

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona KAMENŠEK

**IZRAŽANJE OD PROTEINA LexA ODVISNIH
GENOV BAKTERIJE *Escherichia coli* NA RAVNI
POSAMEZNIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona KAMENŠEK

**IZRAŽANJE OD PROTEINA LexA ODVISNIH GENOV BAKTERIJE
Escherichia coli NA RAVNI POSAMEZNIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EXPRESSION OF LexA REGULATED GENES IN *Escherichia coli* AT
THE SINGLE CELL LEVEL**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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 dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok in za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Ines Mandić Mulec Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	prof. dr. Darja Žgur Bertok Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. David Stopar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona KAMENŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22+579.25:576.32/36(043)=863
KG	<i>Escherichia coli</i> /odziv SOS/represor LexA/geni SOS/GFP/zeleni fluorescirajoči protein/heterogenost izražanja/kolicini
AV	KAMENŠEK, Simona
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/STOPAR, David (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	IZRAŽANJE OD PROTEINA LexA ODVISNIH GENOV BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> NA RAVNI POSAMEZNIH CELIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 71 str., 23 pregl., 20 sl., 3 pril., 101 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Protein LexA je poglavitni regulator odziva SOS, ki uravnava popravljanje poškodb DNA pri <i>Escherichia coli</i>. Uravnava tudi transkripcijo nekaterih drugih genov, npr. genov z zapisom za sintezo kolicinov. LexA se kot dimer veže na 20 nukleotidov dolgo zaporedje v promotorski regiji genov, ki jih uravnava in reprimira njihovo izražanje. V populaciji genetsko identičnih bakterijskih celic obstaja precejšnja fenotipska variabilnost. Heterogenost znotraj populacije bakterijskih celic omogoča, da je majhen del populacije pripravljen na morebitne neugodne razmere v okolju. V raziskavi smo s fluorescenčno mikroskopijo na ravni posameznih celic opazovali heterogenost izražanja genov SOS <i>lexA</i>, <i>recA</i>, <i>polB</i>, <i>umuD</i>, <i>uvrA</i> in kolicinov <i>cka</i>, <i>cka</i>, <i>cna</i>, <i>cea1</i>, <i>cea7</i>. V ta namen smo pridobili ali pripravili fuzije promotorjev proučevanih genov z <i>gfp</i> poročevalskim genom brez lastnega promotorja. Pri svojem delu nismo uporabili dejavnikov, ki bi poškodovali DNA. Sledili smo aktivnosti genskih fuzij na osnovi fluorescence v celicah divjega tipa RW118 in izogenega seva RW464, okvarjenega v genu <i>recA</i>, ki ne sproži odziva SOS. Naši rezultati so pokazali, da je izražanje genov odziva SOS, <i>recA</i>, <i>lexA</i>, <i>polB</i> in <i>uvrA</i>, ter genov za sintezo kolicinov heterogeno, in da je gen <i>umuD</i> pod normalnimi pogoji popolnoma utišan. Izražanje genov <i>recA</i>, <i>lexA</i> in <i>uvrA</i> v populaciji bolj heterogeno kot izražanje genov za sintezo kolicinov. Izražanje genov <i>lexA</i>, <i>recA</i> in <i>uvrA</i> je močno odvisno od spontanega SOS odziva; podobno je tudi izražanje genov za sintezo kolicina A, E7 in kolicina K. Izražanje genov <i>polB</i>, <i>umuD</i> in genov za sintezo kolicinov E1 in N je neodvisno od spontanega odziva SOS, saj je delež celic, ki izraža genske fuzije, primerljiv v sevu RW118 in izogenem sevu RW464. Heterogenost v izražanju genov, ki jih uravnava sistem SOS v celicah populacije z enakim genskim zapisom, je lahko posledica spontanega odziva SOS, brez zunanjih dejavnikov, ki poškodujejo DNA oziroma endogenih dogodkov ali/in posledica stohastičnih dogodkov, kot npr. naključne porazdelitve celične vsebine in s tem represorja LexA med dve hčerinski celici ter nihanj v transkripciji in translaciji LexA. Na izražanje pri različnih genih vpliva ohranjenost LexA vezavnega zaporedja; pozicija tega v promotorski regiji; števila LexA vezavnih zaporedij in njihove medsebojne lege; ter moč promotorja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 579.22+579.25:576.32/36(043)=863
CX *Escherichia coli*/SOS response /LexA represor /SOS genes/GFP/green fluorescent protein/heterogeneity in expression/colicins
AU KAMENŠEK, Simona
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/STOPAR, David (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI EXPRESSION OF LexA REGULATED GENES IN *Escherichia coli* AT THE SINGLE CELL LEVEL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 71 p., 23 tab., 20 fig., 3 ann., 101 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The LexA protein is a key regulator of the SOS response involved in DNA damage repair in *Escherichia coli*. It also regulates transcription of some genes not involved in DNA damage repair, e.g. colicins. LexA binds as a dimer to a 20 nucleotide long sequence in the promotor region and thus represses expression. Among isogenic bacterial cells phenotypic variability is observed. Heterogeneity within bacterial cell populations enables a small part of the population to be prepared for unfavorable environmental conditions. In our research we examined, at the single cell level with fluorescence microscopy, heterogeneous expression of SOS genes *lexA*, *recA*, *polB*, *umuD*, *uvrA*, and colicin *cka*, *caa*, *cna*, *cea1*, *cea7*, using promoter fusions with the promoterless *gfp* reporter gene. Expression was analysed in a wild type RW118 and isogenic *recA* defective strain RW464 that cannot elicit a SOS response. No agents causing DNA damage were employed. Our results revealed heterogeneity in expression of SOS response genes *recA*, *lexA*, *polB*, *uvrA* and also in expression among colicins. Gene *umuD* is completely repressed under normal conditions. Expression of *recA*, *lexA* in *uvrA* genes in a population is more heterogeneous than that for colicins. Expression of *lexA*, *recA* in *uvrA* strongly depends of spontaneous SOS response; similar as expression of colicin A, E7 and colicin K. Expression of *polB*, *umuD* in colicin E1 and N do not depende of spontaneous SOS response since the part of cells that express gene fusion is comperable among RW118 strain and isogenic RW464. Heterogeneity in expression of SOS genes among genetically identical cells is possible due to a spontaneous SOS response induced by endogenous events and stohastic events such as for example random distribution of cell content and the LexA repressor among daughter cells and fluctuations in transcription and translation of LexA. Expression also depends upon the LexA binding sequence, its localisation within the promoter region; the number of LexA binding sequences and their position as well as promoter strength.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA ODZIVA SOS	3
2.2 POTEK SOS	3
2.3 CELIČNI METABOLIZEM IN ODZIV SOS	5
2.4 GENI SOS	5
2.4.1 Število genov SOS	5
2.4.2 Geni SOS in njihova indukcija	5
2.4.3 Opis nekaj genov SOS	6
2.5 VLOGA REPRESORJA LEXA	8
2.5.1 Lastnosti vezave represorja LexA na DNA	8
2.5.2 LexA konsenzno zaporedje in heterologni indeks	8
2.5.3 Kontrola transkripcije z LexA	9
2.6 HETEROGENOST IZRAŽANJA	12
2.6.1 Mehanizmi heterogenosti	12
2.6.2 Odziv SOS in heterogenost	13
2.7 MERJENJE ODZIVA SOS	14
2.7.1 Preučevanje genov SOS z GFP	14
2.8 ODZIV SOS IN KOLICINI	15
2.8.1 Kolicini	15
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI	19
3.1.1 Bakterijski sevi	19
3.1.2 Plazmidi	19
3.1.3 Gojišča	20
3.1.4 Kemikalije	21
3.1.5 Kiti	22
3.1.6 Encimi	24

3.1.7	Začetni oligonukleotidi	24
3.1.8	Pufri in reagenti	24
3.1.9	Oprema	25
3.2	METODE	26
3.2.1	Izolacija plazmidne DNA s kompletom komplet »GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit«.....	26
3.2.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	26
3.2.3	Agarozna gelska elektroforeza.....	28
3.2.4	Ekstrakcija fragmentov DNA iz agaroznega gela s kompletom »QIAQuick Gel Extraction Kit« (Qiagen, Hamburg, Nemčija).....	28
3.2.5	Obarjanje DNA z amonacetatom in etanolom	28
3.2.6	Menjava pufra s kompletom »QIAQuick PCR Purificatin Kit«.....	29
3.2.7	Restrikcija z restriktorskima endonukleazama <i>Bam</i> HI in <i>Xho</i> I.....	29
3.2.8	Ligacija cepljenega fragmenta s cepljenim plazmidom	30
3.2.9	Transformacija.....	30
3.2.10	Elektroporacija	31
3.2.11	Določanje nukleotidnega zaporedja	32
3.2.12	Določanje rastnih krivulj	33
3.2.13	Mikroskopiranje z invertnim mikroskopom	34
4	REZULTATI.....	35
4.1	PRIPRAVA FUZIJ PROMOTOR-GFP PREUČEVANIH KOLICINOV V VEKTORSKEM PLAZMIDU	35
4.1.1	Priprava vektorskega plazmida z restrikcijo	36
4.1.2	Pomnoževanje fragmentov z metodo PCR	37
4.1.3	Restrikcija fragmentov	37
4.1.4	Ligacija.....	37
4.2	MIKROSKOPIRANJE	40
4.2.1	Izražanje genov SOS.....	40
4.2.2	Izražanje kolicinov	45
4.3	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA	48
4.3.1	Določanje LexA vezavnega zaporedja	48
4.3.2	Določanje heterolognega indeksa	50
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	52
5.1	VPLIV LEXA NA IZRAŽANJE GENOV SOS	52
5.1.1	Izražanje genov <i>recA</i> in <i>lexA</i> v sevu divjega tipa	53
5.1.2	Izražanje genov <i>recA</i> in <i>lexA</i> v <i>recA</i> ⁻ sevu RW464.....	55
5.1.3	Izražanje genov <i>polB</i> in <i>umuD</i> v sevu divjega tipa	55
5.1.4	Izražanje genov <i>polB</i> in <i>umuD</i> v <i>recA</i> ⁻ sevu RW464.....	56
5.1.5	Izražanje genov <i>uvrA</i> v sevu divjega tipa	56
5.1.6	Izražanje genov <i>uvrA</i> v <i>recA</i> ⁻ sevu RW464	56

5.2	VPLIV LEXA NA IZRAŽANJE KOLICINA K	57
5.2.1	Protein imunosti (pozitivna kontrola).....	57
5.2.2	Protein aktivnosti kolicin K	57
5.3	VPLIV LEXA NA IZRAŽANJE KOLICINOV A, N, E1 IN E7	58
5.3.1	Izražanje genov <i>caa</i> , <i>cna</i> , <i>cea1</i> , <i>cea7</i> v sevu divjega tipa.....	58
5.3.2	Izražanje genov <i>caa</i> , <i>cna</i> , <i>cea1</i> , <i>cea7</i> v <i>recA</i> ⁻ sevu RW464	59
5.4	LASTNOSTI LEXA VEZAVNIH ZAPOREDIJ IN HETEROLOGNI INDEKSI	59
5.5	SKLEPI.....	62
6	POVZETEK.....	63
7	VIRI	65
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Nekateri od genov SOS pri <i>E. coli</i> in učinek njihovega izražanja kot odgovor na indukcijo SOS (Kuzminov, 1999; Fernández de Henestrosa in sod., 2000; Lewis in sod., 1994).	6
Preglednica 2: Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	19
Preglednica 3: Plazmidi z <i>gfp</i> fuzijami.	20
Preglednica 4: Plazmidi z zapisom za kolicine in plazmidi z <i>gfp</i> fuzijami.	20
Preglednica 5: Koncentracija antibiotikov v gojišču LB.	21
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo.	27
Preglednica 7: PCR mešanica plazmidno DNA.	27
Preglednica 8: PCR mešanica z bakterijskimi celicami.	27
Preglednica 9: PCR program.	27
Preglednica 10: Restriksijska mešanica plazmida ali fragmenta z restriksijsko endonukleazo <i>Bam</i> HI.	29
Preglednica 11: Restriksijska mešanica plazmida ali fragmenta z restriksijsko endonukleazo <i>Xho</i> I.	29
Preglednica 12: Restriksijska mešanica plazmida z restriksijskima endonukleazama <i>Bam</i> HI in <i>Xho</i> I.	30
Preglednica 13: Ligacijska mešanica cepljenega fragmenta (promotorja) s cepljenim plazmidom.	30
Preglednica 14: Mešanica za določanje nukleotidnega zaporedja izbranega dela DNA. ...	32
Preglednica 15: »Master mix« mešanica za določanje nukleotidnega zaporedja.	32
Preglednica 16: Odstotki celic, ki kažejo večjo aktivnost izražanja določenega gena SOS v sevu RW118.	41
Preglednica 17: Odstotki celic, ki kažejo večjo aktivnost izražanja določenega gena SOS v sevu RW464.	41
Preglednica 18: Odstotki celic seva RW118 pri katerih se izraža kolicin.	45
Preglednica 19: Odstotki celic seva RW464 pri katerih se izraža kolicin.	45
Preglednica 20: Promotorske regije kolicinov z razporeditvijo pomembnih regulatornih regij.	48
Preglednica 21: Izračun pogostosti baz za 19 znanih LexA vezavnih zaporedij in njihovo komplementarno zaporedje (Lewis in sod., 1994).	51
Preglednica 22: Heterologni indeks za kolicine.	51
Preglednica 23: Heterologni indeksi za gene SOS (Lewis in sod., 1994; Fernández de Henestrosa in sod., 2000).	51

KAZALO SLIK

	str
Slika 1: Prikaz poteka odziva SOS (Michel, 2005).	4
Slika 2: Razporeditev različnih LexA vezavnih zaporedij SOS glede na promotorje genov SOS (Schnarr in sod., 1991).	11
Slika 3: Shematski prikaz konstrukcije genske fuzije promotorja z <i>gfp</i> , na primeru pSC300 s <i>caa-gfp</i>	35
Slika 4: Primerjava necepljenega in cepljenega pSC200 z <i>lexA-gfp</i>	36
Slika 5: Rezultat cepitve fragmenta promotorja iz pSC203 s fuzijo <i>uvrA-gfp</i> in iz pSC202 s fuzijo <i>umuD-gfp</i>	36
Slika 6: PCR pomnožek promotorskih regij zapisov za kolicine.	37
Slika 7: PCR pomnožek promotorskih regij kolicinov iz DH5 α transformant z vektorskim plazmidom. A) <i>caa</i> . B) <i>cna</i>	38
Slika 8: PCR pomnožek promotorskih regij kolicinov iz DH5 α transformant z vektorskim plazmidom. C) <i>cea1</i> . D) <i>cea7</i>	38
Slika 9: Rezultat cepitve izoliranih plazmidov izoliranih transformant DH5 α z restriktazama <i>Bam</i> HI in <i>Xho</i> I.	39
Slika 10: Pozitivna kontrola: celice RW118 s fuzijo <i>cki-gfp</i> v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.	42
Slika 11: Pozitivna kontrola: celice RW464 s fuzijo <i>cki-gfp</i> v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.	42
Slika 12: Negativna kontrola: celice RW118 v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.	42
Slika 13: Negativna kontrola: celice RW464 v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.	43
Slika 14: Celice z izraženo fuzijo <i>recA-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo <i>recA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji.	43
Slika 15: Celice z izraženo fuzijo <i>lexA-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo <i>lexA-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji.	44
Slika 16: Celice z izraženo fuzijo <i>polB-gfp</i> v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo <i>polB-gfp</i> pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo <i>polB-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo <i>polB-gfp</i> pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo <i>polB-gfp</i> pri svetlobni mikroskopiji.	44

- Slika 17:** Celice z izraženo fuzijo *caa-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *caa-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *caa-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. Celice seva RW464 niso fluorescirale..... 45
- Slika 18:** Celice z izraženo fuzijo *cna-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *cna-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *cna-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *cna-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *cna-gfp* pri svetlobni mikroskopiji..... 46
- Slika 19:** Celice z izraženo fuzijo *cea1-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *cea1-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *cea1-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *cea1-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *cea1-gfp* pri svetlobni mikroskopiji..... 46
- Slika 20:** Celice z izraženo fuzijo *cea7-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *cea7-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *cea7-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *cea7-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *cea7-gfp* pri svetlobni mikroskopiji..... 47

KAZALO PRILOG

Priloga A. Preglednice meritev OD₆₀₀ za seva RW118 in RW464 z različnimi genskimi fuzijami promotorjev z *gfp*.

Priloga B. Rastne krivulje sevov RW118 in RW464 z različnimi *gfp* fuzijami.

Priloga C. Nukleotidna zaporedja.

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina A (411 nt).

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina N (408 nt).

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina E7 (394 nt).

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina E1 (413 nt).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ala	alanin
Ar	argon
Ap ^r	odpornost na antibiotik ampicilin
bp	bazni par
<i>caa</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin A
<i>cea1</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin E1
<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 proti kolicinu K
<i>cna</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin N
ColA	kolicin A
ColE1	kolicin E1
ColE7	kolicin E7
ColK	kolicin K
ColN	kolicin N
Cy5-ddNTP	dideoksiribonukleotid trifosfat, označen s cianinom
Da	dalton
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvoverižna DNA
dNTP	deoksiribonukleozid fosfat
EDTA	etilindiamintetraocetna kislina
EtBr	etidijev bromid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FITC	fluorescentno barvilo, fluorescein izotiocianat
<i>gfp</i>	strukturni gen, ki kodira zeleni fluorescirajoči protein
GFP	zeleni fluorescirajoči protein
Gly	glicin
HI	heterologni indeks
<i>imm</i>	strukturni gen, ki kodira protein imunosti
kb	kilo baze (število baz × 1000)
<i>kil</i>	strukturni gen, ki kodira kolicin sprostivni protein
Kn ^r	odpornost na antibiotik kanamicin
LB	gojišče Luria-Bertani
<i>lexA</i>	strukturni gen, ki kodira transkripcijski represor LexA
LexA	transkripcijski represor
mRNA	sporočilna DNA
NER	popravljanje z izrezovanjem nukleotidov (angl. nucleotide excision repair)

obr./min	obrati na minuto
OD ₆₀₀	optična gostota pri 600 nm
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
<i>polB</i>	strukturni gen, ki kodira protein PolB
PolB	protein PolB
<i>recA</i>	strukturni gen, ki kodira RecA
RecA	protein RecA
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomalna DNA
<i>ruvA</i>	strukturni gen, ki kodira protein RuvA
RuvA	protein RuvA
<i>ruvB</i>	strukturni gen, ki kodira protein RuvA
RuvB	protein RuvB
SOC	super optimalna juha z ogljikom (angl. super oprimal broth with carbon)
SOS	odziv na poškodbe DNA, angl. save our souls
ssDNA	enoverižna DNA
stac	stacionarna faza rasti
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

1 UVOD

Ohranitev celovitosti genoma je pomembna za vse organizme. Številne celice, tako prokariotske kot evkariotske, so razvile odzive na poškodbe v celični DNA. Ti odzivi vključujejo zaustavitev celičnega cikla, inhibicijo celične delitve in spremembe v izražanju genov (McCool in sod., 2004).

Pod normalnimi pogoji ni potrebe po vzdrževanju visoke ravni popravljalnih aktivnosti v celici, vendar po izpostavitvi dejavnikom, ki poškodujejo DNA, bi celice morale biti sposobne takojšnjega odziva. Da bi dosegle ta cilj, so organizmi razvili dovršene sisteme in mreže za usklajeno izražanje genov potrebnih za popravilo poškodb DNA (Khil in Camerini-Otero, 2002).

Zato da bi celice preživele v različnih okoljskih pogojih, imajo nabor genov, katere lahko izražajo ali utišajo glede na njihove potrebe. Med to obsežno zbirko genetsko uravnanih mrež je tudi odziv SOS, sistem, ki inducira popravilo DNA in omogoča bakterijam, da preživijo nenadno povečanje poškodb DNA (Michel, 2005). Številni proteini, inducirani kot del tega odziva, so vpleteni pri podvojevanju DNA, njenem popravljanju ter uravnavanju celične delitve (Friedberg in sod, 2005; Koch in Woodgate, 1998).

Klasične študije uporabljajo kot vzorec za preučevanje odziva SOS bakterijo *Escherichia coli*. Odziv SOS uravnava povečanje ravni izražanja več kot 40 genov induciranih s poškodbami DNA, katerih izražanje je uravnano z represorjem LexA. (Fernández de Henestrosa in sod., 2000).

Poleg tega odziv SOS v veliki meri uravnava tudi izražanje kolicinov. LexA se kot dimer veže na LexA vezavna zaporedja v promotorski regiji in moč njegove vezave je odvisna od ohranjenosti LexA vezavnega zaporedja, namestitve v promotorski regiji in moči promotorja.

Znano je, da celice z enakim genskim zapisom izražajo različne fenotipe. To heterogeno izražanje pri izogenih celicah nastopi zaradi neenakomerne porazdelitve celičnega materiala med hčerinskima celicama (Sweeney in sod., 1994; Tran in sod., 2000; Kelleher in sod., 2000; Bellaiche in sod., 2001; Orgogozo in sod., 2002), poleg tega lahko heterogenost populacije celic izhaja iz stohastičnega pojava na ravni posamezne celice, ki ni povezano s celično delitvijo. Zato celo celice, ki imajo identično vsebino v določeni točki v času, lahko kažejo razlike v stanju in fenotipu v naslednjem trenutku. Posledično je heterogenost populacije celic tesno povezana z uravnavo izražanja genov (Portle in sod., 2007).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali na ravni posameznih celic prihaja do heterogenega izražanja genov, ki jih uravnava represor LexA. Le-ta uravnava gene, ki so potrebni za delovanje sistema SOS, potrebnega za popravilo DNA poškodb, npr. *lexA*, *recA*, *umuDC*, *polB*, *uvrA*, kot tudi za izražanje kolicinov, v naši raziskavi na primeru *cka*, *caa*, *cna*, *cea1* in *cea7*. Zanimala nas je razlika v izražanju posameznih genov, ki smo jo določili v odstotkih. Poleg tega smo z določitvijo zaporedja LexA vezavnega zaporedja za kolicine želeli najti povezavo med jakostjo represije in strukturo LexA vezavnega zaporedja.

Za raziskavo smo morali pripraviti fuzije promotorjev genov kolicinov *caa*, *cna*, *cea1* in *cea7* z genom *gfp* za zeleni fluorescirajoči protein, brez lastnega promotorja, v sevu RW118 in sevu RW464, ki mu manjka zapis za RecA in ne sproži odziva SOS. V ista seva smo tudi transformirali ostale omenjene fuzije, ki so bile pridobljene in predhodno uporabljene za druge raziskave. Izražanje omenjenih fuzij smo analizirali s fluorescentno mikroskopijo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Domnevamo, da se v posameznih populacijah bakterije *E. coli* geni odziva SOS ne izražajo enako.
- Geni vključeni v mutageno popravljanje poškodb DNA se izražajo v najmanjši meri.
- V stacionarni fazi fluorescira največji del populacije celic na račun sprožitve odziva SOS.
- Raven sinteze med različnimi kolicini se razlikuje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA ODZIVA SOS

Odkritje sistema SOS se je razvilo iz študij o učinku UV sevanja na bakterijo *Escherichia coli*. Prvi je eksperimentalno podprl obstoj inducirajoče DNA popravljalne mreže pri *E. coli* pred dobrimi 30 leti Miroslav Radman, ki je vpeljal izraz »odziv SOS«.

Predpostavil je, da lahko bakterije izpostavljene stresu producirajo številne obrambne proteine, katerih geni so normalno utišani, in omogočajo popravilo poškodovane DNA in reaktivacijo sinteze DNA, in da so ti procesi povezani z mutacijami (Radman M, 1975). Z vedenjem, da je represor λ faga proteolitično cepljen v času indukcije profaga (Roberts J.W in Roberts C.W., 1975), in da mutacije v *lexA* in *recA* genih ukinejo odziv SOS, sta Gudas in Pardee (1975) predlagala, da je sistem SOS utišan s proteinom LexA in dereprimiran z aktiviranim proteinom RecA* (Gudas in Pardee, 1975).

Čeprav odziv SOS v širšem smislu vključuje vse ob poškodbi DNA aktivirane gene, v katerem je protein RecA aktivator in LexA negativno delujoči transkripcijski regulator (Little in sod., 1980; Little in sod., 1981; Brent in Ptashne, 1981), so še številni drugi proteini, ki so inducirani s poškodbo DNA in niso neposredno uravnani z RecA ali LexA. Potemtakem je globalni odziv SOS sestavljen iz dveh podpoti, ena je uravnavana z RecA-LexA (in mišljena kot »klasični odziv SOS«) in ena, ki je RecA-LexA neodvisna. Poleg genov, ki so primarno regulirani z LexA, so znani geni, katerih izražanje je odvisno od odziva SOS, ampak niso neposredno uravnani z LexA (Koch in Woodgate, 1998). Mehanizmi uravnave teh genov v glavnem niso dovolj raziskani (Khil in Camerini-Otero, 2002).

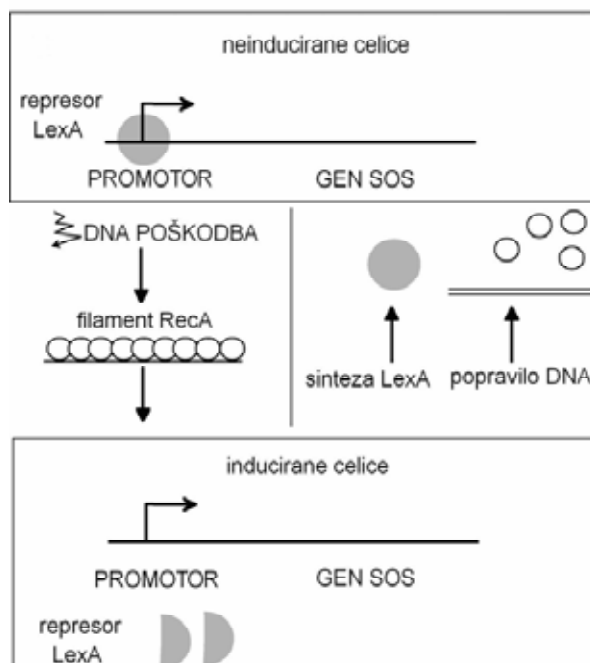
2.2 POTEK SOS

Odziv SOS v *E. coli* uravnava izražanje več kot 40 genov na ravni transkripcije; inducira ene in utiša druge (Fernández de Henestrosa in sod., 2000). Geni SOS so razpršeni na različnih mestih kromosoma (Little in Mount, 1982) in njihovo izražanje uravnava proteina represor LexA in induktor aktiviran RecA* (Walker, 1996). Pod normalnimi pogoji je transkripcija genov SOS utišana z LexA. Med normalno rastjo je LexA vezan na specifično zaporedje (angl. SOS box), prisotno v promotorski regiji genov SOS, in preprečuje njihovo izražanje. Geni SOS so izraženi z različno stopnjo med normalnimi rastnimi pogoji, odvisno od njihovih LexA prepoznavnih zaporedij v promotorski regiji, njene pozicije v promotorski regiji in moči promotorja (Michel, 2005).

RecA deluje kot senzor za poškodbe DNA. Ob poškodbi celične DNA, ki povzroči prekinitev podvojevanja, se RecA veže na enoverižno DNA (ssDNA) in nastane nukleoproteinski filament RecA-ssDNA. V tej aktivirani obliki protein RecA deluje kot alosterični efektor avtoproteolitične cepitve LexA. S cepitvijo LexA se zmanjša koncentracija represorja LexA v celici in padec količine LexA povzroči derepresijo genov SOS, vključenih v popraviljanje in rekombinacijo DNA, hkrati pa poveča tudi raven transkripcije gena represorja LexA (Little in sod., 1980), saj je gen *lexA* avtoreguliran (slika 1).

Bazalna raven izražanja genov, ki pripadajo regulonu SOS, se med geni razlikuje. Na primer v neinduciranih celicah je 7500 molekul RecA, 1300 molekul LexA in nezaznavne količine Pol V (Sassanfar in sod., 1990). Ko je poškodba popravljena ali obidena in inducirajoči dejavnik odstranjen, količina aktivnega RecA vezanega na ssDNA pade, zato se LexA ponovno nakopiči in utiša operone SOS. S tem izklopi odziv SOS in celice se vrnejo v njihovo normalno stanje (McCool in sod., 2004; Ronen in sod., 2002).

RecA nukleoproteinski kompleks ima 2 vlogi: RecA filament lahko ali vdre v homologno dvojnoverižno zaporedje in katalizira izmenjavo verig (ključna reakcija homologne rekombinacije) ali pomaga pri cepitvi LexA (na ta način inducira odziv SOS) (Kuzminov, 1999; McPartland in sod., 1980).



Slika 1: Prikaz poteka odziva SOS (Michel, 2005).

2.3 CELIČNI METABOLIZEM IN ODZIV SOS

Sprožitev sistema SOS nastane v različnih fizioloških stanjih bakterij, kot odgovor na spremembe pH, prehod iz eksponentne v stacionarno rast in stradanje celic (Dri in Moreau, 1994; Taddei in sod., 1995; Koch in Woodgate, 1998), ter na povišan pritisk (Aertsen in sod., 2004). Prav tako se vklopi ob izpostavitvi UV svetlobi, genotoksičnim agensom, ob spopadu z nekaterimi antimikrobnimi snovmi in pri določenih endogenih genskih motnjah (Friedberg in sod., 2005). Razen tega je opažena dolgotrajna indukcija genov SOS kot odziv na mutacije določenih genov. Zaradi tega indukcija sistema SOS ni zadnji poskus preživetja, pač pa je reakcija celic na inhibicijo sinteze DNA (Kuzminov, 1999).

2.4 GENI SOS

2.4.1 Število genov SOS

Če predpostavimo, da je celotno število genov *E. coli* 4300, število genov SOS predstavlja od 0,76 % (za 32 genov) do 1,58 % (za 68 genov) genov celotnega genoma. Vendar pa funkcija vseh še ni poznana (Janion, 2001; Fernández de Henestrosa in sod., 2000).

