



GDAŃSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

Uniwersytet
Gdański

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Ewelina Boguszevska

Analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *Escherichia coli* w trakcie głodu aminokwasowego

Analysis of the initiator proteins DnaA and TrfA
in *Escherichia coli* cells during amino acid starvation

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: prof. dr hab. Igor Konieczny
Zakład Biologii Molekularnej

GDAŃSK 2025

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że przedłożona praca dyplomowa została przygotowana przeze mnie samodzielnie, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych innych osób oraz wykorzystanie materiałów wytworzonych przez generatywne narzędzia sztucznej inteligencji odbyło się w zakresie uzgodnionym z promotorem.

.....

data

.....

podpis



Fundusze Europejskie
dla Nowoczesnej Gospodarki



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

Projekt ten był wspierany przez grant TEAM5 przyznawany przez Fundację na rzecz
Nauki Polskiej POIR.04.04.00-00-5C75/17-00



NARODOWE CENTRUM NAUKI

oraz przez grant OPUS22 Narodowego Centrum Nauki nr 2021/43/B/NZ1/01360

*Szukajcie prawdy jasnego płomienia,
Szukajcie nowych, nieodkrytych dróg!
Każda epoka ma swe własne cele
I zapomina o wczorajszych snach:
Nieście więc wiedzy pochodnię na czele
I nowy udział bierzcie w wieków dziele —
Przyszłości podnoście gmach!*

Adam Asnyk – „Do młodych”

Pragnę serdecznie podziękować prof. dr hab. Igorowi Koniecznemu za lata nauki, owocne dyskusje, cenne wskazówki dotyczące pisania o nauce oraz wsparcie w mierzeniu się z codziennymi wyzwaniami pracy naukowej.

Dziękuję Pracownikom i Doktorantom Zakładu Biologii Molekularnej za życzliwość i przyjazną atmosferę, a przede wszystkim za to, że zawsze mogłam liczyć na pomoc i wskazówki w codziennej pracy.

Podziękowania kieruję także do prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej za możliwość pracy na sprzęcie ONIX oraz ogromną życzliwość i gościnność, dzięki którym pobyt w jej zespole był dla mnie niezwykle cennym i miłym doświadczeniem.

Jestem również wdzięczna osobom, które wsparły mnie na poszczególnych etapach badań: dr Damianowi Trojanowskiemu i dr Marcie Kołodziej za pomoc w opanowaniu techniki analiz poklatkowych, dr Agnieszce Strzałce za współpracę przy analizie danych ChIP-seq, prof. dr hab. Paulinie Czaplewskiej i mgr. Natalii Musiał za wykonanie analizy spektrometrii mas, dr hab. Andrei Lipińskiej za pomoc w obsłudze cytometru przepływowego oraz mgr. Igorowi Grochowinie za przygotowanie skryptu Python do wyszukiwania sekwencji DnaA-box.

Z całego serca dziękuję mojej Rodzinie i Przyjaciółom za nieustanne wsparcie i wiarę we mnie. Szczególnie wdzięczna jestem Mężowi oraz Mamie za zrozumienie, nieocenioną pomoc i siłę, dzięki którym mogłam wytrwać w najtrudniejszych momentach i doprowadzić tę pracę do końca.

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE	1
2. ABSTRACT	3
3. WYKAZ SKRÓTÓW	5
4. WSTĘP	8
4.1. <i>Escherichia coli</i> jako organizm modelowy w badaniach odpowiedzi na stres	8
4.2. Kontrola inicjacji replikacji chromosomalnego DNA w warunkach optymalnych	12
4.3. Inicjacja replikacji plazmidu RK2 w komórkach <i>E. coli</i>	22
4.4. Wpływ stresu środowiskowego na replikację DNA	27
5. CEL PRACY	30
6. MATERIAŁY	31
6.1. Szczepy bakteryjne	31
6.2. Plazmidy	31
6.3. Oligonukleotydy	32
6.4. Podłoża hodowlane i antybiotyki	33
6.5. Białka	33
6.6. Sekwencje DNA	34
7. METODY	35
7.1. Obserwacja bakterii <i>E. coli</i> interwałową techniką ujęć poklatkowych	35
7.2. Analiza i przetwarzanie danych mikroskopowych	35
7.3. Izolacja i oczyszczanie DNA	36
7.4. Transformacja komórek bakteryjnych	36
7.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	37
7.6. Klonowanie metodą Gibsona	38
7.7. Nadprodukcja i oczyszczanie białek DnaA i DnaA-EYFP	40
7.8. Określanie stężenia białek	41
7.9. Określanie stabilności termicznej białek <i>in vitro</i>	41
7.10. Test opóźnienia migracji DNA w żelu (EMSA)	41
7.11. Hodowla bakterii przed stresem, w trakcie stresu oraz po stresie	42
7.12. Analiza całkowitej liczby komórek w mililitrze hodowli bakteryjnej (BactoBox)	42
7.13. Analiza wymiarów komórek bakteryjnych	43
7.14. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	43
7.15. Western Blot	44
7.16. Określanie poziomu lub stabilności białek w komórkach bakteryjnych	45
7.17. Cytometria przepływowa	46
7.18. Rozdział DNA w żelu agarozowym	46
7.19. Określenie stężenia DNA	47
7.20. Immunoprecypitacja chromatyny (ChIP)	47
7.21. Spektrometria mas	50
7.22. Sekwencjonowanie NGS	50
7.23. Analiza danych ChIP-seq	51
7.24. Wyszukiwanie sekwencji DnaA-box i DnaA-box-podobnych w genomie <i>E. coli</i>	52
7.25. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (qPCR)	53
7.26. Wyszukiwanie potencjalnych miejsc wiązania białka Fis w regionie <i>oriV</i>	55
7.27. Analiza poziomu acetylacji białka DnaA <i>in vivo</i>	56
7.28. Analiza statystyczna	57
8. WYNIKI	58
8.1. Określenie aktywności białka DnaA-EYFP	58

