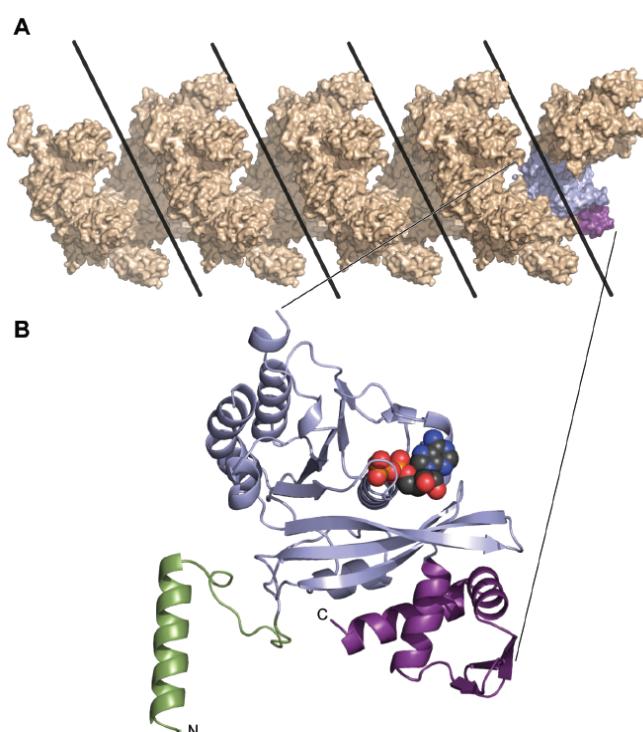
2.3 REKOMBINAZA RecA

Rekombinaze, ki sodijo v družino proteinov RecA, uravnavajo popravilo poškodovane DNA z rekombinacijo. Bakterijski protein RecA je ohranjen in prisoten pri skoraj vseh bakterijah. RecA bakterije *E. coli* (37,8 kDa) ima v celici različne vloge:

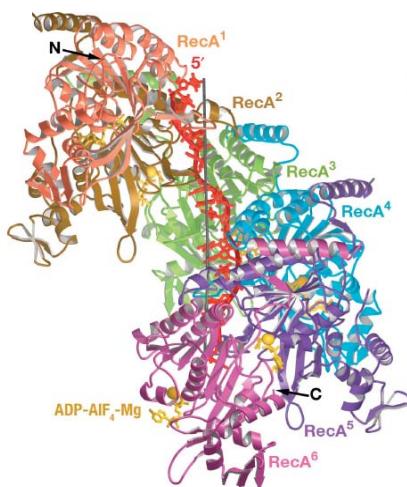
- Odgovoren je za glavne korake pri popravljanju poškodovane DNA z rekombinacijo (Cox, 1999).
- Direktno omogoči, da DNA-polimeraza V pri podvajanju obide poškodbe na DNA, kar je eden izmed mehanizmov odziva SOS (Schlachner in sod., 2006).
- Uravnava odziv SOS, saj deluje kot ko-proteaza, ki sproži avto-katalitsko cepitev represorja LexA (Little, 1991). Slednja funkcija je bistvena za razumevanje interakcije represorja LexA in rekombinaze RecA.

2.3.1 Nastanek filamenta RecA-ssDNA

Le aktivni filament RecA-ssDNA lahko deluje kot ko-proteaza pri cepitvi proteina LexA. RecA se veže na ssDNA tako, da okrog ssDNA nastane nukleoproteinski filament v obliki desnosučne vijačnice. Vsak zavoj v filamentu je sestavljen iz približno 6,2 RecA proteina, vsak monomer RecA pa reagira s približno tremi nukleotidi DNA. Struktura DNA v filamentu je nekoliko spremenjena. DNA se raztegne vzdolž filimenta za 50-60 % in ima približno 18 nukleotidov na zavoj. Na sliki 8 je prikazana struktura filimenta, na sliki 9 pa struktura posameznega zavoja filimenta (Cox, 2007; Chen in sod., 2008).

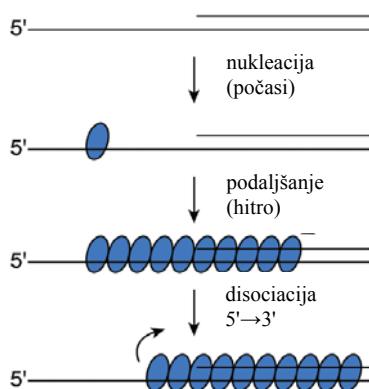


Slika 8: Struktura filimenta RecA. **A:** Filament iz 24-ih monomerov RecA, ki tvorijo 4 obrate. **B:** Monomer RecA (Cox, 2007).



Slika 9: Struktura enega zavoja filimenta RecA-ssDNA, ki je sestavljen iz 6-ih monomerov RecA. Prikazanih je le 15 od 18-ih nukleotidov, ki so znotraj zavoja. Enoveržna DNA je obarvana rdeče (Chen in sod., 2008).

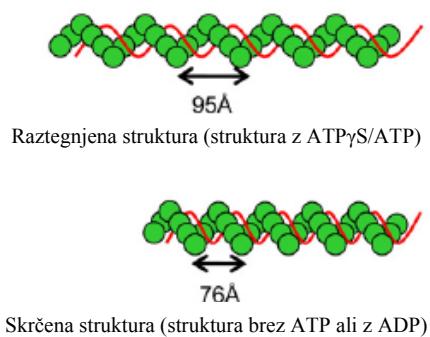
Pri nastanku filimenta najprej pride do nukleacije (en monomer RecA se veže na ssDNA), sledi podaljšanja filimenta (slika 10). Podaljševanje filimenta je enostavno dodajanje monomerov RecA, ki imajo vezan ligand ATP. Omejujoča je stopnja nukleacije, saj v primerjavi s podaljšanjem poteče zelo počasi. Nukleacija je hitrejsa na ssDNA kot na dsDNA in je močno upočasnjena, če so na ssDNA vezani SSB (Register in Griffith, 1985). Proses je reverzibilen. Disociacija se prične na 5' koncu DNA in ni zgolj obrnjen proces nastajanja filimenta, saj mora priti do hidrolize ATP. Disociacija z enoveržne DNA poteka s hitrostjo 60-70 monomerov/min (Arenson in sod., 1999).



Slika 10: Nastanek filimenta RecA na DNA (Cox, 2007).

Filament RecA-ssDNA je elastičen, njegova dolžina je namreč odvisna od nukleotidnih kofaktorjev. V prisotnosti ATP je filament raztegnjen, v odsotnosti nukleotidnega kofaktorja ali v prisotnosti ADP pa je filament v skrčeni obliki (slika 11). Slednja oblika filimenta je neaktivna in ne opravlja zgoraj opisanih funkcij posredovanih z RecA (Nishinaka in sod., 2007). Rekombinacija je torej odvisna od ATP, saj se le kompleks, ki ga sestavljajo RecA, ssDNA in ATP, lahko veže na dsDNA, kar je prvi korak pri popravljanju poškodovane DNA z rekombinacijo (Chen in sod., 2008). Od ATP je odvisna

tudi cepitev proteina LexA, saj mora biti filament RecA v aktivni konformaciji. V raziskavah se uporabljajo analogi molekule ATP, ki upočasnijo dinamiko asociacije in disociacije aktivnega filimenta RecA. Dva takšna analoga sta ATP γ S, ki hidrolizira počasneje ter ADP-aluminijev fluorid-Mg (ADP-AlF₄-Mg), ki ne hidrolizira.



Slika 11: Različni strukturi filimenta RecA-ssDNA (Nishinaka in sod., 2007).

2.4 Z RecA SPROŽENA AVTO-KATALITSKA CEPITEV LexA

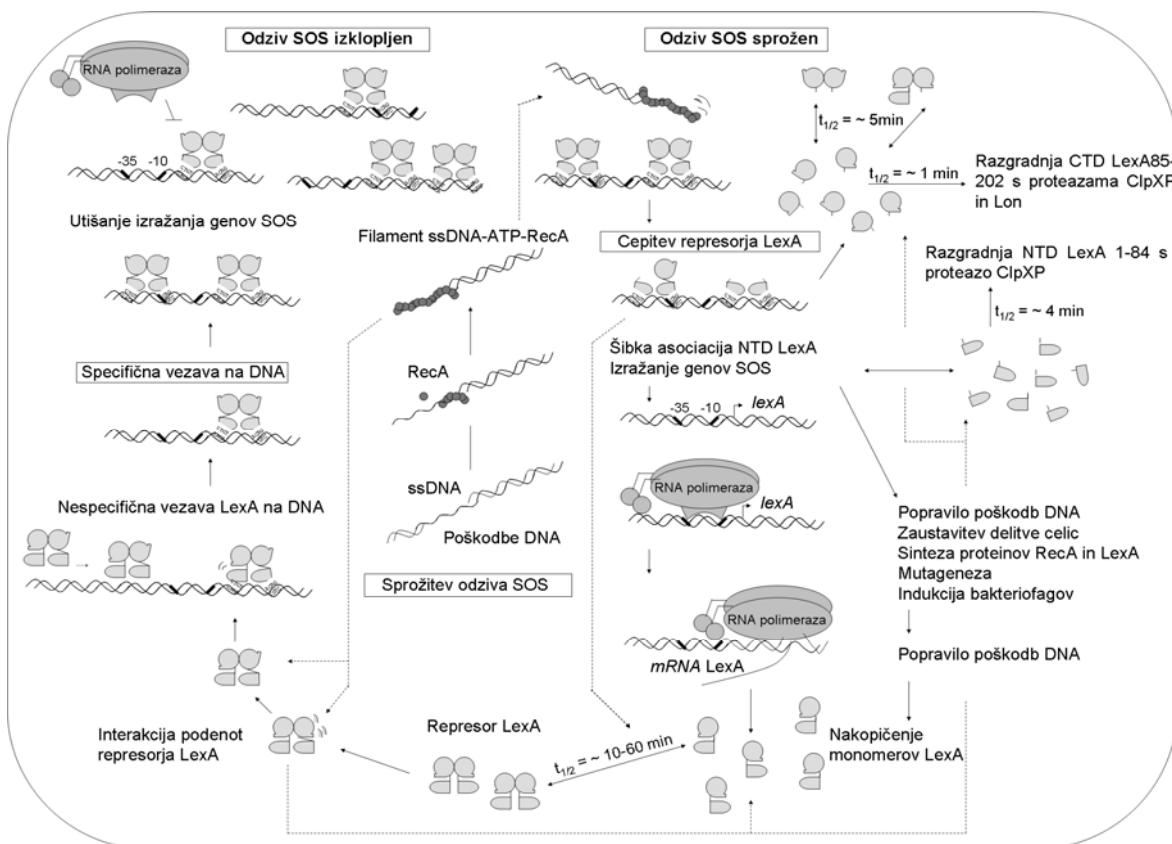
Aktivni filament RecA deluje kot ko-proteaza, saj posredno cepi LexA. Tekom normalne rasti ima *E. coli* prib. 7200 molekul RecA in 1300 molekul LexA (Sassanfar in sod., 1990). 20 % molekul LexA je prostih, nevezanih na DNA. Po indukciji odziva SOS ter nastanku aktivnega filimenta RecA se nivo LexA v celici zniža za 10-krat, iz začetne koncentracije 2 μ M na 0,2 μ M. Večina prostega LexA ima CTD v cepitveno nezmožni konformaciji, zato cepitev LexA teče zelo počasi. Indukcija odziva SOS pospeši cepitev za približno 50-krat (Little, 1983).

Mehanizem z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA še ni povsem jasen. Postavljenih je bilo kar nekaj modelov, kako naj bi aktivni filament RecA vplival na cepitev LexA.

Že leta 1987 sta Slilaty in Little predpostavila, da je za aktivacijo Ser-119 potrebna deprotonacija Liz-156 (Slilaty in Little, 1987). Na teh ugotovitvah so temeljili prvi modeli z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA. Predlagali so, da RecA zniža pK_a Liz-156 in na ta način omogoči deprotonacijo Liz-156 tudi pri nevtralnem pH (Little, 1991). Nato so Roland in sod. (1992) predlagali, da interakcija z aktivnim filamentom RecA povzroči poleg deprotonacije Liz-156 še konformacijsko spremembo LexA. Sprva so predvidevali, da aktivni filament RecA preferenčno reagira z LexA, ki ima CTD v cepitven zmožni konformaciji, se nanjo veže in jo na nek način stabilizira (Luo in sod., 2001), vendar pa so pred kratkim Giese in sod. ugotovili, da aktivni filament RecA lahko reagira z obema konformacijama CTD LexA, cepitveno zmožno in cepitveno nezmožno. Poleg tega RecA vezavno mesto na LexA ni poznano, kar nasprotuje hipotezi o vezavi RecA na LexA (Giese in sod., 2008).

Ugotovili so, da je poleg cepitve monomera, možna tudi cepitev dimera LexA in da je cepitev dimera hitrejša od cepitve monomera. Postavili so hipotezo, da C-terminalna domena ene podenote dimera LexA določa cepitveno mesto druge podenote. Tako je interakcija med dvema podenotama LexA odgovorna, da postane ena podenota cepitveno zmožna in vpliva na hitrost cepitve. Aktivni filament RecA torej stimulira spremembo CTD proteina LexA iz cepitveno nezmožne konformacije v cepitveno zmožno in zato lahko sklepamo, da RecA vsaj delno deluje na alosteričen način (Giese in sod., 2008).

Butala in sod. so predlagali celosten model regulacije odziva SOS, ki je prikazan na sliki 12 (Butala in sod., 2009).



Slika 12: Model uravnavanja odziva SOS bakterije *E. coli*. Represor LexA je vezan na operatorska mesta genov SOS in preprečuje njihovo transkripcijo. Poškodbe DNA sprožijo nastanek filimenta RecA, ki inducira avto-katalitsko cepitev LexA in tako pride do derepresije odziva SOS. Ko celica popravi poškodovano DNA, odziv SOS ni več inducirani (Butala in sod., 2009).

Ni jasno, ali aktivni filament RecA sproži avto-katalitsko cepitev LexA, ko je LexA vezan na tarčna zaporedja DNA, ali ko je LexA v prosti, na DNA nevezani obliki. Little in Mount (1982) sta postavila hipotezo, da se represor LexA ne cepi, ko je vezan na DNA in da je za cepitev najprej potrebna njegova disociacija z DNA, vendar ta hipoteza še ni bila dokazana. Hipoteza temelji na opažanju, da dodatek DNA z operatorskim zaporedjem za LexA upočasni z RecA sproženo avto-katalitsko cepitev LexA.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Preglednica 1: Laboratorijski sevi *E. coli*.

