

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina SKVARČA

**IZRAŽANJE GENOV ODZIVA SOS V SEVIH
BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina SKVARČA

IZRAŽANJE GENOV ODZIVA SOS V SEVIH BAKTERIJE
Escherichia coli

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

EXPRESSION OF THE SOS RESPONSE GENES IN STRAINS OF
BACTERIA *Escherichia coli*

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

POPRAVKI:

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur-Bertok in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tatjana Avšič – Županc

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina SKVARČA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 579.258:579.266(043)=163.6

KG *Escherichia coli*/odziv na poškodovano DNA/odziv SOS/geni SOS/zeleni fluorescirajoči protein/GFP/kolicini/bakteriofagi/na antibiotik tolerantne bakterije/ciprofloksacin/ frekvenca mutacij/rifampicin

AV SKVARČA, Nina

SA ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/MANDIČ-MULEC, Ines (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije

LI 2010

IN IZRAŽANJE GENOV ODZIVA SOS V SEVIH BAKTERIJE *Escherichia coli*

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 76 str., 19 pregl., 20 sl., 5 pril., 67 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Poškodbe DNA, nastanek nukleoproteinskega kompleksa RecA-ssDNA in zaustavitev potovanja replikacijskih vilic sprožijo odziv na poškodovano DNA (odziv SOS). Glavna proteina, ki uravnava odziv SOS pri *Escherichia coli*, sta negativni regulator LexA in pozitiven regulator RecA. Aktivirani RecA posreduje avtokatalitično cepitev dimera LexA, vezanega v promotorski regiji genov, ki jih reprimira. Cepitev dimera sproži odziv SOS in tako derepresijo številnih genov vpletenih pri popravljanju poškodb, citokinezi ter tudi derepresijo številnih genov z zapisi za virulentne dejavnike. Z raziskavo smo želeli preveriti ali določene lastnosti sevov, kot na primer plazmidi oziroma bakteriofagi, vplivajo na odziv SOS. V ta namen smo najprej preverili proučevane naravne izolate za omenjene lastnosti. Največ pozornosti smo namenili sevu z bakteriofagom (18), sevu z večimi različnimi virulentnimi dejavniki (H13) in sevu EHEC (E01/121) in jih primerjali z laboratorijskim sevom RW118. V seve smo vnesli fuzije promotorjev genov odziva SOS (*lexA*, *recA*, *umuD*) s poročevalskim genom *gfp* brez lastnega promotorja ter fuzije promotorjev kolicinov (*caa*, *cea7*) z *gfp*. S pomočjo fluorescentne mikroskopije smo sledili aktivnosti določene genske fuzije v eksponentni in stacionarni fazi ter ob indukciji z Mit-C. Naši rezultati so pokazali, da je izražanje genov odziva SOS v populaciji genetsko enakih celic zelo heterogeno. Aktivnost promotorja določenega gena (*lexA*, *recA*, *umuD*) se razlikuje tudi med posameznimi sevi. Pri sevu H13 smo opazili povečano osnovno raven aktivnosti promotorjev in jo poskusili pojasniti. V primerjavi s sevom RW118, se ob indukciji z Mit-C pri sevu 18, predvidevamo da je to posledica prisotnosti bakteriofaga in sevu H13, poveča delež celic, ki močneje izražajo določen gen odziva SOS.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.258:579.266(043)=163.6

CX *Escherichia coli*/SOS response/SOS genes/green fluorescent protein/GFP/colicins/bacteriophages/antibiotic persistence/ciprofloxacin/mutation frequency/rifampicin

AU SKVARČA, Nina

AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/MANDIČ-MULEC, Ines (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2010

TI EXPRESSION OF THE SOS RESPONSE GENES IN STRAINS OF BACTERIA
Escherichia coli

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 76 p., 19 tab., 20 fig., 5 ann., 67 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In *E. coli* DNA damage, formation of ssDNA-RecA nucleoprotein and replication fork arrest results in induction of the SOS response. The LexA protein is the negative regulator of the SOS response and acts as a transcriptional repressor while the RecA protein acts as a positive transcriptional regulator. Interaction between the RecA-ssDNA filament and LexA protein activates autocleavage of a LexA dimer. Induction of the SOS response derepresses several genes involved in DNA damage repair, cell division and genes encoding virulence factors. Our goal was to determine whether certain virulence factors, plasmids or bacteriophage, influence the SOS response. First we checked if the studied strains harbor any virulence genes. Furthermore, fusions of promoter of the SOS and colicins genes with the promoterless *gfp* reporter gene were inserted into (i) strain 18 harboring a bacteriophage, in (ii) strain with several different virulence factors (H13) and (iii) an EHEC strain (E01/121). Expression of SOS genes in these strains was compared with expression in the wild type laboratory strain RW118. We subsequently examined expression of *lexA*, *recA* and *umuD* with fluorescence microscopy in the logarithmic and stationary growth phases without any DNA external damaging agents. We also examined the kinetics of induction of the SOS response induced with Mit-C. Our data showed heterogeneity in expression of these genes among genetically identical cells, which could be the result of spontaneous induction of the SOS response. We also noted major differences in expression of genes in different strains. Our results revealed a higher basal level of expression of the examined SOS genes in strain H13 compared to strain RW118. In induced cells of strain 18, we observed an increased portion of highly induced cells most probably due to prophage induction, the same was also observed in strain H13.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUCNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1 Uropatogeni sevi <i>E. coli</i>	3
2.1.2 Enterohemoragična <i>E. coli</i>	4
2.2 ODZIV SOS BAKTERIJE <i>E. coli</i>	4
2.2.1 Protein LexA	5
2.2.2 Protein RecA	5
2.2.3 Proteini UvrA, B, C, D	6
2.2.4 Protein Sula	6
2.2.5 Z SOS inducirane DNA polimeraze	7
2.2.6 Geni odziva SOS in potek indukcije	7
2.2.7 Načini indukcije odziva SOS	8
2.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN ODZIV SOS	9
2.3.1 Kolicini in odziv SOS	9
2.3.1.1 Kolicini	9
2.3.1.2 Struktura	10
2.3.1.3 Sproščanje kolicinov	10
2.3.1.4 Mehanizem delovanja kolicinov	10
2.3.1.4.1 Prepoznavanje površinskega receptorja in vnos kolicina	10
2.3.1.4.2 Letalno delovanje kolicina	11
2.3.1.5 Zaščita pred kolicini	11
2.3.1.6 Uravnavanje izražanja kolicinskih genov	12
2.3.2 Bakteriofagi	12

2.3.2.1	Virulentni in temperirani bakteriofagi	12
2.3.2.2	Uravnava indukcije lambdoidnih bakteriofagov	13
2.4	NA ANTIBIOTIK TOLERANTNE BAKTERIJE IN ODZIV SOS	14
2.4.1	Na antibiotik tolerantne bakterije	14
2.4.2	Gensko ozadje na antibiotik tolerantnih bakterij	14
2.4.3	Na antibiotik tolerantne bakterije in odziv SOS	15
2.5	ODZIV SOS IN ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM	16
2.5.1	Razvoj odpornosti	16
2.5.2	Širjenje rezistenc	16
2.6	MERJENJE ODZIVA SOS	17
2.6.1	Poročevalski sistem GFP in proučevanje genov SOS z GFP	18
3	MATERIALI IN METODE	19
3.1	MATERIALI	19
3.1.1	Bakterijski sevi	19
3.1.1.1	Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	19
3.1.1.2	Klinični izolati uroseptičnih sevov <i>E. coli</i>	19
3.1.1.3	Naravna izolata sevov EHEC	19
3.1.2	Plazmidi	20
3.1.3	Kemikalije	21
3.1.4	Kompleti in encimi	23
3.1.5	Začetni oligonukleotidi	23
3.1.6	Pufri in reagenti	24
3.1.7	Oprema	24
3.1.8	Gojišča	25
3.1.8.1	Tekoče gojišče LB	25
3.1.8.2	Tekoče gojišče LB z antibiotiki	25
1.1.1.1	Trdno gojišče LB	26
3.1.8.3	Minimalno gojišče A10	26
3.1.8.4	Mehki agar	26
3.2	METODE	27
3.2.1	Test kolicinogenosti	27
3.2.2	Indukcija lizogenih bakteriofagov z UV	27
3.2.3	Indukcija bakteriofagov z nalidiksično kislino	27
3.2.4	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	28
3.2.4.1	Priprava celičnega lizata/supernatanta celic za PCR	28
3.2.4.2	PCR	28
3.2.4.3	PCR z bakterijskimi celicami	30
3.2.5	Konjugacija na filtru	31
3.2.6	Transformacija	32
3.2.6.1	Priprava kompetentnih celic RW118, H13, 18 in E01/121	32
3.2.6.2	Transformacija kompetentnih celic	32

3.2.7	Izolacija plazmidne DNA s kompletom »GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit« (izolacija plazmidne DNA iz 1 do 5 ml kulture za plazmide v večjem številu kopij ali do 10 ml kulture za plazmide v manjšem številu kopij)	33
3.2.8	Cepitev z restrikcijskimi endonukleazami Fast Digest KpnI	33
3.2.9	Agarozna gelska elektroforeza	34
3.2.10	Ekstrakcija fragmentov DNA iz agaroznega gela	34
3.2.11	Mikroskopiranje z invertnim mikroskopom	34
3.2.11.1	Priprava celic za mikroskopijo in vzorčenje v eksponentni in stacionarni fazi rasti	34
3.2.11.2	Priprava celic za mikroskopijo in vzorčenje ob indukciji	35
3.2.11.3	Priprava preparata	35
3.2.11.4	Svetlobna in fluorescentna mikroskopija	36
3.2.12	Določanje frekvence mutacij	36
3.2.12.1	Določanje frekvenc mutacij z nalidiksično kislino	36
3.2.12.2	Določanje frekvence mutacij za rifampicinom	36
3.2.13	Določevanje števila na antibiotik tolerantnih bakterij	37
3.2.13.1	Določevanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za posamezne seve za ciprofloksacin z e-testi	37
3.2.13.2	Določevanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za posamezne seve za tetraciklin	37
3.2.13.3	Določevanje števila tolerantnih bakterij	37
4	REZULTATI	39
4.1	DOLOČANJE SPOSOBNOSTI TVORBE KOLICINOV	39
4.1.1	Test sposobnosti tvorbe kolicinov s kloroformiranjem	39
4.1.2	Določanje plazmidov, ki imajo zapise za sintezo kolicinov, z metodo PCR	39
4.2	DOLOČANJE VEČJIH PLAZMIDOV	40
4.3	DOLOČANJE PRISOTNOSTI BAKTERIOFAGOV	41
4.4	OBČUTLJIVOST PROUČEVANIH SEVOV ZA ANTIBIOTIKE (Ap, Kn, Nal, Gm, Rif)	41
4.5	MIKROSKOPIRANJE	42
4.5.1	Izražanje genov SOS	42
4.5.2	Izražanje gena za sintezo kolicina E7	48
4.5.3	Izražanje genov SOS ob indukciji	50
4.6	DOLOČANJE FREKVENC MUTACIJ	55
4.7	DOLOČEVANJE ŠTEVILA TOLERANTNIH BAKTERIJ	56
4.8	PREVERJANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA <i>lexA</i> SEVA H13	58
4.9	PREVERJANJE PRISOTNOSTI KOLICINA E2	58

4.10	PREVERJANJE OBČUTLJIVOSTI SEVA H13 ZA KOLICINE A, N, E1 in E3	58
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	60
5.1	IZRAŽANJE GENOV ODZIVA SOS	60
5.1.1	Izražanje genov <i>lexA</i> in <i>recA</i> na kromosomu in na plazmidu	60
5.1.2	Izražanje genov <i>lexA</i> , <i>recA</i> in <i>umuD</i> na plazmidu	61
5.2	IZRAŽANJE KOLICINA E7	62
5.3	IZRAŽANJE GENOV SOS OB INDUKCIJI	63
5.3.1	Izražanje gena <i>lexA</i> v sevih 18 in RW118 ob indukciji z Mit-C	63
5.3.2	Izražanje genov <i>lexA</i> in <i>recA</i> v sevih H13 in RW118 ob indukciji z Mit-C	64
5.3.3	Izražanje gena <i>umuD</i> v sevih H13 in RW118 ob indukciji z Mit-C	64
5.4	H13 IN VIŠJA OSNOVNA RAVEN IZRAŽANJA GENOV SOS	65
5.4.1	Določanje frekvenc mutacij	65
5.4.2	Določanje števila na antibiotik tolerantnih bakterij	65
5.4.3	Preverjanje nukleotidnega zaporedja gena <i>lexA</i> seva H13	66
5.4.4	Preverjanje prisotnosti kolicina E2	66
5.4.5	Preverjanje občutljivosti seva H13 za kolicine A, N, E1 IN E3	66
5.5	SKLEPI	68
6	POVZETEK	69
7	VIRI	71
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kolicini, glede na delovanje (Braun in sod., 1994; Gillor in sod., 2004)..	11
Preglednica 2: Uporabljeni laboratorijski sevi <i>E.coli</i>	19
Preglednica 3: pRK100 in kolicinogeni plazmidi.....	20
Preglednica 4: Plazmidi z zapisom za kolicine in plazmidi z <i>gfp</i> fuzijami	21
Preglednica 5: Uporabljeni antibiotiki in njihove koncentracije v gojiščih.	25
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo.....	29
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo za dokazovanje plazmidov pCol	30
Preglednica 8: Restriksijske mešanice	33
Preglednica 9: V poskusu določanja števila na antibiotik tolerantnih bakterij uporabljene koncentracije antibiotikov ciprofloksacina in tetraciklina (5× MIK).....	38
Preglednica 10: Pregled lastnosti sevov <i>E. coli</i> in občutljivost za antibiotike	42
Preglednica 11: Povzetek lastnosti sevov <i>E. coli</i> 18 in H13 (Rijavec M.).....	43
Preglednica 12: Izražanje promotorjev genov odziva SOS (<i>lexA</i> in <i>recA</i>) s fuzijami z <i>gfp</i> na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu	46
Preglednica 13: Izražanje promotorjev genov SOS s fuzijami na plazmidu	48
Preglednica 14: Izražanje fuzij promotorjev kolicinov z <i>gfp</i> brez promotorjev	50
Preglednica 15: Izražanje fuzije <i>lexA-gfp</i> na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevih <i>E. coli</i> 18 in RW118.....	51
Preglednica 16: Izražanje fuzije <i>lexA-gfp</i> na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevih <i>E. coli</i> RW118 in H13.....	53
Preglednica 17: Izražanje fuzije <i>recA-gfp</i> na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevih <i>E. coli</i> RW118 in H13.....	55
Preglednica 18: Frekvence mutacij proučevanih sevov <i>E. coli</i> določene z nalidiksično kislino in rifampicinom	56
Preglednica 19: Povzetek kolicinov in receptorjev, ki jih le ti prepoznavajo (Gillor in sod, 2004).....	67

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz indukcije odziva SOS pri bakteriji <i>E. coli</i> (Michel, 2005)	8
Slika 2: Zgodnja regulatorna regija lambdoidnega faga (Waldor in Friedman, 2005).....	13
Slika 3: Shema poskusa, indukcija bakterijske kulture z Mit-C.....	35
Slika 4: Določanje MIK. A. Določanje MIK za Cip za sev E01/121 z e-testi. B. Določanje MIK za Tc za sev H13 z redčitveno vrsto.	37
Slika 5: Test kolicinogenosti, zbistritve okrog kolonij pomenijo prisotnost kolicinov oz. mikrocinov.....	39
Slika 6: PCR pomnožki odseka gena RNAII z začetnima oligonukleotidoma H3 in H4. Prvi stolpec pri obeh gelih je standardna DNA bakteriofaga λ , cepljena z encimom <i>Pst</i> I (označene so dolžine fragmentov). V jamici označeni s številko 1 je pozitivna kontrola, plazmid pKCTS, v ostalih jamicah so PCR pomnožki proučevanih sevov, kot so označeni v legendi (s puščico so označeni sevi, pri katerih smo dobili pozitivne rezultate).	40
Slika 7: Test indukcije bakteriofagov z UV, plaki so posledica prisotnosti bakteriofagov.	41
Slika 8: Pozitivna kontrola: Celice seva <i>E. coli</i> RW118 s fuzijo <i>cki-gfp</i> v stacionarni fazi. A pri svetlobni mikroskopiji, B pri fluorescentni mikroskopiji.	43
Slika 9: Negativna kontrola: Celice seva <i>E. coli</i> RW118 s brez plazmida s fuzijo <i>gfp</i> v stacionarni fazi. A pri svetlobni mikroskopiji, B pri fluorescentni mikroskopiji.....	43
Slika 10: Celice seva <i>E. coli</i> H13 z izraženo fuzijo <i>lexA-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev H13 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> na plazmidu pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> na kromosomu pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.	44
Slika 11: Celice seva <i>E. coli</i> H13 z izraženo fuzijo <i>recA-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev H13 s fuzijo <i>recA-gfp</i> na plazmidu pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo <i>recA-gfp</i> na kromosomu pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.	45
Slika 12: Celice sevov <i>E. coli</i> RW118 in H13 z izraženo fuzijo <i>lexA-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.	46
Slika 13: Celice sevov <i>E. coli</i> RW118 in H13 z izraženo fuzijo <i>recA-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.	47
Slika 14: Celice sevov <i>E. coli</i> RW118 in H13 z izraženo fuzijo <i>umuD-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo <i>umuD-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji in B, pri	

fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo <i>umuD-gfp</i> pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.	47
Slika 15: Celice sevov <i>E. coli</i> RW118 in H13 z izraženo fuzijo <i>cea7-gfp</i> na plazmidu v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo <i>cea7-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo <i>cea7-gfp</i> pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.	49
Slika 16: Celice sevov <i>E. coli</i> RW118 in 18 z izraženo fuzijo <i>lexA-gfp</i> na plazmidu 90 min po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C. A. Sev RW118 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji. Sev 18 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji.	51
Slika 17: Celice sevov <i>E. coli</i> RW118 in H13 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> na plazmidu po 90 minutah po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C. A. Sev RW118 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji. C. Sev H13 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji.	52
Slika 18: Celice sevov <i>E. coli</i> RW118 in H13 z izraženo fuzijo <i>recA-gfp</i> na plazmidu po 90 minutah po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C. A. Sev RW118 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji. C. Sev H13 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji.	54
Slika 19: Preživetje sevov RW118, H13 in RW464 izpostavljenih ciprofloksacinu. RW118 kontrola in H13 kontrola, sta kulturi, ki smo ju inkubirali brez ciprofloksacina	57
Slika 20: Preživetje sevov <i>E. coli</i> 18, E01/121 in H54 izpostavljenih ciprofloksacinu. 18 kontrola, E01/121 kontrola in H54 kontrola, so kulture, ki smo jih inkubirali brez ciprofloksacina.	57

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izražanje promotorjev genov odziva SOS s fuzijami na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu, meritve OD₆₀₀ in rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami na kromosomu

Priloga A1: Izražanje promotorjev genov odziva SOS s fuzijami na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu

Priloga A2: Izražanje promotorjev genov odziva SOS s fuzijami na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu (ponovitev)

Priloga A3: Meritve OD₆₀₀ za sev *E. coli* H13 s fuzijami *lexA-gfp* in *recA-gfp* na plazmidu in kromosomu

Priloga A4: Rastne krivulje seva *E. coli* H13 s fuzijami *lexA-gfp* in *recA-gfp* na plazmidu in kromosomu

Priloga A5: Rastne krivulje seva *E. coli* H13 s fuzijami *lexA-gfp* in *recA-gfp* na plazmidu in kromosomu (ponovitev)

Priloga B: Izražanje promotorjev genov SOS s fuzijami na plazmidu, meritve OD₆₀₀ in rastne krivulje

Priloga B1: Izražanje promotorjev genov SOS s fuzijami na plazmidu

Priloga B2: Meritve OD₆₀₀ za seve *E. coli* s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu

Priloga B3: Rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu

Priloga B4: Meritve OD₆₀₀ za seve *E. coli* s fuzijami *recA-gfp* na plazmidu

Priloga B5: Rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami *recA-gfp* na plazmidu

Priloga B7: Rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami *umuD-gfp* na plazmidu

Priloga C: Rezultati izražanja genov odziva SOS ob indukciji in meritve OD₆₀₀ sevov s fuzijami na plazmidu

Priloga C1: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu RW118

Priloga C2: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu 18

Priloga C3: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu *E. coli* RW118

Priloga C4: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu *E. coli* H13

Priloga C5: Izražanje fuzije *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji z mitomicinom C pri sevu *E. coli* RW118

Priloga C6: Izražanje fuzije *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji z mitomicinom C pri sevu *E. coli* H13

Priloga C7: Meritve OD₆₀₀ za seva *E. coli* 18 in RW118 s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji

Priloga C8: Meritve OD₆₀₀ za seva *E. coli* H13 in RW118 s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji

Priloga C9: Meritve OD₆₀₀ za seva *E. coli* H13 in RW118 s fuzijami *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji

Priloga D: Na antibiotik tolerantne bakterije, spremljanje rasti kulture brez antibiotika in preživetje kulture po tretiranju z antibiotikom

Priloga D1: Vrednosti OD₆₀₀ kultur inkubiranih brez antibiotika v poskusu s Cip

Priloga D2: Titrir kultur po dodatku Cip (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Cip, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t_{24} brez)

Priloga D3: Titri kultur po dodatku Cip (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Cip, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t_{24} brez) (1. ponovitev)

Priloga D4: Titri kultur po dodatku Cip (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Cip, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t_{24} brez) (2. ponovitev)

- Priloga D5: Vrednosti OD_{600} bakterijskih kultur inkubiranih brez antibiotika v poskusu s Tc
- Priloga D6: Titri kultur po dodatku Tc (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Tc, ter titer kulture brez Tc po 24 urah (t_{24} brez)
- Priloga D7: Titri kultur po dodatku Tc (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Tc, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t_{24} brez) (ponovitev)
- Priloga E: Primer poravnave operatorskega zaporedja LexA seva H13 in seva deponiranega v zbirki GenBank

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

I	skupina celic, ki jo določa največje izražanje proučevanega gena
II	skupina celic, ki jo določa večje izražanje proučevanega gena
I+II	skupina celic, ki intenzivneje izražajo proučevani gen, celice skupin I in II
III	skupina celic, ki jo določa svetilnost večine celic, celice z izražanjem proučevanega gena na osnovni ravni
Ap ^r	odpornost na antibiotik ampicilin
Ar	argon
bp	bazni par
<i>caa</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin A
<i>cea7</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin E7
<i>cka</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin K
<i>cki</i>	strukturni gen, ki kodira protein imunosti poti kolicinu K
ColA	kolicin A
ColE1	kolicin E1
ColE7	kolicin E7
ColK	kolicin K
ColN	kolicin N
Da	daltonov
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvoveržna DNA
dNTP	deoksiribonukleozid fosfat
<i>eae</i>	gen, ki kodira intimin
EDTA	etilindiamintetraocetna kislina
EtBr	etidijev bromid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gm ^r	odpornost na antibiotik gentamicin
<i>gfp</i>	strukturni gen, ki kodira zeleni fluorescirajoči protein
GFP	zeleni fluorescirajoči protein
HI	heterologni indeks
I	Zmerno občutljiv za antibiotik
<i>imm</i>	strukturni gen, ki kodira protein imunosti
kb	kilo baze (število baz × 1000)

<i>kil</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin sprostitveni protein
Kn ^r	odpornost na antibiotik kanamicin
LB	gojišče Luria-Bertani
<i>lexA</i>	strukturni gen, ki kodira transkripcijski represor LexA
LexA	transkripcijski represor
Mit-C	mitomicin
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
<i>mobA</i>	strukturni gen proteina MobA
MobA	protein, ki prekine dvojno vijačnico v mestu <i>oriT</i>
mRNA	sporočilna DNA
NER	popravljanje z izrezovanjem nukleotidov
nm	nano metri
OD ₆₀₀	optična gostota pri 600 nm
ori	mesto začetka podvojevanja
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
R	odporen na antibiotik
<i>recA</i>	strukturni gen, ki kodira RecA
RecA	protein RecA
Rif ^r	odpornost na antibiotik rifampicin
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomalna RNA
<i>ruvA</i>	strukturni gen, ki kodira protein RuvA
RuvA	protein RuvA
S	občutljiv za antibiotik
SOS	odziv na poškodbe DNA (ang. save our souls)
ssDNA	enoverižna DNA
stx	Šiga toksin
TBE	Tris-boratni elektroforezni pufer
TE	Tris-EDTA
<i>umuD</i>	strukturni gen, ki kodira protein UmuD
UmuD	protein UmuD
UmuD'	aktivirani protein UmuD
UV	ultravijolična svetloba
VT	glej stx, verotoksin
vrt./min	vrtljaji na minuto

1 UVOD

Uporaba določenih antibiotikov (pogosto že samo subinhibitorna koncentracija) sproži odziv SOS. V naravnem okolju antibiotiki redko dosežejo terapevtsko koncentracijo, zato lahko vplivajo na metabolizem bakterijske populacije ali sprožajo odziv na spremenjeno okolje. Kinoloni so danes najpomembnejši in najbolj široko uporabljeni antibiotiki v zdravstvu. Njihova slabost, da izzovejo odziv SOS, je dokazana pri bakterijah *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. Poleg kinolonov sprožajo odziv SOS v bakteriji *S. aureus* tudi β -laktamski antibiotiki (Maiques in sod., 2006; Kelley, 2006).

Za preživetje antibiotične terapije je za bakterije pomembna tako fenotipska kot genotipska variabilnost. Zdravljenje bakterijskih okužb z antibiotiki, ki poškodujejo DNA, pripelje do indukcije odziva SOS. Posledica indukcije odziva SOS je toleranca bakterij (persistence). Te bakterije so žive, niso pa sposobne rasti. Na antibiotik tolerantne bakterije nastanejo stohastično pred izpostavitvijo antibiotiku (Keren in sod., 2004) ali pa so inducirane z antibiotikom preko odziva SOS (Dörr in sod, 2009). Tolerantne bakterije so pomemben dejavnik izida zdravljenja, ker se lahko po končani antibiotični terapiji ponovno namnožijo in povzročijo ponovitev bolezni. Na antibiotik tolerantne bakterije lahko povzročajo še več nevšečnosti, ker se lahko skrijejo tudi pred imunskim odzivom, npr. v osrednjem živčevju (*Treponema pallidum*), v makrofagih ali granulomih (*Mycobacterium tuberculosis*), v biofilmih (*Pseudomonas aeruginosa*) in drugje. Na drugi strani, odporne bakterije nastanejo zaradi večjih mutacij bakterijskega genoma, ki so tudi posledica indukcije odziva SOS. Njihov vir so lahko tudi na antibiotik tolerantne bakterije (Jayarman, 2008).

Vpliv odziva SOS na horizontalne prenose mobilnih elementov, nastajanje in prenos zapisov za odpornosti ter indukcijo virulentnih dejavnikov, so dokazali pri bakterijah *E. coli*, *S. aureus* in *Vibrio cholerae*. V *S. aureus* lahko antibiotiki, ki sprožajo odziv SOS, sprožijo tudi izražanje fibronektin vezočih proteinov, ki posredujejo vezavo, vstop in perzistenco v različnih celicah. Mobilni elementi so poleg vpliva na genetsko diverzitetu, povezani tudi z večino klinično pomembnih toksinov. Neustrezna uporaba antibiotikov pripelje do nasprotnega učinka od željenega, saj preko odziva SOS sprožimo izražanje genov z zapisi za toksine, kar pripelje do poslabšanja stanja bolnika. Zato je pomembno proučiti odziv SOS ter razmisliti o posledicah uporabe določenih antibiotikov. Odziv SOS je tudi potencialna tarča novih protimikrobnih učinkovin, zato so toliko pomembnejše raziskave odziva pri patogenih in komenzalnih sevih *E. coli*.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali izražanje nekaterih ključnih genov odziva SOS, na ravni posameznih celic varira, pri laboratorijskih sevih *E. coli* in sevih izoliranih neposredno iz ljudi in živali. Poškodbe in prekinitvev potovanja replikacijskih vilic inducira izražanje genov odziva SOS. Inducira se izražanje genov vpletenih v popravljanje poškodb DNA. Poleg tega so inducirani tudi geni, ki uravnavajo sintezo mutagenih polimeraz, ključnih pri porajanju odpornosti proti antibiotikom in geni za sintezo represorjev, ki uravnavajo horizontalne prenose DNA, vključno z zapisi za determinante odpornosti in virulence. Znano je, da se ob odsotnosti poškodb DNA posamezni geni odziva SOS izražajo v polni meri le v delu bakterijske populacije. Delež populacije, ki izraža določen gen v odsotnosti poškodb DNA, smo določili z odstotki.

Odziv SOS bakterije *E. coli* je relativno dobro raziskan, vendar so bile vse dosedanje raziskave opravljene na laboratorijskih sevih vrste *E. coli*, ki pa se od komezalov in patogenih sevov razlikujejo. Slednji imajo pogosto daljše genome, večje število genov, ter po več plazmidov in bakteriofagnih genomov. Iz tega sledi, da se lahko razlikujejo tudi v številu genov, ki jih uravnava odziv SOS in posledično tudi v kinetiki indukcije odziva. Sevi z višjo osnovno ravno izražanja genov odziva SOS, bi lahko izkazovali višjo frekvenco mutacij in višjo toleranco proti antibiotikom.

Želeli smo preveriti ali ti elementi vplivajo na sprožitev odziva SOS in na raven izražanja genov odziva SOS. V ta namen smo najprej preverili naravne izolate ali imajo genetske zapise za sintezo virulentnih dejavnikov. V seve z različnimi virulentnimi dejavniki smo vnesli fuzije promotorja gena odziva SOS in poročevalskega gena *gfp* brez lastnega promotorja. Izražanje proučevanih fuzij smo analizirali s pomočjo fluorescentne mikroskopije.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Domnevamo, da raven izražanja genov odziva SOS pri sevih bakterije *E. coli* varira
- Na izražanje genov odziva SOS vpliva vsebnost plazmidov in bakteriofagnih genomov

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je enterobakterija, spada med γ -proteobakterije in sodi v družino *Enterobacteriaceae*. Za bakterije te družine je značilno, da so po Gramu negativni bacili, ki ne izdelujejo spor, so aerobni in fakultativno anaerobni organizmi, fermentirajo glukozo, reducirajo nitrate v nitrite, imajo katalazo in nimajo oksidaze.

Dolžina genoma *E. coli* je $4,64 \times 10^6$ bp in ima zapis za več kot 4000 proteinov. Glede pogojev rasti je nezahtevna. Divji tipi lahko rastejo v minimalnem gojišču, ki vsebuje glukozo kot vir ogljika in soli, ki so vir dušika, fosforja in redkih kovin (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Nevirulentni sevi *E. coli* so komenzali in so del normalne črevesne flore ljudi in živali. Pomembni so, ker sintetizirajo vitamin K in vitamine skupine B ter varujejo ekološko nišo pred patogeni. Virulentni sevi povzročajo okužbe prebavil in zunajčrevesne okužbe (okužbe sečil, meningitis, sepsa, vnetje slepiča in žolčnika, okužbe kirurških ran, rodil ter pljučnico). Večina virulentnih dejavnikov, od katerih se patogeni sevi razlikujejo od komenzalov, je kodiranih na mobilnih genetskih elementih (plazmidi, bakteriofagi, transpozoni). Geni z zapisi za virulentne dejavnike so pogosto na kromosomu otokih patogenosti (angl. pathogenicity islands – PAI) (Kaper, 1998).