2.4.2 Geni SOS in njihova indukcija

Vsi geni SOS niso inducirani ob istem času in v enaki količini. V prvi fazi so med izraženimi geni *lexA*, ki kodira represorski protein SOS, geni *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, katerih produkti so skupaj z endonukleazo UvrC vpleteni v enoverižno popravljanje z izrezovanjem nukleotidov (angl. nucleotide excision repair – NER) v reakciji, ki reže poškodovane nukleotide iz dvoverižne DNA (dsDNA), ter gena *ruvA* in *ruvB*, katerih produkta sta vpletena v rekombinacijsko popravljanje DNA. V naslednji fazi so izraženi geni *recA* in *recN*, katerih produkti so povezani v rekombinacijsko popravljanje DNA brez napak (angl. error-free). Homologna rekombinacija omogoča popravilo lezij, ki se pojavijo na ssDNA regijah replikacijskih vilic z vračanjem dvoverižnosti. Med zadnjimi izraženimi geni je *sulA*, ki kodira inhibitorja celične delitve in povzroča filamentozno celično rast. Z inhibicijo delitve celica pridobi čas, da opravi popravilo. Med zadnjimi izraženimi so tudi geni za sintezo kolicinov (Janion, 2001; Michel, 2005). Na koncu pa, če poškodba ni bila popolnoma popravljena z NER in homologno rekombinacijo, so inducirani geni *umuD* in *umuC*, ki kodirajo mutageno DNA polimerazo V, ki opravlja popravljanje, podvrženo napakam (angl. error-prone) (Tippin in sod., 2004). Ta zadnji »odziv iz obupa« dopušča bakteriji, da popravi lezije DNA, vendar na račun nastanka napak v genomu. Očitno je pomembno, da bakterije natančno uravnavajo odziv SOS, saj ni nobene koristi, če uporabljajo polimeraze, ki opravljajo popravljanje podvrženo napakam dlje kot je

potrebno. Konstantna produkcija LexA med odzivom SOS zagotavlja, da bo takoj, ko bo DNA popravljena, izginotje inducirajočega signala dopustilo LexA, da se ponovno nakopiči in utiša gene SOS (Michel, 2005).

Preglednica 1: Nekateri od genov SOS pri *E. coli* in učinek njihovega izražanja kot odgovor na indukcijo SOS (Kuzminov, 1999; Fernández de Henestrosa in sod., 2000; Lewis in sod., 1994).

funkcija		število molekul/celici in heterogenost		
gen	genski produkt	neinduciran	induciran	HI
Prvi izraženi				
lexA	Represor genov SOS	1300	7540	6,39; 8,31
uvrA	UvrABC ekscinukleaza (NER popravljanje)	20	250	6,98
uvrB	UvrABC ekscinukleaza (NER popravljanje)	250	1000	6,11
uvrD	Helikaza II	5000 – 8000	25000–65000	8,79
polB	DNA polimeraza II	40	300	12,09
ruvA	RuvAB-helikaza	700	5600	9,19
ruvB	Rekombinacijsko popravljanje	200	1600	9,19
dinI	Inhibitor predelave UmuD	500	2300	6,24
Drugi izraženi				
recA	derepresor SOS, rekombinacijsko popravljanje	1000–10000	100000	4,31
recN	RecN, rekombinacijsko popravljanje	?	?	5,16; 9,38; 11,47
Zadnji izraženi				
sulA	Inhibitor celične delitve	?	125× povečanje	4,65
umuD	UmuD' (del Pol V)	180	2400	2,77
umuC	UmuC (Pol V)	0	200	2,77

2.4.3 Opis nekaj genov SOS

SulA se sintetizira v velikih količinah med odzivom SOS in inhibira celično delitev z vezavo na FtsZ, dokler poškodbe DNA niso popravljene (Husiman in sod., 1984). Protein FtsZ med citokinezo tvori obroč na mestu tvorbe septuma in je nujen za celično delitev (Bramhill in Thompson, 1994). Znano je, da se LexA veže na promotor *sulA* močneje v primerjavi z drugimi geni SOS (Friedberg in sod., 2005). V številnih primerih je filamentozna rast tipični rezultat odziva SOS, v katerem SulA posreduje inhibicijo tvorbe obroča iz FtsZ (Robin in sod., 1990).

UvrA, B, C so proteini, vključeni pri popravljanju z izrezovanjem nukleotidov, ki zasledijo in odstranijo poškodovane regije DNA (Brash in sod., 1985; Setlow in Carrier, 1964). UvrA se sintetizira konstitutivno v nizki ravni in med indukcijo količina proteina naraste iz 20 na 200 kopij na celico. UvrA se kot dimer veže na DNA in veže UvrB v kompleks UvrAB (Van Houten, 1990), ki prepozna poškodbo DNA. UvrA se potem odcepi, za kar potrebuje ATP. UvrB se pridruži UvrC, ki naredi zarezo na 3' in 5' koncu poškodbe na poškodovani verigi, za kar tudi potrebuje ATP. UvrD je helicaza, ki pomaga pri odvitju DNA, kar sprosti DNA med zareza. Povprečna dolžina izrezane DNA je 12 nt (Lewin,

2000). UvrA, B in D so pod kontrolo odziva SOS, medtem ko UvrC ni. Osnovna raven izražanja *uvrA*, *uvrB* in *uvrC* v celici omogoča odstranitev občasnih lezij DNA (Moolenaar in sod., 2002). Proteini UvrA, B in C bi naj imeli tudi vlogo pri podvojevanju DNA. N' konec Zn vezavne domene UvrA je nujen za alternativno pot podvojevanja, vendar ne za NER, kar nakazuje, da se je ta domena specifično razvila za vlogo UvrA₂B pri podvojevanju. C' konec Zn vezavne domene pa ima pomembno vlogo pri vezavi na poškodovano in nepoškodovano DNA (Wang in sod, 1994).

Aktivirani RecA* je poleg vloge pri indukciji odziva SOS s spodbuditvijo cepitve LexA prav tako potreben za avtoproteolitsko aktivacijo represorja CI bakteriofaga λ (ki je odgovoren za vzdrževanje litičnega cikla), kot tudi cepitev proteina UmuD v mutageni UmuD', ki skupaj z UmuC deluje kot DNA polimeraza V (Janion, 2001).

RecA pa igra tudi pomembno vlogo pri popravljanju različnih vrst poškodb DNA s homologno gensko rekombinacijo. Protein RecA omogoči združitev in izmenjavo verig med homologno DNA. Proteina RuvA, RuvB, katerih izražanje je uravnano z odzivom SOS (Shinagawa in sod., 1988; Benson in sod., 1988), skupaj z RuvC delujejo kot kompleks za migracijo in ločitev krakov DNA. RuvA skupaj z RuvB ATPazo posreduje od ATP odvisno migracijo krakov mostička Holliday (Parson in West, 1992; Tsanewa in sod. 1992). RuvC nato neodvisno od RuvAB loči rekombinacijski intermediat s specifično endonukleazno cepitvijo mostička Holliday (West in Connolly, 1992).

Escherichia coli ima tri DNA polimeraze, Pol II, Pol IV in Pol V, ki lahko nadaljujejo podvojevanje preko lezij v komplementarni DNA in celicam omogočijo preživetje. Geni, ki kodirajo te encime, so *polB*, *dinB* in *umuCD* in spadajo v SOS inducirajoč regulon. V nasprotju z replikativnimi polimerazami naj bi te polimeraze bile potrebne in izražene samo točno takrat, ko so bakterijske celice v stresu zaradi poškodb DNA (Bjedov in sod., 2003). Ko je sistem SOS utišán v *E. coli*, so geni, ki kodirajo SOS polimeraze, izraženi na zelo nizki ravni ali sploh ne. Geni za SOS polimeraze ne spadajo v kategorijo visoko izraženih genov (Karlin in sod., 2001).

Pol II (*polB*) katalizira ponovno sintezo poškodovane DNA v procesu popravljanja brez napak, po tem, ko je bilo prekinjeno podvojevanje (Rangarajan in sod., 1999; Goodman, 2000). Mutageneza pri UV svetlobi pri *E. coli* celicah je v glavnem neposreden rezultat aktivnosti DNA polimeraze V (Tang in sod., 1999). Pol V sestavljata dve enoti UmuD' in ena enota UmuC. Vstavlja naključne bazne pare v DNA verigo nasproti leziji, zato pomaga replikacijskim vilicam, da hitro preidejo poškodbo, po kateri lahko Pol III nadaljuje podvojevanje (Sassanfar in Roberts, 1990).

2.5 VLOGA REPRESORJA LEXA

2.5.1 Lastnosti vezave represorja LexA na DNA

Večina genov SOS *E. coli* ima eno LexA vezavno zaporedje na katero se LexA veže kot dimer (Schnarr in sod., 1991). C-terminalna domena proteina ima elemente potrebne za dimerizacijo (Schnarr in sod., 1988). Samo nekaj genov ima več kot eno LexA vezavno zaporedje; to je *lexA* (dve zaporedji) in *recN* (tri zaporedja) ter vključno s tistimi za kolicine, ki tudi imajo po dve zaporedji (Schnarr in sod., 1991).

Vezava LexA v primeru več LexA vezavnih zaporedij je kooperativna kadar je razdalja med LexA vezavnimi zaporedji ugodna. LexA prepozna DNA preko N-terminalne domene. Represor LexA bakterije *Escherichia coli* negativno uravnava transkripcijo več kot 40 genov SOS, vključno svojega lastnega. (Schnarr in sod., 1991). Represor LexA je protein iz 202 aminokislin (Markham in sod., 1981; Horii in sod., 1981), ki ima dve strukturno definirani domeni, ki sta med seboj povezani s fleksibilno zgibno regijo (Little in sod., 1985). Interakciji RecA* z LexA sledi proteolitska cepitev LexA. Cepitev se pojavi v zgibni regiji med dvema aminokislinama Ala-84 in Gly-85 in povzroči nastanek dveh polipeptidnih fragmentov. Posledično je transkripcija genov SOS reverzibilno dereprimirana, kar nakazuje, da sta obe strukturni domeni pomembni za učinkovito vezavo represorja LexA na DNA (Schnarr in sod., 1991).

2.5.1.1 LexA kooperativna vezava

Interakcije LexA z dvema prekrivajočima zaporedjima je nekoliko drugačna od interakcije z neprekrivajočima LexA vezavnima zaporedjima. Prekrivajoča se LexA vezavna zaporedja bi naj zmanjševala sterična oviranja med sosednjimi dimeri, ki se poskušajo vezati na mesto prekrivanja, in/ali s tem optimizirala kontakt protein-protein, ki naj bi vplival na kooperativno vezavo proteinov LexA (Lewis in sod., 1994). V primeru dveh oddaljenih LexA vezavnih zaporedij pri genu *lexA*, je kooperativna vezava LexA na LexA vezavno zaporedje šibko (Brent, 1982).

2.5.2 LexA konsenzno zaporedje in heterologni indeks

Represor LexA se veže na LexA vezavno zaporedje dolgo 20 nukleotidov, nameščeno blizu ali v promotorski regiji gena inducirane SOS. Njegova vezava prepreči dostopnost RNA polimeraze. Vsa LexA vezavna zaporedja kažejo palindromsko strukturo in visoko stopnjo podobnosti, vendar se razlikujejo v nukleotidnem zaporedju in ta neidentičnost povzroča, da se represor LexA na različne promotorje veže z različno močjo (Schnarr in sod., 1991; Berg, 1988). Berg in von Hippel sta izpeljala in testirala statistični pristop, ki je zelo uspešen pri identifikaciji specifičnih proteinskih prepoznavnih

nukleotidnih zaporedij in pri določanju moči vezave na posamezna zaporedja v skupini znanih tarčnih zaporedij (Berg, 1988; Berg in von Hippel, 1987; Berg in von Hippel, 1988; O'Neill, 1989). Matematični izraz za merilo odstopanja določenega segmenta od konsenznega zaporedja je heterologni indeks (HI) (Berg in von Hippel, 1988; Berg, 1988).

Lewis s sodelavci so na osnovi poravnave 19 LexA vezavnih zaporedij, katerih nukleotidno zaporedje je bilo določeno, najdenih v *E. coli* kromosomu, določili njihovo konsenzno zaporedje 5'-TACTCG(TA)₅CAGTA-3' in za vsako LexA vezavno zaporedje matematično izračunali HI, ki navaja relativno vezavno moč represorja LexA na določeni genski promotor. Določili so, da se vezava represorja LexA na vezavno zaporedje pojavi, kadar je HI manjši od 15 (Lewis in sod., 1994). LexA se veže na nukleotidno zaporedje s HI manjšim od 12,6 ali manj, vendar ne na zaporedja s HI večjim od 15 (Fernández de Henestrosa in sod., 2000). Zaporedja z nizko HI vrednostjo so bolj podobna konsenznem zaporedju in vežejo LexA z večjo močjo kot zaporedja, ki bolj odstopajo in imajo višjo HI vrednost (Berg in von Hippel, 1988; Berg, 1988).

CTG in CAG sta najbolj kritični za vezavo LexA, saj sta tudi najbolj ohranjeni. Nobena baza v konsenznem zaporedju ni enako pomembna. Najbolj pomembni za prepoznavanje naj bi bili 4 bp CTGT. Med temi 4 bp naj bi osrednja TG bila absolutno potrebna za učinkovito interakcijo represorja LexA glede na to, da sta ta dva bp najdena v vseh znanih LexA vezavnih zaporedjih. Številna LexA vezavna zaporedja imajo A ali G namesto T na zadnji poziciji CTGT motiva. T naj bi na zadnji poziciji CTGT motiva okrepil vezavo LexA (Schnarr in sod., 1991).

Pomembnost (AT)₄ razširitve v konsenznem zaporedju LexA vezavnega zaporedja je težko oceniti, ker je bolj variabilna. Osrednje (AT)₄ zaporedje bi lahko pomagala vezavi LexA posredno (Schnarr in sod., 1991).

2.5.3 Kontrola transkripcije z LexA

Pri vseh znanih genih SOS se represor veže blizu promotorja teh genov, kar nakazuje, da LexA večinoma reprimira z inhibicijo iniciacije transkripcije. Ne glede na to osnovno lastnost zgleda, da je strategija za doseganje inhibicije transkripcije precej variabilna med geni SOS.

Stopnja represije je odvisna od najmanj štirih parametrov: (1) od moči s katero veže posamezno LexA vezavno zaporedje LexA, (2) nameščenosti LexA vezavnega zaporedja glede na promotor, (3) od števila LexA vezavnih zaporedij (slika 2) in (4) od moči promotorja (Friedberg in sod., 2005).

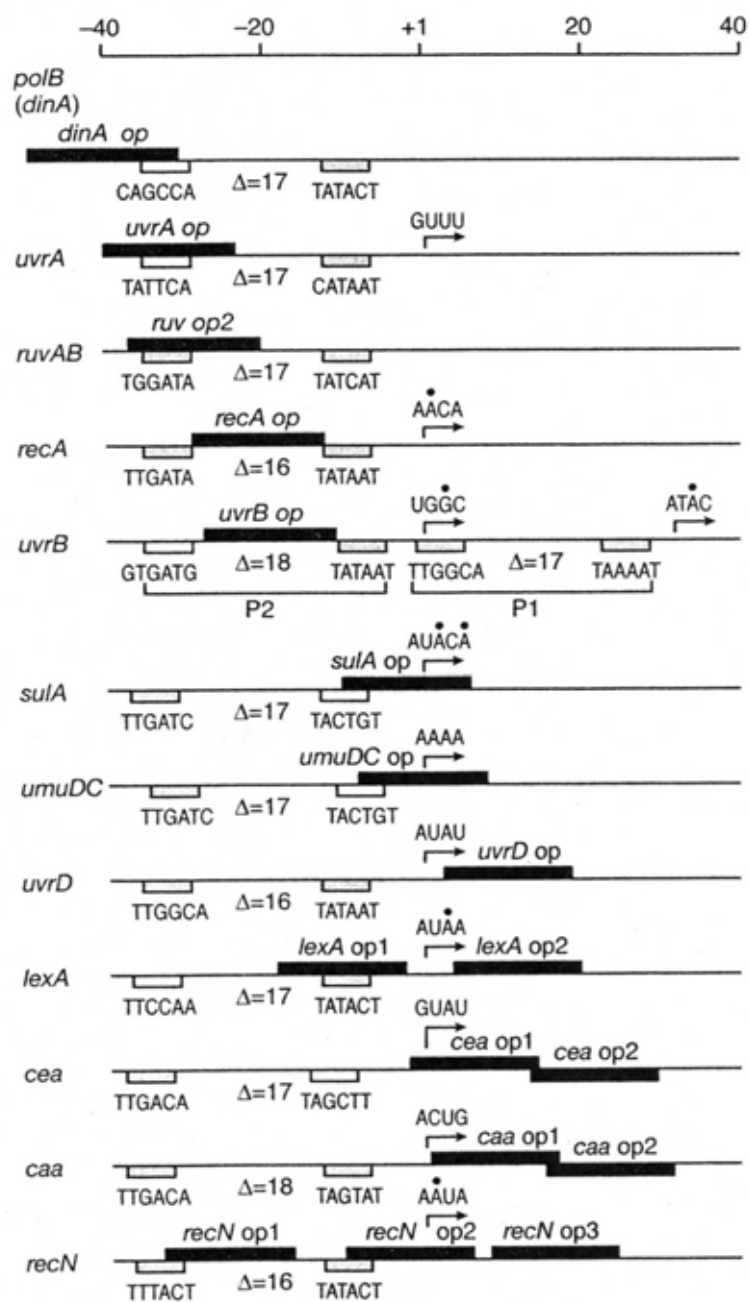
Kot je prikazano na sliki 2, je nameščenost LexA vezavnih zaporedij različna glede na mesto začetka transkripcije pri različnih genih (Schnarr in sod., 1991). Promotorska regija je vpletena v vezavo RNA polimeraze in obsega regijo –35 in –10 ohranjenih zaporedij, ključnih pri prepoznavi in vezavi RNA polimeraze (Lewin, 2000). LexA vezavna zaporedja se bodisi prekrivajo z –35 promotorsko regijo (pri *uvrA* in možno, da tudi pri *polB* in *ruvAB*), so nameščene med –35 in –10 promotorsko regijo (pri *recA* in *uvrB*), se prekrivajo z –10 promotorsko regijo (pri *sulA*, *umuDC*, *lexA*), so najdene navzdol od –10 promotorske regije ali celo navzdol od +1 mesta začetka transkripcije (pri *uvrD*, *cea*, *caa*) (Schnarr in sod., 1991).

V primeru gena *uvrA*, kjer se LexA vezavno zaporedje prekriva z –35 promotorsko regijo, izgleda, da se vezava LexA vpleta z RNA polimerazo na zgodnji stopnji pri preprečevanju tvorbe zaprtega kompleksa RNA polimeraza-promotor, saj je neuspela transkripcija, inhibirana z LexA, popolnoma pojasnljiva z mehanizmom, ki temelji na kompetitivni vezavi LexA in RNA polimeraze (Bertrand-Burggraf in sod., 1987).

V primerih, ko se LexA veže navzdol od mesta začetka transkripcije, je verjetno, da se oba RNA polimeraza in LexA vežeta istočasno. V tem primeru prisotnost represorja ovira oblikovanje za transkripcijo zadostnega »odprtega« kompleksa.

Močno uravnani geni, kot so *sulA* in *umuDC*, vežejo LexA najbolj učinkovito, medtem ko manj tesno regulirani geni, kot so *uvrA*, *B*, *D* in *lexA*, vežejo represor LexA šibkeje (Schnarr in sod., 1991).

Različna afiniteta LexA za promotorje genov odziva SOS dopušča, da so različni geni različno inducirani pri neki stopnji poškodbe DNA. Geni, na katere se LexA veže najšibkeje, so popolnoma inducirani kot odgovor na celo šibko indukcijo SOS, medtem ko so tisti, ki vežejo LexA najmočnejše, popolnoma inducirani le v odzivu na močno indukcijo SOS (Friedberg in sod., 2005).



Slika 2: Razporeditev različnih LexA vezavnih zaporedij SOS (črni zabojčki) glede na promotorje genov SOS. Promotorji so označeni z -35 do (konsenzno zaporedje TTGACA) in -10 regijo (konsenzno zaporedje TATAAT) (beli zabojčki). Identifikacija promotorskih motivov je zanesljiva za vse razen *polB* in *ruvAB*. Črne pikice kažejo alternativno mesto začetka transkripcije (Schnarr in sod., 1991).

2.6 HETEROGENOST IZRAŽANJA

Fenotipska raznolikost omogoča populacijam prokariotskih in evkariotskih organizmov, da se prilagodijo in preživijo okoljske motnje. Veliko zanimanje je za pojasnitev molekulskih mehanizmov heterogenosti. Mehanizmi, ki vodijo k heterogenosti, omogočajo bakterijam, da se fenotipsko prilagodijo na preživetje neugodnih pogojev in da izrabljajo nove niše (Mrak in sod., 2007; Dubnau in Losick, 2006).

Pri bakterijskih populacijah, čeprav jih sestavljajo identične celice, lahko nastopijo razlike v genskem izražanju, pri katerem deli populacije dobijo sposobnost za opravljanje specializiranih funkcij. Dobro znani primeri vključujejo bakterijski razvoj s primerom sporulacije pri *Bacillus subtilis* (Sonenshein, 2000) in oblikovanje hruškastega telesa pri *Myxococcus xanthus* (Jelsbak in Sogaard-Andersen, 2000), kot tudi genesko izmenjavo s primerom razvoja kompetence pri *Bacillus subtilis* (Haijema in sod., 2001) ter bistabilno perzistirajoče celice z odpornostjo na antibiotike (Dubnau in Losick, 2006). Produkcija kolicinov je nedvomno še ena specializirana funkcija in zelo verjetno so še številni drugi zaenkrat še ne identificirani primeri (Mulec in sod., 2003).

2.6.1 Mehanizmi heterogenosti

Heterogenost populacije celic lahko izhaja iz razlik v mikrookolju, ki obkroža celice. Če celica zazna vir drugačnega signala, kot je toksin ali vir hrane, se bodo obnašale drugače od ostalih. Vendar pa se tudi v nespremenljivem okolju populacije celic še vedno obnašajo heterogeno (Portle in sod., 2006). Eksperimentalno je bilo dokazano, da se večina molekul materinskih celic, razen kromosomska DNA, razdeli neenakomerno med dve hčerinski celici (Sweeney in sod., 1994; Tran in sod., 2000; Kellher in sod., 2000; Bellaiche in sod., 2001; Orgogozo in sod., 2002). Zaradi tega imajo hčerinske celice že začetno različno znotrajcelično stanje in kot rezultat kažejo različne fenotipe. Poleg neenakomerne razdelitve celičnega materiala pri delitvi lahko heterogenost populacije celic izhaja iz stohastičnega pojava na ravni posamezne celice, ki ni povezano s celično delitvijo. Ta pojav je pri vsaki celici v veliki meri določen s funkcijo dobro znanih razredov molekul, znanih kot regulatorne molekule, ki so tipično prisotne v zelo nizkih koncentracijah, in še posebej zaradi tega vpliva nihanje v količini zaradi stohastičnih dogodkov na heterogeno izražanje. Zato celo celice, ki imajo identično vsebino v določeni točki v času, lahko kažejo razlike v stanju in fenotipu v naslednjem trenutku. Kot rezultat je heterogenost populacije celic tesno povezana z uravnavo izražanja genov (Portle in sod., 2006).

2.6.2 Odziv SOS in heterogenost

2.6.2.1 Vpliv uporabe antibiotikov na odziv SOS

Klasične snovi, ki poškodujejo DNA, kot sta mitomicin C ali antibiotiki, ki se vpletajo v podvojevanje DNA (ciprofloksacin, fluorokinolon), poleg tega tudi antibiotiki, ki vplivajo na sintezo celične stene (β -laktam), inducirajo odziv SOS (Lewin in Amyes, 1991; Phillips in sod., 1987; Miller in sod., 2004) in zato lahko pospešijo širjenje virulentnih dejavnikov in rezistenc na zdravila s horizontalnimi genskimi prenosi mobilnih elementov, ki nosijo te zapise (Kelley., 2006; Mallik in sod., 2006).

Aktivacija RecA preko odziva SOS lahko sproži derepresijo temperiranih bakteriofagov preko avtocepitve represorja CI, kar ima precejšnje genetske posledice, vključno s povečanjem horizontalnih prenosov in spremenjenim izražanjem genov, katere nosijo fagi, npr. toksinov. Kar je nedavno postalo pomembno je, da uporaba določenih antibiotikov, pogosto v subinhibitorni koncentraciji, sproži odziv SOS, ki zgleда, da vpliva na horizontalne genske prenose, širjenje rezistenc na antibiotike in indukcijo virulentnih dejavnikov (Kelley., 2006; Mallik in sod., 2006).

Dokazano je, da je za pridobitev rezistence proti ciprofloksacinu in rifampicinu pri *E. coli* potrebna indukcija odziva SOS. Pri miši okuženi s sevom okvarjenim v genu *lexA*, kjer LexA ni bil sposoben avtoproteolize, se po dodatku ciprofloksacina ali rifampicina niso razvile odporne bakterije. V nasprotju pa se je pri miši okuženi s kontrolnim sevom z *lexA* genom divjega tipa pokazala občutna in hitra pridobitev rezistence po izpostavitvi obema zdraviloma. To kaže, da je za nastanek odpornih celic potrebna indukcija SOS (Cirz in sod., 2005). Ciprofloksacin pa prav tako inducira od SOS odvisno sintezo kolicinov (German in sod., 2005).

Uporaba nekaterih antibiotikov, tako v zdravstvu kot tudi žvinioreji, utegne omogočiti horizontalno širjenje determinant odpornosti proti antibiotikom med bakterijskimi vrstami (Beaber in sod., 2004).

2.6.2.2 Vpliv LexA variacij na heterogenost izražanja

Znano je, da LexA ni enakomerno izražen v vseh celicah. Molekularna osnova za nihanja v količini LexA še vedno ostaja nejasna. Znotrajcelična koncentracije LexA se očitno spreminja z ravnimi pogoji, ker se znotrajcelične koncentracije spreminjajo med rastjo (Dri in Moreau, 1993).

2.6.2.2.1 Heterogenost v izražanju kolicinov

Kolicini so toksični eksoproteini, ki jih proizvajajo bakterije kolicinogenih sevov *Escherichia coli* in nekaterih sorodnih vrst družine *Enterobacteriaceae*. Kolicini zavirajo občutljive bakterije iste družine (Šmarda in Šmajs, 1998).

Heterogeno izražanje kolicinov, kjer samo del kolicinogene populacije izraža gen aktivnosti, na primer kolicina K, je določeno: (1) Z bazalno indukcijo SOS. Pri tem pride do izražanja *cka* zaradi znotrajceličnih dogodkov, ki povzročijo zaustavitev replikacijskih vilic in nastanek enoverižne DNA in aktivirajo odziv SOS brez zunanjih dejavnikov, ki bi poškodovali DNA. (2) S stohastični dejavniki. Izražanje *cka* bi naj bilo naključno, kot možna posledica odvisnosti od znotrajcelične koncentracije proteina LexA (McAdams in Arkin, 1999; Ozbudak in sod., 2002) in (3) medsebojnega delovanja dimerov LexA pri vezavi na *cka* LexA vezavna zaporedja (Lloubes in sod., 1991). Lahko pa so v heterogeno izražanje vpleteni tudi drugi regulatorni proteini, ki odmaknejo LexA iz vezavnega mesta, ali aktivirajo transkripcijo brez odmaknitve LexA (Mulec in sod., 2003).

2.7 MERJENJE ODZIVA SOS

V času zadnjih 30 let se je kar nekaj laboratorijev posvetilo vprašanju, ki se tičejo funkcije genov SOS in mehanizmov odgovornih za njihovo uravnavo. Dokler niso tehnike fluorescentne mikroskopije, katere so omogočile neposredno merjenje izražanja genov v posameznih celicah, postale dostopne, so indukcijo SOS merili v celotnih kulturah (Michel, 2005). Kronično inducirane celice so bile uporabljene za meritve indukcije SOS v posameznih celicah (McCool in sod., 2004), kjer je navidezna homogenost izražanja genov sistema SOS na ravni populacije prikrila navzočnost stohastičnih dogodkov v posameznih celicah. Stopnja izražanja SOS genetsko identičnih celic raslih pri enakih pogojih se razlikuje od celice do celice, s pojavom visoko induciranih celic ob neinduciranih (Michel, 2005).

Klasične tehnike uporabljene za študije odziva SOS vključujejo tretiranje bakterijskih kultur s snovmi, ki poškodujejo DNA, čemur sledi analiza poročevalskih genov fuziranih na promotorje SOS ali direktna kvantifikacija proteinov LexA in RecA s tehniko imunoprenosa (Michel, 2005). Nedavno so bile uporabljene mikromreže za merjenje časa in amplitude indukcije v bakterijskih populacijah (Ronen in sod., 2002).

2.7.1 Preučevanje genov SOS z GFP

Ronen in sodelavci (2002) so razvili sistem za sledenje transkripcijske aktivnosti operonov v realnem času s pomočjo poročevalskih plazmidov v nizkem številu kopij (Kalir in sod., 2001), v katerih promotor uravnava izražanje gena *gfp*. V vsakem plazmidu različni promotor uravnava stopnjo transkripcije istega poročevalskega gena, *gfp*, in zato je količina nastalega transkripta proporcionalna količini akumuliranega zelenega

fluorescirajočega proteina, GFP. Izražanje genov se lahko meri v živih celicah z uporabo GFP kot poročevalskega sistema. Številne raziskovalne skupine uporabljajo genske fuzije *gfp* s promotorji na plazmidih, kot poročevalskih sistemih za študije ravni izražanja odziva SOS (Cormack in sod., 1996).