Sev	Pomembne genotipske lastnosti	Referenca
DH5 α	$\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1$	Novagen, pET System Manual, 2005
BL21(DE 3)	F $^-$ <i>dcm</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> <i>gal</i> <i>lon</i> <i>hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ (DE3)	Novagen, pET System Manual, 2005
RW118	<i>thr-1 araD139(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 supE44 gal K2 hisG4 rpsL31 xyl-5 mtl-1 araE thi-1 sulA211</i>	Page in sod., 1990
JBC 387	Δ <i>nir</i> Δ <i>lac</i>	Page in sod., 1990

3.1.2 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi. Podčrtana so prepoznavna mesta restrikcijskih endonukleaz, Bio je molekula biotina na 5' koncu nukleotida.

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5'-3'
LexAZA-vodilni	GCG <u>CGGATCC</u> AAAGCGTTAACGGCCAGGCAAC <i>BamHI</i>
LexASA-povratni	CGC <u>ACGCGT</u> TTACAGCCAGTCGCCGTTGCGAA <i>MluI</i>
RecAZA-vodilni	GCG <u>CGGATCC</u> GCTATCGACGAAAACAAACAGA <i>BamHI</i>
RecASA-povratni	CGC <u>ACGCGT</u> TTAAAAATCTCGTTAGTTCTGC <i>MluI</i>
CkaUpBio-vodilni	BioCCATGCTCTGACATGGACAATGCTGAG
CkaDown-povratni	GCCATAAATTCCCTTTGATAATT
UmuDUpBio-vodilni	BioGATAGCCTGAATCAGTATTGATC
UmuDDown-povratni	CTTGATAAACACATAATAATCTGCC
RecAUpBio-vodilni	BioGCAGACCTTGTGGCAACAATTTC
RecADown-povratni	GGATAGTCAATATGTTCTGTTG

3.1.3 Plazmidi

Preglednica 3: Plazmidi

Plazmid	Pomembne genotipske lastnosti	Referenca
pHistag	Promotor za T7 RNA-polimerazo, ekspresijski vektor uravnan z IPTG	Kristan, 2005
pMB1	pT7-7 z vstavljenim genom <i>lexA</i>	Butala, 2008
pKCT1	Fragment <i>TaqI</i> plazmida pUC19 z Ap ^r genom, kloniran v pColK-K235	Mulec in sod., 2003
pKCT3-UP1	pKCT1 s <i>cka-gfp</i> , brez IS2, mutacija v enem vezavnem zaporedju LexA (5' upstream)	Mrak in sod., 2007
pKCT3-UP3	pKCT1 s <i>cka-gfp</i> , brez IS2, mutacija v vseh treh vezavnih zaporedjih LexA	Mrak in sod, 2007

3.1.4 Protitelesa

Preglednica 4: Protitelesa

Protitelo	Proizvajalec
Zajčja protitelesa proti N-terminalnemu delu LexA	Upstate, ZDA
Mišja protitelesa proti penta-histidinskemu repku (His) ₅	QiaGene, ZDA
Kozja protimišja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Santa Cruz Biotechnology, ZDA
Kozja protizajčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Santa Cruz Biotechnology, ZDA

3.1.5 Kemikalije

agar	Roth, Nemčija
agaroza	BMA, ZDA
amonacetat	Merck, Nemčija
APS	Sigma, ZDA
ampicilin	Sigma, ZDA
ATP γ S	Sigma, ZDA
baza TRIS	Sigma, ZDA
bromfenol modro	Sigma, ZDA
CaCl ₂	Merck, Nemčija
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Nemčija
dializno črevo	Sigma, ZDA
DTT	Sigma, ZDA
DNaza I, RNaza I	Sigma, ZDA
dNTP mix (deoksiribonukleozid trifosfat-mešanica)	MBI Fermentas, Litva
etanol	Merck, Nemčija
etidijev bromid	Sigma, ZDA

EDTA	Kemika, Hrvaška
glicerol	Sigma, ZDA
glicin	Sigma, ZDA
gojišče LB	Roth, Nemčija
glukoza	Sigma, ZDA
glutamat	Sigma, ZDA
BSA	Sigma, ZDA
HCl	Merck, Nemčija
imidazol	Sigma, ZDA
IPTG	Sigma, ZDA
KCl	Merck, Nemčija
metanol	Merck, Nemčija
MgCl ₂	Merck, Nemčija
MgSO ₄	Merck, Nemčija
morfolinopansulfonska kislina (MOPS)	Sigma, ZDA
Na ₂ CO ₃	Merck, Nemčija
Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
Na-acetat	Merck, Nemčija
Na-citrat	Sigma, ZDA
NaCl	Merck, Nemčija
NaDS	Sigma, ZDA
NaH ₂ PO ₄	Kemika, Hrvaška
NaOH	Kemika, Hrvaška
TEMED	Sigma, ZDA
tripsin	Sigma, ZDA
Tris-HCl	Sigma, ZDA
trombin	Novagen, Nemčija
β-merkaptoetanol	Merck, Nemčija

3.1.6 Oprema

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- stresalnik (Infors H, Švica)
- stresalna kopel (Stoval Life Science, ZDA)
- aparatura za PCR:
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Kanada)
 - Biometra UNO II (Biometra, Nemčija)
- namizna centrifuga (Eppendorf centrifuge 5417C, Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga (BECKMAN J2-21MIE Centrifuge, Beckman Coulter, ZDA)
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Švica)
- elektroforeza 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Švedska)
- vroča kopel LKB – "Multi temp II" (Pharmacia Biotech, ZDA)
- FPLC
 - kolona Superdex™ 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švedska)
 - FPLC aparatura Äcta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech., Švedska)
- dializne vrečke Dialysis tubing, Cellulose membrane (SIGMA, ZDA)

- spektrofotometer
- UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer, Kanada)
- Shimadzu UV-2101 PC UV/VIS Scanning Spectrometer (SHIMADZU, Japonska)
- vibracijski stresalnik Lab dancer (IKA-WERKE, Nemčija)
- vibracijski stresalnik EV 100 (Tehtnica, Slovenija)
- kopel-stresalnik za razbarvanje gelov The Belly Dancer (Stovall, Life Science, inc., ZDA)
- sonikator VCX 130 (Sonics & Materials, ZDA)

3.1.7 Gojišča

3.1.7.1 Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)

Tekoče gojišče LB vsebuje 10g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasni ekstrakt v 1 L destilirane vode. Sterilizirali smo z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min.

3.1.7.2 Tekoče gojišče LB z ampicilinom

Postopek priprave tekočega gojišča LB z ampicilinom je enak postopku priprave tekočega gojišča LB (Luria-Bertani), le da smo po avtoklavirjanju gojišču dodali še ustrezno količino ampicilina. Koncentracija ampicilina v gojišču LB je 100 µg/mL.

3.1.7.3 Trdno gojišče LB

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

3.1.7.4 Trdno gojišče LB z ampicilinom

Postopek priprave trdnega gojišča LB z ampicilinom je enak postopku priprave trdnega gojišča LB, le da smo po avtoklavirjanju in pred razlivanjem plošč v ohlajeno gojišče dodali ustrezno količino ampicilina. Koncentracija ampicilina v gojišču LB je 100 µg/mL.

3.1.8 Raztopine

3.1.8.1 Raztopine za agarozno gelsko elektroforezo

Pufer TBE (5×)

0,45 M Tris-borat
10 mM EDTA

Nanašalni elektroforezni pufer (6×)

0,25 % bromfenol modro (m/v)
0,25 % ksilen cianol (m/v)
30 % glicerol (m/v)

3.1.8.2 Raztopine za pripravo kompetentnih celic

CaCl₂, Tris-glicerol

10 mM Tris-HCl (pH 7,0)

50 mM CaCl₂

10 % glicerol (m/v)

3.1.8.3 Raztopine za pripravo bakterijskih lizatov in izolacijo rekombinantnih proteinov

Pufer TSE

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

300 mM NaCl

10 mM EDTA

Pufer za dializo

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

200 mM NaCl

Pufer za lizo celic

50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4)

300 mM NaCl

10 mM imidazol

20 mM β-merkaptoetanol (samo za RecA)

3.1.8.4 Raztopine za NaDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo (NaDS-PAGE)

Elektroforezni pufer (10×)

25 mM Tris (pH 7,4)

1,92 M glicin

35 mM NaDS

Raztopina za barvanje

10 % ocetna kislina (v/v)

40 % metanol (v/v)

0,5 % Coomassie Brilliant Blue (m/v)

Nanašalni pufer (2×)

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

5 % NaDS (m/v)

2 mM EDTA

10 % glicerol (v/v)

0,2 % Coomassie Brilliant Blue (m/v)

Raztopina za razbarvanje

10 % ocetna kislina (v/v)

40 % metanol (v/v)

3.1.8.5 Raztopine za Ni-NTA afinitetno kromatografijo

Vezavni pufer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4)

300 mM NaCl

20 mM imidazol

20 mM β-merkaptoetanol (samo za RecA)

Elucijski pufer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4)

300 mM NaCl

250 mM imidazol

20 mM β-merkaptoetanol (samo za RecA)

3.1.8.6 Raztopine za tekočinsko kromatografijo za hitro ločevanje proteinov (FPLC)

Pufer za FPLC

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

0,5 M NaCl

Oba pufra za FPLC smo filtrirali skozi filtra s premerom por 0,45 µm (Milipore, ZDA) in ju odzračili.

3.1.8.7 Raztopine za reakcije cepitve LexA

Pufer za aktivacijo RecA

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

2 mM MgCl₂

1 mM DTT

1 mM ATPγS

Pufer za vezavo LexA na DNA

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

200 mM NaCl

1 mM EDTA

Pufer za z RecA sproženo cepitev LexA

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

1 mM ATPγS

3.1.8.8 Raztopine za prenos western

Pufer za mokri prenos (prenos western)

20 % metanol (v/v)

100 mL 10× elektroforeznega pufra za

NaDS-PAGE

dH₂O do 1 L

Pufer za spiranje PVDF membran (20×)

200 mM Tris-HCl (pH 7,4)

20 mM EDTA

1 M NaCl

Pufer za blokiranje PVDF membran

1× pufer za spiranje membran

4 % BSA (m/v)

Pufer za razvijanje PVDF membran

25 mM Tris-HCl

0,72 mM Na₂HPO₄

137 mM NaCl

Raztopina za barvanje PVDF membran

30 mg 4-kloro-1-naftola v 10 mL metanola

50 mL pufra za razvijanje PVDF membran

60 µL H₂O₂

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija plazmidne DNA

Izolacijo plazmidne DNA smo izvedli s kompletom "GenJET Plasmid Miniprep Kit" (Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca.

3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Velikost, izolacijo in čistost pridobljenih vzorcev DNA smo preverjali v agaroznem gelu, ki smo mu 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 tako, da smo DNA bakteriofaga λ dodali encim PstI (1 U encima PstI/mg DNA). Zmes smo inkubirali 2 uri pri 37 °C. Poleg lestvice λ/PstI smo uporabljali še 100 bp in 1 kb lestvico fragmentov (Fermentas, Litva). Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili tudi za test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA).

3.2.3 Čiščenje DNA iz agaroznega gela

Uporabili smo 1,5-odstotni gel za čiščenje produktov PCR. Iz gela smo DNA čistili po navodilih proizvajalca s kompletom "QIAQuick Gel Extraction Kit" (Qiagen, ZDA). Očiščeno DNA smo hranili pri -20 °C.

3.2.4 Etanolna precipitacija DNA

Raztopini DNA, ki smo jo želeli skoncentrirati, smo dodali 10 M amonijev acetat do končne koncentracije 2-2,5 M ter premešali. Dodali smo še 2 volumna ohlajenega 96 % etanola in ponovno premešali. 10 min smo inkubirali pri -80 °C, nato pa 10 min centrifugirali pri 4 °C in 14000 obr./min. Odstranili smo ves supernatant, dodali 750 µL 80% etanola ter centrifugirali pri 14000 obr./min še 2 min. S pipeto smo odstranili ves preostali supernatant ter DNA posušili na 37 °C. Nazadnje smo DNA raztoplili v poljubni količini destilirane vode.

3.2.5 Priprava kompetentnih celic DH5α in BL21(DE3)

V 5 mL tekočega gojišča LB smo nacepili kolonijo izbranega seva in nacepljen LB inkubirali na stresalniku (250 obr./min) pri 37 °C preko noči. Naslednji dan smo z 200 µL prekonočne kulture inokulirali 50 mL tekočega gojišča LB. Inokulirano gojišče smo stresali pri 37 °C na 250 obr./min in vsako uro merili optično gostoto pri 600 nm (OD₆₀₀). Ko je OD₆₀₀ narasla do vrednosti med 0,3 in 0,4, smo 34 mL gojišča odpipetirali v ohlajene centrifugirke ter inkubirali 10 minut 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 centrifugirali še 1 min pri 4000 obr./min in 4 °C. Odstranili smo preostanek supernatanta ter oborino resuspendirali v 7 mL ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂. Ponovno smo po 10-

minutni inkubaciji na ledu centrifugirali 10 min pri 4000 obr./min na 4 °C, odstranili ves supernatant ter ponovno centrifugirali pri istih pogojih 1 min. Po odstranitvi preostalega supernatanta smo usedlino resuspendirali v 1,4 mL ledeno hladnega CaCl₂. Dobljeno suspenzijo smo razdelili v eppendorfove epruvetke, in sicer v vsako po 100 µL. Dodali smo tudi po 23 µL 87-odstotenega glicerola, ki služi kot krioprotektant. Do uporabe smo pripravljene kompetentne celice hranili pri –80 °C.

3.2.6 Transformacija kompetentnih celic DH5α in BL21(DE3)

100 µL kompetentnih celic smo zmešali z 10 µL ligacijske mešanice ali izoliranega plazmida. Mešanico smo 30 min inkubirali na ledu, nato pa za 90 s izpostavili temperaturi 42 °C. Sledila je ponovna inkubacija na ledu za 2-3 min. Nato smo mešanici dodali 400 µL tekočega gojišča LB ter inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Po 1 h smo transformante razmazali na plošče LB z ampicilinom. Preko noči smo plošče inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo prešteli število zraslih kolonij ter preverili ustreznost transformacije kolonij s PCR in agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Sestava osnovne zmesi verižnih reakcij s polimerazo:

2 µL plazmidne ali kromosomske DNA (100 ng)
po 1 µL oligonukleotidnih začetnikov (0,1 nM)
1 µL dNTP (0,2 µL nM, Fermentas, Litva)
0,5 µL DNA-polimeraza *Pfu* (Promega, ZDA)

Pomnoževanje DNA je potekalo pri identičnih pogojih za vse reakcije: začetna denaturacija pri 95 °C (3 min), ki ji je sledilo 30 ciklov pri 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (št. kbp × 1 min) in zaključno podaljševanje pri 72 °C (5 min).