Glede na mehanizem patogeneze okužb jih delimo v naslednje skupine (Andlovic., 2002):

- enterotoksigena *E. coli* (ETEC): izločajo temperaturno labilen (TL) enterotoksin, ki je po strukturi podoben kolera toksinu ter temperaturno stabilen (TS) enterotoksin
- enteroagregativna *E. coli* (EAaggEC): izločajo toksin podoben TS, značilno zanje je, da se vežejo v skupke
- enteropatogena *E. coli* (EPEC): zapis za glavne virulenčne dejavnike je na otoku patogenosti LEE (lokus izbrisa enterocitv)
- enterohemoragična *E. coli* (EHEC): izdelujejo Šigove toksine
- enteroinvazivna *E. coli* (EIEC): ne sintetizirajo toksinov, po biokemičnih lastnostih, mehanizmih širjenja in invazivnosti so najbolj podobni šigelam
- uropatogeni sevi *E. coli* (UPEC)

2.1.1 Uropatogeni sevi *E. coli*

Okužbe sečil so ena najpogostejših bakterijskih okužb in približno 90 % le teh povzročajo uropatogeni sevi *E. coli* (UPEC). Okužba urinarnega trakta pomeni razmnoževanje bakterij

v urinarnem sistemu, ki je pri zdravem organizmu navadno sterilen. Spremljajo jo boleče in pogosto uriniranje, v urinu je lahko prisotna kri, vendar lahko poteka tudi brez simptomov. Če je okužen samo mehur, imenujemo okužbo cistitis, če je okužba razširjena tudi na ledvice, imenujemo okužbo pielonefritis (Marrs in sod., 2005). Sevi UPEC imajo lahko več otokov patogenosti, ki imajo zapise za površinske virulentne faktorje, večinoma adhezine. Fimbrije tipa 1 posredujejo adherenco, invazivnost in rast v biofilmu. S fimbrijami P in S prepoznavajo površinske antigene epitela urinarnega trakta. Poleg adhezinov so na površini še drugi virulentni dejavniki, kot na primer kapsula, endotoksični LPS in proteini, ki sodelujejo pri izločanju drugih virulentnih dejavnikov (hemolizin, citonekrotični faktor, sistemi prevzemanja železa), ki so tudi del otokov patogenosti (Andlovic, 2002; Emödy in sod., 2003).

2.1.2 Enterohemoragična *E. coli*

EHEC sevi so patogeni organizmi povezani s hrano. Naseljujejo debelo črevo in povzročajo različne bolezni, kot je driska, hemoragični kolitis, lahko pa se pojavijo nevarni zapleti. To so hemolitični uremični sindrom (HUS) z ledvično odpovedjo in nevrološki zapleti. Ključna dejavnika patogeneze EHEC sta izločanje Šigovih toksinov (stx1 in stx2) (angl. Shiga-like toxin) oziroma verotoksinov (VT1 in VT2) ter sinteza intimina (Andlovic, 2002; Gu in sod., 2009). Šigovi toksini spadajo v skupino AB₅ toksinov. Podenota B je pomembna za pritrjevanje na Gb3 glikolipidne receptorje evkariotskih celic. Podenota A je toksin, ki deluje kot N-glikozidaza (cepi specifične ostanke adeninov pri 28S rRNA) in prepreči sintezo proteinov. Zapis za intimin (*eae*), je na otoku patogenosti LEE (lokus izbrisa enterocitov). Z njim se bakterija tesno pritrdi na epitelijske celice. Pomemben virulentni dejavnik sevov EHEC je tudi enterohemolizin. Do okužb prihaja preko okužene in premalo prekuhane hrane in tudi vode (Kaper, 1998; Rey in sod., 2006).

2.2 ODZIV SOS BAKTERIJE *E. coli*

Izraz odziv SOS je vpeljal Miroslav Radman (Radman, 1974). Predpostavil je, da gre za skupino genov oziroma za sistem, ki inducira popravilo DNA in s tem omogoča bakterijam, da preživijo nenadno povečanje števila poškodb DNA (Michel, 2005). Na ravni transkripcije uravnava izražanje več kot 43 genov. Večina genov odziva SOS kodira proteine, ki sodelujejo pri zaščiti, popravljanju, podvojevanju, mutagenezi in metabolizmu DNA. Za približno tretjino proteinov odvisnih od odziva SOS funkcije ne poznamo. Med njimi je kar nekaj takih, ki sprožijo dormantno stanje celic (Janion, 2008; Dörr in sod., 2009). Ključna proteina, ki uravnava odziv SOS sta protein LexA, ki deluje kot represor

transkripcije in s tem negativno uravnava odziv SOS in induktor RecA (pozitivni regulator odziva SOS) (Michel, 2005). Številni drugi proteini, ki jih tudi inducirajo poškodbe DNA, niso neposredno uravnani z RecA in LexA (Koch in Woodgate, 1998).

Odziv SOS so dokazali pri različnih bakterijskih vrstah (npr. *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*), vendar ne v celicah evkariontov. Celice organizmov, ki spadajo v različna kraljestva imajo proteine, ki so podobni proteinom odziva SOS *E. coli*, sodelujejo pri popravljanju poškodb in izkazujejo aminokislinsko homologijo ter encimatsko aktivnost podobno proteinom *E. coli*. Vendar ti proteini niso organizirani v sistem kot odziv SOS bakterije *E. coli* (Kelly, 2006; Janion, 2008).

2.2.1 Protein LexA

Med normalno rastjo je LexA kot homodimer vezan na operatorje (angl. SOS-box) v promotorskih regijah genov odziva SOS in tako preprečuje vezavo RNA polimeraze in izražanje genov. "SOS-box" so zaporedja 20 nukleotidov, nameščenih blizu ali v promotorski regiji genov odziva SOS. S poravnavo 20 LexA vezavnih zaporedij so določili konsenzno zaporedje 5'-TACTG(TA)₅CAGTA-3'. Večina genov ima samo eno vezavno zaporedje. Samo gen *lexA* in geni za kolicine imajo po dve vezavni zaporedji ter *recN*, ki ima 3. Vsa LexA vezavna zaporedja kažejo palindromsko strukturo in so si med seboj zelo podobna, razlikujejo se le v kakšnem nukleotidu. Te razlike vplivajo na jakost vezave LexA na posamezne promotorje. Stopnja uravnavanja genov odziva SOS je pri normalnih pogojih odvisna od nukleotidnega zaporedja in mesta vezavnega zaporedja promotorja, ki ga LexA prepozna, od števila vezavnih mest ter od moči promotorja.

Heterologni indeks (HI) je matematični izračun odstopanja določenega "SOS-box" od konsenznega zaporedja. Je merilo po katerem lahko določimo relativno moč vezave LexA. Če je vrednost HI nizka, tako zaporedje veže LexA močneje, kot če je vrednost visoka in je zaporedje bolj podobno konsenznemu (Walker, 1984; Schnarr in sod., 1991; Lewis in sod., 1994; Berg in von Hippel, 1998; Michel, 2005, Janion, 2008). Močno uravnani geni, kot so *sula* in *umuDC*, vežejo LexA najbolj učinkovito, manj močno uravnani geni, vežejo represor LexA šibkeje. Zaporedja z manjšo afiniteto do LexA, omogočajo prepisovanje, že ob majhnem številu poškodb, primera sta gena *uvr* in *lexA* (Schnarr in sod., 1991; McKenzie in sod., 2000).

2.2.2 Protein RecA

Protein RecA je prisoten pri skoraj vseh bakterijah in tudi pri drugih organizmih. Deluje kot senzor, saj prepozna in se veže na enoverižno DNA (ssDNA) in tudi na dvoverižne

konce DNA (dsDNA), vendar nekoliko težje. Nastali nukleoproteinski kompleks, ssDNA in filament RecA proteinov, ima dve funkciji. Lahko napade homologno zaporedje dsDNA in v procesu homologne rekombinacije povzroči izmenjavo verig ali s ko-proteazno aktivnostjo posreduje avto-katalitično cepitev LexA in s tem inducira odziv SOS. Aktivirani RecA* ima tako več nalog pri induciranih celicah. Prva je cepitev LexA, ki pripelje do derepresije genov SOS. RecA cepi CI represor bakteriofaga λ , kar povzroči prehod bakteriofaga iz lizogenega v litični cikel. Tretja naloga RecA je procesiranje proteina UmuD v aktivirani protein UmuD', kar je predpogoj za sestavljanje polimeraze V. Ko so napake popravljene in ko ni več aktiviranega RecA, se nenehno in na novo sintetizirani LexA, lahko veže na promotorje genov odziva SOS in jih zopet utiša (Walker, 1984; Michel, 2005; Janion, 2008).

Na tvorbo oziroma razstavljanje nukleoproteinskega filameta RecA-ssDNA vplivajo številni proteini (RecX, DinI, PsiB, RdgC, RecFOR, SSB, RecBCD, HU, UvrD). DinI stabilizira filament in na ta način poveča odziv SOS. Ker inhibira cepitev UmuD, povzroči tudi odložitev popravljanja z mutageno polimerazo in omogoči popravljanje natančnejši polimerazi. Da se protein RecA lahko veže v enoverižne vrzeli, morajo biti prisotni proteini RecFOR, medtem ko vezavo RecA na dvoverižne konce DNA, omogočajo proteina RecBC. Če teh proteinov ob določenih poškodbah DNA ni, se odziv SOS ne bo sprožil (Michel, 2005; Simmons, 2008).

2.2.3 Proteini UvrA, B, C, D

Uvr sistem je glavni mehanizem bakterije *E. coli*, ki izrezuje poškodovane nukleotide. UvrA se sintetizira konstitutivno v nizki ravni, vendar izražanje ob indukciji naraste za 10-krat. UvrA se kot dimer veže na UvrB v kompleks UvrAB. Ta kompleks prepozna poškodbe in se veže na pirimidinske dimere ali druge obsežnejše lezije v DNA. Nato se UvrA ob hidrolizi ATP odcepi, tako se na UvrB veže UvrC. Kompleks potrebuje ATP, da lahko cepi DNA na obeh straneh poškodbe v procesu izrezovanja nukleotidov – NER (angl. nucleotide excision repair). UvrD je helikaza in pomaga odviti DNA med zarezama ter omogoči sprostitev ssDNA med zarezama. Povprečna dolžina izrezanega fragmenta DNA je 12 nukleotidov. UvrA, B in D so pod uravnavo odziva SOS, medtem ko UvrC ni (van Hauten, 1990; Lewin, 2004).

2.2.4 Protein Sula

Kontrolne točke poškodb DNA in celične delitve so uravnane z odzivom SOS in sicer preko indukcije genov *umuDC* in *sula*. Namen kontrolne točke odvisne od Sula je

preprečiti delitev poškodovane DNA v hčerinske celice, zato ustavi celično delitev in s tem celici omogoči popolno popravilo poškodovane DNA. SulA prepreči celično delitev z vezavo na protein FtsZ. Protein FtsZ med celično delitvijo tvori obroč (angl. Z-ring) na sredini celice, kjer se tvori septum. Vezava SulA na FtsZ prepreči polimerizacijo FtsZ v obroč in tudi razpadnje obstoječega obroča. SulA tako povzroči nastajanje celičnih filamentov. Le ti pa so prvi fenotipski znak, ki so ga opazili pri celicah z induciranim odzivom SOS (D'Ari in Huisman, 1983; Robin in sod., 1990; Simmons, 2008; Adams in Errington, 2009).

2.2.5 Z SOS inducirane DNA polimeraze

Bakterija *E. coli* ima 5 različnih DNA polimeraz. DNA polimeraze I in DNA polimeraze III odziv SOS ne inducirata. Ostale spadajo v SOS inducirajoči regulon in lahko nadaljujejo podvojevanje preko lezij v komplementarni verigi, in tako celici omogočijo preživetje (Bridges in sod., 1985; Janion, 2001; Bjedov in sod., 2003).

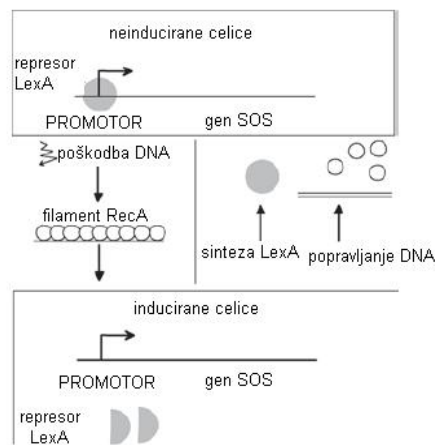
Polimeraza II, ki jo kodira *polB*, katalizira ponovno sintezo poškodovane DNA, potem ko je bilo ustavljeno podvojevanje v procesu brez napak (angl. error-free). Pol II ima eksonukleazno aktivnost (kontrolno branje DNA-polimeraze, angl. proofreading), ki je prisotna pri zelo natančnih polimerazah, vendar je ta polimeraza vseeno lahko mutagena. Gen *dinB* kodira DNA polimerazo IV. Ta polimeraza je pomembna pri adaptivni mutagenezi, povzroča tudi nespecifične premike bralnega okvirja (angl. frameshift mutacije) pri fagih in DNA plazmida F'. Polimeraza V je polimeraza, ki naredi največ napak (angl. error-prone) pri *E. coli*. UmuD tvori dimer, ki se pod vplivom RecA cepi. Sestavljeni homodimer UmuD₂ s proteinom UmuC tvori kompleks UmuD₂C, ki je aktivna polimeraza V. Okvara v *umuD* ali *umuC* zmanjša mutageni učinek povzročiteljev, vključno UV svetlobe. Vse te polimeraze sintetizirajo le kratek fragment, 6 do 8 nukleotidov, nato se sprostijo, da lahko pol III nadaljuje s podvojevanjem (Janion, 2001; Simmons in sod., 2008).

2.2.6 Geni odziva SOS in potek indukcije

Geni odziva SOS se ne inducirajo vsi enako hitro in tudi ne do enake stopnje. Odziv SOS je uravnan tako, da najprej omogoči natančno popravljanje, šele nato dovoli manj natančno popravljanje, ki celici omogoči preživetje. Prvi izraženi gen je *lexA* (v manj kot 1 minuti). Z zamikom se nato izražajo še geni, katerih produkti so vpleteni v visoko natančno popravljanje poškodb. To so geni *uvrA*, *uvrB* in *uvrD*. Nato se aktivirata gena *ruvA* in *ruvB*, katerih produkta sodelujeta pri rekombinacijskem popravljanju, ki ni podvrženo

napakam (angl. error-free) in geni (npr. *recA* in *ssb*), katerih produkti zaščitijo replikacijske vilice in mesto podvojevanja. Poleg teh se zgodaj izraža *dinI*, ki kodira inhibitorja pretvorbe UmuD v UmuD' in gen *polB* (*dinA*). Produkt gena *polB* je DNA polimeraza II, ki omogoča nadaljevanje sinteze DNA, kadar je podvojevanje ustavljeno. Med zadnjimi geni se izraža *sula* in geni za sintezo kolicinov (Walker, 1984; Janion 2001; Michel, 2005; Simmons in sod., 2008).

Če popravilo ni bilo uspešno, se po 40 minutah inducira mutagena DNA polimeraza Pol V, ki jo kodirata gena *umuC* in *umuD*. Za celico je zelo pomembno, da so geni odziva SOS pod močno uravnavo. Celici ne koristi, da je mutagena polimeraza, ki omogoči potovanje podvojevalnih vilic tudi na račun mutageneze, aktivna dlje kot je to potrebno (McKenzie in sod., 2000; Michel, 2005). Kronično indukcijo odziva SOS povzročajo mutacije genov, ki so vpleteni v popravljanje ali podvojevanje DNA (Janion, 2001).



Slika 1: Prikaz indukcije odziva SOS pri bakteriji *E. coli* (Michel, 2005)

2.2.7 Načini indukcije odziva SOS

Posledica različnih sprememb v okolju, stradanja in prehoda v stacionarno fazo so različna fiziološka stanja bakterij, ki lahko pripeljejo do napak v molekuli DNA. Napake ovirajo podvojevanje, zaradi česar nastajajo ssDNA odseki. Največ ssDNA nastane, ko celica poskuša podvojevati poškodovano DNA. Za indukcijo SOS niso dovolj samo lezije, temveč morajo biti prisotne aktivne replikacijske vilice, ki poskušajo podvojevati poškodovano DNA.

SOS inducirajo številne spojine, ki poškodujejo DNA, zavrejo sintezo DNA in celično delitev ter povzročijo kopičenje ssDNA. Take spojine so nekateri antibiotiki iz skupine rifamicinov (rifampicin) in kinoloni (nalidiksična kislina, ciprofloksacin), ki ovirajo delovanje DNA topoizomeraze (giraza in topiziomeraza IV) z reverzibilno vezavo na

proteinski kompleks giraze pri čemer nastajajo zlomi in razpoke v dsDNA. Rifampicin inhibira bakterijsko RNA polimerazo (Cirz in sod., 2005). Na sprožitev odziva SOS vplivajo tudi organska topila, vodikov peroksid, mitomicin C in še številne druge. Tudi β -laktamski antibiotiki in antibiotiki, ki delujejo na penicilin vezoči protein inducirajo odziv SOS (Jerman in sod., 2005; Simmons in sod., 2008). β -laktami inducirajo odziv SOS preko dvokomponentnega sistema DpiBA, s katerim prekinejo podvojevanje DNA (Miller in so., 2004). Endogeni dejavniki, ki sprožijo odziv SOS, so veliko slabše raziskani (Kelly, 2006). Med fizikalne dejavnike, ki sprožijo odziv SOS je tlak. Visoki tlak ima sicer majhen vpliv na mikrobne niše, včasih pa lahko vpliva na preživetje bakterij. Povečan tlak je v globljih morjih, uporablja pa se tudi pri pripravljanju hrane. Aertsen in sod. (2004) so dokazali, da visok hidrostatski tlak inducira odziv SOS ter profage λ . Tudi nepravilno uravnavanje intracelularnega pH in že večkrat omenjeno UV sevanje sprožita odziv SOS (Simmons in sod., 2008).

2.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN ODZIV SOS

Mobilni genetski elementi (fagi, plazmidi, otoki patogenosti) kodirajo virulentne dejavnike pri številnih patogenih bakterijah. Nekatere mobilne elemente uravnava odziv na poškodovano DNA. Primer je pri sevih EPEC lokus izbrisa enterocitov, ki ga uravnava odziv SOS in pri sevih EHEC Šigovi toksini. Pri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) so Maiques in sod. (2005) dokazali, da β -laktamski antibiotiki inducirajo odziv SOS in ob tem sprožajo indukcijo stafilokoknih profagov. Posledica indukcije profagov, ki jo povzročajo fluorokinoloni (Ubeda in sod., 2005) in β -laktami, je podvojevanje in visoka frekvenca prenosa stafilokoknega otoka patogenosti (SaPI) (Kelly, 2006; Simmons in sod., 2008).

2.3.1 Kolicini in odziv SOS

2.3.1.1 Kolicini

Kolicini in mikrocinini so primarni obrambni mehanizem *E.coli* (Gillor in sod., 2004). So toksični bakterijski eksoproteini z relativno ozkim spektrom delovanja, ki delujejo proti *E. coli* in nekateri tudi proti sorodnim bakterijam (*Salmonella* in *Shigella*). Sevi, ki sintetizirajo kolicine, se v naravnem okolju pojavljajo z visoko prevalenco. Več kot polovica naravnih izolatov sintetizira kolicine. To kaže na pomembnost kolicinov za bakterije, verjetno pri obrambi ekološke niše ter uravnavanju mikrobne diverzitete. Kolicini so pomembni tudi za ohranjanje plazmidov, na katerih so poleg zapisov za kolicin, tudi virulentni dejavniki, ki pripomorejo k preživetju bakterije. Kodirani so na

manjših plazmidih (5kb), ki so v celicah v večjem številu kopij ali na večjih konjugativnih plazmidih (50kb), ki se pojavljajo v manjšem številu kopij (Braun in sod., 1994; Šmarda in Šmajs, 1998; Braun in sod., 2002; Kelly, 2006).

2.3.1.2 Struktura

Kolicini so enostavni polipeptidi z molekulsko maso od 25 do 80 kDa. Sestavljeni so iz treh funkcionalnih domen. N-terminalna regija (domena T) je pomembna pri prenosu v celico, osrednja regija se veže s specifičnimi receptorji zunanje membrane, na C-terminalnem (domena C) delu je aktivni center. Aktivni center kolicina je tudi vezavno mesto za protein imunosti, ki s prekritjem le tega povzroči inaktivacijo kolicina. Zapisi za sintezo kolicinov se nahajajo na Col plazmidih. Navadno je najprej zapis za kolicin (*cka* pri ColK), kateremu sledi gen za imunost (*imm*), zadnji je zapis za litični protein (*kil*), ki omogoči sproščanje kolicina iz celice (Braun in sod., 1994; Šmarda in Šmajs, 1998; Braun in sod., 2002).

2.3.1.3 Sproščanje kolicinov

Izločanje kolicinov je samomorilsko dejanje bakterij. Na manjših plazmidih kodirani kolicini, se sproščajo s pomočjo proteina lize, ki se nahaja v citoplazemski ter zunanji membrani. Po delovanju proteinov lize, sta obe membrani propustni za kolicine. Ob tem se izločajo tudi nekateri periplazmatski proteini. Skupaj s proteinom lize se aktivira tudi fosfolipaza A v zunanji membrani. Nasprotno večji plazmidi ne kodirajo proteina lize. Mehanizem sproščanja teh kolicinov ni najboljše poznan (Braun in sod., 1994).

2.3.1.4 Mehanizem delovanja kolicinov

V grobem lahko delimo delovanje kolicinov na tri korake. Najprej kolicin prepozna specifične receptorje na površini občutljive celice in se nanj veže. Nato se prenese preko membrane v citoplazmo in nazadnje letalno deluje na tarčo (Šmarda in Šmajs, 1998).

2.3.1.4.1 Prepoznavanje površinskega receptorja in vnos kolicina

Kolicini se vežejo na specifične receptorske proteine zunanje membrane občutljivih celic, nato delujejo na proteine periplazmatskega prostora, da dosežejo tarčo. Med kolicini skupine A so najbolj preučeni kolicini E, ki se vežejo na protein zunanje membrane BtuB z visoko afiniteto do vezave vitamina B₁₂. Na receptor se vežejo z osrednjim delom (domeno R) (Lazzaroni in sod., 2002). Ostali receptorji, ki jih prepoznavajo kolicini, so FepA

(kolicina B, D), Cir (kolicina Ia in Ib), FhuA (kolicin M), OmpF (kolicini A, N, U in S4) ter Tsx (K, 5 in 10) (Braun in sod., 1994; Gillor in sod., 2004).

Prenos preko zunanje membrane poteka preko dveh različnih poti. Glede na mehanizem vnosa delimo kolicine v dve skupini. Vnos kolicinov iz skupine A poteka s sistemom Tol (TolA, TolB, TolQ, TolR in Pal). Vnos kolicinov iz skupine B je odvisen od celične energije in poteka s pomočjo sistema Ton (proteini TonB, ExbB in ExbD), katerega fiziološka funkcija je prevzem Fe^{3+} in vitamina B₁₂. Kompleks proteinov Ton deluje tako, da se vsakokrat, ko se kanalček odpre, prenese energija iz citoplazemske na zunanjo membrano. Kolicini skupine B imajo na N-terminalnem delu kratko zaporedje TonB box, ki prepozna TonB (Braun in sod., 2002; Lazzaroni in sod., 2002).

2.3.1.4.2 Letalno delovanje kolicina

V Preglednici 1 so razdeljeni kolicini glede na njihov letalen učinek na celico. Primer kolicinov, ki tvorijo pore je kolicin K. Pore, ki jih tvorijo v membranah občutljivih celic, povzročajo izgubo membranskega potenciala in posledično lizo celice.

Kolicini E2, E7, E8 in E9 razgrajujejo molekulo DNA. Kolicin E3 cepi enojne fosfodiesterne vezi v 16S ribosomalni RNA in na ta način inhibira prevajanje. Za kolicin E9 domnevajo, da nespecifično razgrajuje kromosomsko DNA (Braun in sod., 1994).

Preglednica 1: Kolicini, glede na delovanje (Braun in sod., 1994; Gillor in sod., 2004)

Kolicini, ki tvorijo pore	A, B, E1, Ia, Ib, K, N, U, S4, 5, 10
Kolicini, ki delujejo kot endonukleaze	
-DNAze	E2, E7, E8, E9
-RNAze	E3, E4, E5, E6, kloacin DF13
Kolicini, ki inhibirajo proteinsko sintezo	D, E5
Kolicin, ki inhibira sintezo mureina	M

2.3.1.5 Zaščita pred kolicini

Vse celice, ki sintetizirajo kolicin, sintetizirajo tudi protein imunosti, ki ščiti celice samo pred svojim lastnim kolicinom ali enakim kolicinom druge celice. Protein imunosti se v citoplazmi veže na kolicin. Ta kompleks se potem izloči v okolje. Proteini imunosti kolicinov, ki so aktivni v citoplazemski membrani, se nahajajo v citoplazemski membrani, kolicini pa se izločajo brez vezanega proteina imunosti (Braun in sod., 1994). Ni nujno, da so sevi brez zapisa za kolicin, občutljivi za kolicin. Bakterije so odporne na kolicine zaradi odsotnosti ali zaradi sprememb receptorjev zunanje membrane ali mehanizmov vnosa kolicina v celico. Lahko pa ima celica funkcionalen receptor, kot tudi translokacijski

sistem. Ker sintetizira protein imunosti, ki se veže na kolicin, je odporna (Šmarda in Šmajš, 1998; Gillor in sod., 2004)

Gen *imm* se pri kolicinih, ki tvorijo pore, konstitutivno prepisuje nasprotno od strukturnega gena za kolicin. Gen *kil* ima lasten šibek promotor, ki je neodvisen od odziva SOS. Pri nukleaznih kolicinih je gen *imm* del transkripcijske enote in je orientiran v smeri transkripcije genov za aktivnost in gena *kil*. Po transkripciji se protein imunosti takoj veže na kolicin in ga na ta način nevtralizira (Šmarda in Šmajš, 1998).

2.3.1.6 Uravnavanje izražanja kolicinskih genov

Sintezo kolicinov uravnavajo številni mehanizmi. Izražanje vseh kolicinov uravnava odziv SOS, ki se sproži ob poškodbah DNA. Pod normalnimi pogoji je sinteza utišana v večini celic. Geni, ki imajo zapis za kolicine, se izražajo le v majhnem delu populacije, kar je lahko rezultat spontane indukcije odziva. Ob indukciji odziva SOS se kolicini izražajo med zadnjimi izraženimi geni, ki jih uravnava odziv SOS. Na izražanje kolicinov vpliva LexA, ki učinkovito reprimira njihovo izražanje in s tem prepreči prekomerno lizo celic, ki jo povzročajo kolicini ob sproščanju (Šmarda in Šmajš, 1998; Janion, 2001).

Tudi izpostavitve *E. coli* kolicinu E2 in E9 (Kelly, 2006), zaradi njune endonukleazne aktivnosti, izzove odzivi SOS. Le del bakterijske kulture, ki ima zapis za kolicin, kolicin tudi izloča. Kolicin E2 vstopi v druge celice v kulturi, ki ga ne izdelujejo in pri njih povzroči dovolj poškodb DNA, da izzove odziv SOS. Količina proteina imunosti pri celicah, ki izločajo kolicin E2, je dovolj velika, da prepreči letalni učinek kolicina, vendar premajhna, da bi preprečila endonukleazno aktivnost. Tako DNazna aktivnost kolicina E2 stimulira lastno produkcijo (Pugsley, 1983).

Na osnovi fluorescence so Mulec in sod. (2003) opazili izražanje fuzije *cka-gfp* šele v pozni eksponentni fazi (približno 1 % bakterijske populacije). V stacionarni fazi je fluoresciralo približno 3 % celic. Ugotovili so, da je LexA odločilni regulator izražanja kolicinov na ravni prepisovanja pri večini bakterijskih celic. Ne izključujejo možnosti, da bi lahko kak drug regulatorni protein odmaknil LexA iz vezavnega zaporedja *cka* gena ali po alternativni poti aktiviral prepisovanje brez odmaknitve proteina LexA.

2.3.2 Bakteriofagi

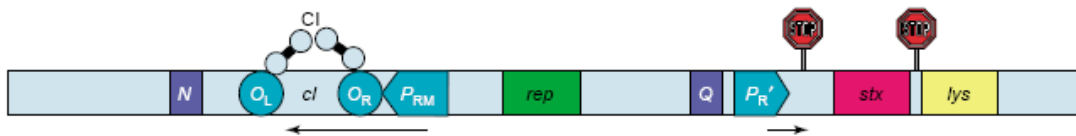
2.3.2.1 Virulentni in temperirani bakteriofagi

Pri številnih bakterijah se zapisi za virulentne dejavnike nahajajo v bakteriofagnih genomih. Bakteriofagi so tako pomembni vektorji širjenja genov za virulentne dejavnike. Virulentni bakteriofagi so sposobni samo litične poti okužbe bakterijskih celic. Taki

bakteriofagi se vežejo na specifične receptorje bakterijske membrane, vnesejo svoj genom v celico, kjer preusmerijo celični metabolizem v sintezo lastnih komponent. Sintetizirajo se bakteriofagni proteini, ki obdajo bakteriofagno DNA. Nato se sproščajo z lizo bakterijske celice. Temperirani bakteriofagi lahko vključijo svojo DNA v bakterijski kromosom z mestno specifično rekombinacijo v specifična vezavna mesta *att* in se skupaj z njim podvajajo. To latentno obliko bakteriofaga imenujemo profag. Občasno se profag inducira, takrat se izreže iz bakterijskega kromosoma in preide v litični cikel. Ta prehod uravnava represor C_I (Lewin, 2004). Represija ni nikoli popolna, saj je vedno prisotnih nekaj induciranih lizogenov (spontana indukcija). Izražanje genov, ki jih kodira profag, lahko spremeni fenotip bakterije. Sevi EHEC imajo v otoku patogenosti LEE zapis za sistem izločanja tipa III, ki prenesejo proteine (del patogenosti) direktno v citoplazmo evkariontskih celic. Zapise za nekatere efektorne proteine so našli zunaj LEE v profagih (Kaper in sod., 1998; Waldor in Friedman, 2005).

2.3.2.2 Uravnava indukcije lambdoidnih bakteriofagov

Fagi iz družine λ kodirajo Šigove toksin in so prisotni pri patogenih sevih *E. coli*. Filamentozni bakteriofag CTX Φ , ki ga najdemo pri *Vibrio cholerae*, ima zapise za kolera toksin (CTX). Oba faga imata represorski sistem, ki vzdržuje profage v mirujočem stanju in pri obeh sprožitih odziva SOS povzroči derepresijo in indukcijo bakteriofagov.



Slika 2: Zgodnja regulatorna regija lambdoidnega faga (Waldor in Friedman, 2005)

Fagi družine λ imajo značilno ureditev genoma in regulatorno shemo (slika 2). Represor C_I preprečuje začetek regulatorne kaskade z vezavo na operatorja O_L in O_R . Vezava represorja na O_R prepreči uporabo P_R (*cro* in zgodnji geni desno od operatorja se ne izražajo), zato pa je aktiven promotor P_{RM} . Prepisovanje navzdol (levo) od promotorja P_{RM} narekuje sintezo represorja (*cI*). Represor je pozitiven regulator gena *cI*. Prepisovanje od promotorja P_R' se ob odsotnosti Q (anti-terminator) konča takoj ob terminatorju. Zaradi indukcije odziva SOS, naraste koncentracija RecA, ki aktiviran cepi represor C_I . Ko je profag induciran, se začne prepisovanje zgodnjih genov od mesta P_L in P_R , vendar se kmalu ustavi. Zgodnje prepisovanje dovoli izražanje anti-terminatorja N, ki deluje na NUT mesta v RNA in preoblikuje RNA polimerazo tako, da lahko prepisuje preko transkripcijskih terminatorje in gena *cro*. Sintetizira se anti-terminator Q. N omogoči prepisovanje zapoznelih genov (geni za podvojevanje, geni za rekombinacijo, geni za vgrajevanje bakteriofagne DNA v

bakterijski kromosom, regulatorji Q, C_{II} in C_{III}). Q je antiterminator in omogoči RNA polimerazi prepisovanje poznih genov (*stx*, *lys* in geni, katerih produkte potrebuje bakteriofag za svoje sestavljanje). Cro prepreči sintezo *cI*, v primeru nadaljevanja litičnega poteka ter izklopi izražanje zgodnjih genov.

Pri lambdoidnih bakteriofagih, represor, ki ga kodira bakteriofag, uravnava mirujoče fage in tudi sintezo Šigovega toksina. Šigov toksin se sprošča z lizo, ki jo povzročajo bakteriofagi. Represija profagov ni nikoli popolna. Indukcija odziva SOS povzroči znatno večjo indukcijo profagov. V primeru CTX profaga je nekoliko drugače. Izražanje *ctx* je v večji meri uravnano z dejavniki, ki so neodvisni od CTX profaga in so kodirani na kromosomu *V. cholerae* (Lewin, 2004; Waldor in Friedman, 2005).