2.7.1.1 Zeleni fluorescirajoči protein GFP

Zeleni fluorescirajoči protein je naravno fluorescirajoč, netoksičen, majhen (27 kDa) in ekstremno stabilen protein iz 238 aminokislin. GFP izvira iz meduze *Aequorea victoria* (Phraser in sod., 1992). GFP producira močno zeleno fluorescenco brez dodanega zunanjega substrata, ko je osvetljen z modro svetlobo, in je zelo uporabno orodje za opazovanje izražanja genov in lokalizacije proteinov na ravni posameznih celic (Chalfie in sod., 1994). Ker je vzbujevalni in emisijski spekter GFP podoben kot pri FITC, se lahko uporabljajo običajni fluorescentni filtri in 488 nm Ar ionski žarek (Chalfie in sod., 1994; Cormack in sod., 1996).

DNA, ki ima zapis za GFP, je vstavljena v ekspresijski vektor in s transformacijo vnesena v celice, ki nas zanimajo. Zaporedje, ki kodira GFP, je vstavljeno v vektor v pravilni orientaciji blizu močnega promotorja in izražanje *gfp* je inducirano (Cormack in sod., 1996).

2.8 ODZIV SOS IN KOLICINI

2.8.1 Kolicini

Bakteriocini so najdeni v skoraj vseh bakterijskih vrstah (Klaenhammer, 1988). Bakteriocini se razlikujejo od tradicionalnih antibiotikov, saj imajo relativno ozek spekter ubijanja in so toksični samo za bakterije zelo sorodne producirajočemu sevu (Riley in Wertz, 2002b). Možna uporaba bakteriocinov je v medicini kot alternativa klasičnim antibiotikom v tretiranju bakterijskih infekcij in prehrambeni industriji z uporabo bakteriocinov kot konzervansov (Riley in Wertz, 2002a).

Kolicini so toksični eksoproteini, ki jih proizvajajo bakterije kolicinogenih sevov *Escherichia coli* in nekaterih sorodnih vrst družine *Enterobacteriaceae*. Kolicini zavirajo občutljive bakterije iste družine. Opisanih je več kot 34 različnih kolicinov. Približno 35 % *E. coli* sevov v človeškem prebavnem traktu je kolicinogenih. Kolicinogene bakterije imajo pred nekolicinogenimi selektivno prednost: ubijejo kompetitivne bakterije drugih sevov iste vrste, s katerimi tekmujejo za hranila in prostor, medtem ko so same imune na lastne kolicine. Produkcija kolicina je letalna za producirajočo celico in sosednje celice, ki prepoznajo kolicin in so dovzetne. Protein imunosti ne ščiti kolicinogene celice le pred lastnimi kolicini, ampak tudi pred kolicini istega tipa, ki deluje iz okolja (Šmarda in Šmajs, 1998; Cursino in sod., 2002; Riley, 1998).

2.8.1.1 Mehanizem delovanja kolicinov

Interakcija z občutljivimi bakterijami vključuje tri korake: (1) vezava kolicina na specifični receptor v bakterijski zunanji membrani; (2) njegova translokacija preko celične ovojnice; in (3) njegova letalna interakcija s specifično tarčno molekulo v celici. Razdelitev kolicinov je osnovana na razlikah pri molekularnih dogodkih teh treh korakov (Šmarda in Šmajs, 1998).

Kolicini ubijajo občutljive bakterije na različne načine. Najbolj pogosti je oblikovanje ionskih kanalčkov v plazemski membrani, zaradi česar pride do depolarizacije membrane. Manj pogosti je nukleazna aktivnost kolicinov, ki delujejo na kromosomsko DNA, z delovanjem kot nespecifične DNA endonukleaze ali specifične endonukleaze na 16S-rRNA. Najmanj pogosti je razgradnja ali inhibicija sinteze peptidoglikana celične stene in posledično celična liza. Kolicin E7 deluje kot nespecifična DNA endonukleaza. Kolicini A, N, E1 in K so porotvorni (Šmarda in Šmajs, 1998).

2.8.1.2 Zaščita pred kolicini

Kolicinogeni sevi so proti lastnemu kolicinu vedno imuni. Vendar pa niso vsi sevi, ki nimajo zapisa za ta kolicin nanj občutljivi, kar je lahko posledica: (a) odpornosti zaradi odsotnosti funkcionalnega kolicinskega receptorja; (b) tolerance, ki je povezana z odsotnostjo funkcionalnega kolicinskega translokacijskega sistema; in (3) imunosti, pri kateri ima celica funkcionalni receptor in translokacijski sistem, ima pa tudi protein imunosti, ki se sintetizira skupaj s kolicinom in integrira s kolicinom, da prepreči njegovo letalno delovanje (Šmarda in Šmajs, 1998).

2.8.1.3 Zapis in organizacija zapisa za kolicine

Zapisi za sintezo kolicinov se nahajajo na Col plazmidih, ki so različnih velikosti (Riley, 1993; Šmarda in Šmajs, 1998; Cursino in sod., 2002). Plazmidi Col imajo strukturni gen za kolicin (*cea* v primeru pColE1), kateremu sledi gen za protein imunosti (*imm*), ki kodira protein, ki posreduje producirajočemu sevu imunost z vezavo na toksin in njegovo inaktivacijo. Sledi gen za lizo (*kil*), ki nosi zapis za litični protein vpleten v sproščanje kolicina iz producirajoče celice (Šmarda in šmajs, 1998; Wan Der Waal in sod., 1995).

2.8.1.3.1 *imm* gen porotvornih kolicinov

Pri porotvornih kolicinih je gen *imm* prepisan konstitutivno nasprotno od strukturnega gena za kolicin in gena *kil* ter ima lastni šibek promotor, neodvisen od sistema SOS (Šmarda in Šmajs, 1998).

2.8.1.3.2 *imm* gen nukleaznih kolicinov

Pri kolicinih z nukleazno aktivnostjo je gen *imm* del transkripcijske enote in je orientiran v smeri transkripcije obeh drugih genov in intenzivnost njegove transkripcije je proporcionalna transkripciji obeh. Kolicin z nukleazno aktivnostjo se takoj po sintezi poveže v kompleks s proteinom imunosti. Na ta način je njegova aktivnost nevtralizirana (Šmarda in Šmajs, 1998).

2.8.1.4 Uravnava sinteze kolicinov

Sintezo kolicinov uravnavajo številni mehanizmi. Osnovna uravnava, skupna vsem kolicinom, je s sistemom SOS, ki je vpleten pri uravnavanju izražanja genov, ki sodelujejo pri popravilu poškodovane DNA. Prepisovanje genov kolicinov lahko sprožimo z dodatkom mitomicina C v gojišče ali UV svetlobo. Pod normalnimi pogoji je sinteza kolicinov utišana v večini celic populacije, izraža se samo v majhnem delu populacije kot rezultat naključne spontane aktivacije sistema SOS (Šmarda in Šmajs, 1998).

Intenzivna sinteza kolicina se ne začne, za razliko od drugih genov reguliranih z odzivom SOS takoj, ampak v zaostanku. Celica s tem pridobi čas, da popravi poškodbe in vzpostavi represijo še preden se pojavi indukcija letalnega proteina celične lize (Salles in sod., 1987).

Številni kolicini so sproščeni s celično lizo. Da bi celice preprečile prekomerno lizo, naj bi bili geni, ki kodirajo kolicine, različno izraženi, tako da pod inducirajočimi pogoji le del populacije izraža gen za aktivnost in lizo.

LexA reprimira izražanje genov kolicinov in s tem prepreči lizo celic, dokler ne pride specifični okoljski signal, kot pomanjkanje hranil, temperatura, ozmolarnost, pH spremembe, anaerobioza, ali produkcija metabolitov ali induktorjev, ki uravnava gensko izražanje. Tudi znotrajcelične koncentracije LexA se spreminjajo in vplivajo na izražanje genov kolicinov (Šmarda in Šmajs, 1998).

Mulec in sod. (2003) na osnovi fluorescence niso opazili izražanja genske fuzije *cka-gfp* v zgodnji prilagoditveni ali zgodnji eksponentni fazi. Prve fluorescentne celice so bile opažene v pozni eksponentni fazi, ko je približno 1 % bakterijske populacije fluoresciralo. V stacionarni fazi je bila fluorescenca, ki odraža izražanje kolicina, opažena pri približno 3 % analiziranih celic. Pokazali so, da LexA protein kaže močan negativni učinek z represijo izražanja kolicina K skoraj popolnoma v eksponentni fazi in v približno 97 % populacije v stacionarni fazi. Zaključili so, da je protein LexA odločilni regulatorni element v vzpostavljanju diferencialnega izražanja sinteze kolicinov na ravni transkripcije v veliki večini celic (Mulec in sod., 2003).

Možno je, da bi tudi kateri drugi regulatorni proteini, katerih koncentracije nihajo kot odgovor na okoljske signale, odmaknili LexA iz *cka* vezavnih zaporedij ali alternativno aktivirali transkripcijo brez odmaknitve LexA (Mulec in sod., 2003).

2.8.1.5 LexA vezavna zaporedja in kolicini

Protein LexA je ključni regulator, ki reprimira gene za sintezo kolicinov (Friedberg in sod., 1995). Kolicini imajo dve prekrivajoči se zaporedji in na vsako se veže dimer LexA, da reprimira izražanje. Kolicini so sproščeni z lizo producirajoče celice in dve prekrivajoči se LexA vezavni zaporedji kažeta učinkovito utišanje izražanja, s čimer ščitijo producirajoči sev pred prekomerno lizo (Schnarr in sod., 1991; Lu in Chack, 1996).

Distalno LexA vezavno zaporedje ima večjo vlogo pri utišanju izražanja gena *cka*, kar je v skladu z večjo afiniteto vezave LexA na distalno zaporedje. Primerjava več kolicinskih dvojnih LexA vezavnih zaporedij in njihovih HI je pokazala, da ima pri večini distalno zaporedje večjo afiniteto vezave LexA (Lewis in sod., 1994).

Upravljanje izražanja kolicinov je proces več dejavnikov, ki vključujejo indukcijo SOS brez zunanjih dejavnikov, ki bi poškodovali DNA, afiniteto LexA vezave na LexA vezavno zaporedje, kot tudi stohastičnost kot posledica nihanj znotrajceličnih koncentracij proteina LexA (McAdams in Arkin, 1999; Ozbudak in sod., 2002).

Produkcija substanc z antimikrobnimi lastnostmi, kot so kolicini, je en od številnih mehanizmov, ki omogočajo bakterijam, da se odzivajo na izzive okolja. (Campbell, 1981). Kolicin producirajoči sevi se pogosto pojavljajo v naravnih populacijah bakterije *Escherichia coli* in izgleda, da igrajo pomembno vlogo v kompetitivnih reakcijah med člani mikrobnih združb za obrambo ali prevzem ekološke niše (Riley in Gordon, 1996).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Laboratorijski sevi bakterije *Escherichia coli*

Uporabljeni Laboratorijski sevi *E. coli*, prikazani v preglednici 2, izvirajo iz zbirke Katedre za molekularno genetiko in mikrobiologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Preglednica 2: Laboratorijski sevi *E. coli*.

sev	genotip	vir
DH5 α	$\Phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169 } \text{endA1 } \text{recA1 } \text{hsdR17 } \text{deoR } \text{thi-1 } \text{supE44 } \text{gyrA96 } \text{relA1}$	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
RW118	$\text{thr-1 } \text{araD139 } \Delta(\text{gpt-proA})62 \text{ lacY1 } \text{tsx-33 } \text{supE44 } \text{galK2 } \text{hisG4 } \text{rpsL31 } \text{xyl-5 } \text{mtl-1 } \text{argE } \text{thi-1 } \text{sulA211}$	R. Woodgate, National Institutes of Health, Bethesda, ZDA
RW464	RW118 <i>recA</i>	R. Woodgate, National Institutes of Health, Bethesda, ZDA
AB1157	$\text{argE3 } \text{his4 } \text{leuB1 } \text{proA2, } \text{thr1, } \text{ara14, } \text{galK2, } \text{lacY1, } \text{mtl1 } \text{xyl5 } \text{thi1 } \text{tsx33 } \text{rpsL31 } \text{supE44}$	Ronen in sod., 2002
MC4100	$\text{araD139 } \Delta(\text{argF-lac})\text{U169 } \text{rpsL150 } \text{relA1 } \text{flbB5301 } \text{ptsF25 } \text{deoC}$	Lange in sod., 2003

3.1.2 Plazmidi

V nalogi smo uporabili plazmide, v majhnem številu kopij, z genskimi fuzijami promotorske regije z *gfp*, ki služi kot poročevalski gen (Cormack in sod., 1996), prikazane v preglednici 3. Plazmidi pSC200, pSC201, pSC202, pSC203 in pSC204 v sevu AB1157 so bili pridobljeni iz raziskave Ronen in sod. (2002), kjer so jih uporabili za drugačne raziskave. Plazmida pKCT3 in pKCT4 v sevu MC4100 sta bila ustvarjena na Katedri za molekularno genetiko in mikrobiologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani in že uporabljena za podobno raziskavo. Plazmide smo izolirali in jih uporabili za naše delo.

pSC101 je plazmid v majhnem številu kopij (1–3 na celico) in ga uporabljajo kot vektorski plazmid za kloniranje (Cohen in sod., 1977). Ima kaseto za rezistenco proti kanamicinu in poliklonsko mesto, navzdol katerega je vstavljen *gfp*.

Preglednica 3: Plazmidi z *gfp* fuzijami.

plazmid	pomembne lastnosti	vir
pColK-JA533	<i>cka cki ckl</i>	Kuhar in Žgur-Bertok, 1999
pKCT3	pColK s <i>cka-gfp</i> Ap ^r Kn ^r	Mulec in sod., 2003
pKCT4	pColK-JA53 s <i>cki-gfp</i> Kn ^r	Mulec in sod., 2003
pSC101	plazmid v majhnem številu kopij z <i>gfp</i> brez promotorja, 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
pSC203	<i>uvrA-gfp</i> Kn ^r	Ronen in sod., 2002
pSC204	<i>polB-gfp</i> Kn ^r	Ronen in sod., 2002

Uporabili smo tudi plazmide z zapisi za kolicine, ki izhajajo iz Pugsleyeve zbirke sevov (A. Pugsley, Institute Pasteur, Pariz, Francija), prikazane v preglednici 4, in so bili predhodno preneseni v sev RW118 za drugačne raziskave. V plazmide je bil predhodno vnesen transpozon Tn3 z zapisom za Ap^r. Plazmide z zapisi za kolicine smo izolirali, pripravili željene genske fuzije v plazmidu pSC101, in jih uporabili za našo delo.

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

plazmid	pomembne lastnosti	vir
pColA::Tn3	<i>caa cai cal</i> Ap ^r	A. Pugsley, Institute Pasteur, Pariz, Francija
pColN::Tn3	<i>cna cni cni</i> Ap ^r	A. Pugsley, Institute Pasteur, Pariz, Francija
pColE1::Tn3	<i>cea1 cei1 cel1</i> Ap ^r	A. Pugsley, Institute Pasteur, Pariz, Francija
pColE7::Tn3	<i>cea7 cei7 cel7</i> Ap ^r	A. Pugsley, Institute Pasteur, Pariz, Francija
pSC300	<i>caa-gfp</i> Kn ^r	Kamenšek, 2007
pSC301	<i>cna-gfp</i> Kn ^r	Kamenšek, 2007
pSC302	<i>cea1-gfp</i> Kn ^r	Kamenšek, 2007
pSC303	<i>cea7-gfp</i> Kn ^r	Kamenšek, 2007

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)

Za pripravo tekočega gojišča LB smo v destilirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB (tripton-10 g, NaCl-10 g, kvasni ekstrakt-5 g). Gojišče smo pripravili v čaši, ga alikvotirali v erlenmajerice (20 ml, 50 ml) in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

3.1.3.2 Tekoče gojišče z antibiotiki

Tekoče gojišče z antibiotiki smo pripravili enako kot tekoče LB (Luria-Bertani), le da smo po avtoklaviranju in pred uporabo dodali ustrezno količino antibiotika.

Preglednica 5: Koncentracija antibiotikov v gojišču LB.

antibiotik	koncentracija (µg/ml)
Ampicilin (Ap)	100
Kanamycin (Kn)	10

3.1.3.3 Trdo gojišče LB

Za pripravo trdih gojišč LB smo v destilirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB in 15 g/l agarja ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo dali gojišče v kopel, da se je ohladilo na 55 °C in ga aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.3.4 Trdo gojišče LB z antibiotiki

Trdo gojišče smo pripravili po enakem postopku kot smo pripravili trdo gojišče LB brez antibiotika, le da smo po avtoklaviranju in pred razlivanjem plošč v ohlajeno gojišče dodali ustrezno količino antibiotika.

3.1.3.5 Tekoče gojišče SOC («super optimal broth with carbon»)

Za pripravo tekočega gojišča SOC smo v destilirani vodi raztopili 28 g/l gojišča SOB (20 g bakto triptona, 5 g bakto kvasnega ekstrakta, 0,5 g NaCl, 2,4 g MgSO₄×H₂O, 0,186 g KCl) ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45–50 °C in dodali 20 ml preko filtra sterilizirane 20-odstotne glukoze.

3.1.4 Kemikalije

DIFCO Laboratories, Detroit, ZDA

- SOB

FERMENTAS, Vilna, Litva

- pufer R za *Xho*I
- pufer za *Bam*HI
- pufer Tango (za *Xho*I in *Bam*HI)
- DNA standard – 1 kb lestvica

KEFO, Ljubljana, Slovenija

- 96-odstotni etanol

KEMIKA, Zagreb, Hrvaška

- saharoza
- glicerol
- glukoza

MERCK, Darmstadt, Nemčija

- agar-agar
- 100-odstotni etanol
- izopropanol
- NaCl
- bromfenol modro
- MgCl_2
- amonacetat
- borova kislina

ROTH, Karlsruhe, Nemčija

- LB
- agaroza
- baza TRIS

SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA

- ampicilin
- kanamicin
- kloramfenikol
- agaroza
- etidijev bromid
- poli-L-lizin
- ksilen cianol
- EDTA

3.1.5 Kiti

AMERSHAM BIOSCIENCES, Buckinghamshire, Velika Britanija

- komplet za določanje nukleotidnega zaporedja »ThermoSequenaseTMCyTM5Dye Terminator Sequencing Kit«
 - o dNTP mešanica (deoksiribonukleozid trifosfat)
 - o ddATP mešanica (dideoksi označen adenin)
 - o ddCTP mešanica (dideoksi označen citozin)
 - o ddGTP mešanica (dideoksi označen gvanin)
 - o ddTTP mešanica (dideoksi označen timin)
 - o raztopina glikogena
 - o reakcijski pufer
 - o TS DNA polimeraza

FERMENTAS, Vilna, Litva

- 2× PCR Master Mix (mešanica za PCR: dNTP-ji, pufer za *Taq* DNA polimerazo, *Taq* DNA polimeraza, MgCl₂)
- komplet »GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit« za izolacijo plazmidne DNA
 - raztopina za resuspendiranje
 - raztopina za celično lizo
 - nevtralizacijska raztopina
 - raztopina z etanolom za spiranje
 - pufer za elucijo
 - kolone za mikrocentrifugirke
- komplet »Rapid DNA Ligation Kit« za ligacijo
 - T4 DNA ligaza
 - 5× ligacijski pufer

MACHEREY-NAGEL, Düren, Nemčija

- komplet »NucleoSpin® Plasmid« za izolacijo plazmidne DNA
 - raztopina A1 za resuspendiranje
 - raztopina A2 za celično lizo
 - raztopina A3 za nevtralizacijo
 - raztopina AW za blokiranje nukleaz
 - raztopina A4 z etanolom
 - raztopina AE za elucijo

QIAGEN, Hamburg, Nemčija

- komplet »QIAQuick Gel Extraction Kit« za čiščenje fragmentov iz elektroforeznega gela
 - kolone za mikrocentrifugirke
 - pufer QG
 - pufer PE
 - pufer EB
- komplet »QIAQuick PCR purification Kit« za menjavo pufra
 - kolone za mikrocentrifugirke
 - pufer PBI
 - pufer PE
 - pufer EB

3.1.6 Encimi

FERMENTAS, Vilna, Litva

- restriktaza *XhoI*
- restriktaza *BamHI*
- T4 ligaza
- TS DNA polimeraza

3.1.7 Začetni oligonukleotidi

JENA Bioscience GmbH, Jena, Nemčija

- *caa* F, *caa* R
- *cna* F, *cna* R
- *cea1* F, *cea1* R
- *cea7* F, *cea7* R

3.1.8 Pufri in reagenti

- TE pufer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

Agarozna gelska elektroforeza

- 5×TBE (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA) hranjen pri sobni temperaturi
- 0,8-odstotni elektroforezni agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,28 g agaroze dodali v 35 ml pufra 0,5×TBE, segreli, da se je agaroz raztopila, nekoliko ohladili ter nato v gel dodali 1,5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml)
- 1-odstotni elektroforezni agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,35 g agaroze dodali v 35 ml pufra 0,5×TBE, segreli, da se je agaroz raztopila, nekoliko ohladili, ter nato v gel dodali 1,5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml)
- 1,5-odstotni elektroforezni agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,525 g agaroze dodali v 35 ml pufra 0,5×TBE, segreli, da se je agaroz raztopila, nekoliko ohladili ter nato v gel dodali 1,5 µl etidijevega bromida (10 mg/ml)
- nanašalni elektroforezni pufer (0,25-odstotni bromfenol modro; 0,25-odstotni ksilen cianol; 40-odstotna saharoza)

3.1.9 Oprema

Pri delu smo uporabljali naslednjo opremo:

- stresalnik Infors HT (Bottmigen, Švica)
- aparatura za PCR Biometra Uno II (Biometra, Göttingen, Nemčija)
- namizna centrifuga Eppendorf Centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- namizna centrifuga Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Bäch, Švica)
- avtomatske pipete Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtomatske pipete TRANSFERPETTE (Brand, Wertheim, Nemčija)
- transiluminator 2011 Macrovue (UV 302 nm) (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- elektroforeza 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- vroča kopel LKB – »MultiTemp II« (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA)
- vroča kopel ISOTEMP 215 (Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- elektroporator Electroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- UV/VIS spektrofotometer Lambda Bio (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
- naprava za določanje nukleotidnega zaporedja ALFexpress (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, ZDA)
- vibracijski stresalnik VIBROMIX 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- vibracijski stresalnik EV 100 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- električno mešalo ROTAMIX 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- invertni mikroskop Eclipse TE300 z digitalno kamero DXM 1200 (Nikon, ZDA)

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija plazmidne DNA s kompletom komplet »GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit«

Iz sevov z različnimi plazmidi z *gfp* fuzijami in plazmidi z zapisi za kolicine smo izolirali plazmidno DNA za nadaljnjo uporabo. Plazmidno DNA smo izolirali iz prekonočne kulture ene kolonije, ki smo jo prejšnji dan vcepili v 20 ml LB z ustreznim antibiotikom in preko noči inkubirali na 250 obr./min pri 37 °C. Ves postopek izolacije je potekal pri sobni temperaturi. Del prekonočne kulture smo centrifugirali v mikrocentrifugirkah 5 minut pri 8000 obr./min. Supernatant smo odstranili in usedlino resuspendirali v 250 µl resuspenzijske raztopine. Dodali smo 250 µl raztopine za celično lizo in mikrocentrifugirko 6× obrnili. Po tem smo dodali 350 µl nevtralizacijske raztopine in premešali vsebino z obračanje mikrocentrifugirke 6×. Vsebino smo centrifugirali 5 minut pri 14000 obr./min, da sta se ločili DNA in oborina z razbitimi celicami. Supernatant s plazmidno DNA smo prenesli v za to pripravljene kolone z mikrocentrifugirkami. Centrifugirali smo 1 minuto in zavrgli supernatant. Na kolono se je pri tem vezala plazmidna DNA in nečistoče, ki smo jih odstranili s spiranjem s 500 µl raztopine, ki vsebuje etanol. Centrifugirali smo 1 minuto pri 14000 obr./min ter zavrgli supernatant. Ta del smo še enkrat ponovili. Zavrgli smo supernatant in še enkrat dodatno centrifugirali 1 minuto, da smo odstranili ostanke etanola. Na koncu smo kolono prenesli v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko in plazmidno DNA eluirali s 50 µl elucijskega pufra s centrifugiranjem 1 minuto pri 14000 obr./min. Do uporabe smo shranili pri –20°C.

Izolacija plazmidne DNA smo s kompletom »NucleoSpin® Plasmid« poteka na enak način, razlikuje se le v malo drugačnih volumnih raztopin in časih centrifugiranja.

3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.2.1 Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo

Začetne oligonukleotide iz preglednice 6 smo uporabili za pomnožitev promotorskih regij kolicinov.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo.

začetni oligonukleotid	nukleotidno zaporedje 5'-3'
ColA-vodilni	TCC TCG AGA TGC TCT GAT CAG TTC ACT
ColA-povratni	TCG GAT CCT ACC ACC ACC CGG CTC
ColN-vodilni	TCC TCG AGG ATC AGT TCA CTG GTT TCA
ColN-povratni	TCG GAT CCG CCA CTG GTA TTA CCA ATG
ColE1-vodilni	TCC TCG AGC AGT TCA CTG GTT TCA ACC
ColE1-povratni	TCG GAT CCC CCG TCA GGA GTA CCA TTC
ColE7-vodilni	TCC TCG AGA GGA ATA CAA CAC CTT AAA
ColE7-povratni	TCG GAT CCT AGG GCC GCC ATT AAT GTT

3.2.2.2 Reakcijska mešanica za verižno reakcijo s polimerazo in PCR program

PCR reakcija za pomnoževanje promotorskih regij kolicinov iz izolirane plazmidne DNA je tekla v 50 µl reakcijske mešanice, katere sestava je podana v preglednici 7.

Preglednica 7: PCR mešanica plazmidno DNA.

začetni oligonukleotid 1 (vodilni)	1 µl
začetni oligonukleotid 2 (povratni)	1 µl
plazmidna DNA	0,3 µl
2× PCR Master mix	25 µl
destilirana voda	22,7 µl

PCR reakcija za pomnoževanje promotorskih regij kolicinov iz svežih kolonij je tekla v 20 µl reakcijske mešanice, katere sestava je podana v preglednici 8. To PCR reakcijo, ki je tekla po programu iz preglednice 9, smo uporabili za preverjanje uspešnosti kloniranja (restrikcije, ligacije in transformacije) promotorskih regij.

Preglednica 8: PCR mešanica z bakterijskimi celicami.

začetni oligonukleotid 1 (vodilni)	0,4 µl
začetni oligonukleotid 2 (povratni)	0,4 µl
bakterijske celice	kolonija*
2× PCR Master mix	10 µl
destilirana voda	9,2 µl

*s sterilnim zobotrebcem zajeta kolonija in resuspendirana v reakcijski mešanici

Preglednica 9: PCR program.

začetna denaturacija	94 °C	4 min	1×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 s	30×
pomnoževanje	75 °C	45 s	
končno pomnoževanje	75 °C	7 min	1×

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Strjeni gel smo vstavili v elektroforezno banico ter prelili s pufrom 0,5×TBE, v katerem je potekala elektroforeza. Sledil je nanos 5 do 10 µl 1-kb lestvice, ki nam služi za prepoznavanje približne velikosti DNA. Preden smo vzorce nanесли, smo jih zmešali z nanašalnim elektroforeznim pufrom v razmerju 1:5. Napetost med elektrodama je znašala 100–120 V/cm.

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabljali za:

- preverjanje prisotnosti in velikosti fragmentov dobljenih v verižni reakciji s polimerazo v 0,8 ali 1-odstotnem gelu,
- preverjanje uspešnosti izolacije plazmidne DNA v 0,8 ali 1-odstotnem gelu,
- preverjanje uspešnosti restrikcije v 1,5-odstotnem gelu,
- izolacijo fragmentov ustrezne velikosti v 0,8-odstotnem gelu (pri pripravi vektorske plazmidne DNA, v katero smo ligirali promotorje kolicinov in pri rezanih fragmentih).

3.2.4 Ekstrakcija fragmentov DNA iz agaroznega gela s kompletom »QIAQuick Gel Extraction Kit« (Qiagen, Hamburg, Nemčija)

V prazne mikrocentrifugirke, ki tehtajo približno 1 g, smo prenesli izrezane koščke gela z določenim DNA fragmentom. Koščke gela smo razporedili v centrifugirke tako, da ena ni tehtala več kot 0,2 g, zaradi dodanih nadaljnjih volumnov. Ko smo določili maso gela v posamezni mikrocentrifugirki, smo na 1 volumen gela dodali 3 volumne pufru QG (pri tem smo upoštevali, da je 100 mg ~ 100 µl). Pri 50 °C smo inkubirali 10 minut oziroma dokler gel ni bil popolnoma raztopljen in vsake 2–3 minute premešali z obračanjem. Nato smo vzorcu dodali 1 volumen izopropanola in premešali. Vsebino smo nato prenesli v kolono z mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri 14000 obr./min, pri čemer se je na kolono vezala DNA. Supernatant smo zavrgli. Dodali smo 500 µl pufru QG in centrifugirali 1 minuto. Kolono smo sprali tako, da smo nanесли 500 µl pufru PE, počakali 2 minuti in centrifugirali 1 minuto. Supernatant smo zavrgli in ponovno centrifugirali 1 minuto. Kolono smo nato prenesli v sterilno mikrocentrifugirko ter DNA sprali z dodatkom 50 µl pufru EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) in centrifugiranjem 1 minuto. Do uporabe smo shranili pri –20 °C.

3.2.5 Obarjanje DNA z amonacetatom in etanolom

Za restrikcijo PCR produkta smo najprej morali odstraniti ostanke PCR mešanice (encime, pufer, primerje), da je restriktaza lahko optimalno delovala.

50 µl PCR produkta smo dodali 15 µl 10 M amonacetata, premešali in dodali 0,3 ml mrzlega 96-odstotnega etanola (4 °C), zopet premešali in 10 minut inkubirali pri –80 °C. Nato smo 15 minut centrifugirali pri sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in dodali 1

ml 80-odstotnega etanola, premešali, centrifugirali 1–2 minuti pri 14000 obr./min. Supernatant smo odlili in centrifugirali še nekaj sekund. S pipeto smo odstranili ves etanol in odprto mikrocentrifugirko sušili pri sobni temperaturi 5–10 min. Ko se je DNA posušila in postala prosojna, smo jo resuspendirali v 50 µl pufru TE.