3.2.8 Priprava plazmidov pLexA in pRecA

Pripravili smo plazmid za izražanje proteina LexA in plazmid za izražanje proteina RecA v sevu *E. coli* BL21(DE3). Proteina LexA in RecA sta imela na N-terminalni domeni histidinski repek iz šestih ostankov histidina (His)₆ in prepoznavno zaporedje za proteazo trombin [(His)₆SerSerLeuValProArg|GlySer]. Kot vektor smo uporabili plazmid pHistag (Kristan, 2005), ki je izpeljanka plazmida za izražanje rekombinantnih proteinov pET8c. Plazmid pET8c je majhen plazmid (prib. 2,5 kb), ki ima zapis za β-laktamazo (odpornost proti ampicilinu) ter promotor za T7 RNA-polimerazo. Za promotorjem je zapis za N-terminalni del rekombinantnih proteinov, ki ima šest histidinov in dva serina. Na pET8c ni zapis za T7 RNA-polimerazo. Ta je na profagu DE3 v bakterijskem kromosomu seva *E. coli* BL21(DE3). Izražanje plazmida je uravnavano z IPTG.

3.2.8.1 Priprava plazmida pRecA

S PCR smo pomnožili zaporedje, ki ima zapis za RecA in se nahaja na kromosomu *E. coli* RW118. Za pomnoževanje smo uporabili začetna oligonukleotida RecAZA in RecASA (preglednica 2). Produkt PCR smo pred nadaljnjo uporabo očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR "QIAquick PCR Purification kit" po navodilih proizvajalca.

Vektor pHistag smo razrezali z restriktijskima endonukleazama *MluI* in *BamHI* po navodilih proizvajalca (Fermentas, Litva). Rezane dele vektorja smo med seboj ločili z agarozno elektroforezo. Želeni fragment pDNA smo nato izrezali iz agaroznega gela in očistili, kot je opisano pri metodi Čiščenje DNA iz agaroznega gela (2.2.3).

Z restriktijskima endonukleazama *MluI* in *BamHI* smo razrezali pomnožen fragment z zapisom za RecA ter nato s pomočjo T4 DNA-ligaze (Fermentas, Litva) vstavili fragment z zapisom za RecA v pripravljen vektor.

3.2.8.2 Priprava plazmida pLexA

S PCR smo pomnožili zaporedje, ki ima zapis za LexA in se nahaja na plazmidu pMB1 (Butala, 2008). Za pomnoževanje smo uporabili začetna oligonukleotida LexAZA in LexASA (preglednica 2).

Vektor pHistag smo razrezali z restriktijskima endonukleazama *MluI* in *BamHI* po navodilih proizvajalca (Fermentas, Litva). Rezane dele vektorja smo med seboj ločili z agarozno elektroforezo. Želeni fragment pDNA smo nato izrezali iz agaroznega gela in očistili, kot je opisano pri metodi Čiščenje DNA iz agaroznega gela (2.2.3).

Z restriktijskima endonukleazama *MluI* in *BamHI* smo razrezali pomnožen fragment z zapisom za RecA ter nato s pomočjo T4 DNA-ligaze (Fermentas, Litva) vstavili fragment z zapisom za RecA v pripravljen vektor.

3.2.9 Izražanje in čiščenje rekombinantnih proteinov

Proteina LexA in RecA smo izolirali in očistili po enakem protokolu.

Protein smo izrazili v sevu *E. coli* BL21(DE3), za katerega je značilen visok nivo izražanja rekombinantnih proteinov. Sev ima v gen *int* vstavljen bakteriofag DE3, ki je različica bakteriofaga λ in ima zapis za RNA-polimerazo faga T7, promotor *lacUV5* in zapis za represor *lacI*. Promotor *lacUV5* sproži prepisovanje T7 RNA-polimeraze le ob dodatku induktorja IPTG v gojišče. Nastala polimeraza se nato specifično veže na promotor T7 na plazmidu za izražanje proteinov in sproži prepisovanje DNA rekombinantnega proteina. Sev ima okvarjena gena *lon* in *ompT*, ki imata zapis za proteazi, ki bi lahko razgradili rekombinantne proteine.

Rekombinantna plazmida pLexA in pRecA smo v celice sevov *E. coli* BL21(DE3) vnesli s transformacijo. Zrasle transformante smo precepili v 20 mL tekočega gojišča LB z

ampicilinom in jih inkubirali na rotacijskem stresalniku (220 obr./min) pri 37 °C preko noči. Po 5 mL prekonočne kulture smo precepili v 400 mL gojišča LB z ampicilinom. Celice smo gojili do OD₆₀₀ = 0,6 in nato dodali IPTG do končne koncentracije 0,8 mM. Tako smo inducirali promotor T7. Po indukciji smo celice stresali še 4 h pri 37 °C.

Celice smo ločili od gojišča s centrifugiranjem (4800 g, 10 min) in jih 2-krat sprali s 3 mL ledeno mrzlega pufra TSE. Pridobljene celice smo zmrznili v tekočem dušiku in jih do uporabe hrаниli pri –80 °C.

Celice smo v prvem koraku razbili v pufru za lizo, kateremu smo dodali 10 µg/mL DNaze, 20 µg/mL RNaze, 1 mg/mL lizocima in 1 mM benzamidina (vse Sigma, ZDA). V tako pripravljeni raztopini smo jih inkubirali 1 h pri 4 °C (celice smo v časi mešali z magnetnim mešalom). Nato smo jih dokončno razbili s sonikatorjem. Sonicirali smo jih 30 min na ledu z 20 s trajajočimi pulzi in amplitudo 40 % in na koncu centrifugirali (14000 obr./min, 4 °C), da so se celice usedle na dno, protein pa je ostal v supernatantu.

Proteine smo očistili z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po navodilih proizvajalca kromatografskega nosilca (Qiagen, ZDA). Naknadno smo proteine očistili z gelsko kromatografijo, ki je potekala v pufru za FPLC na napravi Äkta FPLC (Amersham Biosciences, Švedska). Uporabili smo kolono Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švedska) pri pretoku 0,4 mL/min. Pomembne frakcije smo trikrat dializirali proti pufru za dializo in nato vzorec še centrifugirali (13000 obr./min, 20 min), da smo odstranili morebitno oborjene proteine. Čistemu proteinu smo dodali glicerol (Sigma, ZDA) do končne koncentracije 27 % (v/v) in ga hrаниli pri –20 °C. Z NaDS-PAGE smo preverili velikost in čistost proteinov.

3.2.10 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo določali s kompletom "BCA Protein Assay" (Pierce, ZDA) po navodilih proizvajalca. Umeritveno krivuljo smo pripravili z govejim serumskim albuminom.

3.2.11 NaDS-poliakrilamidna elektroforeza (NaDS-PAGE)

Z NaDS-PAGE smo preverjali čistost izoliranih proteinov ter potek reakcij cepitve LexA. Izvajali smo jo na aparaturi Mini-PROTEAN II system (Bio-Rad, Hercules, ZDA) po navodilih proizvajalca. Pri NaDS-PAGE smo uporabljali proteinski velikostni standard Page-Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Litva).

3.2.12 Vezava LexA na DNA

LexA smo vezali na različna operatorska zaporedja tako, da smo LexA inkubirali skupaj s tarčnim zaporedjem DNA 10 min pri 25 °C v pufru za vezavo LexA na DNA. Pri vseh poskusih smo dali v reakcijsko mešanico DNA v prebitku, da se je ves LexA vezal na DNA. V nadaljevanju so opisana tarčna zaporedja DNA, ki smo jih pripravili za vezavo

LexA. Z enojno črto je označeno vezavno mesto za LexA na operatorskem zaporedju (SOS box). Z dvojno črto je označeno zaporedje v SOS box-u, ki je najbolj ohranjeno.

- 1) Gen *recA* ima zapis za rekombinazo A (RecA). Operatorsko zaporedje gena *recA* ima eno vezavno mesto za LexA. Tarčno zaporedje smo pripravili tako, da smo s PCR pomnožili zaporedje na kromosomu *E. coli* JBC 387 (preglednica 1), pri čemer smo uporabili začetna oligonukleotida RecAUpBio in RecAdown (preglednica 2). Tarčno zaporedje "*recA*" (83 bp):

5'- GCAGACCTTGTGGCAACAATTCTACAAAACACTTGATACTGTATGAGC
ATACAGTATAATTGCTTCAACAGAA -3'

- 2) Gen *umuD* ima zapis za DNA-polimerazo UmuD V. Operatorsko zaporedje gena *umuD* ima eno vezavno mesto za LexA. Tarčno zaporedje smo pripravili tako, da smo s PCR pomnožili zaporedje na kromosomu *E. coli* JBC 387 (preglednica 1), pri čemer smo uporabili začetna oligonukleotida UmuDUpBio in UmuDDown (preglednica 2). Tarčno zaporedje "*umuD*" (98 bp):

5'- GATAGCCTGAATCAGTATTGATCTGCTGGCAAGAACAGACTACTGTAT
AAAAACAGTATAACTTCAGGCAGATTATTAGACGG -3'

- 3) Gen *cka* ima zapis za kolicin K. Vsebuje dva operatorja, na katera se veže LexA z visoko afiniteto, saj se vezavni mesti za LexA prekrivata v enem nukleotidu (Mrak in sod., 2007) . Tarčno zaporedje smo pripravili tako, da smo s PCR pomnožili zaporedje na plazmidu pKCT1 (preglednica 3), pri čemer smo uporabili začetna oligonukleotida CkaUpBio in CkaDown (preglednica 2). Tarčno zaporedje "*cka*" (121 bp):

5'- CCATGCTCTTGACATGGACAATGCTGAGTAGTAGGTTTACTGTACATA
1. dimer LexA
AAACCAGTGGTTATATGTACAGTATATTGTTTAATTATTGTTTAATTAT
2. dimer LexA
CAAAGAACT -3'

- 4) Operatorsko zaporedje gena *cka*, ki ima mutacijo v enem mestu za vezavo LexA (krepko in rdeče v zaporedju), se imenuje "*cka L box*". Na to operatorsko mesto se z visoko afiniteto veže le en dimer LexA. Tarčno zaporedje smo pripravili tako, da smo s PCR pomnožili zaporedje na plazmidu pKCT3-UP1 (preglednica 3), pri čemer smo uporabili začetna oligonukleotida CkaUpBio in CkaDown (preglednica 2). Tarčno zaporedje "*cka L box*" (121 bp):

5'- CCATGCTCTTGACATGGACAATGCTGAGTAGTAGGTTTACCATACATA
AAACCAGTGGTTATATGTACAGTATATTGTTTAATTATTGTTTAATTAT
2. dimer LexA
CAAAGAACT -3'

5) Operatorsko zaporedje gena *cka*, ki ima mutacijo v obeh mestih za vezavo LexA (krepko in rdeče v zaporedju), se imenuje "*cka UP3*". Na to operatorsko zaporedje se LexA ne more vezati. Tarčno zaporedje smo pripravili tako, da smo s PCR pomnožili zaporedje na plazmidu pKCT3-UP3 (preglednica 3), pri čemer smo uporabili začetna oligonukleotida CkaUpBio in CkaDown (preglednica 2). Tarčno zaporedje "*cka UP3*" (121 bp):

5'- CCATGCTCTTGACATGGACAATGCTGAGTAGTAGGTTTACC**A**TACATA
AAACCTGTGGTTATATGT**A**CGTATATTGTTTAATTATTGTTTAATTAT
CAAAGAACT -3'

Vse produkte PCR smo pred uporabo očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR "QIAquick PCR Purification Kit" po navodilih proizvajalca in z agarozno gelsko elektroforezo preverili ustreznost produktov PCR.

3.2.13 Test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA-Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Z EMSA smo preverili vezavo LexA na različna tarčna zaporedja DNA. Pripravili smo različne koncentracije LexA v pufru za vezavo LexA na DNA. Posamezne redčitve proteina smo inkubirali skupaj z DNA 10 min pri 25 °C v pufru za vezavo LexA na DNA. Po vezavi smo preverili nastanek kompleksov protein-DNA na 2,5-odstotnem agaroznem gelu. Elektroforeza je potekala v pufru TBE, 3 h pri 60 V. Po koncu elektroforeze smo agarozni gel 15 min barvali v pufru TBE, ki smo mu dodali etidijev bromid do končne koncentracije 5 ng/mL.

3.2.14 Prenos western in imunodetekcija

S prenosom western smo preverili ali proteazi trombin (Novagen, Nemčija) in tripsin (Sigma, ZDA) odcepita histidinski repek (His)₆. Trombin je proteaza, ki reže v zaporedju LeuValProTrp↓GliSer. Protein LexA ima mesto za cepitev s trombinom na N-terminalnem delu tik pred (His)₆. Zato lahko trombin odcepi (His)₆ s proteina LexA. Trombin cepi tarčni protein v masnem razmerju 1: 2000. Za proteazo tripsin še ni bilo jasno, ali lahko odcepi (His)₆ s proteina LexA. Pri tem testu smo pripravili 3 reakcijske mešanice, ki smo jih nato analizirali s prenosom western:

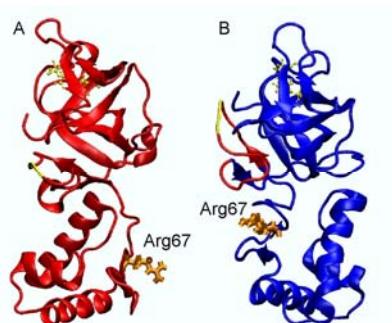
- 1) Proteini LexA (0,9 µg) smo dodali ustrezeno koncentracijo trombina in vzorec inkubirali 2 h pri 20 °C.
- 2) LexA (0,9 µg) smo najprej vezali na DNA (0,8 µg) v pufru za vezavo LexA na DNA in nato dodali ustrezeno koncentracijo tripsina. Vzorec smo inkubirali 30 min pri 25 °C.
- 3) LexA (0,9 µg) je bil prost v raztopini, ko smo mu dodali tripsin (0,1 µg). Vzorec smo inkubirali 30 min pri 25 °C.