2.4 NA ANTIBIOTIK TOLERANTNE BAKTERIJE IN ODZIV SOS

2.4.1 Na antibiotik tolerantne bakterije

Pojav na antibiotik tolerantnih bakterij (angl. persisters) je prvi opazoval Bigger leta 1944. Kulturo *S. aureus* je izpostavil visokim koncentracijam penicilina, vendar je majhen delež populacije preživel in po odstranitvi antibiotika ponovno zrasel.

Tolerantne bakterije so celice, ki v prisotnosti antibiotika ne rastejo, niti ne umrejo (Keren in sod., 2004). So celice, ki so tolerantne na več protimikrobnih sredstev in so prisotne pri vseh preučevanih bakterijskih populacijah (Shah in sod., 2006). Toleranca (angl. persistence) je fenotipska sposobnost le dela populacije. Je prehodna in nasprotno od odpornosti, ni dedna (Dörr in sod., 2009).

2.4.2 Gensko ozadje na antibiotik tolerantnih bakterij

Pri proučevanju tolerantnih bakterij je bil največji problem majhno število celic. Moyed in sod. (1983) so izolirali visoko tolerantno (*hip*) mutanto *E. coli*, s čimer so lahko izolirali dovolj veliko število celic za poskuse. Domnevajo, da na stopnjo tolerantnih bakterij vplivajo mutacije v *hipBA* lokusu. Mutante *hipA7* kažejo povečano toleranco na antibiotike, ki delujejo na celično steno (Ap), odziv na toplotni šok ali poškodujejo DNA. Poleg tega so odkrili tudi povečano toleranco na aminoglikozide in fluorokinolone. Locus *hipBA* imajo zapis za sistem toksin-antitoksin. HipB je transkripcijski regulator operona, kar je značilno za antitoksin. Toksin tvori neaktiven kompleks z antitoksinom, medtem ko nevezan inhibira pomembno celično funkcijo. Toksin z vezavo na tarčo, le to inhibira in posledično povzroči toleranco na antibiotike. Antibiotik se še vedno lahko veže, vendar ne

more več ovirati delovanja tarče. Drugi iz skupine sistemov toksin-antitoksin je sistem RelBE. RelE inhibira prevajanje, s čemer povzroči izklapljanje drugih pomembnih celičnih funkcij, kot je podvojevanje DNA ali sintezo celične stene, ki sta pomembni tarči antibiotikov, kar tudi vodi do tolerance (Keren in sod., 2004; Jayaraman, 2008).

Keren in sod. (2004) so odkrili skupino približno 300 genov, ki so se pri tolerantnih bakterijah povečano izražali. Med temi so bili geni odziva SOS (*recA*, *sulA*, *uvrBA*, *umuDC*), geni operona "phage-shock" (*psp*) in geni odziva na spremembo temperature ("heat shock" in "cold shock"). Močneje so se izražali tudi geni proteinov, ki lahko blokirajo pomembne celične funkcije (sistemi toksin-antitoksin, inhibitorji prevajanja, inhibitorji podvojevanja (Jayaraman, 2008). Keren in sod. (2004) so določili tudi gene, ki so se postopno izklapljali in so značilni za celice, ki ne rastejo. To je okrog 600 genov, ki so vpleteni v metabolizem, sintezo bičkov in geni operona oksidativne fosforilacije. Shah in sod. (2006) so na podlagi izražanja genov ugotovili, da se tolerantne bakterije zelo razlikujejo od celic v eksponentialni in tudi v stacionarni fazi rasti.

2.4.3 Na antibiotik tolerantne bakterije in odziv SOS

Tolerantne bakterije so odvisne od faze rasti. Njihovo število se povečuje z gostoto kulture. Največ so jih določili v stacionarni fazi rasti in v biofilmih *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* in *S. aureus* (Keren in sod., 2004). Odgovorni so za toleranco biofilmov na protimikrobna sredstva. Ob tem je pomembno poudariti, da niti tolerantne bakterije niti biofilmi niso odporni proti antibiotiku in prav tako nimajo povečane minimalne inhibitorne koncentracije (Keren in sod., 2003).

Balaban in sod. (2004) so določili dva tipa na antibiotik tolerantnih bakterij pri *E. coli*. Tolerantne bakterije Tipa I nastanejo v stacionarni fazi rasti in jih s precepljanjem kulture prenašamo, medtem ko tolerantne bakterije Tipa II nastanejo med rastjo. Oba tipa sta v kulturi prisotna pred izpostavitvijo antibiotiku (Jayaraman, 2008).

Debbia in sod. (2001) so dokazali, da je število preživelih celic po tretiranju z različnimi antibiotiki odvisno od delujočega odziva SOS, saj so celice z okvarjenimi geni *lexA* in *recA* po tretiranju povsem propadle. Dörr in sod. (2009) so dokazali, da je nastanek persisterjev v prisotnosti ciprofloksacina posledica delujočega odziva SOS. Domnevajo, da je toleranca na antibiotik inducirana in ni posledica predhodnega stanja, vendar ne izključujejo možnosti, da je toleranca na Cip posledica predhodne spontane indukcije odziva SOS, zaradi česar bi lahko celice postale tolerantne, še preden so prišle v stik z antibiotikom. Mehanizmi tolerance na β -laktame so drugačni, saj delujoči odziv SOS za nastanek tolerantnih bakterij ni pogoj. Domnevajo da lahko gre za naključen preklop v fazi

rasti. Dörr in sod. (2009) so odkrili tudi z SOS inducirani sistem toksin-antitoksin *tisAB*, ki je vpleten pri nastanku tolerantnih bakterij.

2.5 ODZIV SOS IN ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM

2.5.1 Razvoj odpornosti

Na stradanje in okoljski stres se bakterije odzovejo s prehodnimi hipermutacijami genoma (angl. adaptive mutation), ki ustvari genetsko variabilnost (McKenzie in sod., 2000). Pri podvojevanju tako velikih genomov se bakterije, tudi z zelo natančnimi polimerazami, ne morejo izogniti mutacijam. Bakterije pa lahko tudi aktivno sodelujejo pri mutacijah lastnih genomov z induciranjem proteinov, ki posredujejo mutacije. Cirz in sod. (2005) so dokazali, da je za razvoj rezistence (*in vivo*) nujen inducirani odziv SOS in cepitev proteina LexA. V ta namen so uporabili že večkrat omenjena antibiotika ciprofloksacin in rifampicin. Odpornost proti ciprofloksacinu je posledica mutacij v genih, ki kodirajo topoizomeraze ali v genih, katerih produkti vplivajo na permeabilnost membran ali na iznos protimikrobnih snovi. Pri bakterijskih celicah z mutiranim proteinom LexA, ki se ne more cepiti, v poskusu *in vivo* niso opazili nobene odporne bakterije, medtem ko so jih pri divjem tipu po 72 urah izolirali približno 3 %. Ugotovili so tudi, da bi se klinično pomembne mutacije pri *E.coli*, v odsotnosti delujočega LexA, sposobnega cepitve, dogajale do 10⁶-krat počasneje, saj take mutacije potrebujejo 3 do 5 neodvisnih mutacij. Poleg tega so za razvoj rezistence pomembne vse tri z LexA uravnane polimeraze. Če bi manjkala samo ena od polimeraz, bi bil rezultat isti, kot če bi preprečili cepitev LexA. Michel (2005) meni, da bi hiter razvoj bakterijskih rezistenc preprečili z blokiranje odziva SOS.

2.5.2 Širjenje rezistenc

Na enak način, kot širjenje virulentnih dejavnikov z mobilnimi genetskimi elementi, poteka na enak način tudi širjenje zapisov za odpornost. Zapisi za odpornost proti antibiotikom se lahko širijo s konjugativnimi plazmidi in konjugativnimi transpozoni ICE (angl. integrative conjugative elements). Plazmidi in ICE imajo hkrati zapise za rezistence proti različnim antibiotikom. SXT je ICE, ki ima zapise za odpornost proti kloramfenikolu, sulfometoksazolu, trimetoprimu in streptomycinu. Gene SXT, ki so vpleteni v prenos, represirira SetR. Ker je represor SetR podoben represorju CI bakteriofaga λ , domnevajo da indukcija odziva SOS, sproži prenos SXT. Prenos ICE in aktivnost integreze sproži koproteaza, aktiviran RecA (RecA*), ob indukciji odziva SOS (Beaber in sod., 2004;

Hasting in sod., 2004). Úbeda in sod. (2005) so kulturo *S. aureus* izpostavili mitomicinu C in ciprofloksacinu. S tem niso inducirali samo profagov, ampak so zaznali tudi mobilizacijo in visoko frekvenco horizontalnega prenosa otoka patogenosti (SaPI), ki prav tako posredujejo zapise za rezistence. Kromosomski in mobilni integri (ti se nahajajo znotraj transpozonov), imajo genske kasete z zapisi za odpornost proti širokemu spektru antibiotikov. Integri so genetski elementi, ki izražajo gene, ki nimajo lastnih promotorjev. Integri (*intI*) integronov sodelujejo pri premikanju, naključnem izrezovanju in prerazporeditvah genskih kaset. Pri *E. coli* in *V. cholerae* indukcija odziva SOS poveča izražanje integrov. Geni, ki posredujejo odpornost proti antibiotikom, so lahko utišani, dokler niso inducirani z okoljskim stresom in se s pomočjo integronov vzdržujejo v bakterijskih populacijah (Guerin in sod., 2009).

2.6 MERJENJE ODZIVA SOS

V zadnjih nekaj desetletjih se je več laboratorijev ukvarjalo s funkcijami in delovanjem genov odziva SOS. Dokler niso postale dostopne tehnike fluorescentne mikroskopije, s katero so lahko spremljali izražanje genov na ravni posameznih celic, so indukcijo spremljali na ravni populacije (Michel, 2005). Kenyon in sod. (1980) so za preverjanje izražanja genov *din* (angl. damage-inducible) uporabljali poročevalsko fuzijo domnevnega gena *din* z genom *lacZ* brez lastnega promotorja. Glede na barvo kolonij, so lahko določili tiste, ki so vsebovale fuzije in jih s pomočjo tekočih gojišč še natančneje določili. Vendar v takem poskusu dobimo le neko povprečje, kjer ne vemo ali je aktivnost promotorja pri vsaki celici enaka ali se nek gen pri deležu populacije drugače izraža. Ronen in sod. (2002) so kot poročevalski sistem uporabili plazmide v nizkem številu kopij, ki imajo fuzije promotorjev genov odziva SOS in *gfp*, ki nima lastnega promotorja. Gen *gfp* kodira zeleni fluorescirajoči protein, GFP. Ker proučevani promotor uravnava tudi izražanje poročevalskega gena, je količina nastalega produkta proporcionalna GFP. S pomočjo poročevalskega sistema z fuzijo *gfp* so lahko s fluorescentno mikroskopijo določali aktivnost posameznih promotorjev v posamezni celici in tudi trajanje indukcije in lokacije posameznih proteinov. Ronen in sod. (2002) so za določevanje trajanja in amplitude indukcije v bakterijski kulturi uporabili mikromreže (Janion, 2008; Simmons, 2008).

Fernandez de Henestrosa in sod. (2000) so analizirali prepoznavna mesta na DNA, na katera se vežejo proteini, vključno z LexA. Pri delu so upoštevali matematični prestop, ki sta ga vpeljala Berg in von Hippel. Testirali so inducibilnost gena navzdol od potencialnih vezavnih mest LexA. Na ta način so določili 7 novih genov, ki spadajo v LexA regulon.

2.6.1 Poročevalski sistem GFP in proučevanje genov SOS z GFP

GFP protein je naravno fluorescirajoči, zelo stabilen, 27 kD velik protein meduze *Aequorea victoria*. Če je GFP osvetljen z modro svetlobo, producira zelo močno fluorescenco brez dodanega substrata. Uporabljajo se lahko običajni fluorescentni filtri in 488 nm Ar ionski žarek. Cormack in sod. (1996) so pripravili mutirani GFP, ki fluorescira 100-krat bolj intenzivno in je zato primeren za ugotavljanje izražanja genov z nizko ravni izražanja, tudi s prostim očesom. Suarez in sod. (1997) so izboljšali občutljivost poročevalskega sistema tako, da so 3'- konec poročevalskega gena zamenjali s spremenjenim *gfp* genom, katerega produkt 45-krat močnejše fluorescira od naravnega proteina.

Poročevalski sistem je lahko na plazmidu (v več kopijah) ali na transpozonih (samo ena kopija) (Cormack in sod, 1996). Ronen in sod. (2002) so razvili sistem, s katerim so sledili transkripcijske aktivnosti operonov s pomočjo plazmidov. Gen *gfp* je v ekspresijski vektor kloniran v pravilni orientaciji in njegovo izražanje uravnava proučevani promotor. Tako so lahko sledili izražanju različnih promotorjev z istim poročevalskim genom. Količino nastalega produkta so tako lahko določili glede na količino akumuliranega GFP. Z uporabo poročevalskega sistema z GFP lahko merimo izražanje genov v živih celicah (Cormack in sod, 1996).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Laboratorijski sevi *E. coli*

Uporabljeni laboratorijski sevi izvirajo iz zbirke sevov katedre za Molekularno genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete.

Preglednica 2: Uporabljeni laboratorijski sevi *E. coli*

Sev <i>E. coli</i>	genotip	vir
S17 λ pir	Tp ^f Sm ^r <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> M ⁺ RP4::2-Tc::mu::Km Tn7, λ pir	De Lorenzo in sod., 1993
RW118	<i>thr-1 araD139</i> Δ (<i>gpt-proA</i>) 62 <i>lac Y1 ts-33 supE44</i> <i>galK2 hisG4 rpsL31 xyl-5 mtl-1 argE thi-1 sulA211</i>	Woodgate, National Institutes of Health, Bethesda, ZDA, 1999
RW464	RW118 <i>recA</i> ⁻	Woodgate, National Institutes of Health, Bethesda, ZDA, 1999

3.1.1.2 Klinični izolati uroseptičnih sevov *E. coli*

Klinične izolate uroseptičnih sevov *E. coli* (zbirke sevov H, SH, CH in CSH) so izolirali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Izolirane uropatogene seve so identificirali s hemokulturo in metodo po Sanfordu (kvantitativna urinokultura za dokazovanje bakterij). Zbirka vsebuje 105 uropatogenih sevov, v okviru diplome smo uporabili le 10 sevov iz te zbirke, ki spadajo v različne filogenetske skupine. Oznaka H pomeni, da je bil sev identificiran s hemokulturo, HS pomeni, da je bil identificiran z metodo po Sanfordu in s hemokulturo. Sevi označeni s CH so bili izolirani iz otrok in identificirani s hemokulturo, CHS so bili izolirani iz otrok in identificirani z metodo po Sanfordu.

3.1.1.3 Naravna izolata sevov EHEC

Dva seva E01/121 in 1938/96, sta seva, ki pripadata skupini enterohemoragične *E. coli*. Ta seva sta atipična EHEC seva, ker nimata zapisa za Šigov toksin, v ostalih lastnostih pa se ne ločita od pravih EHEC sevov. Sta dar M. Bielaszewske.

3.1.2 Plazmidi

V nalogi smo uporabljali kolicinogene plazmide, prikazane v Preglednici 3, ki izvirajo iz Pugsleyeve zbirke sevov (A. Pugsley, Institute of Pasteur, Pariz, Francija).

Preglednica 3: Kolicinogeni plazmidi

plazmid	genotip	vir
pColA-CA31	plazmid s kolicinom A	Pugsley in sod., 1983
pColN-284	plazmid s kolicinom N	Pugsley in sod., 1983
pColE1-K53	plazmid s kolicinom E1	Pugsley in sod., 1983
pColE2-P9	plazmid s kolicinom E2	Pugsley in sod., 1983
pColE3-CA38	plazmid s kolicinom E3	Pugsley in sod., 1983

V nalogi smo uporabljali plazmide, v majhnem številu kopij, z genskimi fuzijami promotorske regije genov odziva SOS oziroma kolicinov z *gfp* (Cormack in sod, 1996). Ti plazmidi so prikazani v Preglednici 4. Plazmidi pSC200, pSC201 in pSC202-so bili pridobljeni iz raziskave Ronen in sod. (2002), kjer so jih uporabljali za drugačne namene. Plazmida pSC300 in pSC303 ter plazmid pKCT4 so bili pripravljene na Katedri za molekularno genetiko in mikrobiologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani in so jih že uporabili pri podobni raziskavi. Za določevanje aktivnosti promotorjev genov odziva SOS in kolicinov na plazmidih smo s transformacijo v proučevane seve vnesli plazmide pSC200, pSC201, pSC202, pSC300 in pSC303.

pSC101 je plazmid v majhnem številu kopij na celico in ga uporabljajo kot vektorski plazmid za kloniranje (Cohen in sod., 1977). Ima kaseto za rezistenco proti kanamicinu in poliklonsko mesto vzdolž katerega je vstavljen *gfp*.

Plazmid pAG408 v sevu S17 λ pir (de Lorenzo in sod., 1993) je samomorilski plazmid z mini transpozonom (angl. suicide mini-transposon delivery plasmid), ki se ga uporablja za študije genov kodiranih na kromosomu. Ima insercijsko sekvenco, ki omogoča prenos zapisov in ne more preživeti v gostitelju, ker nima zapisa za protein Pir. Sev S17 λ pir omogoča podvajanje plazmida, saj ima protein Pir. Z njim lahko vstavimo transkripcijske fuzije *gfp* v naključno mesto na kromosomu (Suarez in sod., 1996). Plazmida pAG409 in pAG410 sta bila predhodno pripravljena na Katedri za molekularno genetiko in mikrobiologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (Kamenšek, 2008). Plazmid pAG408 so cepili v poliklonskem mestu, ki se nahaja na začetku insercijske sekvence, z encimoma *Sma*I in *Cla*I in vstavili promotorske regije

genov za proteine LexA, RecA in UmuD (cepljene z istimi encimi) pred poročevalskim genom *gfp*. Te plazmide smo uporabili z namenom, da bi preučili izražanje genov *lexA*, *recA* in *umuD* na kromosomu.

Preglednica 4: Plazmidi z zapisom za kolicine in plazmidi z *gfp* fuzijami

plazmid	genotip	vir
pColK-JA533	<i>cka cki ckl</i>	Kuhar in Žgur-Bertok, 1999
pkCT4	PColK-JA53 s <i>cki-gfp</i> Kn ^r	Mulec in sod., 2003
pSC101	plazmid v majhnem št. kopij z <i>gfp</i> brez promoterja, Kn ^r	Cohen in sod., 1977
pSC200	<i>lexA-gfp</i> Kn ^r	Ronen in sod., 2002
pSC201	<i>recA-gfp</i> Kn ^r	Ronen in sod., 2002
pSC202	<i>umuD-gfp</i> Kn ^r	Ronen in sod., 2002
pSC300	<i>caa-gfp</i> Kn ^r	Kamenšek, 2007
pSC303	<i>cae7-gfp</i> Kn ^r	Kamenšek, 2007
pAG408	Samomorilski plazmid z mini-transpozonom, brez Pir proteina, zaradi česar v gostitelju propade. Na mini-Tn5 transpozonu je zapis za <i>atpE</i> , <i>gfp</i> , Kn ^r Gm ^r . Zapis za transpozazo je zunaj transpozobilnega dela, da se ta lahko le enkrat prestavi.	Suarez in sod., 1996
pAG409	pAG408 z <i>lexA-gfp</i> , Kn ^r Gm ^r	Kamenšek, 2008
pAG410	pAG408 z <i>recA-gfp</i> , Kn ^r Gm ^r	Kamenšek, 2008

3.1.3 Kemikalije

Alkaloid, Skopje, Makedonija

CaCl₂

Difco Laboratories, Detroit, ZDA

Nutrient broth

Fermentas, Vilna, Litva

DNA standard – λ lestvica

Kefo, Ljubljana, Slovenija

96-odstotni etanol

Kemika, Zagreb, Hrvaška

glicerol

glukoza

saharoza

Merck, Darmstadt, Nemčija

amonacetat

bromofenol modro

izopropanol

KH_2PO_4

K_2HPO_4

kloroform

MgCl_2

MgSO_4

NaCl

NaOH

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

tiamin

Roth, Karlsruhe, Nemčija

agar

agaroza

baza TRIS

LB

SDS

SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA

ampicilin

ciprofloksacin

EDTA

etidijev bromid

gentamicin

kanamicin

kloramfenikol

ksilen cianol

mitomicin C

Na-citrat

nalidiksična kislina

poli-L-lizin

prolin

rifampicin

RNaza (ribonukleaza A)

tetraciklin

TRIS

3.1.4 Kompleti in encimi

Fermentas, Vilna, Litva

- 2× PCR Master Mix (dNTP-ji, pufer za *Taq* DNA polimerazo, *Taq* DNA polimeraza, MgCl₂),
- komplet »GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit« (komplet za izolacijo plazmidne DNA)
 - Resuspension Solution (raztopina za resuspendiranje celic)
 - Lysis Solution (raztopina za lizo celic)
 - Neutralization Solution (raztopina za nevtralizacijo)
 - Wash solution (raztopina za spiranje z etanolom)
 - Elution Solution (pufer za elucijo plazmidne DNA)
 - Kolone za mikrocentrifugirke

Promega, Wisconsin, ZDA

KpnI (komplet z restrikcijsko endonukleazo), 10-kratni reakcijski pufer,
KpnI (10 U/μl)

Qiagen, Hamburg, Nemčija

- Komplet »QIAQuick Gel Extraction Kit« za čiščenje fragmentov DNA iz elektroforeznega gela
 - kolone za mikrocentrifugirko
 - pufer QG
 - pufer PE
 - pufer EB

3.1.5 Začetni oligonukleotidi

JENA Bioscience GmbH, Jena, Nemčija

- colE2F, colE2R
- H1, H2
- H3, H4
- LexA, LexA P
- RepFIBA
- SAL 14

3.1.6 Pufri in reagenti

Amonijev acetat

10 mol/l amonijev acetat

Pufer TE

10 mM/Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM/EDTA (pH 8,0)

Pufer TE z ribonukleazo A (RNAza)

10 mM/Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM/EDTA (pH 8,0)

20 µg/ml RNAza

Pufer 0,5x TBE

0,45 mM Tris-Borat

10 mM EDTA

CaCl₂

0,1 mol/l CaCl₂

MgSO₄

10 mM MgSO₄

STET

0,1 M NaCl

10 mM TrisCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

3.1.7 Oprema

Uporabljali smo naslednjo opremo:

- aparatura za PCR
 - Biometra Uno II (Biometra, Göttingen, Nemčija)
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
- avtomatske pipete Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Bäch, Švica)
- električno mešalo ROTAMIX 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- elektroforeza 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- invertni mikroskop Eclipse TE300 z digitalno kamero DXM 1200 (nikon, ZDA)
- namizna centrifuga Eppendorf 5417C (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- namizna centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)

- stresalnik Infors HT (Bottmigen, Švica)
- termoblock Constantemp (Technilab, Los Angeles, Kalifornija, ZDA)
- transiluminator 2011 Macrovue (UV 320 nm) (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- UV/VIS spektrofotometer Lambda Bio (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
- vibracijski stresalnik EV 100 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- vibracijski stresalnik VIBROMIX 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- vroča kopel LKB – »MultiTemp II« (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA)
- vroča kopel ISOTEMP 215 (Thermo Fischer Scientific, ZDA)

3.1.8 Gojišča

Uporabljali smo gojišča Luria-Bertani (LB), LB z antibiotiki, minimalna gojišča in mehki agar.

3.1.8.1 Tekoče gojišče LB

Za tekoča gojišča LB smo v destilirani vodi raztopili 25g/l gojišča LB (tripton-10 g, NaCl-10 g, kvasni ekstrakt-5 g) in ga sterilizirali s 15 minutnim avtoklaviranjem pri 121° C.

3.1.8.2 Tekoče gojišče LB z antibiotiki

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

Preglednica 5: Uporabljeni antibiotiki in njihove koncentracije v gojiščih.

Antibiotiki	Koncentracija v gojišču (µg/ml)
Ampicilin (Ap)	100
Gentamicin (Gm)	15
Kanamycin (Kn)	30
Nalidiksična kislina (Nal)	25
Rifampicin (Rif)	150

1.1.1.1 Trdno gojišče LB

V destilirani vodi smo raztopili 25 g/l gojišča LB in 13 g/l agarja. Gojišče smo sterilizirali s 15 minutnim avtoklaviranjem pri 121°C. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili v vodni kopeli na 55°C. Odvisno od zahtev, smo pred razlivanjem dodali ustrezno količino antibiotika.

3.1.8.3 Minimalno gojišče A10

Za pripravo 1 l minimalnega gojišča smo ločeno, s 15 minutnim avtoklaviranjem pri 121°C, sterilizirali 100 ml soli ((NH₄)₂SO₄-10 g/l, K₂HPO₄-10,5 g/l, KH₂PO₄-45 g/l, Na-citrat 5H₂O-5 g/l) in 200 ml destilirane vode ter 700 ml destilirane vode v kateri smo raztopili 13 g/l agarja. Ko sta se raztopini ohladili, smo ju združili ter pred razlivanjem dodali 2 ml 20 % MgSO₄, 5 ml 40 % raztopine glukoze ter po potrebi 4 ml ustrezne 0,5 M aminokislina (prolin, tiamin).

3.1.8.4 Mehki agar

V destilirani vodi smo s segrevanjem raztopili 8 g/l gojišča Nutrient broth, 5 g/l NaCl in 6 g/l agarja. Pred sterilizacijo z avtoklaviranjem, smo ga razpipetirali v epruvete po 3,5 in 4 ml. Pred uporabo smo mehki agar raztopili ter ga ohladili v termobloku.

3.2 METODE

3.2.1 Test kolicinogenosti

Na plošče gojišča LB smo s sterilnimi zobotrebcami prepikirali kolonije sevov. Za preverjanje sposobnosti tvorbe kolicinov, smo v 5 ml gojišča LB nacepili indikatorski sev CL 173. Prepikirane plošče smo inkubirali preko noči na 37 °C in pod enakimi pogoji s stresanjem inkubirali tudi indikatorsko kulturo.

Naslednji dan smo plošče za 15 minut izpostavili hlapom kloroforma. Lizirane celice smo pustili v digestoriju nadaljnjih 15 minut, da je kloroform izhlapel. V epruvete s 4 ml raztopljenega mehkega agarja, ki smo ga prej 10 minut inkubirali v termobloku pri 46 °C, smo dodali 200 µl prekonočne kulture indikatorskega seva, dobro premešali in prelili preko liziranih kolonij. Plošče smo inkubirali preko noči na 37 °C.

3.2.2 Indukcija lizogenih bakteriofagov z UV

V 5 ml gojišča LB smo nacepili seve za preverjanje prisotnosti lizogenih fagov in indikatorsko kulturo CL 173 ter jih preko noči inkubirali s stresanjem pri 37 °C.

Naslednji dan smo prekonočne kulture prelili v sterilne steklene petrijevke in jih odprte za 70 sekund izpostavili ultravijolični žarnici in jih med tem ves čas mešali. Po obsevanju smo petrijevke s kulturo inkubirali pri 37 °C. Po eni uri smo 1 ml obsevane kulture prenesli v mikrocentrifugirke in centrifugirali 2 minuti pri 13.000 vrt./minuto. Nato smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko.

Mehki agar v epruvetah smo raztopili in ga ohladili v termobloku na 46 °C. V 3 ml mehkega agarja smo dodali 200 µl prekonočne kulture indikatorskega seva in 100 µl supernatanta s fagi. Vsebinsko epruvete smo premešali med dlanmi in prelili plošče LB, ki smo jih predhodno ogreli v topli sobi. Ko se je mehki agar strdil smo plošče inkubirali pri 37 °C. Kot kontrolo števila bakterij v supernatantu smo 100 µl le tega razmazali na plošče LB in tudi te inkubirali na 37 °C.

3.2.3 Indukcija bakteriofagov z nalidiksično kislino

Seve smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB z nalidiksično kislino s koncentracijo 8,5 µg/ml in jih preko noči inkubirali s stresanjem pri 37 °C. Enako smo inkubirali indikatorsko kulturo, ki smo jo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB.

V epruvete s prekonočno kulturo smo odpipetirali po 700 µl kloroforma. Nato smo pripravili razredčine liziranih kultur. V topli sobi smo predogreli plošče LB. Mehki agar v epruvetah smo raztopili in ga ohladili v termobloku na 46 °C. V epruvete z mehkim agarjem smo dodali 150 µl kulture indikatorskega seva CL 173 in prelili LB plošče. Ko se je mehki agar strdil, smo na te plošče nakapljali neredčene in redčene vzorce prekonočnih kultur in inkubirali preko noči na 37 °C.

3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.4.1 Priprava celičnega lizata/supernatanta celic za PCR

Kolonijo bakterijskega seva smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB in inkubirali s stresanjem preko noči pri 37 °C. Prekonočno kulturo smo naslednji dan s pomočjo vibracijskega stresalnika premešali in nato odpipetirali 1 ml kulture v mikrocentrifugirko. Bakterijsko kulturo smo centrifugirali 1 minuto pri 14.000 vrt./minuto, da so se celice usedle na dno. Pelet smo resuspendirali v 200 µl sterilne destilirane vode ter inkubirali 10 minut pri 100 °C. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje v mikrocentrifugi pri 14.000 vrt./minuto. 150 µl supernatanta smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in do uporabe shranili na –20 °C.

3.2.4.2 PCR

Z metodo PCR smo pomnoževali regije RepFIIA in RepFIBA, s čemer smo dokazali prisotnost večjih plazmidov v sevih. S pozitivno kontrolo (izolirani plazmid) smo dokazali nemoten potek reakcije, z negativno kontrolo smo potrdili, da namnoženi produkt nastane le v primeru, ko je prisotna ustrežna matrica.

Poleg replikacijskih regij smo s PCR pomnožili operatorsko regijo gena *lexA* in preverjali prisotnost kolicina E2 pri sevu H13.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Dolžina pomnožka (bp)
RepFIB vodilni RepFIB povratni	TCG CTG CAA ACC TTG TCA CTC A GGA GAT CCT GCG TAC ACT GCC T	1593
SAL 14 vodilni SAL 14 povratni	CCC TGA AGT GAC CTC CTC TG GAA AGG CGG CAC TCT GTT GT	840
LexA (vodilni) LexAP (povratni)	GTT ACA GCC AGT CGC CGT T GGA TAA CCC TTC CAG AAT TCG A	720
ColE2 vodilni ColE2 povratni	TTA TGA GCG GTG GCG ATG GA ATA CGG CAT TAT GAC CGC TGT	850

Standardna 50 µl reakcijska mešanica za PCR s celičnim lizatom:

Začetni oligonukleotid vodilni (20 pmol/l)	1 µl
Začetni oligonukleotid povratni (20 pmol/l)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
10× pufer za Taq DNA-polimerazo	5 µl
MgCl ₂	5 µl
Taq DNA-polimeraza (5U/µl)	0,2 µl
Celični lizat	10 µl
ds H ₂ O	26,8 µl

Protokol za PCR z oligonukleotidnimi začetniki RepFIB in SAL14

94 °C	4 :30	1×
94 °C	0:30	
63 °C	0:30	30×
72 °C	2:00	
72 °C	10:00	1×

Protokol za PCR z oligonukleotidnimi začetniki LexA in LexAP

94 °C	4 :30	1×
94 °C	0:30	
55 °C	0:30	30×
72 °C	1:00	
72 °C	10:00	1×

Protokol za PCR z oligonukleotidnimi začetniki ColE2

94 °C	4 :30	1×
94 °C	0:30	
55 °C	0:30	30×
72 °C	1:00	
72 °C	10:00	1×

3.2.4.3 PCR z bakterijskimi celicami

S to metodo smo iskali plazmide podobne ColE1, ki imajo zapise za kolicine.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo za dokazovanje plazmidov pCol

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Dolžina pomnožka (bp)
H1 (vodilni)	GGC AGT GGT CCG GTT GAT	400
H2 (povratni)	TGC AGC CCG TAA TGG TGA	
H3 (vodilni)	AGG ATC TTC TTG AGA TCC TT	700
H4 (povratni)	TAT CCA CAG AAT CAG GGG	

Standardna 20 µl reakcijska mešanica za PCR z bakterijskimi celicami:

Začetni oligonukleotid vodilni (20 pmol/l)	0,4 µl
Začetni oligonukleotid povratni (20 pmol/l)	0,4 µl
Bakterijske celice	1 kolonija *
2× PCR Master mix	10 µl
ds H ₂ O	9,2 µl

* V PCR epico smo s sterilnim zobotrebcem prenesli celo bakterijsko kolonijo.