Isti postopek smo uporabili tudi za menjavo pufru med restrikcijama fragmentov DNA najprej z enim in nato z drugim encimom.

3.2.6 Menjava pufru s kompletom »QIAQuick PCR Purificatin Kit«

Komplet smo uporabili za menjavo pufru med reakcijo restrikcije z enim in nato drugim encimom, saj vsak encim za optimalno delovanje potrebuje ustrezeni pufer v katerem cepi. Volumnu reakcijske mešanice smo dodali 5 volumnov pufru PBI. Vsebinsko smo prenesli v kolono z mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 min pri 14000 obr./min, pri čemer se je na kolono vezala DNA. Supernatant smo zavrgli. Kolono smo sprali z dodatkom 750 µl pufru PE z etanolom in centrifugiranjem 1 min. Supernatant smo zavrgli in ponovno centrifugirali 1 min. Kolono smo nato prenesli v sterilno mikrocentrifugirko ter DNA sprali z dodatkom 50 µl pufru EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) in centrifugiranjem 1 min.

3.2.7 Restrikcija z restrikcijskima endonukleazama *Bam*HI in *Xho*I

S PCR namnožene fragmente promotorjev kolicinov smo želeli vstaviti v plazmid. Za to smo fragmente in vektorski plazmid cepili z istima restrikcijskima encimoma: *Bam*HI in *Xho*I. Za uspešno restrikcijo morata tako fragment kot plazmid imeti ustrezni restrikcijski mesti. Z uporabo dveh restrikcijskih encimov je zagotovljena pravilna orientiranost fragmenta in onemogočeno, da bi se cepljeni konci zlepili med seboj.

Pripravili smo 100 µl restrikcijske mešanice, katerih sestava je v preglednici 10 in 11, kjer smo DNA cepili najprej z enim encimom, zamenjali pufer in nato še z drugim encimom. Za restrikcijo z vsakim encimom smo restrikcijsko mešanico inkubirali 2 uri pri 37 °C.

Preglednica 10: Restrikcijska mešanica plazmida ali fragmenta z restrikcijsko endonukleazo *Bam*HI.

plazmidna DNA ali fragment DNA	50 µl
10× pufer <i>Bam</i> HI	10 µl
<i>Bam</i> HI	1 µl
destilirana voda	39 µl

Preglednica 11: Restrikcijska mešanica plazmida ali fragmenta z restrikcijsko endonukleazo *Xho*I.

plazmidna DNA ali fragment	50 µl
10× pufer R	10 µl
<i>Xho</i> I	1 µl
destilirana voda	39 µl

Restrikcijo smo uporabili tudi za preverjanje uspešnosti transformacije z ligacijo pripravljenih plazmidov v DH5 α . V ta namen smo iz transformant izolirali plazmidno DNA, ki smo jo nato cepili, da bi videli ali ima željeni fragment. Volumen restrikcijske mešanice je v tem primeru znašal 10 μ l, katere sestava je v preglednici 12.

Preglednica 12: Restrikcijska mešanica plazmida z restrikcijskima endonukleazama *Bam*HI in *Xho*I.

plazmidna DNA	7,6 μ l
2 $\times$ pufer Tango	2 μ l
<i>Bam</i> HI	0,2 μ l
<i>Xho</i> I	0,2 μ l

3.2.8 Ligacija cepljenega fragmenta s cepljenim plazmidom

Fragment in vektor smo ekstrahirali iz agaroznega elektroforeznega gela in nastavili ligacijo. V razmerju vektorski plazmid: fragment mora biti 3 $\times$ več fragmenta, da je ligacija uspešnejša. Ligacijsko mešanico iz preglednice 13 smo inkubirali preko noči pri 16 °C.

Preglednica 13: Ligacijska mešanica cepljenega fragmenta (promotorja) s cepljenim plazmidom.

cepljena plazmidna DNA	1 μ l
cepljeni fragment DNA	2,7* μ l
encim ligaza	0,3 μ l
10 $\times$ ligacijski pufer	1 μ l

*koncentracija je zelo nizka

3.2.9 Transformacija

3.2.9.1 Priprava kompetentnih celic RW118, RW464 in DH5 α

V 20 ml LB smo vcepili kolonijo in preko noči stresali na 250 obr./min pri 37 °C. Naslednji dan smo 150 μ l prekonočne kulture vcepili v 50 ml LB in inkubirali pri 37 °C pri 250 obr./min približno 3 ure oziroma dokler kultura ni dosegla optične gostote (OD₆₀₀) med vrednostma 0,4 in 0,6. 45 ml kulture smo odpipetirali v ohlajeno 50 ml sterilno centrifugirko ter inkubirali 10 minut na ledu. Še eno 50 ml centrifugirko smo imeli za utežitveno. Nato smo centrifugirali 10 minut pri 4000 obr./min pri 4 °C. Supernatant smo odlili iz centrifugirke in centrifugirali še 1 minuto ter odstranili preostanek supernatanta. Oborino smo resuspendirali v 8 ml ledeno mrzlega 0,1 M CaCl₂ in zopet inkubirali 10 minut na ledu. Po tem smo centrifugirali 10 minut pri 4000 obr./min pri 4 °C. Odstranili smo supernatant ter centrifugirali še 1 minuto. Po odstranitvi ostanka supernatanta smo usedlino resuspendirali v 1,8 ml ledeno mrzlega CaCl₂. Dobljeno suspenzijo kompetentnih celic smo razdelili v mikrocentrifugirke po 100 μ l, dodali 23 μ l 87-odstotnega glicerola (služi kot krioprotektant) ter shranili pri –80 °C do uporabe.

3.2.9.2 Transformacija kompetentnih celic

100 μ l kompetentnih celic smo dodali 10 μ l ligacijske mešanice (plazmidne DNA). Mešanico smo inkubirali 30 minut na ledu, nato pa inkubirali 90 sekund pri temperaturi 42 °C, da so se pore odprle in celice sprejele DNA. Da so se pore zaprle, smo takoj za tem inkubirali 2–3 minute na ledu. Mešanici smo nato dodali 400 μ l LB ter inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Po približno 1 uri stresa smo transformante razmazali na plošče LB z ustreznim antibiotikom in tako naredili selekcijo transformiranih in netransformiranih celic. Na posamezno ploščo smo iz mikrocentrifugirke odpipetirali po 100 μ l in s hokejko razmazali po celotni površini, in sicer na 5 plošč (oziroma na 3 plošče: 200, 100, 20 μ l). Preko noči smo inkubirali pri 37 °C in naslednji dan pregledali uspešnost transformacije.

3.2.10 Elektroporacija

3.2.10.1 Priprava elektrokompetentnih celic

2,5 ml sveže prekonočne kulture *E. coli* seva DH5 α smo vcepili v 500 ml LB smo in stresali pri 37 °C, dokler kultura ni dosegla optične gostote (OD₆₀₀) med 0,5 do 0,6. Nato smo celice 15 minut hladili na ledu, jih zatem prenesli v ohlajeno centrifugirko in centrifugirali 20 minut pri 5000 obr./min pri 24 °C. Usedlino celic smo resuspendirali v 5 ml ledeno mrzle destilirane vode in ponovno centrifugirali enako kot prej. Supernatant smo odlili in usedlino celic resuspendirali z vibracijskim stresalnikom v ostanku raztopine. Potem smo dodali 40 ml ledeno mrzlega 10-odstotnega glicerola, premešali in centrifugirali 10 minut pri 5000 obr./min in 2–4 °C. Supernatant smo odstranili in usedlino resuspendirali v ledeno mrzlem 10-odstotnem glicerolu do končne koncentracije, ki znaša približno 2×10^{11} celic/ml. Po 40–3000 μ l celic smo alikvotirali v ohlajene mikrocentrifugirke, na hitro zamrznili v tekočem dušiku (–176 °C) in shranili pri –80 °C do uporabe.

3.2.10.2 Elektroporacija celic

5 μ l ligirane plazmidne DNA smo dodali v mikrocentrifugirke s 50 μ l elektrokompetentnih celic. Homogenizirali smo tako, da smo nekajkrat nežno premešali s pipeto. Mešanico smo prenesli v ohlajeno kiveto in vstavili v elektroporator. Elektroporacija je potekala 5 milisekund pri 1700 V. Takoj po elektroporaciji smo dodali 600 μ l gojišča SOC in prenesli nazaj v mikrocentrifugirko. Nato smo inkubirali 45 minut s stresanjem pri 37 °C in po tem transformante razmazali na plošče LB z ustreznim antibiotikom (Kn) in tako naredili selekcijo transformiranih in netransformiranih celic. Na posamezno ploščo smo iz mikrocentrifugirke odpipetirali po 200 μ l in s hokejko razmazali po celotni površini in sicer na 5 plošč (oziroma na 3 plošče: 200, 100, 20 μ l). Preko noči smo inkubirali pri 37 °C in naslednji dan pregledali uspešnost transformacije.

3.2.11 Določanje nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje smo želeli določiti promotorskim zaporedjem kolicinov (ColA, ColN, ColE1, ColE7 iz plazmidov pSC300, 301, 302, 303), da bi preverili ali je med pripravo teh vključkov, zlasti med PCR reakcijo, prišlo do nezaželenih mutacij.

Izolirali smo plazmidno DNA iz transformant dobljenih z elektroporacijo (po zgoraj opisanem postopku).

3.2.11.1 Priprava reakcijskih mešanic s Cy5 označenimi ddNTP-ji

4 mikrocentrifugirke smo označili z A, C, G, T ter v njih pripravili mešanice kot kaže preglednica 14.

Preglednica 14: Mešanica za določanje nukleotidnega zaporedja izbranega dela DNA.

	mešanica A	mešanica C	mešanica G	mešanica T
1,1 mM dNTP	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Cy5-ddNTP	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
destilirana voda	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl
skupni volumen	22 µl	22 µl	22 µl	22 µl

Pripravljene mešanice smo premešali na vibracijskem stresalniku in na kratko centrifugirali, da se je vsa vsebina mikrocentrifugirke zbrala na dnu. Mešanico smo shranili na ledu in jo do uporabe imeli v temi.

Za vsako DNA verigo, ki smo ji določali zaporedje, smo zopet pripravili nove mikrocentrifugirke z oznakami A, C, G, T in jih dali na led. V te mikrocentrifugirke smo prenesli po 2 µl prej pripravljene mešanice (iz preglednice 14) z enako nukleotidno oznako.

Nato smo za vsako matrično DNA (izolirano plazmidno DNA), ki smo ji določali zaporedje, v novi mikrocentrifugirki pripravili »master mix« s sestavo v preglednici 15.

Preglednica 15: »Master mix« mešanica za določanje nukleotidnega zaporedja.

plazmidna DNA	20,5 µl
začetni oligonukleotid (skupno 4 pmol)	2 µl
reakcijski pufer	3,5 µl
termo sekvenaza I DNA polimeraza (10 U/µl)	1 µl
destilirana voda	/
skupni volumen	27 µl

Pripravljeno mešanico »master mix« smo previdno premešali na vibracijskem stresalniku in nato kratko centrifugirali. Po 6 µl »master mixa« smo prenesli v mikrocentrifugirke, ki že vsebujejo 2 µl posameznih A, C, T, G mešanic iz preglednice 14.

Vsako reakcijsko mešanico smo premešali s pipeto in po potrebi centrifugirali. Mikrocentrifugirke smo vstavili v PCR aparaturo in zagnali naslednji program:

94 °C	3 min	1×
95 °C	30 s	
55 °C	30 s	30×
72 °C	80 s	
72 °C	7 min	1×

Po končani PCR reakciji smo mikrocentrifugirke dali na led in v temo.

3.2.11.2 Odstranjevanje nevgrajenih ddNTP-jev z etanolnim obarjanjem

V nadaljevanju smo morali iz reakcijskih mešanic odstraniti nevgrajene ddNTP-je z etanolnim obarjanjem. Vsaki mikrocentrifugirki smo zato dodali 2 µl 7,5 M amonacetata, 2 µl glikogena in 30 µl mrzlega 100-odstotnega etanola. Vsebinsko smo dobro premešali z vibracijskim stresalnikom in inkubirali čez noč pri –20 °C, da se je DNA oborila. Naslednji dan smo mikrocentrifugirke 30 minut centrifugirali pri 10000 obr./min, nekaj mikrocentrifugirk pri sobni temperaturi, nekaj pri 4 °C (temperatura ni pomembna). Po odstranitvi supernatanta smo usedlino sprali z 200 µl ohlajenega 70-odstotnega etanola. Nato smo centrifugirali 5 minut, odstranili supernatant in usedlino sušili pri sobni temperaturi 2–3 minute (paziti smo morali, da usedline nismo presušili, saj je takšno težko resuspendirati).

Vsako usedlino smo nato resuspendirali v 6 µl formamidnega barvila in mešali z vibracijskim stresalnikom 20 sekund, da se je usedlina popolnoma resuspendirala. Na kratko smo še centrifugirali, da se je vsebina zbrala na dnu.

Tik preden smo nanegli vzorce na gel, smo mikrocentrifugirke 2–3 minute segrevali pri 70 °C, da je DNA denaturirala, in jih takoj ohladili na ledu. Celotni volumen mikrocentrifugirke smo nato nanegli na elektroforezni gel za določanje nukleotidnega zaporedja.

Po koncu določanja nukleotidnega zaporedja smo dobljena zaporedja primerjali z znanimi, deponiranimi v genski banki, s pomočjo internetnega orodja BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.2.12 Določanje rastnih krivulj

Za določanje rastnih krivulj in vzorčenje bakterijskih kultur sevov *E. coli* RW118 in RW464 z genskimi fuzijami, smo v 20 ml tekočega LB z ustreznim antibiotikom vcepili eno kolonijo seva z določeno gensko fuzijo. Kulturo smo preko noči inkubirali na stresalniku pri 250 obr./min pri 37 °C. Naslednji dan smo v 20 ml svežega tekočega LB

gojišča z dodanim ustreznim antibiotikom vcepili 50 µl prekonočne kulture in 8–9 ur inkubirali pri 250 obr./min pri 37 °C. Vsako uro smo izmerili OD₆₀₀ kulture s spektrofotometrom in vzorčili ali v prilagoditveni fazi rasti (pri OD₆₀₀ približno 0,5) in/ali v srednji eksponentni fazi rasti (pri OD₆₀₀ približno 2) in/ali v zgodnji stacionarni fazi rasti (pri OD₆₀₀ nad 3,5).

3.2.13 Mikroskopiranje z invertnim mikroskopom

Bakterijske celice sevov z genskimi fuzijami z *gfp* smo pregledovali pod mikroskopom, da smo lahko določili število in obliko fluorescirajočih celic, kjer smo izražanje nekega promotorja sledili z izražanjem *gfp* poročevalskega gena.

3.2.13.1 Vzorčenje

V prilagoditveni, eksponentni in stacionarni fazi rasti smo vzorčili bakterijske celice. Pri določeni optični gostoti (OD₆₀₀) smo vzeli 1 ml kulture, dodali 5 µl kloramfenikola (10 mg/ml) oziroma 2,5 µl kloramfenikola (20 mg/ml), da smo blokirali ribosome in s tem ustavili sintezo proteinov. Vzorec smo do naslednjega dne, ko smo mikroskopirali, hranili pri 4 °C, da se je GFP-ju razvila svetilnost. Rastne krivulje in vzorčenje smo delali v ponovitvah.

3.2.13.2 Priprava preparata

7 µl poli-L-lizina smo kanili na objektnik in ga z drugim razmazali po površini. Ko se je poli-L-lizin posušil, smo 10 µl vzorca nanесли na objektnik, pokrili s krovnikom, pokrili s filter papirjem in nekajkrat pritisnili, da so se celice dobro prilepile na objektnik.

3.2.13.3 Svetlobna in fluorescentna mikroskopija

Preparate smo pregledovali z inverzno mikroskopijo pri 1000× povečavi. Na objektiv smo nanесли kapljico imerznega olja, preparat obrnili »na glavo« in poiskali sliko. Slike smo posneli z digitalno kamero DXM 1200, Nikon, priključeno na mikroskop Eclipse TE300, Nikon, in jih shranjevali s pomočjo programske opreme LUCIA (System for Image Processing and Analysis LUCIA 4,60, Laboratory Imaging Ltd.).

Vsako sliko v določenem vidnem polju smo najprej fotografirali v svetlobni osvetlitvi, nato pa 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.

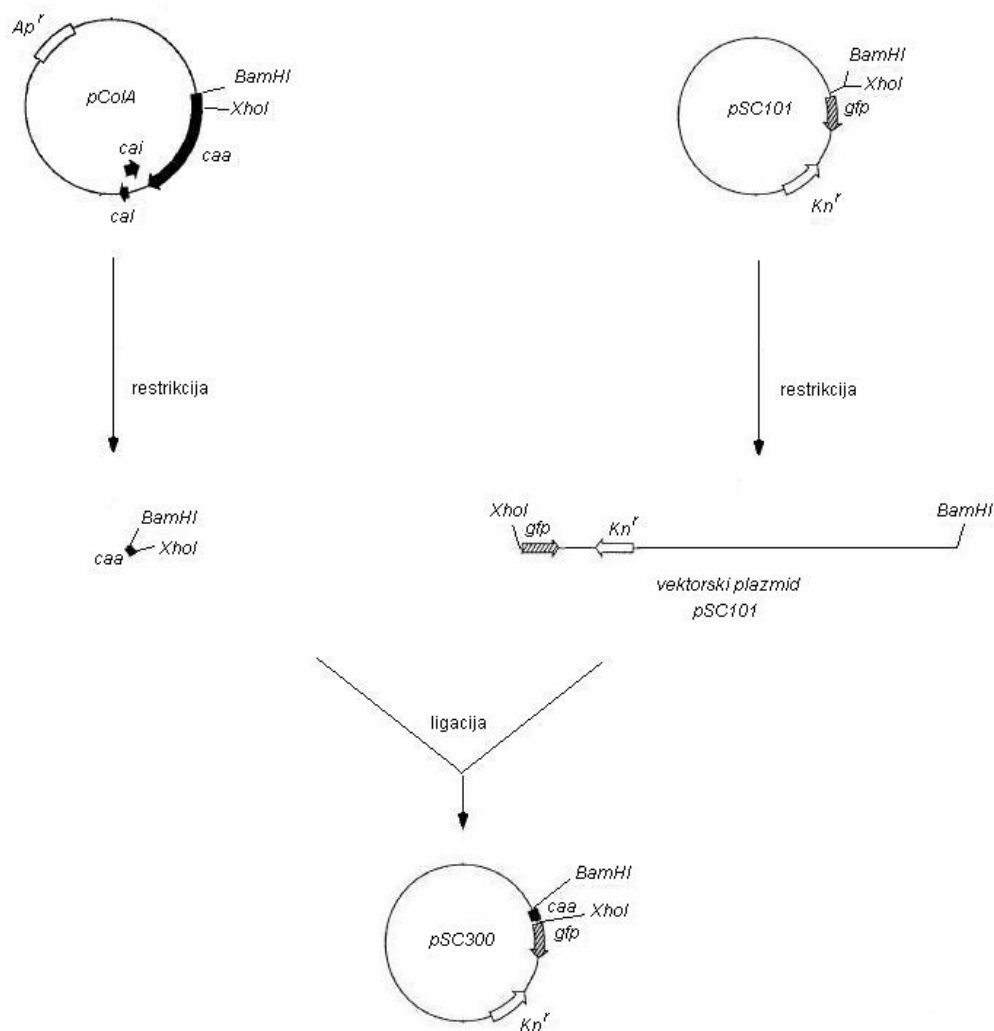
Slike smo nato obdelali s programoma za določanje števila celic cellC (<http://www.cs.tut.fi/sgn/csb/cellc/>) in s programom za določanje svetilnosti Scion Image (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm).

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA FUZIJ PROMOTOR-GFP PREUČEVANIH KOLICINOV V VEKTORSKEM PLAZMIDU

Z namenom preučevanja aktivnosti promotorjev genov aktivnosti nekaterih kolicinov (kolicina A, kolicina N, kolicina E1, kolicina E7) smo pripravili genske fuzije promotorjev z *gfp* poročevalskim genom v vektorskem plazmidu pSC101.

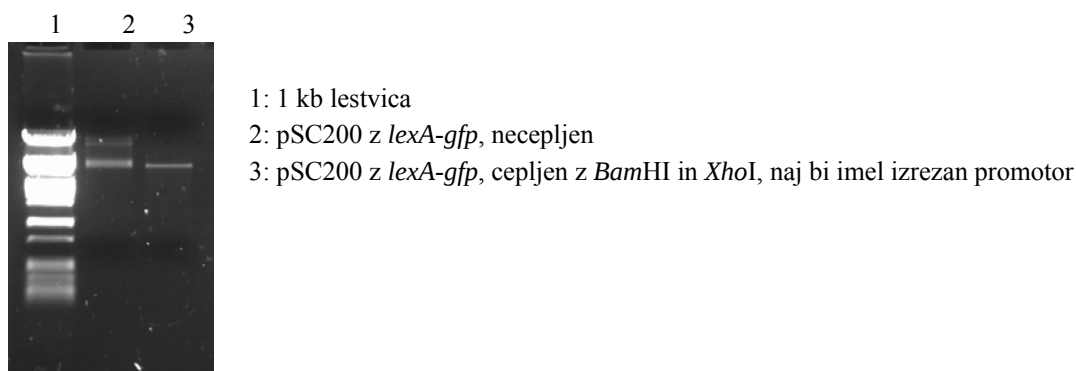
Na sliki 3 je shematsko prikazana konstrukcija plazmida z gensko fuzijo promotorske regije z *gfp* brez lastnega promotorja, prikazana na primeru priprave plazmida pSC300 s fuzijo *caa-gfp*.



Slika 3: Shematski prikaz konstrukcije genske fuzije promotorja z *gfp*, na primeru pSC300 s *caa-gfp*.

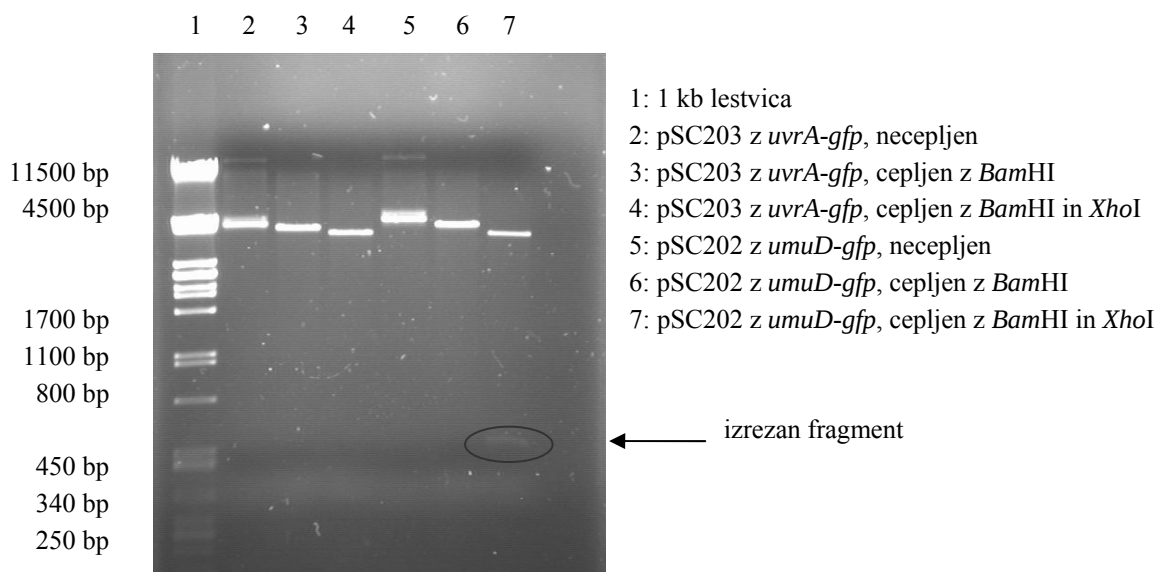
4.1.1 Priprava vektorskega plazmida z restrikcijo

Za vektor za kloniranje smo uporabili plazmid pSC101, ki ima zapis za *gfp* brez lastnega promotorja. Pri pripravi vektorja smo v začetku imeli nekaj težav. Najprej smo uporabili pSC200 s fuzijo *lexA-gfp* in z restriktazama *XhoI* in *BamHI* poskusili izrezati promotorsko regijo *lexA*, da bi dobili vektorski plazmid z *gfp*. Željeni fragment promotorske regije dolžine približno 400 bp se ni izrezal; velikost lis je bila enaka, če smo cepili samo z enim encimom ali obema. To je razvidno iz slike 4, ko primerjamo cepljeni in necepljeni pSC200 pri preverjanju uspešnosti izolacije vektorja iz gela.



Slika 4: Primerjava necepljenega in cepljenega pSC200 z *lexA-gfp*.

Ker cepitev nukleotidnega zaporedja promotorja *lexA* ni uspela, smo poskusili restrikcijo vseh že pripravljenih plazmidov z *gfp* fuzijami, izpeljanih iz plazmida pSC101, ki so nam bili na razpolago, in ugotovili, da sta le pSC203 s fuzijo *uvrA-gfp* in pSC202 s fuzijo *umuD-gfp* primerna. Za delo smo uporabili pSC202 z *umuD-gfp*, ker je ločeni cepljen fragment nekoliko večji. Plazmida smo cepili najprej z enim encimom in nato še z drugim, da smo potrdili očitno razliko med 1× cepljenim in 2× cepljenim, kar je razvidno iz slike 5.

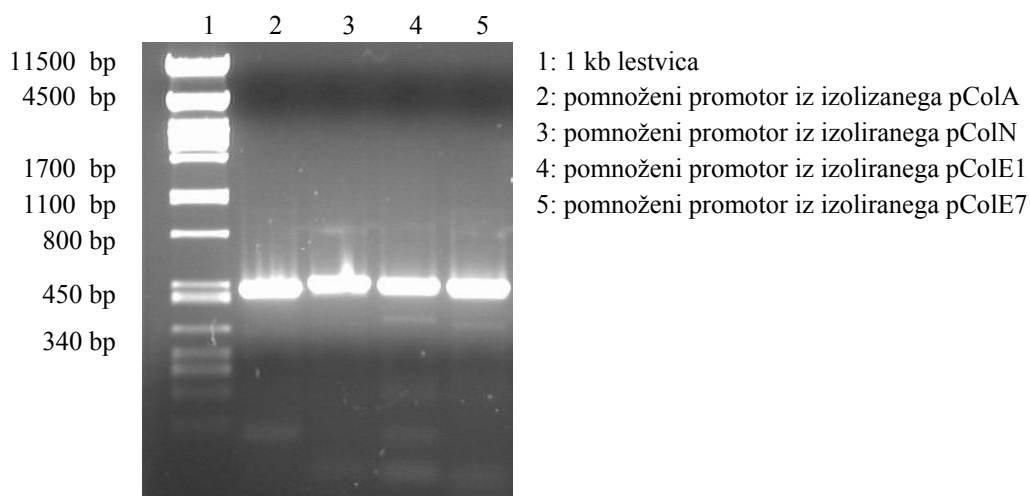


Slika 5: Rezultat cepitve fragmenta promotorja iz pSC203 s fuzijo *uvrA-gfp* in iz pSC202 s fuzijo *umuD-gfp*.

Po cepitvi vektorskega plazmida smo restrikcijske mešanice nanesli na 0,8-odstotni gel in po agarozni gelski elektroforezi ekstrahirali fragment iz gela, kot piše v poglavju Materiali in metode.

4.1.2 Pomnoževanje fragmentov z metodo PCR

Iz seva RW118 smo najprej izolirali plazmidno DNA z zapisi za kolicin A, kolicin N, kolicin E1 in kolicin E7. Z metodo PCR smo namnožili promotorske regije kolicinov ter na agarozni gelski elektroforezi preverili, ali je pomnoževanje uspelo. Na sliki 6 je iz velikosti lis razvidno, da smo uspešno namnožili željene promotorske regije (dolžine približno 400 bp).



Slika 6: PCR pomnožek promotorskih regij zapisov za kolicine.

4.1.3 Restrikcija fragmentov

S PCR namnožene fragmente smo cepili posebej, najprej z *Bam*HI in nato z *Xho*I. Restrikcije nismo preverjali na gelu, ker je razlika med necepljenim in cepljenim le nekaj bp, kar pa na agaroznem elektroforeznem gelu ni opazno. Vso restrikcijsko mešanico smo prenesli na agarozni elektroforezni gel in ekstrahirali fragmente promotorjev iz gela.