Proteine smo z NaDS-PAGE gela prenesli na PVDF membrane (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, Hercules, ZDA) z mokrim prenosom. Membrane smo najprej nekaj sekund namakali v 100 % metanolu, nato pa smo jih skupaj s peno in filter papirji 30 min namakali v pufru za prenos western. Sistem za prenos smo sestavili po navodilih proizvajalca (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, ZDA). Membrana in gel sta bila obdana s papirji in peno za prenos. Membrana je bila na strani anode, gel pa na strani katode. Prenos je potekal 90 min pri 150 mA.

Po končanem prenosa smo membrano preko noči inkubirali v pufru za blokiranje PVDF membran. Naslednji dan smo membrano 2 h inkubirali v pufru za blokiranje s primarnimi protitelesi. Membrano smo spirali 5-krat po 10 min v pufru za spiranje in jo nato 90 min inkubirali v pufru za blokiranje s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s peroksidazo. Membrano smo na koncu spirali 5-krat po 10 min v pufru za spiranje, nato pa smo sekundarna protitelesa zaznali s peroksidaznim substratom v pufru za razvijanje PVDF membran. Ta protokol smo ponovili 2-krat, saj smo v prvem koraku uporabili za primarna protitelesa mišja protitelesa proti pentahistidenskemu repku in nato proti tem sekundarna protitelesa (kozja protimišja protitelesa). V drugem koraku pa smo za primarna protitelesa uporabili kunčja protitelesa proti N-terminalni domeni proteina LexA in nato proti tem sekundarna protitelesa (kozja protizajčja protitelesa). Končna koncentracija primarnih in sekundarnih protiteles v raztopini je bila 0,5 µg/mL.

3.2.15 Cepitev proteina LexA s tripsinom

S to metodo smo preverili stabilnost vezave LexA na različna operatorska zaporedja. LexA smo najprej vezali na pripravljena tarčna zaporedja DNA in nato sprožili cepitev LexA s proteazo tripsin (Sigma, ZDA). Tripsin cepi LexA pri aminokislinskem ostanku Arg-67. Ta je v bližini regije, ki povezuje CTD in NTD molekule proteina LexA. Pri cepitvi s tripsinom nastanejo podobni produkti cepitve, kot pri z RecA sproženi avto-katalitski cepitvi LexA (Little, 1991). Tripsin naj bi cepil LexA le, ko je LexA prost v raztopini oz. ko LexA ni vezan na DNA. Aminokislinski ostanek Arg-67 je namreč v raztopini izpostavljen, ko je LexA prost. V kolikor pa je LexA vezan na DNA, je Arg-67 zakrit v strukturi proteina (slika 13). Tripsin cepi LexA v masnem razmerju 1:50 (Oertel-Buchheit in sod., 1998).



Slika 13: Mesto cepitve LexA s proteazo tripsin. **A:** LexA prost v raztopini. Aminokislinski ostanek Arg-67 je izpostavljen in tripsin ga lahko cepi. **B:** LexA vezan na DNA. Specifična konformacija onemogoči tripsinu dostop do Arg-76 (Butala, neobjavljenno).

Ko se je LexA vezal na DNA, smo reakcijski mešanici dodali tripsin in mešanico inkubirali pri 37 °C. Pripravili smo torej 5 reakcijskih mešanic za cepitev LexA, vezanega na posamezna tarčna zaporedja.

Reakcijska mešanica:

10 µL LexA (0,45 mg/mL) 12,5 µL pufra za vezavo LexA na DNA 40 µL posamezne DNA (0,26 µg/µL) 5 µL tripsina (0,1 mg/mL)	} Enaka reakcijska mešanica za 5 različnih tarčnih zaporedij DNA
---	--

Iz reakcijske mešanice smo po 0 min, 5 min, 15 min, 30 min in 60 min inkubacije odvzeli po 10 µL mešanice in ustavili reakcijo cepitve tako, da smo vzorec dali na led in mu dodali nanašalni pufer za NaDS-PAGE. Cepitev LexA oz. produkte cepitve smo preverili z NaDS-PAGE.

3.2.16 Priprava aktivnega filimenta RecA-ssDNA

RecA smo aktivirali tako, da smo ga 2 h skupaj z enoverižno DNA inkubirali v pufru za aktivacijo RecA pri 25 °C. Končna koncentracija DNA je bila 2,2 µM. Nukleotidno zaporedje enoverižne DNA: 5'-GGGTGTGTGGTGGTGTGC-3'.

3.2.17 Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA

Za test z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA smo najprej aktivirali RecA z metodo priprave aktivnega filimenta RecA (3.2.16). Nato smo LexA vezali na različna operatorska zaporedja DNA, kot je opisano pri metodi Cepitev LexA s tripsinom (3.2.15). Ko se je LexA vezal na DNA, smo vzorcu dodali pufer za z RecA sproženo cepitev LexA ter aktiviran RecA.

Reakcijska mešanica:

2 µL LexA (0,45 mg/mL) 6 µL DNA (0,26 µg/µL) 2,5 µL pufra za vezavo LexA na DNA 4,5 µL pufra za z RecA sproženo cepitev LexA 4 µL aktiviranega RecA (0,40 mg/mL)
--

Za vsako tarčno zaporedje DNA smo pripravili 5 takšnih reakcijskih mešanic in jih po dodatku aktiviranega RecA različno dolgo inkubirali pri 37 °C. Dolžine inkubacije so bile 0 min, 5 min, 15 min, 30 min in 60 min.

Reakcijo cepitve smo ustavili tako, da smo vzorec dali na led in mu dodali nanašalni pufer za NaDS-PAGE. Cepitev LexA oz. produkte cepitve LexA smo preverili z NaDS-PAGE.

Pri vseh reakcijah cepitve smo s pomočjo cepitve s tripsinom žeeli preveriti, ali se je LexA res vezal na tarčno DNA in ali je bil ves LexA po 60 min inkubacije prost v raztopini (je disociiral z DNA) in bil tako dostopen za cepitev. Ugotovili smo, da tripsin cepi LexA, ko ta ni vezan na DNA. Zato smo pripravili dve reakcijski mešanici. V prvi je bil LexA vezan na tarčno zaporedje DNA, v drugi pa je bil prost v raztopni. Obema reakcijskima mešanicama smo dodali tripsin in vzorce inkubirali 1 h pri 37 °C.

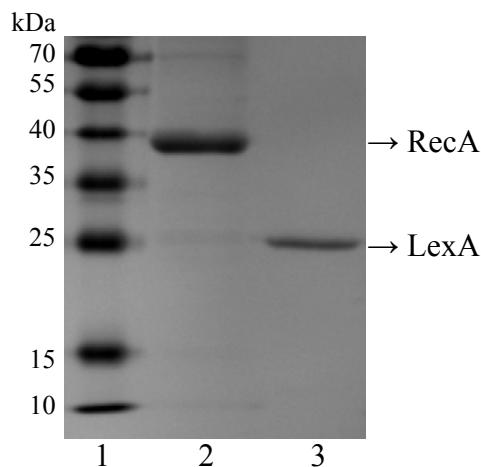
Reakcijski mešanici za preverjanje vezave LexA na DNA s tripsinom:

- 2 µL LexA (0,45 mg/mL), 6 µL DNA (0,26 µg/µL), 2,5 µL pufra za vezavo DNA, 1 µL tripsina (0,1 mg/mL)
- 2 µL LexA (0,45 mg/mL), 6 µL dH₂O, 2,5 µL pufra za vezavo DNA, 1 µL tripsina (0,1 mg/mL)

4 REZULTATI

4.1 IZRAŽANJE IN ČIŠČENJE PROTEINOV LexA IN RecA

Z NaDS-PAGE smo analizirali izražanje in čistost proteinov LexA (22,4 kDa) in RecA (37,8 kDa). Izražanje obeh proteinov je bilo uspešno, saj smo dobili produkte ustreznih velikosti, kot je razvidno s slike 14. Proteina LexA in RecA sta imela histidinski repek (His)₆. Bila sta dovolj čista za uporabo v nadaljnjih analizah.



Slika 14: NaDS-PAGE analiza izoliranih proteinov RecA in LexA. V prvi jamici je velikostna lestvica, v drugi jamici je RecA (1,2 µg), v tretji jamici je LexA (0,9 µg).

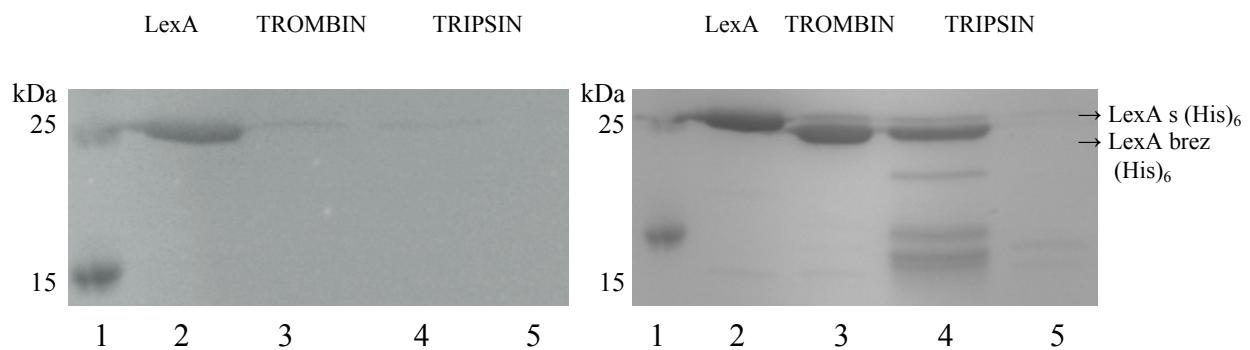
4.2 PRENOS WESTERN

Zanimalo nas je, ali proteazi tripsin in trombin odcepita histidinski repek (His)₆ na N-terminalnem delu LexA. V ta namen smo izvedli reakcije cepitve LexA s trombinom in tripsinom in potek cepitve analizirali s prenosom western.

Z NaDS-PAGE gela smo proteine oz. produkte cepitve prenesli na PVDF membrane in jih detektirali s pomočjo dveh vrst primarnih protiteles. Na sliki 15 (levo) je prikazana membrana po tretiranju s protitelesi proti pentahistidinskemu repku (His)₅. Pri uporabi slednjih primarnih protiteles so se v jamicah 2-5 na membrani pokazale lise v višini proteina LexA s histidinskim repkom (His)₆. V jamici 2, kjer je bil samo LexA, je ta lisa zelo močna, v jamicah 3-5 pa so lise na višini LexA s (His)₆ zelo šibke. Pri jamici 5 je bila lisa s prostim očesom vidna, na sliki pa se je skoraj ne vidi.

Nato smo uporabili še protitelesa proti N-terminalni domeni LexA (desno). Tik pod liso, ki nakazuje na LexA s (His)₆, sta se pri jamicah 3 in 4 pojavili zelo močni lisi na višini LexA, pri jamici 5 pa se je na tej višini pojavila komaj vidna lisa. Pri cepitvi LexA s tripsinom so poleg že omenjenih lis (LexA z in brez histidinskega repka) vidni tudi drugi produkti cepitve. Na membrani je zelo očitna razlika med obema variantama cepitve LexA s

tripsinom. V primeru, ko je bil LexA vezan na DNA, je lisa na višini LexA brez (His)₆ močna, vidnih je tudi več produktov cepitve. V primeru, ko je bil LexA prost v raztopini, pa je lisa na višini LexA brez (His)₆ komaj vidna in tudi drugih produktov cepitve LexA je zelo malo.

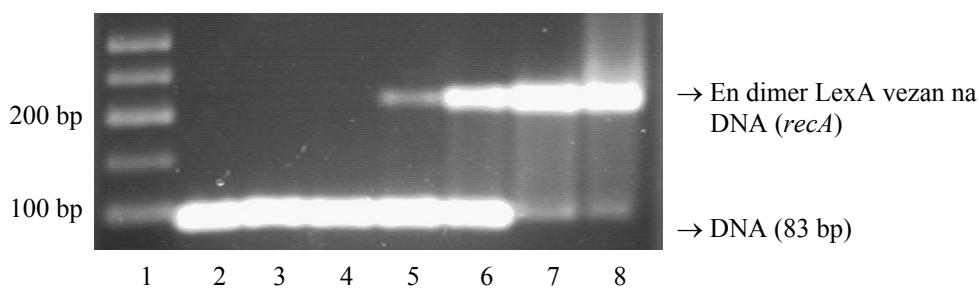


Slika 15: Odtis western. **Levo:** membrana po uporabi protiteles proti (His)₅. **Desno:** membrana po uporabi protiteles proti N-terminalni domeni LexA. **1.** jamica: velikostna lestvica, **2.** jamica: LexA (0,9 µg), **3.** jamica: cepitev LexA (0,9 µg) s trombinom, **4.** jamica: cepitev LexA (0,9 µg) s tripsinom (LexA vezan na DNA), **5.** jamica: cepitev LexA (0,9 µg) s tripsinom (LexA prost v raztopini).

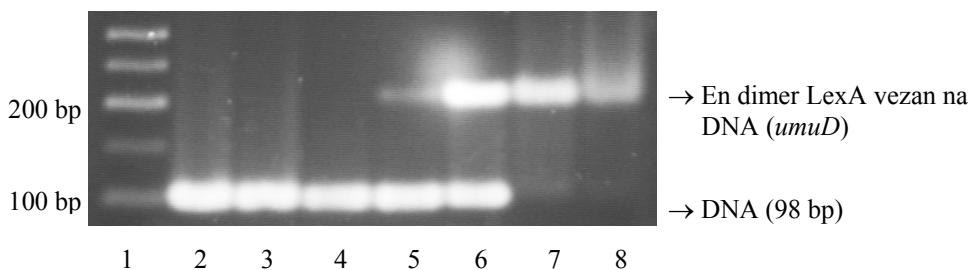
4.3 TEST ZAMIKA ELEKTROFOREZNE MOBILNOSTI (EMSA)

Z EMSA smo preverili vezavo LexA na različna tarčna zaporedja DNA. Zanimalo nas je, ali se na posamezno zaporedje DNA veže en dimer LexA, ali se vežeta po dva dimera LexA. Pripravili smo različne koncentracije LexA in jih vezali na tarčna zaporedja DNA ter preverili nastanek kompleksov LexA-DNA na 2,5-odstotnih agaroznih gelih. Vse reakcijske mešanice so vsebovale približno 400 ng DNA. Na slikah 15-18 so prikazani agarozni geli po barvanju z etidijevim bromidom.

S slik 16 in 17 je razvidno, da je prišlo do zamika potovanja DNA (operatorski zaporedji genov *recA* in *umuD*) v gelu, ko je bilo v reakcijski mešanici 18 ng LexA (jamica 5). DNA se je zamknila le za en nivo, saj se je nanjo vezal le en dimer.