Protokol za PCR z oligonukleotidnimi začetniki H1 in H2

94 °C	4:30	1×
94 °C	0:30	
55 °C	0:30	30×
72 °C	0:30	
72 °C	7:00	1×

Protokol za PCR z oligonukleotidnimi začetniki H3 in H4:

94 °C	4:30	1×
94 °C	0:30	
58 °C	0:30	30×
72 °C	1:00	
72 °C	7:00	1×

3.2.5 Konjugacija na filtru

Po 50 µl prekonočnih kultur donorja, seva S17 λ pir s plazmidom z željeno fuzijo promotorja gena odziva SOS in *gfp* ter recipienta smo dodali v epruveto s 5 ml 10mM MgSO₄. Mešanico smo nato sterilno prefiltrirali skozi membrano z 0,46 µm velikimi porami. Membrano s konjugacijsko mešanico smo položili na ploščo LB ter inkubirali pri 37 °C. LB ploščo smo predhodno ogreli v topli sobi. Po 8 urah inkubiranja smo membrano sprali v 5 ml 10mM MgSO₄ in 300 µl supernatanta do suhega razmazali na 4 plošče LB z rifampicinom in gentamicinom.

Večje kolonije smo naslednji dan s sterilnimi zobotrebeci prepikirali na 2 sveži plošči LB Rif Gm in inkubirali preko noči pri 37 °C. Nato smo prepikirane kolonije odtisnili preko sterilnega žameta na ustrezna selekcijska gojišča. Glede na sposobnost rasti na selekcijskih gojiščih smo določili potencialne transkonjugante. Te smo preverili z izolacijo plazmidne DNA in njeno restrikcijo.

S konjugacijo smo v bakterijske celice seva H13 vnesli vnesli plazmida pAG409 in pAG410 s transponibilnim delom, ki nosi zapis za fuzijo *lexA-gfp* oziroma *recA-gfp* ter zapis za odpornost proti Kn in Gm. Zapis za transpozazo je izven transponibilnega dela, tako da se ta transpozon lahko le enkrat prestavi. Ker je sev H13 odporen proti Kn, smo kot selekcijsko gojišče uporabili gojišče LB z Gm in Rif. V ta namen smo predhodno izolirali bakterijske celice odporne proti Rif tako, da smo 100 µl prekonočnih kultur razmazali na plošče LB Rif. Ker imajo donorji okvaro v genu *recA*, počasneje rastejo in smo jih lahko enostavneje ločili od potencialnih konjugant. Prepikirane domnevne konjugante smo odtisnili na plošče minimalnega gojišča ter minimalnega gojišča s prolinom in tiaminom. Donor S17 λ pir ima namreč okvarjene gene za sintezo prolina, naravni izolati pa so prototrofi, zato smo kolonije, ki so zrasle tudi na minimalnem gojišču brez prolina, določili za transkonjugante.

Z izolacijo plazmidne DNA smo preverili, ali je do transpozicije zares prišlo. Transkonjuganta mora biti odporna na Gm in ne sme vsebovati plazmida. Ker imajo naravni izolati tudi svoje plazmide, smo naredili restrikcijo plazmidne DNA z restrikcijskim encimom Fast Digest *KpnI*, kot je opisano v poglavju Materiali in metode 3.2.7 in 3.2.8. Restrikcijski vzorci donorskega seva in konjugant so se razlikovali. Na ta način smo uspešno določili transkonjugante. Rezultati niso prikazani.

3.2.6 Transformacija

S transformacijo smo v bakterijske celice sevov H13, 18, E01/121 in RW118 vnesli plazmide s fuzijami promotorjev genov odziva SOS in *gfp* ter fuzijami genov za kolicine in *gfp*. Vnašali smo plazmide pSC200, pSC201, pSC202, pSC300 in pSC303 (preglednica 4), ki imajo poleg zapisa za gensko fuzijo z *gfp* tudi zapis za odpornost proti Kn. Vendar so ti sevi že bili odporni proti Kn, zaradi česar smo uspešnost transformacije preverjali z izolacijo plazmidne DNA in z gelsko elektroforezo.

3.2.6.1 Priprava kompetentnih celic RW118, H13, 18 in E01/121

V 50 ml gojišča LB, ki smo ga predhodno ogreli v topli sobi, smo nacepili 100 μ l prekončne kulture in inkubirali na stresalniku (250 vrt./min) in temperaturi 37 °C. Ko smo pri valovni dolžini 600 nm izmerili optično gostoto med 0,35 in 0,60, smo kulturo 10 min inkubirali na ledu. Kulturo smo nato prelili v ohlajene centrifugirke in centrifugirali 10 min pri 6.000 vrt./minuto in 4 °C. Ves supernatant smo odstranili in usedlino resuspendirali v 10 ml ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂ in inkubirali 10 minut na ledu. Kulturo smo ponovno centrifugirali 10 minut pri 6.000 vrt./minuto in 4 °C. Še enkrat smo odstranili ves supernatant in resuspendirali usedlino v 10 ml 0,1 M CaCl₂. Pod enakimi pogoji kot prej smo ponovno centrifugirali resuspendirane celice. Odstranili smo supernatant in v centrifugirko dodali 1,8 ml raztopine za shranjevanje kompetentnih celic (CaCl₂ in glicerol). Mešanico smo razporedili v mikrocentrifugirke po 100 μ l in do uporabe shranili pri –80 °C.

Da smo preverili kako uspešno smo pripravili kompetentne celice, smo transformirali plazmid pUC19, ki ima zapis za odpornost proti Ap. V kolikor smo uspešno pripravili kompetentne celice, so transformante konfluentno prerasle plošče LB Ap.

3.2.6.2 Transformacija kompetentnih celic

Kompetentne celice, ki smo jih imeli po 100 μ l shranjene pri –80 °C, smo odtalili v ledeni kopeli in dodali 2 μ l plazmidne DNA. Transformacijsko mešanico smo 30 min inkubirali na ledu. Inkubaciji je sledil 90-sekundni temperaturni šok pri 42 °C in ponovna 3 minutna inkubacija na ledu. Mešanici smo nato dodali 400 μ l tekočega gojišča LB ter jo 60 minut stresali pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo po 200 μ l transformacijske mešanice s hokejko do suhega razmazali na plošče LB Kn in jih inkubirali preko noči pri 37 °C.

Uporabili smo koncentracijo 35 µg/ml Kn v gojišču, ker so uporabljeni sevi, razen seva RW118 odporni proti Kn.

3.2.7 Izolacija plazmidne DNA s kompletom »GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit« (izolacija plazmidne DNA iz 1 do 5 ml kulture za plazmide v večjem številu kopij ali do 10 ml kulture za plazmide v manjšem številu kopij)

S kompletom »GeneJET™« smo izolirali plazmidno DNA konjugant, transformant in plazmide z *gfp* fuzijami. Najprej smo v mikrocentrifugirke odpipetirali prekončno kulturo in 1-2 minuti centrifugirali pri 14.000 vrt./minuto. Nato smo supernatant odstranili z avtomatsko pipeto in usedlino resuspendirali v 250 µl resuspenzijske raztopine. Dodali smo 250 µl raztopine za lizo celic in mikrocentrifugirko nekajkrat obrnili. Nato smo dodali 350 µl nevtralizacijske raztopine in zopet mikrocentrifugirko nekajkrat obrnili. Sledilo je 5 minutno centrifugiranje pri 14.000 vrt./min. Med tem sta se ločili pDNA in oborina z liziranimi celicami. Supernatant smo prenesli v kolone z mikrocentrifugirkami in centrifugirali 1 minuto. Plazmidna DNA se je vezala na kolono, supernatant smo zavrgli. Nečistoče smo odstranili s spiranjem s 500 µl raztopine, ki vsebuje etanol. Zopet smo centrifugirali 1 minuto pri 14.000 vrt./min in zavrgli supernatant. Spiranje smo še enkrat ponovili, zavrgli supernatant in še enkrat centrifugirali prazno kolono, da smo povsem odstranili ostanke etanola. Kolono smo nato prenesli v prazno mikrocentrifugirko in plazmidno DNA sprali s kolone s 50 µl elucijske raztopine. Na koncu smo po dveh minutah inkubiranja, kolono centrifugirali nadaljnji 2 minuti pri 14.000 vrt./min. Plazmidno DNA smo do uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.8 Cepitev z restrikcijskimi endonukleazami Fast Digest *KpnI*

Z restrikcijskim profilom plazmidov izoliranih iz transkonjugant oziroma transformant, smo dokazali, da celice vsebujejo želeni plazmid z vključenim fragmentom.

Preglednica 8: Restrikcijske mešanice

25 µl mešanica		20 µl mešanica	
plazmidna DNA	22 µl	plazmidna DNA	17 µl
10× pufer za Fast encime	2 µl	10× pufer za Fast encime	2 µl
<i>KpnI</i>	1 µl	<i>KpnI</i>	1 µl

Mikrocentrifugirko z restrikcijsko mešanico smo za 5 minut inkubirali v vodni kopeli na 37 °C. Reakcijo smo nato ustavili s segrevanjem pri 80 °C ali z dodatkom nanašalnega pufra.

3.2.9 Agarozna gelska elektroforeza

1-odstotni elektroforezni agarozni gel smo pripravili tako, da smo v 0,35 ml pufra 0,5× TBE s segrevanjem raztopili 0,35 g agaroze. Raztopino smo nato nekoliko ohladili in dodali 1,5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml). Ko se je gel strdil, smo ga postavili v elektroforetsko banjico in ga prelili z 0,5× pufrom TBE.

Vzorci smo pred nanašanjem na gel zmešali z nanašalnim elektroforeznim pufrom (0,25 odstotni bromfenol modro, 0,25-odstotni ksilen cianol, 40-odstotna saharoza) v razmerju 1:5, ki povzroči, da se vzorec usede na dno jamice in obenem omogoča sledenje potovanja fragmentov v gelu. Izolirane plazmide, fragmente plazmidov pomnožene s PCR in fragmente dobljene po restrikciji smo preverjali v gelu s koncentracijo agaroze 1 %. Napetost med elektrodama je bila 100-120 V/cm, tok pa 30 mA. Kot označevalca dolžine smo uporabljali DNA bakteriofaga λ, cepljeno z restrikcijskim encimom *Pst*I.

3.2.10 Ekstrakcija fragmentov DNA iz agaroznega gela

Iz gela smo izrezali pomnoženi fragment regulatorne regije *lexA* seva H13 in ga prečistili s kompletom »QIAQuick Gel Extraction Kit«.

S sterilnim skalpelom smo izrezali fragment DNA iz gela in ga prenesli v mikrocentrifugirko. Najprej smo koščke gela stehtali. Nato smo dodali 3× volumen pufra QG in inkubirali 10 minut pri 50 °C oziroma dokler se gel ni raztopil ter občasno premešali. Ko so se koščki gela raztopili, smo dodali 1× volumen izopropanola, premešali in prenesli v kolono. Kolono smo centrifugirali 1 minuto pri 14.000 vrt./minuto, odstranili supernatant in dodali 0,5 ml pufra QG. Ponovno smo centrifugirali in odstranili supernatant. Kolono smo sprali z dodatkom pufra PE, počakali 2 minuti in ponovno centrifugirali 1 minuto. Nato smo kolono prenesli v svežo mikrocentrifugirko ter DNA eluirali z dodatkom pufra EB. Kolono smo centrifugirali ter eluirano DNA shranili na -20 °C.

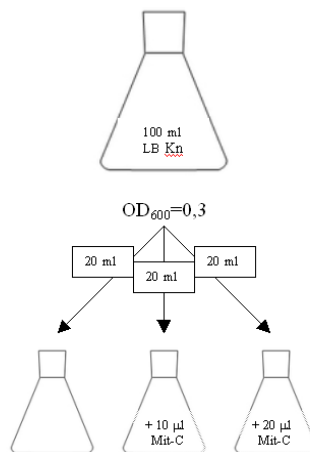
3.2.11 Mikroskopiranje z invertnim mikroskopom

3.2.11.1 Priprava celic za mikroskopijo in vzorčenje v eksponentni in stacionarni fazi rasti

V 5 ml tekočega gojišča LB smo cepili eno kolonijo bakterijskega seva in inkubirali preko noči s stresanjem pri 37 °C. Naslednji dan smo 40 µl prekonočne bakterijske kulture precepili v 20 ml tekočega gojišča LB, ki smo ga predhodno ogreli v topli sobi. Kulturo smo stresali pod enakimi pogoji. Spremljali smo rast ter vzorčili v eksponentni in stacionarni fazi rasti. 1 ml vzorca smo dodali 5 µl kloramfenikola (10 µg/ml) in postavili v hladilnik (preko noči), da se je razvila fluorescenca.

3.2.11.2 Priprava celic za mikroskopijo in vzorčenje ob indukciji

V 5 ml tekočega gojišča LB z ustreznim antibiotikom smo nacepili bakterijsko kolonijo in inkubirali preko noči s stresanjem pri 37 °C. Naslednji dan smo 200 µl prekonočne kulture precepili v 100 ml tekočega gojišča LB Kn in inkubirali pod enakimi pogoji do optične gostote OD₆₀₀ 0,3. Nato smo kulturo razdelili v tri erlenmajerice po 20 ml in v dve dodali induktor – mitomicin C (Mit-C, založna koncentracija 100 mg/ml). V eno smo dodali Mit-C do koncentracije 0,25 µg/ml, v drugo 0,5 µg/ml, tretjo smo inkubirali brez Mit-C in nam je služila kot kontrola. Kulturo smo nato po 15, 30, 60, 90, 120 in 150 minutah vzorčili ter enako dodali kloramfenikol ter postavili preko noči v hladilnik. Poleg vzorčenja smo kulturi določali tudi optično gostoto.



Slika 3: Shema poskusa, indukcija bakterijske kulture z Mit-C

3.2.11.3 Priprava preparata

Na objektno stekelce smo z avtomatsko pipeto nanesli 7 µl poli-L-lizina ter ga z drugim stekelcem razmazali po površini. Ko se je le ta posušil, smo nanesli 10 µl vzorca ter pokrili

s krovnim stekelcem. Da so se celice lepo razporedile in prilepile na objektnik, smo nanj položili nekaj plasti filter papirja ter nanj nekajkrat pritisnili.

3.2.11.4 Svetlobna in fluorescentna mikroskopija

Za pregledovanje preparatov smo uporabljali mikroskop Eclipse TE3000, slike smo posneli s kamero DXM 1200 (Nikon). Za shranjevanje slik smo uporabljali programsko opremo LUCIA (System for Image Processing and Analysis LUCIA 4, 60, Laboratory Imaging Ltd.).

Mikroskopirali smo pri 1000× povečavi in ob tem uporabljali imerzno olje. Ko smo poiskali sliko, smo določeno vidno polje najprej fotografirali pri vidni svetlobi in nato še v fluorescentni osvetlitvi (Super high pressure mercury lamp power supply, Nikon) z uporabo široko spektralnega modrega filtra B2A (λ_{ex} 450-590, Nikon), ki prepušča zeleno svetlobo.

Pare fotografij smo obdelali s programsko opremo cellC (Selinummi in sod., 2005), s katero smo določali število vseh celic in celic, ki so izražala proučevano fuzijo. Delež celic, ki so močnejše izražale določeni gen, smo izračunali tako, da smo število celic, ki so intenzivneje fluorescirale delili s številom vseh celic. Svetilnost samih celic smo določali s programom Scion Image (Scion Corporation). Pri tem smo upoštevali lestvico svetilnosti, ki je določena od 0 za črno do 256 za belo.

3.2.12 Določanje frekvence mutacij

3.2.12.1 Določanje frekvenc mutacij z nalidiksično kislino

V 5 ml tekočega gojišča LB smo cepili kolonijo bakterijskega seva in inkubirali preko noči pri 37 °C. Drugi dan smo pripravili redčitvene vrste prekonočnih kultur. Na plošče LB smo v paralelkah do suhega razmazali 100 µl redčitev 10^{-7} in 10^{-8} . Na ta način smo lahko določili število celic v kulturi. Na 4 plošče LB z nalidiksično kislino smo razmazali po 200 µl prekonočne kulture. Vse plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo prešteli kolonije, ki so zrasle na LB ploščah ter določili titer. Prav tako smo prešteli kolonije na ploščah LB Nal ter tako določili število celic odpornih na nalidiksično kislino.

3.2.12.2 Določanje frekvence mutacij za rifampicinom

Postopek določevanja frekvenc mutacij z rifampicinom je enak postopku z nalidiksično kislino, le da smo na 4 plošče LB z rifampicinom do suhega razmazali po 600 µl prekonočne kulture.

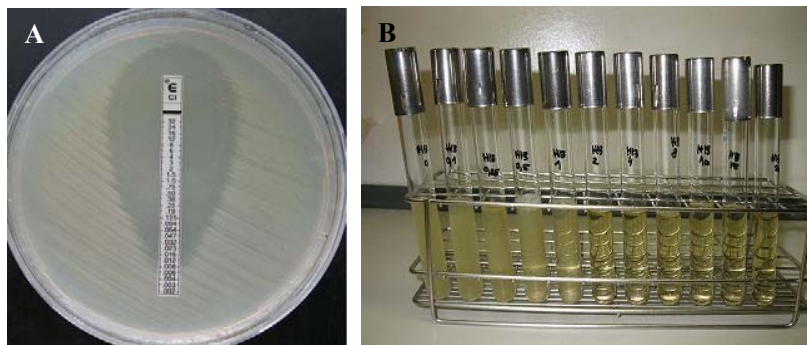
3.2.13 Določevanje števila na antibiotik tolerantnih bakterij

3.2.13.1 Določevanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za posamezne seve za ciprofloksacin z e-testi

Ker potrebujemo svežo kulturo, smo najprej na LB ploščo razmazali kolonijo seva in ploščo inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo nekaj kolonij resuspendirali v tekočem LB gojišču. Primerna gostota suspenzije je bila 0,5 McFarlanda (približno $1,5 \times 10^8$ bakterijskih celic/ml). Suspenzijo smo razmazali s sterilnim brisom tako, da smo bris in petrijevko z gojiščem, med razmazovanjem večkrat obrnili. Na razmazano ploščo smo nato položili e-test (tanka membrana z znanimi padajočimi koncentracijami antibiotika). Po 24 urni inkubaciji pri 37 °C smo odčitali MIK tako, da smo odčitali koncentracijo kjer zaviralna elipsa seka membrano e-testa.

3.2.13.2 Določevanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za posamezne seve za tetraciklin

MIK za tetraciklin smo določili z vrsto epruvet z znanimi padajočimi koncentracijami antibiotika (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 15 in 20 µg/ml Tc). V vsako epruveto z določeno koncentracijo antibiotika smo cepili 10 µl prekonočne kulture in inkubirali pod enakimi pogoji kot prekonočno kulturo, torej s stresanjem pri 37 °C. Po 24 urah smo s pomočjo motnosti določili MIK. Prva epruveta v seriji, ki je bila bistra, je tista z MIK.



Slika 4: Določanje MIK. A. Določanje MIK za Cip za sev E01/121 z e-testi. B. Določanje MIK za Tc za sev H13 z redčitveno vrsto.

3.2.13.3 Določevanje števila tolerantnih bakterij

V 5 ml tekočega LB smo cepili eno kolonijo bakterijskega seva in inkubirali s stresanjem preko noči pri 37 °C.

Naslednji dan smo precepili 40 µl prekonočne kulture v 20 ml tekočega gojišča LB, ki smo ga predogreli v topli sobi ter inkubirali pod enakimi pogoji kot prekonočno kulturo do optične gostote OD₆₀₀ 0,3. Bakterijsko kulturo smo nato razdelili in v eno erlenmajerico dodali 5× MIK antibiotika za posamezen sev ter ju vrnili na stresalnik. Kulturo z antibiotikom smo vzorčili po dveh, petih in štirindvajsetih urah inkubiranja, da smo lahko določili titer. Ob tem smo ob enakih časih kulturi brez antibiotika izmerili optično gostoto in po štiriindvajsetih urah inkubacije tudi vzorčili. Ko smo vzorčili smo v paralelkah na LB plošče razmazali ustrezne redčine. In jih preko noči inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo kolonije prešteli in določili titer.

Preglednica 9: V poskusu določanja števila na antibiotik tolerantnih bakterij uporabljene koncentracije antibiotikov ciprofloksacina in tetraciklina (5× MIK)

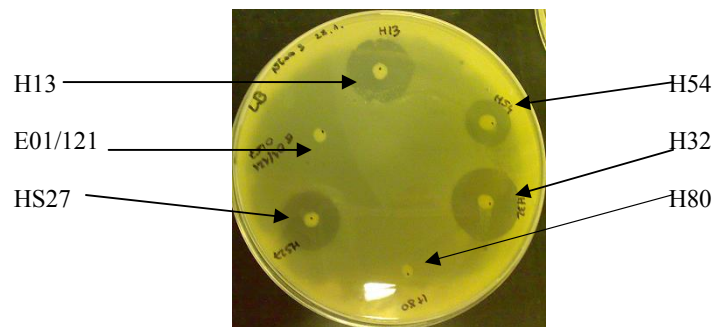
Sev <i>E. coli</i>	koncentracija Cip (µg/ml)	koncentracija Tc (µg/ml)
RW118	0,16	10
H13	0,06	10
E01/121	0,06	10
H54	0,06	10
18	0,08	10
RW464	0,03	-

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE SPOSOBNOSTI TVORBE KOLICINOV

4.1.1 Test sposobnosti tvorbe kolicinov s kloroformiranjem

Z namenom pridobiti čim več informacij o proučevanih sevih smo naredili nekaj enostavnih poskusov. Kot je opisano v poglavju Materiali in metode, smo najprej določili sposobnost tvorbe kolicinov. Sintezo kolicinov smo dokazali pri naslednjih sevih: H54, HS27 ter pri H13 in H32. Pri zadnjih dveh so bile cone zbistritve nekoliko večje, zato lahko sklepamo, da ta dva seva izločata mikrocine, ki so manjši od kolicinov, zaradi česar lažje difundirajo v gojišče. Rezultati so prikazani tudi v preglednici 10.

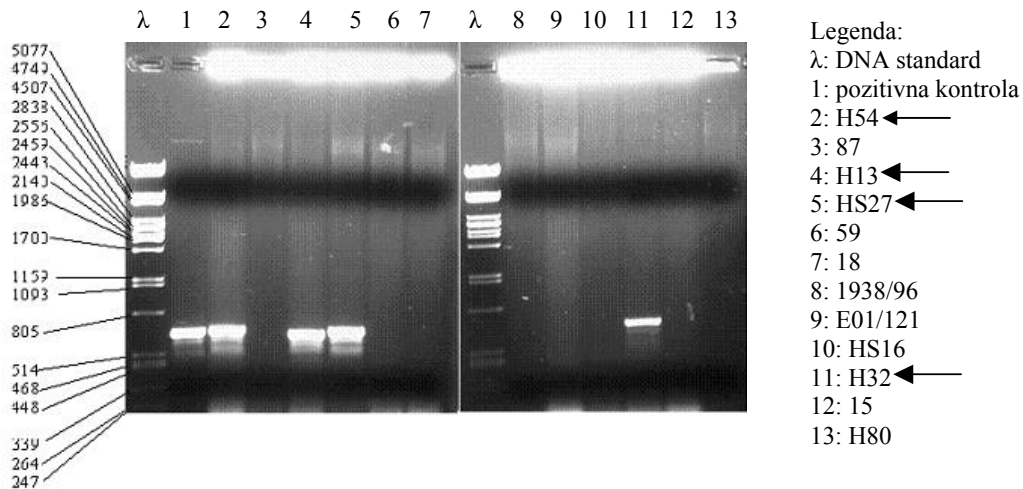


Slika 5: Test kolicinogenosti, zbistritve okrog kolonij pomenijo prisotnost kolicinov oz. mikrocinov

4.1.2 Določanje plazmidov, ki imajo zapise za sintezo kolicinov, z metodo PCR

Z metodo PCR smo s parom oligonukleotidnih začetnikov (H3 in H4) pomnožili zaporedje RNA II, ki je značilno za plazmide iz družine ColE1. RNA II je prekurzor začetnega oligonukleotida pri podvojevanju plazmidov iz družine pColE1 (Morlon in sod., 1988).

Z metodo PCR smo potrdili rezultate biološkega testa kolicinogenosti s kloroformiranjem, saj smo dobili pozitiven rezultat PCR pri sevih H13, H32, H54 in HS27. Rezultati so prikazani na sliki 6.



Slika 6: PCR pomnožki odseka gena *RNAII* z začetnima oligonukleotidoma H3 in H4. Prvi stolpec pri obeh gelih je standardna DNA bakteriofaga λ , cepljena z encimom *PstI* (označene so dolžine fragmentov). V jamici označeni s številko 1 je pozitivna kontrola, plazmid pKCTS, v ostalih jamicah so PCR pomnožki proučevanih sevov, kot so označeni v legendi (s puščico so označeni sevi, pri katerih smo dobili pozitivne rezultate).

Z drugim parom oligonukleotidnih začetnikov H1 in H2 smo pomnožili gen *mobA*, ki je tudi značilen za plazmide iz družine *ColE1*. Protein MobA prekine dvojno vijačnico DNA v mestu *oriT* in cepi eno od vezi, s čimer omogoči ločitev in odvitje verig v mestu cepitve (Meyer, 2000). Geni *mob* imajo zapis za relaksazo in posredujejo prenos plazmidne DNA v drugo celico (Perwez in Meyer, 1999). Potrebni so za prenos številnihe konjugativnih ali mobilizacijskih plazmidov (Chan in sod., 1985). Tudi v tem poskusu smo dobili pozitivne rezultate PCR v primeru sevov H13, H32, H54 in HS27 (rezultati so prikazani v preglednici 10).

4.2 DOLOČANJE VEČJIH PLAZMIDOV

Plazmidi za bakterijske celice niso nujno potrebni, lahko pa imajo zapise za virulentne dejavnike, kolicine in zapise za odpornosti proti antibiotikom. Konjugativni plazmidi lahko sodelujejo pri širjenju odpornosti, virulentnih dejavnikov in metabolnih determinant (Ambrožič, 1998). Zanje je značilno, da imajo mesto začetka podvojevanja (*ori*), zapis za protein (Rep), ki cepi verigo v mestu *ori* in začne podvojevanje ter zapise za produkte, ki uravnavajo podvojevanje (Starčič in sod., 2003). Z reakcijo PCR smo z RepFIBA začetnimi oligonukleotidi preverjali prisotnost replikacijskih regij RepFIA in RepFIB (značilna za plazmid F). Z drugim parom oligonukleotidnih začetnikov SAL14 smo preverjali prisotnost replikacijske regije RepFIIA (značilna za plazmid R1).

Večje plazmide podobne plazmidu R1, za katere je značilna replikacijska regija RepFIIA, smo dokazali v sevih H13, H54 in HS16, medtem ko smo replikacijsko regijo RepFIBA dokazali tudi v sevih 18, H32, HS27, E01/121 in 1938/96. Rezultati so prikazani v Preglednici 10.

4.3 DOLOČANJE PRISOTNOSTI BAKTERIOFAGOV

Prisotnost bakteriofagov smo dokazovali z dvema testoma. Bakteriofage smo najprej inducirali z nalidiksično kislino in nato še z UV svetlobo. V obeh poskusih smo prisotnost plakov opazili samo pri uroseptičnem sevu 18. Rezultati so prikazani v preglednici 10 in na sliki 7. Bakteriofage ima lahko tudi kateri od ostalih sevov s kolicini, ki jih zaradi prisotnosti kolicinov, ki prav tako lizirajo indikatorski sev, na ta način nismo mogli zaznati.



Slika 7: Test indukcije bakteriofagov z UV, plaki so posledica prisotnosti bakteriofagov

4.4 OBČUTLJIVOST PROUČEVANIH SEVOV ZA ANTIBIOTIKE (Ap, Kn, Nal, Gm, Rif)

Občutljivost sevov za antibiotike smo določali, ker smo te podatke potrebovali za selekcijo transformant in konjugant. Proti Ap so odporni vsi sevi razen seva E01/121, proti Kn so odporni vsi sevi, proti Nal so odporni sevi 15, H80, HS27 in 1938/96. Sevi 15, 59 in 87 so odporni proti Gm, medtem ko je proti Rif odporen le sev H80. Sevi 18, H13, H32, E01/121 in 1938/96 so za Rif občutljivi. Rezultati so zbrani v preglednici 10.

Preglednica 10: Pregled lastnosti sevov *E. coli* in občutljivost za antibiotike (Ap, Kn, Nal, Gm, Rif)

Sev <i>E. coli</i>	kolicin/ mikrocin	RNAII/ <i>mobA</i>	RepFIIA	RepFIBA	fagi	občutljivost za antibiotike				
						Ap	Kn	Nal	Gm	Rif
15	- / -	- / -	-	-	-	R	R	R	R	/
18	- / -	- / -	-	+	+	R	R	S	S	S
59	- / -	- / -	-	-	-	R	R	S	R	/
87	- / -	- / -	-	-	-	R	R	S	R	/
H13	+ / +	+ / +	+	+	-	R	R	S	S	S
H32	+ / +	+ / +	-	+	-	R	R	S	S	S
H54	+ / -	+ / +	+	+	-	R	R	S	S	/
H80	- / -	- / -	-	-	-	R	R	R	S	R
HS16	- / -	- / -	+	+	-	R	R	S	S	I
HS27	+ / -	+ / +	-	+	-	R	R	R	S	I
E01/121	- / -	- / -	-	+	-	S	R	S	S	S
1938/96	- / -	- / -	-	+	-	R	R	R	S	S

R- odporen, S- občutljiv, I- zmerno občutljiv

4.5 MIKROSKOPIRANJE

4.5.1 Izražanje genov SOS

S fluorescentno mikroskopijo smo proučevali izražanje genov odziva SOS na ravni posameznih celic. Kot je opisano v poglavju metode pod točkama 3.2.5 in 3.2.6 smo v ta namen najprej pripravili seve z genskimi fuzijami na kromosomu in plazmidu. Sevom smo določili rastne krivulje in odvzeli vzorce v eksponentni in zgodnji stacionarni fazi rasti. Vzorcem smo dodali kloramfenikol in jih preko noči pustili v hladilniku, da se je fluorescenca razvila. Naslednji dan smo jih pregledovali pod mikroskopom.

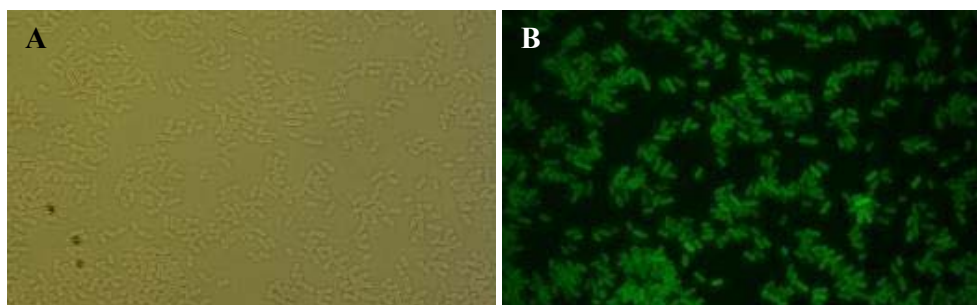
Celice smo glede na svetilnost razdelili v 3 skupine. V skupino I smo uvrstili celice, ki so najbolj intenzivno fluorescirale. Večina celic, ki ni fluorescirala intenzivno, določa osnovno raven izražanja določenega proučevanega gena, zato smo te celice uvrstili v skupino III. V skupini II so celice, ki so po intenzivnosti fluorescene nekje na sredini. Primeri, ko so le posamezne celice izražale proučevani gen smo uvrstili v drugo skupino in zanje določili delež fluorescentnih. Delež celic, ki so intenzivne fluorescirale smo določili tako, da smo najprej s porgramsko opremo cellC prešteli vse celice v vidnem polju (100 %), ter nato še celice, ki so intenzivne fluorescirale ter delež izračunali po križnem računu.

Osredotočili smo se na seve, katerim smo v prvem delu diplomske naloge dokazali več virulentnih dejavnikov. Posebej zanimiv je sev 18, ki ima bakteriofag in sev H13, saj ima več različnih virulentnih dejavnikov (preglednici 10 in 11). RW118 je laboratorijski sev in nam je služil kot kontrola.