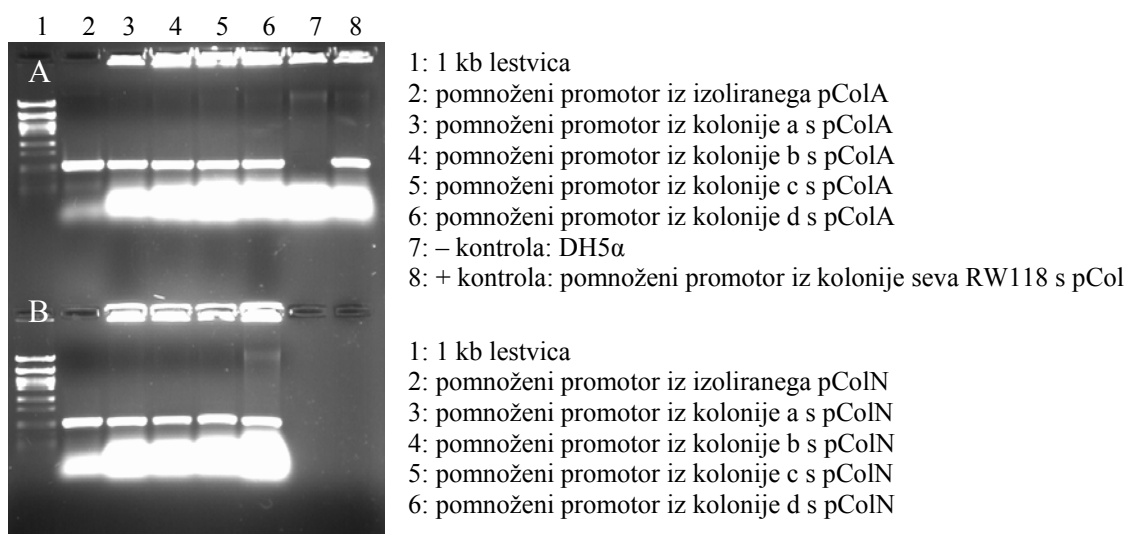
4.1.4 Ligacija

Po restrikciji vektorskega plazmida pSC101 in fragmentov promotorskih regij kolicinov je sledila ligacija. Sev DH5 α smo transformirali z elektroporacijo z ligirano plazmidno DNA, saj ta sev *E. coli* veliko bolj uspešno sprejema DNA kot kateri drugi. S PCR smo preverili, ali zrasle kolonije res imajo plazmide z željenim fragmentom – promotorjem, ker bi lahko izolirali transformante s samo ligiranim vektorjem, v kolikor bi bil rezan samo z enim encimom, še vedno pa bi zrasle, ker bi imele kanamicinsko rezistenco. Iz kolonij zraslih na selekcijskih LB ploščah smo z metodo PCR namnožili promotorske regije in na agarozni

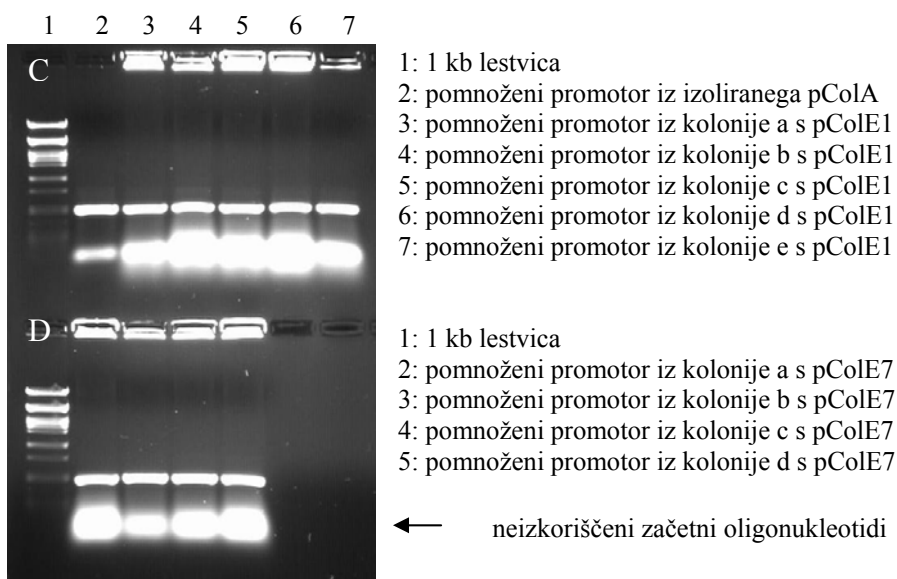
gelski elektroforezi preverili vsebnost promotorskih regij v več kolonijah istih transformant in tako preverili uspešnost ligacije in transformacije. Rezultati agarozne gelske elektroforeze so prikazani na slikah 7 in 8.

Za primerjavo velikosti s PCR namnoženega fragmenta promotorja iz DH5 α transformant, smo na gel nanesti s PCR namnožene promotorje iz izoliranih plazmidov seva RW118.

Za pozitivno kontrolo PCR reakcije smo uporabili kolonijo enega seva RW118 s Col plazmidom in parom začetnih oligonukleotidov specifičnih za ta kolicin, za negativno pa kolonijo seva DH5 α brez plazmida in parom začetnih oligonukleotidov za kolicin.



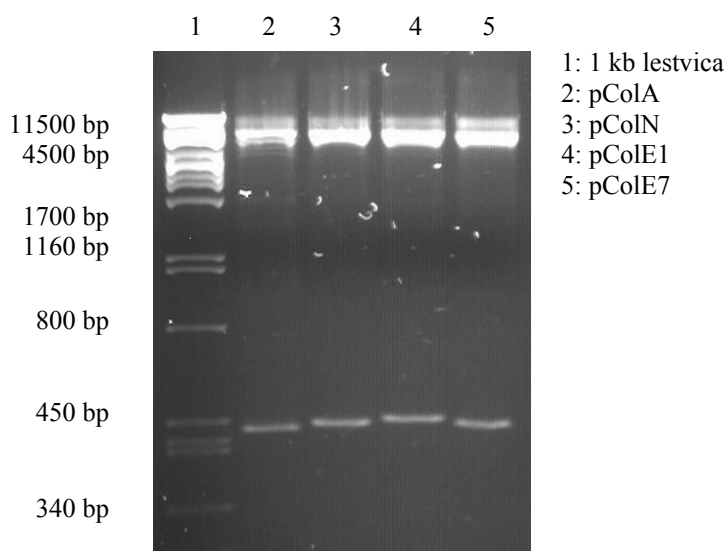
Slika 7: PCR pomnožek promotorskih regij kolicinov iz DH5 α transformant z vektorskim plazmidom.
A) *caa*. B) *cna*.



Slika 8: PCR pomnožek promotorskih regij kolicinov iz DH5 α transformant z vektorskim plazmidom.
C) *cea1*. D) *cea7*.

S preverjanjem transformant smo ugotovili, da je bila ligacija uspešna, ker so na gelu željene lise velikosti približno 400 bp, kar ustreza vključenemu fragmentu.

Produkte ligacije je bilo potrebno še preveriti z restrikcijo izolirane plazmidne DNA iz transformant DH5 α s fuzijo promotorja gena z zapisom za kolicin z *gfp* (slika 9), kjer smo na agaroznem elektroforeznem gelu pričakovali dve lisi: vektorski plazmid, ki je pri vseh enake dolžine, in fragmente promotorja, ki se med seboj nekoliko razlikujejo v dolžini.



Slika 9: Rezultat cepitve izoliranih plazmidov izoliranih transformant DH5 α z restriktazama *Bam*HI in *Xho*I.

Ko smo se prepričali, da smo izolirali transformante z željenimi plazmidi, smo seva RW118 in RW464 transformirali z izolirano plazmidno DNA, kot je opisano v Materialih in metodah. Po transformaciji smo še enkrat preverili pomnoževanje promotorskih regij z metodo PCR in se z nanosom na agarozni gel prepričali, da imamo res seve s pripravljeno fuzijo promotorja kolicina z *gfp* na vektorskem plazmidu.

4.2 MIKROSKOPIRANJE

4.2.1 Izražanje genov SOS

Ker smo predpostavljali, da je izražanje genov sistema SOS heterogeno v populaciji genetsko identičnih celic, smo želeli z mikroskopijo določiti deleže bakterijskih celic, ki močneje izražajo določeni gen.

Najprej je bilo potrebno pripraviti seve, pri katerih smo opazovali izražanje gena reguliranega s SOS s pomočjo fuzije njegovega promotorja z *gfp*. Izbrana seva sta bila seva *E. coli*, in sicer divji tip RW118 in izogeni sev RW464, ki nima zapisa za gen *recA*, v katera smo vnesli plazmid z željeno gensko fuzijo.

Plazmidno DNA s fuzijami promotorjev genov SOS z *gfp* smo izolirali iz sevov AB1157 in MC4100 in s transformacijo (kot je opisano v poglavju Materiali in metode) prenesli v kompetentne celice seva RW118 in RW464.

Sevoma RW118 in RW464 s plazmidi z genskimi fuzijami smo določali rastno krivuljo in vzorčili v prilagoditveni, eksponentni in zgodnji stacionarni rastni fazi. Meritve OD₆₀₀ in rastne krivulje so v Prilogi A in B. Vzorce smo pregledali pod mikroskopom.

Vzorčili smo v dveh ponovitvah določanja rastnih krivulj in določili delež intenzivno fluorescirajočih celic kot povprečje obeh ponovitev.

Lestvica svetilnosti je določena od 0 (črno) do 256 (belo). Podano ozadje ima nižjo fluorescenco, ki jo izraža večina celic, ki ne fluorescira intenzivno. Če se pojavi intenzivnejša fluorescenca le pri nekem deležu celic in ostale ne fluorescirajo, je ozadje 0. Najnižja vrednost v ozadju pomeni najnižjo fluorescenco, ki jo še zaznamo.

Preglednica 16: Odstotki celic, ki kažejo večjo aktivnost izražanja določenega gena SOS v sevu RW118.

RW118	odstotek intenzivnih	svetilnost	ozadje*	število vseh celic
cki prilagoditvena faza rasti	4,36	46 – 95	19 – 28	3667
cki eksponentna faza rasti	0,92	50 – 122	22 – 34	10613
cki stacionarna faza rasti	89,97	45 – 119	26 – 39	2854
cka prilagoditvena rastna faza	0,07	40 – 81	0	3050
cka eksponentna faza rasti	0	0	0	2125
cka stacionarna faza rasti	0,85	57 – 211	23 – 30	16606
recA prilagoditvena faza rasti	1,85	57 – 184	22 – 44	4598
recA eksponentna faza rasti	3,09	66 – 194	28 – 49	5028
recA stacionarna faza rasti	2,28	57 – 211	30 – 47	8366
lexA prilagoditvena faza rasti	0,58	57 – 90	24 – 38	4188
lexA eksponentna faza rasti	1,08	57 – 152	23 – 42	7498
lexA stacionarna faza rasti	1,48	57 – 192	28 – 39	5089
polB prilagoditvena faza rasti	0	0	0	2076
polB eksponentna faza rasti	0,03	38 – 55	26 – 33	6914
polB stacionarna faza rasti	0,06	40 – 69	24 – 35	6218
umuD prilagoditvena faza rasti	0	0	0	2156
umuD eksponentna faza rasti	0,03	43 – 64	0	6738
umuD stacionarna faza rasti	0,09	31 – 43	0	2083
uvrA prilagoditvena faza rasti	2,03	43 – 81	24 – 31	3016
uvrA eksponentna faza rasti	0,54	57 – 115	29 – 56	6165
uvrA stacionarna faza rasti	90,05	38 – 95	33 – 37	3457

* velika večina celic kaže nižjo fluorescenco

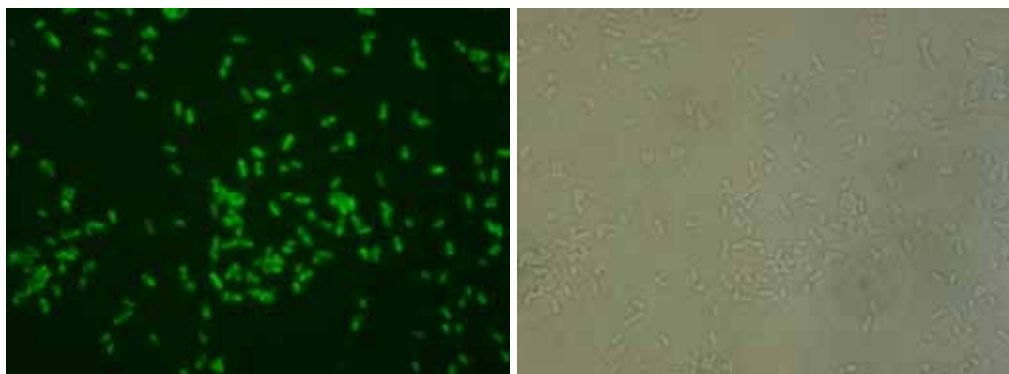
Preglednica 17: Odstotki celic, ki kažejo večjo aktivnost izražanja določenega gena SOS v sevu RW464.

RW464 recA ⁻	odstotek intenzivnih	svetilnost	ozadje*	število vseh celic
cki eksponentna faza rasti	0,35	57 – 143	19 – 35	3990
cki stacionarna faza rasti	85,83	47 – 160	26 – 34	3500
cka eksponentna faza rasti	0,03	28 – 38	0	4556
cka stacionarna faza rasti	0	0	20 – 30	5631
recA eksponentna faza rasti	0,52	52 – 140	23 – 42	4077
recA stacionarna faza rasti	1,69	52 – 176	28 – 45	5695
lexA eksponentna faza rasti	0,08	52 – 136	20 – 40	3813
lexA stacionarna faza rasti	0,53	52 – 102	21 – 40	2823
polB eksponentna faza rasti	0,23	25 – 64	0	6494
polB stacionarna faza rasti	0,60	26 – 71	0	6625
umuD eksponentna faza rasti	0	0	0	3429
umuD stacionarna faza rasti	0,05	24 – 34	0	4004
uvrA eksponentna faza rasti	0,47	52 – 78	23 – 42	5282
uvrA stacionarna faza rasti	1,30	56 – 173	23 – 43	7599

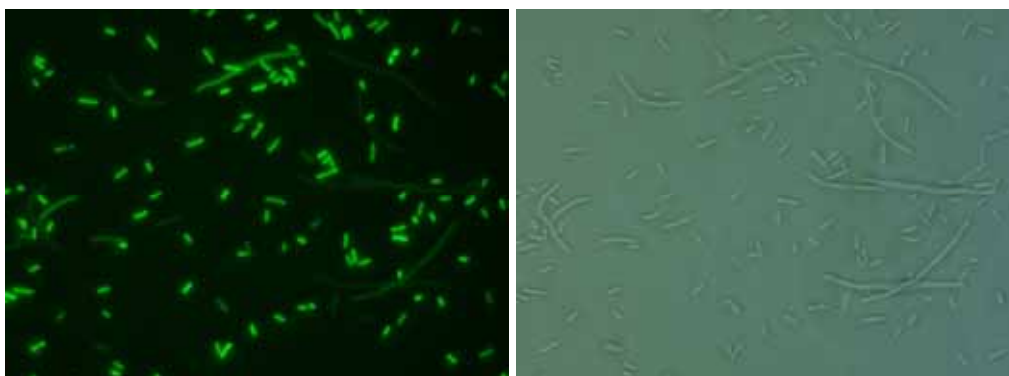
* velika večina celic kaže nižjo fluorescenco

Kot pozitivno kontrolo (slika 10 in 11) smo uporabili bakterijski kulturi seva RW118 in RW464 s plazmidom pKCT4, z gensko fuzijo promotorja gena *cki* z *gfp*, v stacionarni fazi. Promotor gena *cki* ni uravnan z odzivom SOS in je konstantno aktiven, neodvisno od represorja LexA.

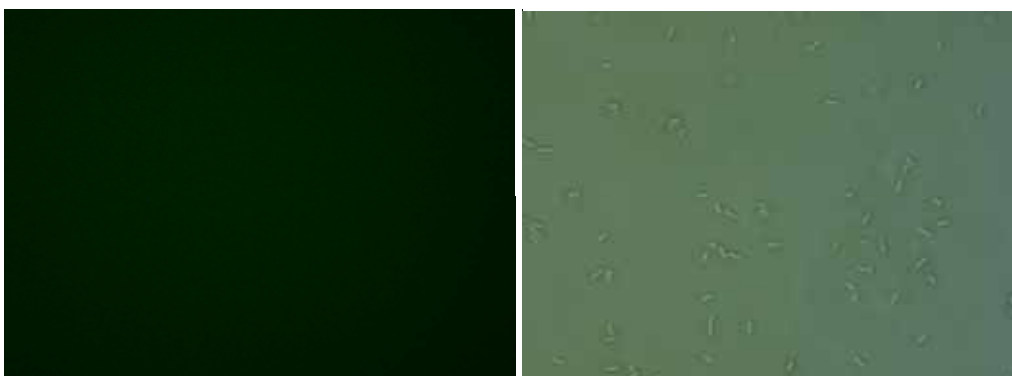
Negativno kontrolo (slika 12 in 13) pa sta predstavljala seva RW118 in RW464 brez plazmidov z genskimi fuzijami.



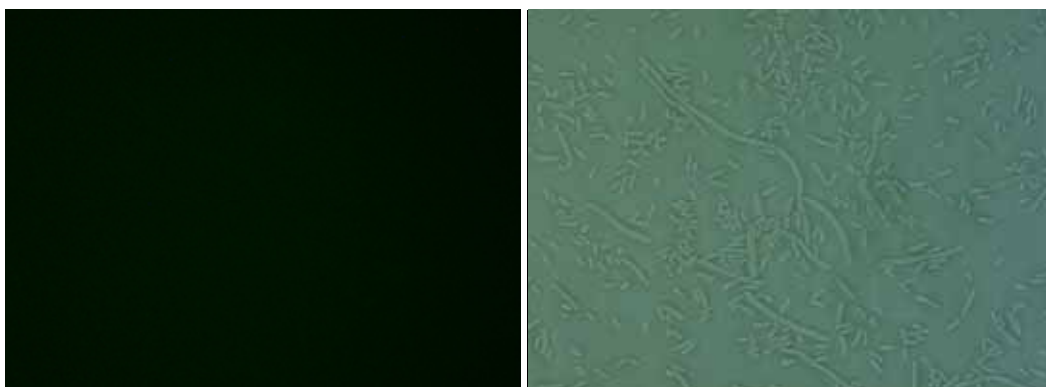
Slika 10: Pozitivna kontrola: celice RW118 s fuzijo *cki-gfp* v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.



Slika 11: Pozitivna kontrola: celice RW464 s fuzijo *cki-gfp* v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.

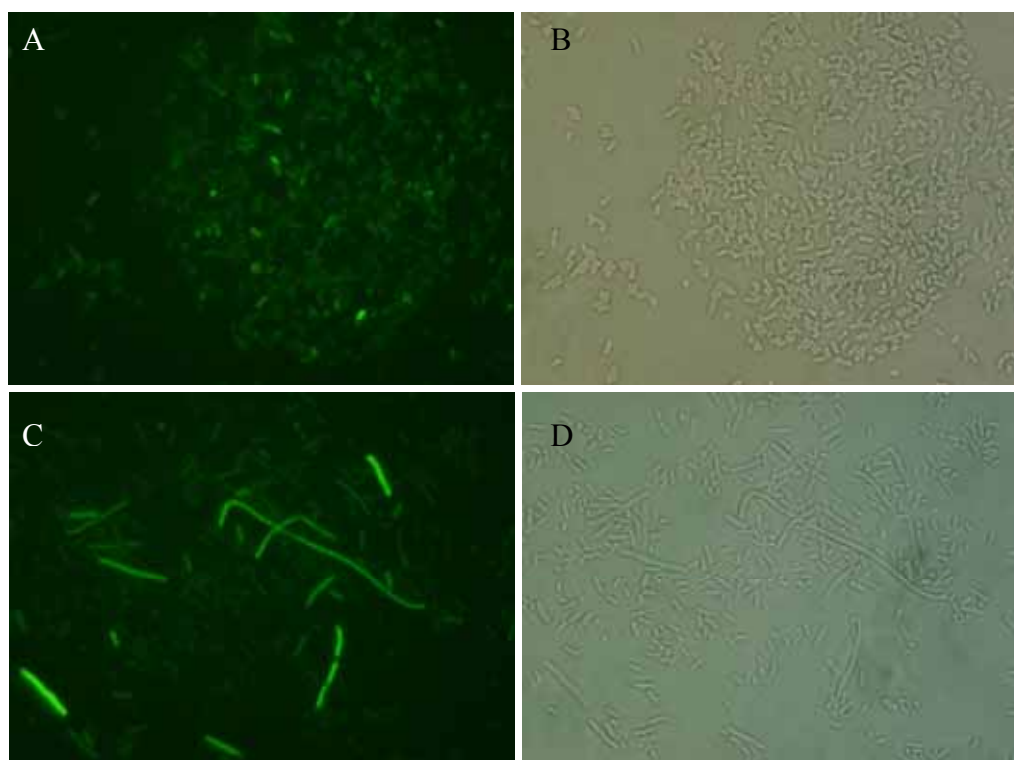


Slika 12: Negativna kontrola: celice RW118 v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.

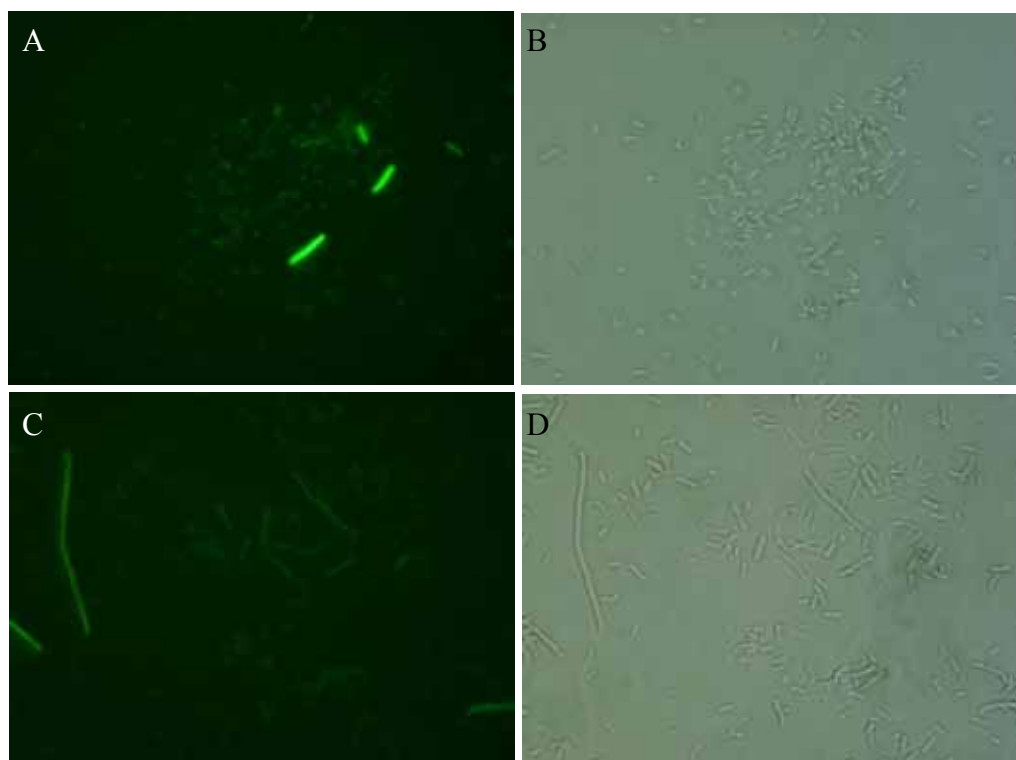


Slika 13: Negativna kontrola: celice RW464 v stacionarni fazi posnete pri fluorescentni in svetlobni mikroskopiji.

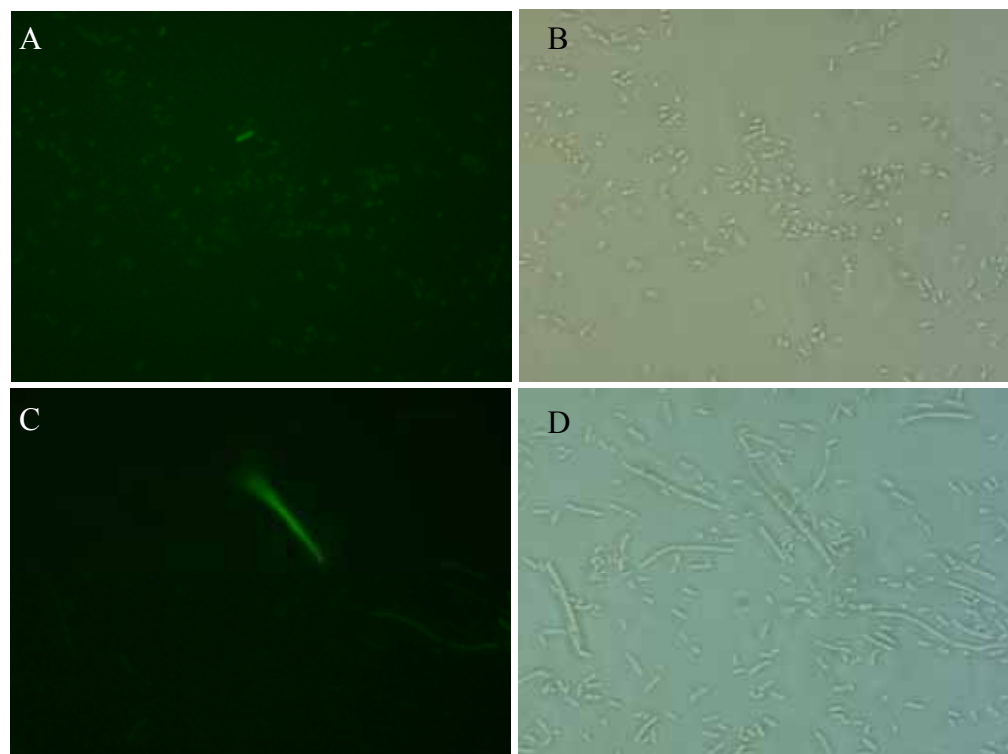
Slike 14–16 prikazujejo celice z izraženimi fuzijami proučevanih promotorjev genov SOS z *gfp* v stacionarni fazi rasti. Vidne so različne ravni aktivacije promotorja v populaciji celic in razlike v aktivnosti promotorjev pri različnih genih odziva SOS. Za vsako fuzijo so za primerjavo podane fotografije proučevanih fuzij v celicah seva divjega tipa RW118 in izogenega seva RW464, ki nima funkcionalnega proteina RecA. Opazne so razlike v deležu celic, ki izraža gensko fuzijo in obliko celic.



Slika 14: Celice z izraženo fuzijo *recA-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *recA-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *recA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *recA-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *recA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji.



Slika 15: Celice z izraženo fuzijo *lexA-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *lexA-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *lexA-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *lexA-gfp* pri svetlobni mikroskopiji.



Slika 16: Celice z izraženo fuzijo *polB-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *polB-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *polB-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *polB-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *polB-gfp* pri svetlobni mikroskopiji.

4.2.2 Izražanje kolicinov

Ugotovljeno je, da je izražanje kolicinov v večji meri uravnano z odzivom SOS, zato smo želeli določiti delež populacije, ki izraža gen aktivnosti.

Pripravili smo plazmide s fuzijami promotorjev kolicinov z *gfp* brez promotorja, katerih priprava je opisana v poglavju 4.1, in opazovali izražanje *gfp* v sevih RW118 in RW464.

Preglednica 18: Odstotki celic seva RW118 pri katerih se izraža kolicin.

RW118	odstotek intenzivnih	svetilnost	ozadje*	število vseh celic
ColA	0,62	41 – 187	0	15555
ColN	0,51	41 – 179	0	9793
ColE1	0,48	41 – 175	0	12197
ColE7	1,55	41 – 240	0	9338

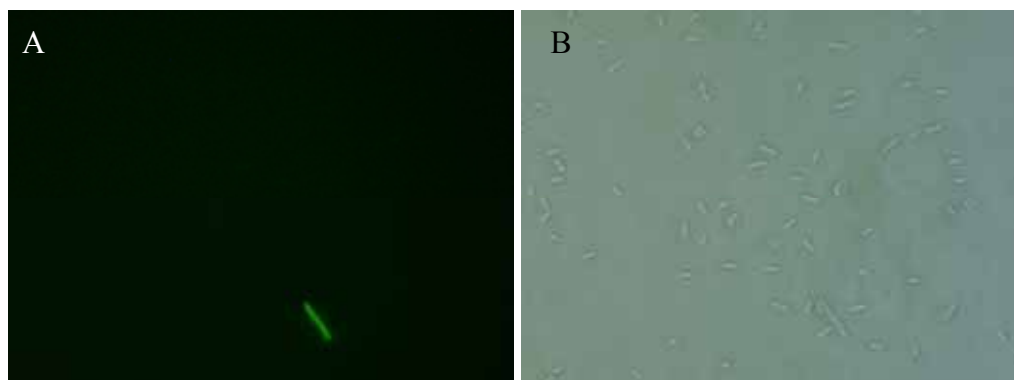
* velika večina celic kaže nižjo fluorescenco

Preglednica 19: Odstotki celic seva RW464 pri katerih se izraža kolicin.