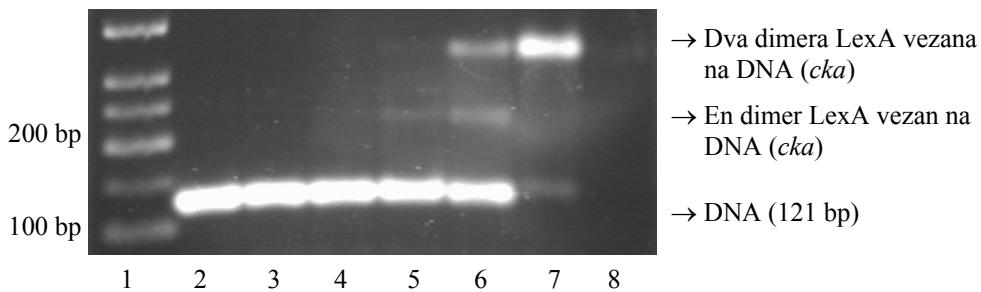


Slika 16: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje gena *recA*. **1.** jamica: 50 bp lestvica, **2.** jamica: samo DNA, **3.** jamica: 0,72 ng LexA, **4.** jamica: 3,6 ng LexA, **5.** jamica: 0,018 µg LexA, **6.** jamica: 0,09 µg LexA, **7.** jamica: 0,225 µg LexA, **8.** jamica: 0,675 µg LexA.

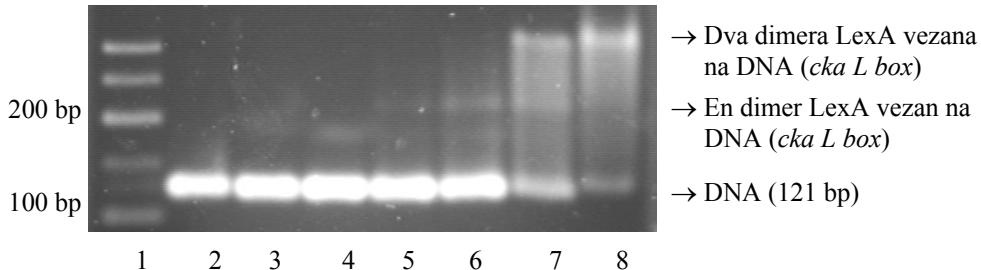


Slika 17: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje gena *umuD*. **1.** jamica: 50 bp lestvica, **2.** jamica: samo DNA, **3.** jamica: 0,72 ng LexA, **4.** jamica: 3,6 ng LexA, **5.** jamica: 0,018 µg LexA, **6.** jamica: 0,09 µg LexA, **7.** jamica: 0,225 µg LexA, **8.** jamica: 0,675 µg LexA.

S slik 18 in 19 je razvidno, da je prišlo do zamika potovanja DNA (operatorsko zaporedje gena *cka* in zaporedje "cka L box") v gelu, ko je bilo v reakcijski mešanici 18 ng LexA (jamica 5). Ko je bil LexA vezan na operatorsko zaporedje gena *cka* (slika 18) je prišlo do dveh zamikov pri 90 ng LexA (jamica 6). Ko je bil LexA vezan na zaporedje "cka L box" (slika 19) pa je bil drugi zamik jasno viden šele pri 225 ng LexA (jamica 7). Prvi zamik nakazuje na vezavo enega dimera LexA na DNA, drugi zamik pa na vezavo dveh dimerov LexA na DNA. V primeru operatorskega zaporedja gena *cka* (slika 18) je bil pri 225 ng LexA prvi zamik zbrisani. Viden je bil le drugi zamik, saj sta bila na vso DNA vezana po dva dimera. Pri 675 ng LexA (jamica 8) na gelu ni bilo vidnega zamika. V primeru zaporedja "cka L box" (slika 19) sta bila šele pri 675 ng LexA na vso DNA vezana po dva dimera.



Slika 18: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje gena *cka*. **1.** jamica: 50 bp lestvica, **2.** jamica: samo DNA, **3.** jamica: 0,72 ng LexA, **4.** jamica: 3,6 ng LexA, **5.** jamica: 0,018 µg LexA, **6.** jamica: 0,09 µg LexA, **7.** jamica: 0,225 µg LexA, **8.** jamica: 0,675 µg LexA.

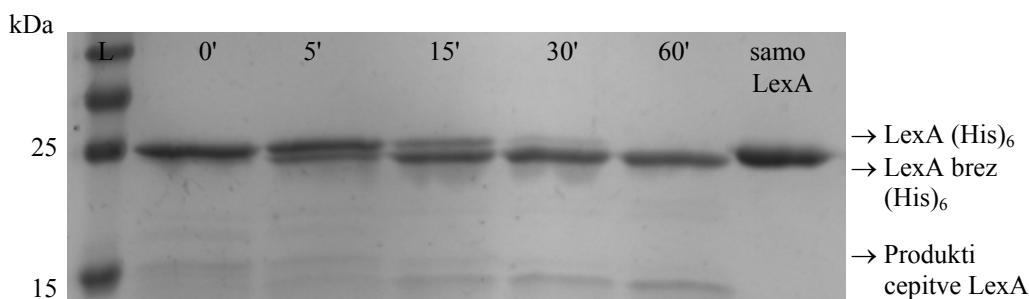


Slika 19: EMSA: Zamik potovanja DNA ob vezavi LexA na operatorsko zaporedje "cka L box". **1.** jamica: 50 bp lestvica, **2.** jamica: samo DNA, **3.** jamica: 0,72 ng LexA, **4.** jamica: 3,6 ng LexA, **5.** jamica: 0,018 µg LexA, **6.** jamica: 0,09 µg LexA, **7.** jamica: 0,225 µg LexA, **8.** jamica: 0,675 µg LexA.

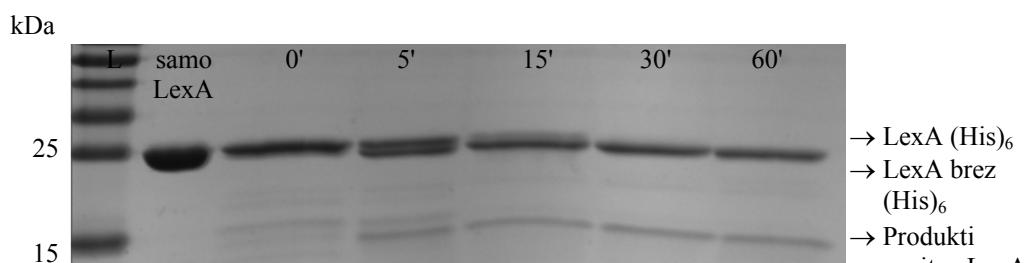
4.4 CEPITEV LexA S TRIPSINOM

Preveriti smo želeli stabilnost vezave LexA na posamezna tarčna zaporedja DNA. LexA smo vezali na pripravljena tarčna zaporedja DNA, nato pa smo dodali tripsin, ki cepi LexA pri aminokislinskem ostanku Arg-67. Reakcije cepitve, ki so potekale pri 37 °C smo ustavili po 0 min, 5 min, 25 min, 30 min in 60 min inkubacije, kar je na gelu označeno z 0', 5', 15', 30' in 60'. Cepitev smo preverili na NaDS-PAGE. Jamica, kjer smo dodali samo necepljen LexA, je na vseh gelih označena s "samo LexA". V prvi jamici je na vseh gelih velikostna lestvica. V jamicah, kjer so rezultati cepitve LexA, je približno 0,67 µg LexA.

S slik 20 in 21 je razvidno, da se z daljšanjem časa inkubacije, intenzivnost lis na višini LexA s (His)₆ zmanjšuje, intenzivnost lis na višini LexA brez (His)₆ pa se povečuje. Povečuje se intenzivnost lis, ki kažejo na produkte cepitve LexA s tripsinom. Tripsin začne cepiti LexA pri Arg-67 že po 5 min inkubacije.

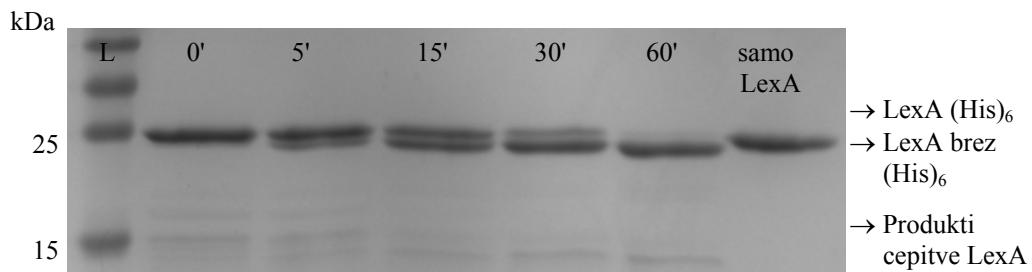


Slika 20: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na operator gena *recA*. L označuje lestvico, sledijo različni časi inkubacije LexA s tripsinom in necepljen LexA.



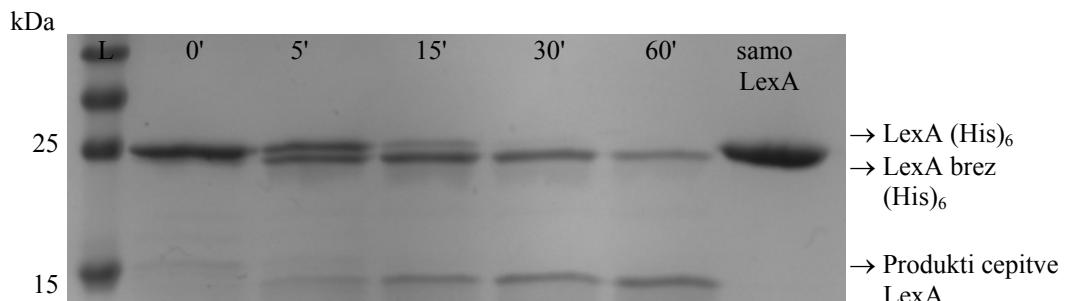
Slika 21: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na operator gena *umuD*. L označuje lestvico, sledi necepljen LexA in različni časi inkubacije LexA s tripsinom.

Slike 22 je razvidno, da se z daljšanjem časa inkubacije, intenzivnost lis na višini LexA s (His)₆ zmanjšuje, intenzivnost lis na višini LexA brez (His)₆ povečuje. Intenzivnost lis, ki kažejo na cepitev LexA pri Arg-67 s tripsinom, se povečuje komaj opazno, kar pomeni, da reakcija cepitve LexA s tripsinom poteka počasneje kot v primeru, ko je LexA vezan na operatorja genov *recA* in *umuD*.



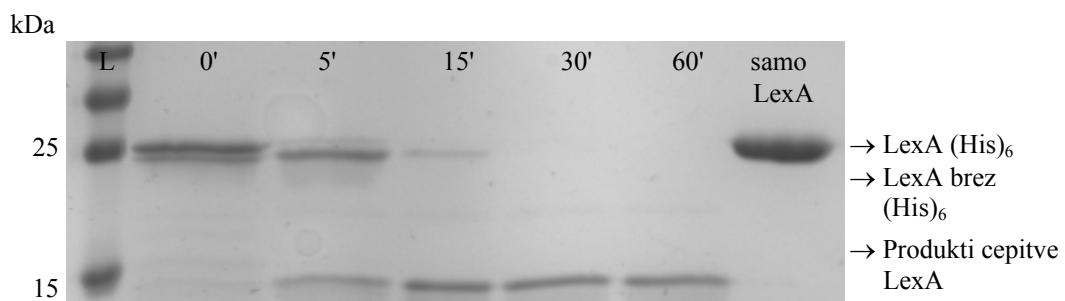
Slika 22: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na operator gena *cka*. L označuje lestvico, sledijo različni časi inkubacije LexA s tripsinom in necepljen LexA.

Slike 23 je razvidno, da se z daljšanjem časa inkubacije, intenzivnost lise na višini LexA s (His)₆ zmanjšuje, intenzivnost lise na višini LexA brez (His)₆ pa se povečuje. Povečuje se intenzivnost lis, ki kažejo na produkte cepitve LexA s tripsinom. Tripsin začne cepiti LexA pri Arg-67 po 5 min inkubacije.



Slika 23: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na zaporedje "*cka L box*". L označuje lestvico, sledijo različni časi inkubacije LexA s tripsinom in necepljen LexA.

Slike 24 je razvidno, da se z daljšanjem časa inkubacije, intenzivnost lise na višini LexA s (His)₆ zmanjšuje. Liza izgine že po 15 min inkubacije. Intenzivnost lise na višini LexA brez (His)₆ se poveča le pri 15 min inkubacije, potem pa začne intenzivnost padati. Po 30 min inkubacije lisa na višini LexA brez (His)₆ popolnoma izgine. Na sliki 24 je vidno, da se z daljšanjem časa inkubacije povečuje intenzivnost lis, ki kažejo na produkte cepitve LexA s tripsinom.



Slika 24: NaDS-PAGE: Cepitev LexA s tripsinom, ko je LexA vezan na zaporedje "*cka UP3*". L označuje lestvico, sledijo različni časi inkubacije LexA s tripsinom in necepljen LexA.

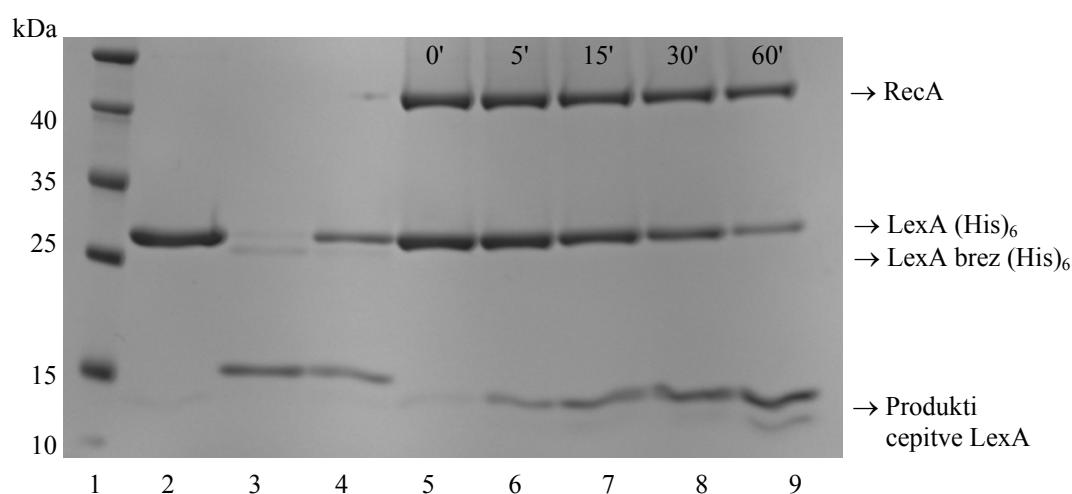
Rezultati nakazujejo, da tripsin pri Arg-67 cepi LexA, ki ni specifično vezan na DNA. Zato lahko z metodo cepitve represorja LexA S proteazo tripsin sledimo sproščanju represorja z operatorskih zaporedij DNA.