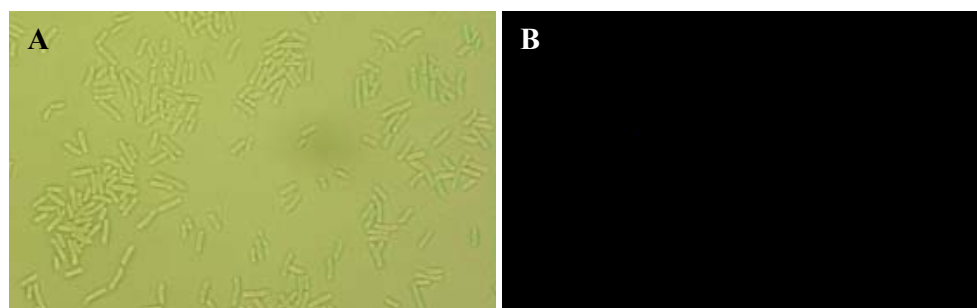
Preglednica 11: Povzetek lastnosti sevov *E. coli* 18 in H13 (Rijavec M.)

	kapsula	toksin	sideroforji	adhesini	plazmidni replikoni	bakteriofag	filogenetska skupina
18	-	hlyA usp cnf	iroCD iroN iucD fyuA	papC fimG sfa/focC	RepFIB	+	B2
H13	K1	hlyA kolicin	iroN iroCD fyuA iucD	papC fimH	RepFIIA RepFIB	-	B2

Pri mikroskopiranju smo kot pozitivno kontrolo uporabili bakterijske celice v stacionarni fazi seva RW118 s plazmidom pKCT4, z gensko fuzijo promotorja gena *cki* z *gfp*, saj promotor gena *cki* ni uravnan z odzivom SOS in je zato konstitutivno aktiven. Kot negativno kontrolo smo uporabili sev RW118 brez plazmidov z genskimi fuzijami. Pozitivna in negativna kontrola sta prikazani na sliki 8 in 9.

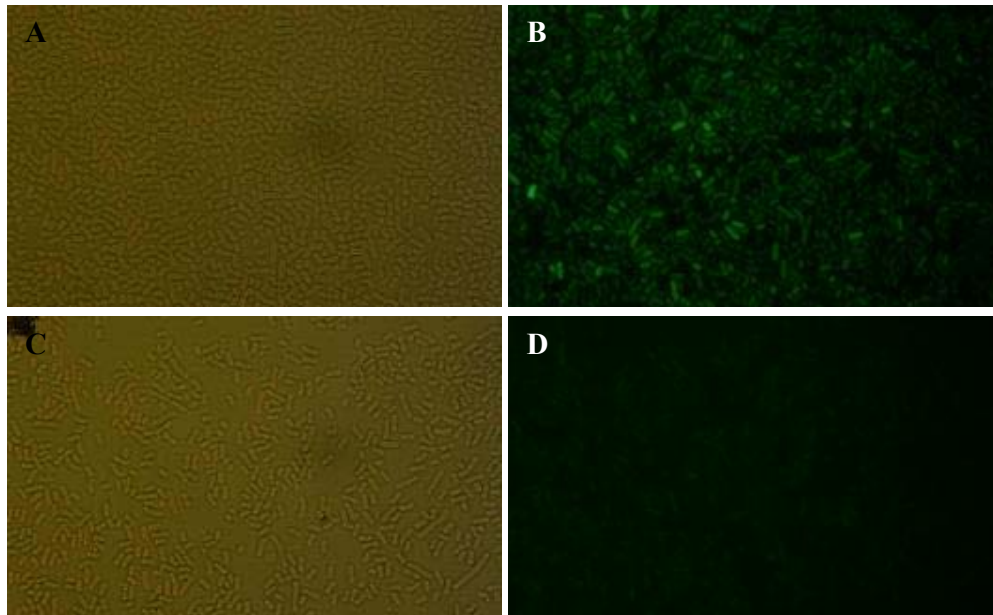


Slika 8: Pozitivna kontrola: Celice seva *E. coli* RW118 s fuzijo *cki-gfp* v stacionarni fazi. A pri svetlobni mikroskopiji, B pri fluorescentni mikroskopiji.

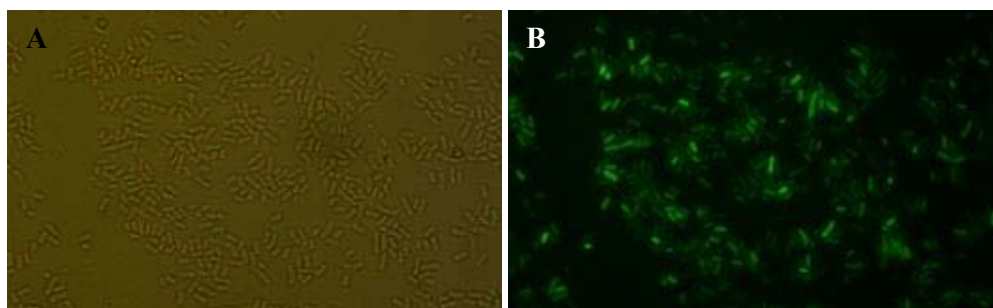


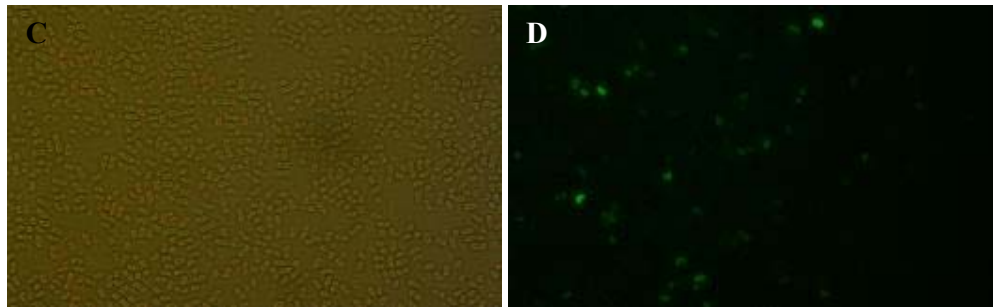
Slika 9: Negativna kontrola: Celice seva *E. coli* RW118 s brez plazmida s fuzijo *gfp* v stacionarni fazi. A pri svetlobni mikroskopiji, B pri fluorescentni mikroskopiji.

Na slikah 10 in 11 so prikazane celice seva H13 z izraženimi fuzijami promotorjev z *gfp* na plazmidu v primerjavi s fuzijami na kromosomu. Iz teh slik lahko sklepamo na razlike v izražanju fuzij genov odziva SOS z *gfp* na ravni posameznih celic na kromosomu in na plazmidu. V primeru fuzije na plazmidu je izražanje fuzij na osnovni ravni opazno višje kakor, če je fuzija na kromosomu. Naši rezultati kažejo tudi večje število celic, v primeru fuzije na plazmidu, ki močneje izražajo določeno fuzijo (intenzivnejše celice).



Slika 10: Celice seva *E. coli* H13 z izraženo fuzijo *lexA-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev H13 s fuzijo *lexA-gfp* na plazmidu pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo *lexA-gfp* na kromosomu pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.





Slika 11: Celice seva *E. coli* H13 z izraženo fuzijo *recA-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev H13 s fuzijo *recA-gfp* na plazmidu pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo *recA-gfp* na kromosomu pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.

V preglednici 12 so prikazani rezultati izražanja fuzij promotorjev genov odziva SOS z *gfp* za sev H13 na plazmidu, v primerjavi z izražanjem istih fuzij na kromosomu. Rezultati so prikazani kot dva ločena poskusa, saj so rezultati izražanja fuzij na kromosomu med seboj zelo različni. Odstotek skupin I in II predstavlja delež celic, ki intenzivneje izraža določeno fuzijo. Izračunali smo ga iz prilog A1 in A2, tako da smo sešteli odstotke celic, ki so intenzivneje izražale določeno fuzijo (odstotek celic skupine I + odstotek celic skupine II). Naši rezultati kažejo razlike v izražanju določene fuzije glede na to ali je ta fuzija na kromosomu ali na plazmidu. Na plazmidu je v primeru fuzije *lexA-gfp* v stacionarni fazi v prvem poskusu 11,6 % celic (delež celic v skupinah I in II je določen iz preglednic A1 in A2), v drugem pa 7,98 % celic intenzivneje izražalo to fuzijo kakor isto fuzijo na kromosomu. Izražanje fuzije *lexA-gfp* na osnovni ravni (svetilnost skupine III v preglednici 12), je v primeru fuzije na plazmidu večje kakor pri celicah s fuzijo na kromosomu. Podobno je tudi v primeru fuzije *recA-gfp*. Fuzijo *recA-gfp* je intenzivneje izražalo 12,36 % v prvem poskusu v stacionarni fazi (12,87 % v drugem poskusu) več celic s fuzijo na plazmidu, kakor celic s fuzijo na kromosomu. Tudi v primeru te fuzije je izražanje na osnovni ravni večje pri fuziji na plazmidu. To je tudi pričakovano, saj je izražanje nekega gena na kromosomu odvisno od večjega števila dejavnikov.

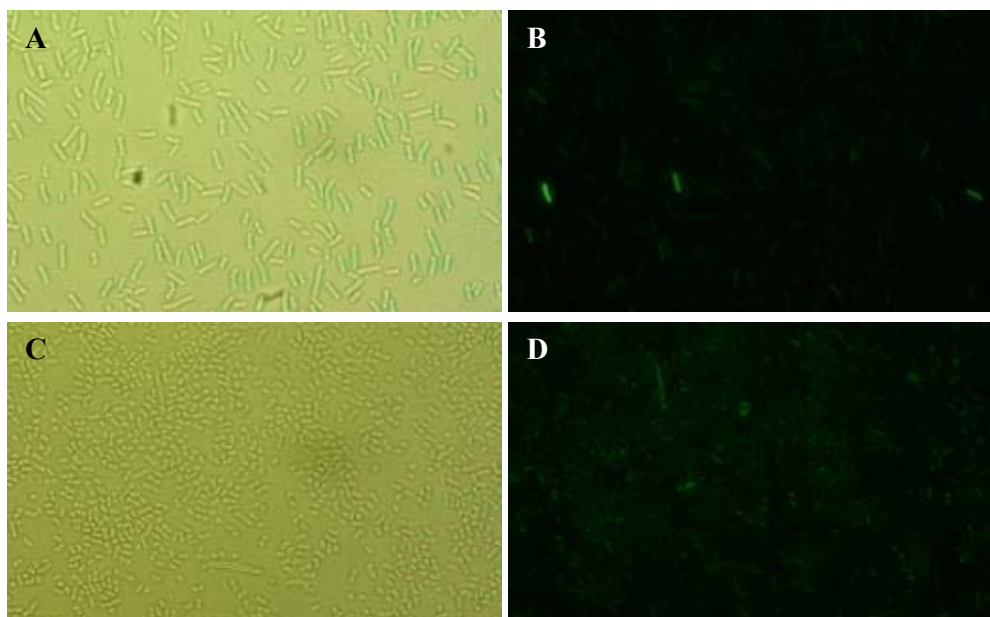
Zaradi variabilnosti v izražanju genskih fuzij promotorjev genov SOS odziva z *gfp* na kromosomu, smo se pri nadaljnjem delu bolj posvetili bakterijskim celicam z genskimi fuzijami na plazmidu. Osnovna preglednica, meritve OD₆₀₀ in rastne krivulje so v Prilogi A.

Preglednica 12: Izražanje promotorjev genov odziva SOS (*lexA* in *recA*) s fuzijami z *gfp* na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu

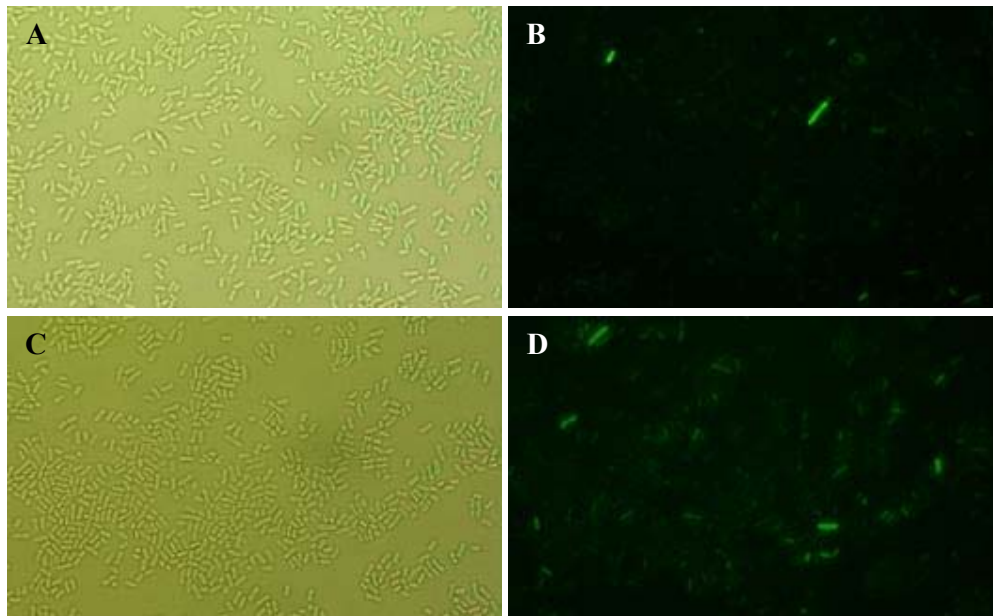
		test		ponovitev	
		I in II	III	I in II	III
		intenzivne celice (%)	svetilnost*	intenzivne celice (%)	svetilnost*
Fuzija na plazmidu	H13 <i>lexA-gfp</i>				
	- eksponentna faza rasti	8,24	21-37	5,64	19-29
	- stacionarna faza rasti	11,6	24-37	7,89	21-37
	H13 <i>recA-gfp</i>				
- eksponentna faza rasti	10,07	21-37	5,81	20-37	
- stacionarna faza rasti	16,5	24-39	15,39	24-37	
Fuzija na kromosomu	H13 <i>lexA-gfp</i>				
	- eksponentna faza rasti	0	11-23	0	12-26
	- stacionarna faza rasti	0	12-36	0	13-36
	H13 <i>recA-gfp</i>				
- eksponentna faza rasti	2,61	19-35	1,90	13-29	
- stacionarna faza rasti	4,14	22-39	2,52	13-29	

*velika večina celic kaže nižjo fluorescenco

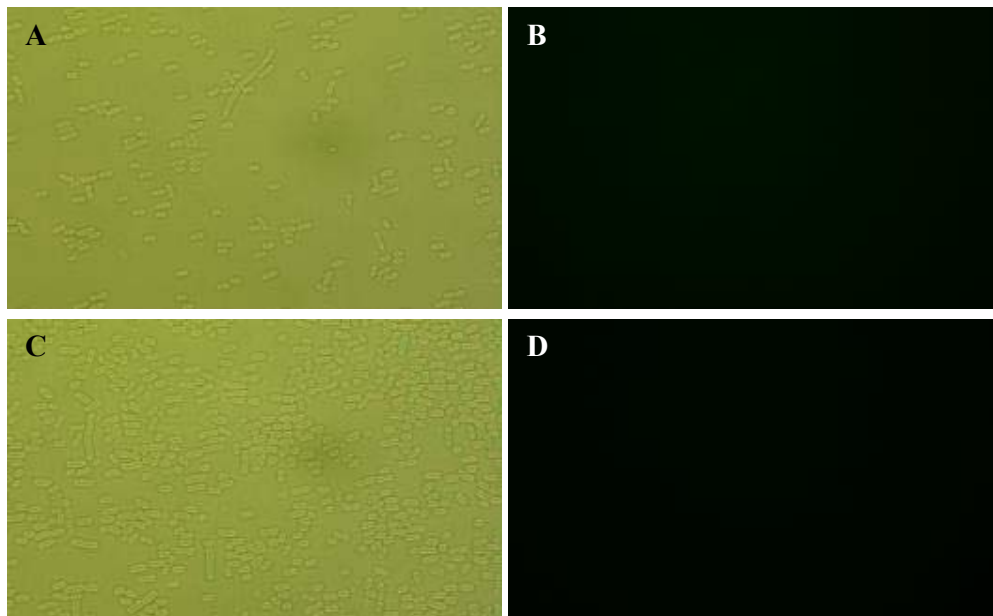
Naslednje slike (Slike 12-14) prikazujejo celice z izraženimi fuzijami promotorjev z *gfp* v stacionarni fazi v laboratorijskem sevu RW118 in naravnim izolatom H13 s fuzijami promotorjev genov odziva SOS z *gfp* na plazmidu. Slike so pokazale razlike v izražanju fuzij *lexA-gfp* in *recA-gfp* na osnovni ravni. Sev H13 izraža gene odziva SOS na višji osnovni ravni (intenzivnost večine celic) kakor sev RW118 z enako fuzijo.



Slika 12: Celice sevov *E. coli* RW118 in H13 z izraženo fuzijo *lexA-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.



Slika 13: Celice sevov *E. coli* RW118 in H13 z izraženo fuzijo *recA-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *recA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo *recA-gfp* pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.



Slika 14: Celice sevov *E. coli* RW118 in H13 z izraženo fuzijo *umuD-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *umuD-gfp* pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo *umuD-gfp* pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.

V preglednici 13 so prikazani rezultati izražanja genov odziva SOS pri sevih RW118, H13, 18 in E01/121, v katere smo predhodno transformirali plazmide z genskimi fuzijami

promotorjev genov *lexA*, *recA* in *umuD* z *gfp*. V tem poskusu nismo uporabili kemičnih spojin, ki bi lahko povzročale poškodbe DNA. Vse meritve smo opravili v ponovitvah. Iz preglednice je razvidno, da je pri sevu H13 že osnovna raven izražanja genov (določena s svetilnostjo večine celic-skupina III, obrobjeno z rdečo) odziva SOS nekoliko višja. Večji je tudi delež intenzivnejših celic (modri okvirček) kot pri ostalih sevih.

Pri sevu H13 s fuzijo *lexA-gfp*, v stacionarni fazi, 6,1 % več celic (odstotek skupin I in II) močneje izraža to fuzijo kot pri sevu RW118, 6,2 % več kakor pri sevu 18 in 5,1 % več kot pri sevu E01/121. Naši rezultati kažejo, da je pri sevu H13 večje izražanje fuzije *lexA-gfp* na osnovni ravni, kakor pri ostalih sevih.

Podobne rezultate smo dobili tudi v primeru fuzije *recA-gfp*, kjer to fuzijo v sevu H13, v stacionarni fazi, intenzivneje izraža 15,93 % celic, medtem ko jo v sevu RW118 intenzivneje izraža le 3,84 % celic, v sevu 18 1,59 % in v sevu E01/121 3,46 % celic. Pri sevu H13 smo ugotovili višjo osnovno raven izražanja gena *recA* (svetilnost skupine III, moder okvirček).

V primeru fuzije *umuD-gfp* pri večini celic nismo zaznali izražanja te fuzije, zato smo določili samo delež celic, ki je izražal to fuzijo na zelo nizki ravni. Ugotovili smo, da so sevi pri izražanju te fuzije ne razlikujejo toliko. Poleg tega naši rezultati kažejo, da je gen *umuD* ob normalnih pogojih rasti močno utišán.

Preglednica 13: Izražanje promotorjev genov SOS s fuzijami na plazmidu

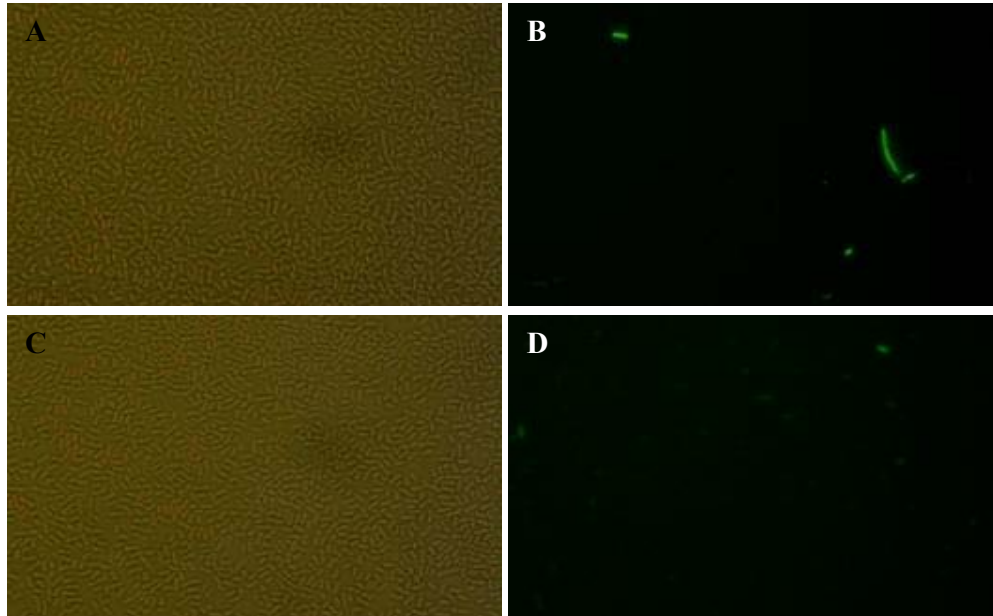
	<i>lexA-gfp</i>		<i>recA-gfp</i>		<i>umuD-gfp</i>	
	I+II	III	I+II	III	I+II	III
	intenzivne celice (%)	svetilnost*	intenzivne celice (%)	svetilnost*	intenzivne celice (%)	svetilnost*
RW118						
- eksponentna faza rasti	0,76	13-30	2,61	17-37	-	-
- stacionarna faza rasti	1,79	16-35	3,84	17-37	0,16	0
H13						
- eksponentna faza rasti	5,64	19-29	5,81	20-37	-	-
- stacionarna faza rasti	7,89	21-37	15,4	24-37	0,03	0
18						
- eksponentna faza rasti	0,46	11-26	1,25	15-26	-	-
- stacionarna faza rasti	1,69	11-30	1,59	15-32	0,04	0
E01/121						
- eksponentna faza rasti	0	12-30	3,30	15-35	-	-
- stacionarna faza rasti	2,79	17-30	3,46	15-33	0,16	-

*večina celic kaže nižjo fluorescenco
-nismo vzorčili

4.5.2 Izražanje gena za sintezo kolicina E7

Ker je tudi izražanje genov za sintezo kolicinov odvisno od odziva SOS, nas je zanimala aktivnost njihovih promotorjev v preiskovanih sevih. S transformacijo smo v seve vnesli

plazmid s fuzijo promotorja gena za sintezo kolicina E7 z *gfp*. Slika 15 prikazuje bakterijske celice z izraženimi fuzijami *cea7-gfp*, na plazmidu, v stacionarni fazi rasti, v sevih RW118 in H13. Iz slik je razvidno, da je pri sevu RW118 intenzivneje izražalo to fuzijo več celic, kakor v sevu H13.



Slika 15: Celice sevov *E. coli* RW118 in H13 z izraženo fuzijo *cea7-gfp* na plazmidu v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *cea7-gfp* pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi. C. Sev H13 s fuzijo *cea7-gfp* pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji, v stacionarni fazi.

V preglednici 14 so prikazani rezultati izražanja gena za sintezo kolicina E7. Rastne krivulje in meritve OD_{600} so v prilogi B. V tem poskusu smo opazili manjše razlike v izražanju genov za sintezo kolicinov med sevoma RW118 in H13. Osnovna raven izražanja fuzije *cea7-gfp* ni, zato smo za celice, ki so kolicine izražale najmanj intenzivno določili delež. Največji delež celic (v stacionarni fazi), ki izražajo to fuzijo, smo ugotovili pri sevu RW118 (1,63 %), najmanjši pa pri sevu H13 (0,6 %). Ti rezultati niso bili pričakovani.

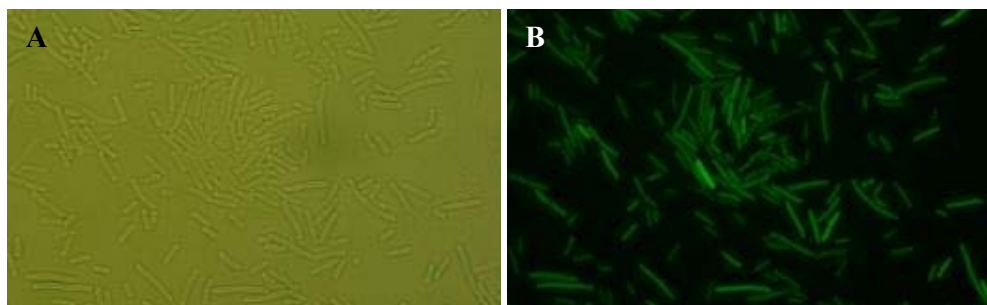
Preglednica 14: Izražanje fuzij promotorjev kolicinov z *gfp* brez promotorjev

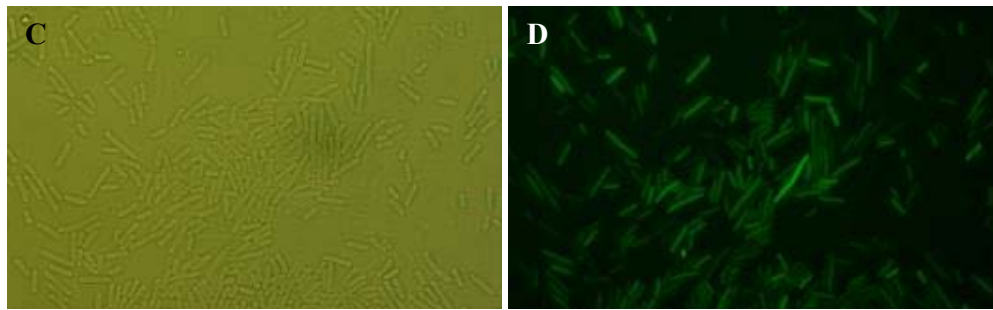
	I+II	III	
	intenzivne celice (%)	intenzivne celice (%)	svetilnost
RW118 <i>cea7-gfp</i>			
- eksponentna faza rasti	0,15	18-41	0,64
- stacionarna faza rasti	0,53	23-48	1,10
H13 <i>cea7-gfp</i>			
- eksponentna faza rasti	0,05	16-33	0,34
- stacionarna faza rasti	0,14	18-33	0,46
18 <i>cea7-gfp</i>			
- eksponentna faza rasti	-	-	-
- stacionarna faza rasti	0,64	11-30	1,28
E01/121 <i>cea7-gfp</i>			
- eksponentna faza rasti	-	-	-
- stacionarna faza rasti	0,55	13-33	1,34

4.5.3 Izražanje genov SOS ob indukciji

Ker smo opazili razlike v izražanju preučevanih promotorjev med posameznimi sevi, nas je zanimalo ali se ti sevi razlikujejo tudi glede kinetike indukcije odziva SOS. V ta namen smo odziv SOS inducirali z antibiotikom mitomicinom-C, ki se interkalira med bazne pare in povzroči prepletanje dvojne vijačnice, zaradi česar se prekine podvojevanje DNA. Zanimalo nas je, če na indukcijo odziva SOS vplivajo drugi virulentni dejavniki, kot so bakteriofagi in večje število plazmidov. Celice za mikroskopijo smo pripravili tako kot je opisano v poglavju 4.11.2. Osnovne preglednice in meritve optične gostote so v Prilogi C.

Na sliki 16 so prikazane celice sevov 18 in RW118 s fuzijo *lexA-gfp* na plazmidu. Pri obeh sevih je opaziti filamentozno rast po 90 minutah po dodatku Mit-C, ki je pri kulturi, ki smo jo inkubirali brez dodanega Mit-C nismo opazili.





Slika 16: Celice sevov *E. coli* RW118 in 18 z izraženo fuzijo *lexA-gfp* na plazmidu 90 min po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C. A. Sev RW118 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji. Sev 18 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji.

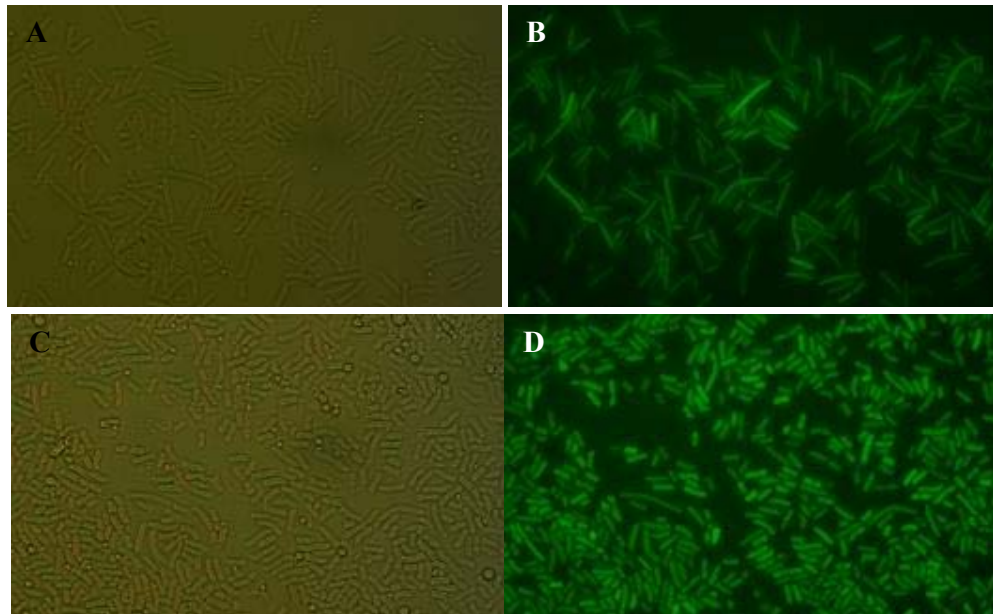
V preglednicah 15, C1 in C2 (priloga C) so prikazani rezultati poskusa z indukcijo odziva SOS z Mit-C pri sevih 18 in RW118 s fuzijo *lexA-gfp* na plazmidu. Naši rezultati kažejo, da se pri sevu 18 s fuzijo *lexA-gfp*, ob indukciji z 0,5 µg/ml Mit-C poveča delež celic (moder okvirček), ki močneje izražajo gene odziva SOS v primerjavi s sevom RW118 z enako fuzijo ob istem času in enaki dodani koncentraciji Mit-C. Pri koncentraciji 0,25 µg/ml Mit-C so razlike manjše, kar je lahko posledica premajhne koncentracije Mit-C in ker so celice nastale poškodbe uspele popraviti, lahko pa se bakteriofagi, za katere menimo, da so vzrok večjega števila celic z močneje izraženim genom *lexA*, niso inducirali. Ker poskusa nismo ponovili, ne moremo z gotovostjo trditi, da so rezultati točni. Pri teh dveh sevih razlike na osnovni ravni izražanja genov odziva SOS nismo opazili.

Preglednica 15: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevih *E. coli* 18 in RW118

		18 <i>lexA-gfp</i>		RW118 <i>lexA-gfp</i>	
		I+II	III	I+II	III
		intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost
OD₆₀₀=0,3		0	11-22	0	11-31
Brez Mit-C	15'	0,42	11-26	0,31	11-32
	30'	0,25	11-26	0,52	12-35
	60'	0,30	13-26	0	12-36
	90'	0,62	13-31	0,61	13-36
0,25 µg/ml Mit-C	15'	0,12	12-24	0	12-31
	30'	0,26	12-31	2,94	17-30
	60'	6,92	17-30	11,2	21-30
	90'	16,6	26-39	11,8	23-40
0,5 µg/ml Mit-C	15'	4,70	17-26	2,12	14-31
	30'	4,50	19-29	4,11	22-31
	60'	8,68	19-35	7,32	24-34
	90'	48,9	27-43	24,4	28-40

Na sliki 17 so prikazane bakterijske celice sevov H13 in RW118 s fuzijo *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z mitomicinom C po 90 minutah po dodatku mitomicina C. Iz slike

smo opazili filamentozno rast celic seva RW118. celice seva RW118 so vse nekoliko daljše, medtem ko daljše celice pri sevu H13 niso tako pogoste. Slike kažejo večje izražanje fuzije *lexA-gfp* (90 min po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C) v sevu H13 kakor v sevu RW118. Poleg tega je iz slik razvidno, da veliko več celic seva H13 izraža fuzijo močneje (večja svetilnost) kakor celice seva RW118.