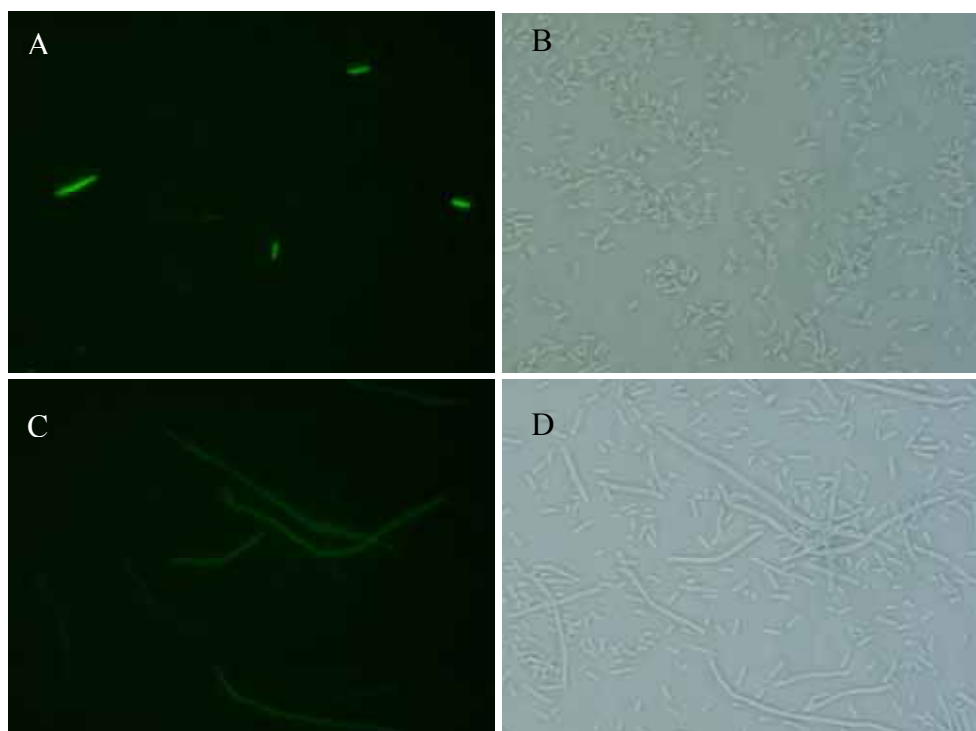
RW464 recA ⁻	odstotek intenzivnih	svetilnost	ozadje*	število vseh celic
ColA	0,075	26 – 50	0	9315
ColN	0,45	26 – 48	0	8938
ColE1	0,36	26 – 81	0	7253
ColE7	0,43	26 – 81	0	7050

* velika večina celic kaže nižjo fluorescenco

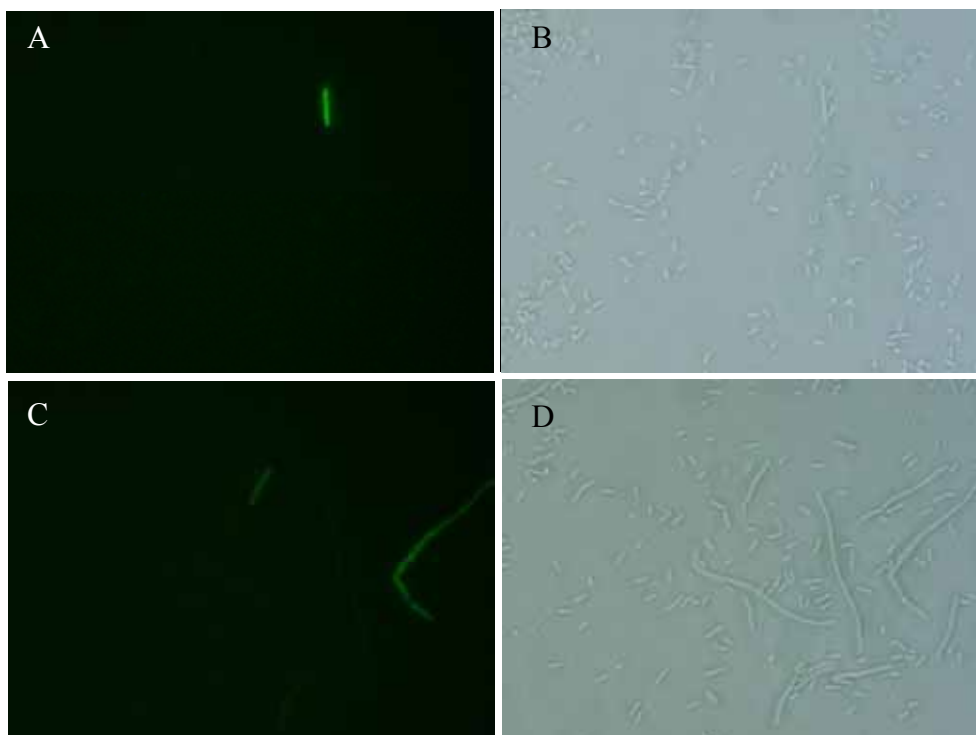
Slike 17–20 prikazujejo celice z izraženimi fuzijami promotorjev genov za kolicine z *gfp* v stacionarni fazi rasti. Opazimo, da je aktivacija promotorja v populaciji seva z dano fuzijo v sevu divjega tipa RW118 heterogena. Prikazane so tudi fotografije izražanja proučevanih fuzij v izogemem sevu RW464 brez funkcionalnega proteina RecA.



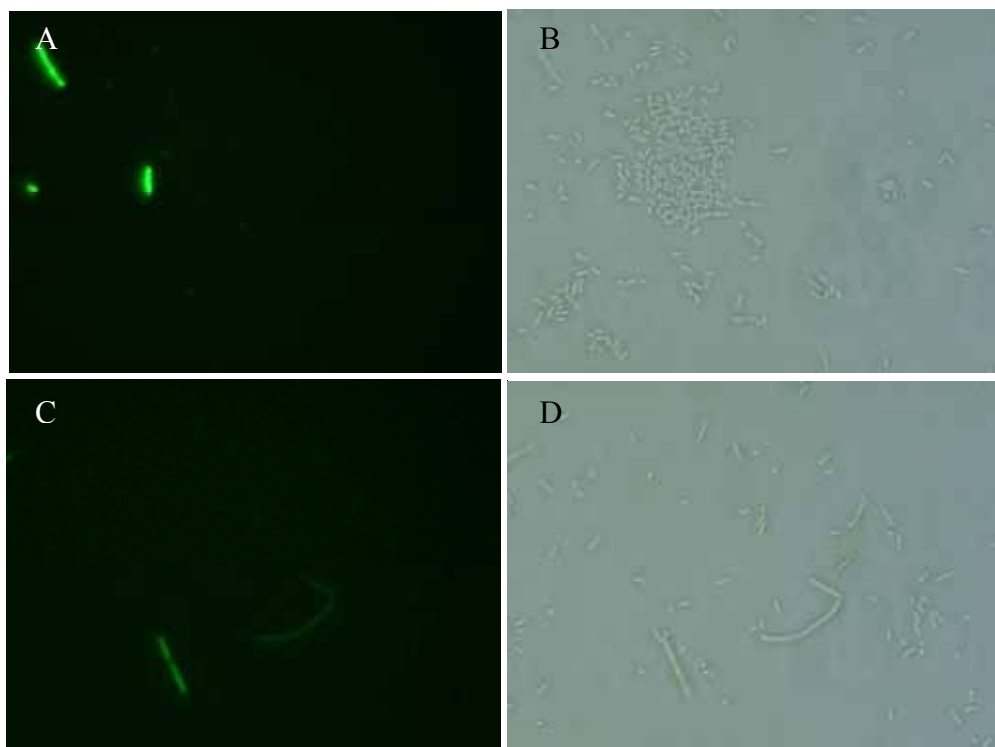
Slika 17: Celice z izraženo fuzijo *caa-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *caa-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *caa-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. Celice seva RW464 niso fluorescirale.



Slika 18: Celice z izraženo fuzijo *cna-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *cna-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *cna-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *cna-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *cna-gfp* pri svetlobni mikroskopiji.



Slika 19: Celice z izraženo fuzijo *cea1-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *cea1-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *cea1-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *cea1-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *cea1-gfp* pri svetlobni mikroskopiji.



Slika 20: Celice z izraženo fuzijo *cea7-gfp* v stacionarni fazi. A. Sev RW118 s fuzijo *cea7-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. B. Sev RW118 s fuzijo *cea7-gfp* pri svetlobni mikroskopiji. C. Sev RW464 s fuzijo *cea7-gfp* pri fluorescentni mikroskopiji. D. Sev RW464 s fuzijo *cea7-gfp* pri svetlobni mikroskopiji.

4.3 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

4.3.1 Določanje LexA vezavnega zaporedja

Ker smo sami pripravljali fuzije promotorjev kolicinov z *gfp* v vektorskem plazmidu, je bilo potrebno preveriti ali je promotorsko zaporedje pravilno, saj obstaja možnost, da pride med PCR reakcijo do nepravilnega vstavljanja nukleotidov in tako do kloniranja mutiranega fragmenta v vektorski plazmid. Nukleotidna zaporedja smo primerjali z že znanimi zaporedji, ki so deponirana v genski banki.

V preglednici 20 je prikazano nukleotidno zaporedje promotorske regije genov za kolicine, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje, s pomembnimi regulatornimi zaporedji in razdaljo v številu nukleotidov med njimi.

Preglednica 20: Promotorske regije kolicinov z razporeditvijo pomembnih regulatornih regij.

kolicin	-35		-10		LexA vezavno zaporedje	s T bogata regija		SD zaporedje		ATG
ColA	TTGACA	18	TAGTAT	5	TACTGTATATAAACACATGTGAATATACAGT	-----	91	AAAGAGG	7	ATG
ColN	TTGACA	17	TAGCTT	3	TGCTGTATATAAACACAGTGGTTATGTACAGT	ATTGTTTTTAATGGTTGTTTT	7	AAAGAGG	8	ATG
ColE1	TTGACA	17	TAATTT	2	AACTGTATATAAACACAGTGATTATATACAGT	ATATTACTTTAACTATTGTTTT	6	AAAGAGG	8	ATG
ColE7	TTGACA	17	TACTTT	2	ATCTGTACATAAACACAGTGGTTTATGTACAGT	ATTAACATATGTAATTAATGTTTT	8	AAAGAGG	8	ATG

Promotor ima razpršena DNA zaporedja, kamor se vežejo transkripcijski faktorji in tudi RNA polimeraza. Represor LexA se veže na določeno ohranjeno zaporedje v promotorski regiji s sistemom SOS uravnanega gena. Sama moč vezave je odvisna od ohranjenosti nukleotidnega zaporedja LexA vezavnega zaporedja. Če je zaporedje manj ohranjeno, se LexA veže šibkeje in transkripcija gena SOS je lažja. Transkripcija gena pa je odvisna tudi od same razdalje LexA vezavnega zaporedja do mesta, kamor nalega RNA polimeraza, tj. do –35 in –10 zaporedja. Kadar je LexA preblizu temu zaporedju, to otežuje RNA polimerazi dostop do njenega vezavnega zaporedja in s tem transkripcijo (Lewin, 2000).

Ohranjeni zaporedji pri večini promotorjev *E. coli* sta –35 TTGACA in –10 TATAAT, med katerima je 15–17 nukleotidov (Lewin, 2000).

V LexA vezavnem zaporedju je 6 nukleotidnih mest, ki so zelo ohranjena: CTG na mestu 3 do 5 in CAG na mestu 16 do 18. Vmesno zaporedje 10 nukleotidov je bogato z AT in je najbolj variabilno v zaporedju (Lewis in sod., 1994).

Shine Dalgarnovo zaporedje (AGGAGG) je s purini bogato zaporedje in je komplementarno nukleotidnem zaporedju na 3' koncu 16S rRNA in zato vpleteno pri vezavi ribosoma na mRNA.

Optimalna vezava RNA polimeraze je, če je med –35 in –10 zaporedjem 16 do 17 bp. Funkcija –35 zaporedja je, da oskrbi signal za prepoznavo RNA polimeraze, medtem ko

–10 zaporedje omogoči kompleksu, da se pretvori iz zaprte v odprto obliko. Lahko rečemo, da –35 zaporedje predstavlja prepoznavno domeno, medtem ko –10 zaporedje predstavlja mesto razklenitve dvojne vijačnice. –10 konsenzno zaporedje sestavljajo izključno AT nukleotidi, ki pomagajo pri začetni talitvi DNA v enojno verigo. Potrebna je nižja energija za porušitev vezi med AT v primerjavi z GC pari. Vez med AT potrebuje minimalno energijo za separacijo.

Tipični promotorji imajo –35 in –10 zaporedja, ki so prepoznana z RNA polimerazo, lahko pa je eno od teh zaporedij odsotno pri nekaterih nenavadnih promotorjih. Vsaj v nekaterih primerih promotorje ne more prepoznati RNA polimeraza sama in reakcija potrebuje še posredovanje pomožnega proteina.

Zaporedje med –35 in –10 ima večino kontaktnih točk za encim. Iste pozicije v različnih promotorjih omogočajo kontaktne točke, kljub temu, da je prisotna druga baza. To nakazuje, da je mehanizem za vezavo RNA skupen, čeprav reakcija ni odvisna od prisotnosti določene baze na neki točki kontakta (Lewin, 2000).

4.3.2 Določanje heterolognega indeksa

Vsa LexA vezavna zaporedja kažejo visoko stopnjo podobnosti, ampak se razlikujejo v nukleotidnem zaporedju in ta neidentičnost povzroča, da se represor LexA na različne promotorje veže z različno močjo (Schnarr in sod., 1991; Berg, 1988).

Berg in von Hippel sta izpeljala in testirala statistično teorijo, ki določa enostavno matematično metodo za določanje moči vezave proteina na različna prepoznavna zaporedja (Berg, 1988; Berg in von Hippel, 1987; Berg in von Hippel, 1988).

Analiza zahteva najprej izračun pogostosti pojava vseh štirih baz na vsaki poziciji v skupini že znanih nukleotidnih zaporedij. Posamezna zaporedja so nato ovrednotena z določitvijo, ali se baze prisotne na vseh posameznih pozicijah v danem zaporedju pojavijo pogosto ali redko pri vseh teh zaporedjih. Matematični izraz za merilo odstopanja določenega segmenta od konsenznega zaporedja je heterologni indeks (HI) (Berg in von Hippel, 1988; Berg, 1988).

Heterologni indeks za zaporedje se izračuna iz vsote naravnih logaritmov razmerij med pogostostjo baz v konsenznem in dejanskem zaporedju, z upoštevanjem napake, po formuli:

$$\text{Heterologni indeks (HI)} = \lambda E = \sum \ln [(n_{(\text{konsenzus})} + 0,5)/n_{(\text{dejansko})} + 0,5)]$$

Primer izračuna HI za distalno LexA vezavno zaporedje (TGCTGTATATAAAACCAGTG) pri količini N:
 $\lambda E = \ln(25 + 0,5/25 + 0,5) + \ln(24 + 0,5/8 + 0,5) + \dots + \ln(24 + 0,5/24 + 0,5) + \ln(25 + 0,5/2 + 0,5) = 9,73$

$n_{(\text{konsenzus})}$ je število, ki pove kako pogosto se najbolj konsenzna oziroma pogosta baza pojavi na določeni poziciji v nizu znanih vezavnih zaporedij za neki protein. Podobno pa $n_{(\text{dejansko})}$ predstavlja število, ki pove kako pogosto se v znanem vezavnem zaporedju pojavi neka baza na določeni nukleotidni poziciji v zaporedju, in pomeni, če je npr., kot kaže preglednica 21, na nukleotidni poziciji 1 v analiziranem LexA vezavnem zaporedju T in je na isti nukleotidni poziciji v ohranjenem zaporedju tudi T, da je $n_{(\text{konsenzus})}$ in $n_{(\text{dejansko})}$ isto število, ki je v tem primeru 25; če pa je v analiziranem zaporedju na tej poziciji A in v ohranjenem zaporedju T, potem je v tem primeru $n_{(\text{konsenzus})} = 25$ in $n_{(\text{dejansko})} = 9$.

Vrednost 0,5 je aproksimacija uporabljena za popravek pri uporabi majhne velikosti vzorca (Berg in von Hippel, 1988).

Nižje vrednosti heterolognega indeksa kažejo boljše naleganje na konsenzno zaporedje in domnevno močnejšo interakcijo protein-DNA. Empirične študije so pokazale, da tista analizirana proteinska vezavna zaporedja z najboljšim HI, to je tista, ki imajo najmanj nepogostih baz, so najmočnejše vezana z specifičnim DNA vezavnim proteinom (Berg in von Hippel, 1988; Berg, 1988).

Številke v preglednici 21 prikazujejo pogostost baz, ki so bile opazovane pri poravnavi 19 že določenih LexA vezavnih zaporedjih in njihovih komplementarnih zaporedjih (Lewis in sod., 1994).

Preglednica 21: Izračun pogostosti baz na posameznih pozicijah v 19 znanih LexA vezavnih zaporedjih in njihovih komplementarnih zaporedjih (Lewis in sod., 1994).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	T	A	C	T	G	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	C	A	G	T	A
A	9	24	0	0	0	1	26	3	21	9	24	5	30	6	30	0	38	1	1	25
C	2	5	37	0	0	0	1	3	0	2	3	12	2	5	7	38	0	0	8	2
G	2	8	0	0	38	7	5	2	12	3	2	0	3	1	0	0	0	37	5	2
T	25	1	1	38	0	30	6	30	5	24	9	21	3	26	1	0	0	0	24	9

S pomočjo informacij iz preglednice 21, o pogostosti pojava neke baze na določeni nukleotidni poziciji v zaporedju, smo izračunali heterologne indekse za kolicine, kateri so podani v preglednici 22. LexA ima dva vezavna zaporedja, in sicer distalno in proksimalno, ki je bližje začetku prepisa strukturnega gena (ATG kodonu). Zaporedji vezave se prekrivata in imata različna heterologna indeksa.

Preglednica 22: Heterologni indeks za kolicine.

Kolicin	LexA vezavno zaporedje (distalno)	λE_{20}	LexA vezavno zaporedje (proksimalno)	λE_{20}
ColA	TACTGTATATAAAACACATGT	9,73	ACATGTGAATATATACAGTT	11,52
ColN	TGCTGTATATAAAACCAGTG	7,55	CAGTGTTATATGTACAGTA	11,61
ColE1	AACTGTATATAAAACCAGTG	7,48	CAGTGATTATATATACAGTA	11,06
ColE7	ATCTGTACATAAAACCAGTG	12,44	CAGTGTTTTATGTACAGTA	12,98
ColK	TACTGTACATAAAACCAGTG	7,63	CAGTGTTATATGTACAGTA	11,61

*podčrtano pomeni mesto prekrivanja

LexA vezavna zaporedja v preglednici 23 so razporejena glede na njihove predvidene afinitete, z najmočnejšimi na vrhu in najšibkejšimi na koncu.

Preglednica 23: Heterologni indeksi za gene SOS (Lewis in sod., 1994; Fernández de Henestrosa in sod., 2000).

gen SOS	LexA vezavno zaporedje	λE_{20}
umuDC	TACTGTATATAAAACAGTA	2,77
recA	TACTGTATGAGCATACAGTA	4,31
sulA	TACTGTACATCCATACAGTA	4,65
uvrB	AACTGTTTTTTATCCAGTA	6,11
lexA1	TGCTGTATATACTCACAGCA	6,39
uvrA	TACTGTATATTCATTCAGGT	6,98
lexA2	AACTGTATATACACCCAGGG	8,31
uvrD	ATCTGTATATATACCCAGCT	8,79
ruvAB	CGCTGGATATCTATCCAGCA	9,19
polB	GACTGTATAAAACCACAGCC	12,09

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V raziskavi smo želeli ugotoviti ali nekateri ključni geni odziva SOS, *recA*, *lexA*, *uvrA*, *polB* in *umuD* in geni za sintezo kolicinov A, E1, N, E7 in K, ki so tudi odvisni od odziva SOS, izkazujejo heterogenost v izražanju. V ta namen smo s pomočjo fuzij promotorskih regij zgoraj omenjenih genov z reporterskim genom *gfp* brez lastnega promotorja in s fluorescentno mikroskopijo določali delež celic, ki močneje izražajo proučevane gene.

Na podlagi rezultatov fluorescentne mikroskopije in določitve nukleotidnih zaporedij LexA vezavnih zaporedij kolicinov, smo poskušali razložiti molekularno ozadje heterogenosti in vpliv LexA na izražanje genov, katerih izražanje je odvisno od sistema SOS.

Da bi določili ali je indukcija izražanja preučevanih genov odvisna od spontanega odziva SOS, smo plazmide s pripravljenimi genskimi fuzijami s transformacijo prenesli v RW118, *E. coli* sev divjega tipa in v izogeni sev RW464, ki nima zapisa za protein RecA in ne more aktivirati odziva SOS. V raziskavi nismo uporabili nobenih dejavnikov, ki bi sprožili odziv SOS, zato smo lahko opazovali osnovno raven izražanja genov SOS in kolicinov.

Za lažje razumevanje rezultatov in razprave pojasnjujem, da je osnovni nivo izražanja tisti, ki ga izraža večina celic in pomeni konstantno nizko raven aktivnosti promotorja v odsotnosti zunanjih dejavnikov, ki bi povzročili poškodbe DNA, saj so produkti nekaterih genov potrebni za normalno delovanje celice. Osnovni nivo izražanja je določen s fluorescenco večine celic, ki ne fluorescirajo intenzivno, in je predstavljen kot ozadje v preglednici 16 v poglavju Rezultati.

Deleže fluorescirajočih celic, ki smo jih prikazali v preglednicah 16, 17, 18 in 19 v poglavju Rezultati, smo določili v neki populaciji celic bakterijskega seva in ni nujno, da prikazujejo dejansko stanje. Da bi se prepričali v verodostojnost dobljenih deležev, bi morali v raziskavo zajeti več ponovitev poskusa in določiti kvantitativno napako, ki lahko nastane pri sami analizi slik. Ta napaka bi lahko bila pomembna predvsem pri posameznih sevih, kjer so majhne razlike med deležem fluorescirajočih celic glede na fazo rasti, kot je pri celicah seva RW118 s fuzijo *recA-gfp*.

5.1 IZRAŽANJE GENOV SOS

Za opazovanje izražanja osnovnega nivoja izražanja nekaterih genov odziva SOS smo uporabili pridobljene, že pripravljene fuzije *recA-gfp*, *lexA-gfp*, *polB-gfp*, *umuD-gfp* in *uvrA-gfp* v vektorskem plazmidu pSC101. Plazmide z genskimi fuzijami smo s transformacijo prenesli v sev divjega tipa *E. coli* in v izogeni *recA*⁻ sev, ker smo želeli ugotoviti ali/in zakaj nastanejo razlike v nivoju izražanja posameznih genov med sabo in v prisotnosti ter odsotnosti *recA*.

Vsi geni SOS niso inducirani ob istem času in z enako stopnjo. V prvi fazi je med izraženimi geni *lexA* (Janion, 2001; Michel, 2005). Majhna količina LexA se mora v celici neprestano sintetizirati za utišanje genov odziva SOS v odsotnosti poškodb DNA. Poleg tega je razpolovna doba LexA 60 min (Little, 1983), in ker uravnava samega sebe, se neprestano izraža na nizki ravni. Ob indukciji odziva SOS pride do avtoceptive LexA in derepresije izražanja lastnega gena. Ko so poškodbe DNA popravljene naraste raven proteina LexA in le-ta lahko zopet vzpostavi represijo genov.

Količina LexA se zaznavno spreminja skozi rastni cikel divjega tipa *E. coli*. Dri in Moreau (1993) sta dokazali, da takšne spremembe nastopijo zaradi proteolitske cepitve LexA in povečane moči promotorjev *lexA* in drugih, ko bakterije vstopijo v stacionarno fazo. Pokazali sta, da se znotrajcelična koncentracija LexA in raven transkripcije genov spreminja v odvisnosti od rastnih pogojev. Količina proteina LexA se je povečala med eksponentno fazo rasti, z največjo količino v stacionarni fazi. Da bi testirali, ali so spremembe v količini LexA med rastjo odvisne od cepitve LexA, so poskus naredili v sevu *lexA*(Ind), ki ni sposoben cepitve LexA in je zato količina LexA stabilna. Ugotovili so, da je koncentracija v sevu z okvarjenim *lexA* bila enaka kot v stacionarni fazi divjega tipa (Dri in Moreau, 1993). To pomeni, da je bilo v stacionarni fazi izražanje reprimirano in ni prihajalo do cepitve LexA, zato je tudi koncentracija LexA bila večja kot prej.

Znano je, da je učinkovitost vezave proteina LexA odvisna od LexA vezavnih zaporedij in da se pri genih, kot sta *sulA* in *umuDC*, veže LexA najbolj učinkovito, medtem ko se pri genih *uvrA*, *B*, *D* in *lexA* veže LexA šibkeje (Schnarr in sod., 1991).

5.1.1 Izražanje genov *recA* in *lexA* v sevu divjega tipa

Pri populaciji celic divjega tipa s fuzijo *recA-gfp* smo opazili s pomočjo fluorescence, da večina celic kaže visoko osnovno raven izražanja promotorja v eksponentni fazi, ki nato v stacionarni fazi malo pade. Tudi odstotek intenzivno fluorescirajočih celic z veliko aktivnostjo promotorja je v stacionarni fazi bil nekoliko manjši kot v eksponentni fazi. Tako je v prilagoditveni fazi intenzivno fluoresciralo 1,85 %, v eksponentni 3,09 % in v stacionarni 2,28 % celic populacije. Kljub temu pa so celice v stacionarni fazi kazale največjo fluorescenco. Celice, ki so intenzivno fluorescirale, so bile izrazito daljše, kar nakazuje na močno indukcijo SOS brez zunanjih poškodb.

Faza rasti tudi vpliva na aktivacijo gena *recA*. V odsotnosti poškodb DNA je aktivnost promotorjev genov *lexA* in *recA* največja v eksponentni fazi rasti. Cepitev LexA posreduje RecA z vezavo na ssDNA (Little in Mount, 1982; Moreau in Carlier 1989; Roberts in sod., 1979). Očiten vir ssDNA so replikacijske vilice, ki nastanejo med delitvijo DNA. Ta ideja je podprta z opazovanji, da je cepitev LexA, vsaj deloma, odvisna od rasti bakterij. Zato je omejujoč dejavnik aktivacije RecA med rastjo količina ssDNA v celici (Dri in Moreau, 1993).

Prav zato, ker je v normalnih pogojih prisotnega največ RecA v eksponentni fazi in je zaradi napak pri delitvi tudi aktiviran, je skladno s tem zato tudi več LexA v eksponentni fazi cepljenega in posledično se kaže večja aktivnost izražanja promotorja *recA* v eksponentni fazi.

Vse celice potrebujejo majhne količine RecA, ker morajo biti pripravljene na poškodbe, zato je fluoresciralo večina celic s fuzijo *recA-gfp*. Pri tistih zelo intenzivnih pa je prišlo do močne aktivacije promotorja *recA* zaradi derepresije, kot posledice znotrajceličnih dogodkov ali stohastičnih dogodkov, in zato tudi do povišanega izražanja *lexA* in vzajemno zopet *recA*.

Pri populaciji celic s fuzijo *lexA-gfp* je bila osnovna indukcija, ki pa je bila malo manjša kot v primeru *recA-gfp*, tudi največja v eksponentni fazi. Zaradi derepresije *lexA* v eksponentni fazi je tudi izražanje *recA* v eksponentni fazi dereprimirano. Celice z osnovnim nivojem izražanja manj fluorescirajo v stacionarni fazi kot v eksponentni, ker je v stacionarni fazi represija večja (Dri in Moreau, 1993). Vendar pa je odstotek intenzivno fluorescirajočih skozi rastni cikel naraščal in največja intenzivnost je bila v stacionarni fazi, kjer je močno fluoresciralo 1,48 % celic. V prilagoditveni 0,58 % in v eksponentni 1,08 %.

Naši rezultati niso takšni kot v raziskavi Mrak in sodelavci (2007), ki so prav tako analizirali fluorescenco populacije celic s fuzijo *lexA-gfp*. Fluorescentna mikroskopija je pokazala, da se LexA izraža v vseh celicah, tako kot v naši raziskavi. Vendar pa je v njihovi raziskavi na osnovi intenzivnosti fluorescence izražanje večje v le približno 0,3 % celic.

Svetlejšje celice so prav tako kot v naši raziskavi bile izrazito daljše, kar nakazuje, da so bile visoko inducirane z izražanjem SOS v odsotnosti zunanje poškodbe DNA.

Escherichia coli z vstopom v stacionarno fazo odgovori na stradanje. V stacionarni fazi verjetno zaradi pomanjkanja hranil nastopijo stresni pogoji in zato nekatere celice intenzivno fluorescirajo, kar kaže na spontano indukcijo SOS. V močno fluorescirajočih celicah je prišlo do močne derepresije promotorja gena *lexA* in *recA* na račun cepitve LexA. Intenzivno fluorescirajoče celice so bile zelo dolge, kar kaže na prekinitev celične delitve zaradi aktivacije *sulA*.

RecA je glavni transkripcijski aktivator odziva SOS (Little in sod., 1980). Če primerjamo odstotek aktivacije in osnovno izražanje promotorja *recA* z ostalimi geni SOS, se ta izraža v nekoliko večji meri kot ostali, kar je pomembno, saj mora kot glavni transkripcijski aktivator omogočati takojšen vklop odziva SOS ob nenadni poškodbi, zato je tudi nivo osnovnega izražanja nekoliko višji. Poleg tega je vpleten in potreben tudi za homologno rekombinacijo, ki je lahko neodvisna od SOS.

V stacionarni fazi se poveča moč promotorja gena *recA*, *lexA* in domnevano se koncentracije LexA povečajo na račun akumulacije LexA v stacionarni fazi.

5.1.2 Izražanje genov *recA* in *lexA* v *recA*⁻ sevu RW464

Sev RW464 ima okvarjen gen *recA*, zato indukcija odziva SOS ni možna. Posledično smo v sevu RW464 ugotavljali aktivnost preučevanih promotorjev v odsotnosti spontanega odziva SOS (ta se sproži v odsotnosti zunanjih agensov, ki poškodujejo DNA). Pričakovali smo, da ne bo prišlo do izražanja genov v sevu RW464, vendar smo dokazali izražanje fuzije ***recA-gfp*** tudi v celicah, ki nimajo proteina RecA, le na nekoliko manjši ravni kot pri sevu divjega tipa. Intenzivno je v eksponentni fazi fluoresciralo 0,52 % celic in v stacionarni 1,69 % celic, z naraščanjem in največjo fluorescenco v stacionarni fazi. Razlika med divjim tipom je tudi v intenzivnosti fluorescence, ki je v primeru *recA*⁻ seva nižja. RecA je vpleten tudi pri homologni rekombinaciji, ki vedno ni odvisna od SOS, in nivo izražanja *recA* v sevu, kjer ni mogoča spontana indukcija SOS, pomeni ravno to osnovno raven in od sistema SOS neodvisno sintezo RecA, potrebnega za homologno rekombinacijo.

Tako kot pri sevu s fuzijo *recA-gfp* smo tudi pri sevu s fuzijo ***lexA-gfp*** opazili osnovni nivo izražanja, kar pove, da se tudi v odsotnosti SOS mora sintetizirati majhen nivo LexA, da reprimira gene. 0,08 % celic s fuzijo *lexA-gfp* je močnejše fluoresciralo v eksponentni fazi in v stacionarni fazi 0,53 %. Možno je, da bi tudi kateri drugi regulatorni proteini, katerih koncentracije nihajo kot odgovor na okoljske signale, odmaknili LexA iz vezavnih zaporedij ali alternativno aktivirali transkripcijo brez odmaknitve LexA.