4.5 Z RecA SPROŽENA AVTO-KATALITSKA CEPITEV LexA

Želeli smo ugotoviti, ali RecA sproži avto-katalitsko cepitev LexA, ko je LexA vezan na DNA. LexA smo vezali na različna tarčna zaporedja DNA in izvedli test z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA. Med reakcijo cepitve bo LexA disociiral z DNA in prešel v raztopino. V kolikor aktivni filament RecA sproži cepitev le na DNA vezanega represorja LexA, se bo z daljšanjem inkubacije LexA vezanega na DNA z aktivnim filamentom RecA, povečevala količina produktov cepitve LexA. Vedno več bo namreč represorja LexA v konformaciji, katere cepitev lahko sproži RecA.

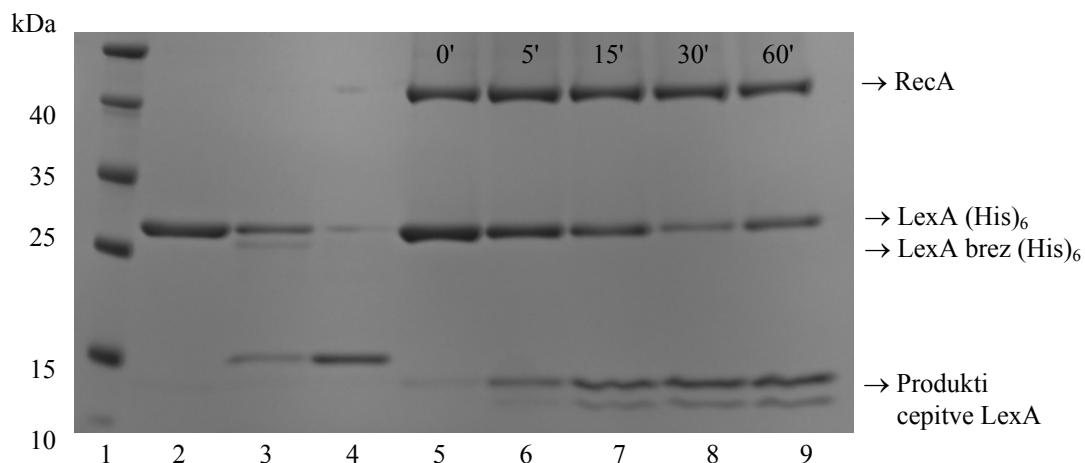
Z NaDS-PAGE smo preverili potek z RecA sprožene avto-katalitske cepitve RecA, ki je bil viden kot zmanjševanje intenzitete lis v višini proteina LexA in nastajanju produktov cepitve LexA na gelu (slike 25-29). Reakcija cepitve je potekala pri 37 °C. V vseh jamicah je masa LexA 0,9 µg, masa RecA pa 1,6 µg.

S slike 25 je razvidno, da se intenziteta lis v višini LexA v odvisnosti od časa inkubacije LexA z aktivnim filamentom RecA znižuje, intenziteta lis, ki nakazujejo produkte z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA, pa se zvišuje (jamice 5-9). Pri jamici 3, kjer je bil LexA vezan na DNA, vidimo, da je tripsin z LexA odcepil histidinski repek, ter da je nekaj LexA cepil tudi pri Arg-67. Pri jamici 4, kjer je bil LexA prost v raztopini, pa je vidnih manj produktov cepitve LexA s tripsinom. Pri teh dveh jamicah je verjetno prišlo do zamenjave vzorcev pri nanašanju na gel, saj so bili pričakovani rezultati ravno obratni.



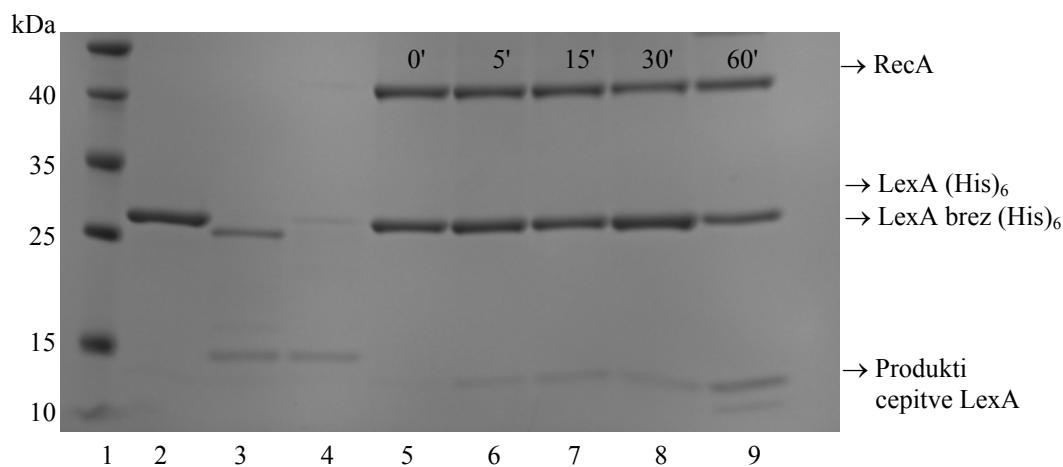
Slika 25: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko mesto gena *recA*. 1. jamica: velikostna lestvica, 2. jamica: LexA, 3. jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA vezan na DNA), 4. jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA prost v raztopini) 5.-9. jamica: cepitev LexA z RecA (različne dolžine poteka reakcije cepitve).

S slike 26 je razvidno, da se intenziteta lis v višini LexA v odvisnosti od časa inkubacije LexA z aktivnim filamentom RecA znižuje, intenziteta lis, ki nakazujejo produkte cepitve LexA, pa se zvišuje (jamice 5-9). Pri jamici 3, kjer je bil LexA vezan na DNA vidimo, da je tripsin odcepil histidinski repek z LexA ter razcepil le nekaj LexA, pri jamici 4, kjer je bil LexA prost v raztopini, pa je tripsin razcepil skoraj ves LexA.



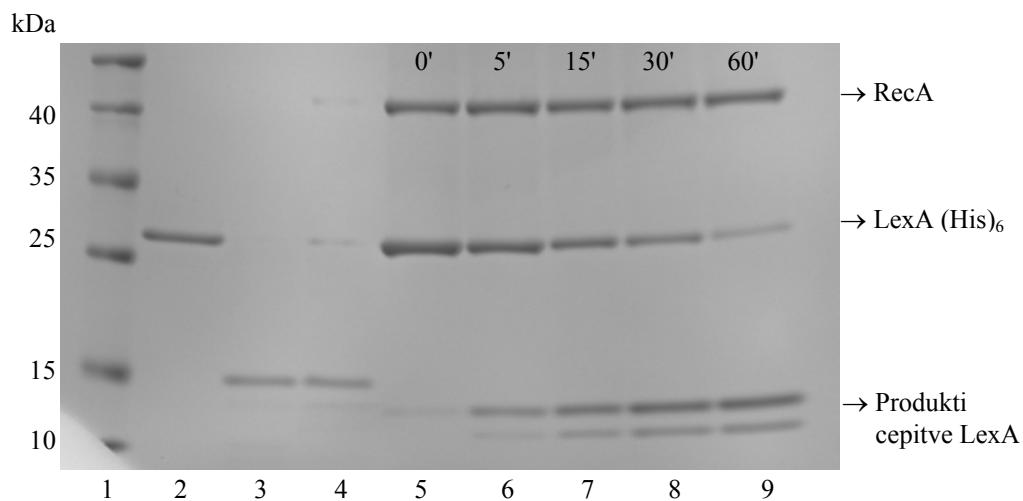
Slika 26: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko mesto gena *umuD*. **1.** jamica: velikostna lestvica, **2.** jamica: LexA, **3.** jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA vezan na DNA), **4.** jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA prost v raztopini) **5.-9.** jamica: cepitev LexA z RecA (različne dolžine poteka reakcije cepitve).

S slike 27 je razvidno, da se intenziteta lis v višini LexA v odvisnosti od časa inkubacije LexA z aktivnim filamentom RecA znižuje, intenziteta lis, ki nakazujejo produkte cepitve LexA, pa se zvišuje (jamice 5-9). Količina produktov z RecA sprožene avto-katalitske cepitve pa vseeno enakomerno narašča v odvisnosti od časa inkubacije. Pri jamici 3, kjer je bil LexA vezan na DNA vidimo, da je tripsin z LexA odcepil histidinski repek in razcepil nekaj LexA, pri jamici 4, kjer je bil LexA prost v raztopini, pa je tripsin razcepil skoraj ves LexA.

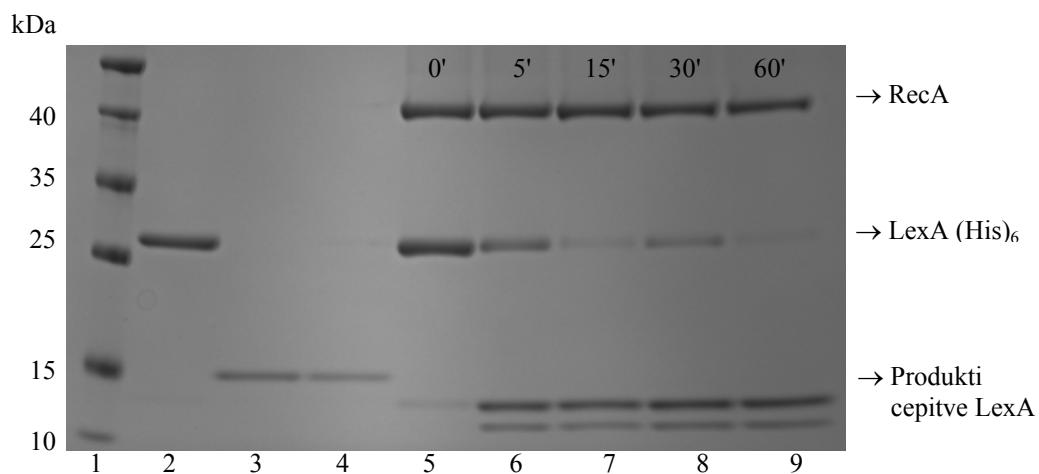


Slika 27: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko mesto gena *cka*. 1. jamica: velikostna lestvica, 2. jamica: LexA, 3. jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA vezan na DNA), 4. jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA prost v raztopini) 5.-9. jamica: cepitev LexA z RecA (različne dolžine poteka reakcije cepitve).

S slik 28 in 29 je razvidno, da se intenziteta lis v višini LexA v odvisnosti od časa inkubacije LexA z aktiviranim RecA znižuje, intenziteta lis, ki nakazujejo produkte cepitve LexA, pa se zvišuje (jamice 5-9). Tako pri jamici 3, kjer je bil LexA vezan na DNA, kot tudi pri jamici 4, kjer je bil LexA prost v raztopini, je vidno, da je tripsin razcepil skoraj ves LexA.



Slika 28: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko zaporedje "*cka L box*". **1.** jamica: velikostna lestvica, **2.** jamica: LexA, **3.** jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA vezan na DNA), **4.** jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA prost v raztopini) **5.-9.** jamica: cepitev LexA z RecA (različne dolžine poteka reakcije cepitve).



Slika 29: NaDS-PAGE: Z RecA sprožena avto-katalitska cepitev LexA, ko je LexA vezan na operatorsko zaporedje "*cka UP3*". **1.** jamica: velikostna lestvica, **2.** jamica: LexA, **3.** jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA vezan na DNA), **4.** jamica: cepitev LexA s tripsinom (LexA prost v raztopini) **5.-9.** jamica: cepitev LexA z RecA (različne dolžine poteka reakcije cepitve).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 IZRAŽANJE IN ČIŠČENJE PROTEINOV LexA in RecA

Pripravili smo plazmida za izražanje rekombinantnih proteinov LexA in RecA. Izražanje obeh proteinov je bilo uspešno, saj smo pridobili zadostne količine proteinov za nadaljnje proučevanje. Proteina nam je uspelo brez težav tudi očistiti do > 95-odstotne čistosti. Tako je bil morebiten vpliv proteinskih nečistoč na potek reakcij pri nadalnjem proučevanju zanemarljiv.

5.2 ZAMIK ELEKTROFOREZNE MOBILNOSTI (EMSA)

Z EMSA smo preverili vezavo represorja LexA na posamezna tarčna zaporedja DNA, ki smo jih pripravili s PCR. Vsa pripravljena tarčna zaporedja DNA so bila dolga približno 100 bp in so na sredini vsebovala eno ali dve operatorski zaporedji za vezavo LexA. LexA smo inkubirali skupaj z DNA in preverili nastanek kompleksov protein-DNA. Glede na število dimerov LexA, ki so se vezali na DNA, je bil viden zamik v potovanju DNA v agaroznem gelu. V primeru vezave enega dimera LexA je bil viden en sam zamik, v primeru vezave dveh dimerov LexA na DNA pa sta bila vidna dva zamika. Iz rezultatov je razvidno, da se je na operatorski zaporedji genov *recA* in *umuD* vezal en dimer LexA, kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji, saj imata operatorja genov *recA* in *umuD* le eno vezavno mesto za LexA (Fernández de Henestrosa in sod., 2000). Operatorja genov *recA* in *umuD* se minimalno razlikujeta od ohranjenega zaporedja CTGT-ATATATAT-ACAG (Walker, 1984). Operator gena *recA* ima zaporedje 5'-TACTGTATGCTCATACAGTA-3', operator gena *umuD* pa ima zaporedje 5'-TACTGTATAAAACAGTA-3'. S krepkim tiskom so označena najbolj ohranjena zaporedja v vezavnem mestu za LexA posameznega operatorja. To so nukleotidi, s katerimi represor LexA specifično reagira.