Slika 17: Celice sevov *E. coli* RW118 in H13 s fuzijo *lexA-gfp* na plazmidu po 90 minutah po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C. A. Sev RW118 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji. C. Sev H13 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji.

V preglednici 16 so prikazani rezultati izražanja fuzije *lexA-gfp* pri sevih H13 in RW118 na plazmidu ob indukciji z Mit-C. Poskus smo naredili v dveh ponovitvah. V drugi ponovitvi so vse vrednosti svetilnosti nekoliko višje, kar je lahko posledica sveže pripravljene Mit-C, vendar na delež celic, ki intenzivneje fluorescirajo, to ni imelo vpliva.

Naši rezultati kažejo, da se pri sevu H13 s fuzijo *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C, odziv SOS sproži hitreje kot pri sevu RW118 z isto fuzijo pri obeh koncentracijah Mit-C. Delež celic, ki močneje izražajo fuzijo *lexA-gfp* (celice v skupinah I in II), je pri sevu H13 višji kot pri RW118 (v preglednici 15, prilogah C3 in C4 označeno z modrim okvirčkom). V prvem poskusu je v sevu H13 gen *lexA*, pri koncentraciji 0,25 µg/ml Mit-C po 150 minutah, močneje izražalo 33,9 % celic, pri sevu RW118 pa 26,4 % celic. V

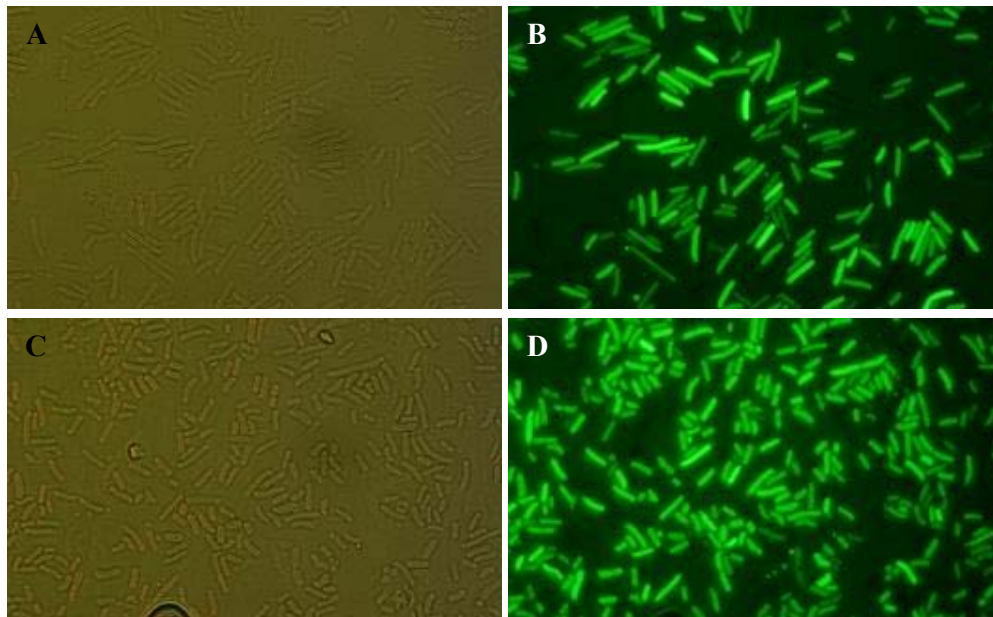
drugem poskusu je to fuzijo pri istih pogojih v sevu H13 močnejše izražalo 65,3 % celic, v sevu RW118 39,3 % celic.

V prvem poskusu, 30 min po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C, nismo opazili nobene celice seva RW118, ki bi intenzivneje fluorescirala, medtem ko smo v sevu H13 opazili 9,82 % celic, ki so močnejše izražale gen *lexA*. V drugem poskusu smo majhen delež (0,18 %), ki so intenzivneje izražale gen *lexA* opazili tudi pri sevu RW118, v sevu H13 smo opazili kar 9,91 % celic, ki so fluorescirale intenzivneje. Ob koncu prvega poskusa, torej po 150 minutah po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C, smo pri sevu H13 opazili 93 % celic, ki so intenzivneje izražale fuzijo *lexA-gfp* in 67,4 % pri sevu RW118. V drugem poskus so naši rezultati pokazali 47,5 % več celic, ki so močnejše izražale fuzijo *lexA-gfp*, pri sevu H13 kot pri sevu RW118.

Preglednica 16: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevih *E. coli* RW118 in H13

		RW118 <i>lex-gfp</i>		RW118 <i>lex-gfp</i> (ponovitev)		H13 <i>lex-gfp</i>		H13 <i>lex-gfp</i> (ponovitev)	
		I+II	III	I+II	III	I+II	III	I+II	III
		intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost
OD ₆₀₀ =0,3		0	12-26	0	13-28	0	11-31	0	11-32
Brez Mit-C	15'	-	-	-	-	0	11-31	-	-
	30'	-	-	-	-	0	11-40	-	-
	60'	0	12-26	0,80	19-30	0,29	12-40	0,7	16-40
	90'	0	10-26	0,05	21-31	0	10-36	3,6	17-37
	120'	0,06	10-26	0,49	28-41	0	10-35	-	-
	150'	0	10-36	0,17	29-39	0	10-34	4,8	21-35
0,25 µg/ml Mit-C	15'	-	-	-	-	0	12-30	4,8	24-40
	30'	-	-	-	-	12,5	16-31	9,03	16-40
	60'	2,01	16-32	5,60	24-40	7,91	17-40	10,7	22-40
	90'	9,13	16-33	8,65	21-40	9,23	16-40	14,7	22-56
	120'	12,2	13-40	9,41	27-41	15,7	22-40	18,4	28-56
	150'	26,4	27-42	39,3	24-42	33,9	26-40	65,3	35-57
0,5 µg/ml Mit-C	15'	0	12-34	0,18	19-35	8,73	17-30	9,91	17-29
	30'	0	10-23	5,40	20-42	9,82	17-31	15,7	19-29
	60'	10,7	12-33	3,21	21-44	94,7	19-43	12,7	25-44
	90'	22,7	12-35	23,9	29-45	80,1	22-40	76,6	27-45
	120'	-	-	35,4	27-45	84,9	22-40	83,9	29-45
	150'	67,4	19-40	43,6	33-45	93,0	31-40	91,1	29-45

Na sliki 18 so prikazane celice sevov RW118 in H13 s fuzijo *recA-gfp* na plazmidu 90 min po dodatku 0,5 µg/ml Mit-C. V tem poskusu so se celice seva RW118 daljšale, medtem ko pri celicah seva H13 nismo opazili filamentozne rasti. Slike kažejo, da gen *recA* pri sevu H13 intenzivneje izraža večina celic, medtem ko so pri sevu RW118 posamezne celice, ki izražajo fuzijo *recA-gfp* na nekoliko višji ravni.



Slika 18: Celice sevov *E. coli* RW118 in H13 z izraženo fuzijo *recA-gfp* na plazmidu po 90 minutah po dodatku 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Mit-C. A. Sev RW118 s fuzijo *recA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji in B, pri fluorescentni mikroskopiji. C. Sev H13 s fuzijo *recA-gfp* pri svetlobni in D, pri fluorescentni mikroskopiji.

V preglednici 17 so prikazani rezultati izražanja fuzije *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji z mitomicinom C pri sevih H13 in RW118. V tem poskusu so razlike ob dodatku Mit-C največje do 90 minut, saj je potem večina celic že močno inducirana. Naši rezultati ponovno kažejo hitrejši odziv SOS pri sevu H13 kakor pri sevu RW118 za prvih 30 min po dodatku Mit-C pri obeh koncentracijah.

Ugotovili smo, da celice seva H13 gen *recA* izražajo na višji osnovni ravni kot pri sevu RW118 (svetlnost skupine III, označeno z modrim okvirčkom) tudi v paralelki brez dodanega Mit-C in paralelki z 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Mit-C. Na primer v prvem poskusu 150 min po dodatku 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Mit-C, se je osnovna raven izražanja fuzije pri sevu H13 dvignila na 60-70 enot (območje svetlnosti), medtem ko se je pri sevu RW118 dvignila le na 38-52 enot. Poleg tega so naši rezultati pokazali, da je v skupini I (najbolj inducirane celice) večji delež celic pri sevu RW118, kakor pri sevu H13 v obeh paralelkah z dodanim Mit-C.

Preglednica 17: Izražanje fuzije *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevih *E. coli* RW118 in H13

		RW118 <i>recA-gfp</i>		RW118 <i>recA-gfp</i> (ponovitev)		H13 <i>recA-gfp</i>		H13 <i>recA-gfp</i> (ponovitev)	
		I+II	III	I+II	III	I+II	III	I+II	III
		intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost
OD ₆₀₀ =0,3		1,27	18-38	2,04	16-37	7,19	18-37	8,75	21-39
Brez Mit-C	15'	-	-	-	-	-	-	-	-
	30'	-	-	-	-	-	-	-	-
	60'	2,90	19-36	3,23	19-37	14,1	21-37	13,8	21-38
	90'	-	-	-	-	-	-	14,6	21-42
	120'	-	-	-	-	-	-	-	-
	150'	3,95	19-37	-	-	13,8	24-42	-	-
0,25 µg/ml Mit-C	15'	2,57	18-36	1,44	18-37	12,4	28-39	11,5	24-38
	30'	6,15	24-39	6,79	28-51	7,98	28-39	14,6	25-40
	60'	86,0	29-45	96,8	30-47	32,2	40-63	25,3	39-61
	90'	82,9	33-50	98,0	33-56	83,5	47-63	84,7	47-63
	120'	91,1	33-50	-	-	82,7	64-77	-	-
	150'	97,1	38-52	-	-	93,2	71-86	-	-
0,5 µg/ml Mit-C	15'	4,41	18-36	1,51	15-34	11,7	28-45	10,2	26-44
	30'	7,94	19-45	9,11	21-49	17,0	30-44	18,6	28-44
	60'	87,4	33-52	80,3	33-54	90,6	30-49	89,0	38-49
	90'	90,7	33-52	81,4	33-54	96,5	43-57	98,9	43-56
	120'	95,6	38-52	-	-	-	-	-	-
	150'	97,1	38-52	-	-	98,1	60-70	96,8	60-72

Enak poskus smo opravili tudi s celicami sevov RW118 in H13 s fuzijo *umuD-gfp* na plazmidu, vendar rezultatov nismo prikazali, ker večjih razlik nismo opazili, saj je ta gen močno reprimiran in kljub dodatku Mit-C izražanje ni bilo inducirano.

4.6 DOLOČANJE FREKVENC MUTACIJ

Frekvence mutacij smo določali z nalidiksično kislino in rifampicinom. Zanimalo nas je, kakšne so razlike v mutabilnosti posameznih sevov. Že prisotnost nizkih koncentracij antibiotikov lahko pomeni okoljski stres. Znano je, da nizke koncentracije kinolonov inducirajo SOS odziv in posledično se zaradi indukcije error-prone DNA polimeraz, poveča število mutacij. V prisotnosti β -laktamov, se tudi poveča stopnja mutacij, zaradi indukcije od SOS odvisne error-prone DNA polimeraze IV (Henderson-Begg in sod., 2006). V preglednici 18 so zbrani naši rezultati. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni dveh poskusov z Rif ter rezultati enega poskusa z Nal.

Pri sevu H13 je frekvenca mutacij, določena z rifampicinom, za 10 \times višja kot pri sevih RW118, 18 in 1938/96 ter za 10 \times nižja od sevov E01/121 in H54.

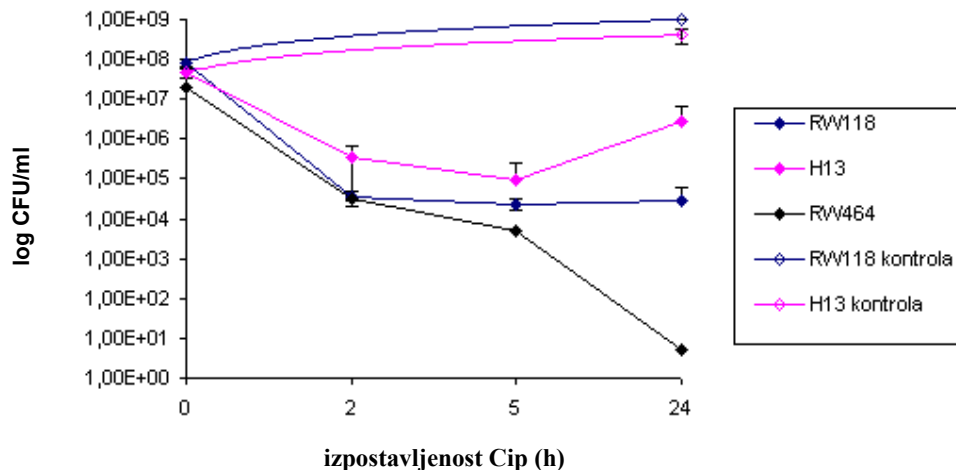
Preglednica 18: Frekvence mutacij proučevanih sevov *E. coli* določene z nalidiksično kislino in rifampicinom

Sev <i>E. coli</i>	frekvenca mutacij z Nal	povprečje frekvenc mutacij z Rif	standardni odklon, frekvence mutacij z Rif
RW118	$8,3 \times 10^{-10}$	$6,8 \times 10^{-9}$	$0,9 \times 10^{-9}$
H13	$4,3 \times 10^{-10}$	$7,0 \times 10^{-8}$	$0,4 \times 10^{-8}$
E01/121	0	$9,8 \times 10^{-8}$	$7,3 \times 10^{-8}$
18	$2,6 \times 10^{-10}$	$5,9 \times 10^{-9}$	$0,4 \times 10^{-9}$
H54	0	$1,1 \times 10^{-7}$	$0,1 \times 10^{-7}$
1938/96	0	$8,6 \times 10^{-9}$	0

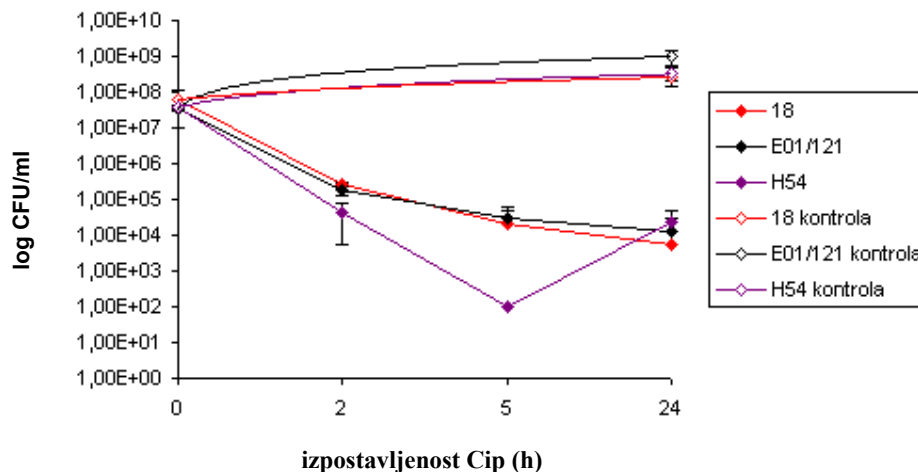
4.7 DOLOČEVANJE ŠTEVILA TOLERANTNIH BAKTERIJ

Število celic, ki preživijo tretiranje z antibiotikom je, enako kot frekvenca mutacij, odvisno od indukcije odziva SOS (Debbia in sod., 2001). To smo potrdili s sevom RW464, ki ima okvaro v genu *recA* in zato ne more inducirati SOS odziva. Pri tem sevu je večina celic po 24 urah tretiranja s ciprofloksacinom propadla. SOS odziv smo inducirali s $5 \times$ MIK ciprofloksacina, ki smo jo določili tako kot je opisano v poglavju 4.13.1 ter za tetraciklin v poglavju 4.13.2. Uporabljene koncentracije v poskusu so prikazane v preglednici 9. Domnevali smo, da bo sev H13, ker smo pri njem opazili povečano izražanje genov SOS, imel največ preživelih celic po končanem tretiranju s ciprofloksacinom.

Preglednice z rezultati in meritvami OD_{600} so v Prilogi D. Na slikah 19 in 20 so prikazane povprečne vrednost preživetja celic izpostavljenih ciprofloksacinu ter drugega dela kulture, ki smo ga inkubirali brez antibiotika in nam služi kot kontrola. Po pričakovanjih je tretiranje z antibiotikom preživel največ celic seva H13. 5 ur po dodatku Cip so si sevi po preživetju še najbolj podobni. Večje razlike nastanejo 24 ur po dodatku Cip, ko je preživel $3,8 \times 10^6$ celic seva H13, okrog 2×10^4 celic sevov RW118, E01/121 in H54, ter $5,7 \times 10^3$ celic seva 18. Kot sem že omenila je titer celic pri sevu RW464 24 ur po dodatku Cip padel na 5, medtem ko je bil 5 ur po dodatku Cip 1000-krat večji.



Slika 19: Preživetje sevov *E. coli* RW118, H13 in RW464 izpostavljenih ciprofloksacinu. RW118 kontrola in H13 kontrola, sta kulturi, ki smo ju inkubirali brez ciprofloksacina



Slika 20: Preživetje sevov *E. coli* 18, E01/121 in H54 izpostavljenih ciprofloksacinu. 18 kontrola, E01/121 kontrola in H54 kontrola, so kulture, ki smo jih inkubirali brez ciprofloksacina

Enak poskus smo opravili tudi s tetraciklinom, vendar smo ugotovili presenetljivo visoke deleže preživelih bakterij. Ti rezultati so v nasprotju s pričakovanim. Rezultatov nismo prikazali.

4.8 PREVERJANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA *lexA* SEVA H13

Da bi razjasnili, ali je višja raven izražanja genov odziva SOS seva H13 posledica mutacij v regulatorni regiji gena *lexA* oz. v genu *lexA*, smo primerjali nukleotidni zaporedji genov *lexA* sevov H13 in RW118. V ta namen smo s parom začetnih oligonukleotidov LexA in LexAP namnožili DNA *lexA* in preverili uspešnost pomnoževanja z gelsko elektroforezo. Nato smo iz elektroforeznega gela izolirali pomnoženi DNA fragment seva H13. Nukleotidno zaporedje izoliranega DNA gena *lexA* seva H13 so določili v Macrogen. S programom BLAST smo dobljena nukleotidna zaporedja primerjali z zaporedji deponiranimi v zbirki GenBank. Poravnavo smo naredili z geni *lexA* deponiranimi v tej zbirki. Ena od teh je prikazana v Prilogi E. Večje število zaporedij se razlikuje le v nekaj nukleotidih, vendar je zaporedje amino kislin enako.

4.9 PREVERJANJE PRISOTNOSTI KOLICINA E2

Znano je, da lahko kolicin E2, ki deluje kot nukleaza, izzove v producentu odziv SOS (Pugsley., 1983). Želeli smo preveriti ali sev H13 sintetizira kolicin E2. V ta namen smo s PCR pomnožili gen za sintezo kolicina E2. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili sev PC4204, ki ima plazmid pColE2. Ker smo z metodo PCR pri sevu H13 namnožili več nespecifičnih produktov, smo poskusili s testom kolicinogenosti s kloroformiranjem. Ker so bakterije imune proti kolicinu, ki ga same producirajo, bi tako z rastjo seva H13 okrog kolonij seva s plazmidom pColE2, določili da le ta producira kolicin E2. Pri tem smo na eno ploščo LB napikirali kolonije seva H13 in kot indikatorsko kulturo uporabili sev PC4204, medtem ko smo na drugo ploščo napikirali kolonije seva PC4204 ter kot indikatorsko kulturo uporabili H13.

Naši rezultati so pokazali, da je H13 neobčutljiv za kolicin seva PC4204, medtem ko je PC4204 občutljiv za kolicin, ki ga producira H13.

4.10 PREVERJANJE OBČUTLJIVOSTI SEVA H13 ZA KOLICINE A, N, E1 in E3

Odpornost proti kolicinom lahko nastane zaradi sprememb površinskih receptorjev, ki jih kolicini uporabljajo za vstop v celico (prava odpornost) ali zaradi mutacij transportnih mehanizmov, ki jih kolicini uporabljajo za prehod preko membrane v citoplazmo-toleranca (Braun in sod., 1994; Gillor in sod., 2004). Občutljivost H13 za kolicine A, N, E1 in E3 smo preverjali s testom kolicinogenosti s kloroformiranjem. Na plošče LB smo nacepili seve s kolicini in zopet kot indikatorsko kulturo uporabili H13.

H13 je neobčutljiv za vse uporabljene kolicine.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V raziskavi smo želeli preveriti ali se izražanje genov odziva SOS med sevi razlikuje in če se, ali na razlike vpliva prisotnost mobilnih genetskih elementov in bakteriofagov, ki jih imajo pogosto naravni izolati. Zanimala nas je tudi kinetika izražanja genov ob dodatku mitomicina C, ki preko poškodb DNA sproži odziv SOS. V ta namen smo z enostavnimi testi preverili, če imajo preiskovani sevi zapise za virulentne dejavnike, plazmide in bakteriofage. Na podlagi pridobljenih podatkov, smo za nadaljnje delo izbrali sev z bakteriofagom (18), sev z različnimi virulentnimi dejavniki (H13) ter sev iz skupine EHEC (E01/121). S pomočjo fuzij promotorskih regij proučevanih genov odziva SOS ter kolicinov in poročevalskega gena *gfp*, smo s fluorescentno mikroskopijo določali delež celic, ki določen gen močneje izražajo.

Produkti *lexA* in *recA*, so v celicah pomembni tudi za normalno rast, zato so njihovi promotorji stalno aktivni na nizki ravni, tudi v odsotnosti dejavnikov, ki bi poškodovali DNA. To raven izražanja imenujemo osnovno raven izražanja in je določena s fluorescenco večine celic, ki ne fluorescirajo intenzivno. Te celice smo uvrstili v skupino III. Pri fuziji promotorja *umuD* in *gfp* te skupine celic nismo zasledili, saj polimeraza, ki jo *umuD* kodira, za normalno rast ni potrebna in je ob odsotnosti dejavnikov, ki bi poškodovali DNA, močno utišana. Ob indukciji z mitomicinom C se delež celic s fuzijama *lexA-gfp* in *recA-gfp* v skupini III manjša na račun celic, ki močneje izražajo gene odziva SOS (skupini I in II).

5.1 IZRAŽANJE GENOV ODZIVA SOS

Za določanje osnovne ravni izražanja genov *lexA* in *recA* na kromosomu, smo uporabili na Katedri za molekularno genetiko pripravljene fuzije *lexA-gfp* in *recA-gfp* v samomorilskem plazmidu pAG408 z insercijsko sekvenco (IS), ki omogoča prestavljanje genov v naključno mesto na kromosomu. IS s promotorji proučevanih genov in *gfp* smo s transponibilno konjugacijo prenesli v sev H13, kjer se je le-ta le enkrat prestavila in naključno vključila v kromosom. S transformacijo smo, v proučevane seve 18, H13 in E01/121 vnesli fuzije *lexA*, *recA* in *umuD* z vektorskim plazmidom pSC101.

5.1.1 Izražanje genov *lexA* in *recA* na kromosomu in na plazmidu

Izražanje genov *lexA* in *recA-gfp* je bilo v odsotnosti dejavnikov, ki bi lahko poškodovali DNA in tako vplivali na indukcijo odziva SOS šibkejše in bolj variabilno na kromosomu

kot izražanje teh genov na plazmidu. Veliko razliko smo opazili pri sevu H13 s fuzijo *lexA-gfp*, kjer je izražanje gena *lexA* na kromosomu bilo na zelo nizki ravni, medtem ko smo pri fuziji na plazmidu opazili višjo osnovno raven izražanja te fuzije. Poleg osnovnega nivoja izražanja smo pri fuziji *lexA* na plazmidu opazili tudi celice, ki intenzivneje izražajo *lexA*, in sicer do 12 % v zgodnji stacionarni fazi rasti.

V primeru fuzije *recA-gfp* na kromosomu v primerjavi z enako fuzijo na plazmidu nismo opazili tako velikih razlik med izražanjem kromosomske in plazmidne fuzije. Rezultati kažejo nekoliko višjo osnovno raven izražanja gena *recA* na plazmidu. Vendar smo pri celicah, ki intenzivneje izražajo *recA*, v primeru fuzije na plazmidu (15,9 % celic) zaznali od 4 do 7-krat večji delež celic, ki močneje fluorescirajo v stacionarni fazi, kot pri fuziji na kromosomu.

5.1.2 Izražanje genov *lexA*, *recA* in *umuD* na plazmidu

Čeprav je bakterijska kultura sestavljena iz identičnih celic, lahko del te populacije drugače izraža določene gene, ker izvajajo specializirane funkcije (Mulec in sod, 2003). Geni odziva SOS se ne inducirajo vsi enako hitro in tudi ne do enake stopnje. Domnevajo, da so geni odziva SOS inducirani le do neke stopnje, ki celici omogoči preživetje in da se odziv SOS sproži večkrat zapored, če je število poškodb DNA preveliko, da bi jih celica popravila tekom prve indukcije odziva SOS. Za bakterijo je pomembno, da so geni odziva SOS močno uravnani. Prvi gen odziva SOS, gen *lexA*, se izraža prvi in uravnava tudi lastno izražanje. Konstantna produkcija proteina LexA omogoča takojšnjo represijo genov odziva SOS, ko so poškodbe DNA odpravljene (Janion 2001; Michel, 2005).

Rezultati prikazani v preglednici 13 pokažejo, da na osnovni ravni izražanja genov *lexA* in *recA* nekoliko izstopa sev H13, medtem ko je izražanje sevov 18 in E01/121 bolj primerljivo z laboratorijskim sevom RW118. 5,64 % celic seva H13 v eksponentni fazi rasti intenzivneje izraža gen *lexA*, medtem ko pri sevu RW118 *lexA* močneje izraža le 0,76 % celic. V zgodnji stacionarni fazi gen *lexA* pri sevu RW118 intenzivneje izraža 1,76 % celic, kar se sklada z rezultatom predhodne preiskave (Kamenšek, 2007). V zgodnji stacionarni fazi rasti pri sevu H13 približno 4,5-krat več celic močneje izraža gen *lexA* v primerjavi s sevom RW118.

Količina LexA je odvisna od faze rasti bakterije in rastnih pogojev in je posledica proteolitske cepitve LexA in večje moči promotorjev, ko celice vstopijo v stacionarno fazo. Količina LexA se povečuje med eksponentno fazo rasti in je največja v stacionarni fazi

rasti, ker je v stacionarni fazi izražanje dereprimirano in ker ni prihajalo do cepitev LexA, je tudi koncentracija večja kot v eksponentni fazi rasti (Dri in Moreau, 1993).

Podobne rezultate smo opazili tudi pri fuziji *recA-gfp*, kjer v eksponentni fazi rasti pri sevu H13 2,2-krat več celic intenzivneje izraža gen *recA* kot pri sevu RW118, v stacionarni fazi rasti je razlika večja za 4-krat. Pri sevu RW118 v stacionarni fazi gen *recA* izraža 3,56 % celic. Protein RecA je poleg cepitve dimera LexA, sodeluje tudi v procesu homologne rekombinacije, ki je neodvisna od odziva SOS, zato je ta protein v celici konstantno prisoten. Aktivnost promotorja gena *recA* je bila v primerjavi z ostalimi geni odziva SOS nekoliko večja, saj mora kot pglavilni aktivator transkripcije omogočati takojšnjo indukcijo odziva SOS ob poškodbi DNA. Zato je tudi osnovna raven izražanja gena *recA* nekoliko višja.

V primeru fuzije *umuD-gfp*, večjih razlik nismo zaznali, vendar je bila aktivnost tega gena pri vseh proučevanih sevih komaj zaznavna. Izražanje gena *umuD* je bilo v stacionarni fazi rasti največje pri sevu RW118 (0,16% celic) in je le malo večje od izražanja, ki so ga določili v predhodni raziskavi, ko so v stacionarni fazi opazili povečano izražanje gena *umuD* pri 0,09 % celic (Kamenšek, 2007). Pri sevu H13 je fuzijo *umuD-gfp* izražalo le 0,03 % celic. V obeh primerih je bila fluorescenca zelo nizka. Če v celici odziv SOS ni induciran, so geni z zapisom za SOS polimeraze, izraženi na zelo nizko ravni ali pa sploh ne. Gen *umuD* je močno reprimiran z LexA in se izraža med zadnjimi geni ob indukciji odziva SOS, v kolikor poškodbe niso popravljene. Ker kodira mutageno polimerazo je pomembno, da se ne izraža, če to ni nujno za preživetje celice.

Pri sevu RW118 smo pri vseh treh fuzijah opazili filamenotno rast celic, ki so intenzivno fluorescirale, kar kaže na močan odziv SOS. Filamentozno rast smo v stacionarni fazi opazili tudi pri sevih 18 in E01/121. V stacionarni fazi rasti celice stradajo, prisotni so stresni pogoji, kar pripelje do spontane indukcije odziva SOS. V močno induciranih celicah je prišlo do derepresije genov odziva SOS, med njimi tudi gena *sulA*, ki inhibira celično delitev in omogoči celici popravljjanje napak v DNA. Filamentozna rast je posledica sinteze proteina SulA in njegove vezave na protein FtsZ, ki na mestu septuma tvori obroč.

5.2 IZRAŽANJE KOLICINA E7

Pripravljene transkripcijske fuzije promotorjev kolicina E7, *cea7-gfp* v vektorskem plazmidu pSC101, smo s transformacijo vnesli v proučevane seve. Le majhen del

populacije sintetizira kolicin, v primeru kolicina K okrog 3 % celic v stacionarni fazi rasti (Mulec in sod., 2003). Za celico je bistvenega pomena, da so kolicini med zadnjimi izraženimi geni ob induciranjem odzivu SOS, saj tako celica pridobi čas, da popravi poškodbe DNA. V nasprotnem primeru, bi ob indukciji proteina lize vse celice populacije propadle (Šmarda in Šmajš, 1998; Janion, 2001).

V eksponentni fazi je pri sevu RW118 gen *cae7* izražalo le 0,79 % celic, v zgodnji stacionarni fazi pa 1,63 %. Naši rezultati se skladajo s predhodno raziskavo, ko je v sevu RW118 fuzijo *cae7-gfp* izražalo 1,55 % celic. V naravnih izolatih je bilo izražanje kolicinov, še manj inducirano. Pri sevu H13 je bila aktivnost promotorja gena za kolicin E7 v eksponentni fazi izražena pri manj kot 0,4 % celic, v stacionarni fazi pa pri 0,6 % celic. Seva 18 in E01/121 sta kazala največjo aktivnost promotorja in sicer je pri sevu 18 gen *cea7* izražalo 1,74 % celic in sev E01/121 1,89 % celic v zgodnji stacionarni fazi.

5.3 IZRAŽANJE GENOV SOS OB INDUKCIJI

Odziv SOS sprožijo različne genotoksične snovi, UV sevanje in drugi kemijski ter fizikalni dejavniki. V našem poskusu smo odziv SOS inducirali z dvema različnima koncentracijama Mit-C.

5.3.1 Izražanje gena *lexA* v sevih 18 in RW118 ob indukciji z Mit-C

Ob indukciji z Mit-C sta seva 18 in RW118 izkazovala podobno osnovno raven izražanja proučevanega gena odziva SOS. Poskus je pri obeh sevih potekal zelo podobno, kar nam prikazujejo rezultati kontrolne kulture, torej kulture, ki smo jo vzorčili vzporedno s kulturama, ki smo jih inkubirali z Mit-C, le da smo kontrolno kulturo inkubirali brez dodanega Mit-C. Pri obeh koncentracijah Mit-C smo 90 min po dodatku Mit-C, pri sevu z bakteriofagom (sev 18) zaznali večji delež celic, ki so fluorescirale bolj intenzivno kot pri sevu RW118. Pri večji koncentraciji Mit-C (0,5 µg/ml) smo pri sevu 18 opazili 2-krat več celic, ki so močnejše izražale fuzijo *lexA-gfp*, medtem ko je bila osnovna raven izražanja še vedno primerljiva s sevom RW118.