5.1.3 Izražanje genov *polB* in *umuD* v sevu divjega tipa

Ko je v celicah *E. coli* sistem SOS utišán, so geni, ki imajo zapis za SOS polimeraze, izraženi v zelo majhnih količinah ali sploh ne. Geni za SOS polimeraze ne spadajo v kategorijo visoko izraženih genov (Karin in sod., 2001).

Populacija celic s fuzijo *polB-gfp* je izkazovala komaj zaznavno aktivnost promotorja v veliki večini celic skozi rastni cikel, medtem ko pri populaciji celic s fuzijo *umuD-gfp* aktivnosti nismo zaznali.

Promotorja fuzije ***polB-gfp*** in ***umuD-gfp*** sta bila močnejše aktivirana v manj kot 0,1 % celic populacije celic v stacionarni fazi in še tam je bila fluorescenca nizka. V naši raziskavi nismo uporabljali dejavnikov, ki inducirajo odziv SOS in zato ni prišlo do indukcije teh dveh genov. Vemo, da sta *polB* in *umuD* zelo močno reprimirana z LexA in da se njuno izražanje pojavi šele v zadnji fazi popravljanja, v kolikor napake niso bile odpravljene. Ker gena kodirata mutageni polimerazi, ni razloga, da bi bili neprestano izraženi oziroma že ob manjših poškodbah DNA. Zato tudi v naši raziskavi kažeta najmanjšo raven izražanje izmed vseh preučevanih genov SOS.

5.1.4 Izražanje genov *polB* in *umuD* v *recA⁻* sevu RW464

Pri obeh fuzijah nismo zaznali osnovnega izražanja promotorja genov. Je pa zanimivo, da smo pri *polB-gfp* fuziji v *recA⁻* sevu ugotovili približno 10× več intenzivno fluorescirajočih celic, v eksponentni 0,23 % in stacionarni fazi 0,6 %, kot v divjem tipu. Intenzivnost fluorescence je bila primerljiva v *recA⁻* kot v divjem tipu.

Pri *recA⁻* sevu z gensko fuzijo *umuD-gfp* sta fluorescirali s šibko intenziteto le v stacionarni fazi 2 celici v populaciji 4000 celic, kar je 0,05 %.

Možna razlaga tega je, da medtem ko je *umuD* močno reprimiran z LexA, obstajajo pri *polB* še kakšni drugi mehanizmi, ki vplivajo na njegovo izražanje v posameznih celicah.

5.1.5 Izražanje genov *uvrA* v sevu divjega tipa

Večina celic seva s fuzijo *uvrA-gfp* je izkazovala aktivnost proučevanega promotorja. Fluorescenca in morfologija celic s fuzijo *uvrA-gfp* je bila podobna pozitivni kontroli *cki-gfp*. V stacionarni fazi je intenzivno fluorescirala večina celic, približno 90 %. Celice so bile normalnih oblik; nobena celica ni bila filamentozna.

Pri indukciji odziva SOS je gen *uvrA* izražen med prvimi in je vpleten v enoverižno popravljanje z izrezovanjem nukleotidov (angl. nucleotide excision repair – NER) (Brash in sod., 1985; Setlow in Carrier, 1964). UvrA se sintetizira konstitutivno v nizki ravni in med indukcijo količina proteina naraste iz 20 na 200 kopij na celico. Njegovo LexA vezavno zaporedje se nahaja med –35 in –65 regijo. Izgleda, da tekmuje z RNA polimerazo za vezavno mesto. Osnovna raven izražanja *uvrA* v celici omogoča odstranitev občasnih lezij DNA (Moolenaar in sod., 2002). UvrA je del popravljalnega mehanizma, ki je prisoten v celici tudi brez indukcije SOS in zato je promotor močno aktiven v večini celic. Protein UvrA pa bi naj imel tudi vlogo v replikaciji (Wang in sod, 1994).

5.1.6 Izražanje genov *uvrA* v *recA⁻* sevu RW464

Tudi v tem sevu smo pri večini celic zaznali aktivnost promotorja. Vendar je v *recA⁻* sevu zelo intenzivno fluoresciralo v stacionarni fazi le 1,3 % celic s fuzijo *uvrA-gfp* in manj kot 0,5 % v eksponentni. Celice, ki so intenzivno fluorescirale, so bile zelo dolge.

Nizka fluorescenca pri večini celic s fuzijo *uvrA-gfp* predstavlja to nizko raven izražanja *uvrA* v celici, ki omogoča odstranitev občasnih lezij DNA brez vklopa odziva SOS.

Sev *recA⁻* kaže močno odvisnost izražanja *uvrA* od odziva SOS, saj je zelo velika razlika v deležu intenzivno fluorescirajočih celic med divjim tipom in sevom *recA⁻*.

Ker so celice divjega tipa normalne oblike, in se ne pojavi filamentacija, bi bilo potrebno preveriti, ali je preučevana fuzija res *uvrA-gfp*, kajti obstaja verjetnost, da je fuzija pridobljenega seva vključila mutacije.

5.2 IZRAŽANJE KOLICINA K

Da bi opazovali izražanje genov proteina aktivnosti porotvornega kolicina K in pripadajočega proteina imunosti na ravni posameznih celic skozi rastni cikel, so Mulec in sodelavci (2003) pripravili transkripcijske fuzije promotorjev genov *cka* in *cki* z *gfp* brez lastnega promotorja v naravnem kolicin K kodirajočem plazmidu pColK-JA533 (iz tega izhajajoč pKCT3 ima fuzijo *cka-gfp*, pKCT4 ima fuzijo *cki-gfp*).

5.2.1 Izražanje gena za protein imunosti (pozitivna kontrola)

Pri porotvornih kolicinih je gen *imm* prepisan konstitutivno iz nasprotne verige kot gen za kolicin in gen za lizo in ima lastni šibek promotor, ki je neodvisen od sistema SOS (Šmarda in Šmajs, 1998).

Protein imunosti z zapisom za sintezo v genu *cki* se sintetizira konstitutivno v nizki količini, da ščiti kolicinogeno populacijo pred lastnim kolicinom. Približno 500 molekul proteina imunosti je vključenega v citoplazemsko membrano, kjer inhibirajo oblikovanje kanalčkov (Mulec in sod., 2003).

Da bi določili, ali v resnici vse celice izražajo gen imunosti, smo seva RW118 in RW464, odporna na kolicin K, ker imata pKCT4 s transkripcijsko fuzijo *cki-gfp*, gojili in vzorce periodično odstranili in pripravili za mikroskopijo. V raziskavi smo potrdili, da se gen *cki* izraža skozi celotni rastni cikel. Najmočnejše izražanje je bilo opazno v stacionarni fazi, ko je bila intenzivnost fluorescence največja in je zelo močno fluoresciralo nad 85 % celic, v primeru seva divjega tipa kot tudi seva *recA⁻*.

Rezultati se skladajo z raziskavo Mulec in sod. (2003), kjer je izražanje *cki-gfp* bilo opaženo skozi rastni cikel v skoraj vseh (98,9 %) analiziranih celicah. Razlika v odstotku fluorescirajočih celic je samo na račun razlik v postavljanju meja intenzivnosti fluorescence.

5.2.2 Izražanje gena *cka* za protein aktivnosti kolicin K

Ko nastopijo pogoji stradanja, celice začno proizvajati kolicine za obrambo ali prevzem ekološke niše (Riley in Gordon, 1996). Skladno s tem začno v stacionarni fazi v večji meri izražati gene z zapisi za kolicine.

Preučili smo izražanje fuzije *cka-gfp* v posameznih celicah populacije s fluorescentno mikroskopijo v sevu divjega tipa in sevu *recA⁻*.

Določili smo, da se je v divjem tipu izražala aktivnost promotorja fuzije *cka-gfp* v stacionarni fazi v 0,85 % celic. Pred to rastno fazo ni bilo zaznavne aktivnosti, oziroma le pri redkih izjemah 1 ali 2 celici na populacijo 4000 celic v rastni fazi že prej, kar lahko obrazložimo z znotrajceličnimi dogodki, ki poškodujejo DNA. Pri sevu *recA⁻* v stacionarni fazi nismo opazili izražanja *cka-gfp*.

Takšno raziskavo so delali že prej Mulec in sod. (2003), ki tudi niso zaznali izražanja v divjem tipu v zgodnji prilagoditveni ali zgodnji eksponentni fazi. V stacionarni fazi so določili nekoliko višji odstotek fluorescirajočih celic kot mi, in sicer 3 %.

Mulec in sodelavci (2003) so opazili, da se morfologija celic z aktivnim promotorjem fuzije *cka-gfp* ni razlikovala od celic, pri katerih promotor ni bil aktiven, kar pojasnjuje, da niso doživele visoke indukcije SOS. V naši raziskavi je tudi pri večini intenzivno fluorescirajočih celic bila velikost celic takšna kot pri ostalih, vendar je nekaj celic bilo zelo dolgih, kar nakazuje, da je v njih prišlo do močnega odziva SOS z ustavitvijo celične delitve.

Urnava izražanja sinteze kolicina v populaciji kolicinogenih celic je proces več dejavnikov, ki vključuje SOS indukcijo brez eksogenih dejavnikov, ki poškodujejo DNA, afinitete LexA vezave na LexA vezavno zaporedje, medsebojnega delovanja vezave LexA dimerov na LexA vezavna zaporedja, kot tudi stohastičnost zaradi nihanj znotrajceličnih koncentracij LexA proteina (Mrak in sod., 2007).

5.3 IZRAŽANJE KOLICINOV A, N, E1 IN E7

Transkripcijske fuzije promotorjev kolicinov A, N, E1 in E7 z *gfp* smo pripravili v vektorskem plazmidu pSC101 in jih prav tako kot ostale fuzije genov SOS s transformacijo prenesli v sev RW118 in *recA⁻* sev RW464.

5.3.1 Izražanje genov *caa*, *cna*, *cea1*, *cea7* v sevu divjega tipa

Kolicini so med zadnjimi izraženimi geni pri induciranem odzivu SOS (Janion, 2001). Poleg tega pri nekaterih kolicinih obstaja več mehanizmov uravnave, ki so udeleženi v upravljanju tega procesa (Šmarda in Šmajš, 1998).

S fluorescentno mikroskopijo nismo zaznali osnovnega nivoja izražanja genov za kolicine (ni bilo ozadja). Pomembno je, da je pri večini kolicinogenih celic gen za sintezo utišán, saj bi v nasprotnem primeru neuravnava izražanje pomenilo propad celic.

Aktivnost promotorja je kazal le majhen del populacije celic, katere so tudi intenzivno fluorescirale. Intenzivnost fluorescence je bila zelo velika. V sevu s fuzijo promotorja gena *caa*, ki kodira kolicin A, z *gfp* je intenzivno fluoresciralo 0,62 % celic, v sevu s fuzijo *cna*-

gfp 0,52 % in s fuzijo *cea1-gfp* 0,48 %. Največji delež fluorescirajočih celic smo zaznali pri sevu s fuzijo *cea7-gfp*, kjer je fluoresciralo 1,55 % celic, pri katerem je bila intenzivnost fluorescence največja.

Celice so bile tako normalnih oblik kot filamentozne, pri katerih je prišlo do močnega odziva SOS zaradi inhibicije celične delitve na račun aktivacije *sulA*.

5.3.2 Izražanje genov *caa*, *cna*, *cea1*, *cea7* v *recA*⁻ sevu RW464

Predvidevali smo, da v sevu RW464, okvarjenim v genu *recA*, ne bo prišlo do izražanja genov za kolicine zaradi nezmožnosti vklopa odziva SOS (tako kot smo to dokazali v primeru kolicina K, s to razliko, da je zapis za kolicin K v naravnem plazmidu). Vendar je zaradi aktivnosti promotorja vseeno fluoresciralo del populacije celic, le veliko šibkejše kot v sevu divjega tipa.

Pri sevu s fuzijo promotorja gena *caa* z *gfp* je intenzivneje fluoresciralo manj kot 0,1 % celic. Pri sevu s fuzijo *cna-gfp* je fluoresciralo 0,45 % celic, kar je le malo manj kot v divjem tipu. Pri sevu s fuzijo *cea1-gfp* je fluoresciralo 0,36 % celic, kar je tudi nekaj manj kot v divjem tipu. Pri *cea7-gfp* pa je fluoresciralo 0,43 % celic.

Sklepali smo, da je sinteza posameznih kolicinov različno odvisna in uravnana z odzivom SOS, kar je posledica lastnosti LexA vezavnih zaporedij in samega promotorja.

5.4 LASTNOSTI LEXA VEZAVNIH ZAPOREDIJ IN HETEROLOGNI INDEKSI

Večina genov sistema SOS *E. coli* ima eno LexA vezavno zaporedje na katero se veže LexA dimer. Od proučevanih genov imajo samo *lexA* in geni za sintezo kolicinov dve vezavni zaporedji (Schnarr in sod., 1991). Na vsako vezavno zaporedje se veže po en dimer. Ti geni so ocenjeni kot bolj močno regulirani.

Promotor gena *lexA* ima dve neprekrivajoči se vezavni zaporedji, kar pomeni zopet drugačno interakcijo dimerov LexA kot pri kolicinih, kjer se LexA vezavna zaporedja prekrivajo. Prekrivajoča se LexA vezavna zaporedja naj bi zmanjšala sterično oviranje in/ali s tem optimizirala stike protein-protein, in naj bi vplivala na kooperativno vezavo LexA proteinov pri kolicinih (Lewis in sod., 1994). V primeru dveh oddaljenih LexA vezavnih zaporedij pri *lexA* genu je kooperativna vezava LexA na LexA vezavna zaporedja precej šibka (Brent, 1982).

Kolicini so sproščeni z lizo producirajoče celice in dve prekrivajoči se LexA vezavni zaporedji kažeta učinkovito represijo izražanja, s čimer ščitijo producirajoči sev pred prekomerno lizo (Lu in Chack, 1996).

Znano je tudi, da se za razliko od drugih s SOS uravnanih genov intenzivna sinteza kolicina ne začne takoj, ampak v zaostanku v primerjavi z nekateri induciranimi geni SOS. Celica s tem pridobi čas, da popravi poškodbe in vzpostavi represijo še preden se pojavi indukcija letalnega proteina celične lize (Salles in sod., 1987).

LexA vezavni zaporedji kolicinov sta označeni kot distalno in proksimalno glede na ATG kodon. Distalno LexA vezavno zaporedje ima večjo vlogo pri represiji izražanja genov za kolicine, kar je v skladu z večjo afiniteto vezave LexA na distalno zaporedje. Primerjava LexA vezavnih zaporedij in njihovih HI večih kolicinov je v raziskavi Lewisa in sodelavcev (1994) pokazala, da ima pri večini distalno zaporedje večjo afiniteto LexA vezave.

Nukleotidna zaporedja z nizko HI vrednostjo so bližje konsenznem LexA vezavnem zaporedju in vežejo LexA z večjo afiniteto kot zaporedja z višjo HI vrednostjo (Berg in von Hippel, 1988; Berg, 1988).

Pri preučevanih kolicinih ColA, ColN, ColE1 in ColE7, pri katerih smo genske fuzije pripravili v vektorju pSC101, smo ugotovili skladnost med deležem celic s fluorescenco v divjem tipu in pripadajočim heterolognim indeksom. Z večanjem heterolognega indeksa je bil temu primeren tudi delež fluorescirajočih celic večji.

V največjem deležu populacije celic seva divjega tipa se je izražala fuzija *cea7-gfp* (1,55 %). Kar je skladno s tem, da ima najvišji heterologni indeks med preučevanimi kolicini; 12,44 za distalno regijo in 12,98 za proksimalno, in posledično šibkeje veže LexA. Izražanje gena je v odsotnosti zunanjih dejavnikov, ki poškodujejo DNA, do neke mere neodvisno od odziva SOS, saj smo na podlagi fluorescence ugotovili, da se je aktiviral promotor v 0,43 % populacije celic seva *recA⁻*.

Naslednji po deležu celic, ki je fluoresciral v 0,62 %, je sev divjega tipa s *caa-gfp*. HI pri *caa* je drugi največji med preučevanimi kolicini; 9,73 za distalno regijo in 11,52 za proksimalno. Ker pa je v *recA⁻* sevu fluoresciral zelo majhen delež populacije, le 0,075 % celic, predvidevam, da igra pri izražanju gena *caa* v odsotnosti poškodb DNA pomembno vlogo spontani SOS odziv.

Izražanje genov aktivnosti *cna* in *cea1*, ki imata podoben HI, je skoraj primerljivo (v deležu fluorescirajočih) v divjem tipu. S fuzijo *cna-gfp* je fluoresciralo 0,51 % celic populacije, HI je 7,55 za distalno regijo in 11,61 za proksimalno regijo. S fuzijo *cea1-gfp* pa je fluoresciralo 0,48 % celic, promotor *cea1* ima HI za distalno regijo 7,48 in za proksimalno 11,06.

Odstotek fluorescirajočih celic s fuzijo *cna-gfp* in *cea1-gfp* v sevu *recA⁻* je le malo nižji kot v divjem tipu; pri populaciji s fuzijo *cna-gfp* je fluoresciralo 0,45 % in pri populaciji s fuzijo *cea1-gfp* 0,36 % celic. Spontani SOS odziv (brez zunanjih dejavnikov, ki poškodujejo DNA) ima manjšo vlogo pri izražanju *cna* in *cea1*, saj skoraj ni razlike v odstotku izražajočih celic med divjim tipom in *recA⁻*. Pri uravnavanju izražanja so lahko vpleteni še drugi mehanizmi, ki bodisi odmaknejo LexA iz LexA vezavnih zaporedij ali aktivirajo transkripcijo brez odmaknitve LexA.

Genska fuzija promotorja *cka* z *gfp* je bila pripravljena v naravnem plazmidu pColK (iz tega izhajajoč je pKCT3). HI za distalno zaporedje je 6,63 in za proksimalno 11,61. Oba HI sta primerljiva s HI promotorja gena za kolicin N. Vendar se je pri *cka-gfp* fuziji pokazala večja aktivnost promotorja, saj je v sevu divjega tipa fluoresciralo v stacionarni fazi 0,85 % celic. Razlog je lahko drugi plazmidni vektor, kakor tudi moč promotorja. Obstaja tudi možnost, da na izražanje vplivajo še drugi dejavniki, kot so regulatorni proteini, ki vplivajo na izražanje. V *recA⁻* sevu nismo opazili fluorescirajočih celic, zato sklepamo na zelo močno odvisnost izražanja gena za kolicin K od spontanega odziva SOS.

Iz primerjave HI kolicinov, ki so pri kolicinih višji od približno 7,5, s HI gena *recA*, ki znaša le 4,31, lahko trdimo, da je zaradi dveh prekrivajočih LexA vezavnih zaporedij represija močnejša kot pri genu *recA*, ki ima le eno vezavno zaporedje in kaže v enaki rastni fazi osnovno raven izražanja v večini celic ter intenzivno v večjem deležu (2,28 %).

Izražanje *lexA* je tudi uravnano z dvema LexA vezavnima zaporedjema kot pri kolicinih, s HI 6,39 in 8,31. Čeprav ima dve vezavni zaporedji kot pri kolicinih in čeprav imata obe zaporedji nižji HI kot pri kolicinih, se *lexA* vseeno izraža v osnovni ravni v večini celic in intenzivno v večjem delu kot pri kolicinih. To pa zato, ker se zaporedji pri *lexA* ne prekrivata in je zato kooperativnost vezave šibka.

Gen *umuD* ima eno LexA vezavno zaporedje z zelo nizkim HI (2,77), ki se prekriva z -10 zaporedjem in z močno afiniteto veže LexA v -10 ohranjeni regiji. To se sklada z našimi rezultati, ki kažejo, da se *umuD-gfp* izraža v komaj zaznavnem delu populacije.

V primerjavi z *umuD* ima *polB* zelo visok HI (12,09), kar bi pomenilo, da se bo izražal v velikem delu celic divjega tipa, vendar nasprotno, se tudi *polB* izraža kot *umuD* v komaj zaznavnem delu. Razlog je morda dejstvo, da se LexA vezavno zaporedje prekriva z -35 in zato LexA uspešneje tekmuje z RNA polimerazo za vezavo. Morda je tudi promotor gena *polB* močnejši kot gena *umuD*.

5.5 SKLEPI

- Proučevani geni odziva SOS, *recA*, *lexA*, *polB* in *uvrA*, ter geni za sintezo kolicinov K, A, E1, N in E7, izkazujejo heterogenost izražanja.
- Promotor gena *umuD* je bil pod pogoji dela popolnoma utišan.
- Izražanje genov *recA*, *lexA* in *uvrA* je v populaciji bolj heterogeno kot izražanje genov za sintezo kolicinov.
- Izražanje genov *lexA*, *recA* in *uvrA* je močno odvisno od spontanega odziva SOS; podobno je tudi izražanje genov za sintezo kolicina A, E7 in kolicina K.
- Izražanje genov *polB*, *umuD* in genov za sintezo kolicinov E1 in N je neodvisno od spontanega odziva SOS, saj je delež celic, ki izraža genske fuzije, primerljiv v sevu RW118 in izogenem sevu RW464 brez aktivnega proteina RecA.
- Delež celic populacije, ki izraža preučevane genske fuzije, je odvisen tudi od HI LexA vezavnih zaporedij, in njihovega števila; večja je afiniteta vezave LexA proteina, manjši je delež celic, ki izraža dano gensko fuzijo.

6 POVZETEK

Odziv SOS pri bakteriji *Escherichia coli* uravnava sintezo več kot 40 genov vključenih v popravilo poškodb DNA. Dva proteina igrata ključno vlogo v regulaciji SOS odziva: represor LexA in induktor RecA. Med normalno rastjo je represor LexA vezan na specifično zaporedje, LexA vezavno zaporedje, v promotorski regiji gena odziva SOS in preprečuje njegovo izražanje. Geni SOS so pod normalnimi pogoji, v odsotnosti DNA poškodb, represirani. Ob poškodbi DNA nastanejo enoverižni konci DNA, katere zazna in se z njimi poveže RecA, s tem pa povzroči avtocepitev LexA in derepresijo genov, ki so pod kontrolo LexA, vključno z *recA* in *lexA*. Ko je poškodba popravljena, se zmanjša količina aktiviranega RecA in LexA se zopet akumulira in utiša ekspresijo genov SOS. Vsi geni SOS niso izraženi enako hitro in na enaki ravni. Tisti, ki so vpleteni v zgodnje popraviljanje so izraženi najprej, tisti, ki pomenijo izhod v sili na račun mutacij, pa zadnji. Poleg poškodb DNA lahko SOS odziv sprožijo spremembe pH, prehod iz eksponentne v stacionarno rast in stradanje celic.

Odziv SOS pa ni le sistem, ki uravnava gene vpletene v popraviljanje, pač pa vpliva tudi na nekatere druge gene, npr. kolicine, bakteriocine *E. coli*, ki zavirajo rast sorodnih bakterij. SOS je lahko vpleten tudi v širjenje zapisa za virulentne dejavnike in rezistenc proti antibiotikom.

Bakterijske populacije določenega seva so sestavljene iz genetsko identičnih celic. Znano je, da v populacijah izogenih celic obstajajo precejšnje variacije v razvoju, površinskih strukturah pomembnih pri virulenci, kot tudi pri molekulskih komponentah celic. Zanimalo nas je, ali geni odziva SOS in geni za sintezo nekaterih kolicinov izkazujejo heterogenost izražanja. V naši raziskavi smo s fluorescenčno mikroskopijo celic s fuzijami promotorskih regij in poročevalskega gena *gfp* brez lastnega promotorja na ravni posameznih celic opazovali izražanja genov SOS in kolicinov. Izražanje genskih fuzij smo proučevali v sevu divjega tipa RW118 in v izogenem sevu RW464, ki pa nima funkcionalnega proteina RecA in posledično ne inducira odziva SOS. Pri našem delu nismo uporabili dejavnikov, ki bi poškodovali DNA. Ugotovili smo, da je izražanje proučevanih genov heterogeno in da je izražanje genov *recA*, *lexA*, *uvrA* ter genov za sintezo kolicinov A, E7 in K odvisno tudi od spontanega odziva SOS, ki se sproži zaradi endogenih dogodkov, ki povzročijo zaustavitev replikacijskih vilic in nastanek enoverižne DNA. Poleg tega je heterogenost v izražanju lahko posledica naključne porazdelitve celične vsebine in represorja LexA med dve hčerinski celici, kjer ena lahko dobi več molekul regulatorja, ter nihanj v transkripciji in translaciji. Možni so še drugi mehanizmi, npr. proteini, ki odmaknejo LexA iz LexA vezavnih zaporedij ali aktivirajo transkripcijo brez odmaknitve LexA. Do razlik v izražanju proučevanih genov prihaja tudi na račun LexA vezavnega zaporedja, ki je specifično za vsak gen in vpliva na moč vezave LexA, pozicije LexA vezavnega zaporedja v promotorski regiji, števila LexA vezavnih zaporedij in njihove medsebojne lege ter moči

promotorja. Uravnavanje genov s proteinom LexA je torej zelo kompleksno in zagotavlja optimalni celični odziv na poškodbe DNA. Pri kolicinih je izražanje še posebej uravnano, saj produkcija kolicina vodi k lizi in propadu celice. Zato imajo geni za sintezo kolicinov dve prekrivajoči se LexA vezavni zaporedji, vsako z različno močjo vezave. Vezava LexA dimerov na obe LexA vezavni zaporedji je kooperativna. Pri izražanju genov za kolicine smo le pri manjšem deležu celic ugotovili aktivnost promotorja, medtem ko je večji del populacije imel proučevani promotor popolnoma utišan. Na drugi strani smo pri *recA*, *lexA* in *uvrA* ugotovili večjo raven heterogenosti izražanja, gen *umuD* pa je bil pod pogoji uporabljenimi v raziskavi popolnoma utišan.