Na operatorsko zaporedje gena *cka* sta se vezala dva dimera LexA. Gen *cka* ima dve operatorski mesti za vezavo LexA, ki se med seboj prekrivata v enem nukleotidu. Zaradi tega naj bi prišlo do interakcije med dvema dimeroma LexA, ki se vežeta na DNA kooperativno in zato bolj stabilno (Mrak in sod., 2007). Operatorsko zaporedje gena *cka* vsebuje dve vezavni mesti za LexA v naslednjem zaporedju: 5'-TACTGTACATAAAACCAGTGGTTATGTACAGTA-3'. V krepkem tisku so nukleotidi, s katerimi LexA specifično reagira.

Tudi na zaporedje "cka L box", ki je mutirano operatorsko zaporedje gena *cka* (Mrak in sod., 2007) sta se vezala dva dimera LexA. Če primerjamo vezavo LexA na operatorsko zaporedje *cka* in zaporedje "cka L box", vidimo, da so potrebne višje koncentracije represorja LexA, da pride do zasičenja obeh operatorskih mest na mutirani različici operatorja gena *cka*. Mutacija v "cka L box" torej ne prepreči vezave LexA na operator, temveč zmanjša afiniteto vezave LexA na mestu mutacije.

Dokazali smo, da se LexA veže na vsa tarčna zaporedja DNA, ki smo jih pripravili s pomočjo PCR in da se na operatorska zaporedja genov *recA*, *umuD* ter *cka* veže ustrezeno število dimerov LexA. Poleg tega so Butala in sod. potrdili, da se LexA ne veže specifično

na operatorsko zaporedje gena *cka*, ki ima okvarjeni obe operatorski mesti za vezavo LexA ("cka UP3", neobjavljeni rezultati).

5.3 PRENOS WESTERN

Z metodo prenosa western smo preverili, ali proteazi trombin in tripsin odcepita histidinski repek (His)₆ z N-terminalnega dela LexA. Trombin reže protein v zaporedju LeuValProTrp↓GliSer. To zaporedje je vseboval rekombinantni protein LexA na N-terminalnem delu takoj za (His)₆, zato smo predvidevali, da proteaza trombin uspešno odcepi (His)₆ z LexA. Za proteazo tripsin še ni bilo jasno, ali lahko odcepi (His)₆ s proteina LexA. Znano pa je, da tripsin cepi LexA pri aminokislinskem ostanku Arg-67 (Oertel-Buchheit in sod., 1998). Rezultati so vidni na sliki 19. Ugotovili smo, da obe proteazi odcepita (His)₆ z LexA, kar je v skladu z našimi pričakovanji. Tripsin je odcepil (His)₆ z LexA, ko je bil LexA prost v raztopini in tudi, ko je bil LexA vezan na DNA. Ugotovili smo torej še, da tripsin lahko reagira z LexA in odcepi (His)₆ ne glede na to, ali je LexA vezan na DNA, ali pa je prost v raztopini.

Pri prenosu western so rezultati pokazali tudi sledeče: v primeru, ko je bil LexA vezan na DNA, je bila lisa v višini LexA brez (His)₆ zelo močna, kar potrjuje, da je tripsin lahko reagiral z vsemi molekulami LexA. Vidni so bili tudi značilni produkti cepitve LexA s tripsinom (približno 15 kDa velik fragment) pri aminokislinskem ostanku Arg-67. Iz tega lahko sklepamo, da je tripsin cepil nekaj LexA pri Arg-67. Večina pa LexA je vseeno ostalo necepljenega. V primeru prostega LexA je bila lisa v višini LexA brez (His)₆ šibka oz. komaj vidna, iz česar lahko sklepamo, da je tripsin razcepil večino LexA pri Arg-67. To dodatno potrjuje rezultate cepitve LexA s tripsinom, saj smo ugotovili, da tripsin cepi LexA pri aminokislinskem ostanku Arg-67 le, ko je LexA prost v raztopini. Do tega pride zaradi značilne konformacije, ki jo LexA zavzame, ko ni vezan na DNA. V takšni konformaciji je Arg-67 izpostavljen in tako na voljo za cepitev s tripsinom (Oertel-Buchheit in sod., 1998).

Ni jasno, zakaj ni vidnih več produktov cepive LexA pri Arg-67 s tripsinom, ko je bil LexA prost v raztopini. Ena izmed možnosti je, da ni prišlo do prenosa produktov z NaDS-PAGE gela na membrano in jih zato nismo mogli zaznati s protitelesi. Možno je tudi, da je prišlo do popolne razgradnje nevezanega LexA.

5.4 CEPITEV LexA S TRIPSINOM

S cepitvijo LexA s tripsinom smo žeeli preveriti stabilnost vezave LexA na različna operatorska zaporedja, ki smo jih pripravili s PCR. Na podlagi znanih ugotovitev v zvezi z mehanizmom cepitve LexA s tripsinom (Oertel-Buchheit in sod., 1998) smo predpostavili, da tripsin ne bo cepil LexA, dokler bo LexA vezan na DNA ter, da bo do cepitve LexA s tripsinom prišlo šele, ko bo LexA disociiral z DNA. Po disociaciji LexA z DNA naj bi namreč LexA prešel v konformacijo, pri kateri je aminokislinski ostanek Arg-67 izpostavljen raztopini. Tako lahko izpostavljen del pride v interakcijo s tripsinom in tripsin lahko cepi LexA pri Arg-67. Sledili smo nastajanju produktov cepitve LexA s tripsinom in na podlagi tega sklepali, kako hitro LexA disociira s posameznega operatorskega

zaporedja. Pri tem nas je zanimala predvsem primerjava disociacije LexA z različnih operatorskih zaporedij, saj je bila metoda, ki smo jo uporabili premalo občutljiva, da bi lahko z njo proučevali kinetiko disociacije.

Rezultati so pokazali, da se je z daljšanjem časa inkubacije LexA vezanega na DNA s tripsinom povečevala količina produktov cepitve LexA s tripsinom, torej je LexA v odvisnosti od časa disociiral z DNA in tripsin ga je cepil.

V primerih, ko je bil LexA vezan na operatorska zaporedja genov *recA* in *umuD*, smo dobili podobna rezultata. Produkti cepitve LexA s tripsinom se pojavijo že po 5 min inkubacije, kar pomeni, da je LexA relativno hitro disociiral z DNA. Da sta rezultata pri teh dveh operatorskih zaporedjih podobna, je v skladu z našimi pričakovanji, saj se na obe zaporedji veže le en LexA dimer. Pričakovali pa smo, da bo med njima vseeno vidna manjša razlika med hitrostjo disociacije z DNA, saj se LexA na operatorsko zaporedje gena *umuD* veže z višjo afiniteto, kot na operatorsko zaporedje gena *recA* (Fernández de Henestrosa in sod., 2000). Predvidevamo, da je bila metoda premalo občutljiva.

Če primerjamo rezultata, ko je bil LexA vezan na operatorski zaporedji genov *recA* in *umuD* z rezultatom, ko je bil LexA vezan na operatorsko zaporedje gena *cka*, je razlika med količino nastalih produktov cepitve LexA s tripsinom očitna. V primeru operatorskega zaporedja gena *cka* nastane malo produktov cepitve, njihova količina pa se v odvisnosti od časa inkubacije skoraj ne spreminja. Na operatorsko zaporedje gena *cka* se vežeta dva dimera LexA z visoko afiniteto in zato s tega operatorskega zaporedja LexA disociira počasi.

Primerjava rezultatov, ko je bil LexA vezan na operatorsko zaporedje gena *cka* in na zaporedji *cka* z mutacijami v LexA vezavnih mestih ("*cka L box*" in "*cka UP3*") nam pokaže, da je v primerih mutiranih operatorskih zaporedij nastalo več produktov cepitve LexA s tripsinom in da se je količina produktov cepitve povečevala v odvisnosti od časa inkubacije. LexA se je torej na mutirani operatorski zaporedji gena *cka* vezal z manjšo afiniteto in zato hitreje disociiral z DNA. Iz rezultatov je tudi razvidno, da je v primeru vezave LexA na "*cka UP3*" tripsin cepil ves LexA, kar se ujema s predhodnimi ugotovitvami (Mrak in sod., 2007), da se na *cka UP3* LexA ne veže, oziroma se veže z zelo nizko afiniteto.

Povzamemo lahko, da tripsin cepi LexA pri aminokislinskem ostanku Arg-67, ko LexA disociira z DNA oz. ko je prost v raztopini. Vezava LexA na operatorska zaporedja genov *recA*, *umuD*, *cka* in zaporedje "*cka L box*" inhibira cepitev LexA pri Arg-67 s tripsinom. Vezava LexA na operatorska zaporedja genov *recA*, *umuD*, *cka* in zaporedji "*cka L box*" ter "*cka UP3*" je različno stabilna in LexA različno hitro disociira z naštetih zaporedij.

Rezultati cepitve LexA s tripsinom imajo tudi alternativno razlago. Možno je, da tripsin potrebuje zgolj več časa, da razcepi LexA, ne glede na to, ali LexA disociira z DNA ali ostane vezan na DNA. Rezultate bi morali primerjati s podatki o kinetiki disociacije LexA s posameznih operatorskih zaporedij. V kolikor bi vedeli, koliko časa je potrebnega, da večina LexA disociira z nekega operatorskega zaporedja, bi z gotovostjo lahko trdili, da je

bila po določenem času inkubacije LexA s tripsinom, določena količina proteina LexA disociiranega z DNA in tako v konformaciji, ki jo tripsin lahko cepi.

5.5 Z RecA SPROŽENA AVTO-KATALITSKA CEPITEV LexA

S testom z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA smo žeeli preveriti našo hipotezo, da RecA ne sproži avto-katalitske cepitve LexA, ko je LexA vezan na DNA. V ta namen smo LexA vezali na različna operatorska zaporedja, dodali aktiviran RecA in nato spremljali potek cepitve v odvisnosti od časa. Že iz rezultatov cepitve LexA s tripsinom lahko sklepamo, da se je z daljšanjem časa inkubacije povečevala količina prostega LexA v raztopini, saj je LexA disociiral z operatorskih zaporedij. Rezultati testa z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA so pokazali, da se je količina produktov cepitve LexA v odvisnosti od časa inkubacije LexA z aktiviranim RecA povečevala, količina LexA pa se je zmanjševala. Iz tega lahko sklepamo sledče: z daljšanjem časa inkubacije se je povečevala količina disociiranega LexA z DNA. Tako je bilo v raztopini na voljo vedno več prostega LexA in kot takšen je lahko vstopal v interakcijo z aktivnim filamentom RecA, slednji pa je sprožil avto-katalitsko cepitev LexA. Nastali so značilni produkti cepitve LexA in njihova količina je z daljšanjem časa inkubacije naraščala.

Če med seboj primerjamo rezultate, ko je bil LexA vezan na različna operatorska zaporedja, vidimo, da rezultati sovpadajo z rezultati cepitve LexA s tripsinom. Ko je bil LexA vezan na operatorsko zaporedje gena *recA*, so bili rezultati z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA podobni kot v primeru, ko je bil LexA vezan na operatorsko zaporedje gena *umuD*. Zmanjševanje intenzitete lis v višini LexA in nastajanje produktov v odvisnosti od časa inkubacije je potekalo približno enako hitro, torej je LexA s teh dveh operatorskih zaporedij disociiral približno enako hitro. To je bilo v skladu z našimi pričakovanji, saj se na obe operatorski zaporedji (*recA* in *umuD*) veže le en dimer LexA (Fernández de Henestrosa in sod., 2000). V primeru, ko je bil LexA vezan na operatorsko zaporedje gena *cka*, pa se je intenziteta lis v višini LexA zmanjševala komaj opazno. Tudi produktov z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA je bilo malo in njihova količina je naraščala komaj opazno. Rezultat potrjuje ugotovitev, da se na operatorsko zaporedje *cka* vezeta dva dimera LexA (Mrak in sod., 2007). Primerjamo lahko še z RecA sproženo avto-katalitsko cepitev LexA, ko je bil LexA vezan na mutirana operatorska zaporedja gena *cka* ("*cka L box*" in "*cka UP3*"). Reakcija cepitve je potekala hitreje pri "*cka L box*" kot pri *cka* in najhitreje pri "*cka UP3*", saj ima LexA nižjo afiniteto do vezave na mutirani operatorski zaporedji. Pri zaporedju "*cka UP3*" je prišlo do popolne razgradnje LexA. Rezultati sovpadajo z rezultati cepitve LexA s tripsinom.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je za z RecA sproženo avto-katalitsko cepitev LexA potrebna disociacija LexA z operatorskih zaporedij oz. da RecA ne sproži avto-katalitske cepitve, ko je LexA vezan na operatorska zaporedja.