Ker smo za sev 18 dokazali, da ima bakteriofag, domnevamo da je povečan delež celic z intenzivnejšim izražanjem pri sevu 18 posledica prisotnosti le tega. Saj je znano, da odziv SOS uravnava prehod temperiranih bakteriofagov v litični cikel. Tako protein RecA ob indukciji odziva SOS cepi tudi represorje bakteriofagov iz družine λ . Geni bakteriofagov so ob indukciji prepisani, zaradi česar je posledično cepljena DNA bakterije, kar pripelje do močnejšega odziva SOS.

5.3.2 Izražanje genov *lexA* in *recA* v sevih H13 in RW118 ob indukciji z Mit-C

Pri obeh fuzijah *lexA-gfp* in *recA-gfp* smo ob indukciji z Mit-C (0,5 µg/ml) pri sevu H13 opazili hitrejši odziv od odziva seva RW118. Pri sevu H13 smo že po 15 minutah po dodatku Mit-C pri fuziji *lexA-gfp* zaznali približno 9 %, pri fuziji *recA-gfp* pa okrog 11% celic z močnejšim izražanjem tega gena, medtem ko smo prve celice RW118, ki *lexA* izražajo intenzivneje, zaznali šele po 30 minutah. Pri fuziji *recA-gfp* smo pri sevu RW118 sicer intenzivnejše celice opazili že po 15 minutah, vendar največ 4 %.

Pri fuziji *recA-gfp* v sevu H13 smo opazili višjo osnovno raven izražanja tega gena. V poskusih z obema fuzijama, je delež celic, ki močneje izražajo ti dve fuziji pri sevu H13 največji. Okrog 30 % več celic seva H13 je 150 min po dodatku Mit-C močneje izražalo fuzijo *lexA-gfp*, kot celic seva RW118. Pri poskusu s fuzijo *recA-gfp* so bile razlike manjše, saj je 150 min po dodatku mitomicina C, večina celic močno izražala gen *recA*. Tu so razlike največje do 60 min po dodatku Mit-C. Ob tem smo opazili, da je bilo v skupini I več celic seva RW118 kot pri H13. Skupni delež celic z močnejšim izražanjem *recA-gfp* je bil vseeno večji pri sevu H13.

V obeh poskusih so celice seva RW118, ki so fluorescirale najintenzivneje, izkazovale višjo fluorescenco od celic seva H13, bile pa so tudi izrazito daljše. Tega fenomena pri sevu H13 nismo opazili. Zakaj so razlike med tema sevoma tako velike smo poskušali razjasniti v nadaljevanju diplomske naloge.

5.3.3 Izražanje gena *umuD* v sevih H13 in RW118 ob indukciji z Mit-C

Mutageno DNA polimerazo V kodira gen *umuD*. Ker je polimeraza V mutagena, je za celico pomembno, da je med normalno rastjo gen *umuD* močno utišan. Ob indukciji odziva SOS se najprej aktivirajogeni za polimeraze, ki so natančnejše pri popravljaju poškodb. Če napake niso popravljene se šele po 40 minutah inducira izražanje gena *umuD* (Michel, 2005). V našem poskusu se pri uporabljenih pogojih gen *umuD*, ni izražal po pričakovanjih. Večjega izražanja nismo opazili niti 150 min po dodatku Mit-C. To je lahko posledica premajhne koncentracije mitomicina C v gojišču, zaradi česar je nastalo premalo poškodb in so jih celice lahko popravile z drugimi popravljanimi mehanizmi, ki se aktivirajo pred DNA polimerazo V.

5.4 H13 IN VIŠJA OSNOVNA RAVEN IZRAŽANJA GENOV SOS

Ker smo opazili pri sevu H13 povišano osnovno raven izražanja genov odziva SOS, nas je zanimalo ali to vpliva na frekvenco mutacij in število na antibiotik tolerantnih bakterij, na kar vpliva inducirani odziv SOS. Poskušali smo razložiti zakaj ima sev H13 višjo osnovno raven izražanja genov odziva SOS.

5.4.1 Določanje frekvenc mutacij

Adaptivne mutacije nastanejo zaradi okoljskega stresa ali stradanja pri celicah, ki ne rastejo ali rastejo zelo počasi in vsaj nekatere mutacije omogočajo rast (McKenzie in sod., 2000). Bakterije lahko pridobijo odpornost proti različnim antibiotikom, vključno proti antibiotikom iz skupine kinolonov (nalidiksična kislina) in rifamicinov (rifampicin), zaradi mutacij kromosomskih genov. Tako rifampicin kot ciprofloksacin (fluorokinolon) lahko inducirata odziv SOS in sta mutagena. Za nastanek mutacij je nujen inducirani odziv SOS in vse 3 SOS DNA polimeraze (Cirz in sod., 2005).

Ker so nas zanimale razlike v frekvenci mutacij med sevi, smo preverili število mutacij, ki nastanejo med rastjo na Nal in Rif. Naši rezultati so pokazali 10-krat višjo frekvenco mutacij pri sevu H13 kot pri laboratorijskem sevu RW118, uroseptičnem sevu 18 in sevu EHEC 1938/96. Višja frekvenca mutacij bi lahko bila posledica višje osnovne ravni izražanja genov odziva SOS. Zanimivo je, da je bila frekvenca mutacij za seva H54 in E01/121 10-krat višja kot seva H13, vendar vzroka ne poznamo.

5.4.2 Določanje števila na antibiotik tolerantnih bakterij

Domnevali smo, da bo pri sevu H13 zaradi višje osnovne ravni izražanja genov odziva SOS, največ preživelih celic po tretiranju s ciprofloksacinom (Cip). Cip inhibira delovanje giraze in topoizomeraze, zaradi česar nastanejo dvoverižni konci DNA. Procesiranje le teh pa pripelje do nastanka odsekov ssDNA in indukcije odziva SOS. Za nastanek na antibiotik tolerantnih bakterij (angl. persisters) je nujen delujoči odziv SOS (Dörr in sod., 2009). V ta namen smo s ciprofloksacinom tretirali *recA*⁻ sev RW464. 24 ur po dodatku Cip je preživel manj kot 10 celic na ml. S tem smo potrdili, da je delujoči odziv SOS nujen za nastanek na antibiotik tolerantnih bakterij.

24 ur po dodatku Cip je pri sevu RW118 preživel 0,004 % celic, pri sevu H13 približno 0,7 %, pri sevu 18 je tretiranje preživel 0,002 % celic, pri E01/121 0,001 % in pri sevu H54 0,007 %. Tudi ti rezultati so v skladu s prejšnjimi in kažejo povišano osnovno raven izražanja genov odziva SOS pri sevu H13.

5.4.3 Preverjanje nukleotidnega zaporedja gena *lexA* seva H13

Posledica mutacij regulatorne regije gena *lexA* ali mutacije v genu *lexA*, bi lahko bila višja raven izražanja genov odziva SOS v sevu H13.

Nukleotidno zaporedje gena *lexA* seva H13, smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji sevov deponiranih v zbirki GenBank. Poravnave so pokazale, da se gen *lexA* seva H13 razlikuje le v nekaj nukleotidih, kar pa ne spremeni aminokislinskega zaporedja. Čeprav lahko različni kodoni kodirajo isto aminokislino so nekateri manj zastopani. Če organizem uporablja preferenčne kodone ima lahko spremenjenih kodonov manj (tudi do 11-krat manj), kar je lahko omejujoči faktor sinteze proteinov. Prekinitev sinteze LexA pomeni manjšo koncentracijo proteina v celici, kar bi lahko povzročilo povečano izražanje genov odziva SOS, ki jih LexA reprimira.

5.4.4 Preverjanje prisotnosti kolicina E2

Znano je, da sevi, ki producirajo kolicin E2 z endonukleolitično aktivnostjo sintetizirajo premalo proteina imunosti. Posledično kolicin E2 cepi DNA producenta, kar izzove odziv SOS (Pugsley, 1983).

Naši rezultati so pokazali, da je H13 neobčutljiv za kolicin E2, producent kolicina E2 pa je občutljiv za kolicin, ki ga izloča H13. Glede na nespecifično pomnožene produkte, ki smo jih dobili s PCR pri sevu H13 in specifično pomnoženi fragment pri sevu s kolicinom E2, ne moremo povsem izključiti možnosti, da sev H13 ne sintetizira kolicina E2.

5.4.5 Preverjanje občutljivosti seva H13 za kolicine A, N, E1 IN E3

Bakterije so lahko odporne proti kolicinu, če nimajo receptorja, ki ga kolicin prepozna – prava odpornost, ali pa so tolerantne, ker imajo okvarjene sisteme prevzemanja. Kolicini A, E1 in E3 uporabljajo enake celične receptorje kot kolicin E2. Kolicina A in N pa receptor OmpF (preglednica 19). S tem smo želeli preveriti ali je H13 odporen proti kolicinu E2, ker ga tudi sam proizvaja ali je odporen, ker nima celičnega receptorja, ki ga uporablja kolicin E2 za prepoznavanje občutljivih celic.

Preglednica 19: Povzetek kolicinov in receptorjev, ki jih le ti prepoznavajo (Gillor in sod, 2004)

kolicin	Receptor na občutljivih celicah
Kolicin E2	BtuB
Kolicin A	BtuB, OmpF
Kolicin N	OmpF
Kolicin E1	BtuB
Kolicin E3	BtuB

Glede na to, da H13 ni občutljiv za nobenega od uporabljenih kolicinov, lahko domnevamo, da ne sintetizira kolicina E2, saj bi bilo težko verjetno, da bi bil H13 odporen na vse preverjane kolicine, ker bi sam imel zapise za vse 4 kolicine. Najverjetneje je odporen, ker nima receptorja ali ima mutiran receptor. S tem smo izključili možnost, da ima H13 višjo osnovno raven izražanja genov odziva SOS, zaradi produkcije kolicin E2.

5.5 SKLEPI

- Izražanje genov odziva SOS se med sevi razlikuje
- Preiskovani geni *lexA*, *recA*, *umuD* in geni za sintezo kolicina *cea7* izkazujejo heterogenost izražanja
- Izražanje gena *lexA* je ob indukciji z Mit-C hitrejše pri sevu z bakteriofagom (18) kot pri laboratorijskem sevu (RW118)
- Izražanje genov *lexA* in *recA* je ob indukciji z Mit-C hitrejše pri sevu z večjim številom virulentnih dejavnikov (H13) kot pri laboratorijskem sevu, ob tem smo izključili možnost, da je višje izražanje *lexA* in *recA* na osnovni ravni posledica prisotnosti kolicina E2
- Izražanje gena *umuD* je v odsotnosti dejavnikov, ki bi lahko poškodovali DNA, močno utišano in tudi ob indukciji z Mit-C pod uporabljenimi pogoji ostane na zelo nizki ravni
- Frekvenca mutacij je 10× višja pri sevu, pri katerem se osnovni nivo odziva SOS izraža na višji ravni (H13), kakor pri laboratorijskem sevu
- Pojav na antibiotik tolerantnih bakterij je posledica indukcije odziva SOS
- Delež preživelih po tretiranju z antibiotikom, ki vpliva na nastanek poškodb DNA (Cip), je večji v sevu z višjim izražanje odziva SOS na osnovni ravni (sev H13)

6 POVZETEK

Odziv SOS je odgovor na poškodovano DNA. Negativni regulator odziva SOS protein LexA uravnava izražanje preko 40 genov. Drugi pomemben protein, ki ima poleg LexA ključno vlogo v regulaciji odziva SOS je pozitiven regulator RecA. Protein RecA prepozna ssDNA in se nanjo veže v obliki filamena. Pod normalnimi pogoji, v odsotnosti poškodb DNA, so geni odziva SOS reprimirani. Indukcija odziva SOS je lahko posledica stohastičnih dogodkov v celici ali eksogenih dejavnikov, ki pripeljejo do poškodbe DNA. Ob poškodbah DNA nastanejo enoverižni konci DNA, na katere se veže RecA. Aktivirani protein RecA posreduje avtokatalitično cepitev dimera LexA, vezanega na specifična zaporedja regulatorne regije genov, ki jih reprimira, kar sproži izražanje genov odziva SOS. Ko so poškodbe odpravljene, se zmanjša količina aktiviranega proteina RecA in konstantno sintetizirani protein LexA se akumulira ter utiša gene odziva SOS.

Vsi geni odziva SOS niso izraženi enako hitro in na enaki ravni. Najprej se izražajo geni, katerih produkti so vpleteni v popraviljanje poškodb brez napak. Kasneje, če poškodbe niso popravljene, se izražajo geni, ki kodirajo mutagene polimeraze, ki celici omogočijo preživetje, vendar na račun mutacij. Med zadnjimi izraženimi geni so tudi geni z zapisi za kolicine. LexA uravnava izražanje tudi drugih genov. Aktivirani RecA sproži cepitev bakteriofagnih represorjev (bakteriofagi iz družine λ), ki preidejo iz lizogenega v litični cikel. Odziv SOS vpliva tudi na nastajanje in širjenje odpornosti proti antibiotikom ter širjenje virulentnih dejavnikov z mobilnimi genetskimi elementi.

Čeprav so bakterijske populacije določenega seva sestavljene iz genetsko identičnih bakterijskih celic, se v delu populacije določeni geni drugače izražajo, kot posledica stohastičnih dogodkov v celici ali stresnega okolja. Zanimalo nas je ali se geni odziva SOS pri različnih naravnih izolatih *E. coli* izražajo drugače in če na njihovo izražanje vplivajo bakteriofagi in mobilni genetski elementi, ki so pogosto prisotni pri naravnih izolatih. V ta namen smo v seve vnesli fuzije promotorjev genov *lexA*, *recA* in *umuD* ter kolicin E7 s poročevalskim genom za zeleni fluorescirajoči protein-*gfp*. Izražanje fuzij smo opazovali s fluorescentno mikroskopijo v odsotnosti dejavnikov, ki bi lahko poškodovali DNA. Ugotovili smo, da je izražanje genov odziva SOS in gena *cea7* heterogeno in odvisno od spontanega odziva SOS, ki je lahko posledica endogenih dejavnikov, ki povzročijo zaustavitev replikacijskih vilic in nastanek ssDNA. Do razlik v izražanju prihaja tudi na račun kompleksnosti uravnave genov odziva SOS z represorjem LexA.

Ker nas je zanimala tudi kinetika odziva SOS, smo odziv SOS inducirali z Mit-C, ki se interkalira med baze v verigi DNA. Naši rezultati kažejo, da je v sevu 18 v primerjavi z laboratorijskim sevom RW118, na račun bakteriofaga, 90 min po dodatku Mit-C večji delež celic, ki gen *lexA* izražajo intenzivneje. Podobne rezultate smo opazili tudi ob

indukciji seva H13, ki ima več različnih virulentnih dejavnikov. V obeh primerih smo opazili tudi hitrejši odziv na dodatek Mit-C pri naravnih izolatih v primerjavi z RW118. Opazili smo tudi povišano osnovno izražanje genov odziva SOS pri sevu H13, kar smo poskušali tudi razložiti. Možno je, da je višja osnovna raven izražanja genov odziva SOS posledica številnih plazmidov, ki smo jih opazili pri tem sevu, vendar bodo za natančnejšo razlago potrebne nadaljnje raziskave.

7 VIRI

- Adams W.D., Errington J. 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 642-653
- Aertsen A., Van Houdt R., Vanoirbeek K., Michiels C. W. 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186, 18: 6133-6141
- Ambrožič J., Ostrovršnik A., Starčič M., Kuhar I., Grabnar M., Žgur-Bertok D. 1998. *Escherichia coli* ColV plasmid pRK100: genetic organization, stability and conjugal transfer. *Microbiology*, 144, 2: 343-352
- Andlovic A. 2002. *Escherichia coli*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185-188
- Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305: 1622-1625
- Beaber J.W. 2004 SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427, 72-74
- Berg O.G., von Hippel P.H. 1988. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins: II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *Journal of Molecular Biology*, 200, 4: 709-723
- Bigger J. W. 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet*, 244: 497-500
- Bjedov I., Lecointre G., Tenaillon O., Vaury C., Radman M., Taddei F., Denamur E., Matic I. 2003. Polymorphism of genes encoding SOS polymerases in natural populations of *Escherichia coli*. *DNA Repair*, 2: 417-426
- Braun V., Patzer S.I., Hantke P. 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, 84: 365-380
- Braun V., Pilsl H., Groß P. 1994. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Microbiology*, 161: 199-206
- Bridges B.A., Woodgate R. 1985. Mutagenic repair in *Escherichia coli*: Products of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 4193-4197

- Chan P.T., Ohmori H., Tomizawa J., Lebowitz J. 1985. Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 8925-8935
- Cirz R.T., Chin J.K., Andes D.R., de Crécy-Lagard V., Craig W.A., Romesberg F.E. 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biology*, 3, 6: 1024-1033
- Cohen S.N., Chang A.C. 1977. Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *Journal of Bacteriology*, 132,2: 734-737
- Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173: 33-38
- D'Ari R., Huisman O. 1983. Novel mechanism of cell division inhibition associated with the SOS response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 156, 1: 243-250
- Debbia E.A., Roveta S., Schito A.M., Gualco L., Marchese A. 2001. Antibiotic persistence: The role of spontaneous DNA repair response. *Microbial Drug Resistance*, 7, 4: 335-342
- De Lorenzo V., Timmis K.N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods in Enzymology*, 235: 386-405
- Dörr T., Lewis K., Vulić M. 2009. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PloS Genetics*, 5,12: 1-9
- Dri A. M., Moreau P.L. 1993. Phosphate starvation and low temperature as well as ultraviolet irradiation transcriptionally induce the *Escherichia coli* LexA-controlled gene *sfiA*. *Molecular Microbiology*, 8, 4:697-706
- Emödy L., Kerenyi M., Nagy G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 29- 33
- Fernaández 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
- Gillor O., Kirkup C.B., Riley M.A. 2004. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 54: 129-146
- Gu J., Liu Y., Yu S., Wang H., Wang Q., Yi Y., Zhu F., Yu X., Zou Q., Mao X. 2009. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA,

- intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. *Microbes and Infection*, 11: 835-841
- Guerin E., Cambray G., Sanchez-Alberola N., Campoy S., Erill I., Da Re S., Gonzales-Zorn B., Barbe J., Ploy C., Mazel C. 2009. The SOS response controls integron recombination. *Science*, 324:1034-1034
- Hastings P.J., Rosenberg S.M., Slack A. 2004. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 12, 9: 401-404
- Henderson-Begg S.K., Livermore D.M., Hall L. M.C. 2006. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 849-854.
- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Molekularna biologija. Ljubljana. Študentska založba: 11-11
- Janion C. 2001. Some aspects of the SOS response system -A critical survey. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 3: 599-610
- Janion C. 2008. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences*, 4, 6: 338-344
- Jayaraman R. 2008. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *Journal of Biosciences*, 33: 795-805
- Jerman B., Butala M., Žgur-Bertok D. 2005. Sublethal concentrations of ciprofloxacin induce bacteriocin synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 7: 3087-3090
- Kamenšek S. 2007. Izražanje od proteina LexA odvisnih genov bakterije *Escherichia coli* na ravni posameznih celic. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za molekularno genetiko in mikrobiologijo: 52-62
- Kamenšek S. 2008. Plazmidi s pripravljenimi fuzijami genov odziva SOS in *gfp*. Ustni vir. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za molekularno genetiko in mikrobiologijo.
- Kaper J.B. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 103-108
- Kelly W.L. 2006. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Molecular Microbiology*, 62, 5: 1228-1238

- Kenyon C.J., Walker G.C. 1980. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77, 5: 2819-2823
- Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. 2003. Persister cells and tolerance to antimicrobials. FEMS Microbiology Letters, 230:13-18
- Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K. 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 189, 24: 8172-8180
- Koch W.H., Woodgate R. 1998. The SOS response. V: DNA damage and repair. Vol. 1: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes. Nickoloff J.A., Hoekstra M.F. (eds.). Totowa, Humana Press Inc.: 107-134
- Kuhar I., Žgur-Bertok D. 1999. Transcription regulation of the colicin K *cka* gene reveals induction of colicin K synthesis by differential responses to environmental signals. Journal of Bacteriology, 181, 23: 7373-7380
- Lazzaroni J.C., Dubuisson J. F., Vianney A. 2002. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. Biochimie, 84: 391–397
- Lewin B. 2004. Genes VIII. 8th ed. Upper Saddle River, Pearson Education: 911-914, 928-948, 1247-1247
- Maiques E., Úbeda C., Campoy S., Salvador N., Lasa Í., Novick R.P., Barbé J., Penadés J.R. 2006. β -Lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 188, 7: 2726–2729
- Marrs C.F., Zhang L., Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiology Letters, 252: 183-190
- McKenzie G.J., Reuben H.S., Lee P. L., Rosenberg s. M. 2000. The SOS response regulates adaptive mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 12:6646-6651
- Meyer R. 2000. Identification of the *mob* genes of plasmid pSC101 and characterization of a hybrid pSC101-R1162 system for conjugal mobilization. Journal of Bacteriology, 182, 17: 4875-4881
- Michel B. 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. PLoS Biology, 3,7: 1174-1176

- 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*, 305:1629–1631.
- Morlon J., Chartier M., Bidaud M., Lazdunski C. 1988. The complete nucleotide sequence of the colicinogenic plasmid ColA. High extent of homology with ColE1. *Molecular & General Genetics*, 211: 231-243
- Mulec J., Podlesek Z., Mrak P., Kopitar A., Ihan A., Žgur-Bertok D. 2003. A *cka-gfp* transcriptional fusion reveals that the colicin K activity gene is induced in only 3 percent of the population. *Journal of Bacteriology*, 185, 2: 654–659
- Perwez T., Meyer R.J. 1999. Stabilization of the relaxosome and stimulation of conjugal transfer are genetically distinct functions of the R1162 protein MobB. *Journal of Bacteriology*, 181: 2124-2131
- Pugsley A.P. 1983. Autoinduced synthesis of colicin E2. *Molecular and General Genetics*, 190: 379-383
- Radman M., 1975. SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Science*, 5A: 355-367
- Rey J., Sanchez S., Blanco J.E., Hermoso de Mendoza J., Hermoso de Mendoza M., Garcia A., Gil C., Tejero N., Rubio R., Alonso J.M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 212 – 217
- Rijavec M. 2004. Analiza uropatogenih sevov *Escheichia coli* za prisotnost plazmidov, kolicinov in sistema prevzema železa *iro*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za molekularno genetiko in mikrobiologijo: 1-66
- Robin A., Joseleau-Petit D., D'Ari R. 1990. Transcription of the *ftsZ* gene and cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 3: 1392-1399
- Ronen M., Rosenberg R., Shraiman B.I., Alon U. 2002. Assigning numbers to the arrows: Parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16: 10555-10560
- Schnarr M., Oertel-Buchheit P., Kazmaier M., Granger-Schnarr M. 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie*, 73: 423-431

- Scion Corporation. 2009. Scion image for windows. Washington D.C., Scion Corporation.
http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm (software)
- Selinummi J., Seppälä J., Yli-Harja O., Puhakk A.P. 2005. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. *Bio techniques*, 39, 6: 859-863
<http://sites.google.com/site/cellsoftware/> (junij 2009)
- Shah D., Zhang Z., Khodursky A.B., Kaldalu N., Kurg K., Lewis K. 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E.coli*. *BMC Microbiology*, 6: 53-61
- Simmons L.A., Foti J.J., Cohen S.E., Walker G.C. 2008. The SOS regulatory network. *EcoSal Module 5.4.3*. Cambridge. Washington, D.C. ASM Press: 1-18
- Starčič M.E., Gaastra W., van Putten J., Žgur-Bertok D. 2003. Identification of the origin of replications and partial characterization of plasmid pRK100. *Plasmid*, 50, 2: 102–112
- Suarez A., Güttler A., Strätz M., Staendner L.H., Timmins K.N., Guzmán C.A. 1997. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene*, 196: 69-74
- Šmarda J., Šmajš D. 1998. Colicins – exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 43, 6: 563-582
- Úbeda C., Maiques E., Knecht E., Lasa Í., Novick R.P., Penades J.R. 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Molecular Microbiology*, 56:836–844
- Van Hauten B. 1990. Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 54, 1: 18-51
- Waldor M.K., Friedman D.I. 2005. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 459-465
- Walker G.C. 1984. Mutageneses and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 48, 1: 60-93

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok za odlično vodenje pri laboratorijskem delu ter nasvete in pomoč pri pisanju diplomske naloge ter recenzentki prof. dr. Ines Mandić-Mulec za koristne nasvete pri pisnem delu naloge.

Hvala Simoni Kamenšek za plazmide s fuzijami ter pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim na katedri za molekularno genetiko in mikrobiologijo za potrpežljivost in pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala NIB-u, ker so mi omogočili mikroskopiranje.

Zahvala velja tudi družini in prijateljem za podporo in vse potrpljenje v času študija ter za pomoč pri pisanju diplomske naloge.

PRILOGE

Priloge A: Izražanje promotorjev genov odziva SOS s fuzijami na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu, meritve OD₆₀₀ in rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami na kromosomu

V prilogah A1 in A2 so prikazani rezultati izražanja fuzij *lexA* in *recA* z *gfp* v sevu H13 na kromosomu v primerjavi z izražanjem na plazmidu.

Priloga A1: Izražanje promotorjev genov odziva SOS s fuzijami na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu

		I		II		III*	Št. celic
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	
Fuzija na plazmidu	H13 <i>lexA-gfp</i>						
	- eksponentna faza rasti	101-135	0,04	38-90	8,24	21-37	2426
	- stacionarna faza rasti	0	0	38-113	11,6	24-37	3886
	H13 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	111-137	0,57	38-104	9,5	21-37	2109	
- stacionarna faza rasti	122-155	0,06	40-109	15,9	24-39	3447	
Fuzija na kromosomu	H13 <i>lexA-gfp</i>						
	- eksponentna faza rasti	0	0	0	0	11-23	1942
	- stacionarna faza rasti	0	0	0	0	12-36	2991
	H13 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	100-164	0,11	36-95	2,50	19-35	2688	
- stacionarna faza rasti	111-140	0,04	40-110	4,10	22-39	4551	

*velika večina celic kaže nižjo fluorescenco

Priloga A2: Izražanje promotorjev genov odziva SOS s fuzijami na kromosomu v primerjavi z izražanjem fuzij na plazmidu (ponovitev)

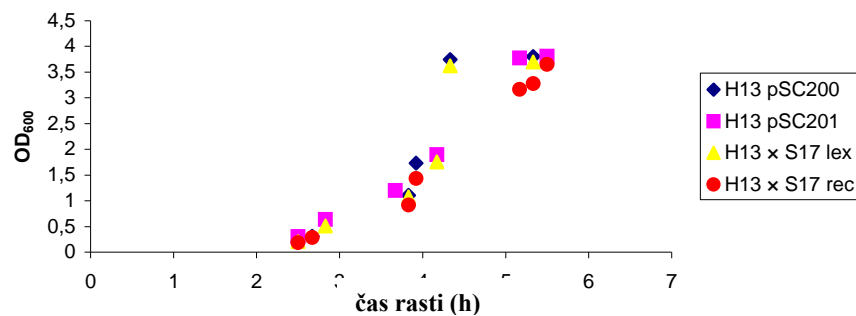
	ponovitev	I		II		III*	Št. celic
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	odstotek	
Fuzija na plazmidu	H13 <i>lexA-gfp</i>						
	- eksponentna faza rasti	0	0	30-78	5,64	19-29	3156
	- stacionarna faza rasti	0	0	38-95	7,89	21-37	5187
	H13 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	120-138	0,02	38-109	5,79	20-37	4649	
- stacionarna faza rasti	111-139	0,19	38-100	15,2	24-37	3652	
Fuzija na kromosomu	H13 <i>lexA-gfp</i>						
	- eksponentna faza rasti	0	0	0	0	12-26	2753
	- stacionarna faza rasti	0	0	0	0	13-36	2663
	H13 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	0	0	30-97	1,90	13-29	2268	
- stacionarna faza rasti	0	0	30-100	2,52	13-29	2978	

*velika večina celic kaže nižjo fluorescenco

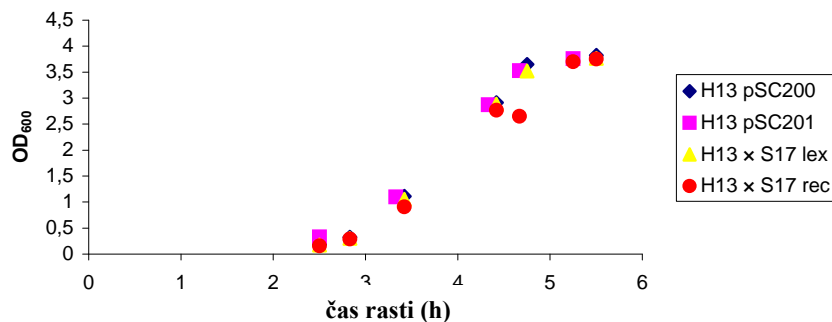
V prilogi A3 so zbrane meritve OD₆₀₀ sevov s fuzijami promotorjev genov SOS odziva z *gfp* na plazmidu in kromosomu. V prilogi A4 so prikazane rastne krivulje sevov z genskimi fuzijami na plazmidu in kromosomu in v prilogi A5 rastne krivulje ponovljenega poskusa.

Priloga A3: Meritve OD₆₀₀ za sev *E. coli* H13 s fuzijami *lexA-gfp* in *recA-gfp* na plazmidu in kromosomu

OD ₆₀₀					OD ₆₀₀ (ponovitev)				
čas (h)	H13 pSC200	H13 pSC201	H13 IS50 (<i>lexA-gfp</i>)	H13 IS50 (<i>recA-gfp</i>)	čas (h)	H13 pSC200	H13 pSC201	H13 IS50 (<i>lexA-gfp</i>)	H13 IS50 (<i>recA-gfp</i>)
2,50	0,211	0,307	0,204	0,189	2,50	0,187	0,332	0,174	0,154
2,67	0,312	-	-	0,288	2,83	0,326	-	0,302	0,287
2,83	-	0,635	0,512	-	3,33	-	1,103	-	-
3,67	-	1,201	-	-	3,42	1,110	-	1,052	0,911
3,83	1,107	-	1,078	0,920	4,33	-	2,872	-	-
3,92	1,731	-	-	1,431	4,42	2,912	-	2,884	2,770
4,17	-	1,897	1,754	-	4,67	-	3,525	-	2,65
4,33	3,744	-	3,620	-	4,75	3,650	-	3,520	-
5,17	-	3,772	-	3,165	5,25	-	3,760	-	3,70
5,33	3,802	-	3,698	3,275	5,50	3,820	-	3,762	3,754
5,50	-	3,812	-	3,650	-	-	-	-	-



Priloga A4: Rastne krivulje seva *E. coli* H13 s fuzijami *lexA-gfp* in *recA-gfp* na plazmidu in kromosomu



Priloga A5: Rastne krivulje seva *E. coli* H13 s fuzijami *lexA-gfp* in *recA-gfp* na plazmidu in kromosomu (ponovitev)

Priloge B: Izražanje promotorjev genov SOS s fuzijami na plazmidu, meritve OD₆₀₀ in rastne krivulje

Priloga B1: Izražanje promotorjev genov SOS s fuzijami na plazmidu

	I		II		III*	št. celic
	svetlnost	intenzivne celice (%)	svetlnost	intenzivne celice (%)	svetlnost	
RW118 <i>lexA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	0	0	31-60	0,76	13-30	2879
- stacionarna faza rasti	120-156	0,03	36-93	1,76	16-35	3691
H13 <i>lexA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	0	0	30-78	5,64	19-29	3156
- stacionarna faza rasti	0	0	38-95	7,89	21-37	5187
18 <i>lexA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	0	0	27-44	0,46	11-26	1897
- stacionarna faza rasti	0	0	30-60	1,69	11-30	3523
E01/121 <i>lexA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	0	0	0	0	12-30	3212
- stacionarna faza rasti	0	0	31-64	2,79	17-30	3441
RW118 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	0	0	38-90	2,61	17-37	2898
- stacionarna faza rasti	130-199	0,28	38-125	3,56	17-37	3266
H13 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	120-138	0,02	38-109	5,79	20-37	4649
- stacionarna faza rasti	111-139	0,19	38-100	15,2	24-37	3652
18 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	60-104	0,12	27-48	1,13	15-26	2671
- stacionarna faza rasti	66-121	0,11	33-55	1,48	15-32	2900
E01/121 <i>recA-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	80-144	1,21	36-73	2,09	15-35	3160
- stacionarna faza rasti	85-121	1,15	34-57	2,31	15-33	2820
RW118 <i>umuD-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	-	-	-	-	-	-
- stacionarna faza rasti	0	0	11-17	0,16	0	2543
H13 <i>umuD-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	-	-	-	-	-	-
- stacionarna faza rasti	0	0	11-16	0,03	0	2917
18 <i>umuD-gfp</i>						
- eksponentna faza rasti	-	-	-	-	-	-
- stacionarna faza rasti	0	0	12-18	0,04	0	2556

*velika večina celic kaže nižjo fluorescenco, - nismo vzorčili

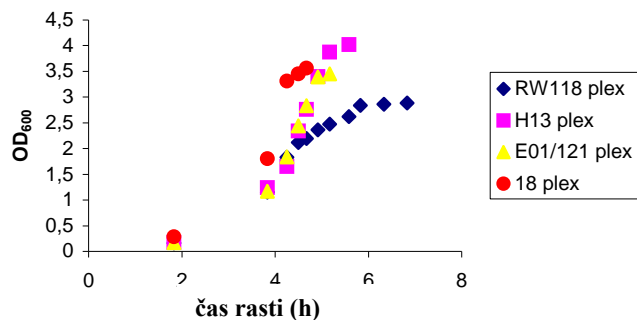
V prilogah B2, B4 in B6 so zbrane meritve OD₆₀₀ sevov s fuzijami promotorjev genov SOS odziva z *gfp* na plazmidu. V prilogah od B3, B5 in B7 so prikazane rastne krivulje sevov s fuzijami na plazmidu.