7 VIRI

- 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
- Ballaiche Y., Gho M., Kaltschmidt J.A., Brand A.H., Schweisguth F. 2001. Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology*, 3, 1: 50–57
- Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427: 71–74
- Benson F.E., Illing G.T., Sharples G.J., Lloyd R.G. 1988. Nucleotide sequencing of the *ruv* region of *Escherichia coli* K-12 reveals a LexA regulated operon encoding two genes. *Nucleic Acids Research*, 16, 4: 1541–1549
- Berg O.G., von Hippel P.H. 1987. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Statistical-mechanical theory and application to operators and promoters. *Journal of Molecular Biology*, 193, 4: 723–750
- Berg O.G. 1998. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins: the LexA protein and the arginine repressor use different strategies for functional specificity. *Nucleic Acids Research*, 16, 11: 5089–5105
- 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
- Bertrand-Burggraf E., Hurstel S., Daune M., Schnarr M. 1987. Promoter properties and negative regulation of the *uvrA* gene by the LexA repressor and its amino-terminal DNA binding domain. *Journal of Molecular Biology*, 193, 2: 293–302
- 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
- Bramhill D., Thompson C.M. 1994. GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5813–5817
- Brash D.E., Franklin W.A., Sancar A., Haseltine W.A. 1985. *Escherichia coli* DNA photolyase reverses cyclobutane pyrimidine dimers but not pyrimidine-pyrimidine (6-4) photoproducts. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 21: 11438–11441
- Brent R., Ptashne M. 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7: 4204–4208
- Brent R. 1982. Regulation and autoregulation by LexA protein. *Biochimie*, 64, 8-9: 565–569
- Campbell A. 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 35: 55–83

- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 236: 802–803
- Cirz R.T., Chin J.K., Andes D.R., de Crécy-Lagard V., Craig W.A., Romesberg F. 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLOS Biology*, 3, 6: 1024–1033
<http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371%2Fjournal.pbio.0030176> (19. avg. 2007)
- 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 green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 1: 33–38
- Cursino L., Šmarda J., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.A. 2002. Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 185–195
- 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
- Dri A.-M., Moreau P.L. 1994. Control of the LexA regulon by pH: Evidence for a reversible inactivation of the LexA repressor during the growth cycle of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12, 4: 621–629
- Dubnau D., Losick R. 2006. Bistability in bacteria. *Molecular Microbiology*, 61, 3: 564–572
- Fernández de Henestrosa A.R., Ogi T., Aoyagi S., Chafin D., Hayes J.J., Ohmori H., Woodgate, R. 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 35, 6: 1560–1572
- Gudas L.J., Pardee A.B. 1975. Model for regulation of *Escherichia coli* DNA repair functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 6: 2330–2334
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. 1995. DNA repair and mutagenesis. Washington, DC, American Society for Microbiology: 407–465
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. 2005. DNA repair and mutagenesis. 2nd ed. Washington, DC, American Society for Microbiology: 463–508
- Goodman M.F. 2000. Coping with replication train wrecks in *Escherichia coli* using Pol V, Pol II and RecA proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 4: 189–195
- Haijema B.J., Hahn J., Haynes J., Dubnau D. 2001. A ComGA-dependent checkpoint limits growth during the escape from competence. *Molecular Microbiology*, 40, 1: 52–64
- Horii T., Ogawa T., Ogawa H. 1981. Nucleotide sequence of the *lexA* gene of *Escherichia coli*. *Cell*, 23: 689–697

- Husiman O., Dari R., Gottesman S. 1984. Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block separation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 4490–4494
- Janion C. 2001. Some aspects of the SOS response system – A critical survey. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 3: 599–610
- Jelsbak L., Sogaard-Andersen L. 2000. Pattern formation: fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 6: 637–642
- 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
- Kalir S., McClure J., Pabbaraju K., Southward C., Ronen M., Leibler S., Surette M.G., Alon U. 2001. Ordering genes in a flagella pathway by analysis expression kinetics from living bacteria. *Science*, 292: 2080–2083
- Karlin S., Mrazek J., Campbell A., Kaiser D. 2001. Characterizations of highly expressed genes of four fast-growing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183 17: 5025–5040
- Kelleher J.F., Mandell M.A., Moulder G., Hill K.L., L'Hernaul S.W., Barstead R. Titus M.A. 2000. Myosin VI is required for asymmetric segregation of cellular components during *C. elegans* spermatogenesis. *Current Biology*, 10, 23: 1489–1496
- Kelley W.L. 2006. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and closer look at the LexA regulon. *Molecular Microbiology*, 62, 5: 1228–1238
- Khil P.P. in Camerini-Otero R.D. 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Molecular Biology*, 44, 1: 89–105
- Klaenhammer T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337–349
- Koch W.H., Woogdate 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
- Kuzminov A. 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 4: 751–813
- Lange R., Fisher D., Hengge-Aronis R. 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the σ^s subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177: 4676–4680
- Lewin C.S., Amyes S.G. 1991. The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimetoprim. *Journal of Medical Microbiology*, 34: 329–332
- Lewin B. 2000. *Genes VII*. 7th ed. New York, Oxford University Press Inc.: 445–249, 966

- Lewis L.K., Harlow G.R., Gregg-Jolly L.A., Mount D.W. 1994. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 241: 507–523
- Little J.W., Edmiston S.H., Pacelli L.Z., Mount D.W. 1980. Cleavage of *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 6: 3225–3229
- Little J.W., Mount D.W., Yanisch-Perron C.R. 1981. Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7: 4199–4230
- Little J.W., Mount D.W. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29, 1: 11–22
- Little J.W. 1983. The SOS regulatory system: control of its state by the level of RecA protease. *Journal of Molecular Biology*, 167, 4: 791–808
- Little J.W., Hill S.A. 1985. Deletions within a hinge region of a specific DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 8: 2301–2305
- Lloubes R., Grange-Schnarr M., Lazdunski C., Schnarr M. 1991. Interaction of a regulatory protein with a DNA target containing two overlapping binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 4: 2303–2312
- Lu F.M., Chak K.F. 1996. Two overlapping SOS-boxes in ColE operons are responsible for the viability of cell harbouring the Col plasmid. *Molecular and General Genetics*, 251, 4: 407–411
- Malik M., Zhao X., Drlica K. 2006. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Molecular Microbiology*, 61, 3: 810–825
- Markham B.E., Little J.W., Mount D.W. 1981. Nucleotide sequence of the *lexA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 9, 16: 4149–4161
- McAdams H.H., Arkin. 1999. It's a noisy business. Genetic regulation at the nanomolar scale. *Trends in Genetics*, 15: 65–69
- McCool J.D., Long E., Petrosino J.F., Sandler H.A., Rosenberg S.M., Sandler S.J. 2004. Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Molecular Microbiology*, 53, 5: 1343–1357
- McPartland A., Green L., Echols H. 1980. Control of *recA* gene RNA in *E. coli*: Regulatory and signal genes. *Cell*, 20, 3: 731–737
- Michel B. 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLOS Biology*, 3, 7: 1174–1176
<http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371%2Fjournal.pbio.0030255> (7. avg. 2007)

- Miller C., Thomsen E., Gaggero C., Mosseri Ingmer R.H., Cohen S.N. 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305: 1629–1631
- Moolenaar G.F., van Rossum-Fikkert S., van Kesteren M., Goosen N. 2002. Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3: 1467–1472
- Moreau P.L., Carlier M.F. 1989. RecA protein-promoted cleavage of LexA repressor in the presence of ADP and structural analogues of inorganic phosphate, the fluoride complexes of aluminium and beryllium. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 4: 2302–2306
- Mrak P., Podlesek Z., van Putten J. P.M., Žgur-Bertok D. 2007. Heterogeneity in expression of *Escherichia coli* colicin K activity gene *cka* is controlled by the SOS system and stochastic factors. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 4: 391–401
- Mulec J., Podlesek Z., Mrak P., Kopitar A., Ihan A., Žgur-Bertok D. 2003. A *cka-gfp* transcriptional fusion reveals that the colicin K activity gene is induced in only 3 percent of the population. *Journal of Bacteriology*, 185, 2: 654–659
- O'Neill M.C. 1989. Consensus methods for finding and ranking DNA binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 207, 2: 301–310
- Orgogozo V., Schweisguth F., Bellaiche Y. 2002. Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Nubm at mitosis. *Development (Cambridge, United Kingdom)*, 129, 20: 4677–4684
- Ozbudak E.M., Thattai M., Kurster I., Grossman A.D., van Qudenarden A. 2002. Regulation of noise in the expression of a single cell. *Nature Genetics*, 31: 69–73
- Parsons C.A., West C. 1993. Formation of a RuvAB-Holliday junction complex in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 232, 2: 397–405
- Phillips L., Culebras F., Moreno F., Baquero. 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20: 631–638
- Phrasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, 111, 2: 229–233
- Portle S., Causey T.B., Wolf K., Bennett G.N., San K-Y., Mantzaris N. 2007. Cell population heterogeneity in expression of a gene-switching network with fluorescent markers of different half-lives. *Journal of Biotechnology*, 128, 2: 362–375
- Radman M. 1975. SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Science*, 5A: 355–367
- Rangarajan S., Woodgate R., Goodman M.F. 1999. A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: A pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9224–9229

- Riley M.A. 1993. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 6: 1380–1395
- Riley M.A., Gordon D.M. 1996. The ecology and evolution of bacteriocins. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17: 151–158
- Riley M.A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Microbiology*, 32: 255–278
- Riley M.A., Wertz J.E. 2002a. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, 56: 117–137
- Riley M.A., Wertz J.E. 2002b. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84: 357–364
- Roberts J.W., Roberts C.W. 1975. Proteolytic cleavage of bacteriophage lambda repressor in induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 1: 147–151
- Roberts J.E., Roberts C.W., Craig N.L., Phizicky E.M. 1979. Activity of *Escherichia coli* recA gene product. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 43: 917–20
- Robin in sod., 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
- Salles B., Weisemann J.M., Weinstock G.M. 1987. Temporal control of colicin E1 induction. *Journal of Bacteriology*, 169, 11: 5028–5034
- Sassanfar M., Roberts J.W. 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*: The involvement of DNA replication. *Journal of Molecular Biology*, 212, 1: 79–96
- Schnarr M., Granger-Schnarr M., Hurstel S., Pouyet J. 1988. The carboxy-terminal domain of the LexA repressor oligomerises essentially as the entire protein. *FEBS Letters*, 234, 1: 56–60
- Schnarr M., Oertel-Buchheit P., Kazmaier M., Granger-Schnarr M. 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie*, 73: 423–431
- Setlow R.B., Carrier W.L. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 2: 226–231.
- Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Kimura S., Iwasaki H., Nakata A. 1988. Structure and regulation of the *Escherichia coli* *ruv* operon involved in DNA repair and recombination. *Journal of Bacteriology*, 170, 9: 4322–4329
- Sonenshein A.L. 2000. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 6: 561–566

- Sweeney P.J., Srien F., Fredrickson A.G. 1994. Measurement of unequal DNA partitioning in *tetrahymena-pyiformis* using slit-scanning flow-cytometry. *Biotechnology Progress*, 10, 1: 19–25
- Šmarda J., Šmajs. 1998. Colicins – exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 43, 6: 563–582
- Taddei F., Matic I., Radman M. 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 11736–11740
- Tang M., Shen X., Frank E.G., O'Donnell M., Woodgate R., and Goodman M.F. 1999. UmuD'₂C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 16: 8919–8924
- Tippin B., Pham P., Goodman M.F. 2004. Error-prone replication for better or worse. *Trends in Microbiology*, 12, 6: 288–295
- Tran J., Brenner T.J., DiNardo S. 2000. Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature*, 407, 6805: 754–757
- Tsaneva I.R., Müller B., West S.C. 1992. ATP-dependent branch migration of holliday junctions promoted by the RuvA and RuvB proteins of *E. coli*. *Cell*, 69: 1171–1180
- Walker G. 1996. The SOS response of *Escherichia coli*. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Vol.1. Neidhardt F.C. (ed.). Washington, DC, American Society of Microbiology: 1400-1416
- Van Houten B. 1990. Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 54, 1: 18–51
- Wan Der Waal F.J., Luirink J., Oudega B. 1995. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure and biotechnological application. *FEMS Microbiology Reviews*, 17: 381–399
- Wang J., Mueller K.L., Grossman L. 1994. A mutational study of the C-terminal zinc-finger motif of the *Escherichia coli* UvrA protein. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 14:10771–10777
- West S.C., Connolly B. 1992. Biological roles of the *Escherichia coli* RuvA, RuvB and RuvC proteins revealed. *Molecular Microbiology*, 6, 19: 2755–2759

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Darji Žgur Bertok za vodenje pri laboratorijskem delu, nasvete in pomoč pri izdelavi diplome.

Hvala tudi recenzentu prof. dr. Davidu Stoparju za hitro in konstruktivno kritiko pisnega dela.

Hvala Mateju in Zdravku za veliko pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu.

Hvala NIB-u, da sem lahko izvedla mikroskopiranje.

Hvala Damijanu za spodbudo in optimizem.

Hvala sestri Nataliji za tehnično pomoč.

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

PRILOGE

Priloga A:

Preglednice meritev OD₆₀₀ za seva RW118 in RW464 z različnimi genskimi fuzijami promotorjev z *gfp*.

Preglednica A1: Meritev OD₆₀₀ kulture transformiranega seva RW118 s plazmidno DNA z *gfp* fuzijo promotorja gena SOS.

čas (h)	OD ₆₀₀				čas (h)	OD ₆₀₀			
	RW118	cka-gfp	lexA-gfp	recA-gfp		cki-gfp	polB-gfp	uvrA-gfp	umuD-gfp
2,67	0,142	0,118	0,139	0,118	2,67	0,108	0,199	0,204	0,285
3,67	0,552*	0,558*	0,548*	0,522*	3,14	0,213	0,400*	0,405*	0,411*
4,67	1,795	1,705	1,685	1,436	3,67	0,457*	0,650	0,620	0,680
5,26	2,287*	2,200*	2,107*	1,900*	4,67	1,200	1,605	1,895	1,765
5,67	2,627	2,607	2,540	2,333	5,17	1,427	1,893*	2,253*	2,107*
6,67	3,347	3,267	3,180	3,047	5,67	2,240*	2,727	2,493	2,627
7,67	3,760	3,793	3,560	3,130	6,60	3,133	3,560	3,180	3,367
8,62	3,674	3,793	3,780	3,307	7,67	3,927	3,873	2,867	3,880
9,17	4,073*	4,120*	4,060*	3,967*	8,26	4,147	3,987	3,153	3,853
					8,72	4,060*	3,007*	4,110*	3,653*

Preglednica A2: Meritev OD₆₀₀ kulture transformiranega seva RW118 s plazmidno DNA z *gfp* fuzijo promotorja gena SOS; ponovitve.

čas (h)	PONOVI TEV					čas (h)	PONOVI TEV		
	OD ₆₀₀						OD ₆₀₀		
	RW118	cka-gfp	cki-gfp	lexA-gfp	recA-gfp		polB-gfp	uvrA-gfp	umuD-gfp
2,67	0,097	0,111	0,054	0,082	0,060	2,67	0,071	0,195	0,213
3,67	0,438	0,482*	0,249	0,360	0,275	3,09	0,129	0,352	0,380
3,84	0,565*	0,587	/	/	/	3,26	/	0,449	0,482
3,97	/	/	/	0,556*	/	3,31	/	/	0,520*
4,09	1,465	1,260	0,462*	/	0,503*	3,37	/	0,542*	/
4,74	1,805	1,845	0,845	1,055	0,815	3,58	0,272	/	/
5,42	2,260*	2,187*	1,660	2,190*	1,830	3,84	0,358	/	/
5,67	/	/	/	/	2,150*	4,09	0,530*	/	/
5,76	/	/	2,153*	/	/	4,42	/	1,650	1,875
6,67	3,467	3,393	2,887	3,373	3,140	4,67	/	/	2,010*
7,67	4,167	4,087	3,767	4,113	3,990	4,81	/	2,173*	/
8,26	4,020*	3,927*	3,693*	3,973*	3,907*	5,09	1,700	/	/
8,67	4,287	4,180	3,760	4,153	4,393	5,33	2,127*	/	/
9,34	3,840	3,887	3,713	3,880	3,587	5,76	/	2,940	2,987
						6,26	2,907	3,493	3,613
						6,76	3,293	3,640	3,580
						7,26	3,573	3,867	3,380
						7,67	3,853	3,893*	4,160*
						8,26	4,487*	3,660	4,047

Preglednica A3: Meritev OD₆₀₀ kulture transformiranega seva RW464 s plazmidno DNA z gfp fuzijo promotorja gena SOS.

čas (h)	OD ₆₀₀			čas (h)	OD ₆₀₀				
	lexA-gfp	recA-gfp	uvrA-gfp		RW464	cka-gfp	cki-gfp	umuD-gfp	polB-gfp
2,67	0,295	0,305	0,331	2,92	0,426	0,396	0,342	0,298	0,138
3,67	0,753	0,744	0,752	3,83	0,840	0,700	0,706	0,556	0,314
4,17	1,165	1,205	1,185	5,00	1,885*	1,670*	1,570*	1,185	0,650
4,42	1,325	1,165	1,255	5,67	/	/	/	1,847*	/
4,67	1,633	1,400	1,740	5,83	/	/	/	/	1,347*
5,01	1,953*	/	1,993*	6,25	2,273	2,480	2,687	2,340	1,567
5,17	/	1,973*	/	7,00	2,227	2,733	2,853	2,573	2,187
5,84	2,460	2,593	2,340	8,00	3,453	3,240	2,880	2,387	2,340
6,84	2,900	3,100	2,900	9,00	3,480*	3,567*	3,653*	3,340*	3,233*
7,84	3,473	2,987	2,893						
8,18	3,393*	3,460*	3,493*						
8,67	3,507	3,080	3,020						

Preglednica A4: Meritev OD₆₀₀ kulture transformiranega seva RW118 s plazmidno DNA z gfp fuzijo promotorja kolicina; prvič in ponovitev.

čas (h)	OD ₆₀₀				čas (h)	PONOVITEV			
						OD ₆₀₀			
	caa-gfp	cna-gfp	cea1-gfp	cea7-gfp		caa-gfp	cna-gfp	cea1-gfp	cea7-gfp
2,75	0,319	0,501	0,213	0,319	2,67	0,252	0,290	0,497	0,562
3,75	0,934	1,204	0,740	1,064	3,67	0,870	0,895	1,235	1,430
4,75	2,213	2,540	1,820	2,607	4,67	2,213	2,187	2,420	2,713
5,75	3,220	2,827	3,073	3,367	5,67	3,113	3,100	3,520	3,253
6,75	3,487	3,907	3,653	3,267	6,25	3,453	3,580	3,793*	4,020*
7,83	3,687*	2,793*	3,180*	2,067*	6,67	3,744*	3,627*	2,920	2,853
8,33	3,040	3,360	3,827	2,480	7,25	3,520	3,740	3,207	4,030
8,75	3,947	2,693	3,627	3,127					

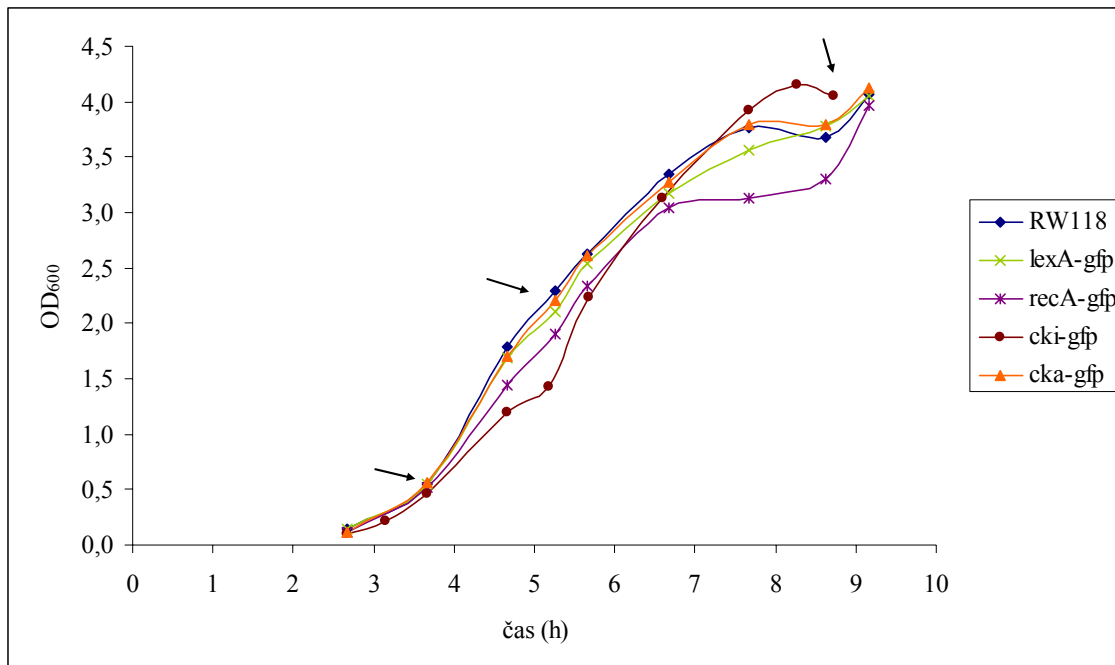
Preglednica A5: Meritev OD₆₀₀ kulture transformiranega seva RW464 s plazmidno DNA z gfp fuzijo promotorja kolicina; prvič in ponovitev.

čas (h)	OD ₆₀₀				čas (h)	PONOVITEV			
						OD ₆₀₀			
	caa-gfp	cna-gfp	cea1-gfp	cea7-gfp		caa-gfp	cna-gfp	cea1-gfp	cea7-gfp
2,75	0,298	0,484	0,283	0,268	2,67	0,529	0,550	0,524	0,489
3,75	0,734	1,027	0,714	0,688	3,67	1,205	1,290	1,150	1,080
4,75	1,767	2,233	1,547	1,540	4,67	2,260	2,473	2,240	1,987
5,75	2,340	2,680	2,473	1,880	5,67	2,920	2,953	2,900	2,933
6,75	2,793	3,113	2,253	2,340	6,25	3,160	2,953	2,933	2,900
7,83	3,127*	2,267*	2,847	2,773	6,67	3,367*	3,293*	3,147*	3,033*
8,33	2,847	2,687	3,130	3,173	7,25	2,873	2,900	2,687	3,480
8,75	3,953	3,653	3,627*	3,640*					

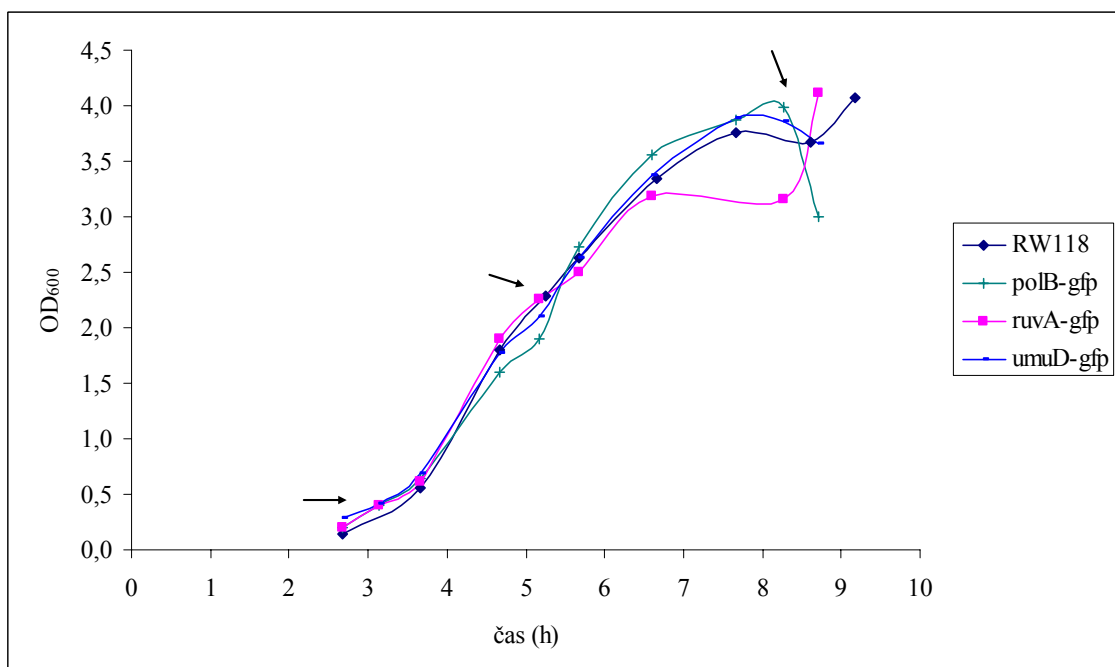
* zvezdica pri številkah pomeni vzorčenje in da je ta vzorec bil mikroskopiран

Priloga B:

Rastne krivulje sevov RW118 in RW464 z različnimi *gfp* fuzijami.

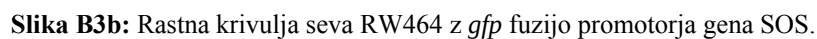
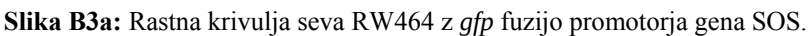


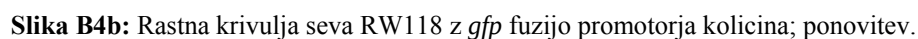
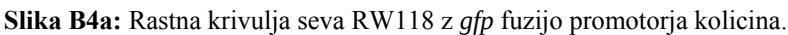
Slika B1a: Rastna krivulja seva RW118 z *gfp* fuzijo promotorja gena SOS.

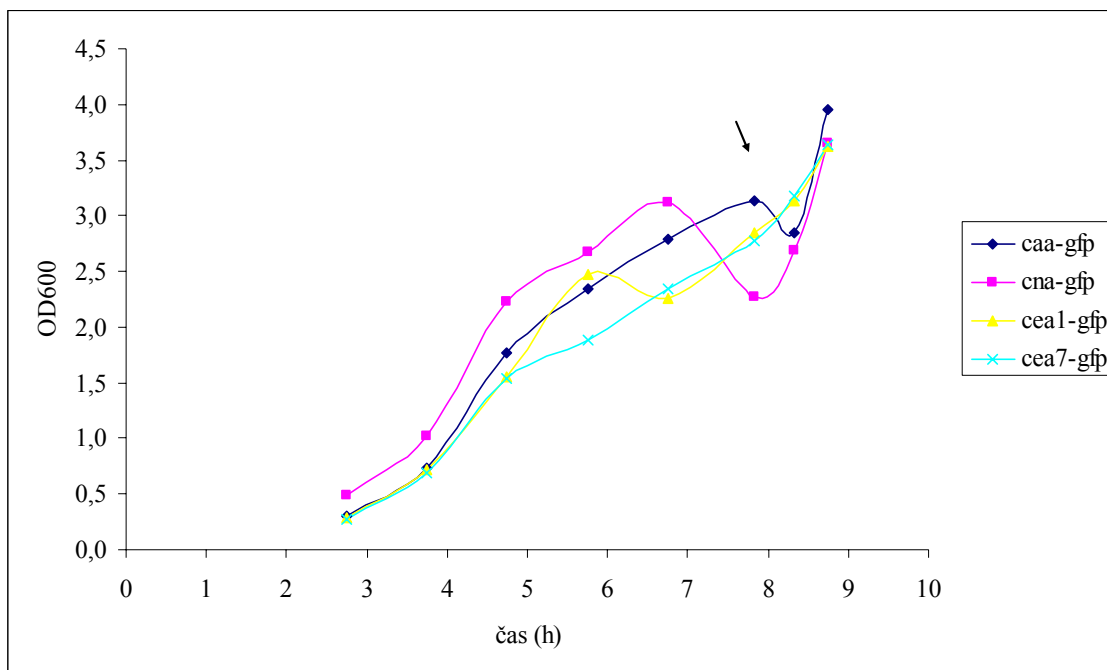


Slika B1b: Rastna krivulja seva RW118 z *gfp* fuzijo promotorja gena SOS.

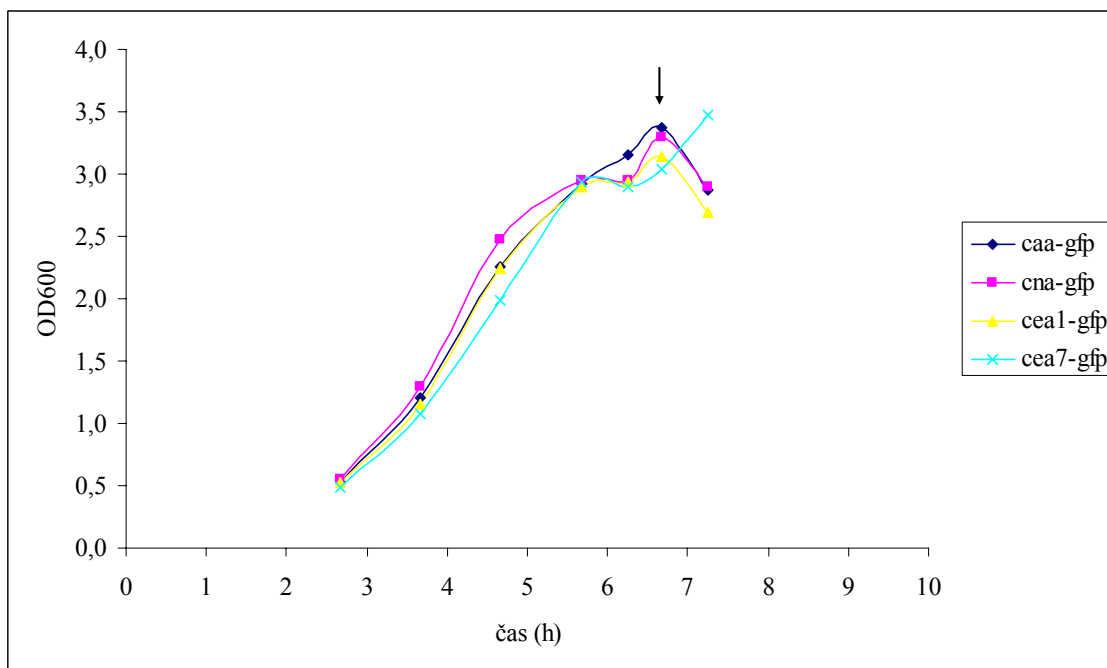








Slika B5a: Rastna krivulja seva RW464 z *gfp* fuzijo promotorja kolicina.



Slika B5b: Rastna krivulja seva RW464 z *gfp* fuzijo promotorja kolicina; ponovitev.

* puščice nakazujejo čas in OD₆₀₀ vzorčenja

Priloga C:

Nukleotidna zaporedja.

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina A (411 nt):

CGGCGATTGTTTTTCTGAGCGGTAAGTACGAGGCCGTTAGCCATATCACGGTACAGCTGTG
AACGGGATTTCCCGTTAATTTTAGTGTGTCCTGAATAGTGTGCCATGCCATAAAGTGACGTTGT
CCCGTTAGTGTCTCATTGAATAAATATAGTAAATCATTTCCCTTCGTGATTAATAACTAAAAACC
ATGTTGACAGCATGGAAGTCCGGGCGTAGTATCATTTTACTGTATATAAACACATGTGAATAT
ATACAGTTTTTGGTGTGGCAGAGCACTTATAACAGCGTGGCGGCAGGTAGCCGCTCAGCAATAA
ACCGCACACCAGATTTCTCATAAAACAAAAATAAAAAGAGGAAAGATTATGCCTGGATTTAAT
TATGGTGGAAAAGGTGATGGAACCGG

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina N (408 nt):

ACTGACAAGGCCTGAGCGCATATCACGGTAAAGTGTGAGCGCGATCTGCCCCGCATTTTCAGC
GCGTCCCGGAGTGTGTGCCATGCCATAAAGTGACAGTGTCCCATAGATGTCTCATATCATGGTT
TCAGTAGAACATAATGAGGTCTGAGAGCGGTAATGTTTGCGCCGGTTTTTGTGGTATCCGGCGA
GAATAGCGCGTGGTGTGAAAGACTGTTTTTTTGATCGTTTTTACAAAAATGGAAGTCCACAGTC
TTGACAGGGAAAATGCAGCGGCGTAGCTTTTATGCTGTATATAAAACCAGTGTTTATATGTACA
GTATTTGTTTTTAATGGTTTGTTTTAAAGTCAAAGAGGGGTCTATTATGGGTAGTAATGGCGCA
GATAACGCACATAACAATGCTTT

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina E1 (413 nt):

AGACCTGAGCGCATATCACGGTAAAGTGTGAACGCGATCTTCCAGTCATTTTCAGTGCGTCCC
GGAGTGTGTGCCATGCCATAAAGTTACAGTGTCCCATAGGTGTCTCATCTCATGGTTTCAGTAA
AACATAATGAGGTCTGAGAACGGTAATGTTTGTGCTGGTTTTTGTGGCATCGGGTGGAAATAGC
ACGTGGTGTGGGTGGCTGTTTTTTTGATCGTTTTTACAAAAATGAAAATCCACAGGGTTGACAG
GGAAAATGCAGCGGCGTAATTTTAAAGTGTATATAAAACCAGTGATTATATATACAGTATATTA
CTTTAACTATTTGTTTTTAATGTCAAAGAGGATTTTATAATGGAAACAGCTGTAGCGTACTATA
AAGATGGTGTTCCTTATGATGATAAGGG

Nukleotidno zaporedje promotorske regije kolicina E7 (394 nt):

GTGGCCTTTCTGGTTATGTTTCAGTGTGCTCGGATGGGGGATGAAAACAATTCTCGACAGGAACT
ACAACGCCACAGCGGCGGTGTATCAGAAAGTTGTGACACTGGAAGATAAACTGGCGGAGAAAC
CTGTCACGGGTAAGAGCCGGAAAAACTGACGCGCTTCGTTTGTCCAACGCCTCACGGACCGCGA
AAGGATTTTCGGAACCGTTACCGTTTCCATGAGTGACTCCTCCGAAGTCCAAAAAATATCCC
TCCCTGACTTGACAGAGAAAAATAATGGCGAGTACTTTTTGATCTGTACATAAAACCAGTGTTTT
TATGTACAGTATTAATATGTAATTAATTGTTTTAACGCTTAAAAGAGGGAATTTTTATGAGCGG
TGGAGATGGA