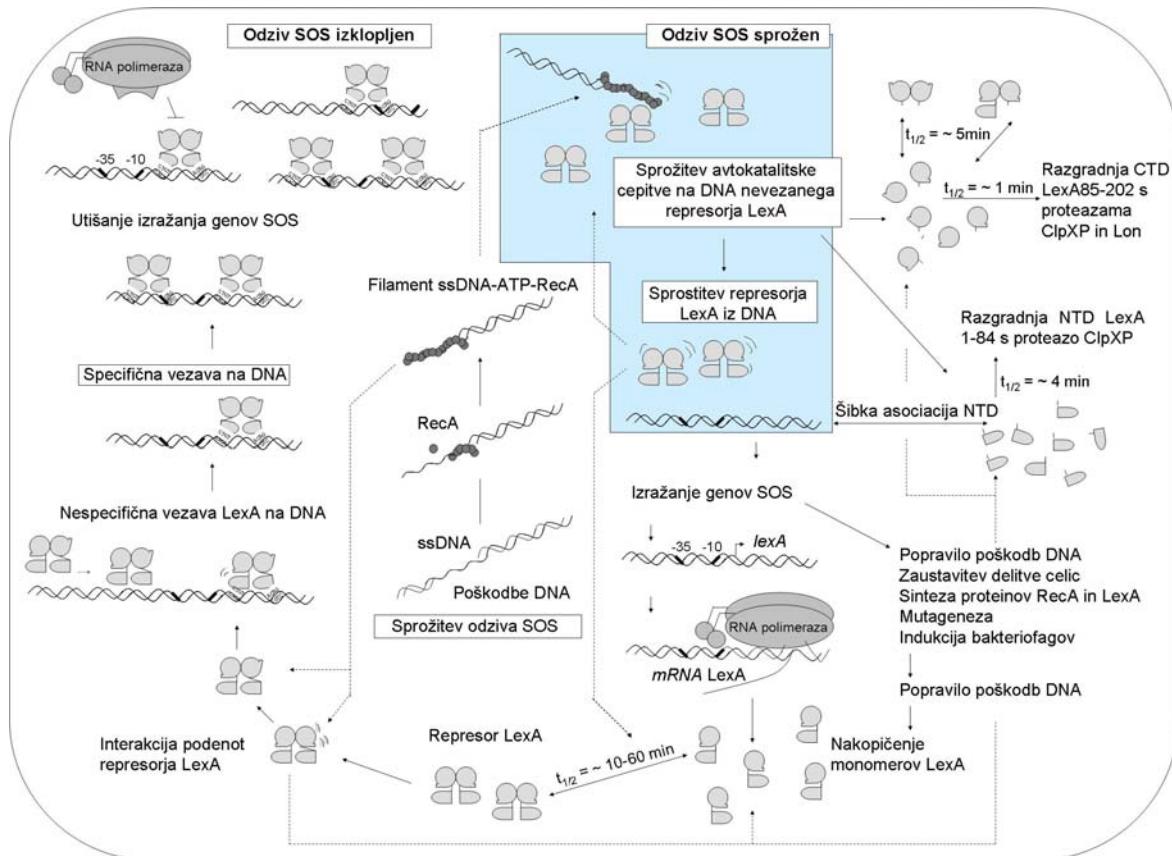
Rezultati, pridobljeni v diplomskem delu, se ujemajo z dosedanjimi ugotovitvami v zvezi z odzivom SOS, ki je uravnavan z represorjem LexA in rekombinazo RecA. Ugotovili so, da se nivo, čas in trajanje indukcije različnih genov SOS, katerih izražanje uravnava LexA, lahko zelo razlikujejo. To je odvisno od ohranjenosti operatorskih zaporedij, na katera se veže LexA. Tudi oddaljenost teh zaporedij od tarčnega promotorja ter jakost tega

promotorja vplivata na odziv SOS. Glede na to, da se LexA veže na različna operatorska zaporedja z različno afiniteto, je verjetno, da v celici prihaja do selektivne derepresije različnih genov SOS (Courcelle in sod., 2001). Tako lahko npr. pride do derepresije nekaterih genov SOS že pri minimalnih poškodbah DNA in zelo zgodaj pri odzivu SOS, nekateri geni pa se začnejo prepisovati šele, ko je DNA močno poškodovana in je odziv SOS inducirан neprekinjeno dalj časa. Znano je, da v začetni fazи odziva SOS najprej pride do derepresije genov *recA* in *ssb*. Produkti teh genov (rekombinaza RecA in SSB) hitro stabilizirajo podvojevalne vilice, da se ustavi podvojevanje DNA. Poveča se torej nivo RecA v celici. Ta sproži avto-katalitsko cepitev LexA in tako se lahko začne prepisovati vedno več genov odziva SOS. Za *recA* in *ssb* pride do derepresije genov, kot so npr. *uvrA*, *uvrB* in *ydjQ*, ki poskrbijo za popravilo poškodovane DNA. Nato se prepišejo geni za DNA-polimeraze (*polB*, *dinB* in *umuDC*), ki lahko obidejo poškodbe na DNA. V zadnjih fazah odziva SOS lahko pride tudi do derepresije genov in sinteze protimikrobnih snovi. Tako npr. pride do derepresije gena *cka*, katerega produkt je kolicin K (Erill in sod., 2007).

Iz rezultatov lahko sklepamo, da LexA najhitreje disociira z operatorskih zaporedij genov *recA* in *umuD*. LexA počasi disociira z operatorskega zaporedja gena *cka*. Slednji je reprimiran kar z dvema LexA dimeroma, med katerima pride do interakcije in je zato vezava LexA na DNA še bolj stabilna (Mrak in sod., 2007). Iz raziskav lahko sklepamo, da so različne stopnje disociacije represorja LexA z operatorskih zaporedij ter selektivna derepresija genov SOS povezani. Tako je veliko večja verjetnost, da RecA sproži avto-katalitsko cepitev LexA, ko je LexA prost v celici, kot pa ko je specifično vezan na DNA.

Natančno poznavanje mehanizma vezave LexA na DNA ter mehanizma z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA, ki do danes še nista povsem pojasnjena, bi omogočila točno razumevanje odziva SOS bakterije *E. coli* ter drugih mikroorganizmov, med njimi tudi patogenih, ki povzročajo bolezenska stanja. Vemo, da nekateri antibiotiki povzročijo poškodbe bakterijske DNA, posledica sproženega odziva SOS pa je lahko derepresija genov za sintezo virulentnih dejavnikov in širjenje genov za odpornost proti antibiotikom (Miller in sod., 2004). Slednje predstavlja resen problem pri zdravljenju bakterijskih okužb z antibiotiki. Razumevanje odziva SOS in izdelava strukture na DNA specifično vezanega represorja LexA bi lahko omogočila izdelavo novih zdravil, kar so že predlagali Butala in sod. (2007).

Na podlagi rezultatov, pridobljenih v diplomskem delu smo predlagali dopolnitev modela odziva SOS, ki je prikazan na sliki 30 (neobjavljeno).



Slika 30: Dopoljen model uravnavanja odziva SOS bakterije *E. coli*. Dopolnitev je označena z modro. Represor LexA je vezan na operatorska mesta genov SOS in preprečuje njihovo prepisovanje. Poškodbe DNA sprožijo nastanek filamenta RecA, ki inducira avto-katalitsko cepitev na specifično DNA nevezanega LexA. pride do derepresije odziva SOS. Ko celica popravi poškodovano DNA, odziv SOS ni več inducirani.

5.6 SKLEPI

- Proteaza tripsin se je izkazala kot uporabno orodje za razlikovanje med na DNA specifično vezanega in nevezanega represorja LexA.
- Vezava represorja LexA na operatorska zaporedja genov *recA*, *umuD*, *cka* in zaporedja "cka L box" ter "cka UP3" je različno stabilna in LexA različno hitro disociira z naštetih zaporedij.
- Z veliko verjetnostjo lahko trdimo, da rekombinaza RecA ne sproži avto-katalitske cepitve na specifično zaporedje DNA vezanega represorja LexA.

6 POVZETEK

Bakterije se na poškodbe DNA odzovejo z odzivom SOS. Pri bakteriji *E. coli* ga sprožijo številni endogeni in eksogeni dejavniki. Odziv SOS je koordiniran celični odziv, ki ga uravnavata proteina LexA in RecA. Tekom celične rasti deluje LexA kot represor prepisovanja SOS genov, katerih produkti sodelujejo pri inhibiciji celične delitve in popravljanju poškodovane DNA.

Monomer represorja LexA je iz N-terminalne DNA vezavne domene in C-terminalne domene, ki je odgovorna za dimerizacijo LexA ter njegovo cepitev. LexA se veže na 16 bp dolgo LexA vezavno zaporedje, ki je ohranjeno pri Gram-negativnih bakterijah. Zaporedja za vezavo LexA se nahajajo blizu ali v samem promotorju in tako LexA sterično onemogoči vezavo RNA-polimeraze. Avto-katalitska cepitev LexA je eden izmed prvih korakov indukcije odziva SOS, saj tako pride do derepresije genov SOS. Poznani sta dve možnosti cepitve LexA: a) intramolekularna avto-katalitska cepitev, ki poteče spontano pri visokem pH in b) z aktivnim filamentom RecA-ssDNA sprožena avto-katalitska cepitev. Na C-terminalni domeni LexA je katalitsko jedro za cepitev LexA, ki vsebuje Ser-119 in Liz-156. Liz-156 aktivira Ser-119. Hidrosilna skupina aktiviranega Ser-119 deluje kot nukleofil in napade vez med Ala-84 in Gli-85.

Rekombinaza RecA se veže na ssDNA tako, da okrog ssDNA nastane nukleoproteinski filament v obliki desnosučne vijačnice. Filament RecA-ssDNA je aktiven le, če je v kompleksu z ATP. Aktivni filament RecA je ko-proteaza, saj sproži avto-katalitsko cepitev LexA in tako sodeluje pri uravnavanju odziva SOS. Mehanizem z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA še ni jasen.

V diplomski nalogi smo izrazili in očistili rekombinantna proteina LexA in RecA, ki sta imela na N-terminalnem delu histidinski repek. Proučili smo stabilnost vezave represorja LexA na tarčna zaporedja DNA. Ugotovili smo, da se LexA na različna operatorska zaporedja veže z različno afiniteto in zato različno hitro disociira z operatorjev. LexA najhitreje disociira z operatorja gena *recA*, počasneje z operatorja gena *umuD* in najpočasneje z operatorja gena *cka*. Z metodo z RecA sprožene avto-katalitske cepitve LexA, pri kateri smo LexA vezali na različna operatorska zaporedja, smo prišli do sklepa, da aktivni filament RecA ne sproži avto-katalitske cepitve LexA, ko je LexA specifično vezan na tarčno zaporedje DNA. Za z RecA posredovano avto-katalitsko cepitev LexA je potreba disociacija LexA z DNA. Na podlagi rezultatov, pridobljenih v diplomskem delu smo dopolnili model odziva SOS.

7 VIRI

- Arenson T. A., Tsodikov O. V., Cox M. M. 1999. Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. *Journal of Molecular Biology*, 288, 3: 391-401.
- Butala M. 2008. Molekularni mehanizmi s temperaturo uravnavanega izražanja kolicina K (bakterije *Escherichia coli*). Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 37-60.
- Butala M., Hodošček M., Anderluh G., Podlesek Z., Žgur-Bertok D. 2007. Intradomain LexA rotation is a prerequisite for 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.
- Chattopadhyaya R., Pal A. 2004. Improved model of LexA repressor dimer bound to *recA* operator. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 21, 5: 681-689.
- Chen Z., Yang H., Pavletich N. P. 2008. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*, 453, 7194: 489-494.
- Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P. O., Hanawalt P. C. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 158, 1: 41-64.
- Cox M. M. 1999. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, 63: 311-366.
- Cox M. M. 2007. Regulation of bacterial RecA protein. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 1: 41-63.
- 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.
- Erill I., Campoy S., Barbé J. 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 6: 637-656.
- 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 regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 35, 6: 1560-1572.
- 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.
- Giese K. C., Michalowski C. B., Little J. W. 2008. RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *Journal of Molecular Biology*, 377, 1: 148-161.
- Hurstel S., Granger-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.

- Kim B, Little J. W. 1992. Dimerization of a specific DNA-binding protein on the DNA. *Science*, 225, 5041: 203-206.
- 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.
- Kristan K. 2005. Vloga N-terminalne regije pri tvorbi transmembranske pore ekvinatoksina II, citolitičnega proteina iz morske veternice *Actinia equina*. Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 30-34.
- 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.
- Little J. W. 1983. The SOS regulatory system: control of its state by the level of RecA protease. *Journal of Molecular Biology*, 167, 4: 791-808.
- Little J. W. 1984. Autodigestion of LexA and phage λ repressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 5: 1375-1379.
- 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., Kim B., Roland K. L., Smith M. H., Lin L. L., Slilaty S. N. 1994. Cleavage of LexA repressor. *Methods in Enzymology*, 224: 266-284.
- 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.
- 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.
- Mohana-Borges R., Pacheco A. B., Sousa F. J., Fougel D., Almeida D. F., Silva J. L. 2000. LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific DNA in tightening protein-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 7: 4708-4712.
- 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 A., 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: 654-659.
- 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.

- Nishinaka T., Doi Y., Hara R., Yashima E. 2007. Elastic behavior of RecA-DNA helical filaments. *Journal of Molecular Biology*, 370, 5: 837-845.
- 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
- Oertel-Buchheit P., Reinbolt J., John M., Granger-Schnarr M., Schnarr M. 1998. A LexA mutant repressor with a relaxed inter-domain linker. *Protein Science*, 7: 512-515.
- 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.
- Radman M. 1974. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *E. coli*: SOS repair hypothesis. V: Molecular and environmental aspects of mutagenesis. Prakash L., Sherman F., Miller M. W., Lawrence C. W., Taber H. W. (eds.). Charles C. Thomas, Springfield, Illinois: 128-142.
- Register J. C., Griffith J. 1985. The direction of RecA assembly onto single strand DNA is the same as the direction of strand assimilation during strand exchange. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 22: 12308-12312.
- 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.
- 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.
- Schlachner K., Pham P., Cox M. M., Goodman M. F. 2006. Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. *Chemical Reviews*, 106, 2: 406-419.
- 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.
- 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.
- Wade J. T., Reppas N. B., Church G. M., Struhl K. 2005. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *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.

ZAHVALA

Zahvaljujem se **prof. dr. Darji Žgur-Bertok** za odlično mentorstvo in posluh za nove ideje. Hvala za vso pomoč in hiter odziv, ko sem bila v časovni stiski.

prof. dr. Gregorju Anderluhu se zahvaljujem za pregled diplomskega dela s svetlobno hitrostjo.

dr. Zdravku Podlesku in **dr. Mateju Butali** se zahvaljujem, da sta me popeljala v svet raziskovanja in mi pokazala, da je delo v laboratoriju lahko čudovito. Naučila sta me skoraj vsega, kar danes znam in me pripravila na svet znanosti!

Kolegice in kolegi **Mira P., Rok T., Matej S., Biserka B., Cene G., Andrej B., Simona K., Vesna H., Barbara B., Gregor B.** in **Ajda M.**, zahvaljujem se vam, da ste me sprejeli takšno kakršna sem, mi vedno dajali občutek, da sem dobrodošla in mi nudili neizmerno pomoč pri diplomski nalogi. Hvala tudi, da ste verjeli vame, ko sem to najbolj potrebovala.

Alen M. in **Andrej P.**, zahvaljujem se vama za vse žure, brez katerih študentska leta ne bi bila to, kar so bila.

Andrej Razpotnik in **Živa Petkovšek**, moje leto absolventskega staža sta naredila nepozabno! Pokazala sta mi, da lahko v življenju zdužim zabavo in delo in da prijatelje lahko najdeš tam, kjer jih najmanj pričakuješ. Hvala!

Anja Dežman, **Lučka Thurnher** in **Marija Dežman**, vaše prijateljstvo ne pozna meja. Skupaj smo se prebile čez marsikaj in postale močnejše. Veselim se novih izzivov, ker vem, da mi stojite ob starni. Rada vas imam!

Na koncu se zahvaljujem sestri **Nini** ter **staršema Dušici in Iztoku**. Pokazali ste mi, da je svet velik, poln in da je prav takšno lahko tudi življenje. Zahvaljujem se vam, da ste mi dali neizmirno širino, me naučili delavnosti, vztrajnosti in mi omogočili, da sem postala to, kar sem. Hvala za ljubezen in podporo. Skupaj nam je uspelo!