Priloga B2: Meritve OD₆₀₀ za seve *E. coli* s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu

čas (h)	OD ₆₀₀			
	RW118 pSC200	H13 pSC200	E01/121 pSC200	18 pSC200
1,83	0,162	0,174	0,171	0,289
3,83	1,151	1,241	1,172	1,8
4,25	1,832	1,648	1,836	3,312
4,50	2,121	2,34	2,442	3,450
4,67	2,194	2,763	2,831	3,561
4,92	2,366	3,402	3,395	-
5,17	2,475	3,875	3,452	-
5,58	2,622	4,02	-	-
5,83	2,84	-	-	-
6,33	2,86	-	-	-
6,83	2,882	-	-	-

- nismo vzorčili

odebeljen tisk: vzorčili in mikroskopirali

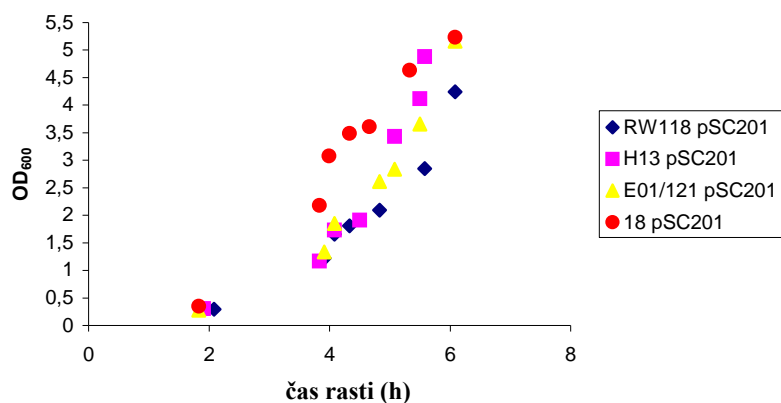


Priloga B3: Rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu

Priloga B4: Meritve OD₆₀₀ za seve *E. coli* s fuzijami *recA-gfp* na plazmidu

čas (h)	OD ₆₀₀			
	RW118 pSC201	H13 pSC201	E01/121 pSC201	18 pSC201
1,83	-	-	0,278	0,352
1,91	-	0,304	-	-
2,08	0,295	-	-	-
3,83	-	1,168	-	2,181
3,91	1,220	-	1,336	-
3,99	-	-	-	3,080
4,08	1,655	1,732	1,855	-
4,33	1,812	-	-	3,490
4,50	-	1,915	-	-
4,66	-	-	-	3,610
4,83	2,095	-	2,615	-
5,08	-	3,435	2,840	-
5,33	-	-	-	4,635
5,50	-	4,115	3,660	-
5,58	2,850	4,880	-	-
6,08	4,240	-	5,16	5,230

- nismo vzorčili, **odebeljen tisk:** vzorčili in mikroskopirali



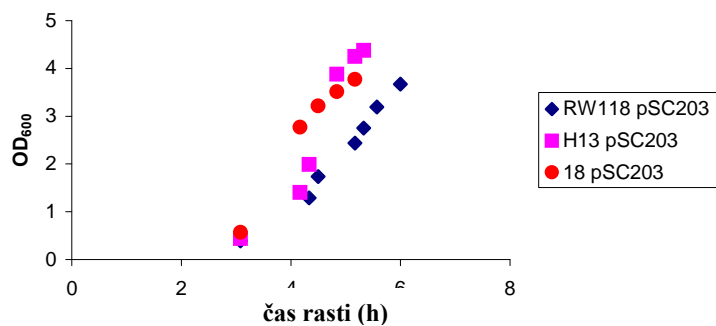
Priloga B5: Rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami *recA-gfp* na plazmidu

Priloga B6: Meritve OD₆₀₀ za seve *E. coli* s fuzijami *umuD-gfp* na plazmidu

čas (h)	OD ₆₀₀		
	RW118 pSC203	H13 pSC203	18 pSC203
3,08	0,392	0,443	0,57
4,17	-	1,404	2,77
4,33	1,289	1,992	-
4,50	1,740	-	3,215
4,84	-	3,876	3,515
5,17	2,436	4,250	3,770
5,33	2,755	4,379	-
5,57	3,190	-	-
6,00	3,670	-	-

- nismo vzorčili

odebeljen tisk: vzorčili in mikroskopirali



Priloga B7: Rastne krivulje sevov *E. coli* s fuzijami *umuD-gfp* na plazmidu

Priloge C: Rezultati izražanja genov odziva SOS ob indukciji in meritve OD₆₀₀ sevov s fuzijami na plazmidu

V prilogi C1 in C2 so prikazani rezultati izražanja fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji pri sevih RW118 in 18.

Priloga C1: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu RW118

		I		II		III	Št. celic
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	
OD₆₀₀=0,3		0	0	0	0	11-31	1321
Brez Mit-C	15'	0	0	36-64	0,31	11-32	1937
	30'	0	0	36-81	0,52	12-35	1244
	60'	0	0	0	0	12-36	577
	90'	0	0	50-85	0,61	13-36	3268
0,25 µg/ml Mit-C	15'	0	0	0	0	12-31	735
	30'	0	0	31-55	2,94	17-30	1493
	60'	0	0	31-60	11,2	21-30	1523
	90'	0	0	41-106	11,8	23-40	2141
0,5 µg/ml Mit-C	15'	0	0	32-64	2,12	14-31	849
	30'	0	0	35-76	4,11	22-31	1677
	60'	0	0	35-78	7,32	24-34	1353
	90'	0	0	41-104	24,4	28-40	1562

Priloga C2: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu 18

		I		II		III	Št. celic
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	
OD₆₀₀=0,3		0	0	0	0	11-22	1676
Brez Mit-C	15'	0	0	30-45	0,42	11-26	1421
	30'	0	0	27-55	0,25	11-26	1610
	60'	0	0	27-41	0,30	13-26	1655
	90'	0	0	32-83	0,62	13-31	2594
0,25 µg/ml Mit-C	15'	0	0	30-41	0,12	12-24	856
	30'	0	0	32-41	0,26	12-31	1170
	60'	0	0	31-63	6,92	17-30	1546
	90'	0	0	40-83	16,6	26-39	1717
0,5 µg/ml Mit-C	15'	0	0	27-45	4,70	17-26	956
	30'	0	0	30-81	4,50	19-29	1643
	60'	0	0	36-64	8,68	19-35	1543
	90'	0	0	44-100	48,9	27-43	2367

V prilogah C3 in C4 so prikazani rezultati izražanja fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji pri sevih RW118 in H13 ter v prilogah C5 in C6 fuzije *recA-gfp* ob indukciji.

Priloga C3: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu *E. coli* RW118

		RW118 <i>lexA-gfp</i>					ponovitev					št. celic
		I		II		III	I		II		III	
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	
OD₆₀₀=0,3		0	0	0	0	12-26	0	0	0	0	13-28	2484
Brez Mit-C	15'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60'	0	0	0	0	12-26	0	0	31-60	0,80	19-30	3879
	90'	0	0	0	0	10-26	0	0	76-90	0,05	21-31	3027
	120'	0	0	27-41	0,06	10-26	0	0	42-86	0,49	28-41	2230
	150'	0	0	0	0	10-36	0	0	40-90	0,17	29-39	2797
0,25 µg/ml Mit-C	15'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60'	0	0	33-62	2,01	16-32	0	0	41-93	5,60	24-40	3845
	90'	0	0	34-88	9,13	16-33	0	0	41-83	8,65	21-40	2629
	120'	0	0	41-60	12,2	13-40	0	0	42-113	9,41	27-41	2161
	150'	0	0	43-102	26,4	27-42	0	0	43-119	39,3	24-42	2261
0,5 µg/ml Mit-C	15'	0	0	0	0	12-34	0	0	43-74	0,18	19-35	2087
	30'	0	0	0	0	10-23	0	0	43-107	5,40	20-42	2531
	60'	0	0	34-50	10,7	12-33	0	0	45-64	3,21	21-44	2966
	90'	0	0	36-71	22,7	12-35	0	0	46-89	23,9	29-45	3580
	120'	-	-	-	-	-	0	0	46-121	35,4	27-45	1747
	150'	0	0	41-102	67,4	19-40	0	0	46-128	43,6	33-45	2760

-nismo vzorčili

Priloga C4: Izražanje fuzije *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji z Mit-C pri sevu *E. coli* H13

		H13 <i>lexA-gfp</i>					ponovitev					Št. celic
		I		II		III	I		II		III	
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	
OD₆₀₀=0,3		0	0	0	0	11-31	0	0	0	0	11-32	1884
Brez Mit-C	15'	0	0	0	0	11-31	-	-	-	-	-	1113
	30'	0	0	0	0	11-40	-	-	-	-	-	994
	60'	0	0	42-52	0,29	12-40	0	0	41-47	0,7	16-40	2810
	90'	0	0	0	0	10-36	0	0	38-60	3,6	17-37	3733
	120'	0	0	0	0	10-35	-	-	-	-	-	972
	150'	0	0	0	0	10-34	0	0	36-64	4,8	21-35	3323
0,25 µg/ml Mit-C	15'	0	0	0	0	12-30	0	0	41-62	4,8	24-40	2634
	30'	0	0	32-78	12,5	16-31	0	0	41-88	9,03	16-40	3411
	60'	0	0	41-78	7,91	17-40	0	0	41-85	10,7	22-40	3188
	90'	0	0	41-55	9,23	16-40	0	0	57-102	14,7	22-56	2508
	120'	0	0	41-69	15,7	22-40	0	0	57-104	18,4	28-56	2381
	150'	0	0	41-107	33,9	26-40	0	0	58-116	65,3	35-57	2832
0,5 µg/ml Mit-C	15'	0	0	31-62	8,73	17-30	0	0	30-60	9,91	17-29	3085
	30'	0	0	32-67	9,82	17-31	0	0	30-67	15,7	19-29	3438
	60'	0	0	44-109	94,7	19-43	0	0	45-85	12,7	25-44	2238
	90'	139-156	0,25	41-123	79,8	22-40	0	0	46-95	76,6	27-45	3070
	120'	0	0	41-119	84,9	22-40	0	0	46-104	83,9	29-45	1685
	150'	0	0	41-119	93,0	31-40	0	0	46-104	91,1	29-45	910

-nismo vzorčil

Priloga C5: Izražanje fuzije *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji z mitomicinom C pri sevu *E. coli* RW118

		RW118 <i>recA-gfp</i>					ponovitev					Št. celic
		I		II		III	I		II		III	
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	
OD₆₀₀=0,3		0	0	39-88	1,27	18-38	104-180	0,06	38-71	1,98	16-37	2949
Brez Mit-C	15'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60'	0	0	37-102	2,90	19-36	97-201	0,20	38-93	3,03	19-37	2975
	90'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	120'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	150'	120-182	0,25	38-88	3,70	19-37	-	-	-	-	-	2433
0,25 µg/ml Mit-C	15'	120-154	0,34	37-68	2,23	18-36	76-95	0,08	38-53	1,36	18-37	2994
	30'	120-137	0,14	40-87	6,01	24-39	130-191	0,11	52-121	6,68	28-51	2484
	60'	125-201	2,90	46-117	83,1	29-45	130-221	4,17	48-125	92,6	30-47	3755
	90'	130-181	17,9	51-125	65,0	33-50	132-196	21,6	57-131	76,4	33-56	2188
	120'	130-212	24,0	51-125	67,1	33-50	-	-	-	-	-	809
	150'	135-206	27,2	53-125	68,5	38-52	-	-	-	-	-	563
0,5 µg/ml Mit-C	15'	115-154	0,08	37-77	4,33	18-36	115-145	0,25	35-52	1,51	15-34	4103
	30'	0	0	46-111	7,94	19-45	134-168	0,07	50-117	9,11	21-49	3797
	60'	120-206	4,27	53-113	83,1	33-52	120-178	14,4	55-115	80,3	33-54	1991
	90'	121-199	8,57	53-118	82,1	33-52	134-181	14,9	55-118	81,4	33-54	3178
	120'	121-201	12,2	53-118	83,4	38-52	-	-	-	-	-	516
	150'	121-187	14,2	53-118	82,9	38-52	-	-	-	-	-	546

-nismo vzorčili, pri časih nad 90 minut po dodatku mitomicina C, ni bilo več smiselno vzorčit, saj je večina celic izražala fuzijo *recA-gfp* na zelo visoki ravni

Priloga C6: Izražanje fuzije *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji z mitomicinom C pri sevu *E. coli* H13

		H13 <i>recA-gfp</i>					ponovitev					Št. celic
		I		II		III	I		II		III	
		svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	intenzivne celice (%)	svetilnost	
OD₆₀₀=0,3		0	0	38-90	7,19	18-37	120-147	0,2	40-102	8,55	21-39	2771
Brez Mit-C	15'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60'	0	0	38-100	14,1	21-37	0	0	39-100	13,8	21-38	3102
	90'	-	-	-	-	-	120-153	0,43	43-108	14,2	21-42	2815
	120'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	150'	0	0	43-104	13,8	24-42	-	-	-	-	-	2375
0,25 µg/ml Mit-C	15'	0	0	40-95	12,4	28-39	0	0	39-102	11,5	24-38	3277
	30'	0	0	40-97	7,98	28-39	0	0	41-109	14,6	25-40	3015
	60'	139-176	0,14	64-125	32,2	40-63	120-153	0,64	62-107	24,7	39-61	3617
	90'	128-146	0,32	64-120	83,2	47-63	120-158	1,68	64-111	83,0	47-63	2862
	120'	125-145	2,15	78-120	80,5	64-77	-	-	-	-	-	977
	150'	125-166	11,1	87-120	82,1	71-86	-	-	-	-	-	1380
0,5 µg/ml Mit-C	15'	97-115	0,06	46-85	11,6	28-45	137-170	0,08	47-113	10,1	26-44	2868
	30'	0	0	45-100	17,0	30-44	111-136	0,27	45-111	18,3	28-44	3458
	60'	106-139	0,22	50-100	90,4	30-49	120-141	0,77	50-115	88,2	38-49	4139
	90'	120-160	1,55	58-115	94,9	43-57	120-172	16,8	57-115	82,1	43-56	1697
	120'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	150'	120-158	6,67	71-120	91,4	60-70	122-177	17,8	73-114	79,0	60-72	954

- nismo vzorčili, pri časih nad 90 minut po dodatku mitomicina C, ni bilo več smiselno vzorčit, saj je večina celic izražala fuzijo *recA-gfp* na zelo visoki ravni

V prilogah C7-C9 so prikazane meritve OD₆₀₀ za seve *E. coli* s fuzijami promotorjev genov SOS z *gfp* na plazmidu ob indukciji.

Priloga C7: Meritve OD₆₀₀ za seva *E. coli* 18 in RW118 s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji

	18 <i>lexA-gfp</i>			RW118 <i>lexA-gfp</i>		
	brez	0,25 µg/ml Mit-C	0,5 µg/ml Mit-C	brez	0,25 µg/ml Mit-C	0,5 µg/ml Mit-C
t ₀	0,320			0,291		
15'	0,618	0,613	0,616	0,490	0,491	0,484
30'	0,734	0,719	0,716	0,639	0,650	0,613
60'	1,082	1,104	1,089	0,845	0,890	0,868
90'	1,825	1,850	1,710	1,940	1,985	1,855

Priloga C8: Meritve OD₆₀₀ za seva *E. coli* H13 in RW118 s fuzijami *lexA-gfp* na plazmidu ob indukciji

		OD ₆₀₀		OD ₆₀₀ ponovitev	
		H13 <i>lexA-gfp</i>	RW118 <i>lexA-gfp</i>	H13 <i>lexA-gfp</i>	RW118 <i>lexA-gfp</i>
OD ₆₀₀ pred ločitvijo		0,500	0,500	0,333	0,350
Brez Mit-C	15'	0,944	-	-	-
	30'	1,625	-	-	-
	60'	1,885	1,845	1,795	1,490
	90'	2,580	2,095	2,190	1,880
	120'	3,245	2,640	2,260	1,985
	150'	4,340	3,075	3,650	2,865
0,25 µg/ml Mit-C	15'	1,020	-	0,516	-
	30'	1,600	-	0,690	-
	60'	1,815	1,755	1,830	1,495
	90'	2,405	2,275	2,100	1,970
	120'	3,235	2,735	2,270	2,000
	150'	4,150	3,120	3,310	2,750
0,5 µg/ml Mit-C	15'	0,936	0,866	0,480	0,482
	30'	1,560	1,420	0,686	0,614
	60'	1,760	1,730	1,860	1,340
	90'	2,165	2,175	1,995	1,800
	120'	2,775	2,662	2,255	1,745
	150'	3,320	3,000	3,125	2,750

- nismo vzorčili

Priloga C9: Meritve OD₆₀₀ za seva *E. coli* H13 in RW118 s fuzijami *recA-gfp* na plazmidu ob indukciji

		OD ₆₀₀		OD ₆₀₀ ponovitev	
		H13 <i>recA-gfp</i>	RW118 <i>recA-gfp</i>	H13 <i>recA-gfp</i>	RW118 <i>recA-gfp</i>
OD₆₀₀ pred ločitvijo		0,347	0,339	0,331	0,400
Brez Mit-C	15'	-	-	-	-
	30'	-	-	-	-
	60'	1,335	1,075	-	-
	90'	2,040	-	1,815	1,850
	120'	-	-	-	-
	150'	4,035	2,935	-	-
0,25 µg/ml Mit-C	15'	0,610	0,509	0,510	0,577
	30'	0,742	0,684	0,704	0,731
	60'	1,740	1,105	1,585	1,135
	90'	1,960	1,570	1,970	1,675
	120'	2,940	2,255	-	-
	150'	3,545	2,915	-	-
0,5 µg/ml Mit-C	15'				
	30'	0,593	0,506	0,525	0,585
	60'	0,727	0,666	0,691	0,723
	90'	1,715	1,125	1,515	1,205
	120'	1,940	1,555	1,860	1,430
	150'	2,665	1,965	-	-
		3,480	2,850	-	-

-nismo vzorčili

Priloga D: Na antibiotik tolerantne bakterije, spremljanje rasti kulture brez antibiotika in preživetje kulture po tretiranju z antibiotikom

V prilogah D1-D4 so prikazane optične gostote kontrolne kulture – kulture, ki smo jo inkubirali v odsotnosti antibiotika in titri posameznih ponovitev poskusa s Cip ter v prilogah D5-D7 tudi poskusa s Tc.

Priloga D1: Vrednosti OD₆₀₀ kultur inkubiranih brez antibiotika v poskusu s Cip

sev <i>E.coli</i>	OD ₆₀₀				OD ₆₀₀ 1. ponovitev				OD ₆₀₀ 2. ponovitev			
	t ₀	t ₂	t ₅	t ₂₄	t ₀	t ₂	t ₅	t ₂₄	t ₀	t ₂	t ₅	t ₂₄
RW118	0,305	1,78	3,07	4,32	0,320	2,44	4,38	4,38	-	-	-	-
H13	0,310	2,04	3,88	4,14	0,291	3,23	4,50	4,79	0,330	3,12	3,71	3,99
18	0,301	2,20	4,25	4,00	0,292	3,68	4,10	4,96	0,350	3,96	4,40	3,70
E01/121	0,320	2,08	4,13	4,57	0,330	3,53	3,88	4,40	0,350	3,59	5,01	4,30
H54	-	-	-	-	0,360	4,37	3,50	4,09	0,290	3,89	4,83	3,43
RW464	0,320	1,69	3,77	3,91	-	-	-	-	-	-	-	-

- nismo vzorčili in merili

Priloga D2: Titri kultur po dodatku Cip (t₀), po 2 (t₂), 5 (t₅) in 24 (t₂₄) urah tretiranja s Cip, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t₂₄ brez)

sev <i>E.coli</i>	titri				
	t ₀	t ₂	t ₅	t ₂₄	t ₂₄ brez Cip
RW118	$6,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	-
H13	$5,3 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	-
18	$2,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^5$	$0,3 \times 10^4$	$2,5 \times 10^1$	-
E01/121	$3,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	-
RW464	$2,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$	5	-

Priloga D3: Titri kultur po dodatku Cip (t₀), po 2 (t₂), 5 (t₅) in 24 (t₂₄) urah tretiranja s Cip, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t₂₄ brez) (1. ponovitev)

sev <i>E.coli</i>	titri				
	t ₀	t ₂	t ₅	t ₂₄	t ₂₄ brez Cip
RW118	$1,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^9$
H13	$3,1 \times 10^7$	$7,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$	$7,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^8$
18	-	$2,7 \times 10^5$	$6,8 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^8$
E01/121	$3,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	∞	$1,3 \times 10^9$
H54	$4,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	-	$4,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^8$

Priloga D4: Titri kultur po dodatku Cip (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Cip, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t_{24} brez) (2. ponovitev)

sev <i>E.coli</i>	titri				
	t_0	t_2	t_5	t_{24}	t_{24} brez Cip
H13	$5,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$	$7,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^8$
18	$9,9 \times 10^7$	-	$5,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$2,2 \times 10^8$
E01/121	$3,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$6,4 \times 10^3$	$5,0 \times 10^1$	$6,8 \times 10^8$
H54	$3,4 \times 10^7$	$6,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$3,3 \times 10^3$	$4,4 \times 10^8$

Priloga D5: Vrednosti OD₆₀₀ bakterijskih kultur inkubiranih brez antibiotika v poskusu s Tc

sev <i>E.coli</i>	OD ₆₀₀				OD ₆₀₀ ponovitev			
	t_0	t_2	t_5	t_{24}	t_0	t_2	t_5	t_{24}
RW118	0,32	2,33	4,90	4,41	0,36	2,08	4,83	3,54
H13	0,37	3,69	5,53	4,60	0,36	3,57	7,00	3,65
18	0,32	3,55	5,79	4,55	0,35	3,96	6,40	3,71
E01/121	0,29	3,47	6,05	4,77	0,35	3,59	7,02	4,33
H54	0,29	3,89	5,83	3,43	0,29	3,38	5,44	3,77

Priloga D6: Titri kultur po dodatku Tc (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Tc, ter titer kulture brez Tc po 24 urah (t_{24} brez)

sev <i>E.coli</i>	titri				
	t_0	t_2	t_5	t_{24}	t_{24} brez
RW118	$4,5 \times 10^7$	$6,2 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$
H13	$3,1 \times 10^7$	$8,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$9,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^8$
18	$2,4 \times 10^7$	-	$2,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$3,9 \times 10^8$
E01/121	$1,2 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$8,2 \times 10^8$
H54	$3,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$	$7,3 \times 10^3$	$4,9 \times 10^4$	$4,4 \times 10^8$

Priloga D7: Titri kultur po dodatku Tc (t_0), po 2 (t_2), 5 (t_5) in 24 (t_{24}) urah tretiranja s Tc, ter titer kulture brez Cip po 24 urah (t_{24} brez) (ponovitev)

sev <i>E.coli</i>	titri				
	t_0	t_2	t_5	t_{24}	t_{24} brez
RW118	$7,1 \times 10^7$	$9,9 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$	$9,2 \times 10^7$	$8,4 \times 10^8$
H13	$9,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$
18	$9,9 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$
E01/121	$3,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$	$6,8 \times 10^8$
H54	$5,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^8$

Priloga E: Primer poravnave operatorskega zaporedja LexA seva H13 in seva deponiranega v zbirki GenBank

Poravnava zaporedja pomnoženega z oligonukleotidnim začetnikom LexA seva H13 in seva *E. coli* SE15 iz zbirke:

Identični nukleotidi: 663/665 (99%)

Vrzeli: 2/665 (0%)

```
Query 12 CTC-ATGGTG-AGCTCTGCTGACGAAGGTCAACGACAATTGGTTTAAACTCGCTGTTTTTC 69
      |||
Sbjct 4250609 CTC AATGGTGAAGCTCTGCTGACGAAGGTCAACGACAATTGGTTTAAACTCGCTGTTTTTC 4250550

Query 70 TGGCAACAGTTCGACTTTATTGCCCTGTTTTTTCAGGCGTTTAACGGTAACTTCGTCATC 129
      |||
Sbjct 4250549 TGGCAACAGTTCGACTTTATTGCCCTGTTTTTTCAGGCGTTTAACGGTAACTTCGTCATC 4250490

Query 130 AATACGTGCGACAACGACCTGACCGTTACGTACATCCTGAGTTTTATGCACTGCCAGCAA 189
      |||
Sbjct 4250489 AATACGTGCGACAACGACCTGACCGTTACGTACATCCTGAGTTTTATGCACTGCCAGCAA 4250430

Query 190 ATGCCATCCATAATGCCGATATCTTTCATCGACATCCCGCTGACACGCAGCAGGAAATC 249
      |||
Sbjct 4250429 ATGCCATCCATAATGCCGATATCTTTCATCGACATCCCGCTGACACGCAGCAGGAAATC 4250370

Query 250 AGCATTTCGGCTTGAACAAGGAAGGATCGACCTGATAATGACCTTCAATATGCTGTTGCGC 309
      |||
Sbjct 4250369 AGCATTTCGGCTTGAACAAGGAAGGATCGACCTGATAATGACCTTCAATATGCTGTTGCGC 4250310

Query 310 CAGAAGCGGTTACCGGCAGCCACACGACCTACCAGCGGCAACCCTTCTTCTTCTCCTG 369
      |||
Sbjct 4250309 CAGAAGCGGTTACCGGCAGCCACACGACCTACCAGCGGCAACCCTTCTTCTTCTCCTG 4250250

Query 370 CAATAAACGAATCCCGCGTGATGCGCCGAAACAATTTCAATAACGCCTTTCGCGTCCAG 429
      |||
Sbjct 4250249 CAATAAACGAATCCCGCGTGATGCGCCGAAACAATTTCAATAACGCCTTTCGCGTCCAG 4250190

Query 430 CGCCTTCAGATGTTCTTCAGCCGCGTTTGGGGAACGGAACCCCAAACGCTGCGCGATTTC 489
      |||
Sbjct 4250189 CGCCTTCAGATGTTCTTCAGCCGCGTTTGGGGAACGGAACCCCAAACGCTGCGCGATTTC 4250130

Query 490 CGCACGCGTCGGCGGCATACCTGTCTGGCTGATGTGATCACGGATGAGATCAAACACCTC 549
      |||
Sbjct 4250129 CGCACGCGTCGGCGGCATACCTGTCTGGCTGATGTGATCACGGATGAGATCAAACACCTC 4250070

Query 550 TTGTGCTGCGCCGTTAACGCTTTCATTCCGCCCCCTGGGTGTATATACAGTTATGCTGT 609
      |||
Sbjct 4250069 TTGTGCTGCGCCGTTAACGCTTTCATTCCGCCCCCTGGGTGTATATACAGTTATGCTGT 4250010

Query 610 GAGTATATACAGCAAAAGGCGATTTTGAACCATAAACTGCACAATAAACAGAGATTTA 669
      |||
Sbjct 4250009 GAGTATATACAGCAAAAGGCGATTTTGAACCATAAACTGCACAATAAACAGAGATTTA 4249950

Query 670 TCGAA 674
      |||
Sbjct 4249949 TCGAA 4249945
```

Poravnava zaporedja pomnoženega z oligonukleotidnim začetnikom LexAP seva H13 in seva *E. coli* SE15 iz zbirke:

Identični nukleotidi: 674/676

Vrzeli: 2/276 (0%)

Query 1 TGTGCAGTTTATGGTTCC-AAATCGCCTTTTGCTGTATATACTCACAGCATAACTGGTAT 59
|||||
Sbjct 4249966 TGTGCAGTTTATGGTTCCAAAAATCGCCTTTTGCTGTATATACTCACAGCATAACT-GTAT 4250024

Query 60 ATACACCCAGGGGGCGGAATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAACAAGAGGTGTTTGATCTC 119
|||||
Sbjct 4250025 ATACACCCAGGGGGCGGAATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAACAAGAGGTGTTTGATCTC 4250084

Query 120 ATCCGTGATCACATCAGCCAGACAGGTATGCCGCCGACGCGTGCGGAAATCGCGCAGCGT 179
|||||
Sbjct 4250085 ATCCGTGATCACATCAGCCAGACAGGTATGCCGCCGACGCGTGCGGAAATCGCGCAGCGT 4250144

Query 180 TTGGGGTTCGGTTCCCAAACGCGGCTGAAGAACATCTGAAGGCGCTGGCACGCAAAGGC 239
|||||
Sbjct 4250145 TTGGGGTTCGGTTCCCAAACGCGGCTGAAGAACATCTGAAGGCGCTGGCACGCAAAGGC 4250204

Query 240 GTTATTGAAATTGTTTCCGGCGCATCACGCGGATTTCGTTTATTGCAGGAAGAGGAAGAA 299
|||||
Sbjct 4250205 GTTATTGAAATTGTTTCCGGCGCATCACGCGGATTTCGTTTATTGCAGGAAGAGGAAGAA 4250264

Query 300 GGGTTGCCGCTGGTAGGTCGTGTGGCTGCCGGTGAACCGCTTCTGGCGCAACAGCATATT 359
|||||
Sbjct 4250265 GGGTTGCCGCTGGTAGGTCGTGTGGCTGCCGGTGAACCGCTTCTGGCGCAACAGCATATT 4250324

Query 360 GAAGGTCATTATCAGGTCGATCCTTCCTTGTTCAGCCGAATGCTGATTTCCTGCTGCGT 419
|||||
Sbjct 4250325 GAAGGTCATTATCAGGTCGATCCTTCCTTGTTCAGCCGAATGCTGATTTCCTGCTGCGT 4250384

Query 420 GTCAGCGGGATGTCGATGAAAGATATCGGCATTATGGATGGCGATTGCTGGCAGTGCAT 479
|||||
Sbjct 4250385 GTCAGCGGGATGTCGATGAAAGATATCGGCATTATGGATGGCGATTGCTGGCAGTGCAT 4250444

Query 480 AAAACTCAGGATGTACGTAACGGTCAGGTCGTTGTCGCACGTATTGATGACGAAGTTACC 539
|||||
Sbjct 4250445 AAAACTCAGGATGTACGTAACGGTCAGGTCGTTGTCGCACGTATTGATGACGAAGTTACC 4250504

Query 540 GTTAAACGCCTGAAAAAACAGGGCAATAAAGTCGAACTGTTGCCAGAAAAACAGCGAGTTT 599
|||||
Sbjct 4250505 GTTAAACGCCTGAAAAAACAGGGCAATAAAGTCGAACTGTTGCCAGAAAAACAGCGAGTTT 4250564

Query 600 AAACCAATTGTCGTTGACCTTCGTCAGCAGAGCTTACCATTGAGGGGCTGGCGGTTGGG 659
|||||
Sbjct 4250565 AAACCAATTGTCGTTGACCTTCGTCAGCAGAGCTTACCATTGAGGGGCTGGCGGTTGGG 4250624

Query 660 GTTATTCGCAACGGCG 675
|||||
Sbjct 4250625 GTTATTCGCAACGGCG 4250640