8.2.	Wykorzystanie algorytmu N2V do analizy zdjęć mikroskopowych i przygotowania kymografów	64
8.3.	Lokalizacja białka DnaA w komórkach <i>E. coli</i> w warunkach optymalnych	66
8.4.	Lokalizacja białka DnaA w komórkach <i>E. coli</i> podczas głodu aminokwasowego	67
8.5.	Wpływ głodu aminokwasowego na wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA i DnaA-EYFP	72
8.6.	Analiza replikacji chromosomalnego DNA w komórkach poddanych stresowi	74
8.7.	Wiązanie białka DnaA do chromosomalnego DNA w warunkach głodu aminokwasowego	77
8.8.	Wiązanie białka DnaA do <i>oriC</i> w komórkach szczepu typu dzikiego i Δppk podczas stresu	94
8.9.	Wiązanie DnaA do <i>oriV</i> w komórkach szczepu typu dzikiego i Δppk podczas stresu	95
8.10.	Wpływ białka Fis i acetylacji na wiązanie DnaA do DNA <i>in vivo</i>	98
8.11.	Wpływ stresu na oddziaływanie białka TrfA z <i>oriV</i>	101
8.12.	Stabilność białka TrfA w trakcie głodu aminokwasowego	102
8.13.	Wpływ głodu aminokwasowego na inicjację replikacji plazmidu RK2	104
9.	DYSKUSJA	106
9.1.	Białka inicjatorowe DnaA i TrfA w komórkach <i>E. coli</i> w warunkach optymalnych	106
9.2.	Białka inicjatorowe DnaA i TrfA w komórkach <i>E. coli</i> podczas głodu aminokwasowego	108
9.3.	Białka inicjatorowe DnaA i TrfA w komórkach <i>E. coli</i> w trakcie wyjścia ze stresu	115
10.	LITERATURA	118

1. STRESZCZENIE

Bakterie potrafią szybko adaptować się do zmiennych warunków środowiska dzięki precyzyjnej regulacji procesów komórkowych, w tym replikacji DNA. Molekularne podstawy inicjacji replikacji chromosomalnego DNA są dobrze poznane, jednak znacznie mniej wiadomo o tym, jak proces ten zostaje zahamowany podczas stresu. Jeszcze mniej informacji dotyczy regulacji replikacji plazmidów podczas stresu, które odgrywają kluczową rolę w rozprzestrzenianiu genów oporności na antybiotyki. Celem niniejszej pracy była analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *Escherichia coli* podczas stresu. Białko DnaA, odpowiada za rozpoczęcie replikacji chromosomu, natomiast TrfA, pełni rolę inicjatora replikacji plazmidu RK2. W warunkach optymalnych DnaA wiąże się z miejscem inicjacji replikacji chromosomu (*oriC*), co prowadzi do rozpoczęcia procesu replikacji DNA. Wykazałam, że podczas głodu aminokwasowego cząsteczki DnaA nie wiążą się do *oriC*, a zjawisko to koreluje ze wzrostem poziomu ich acetylacji. Ponadto w trakcie stresu wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA ulega stopniowemu obniżeniu, choć nigdy nie spada poniżej poziomu detekcji. Analiza ChIP-seq ujawniła, że cząsteczki DnaA obecne w komórce podczas stresu wykazują zmieniony profil interakcji z DNA. Podczas głodu aminokwasowego cząsteczki DnaA nie oddziałują z regionami DNA zajmowanymi w warunkach optymalnych, lecz wiążą się z innymi obszarami genomu. Zmianie ulega także wewnątrzkomórkowa lokalizacja DnaA, ponieważ w warunkach stresu białko nie tworzy wyraźnych skupisk charakterystycznych dla komórek rosnących w warunkach optymalnych. Uzyskane wyniki pokazują, że poziom, lokalizacja, profil oddziaływania z DNA oraz acetylacja DnaA ulegają zmianom podczas stresu, co w efekcie zapobiega inicjacji replikacji chromosomalnego DNA. W komórkach *E. coli*, białko DnaA współdziała z plazmidowym białkiem TrfA podczas inicjacji replikacji plazmidu RK2. Wykazałam, że podczas głodu aminokwasowego inicjacja replikacji plazmidu RK2 jest zahamowana w wyniku braku oddziaływania DnaA i TrfA z plazmidowym *origin* replikacji (*oriV*). Obniżenie poziomu wiązania inicjatorów do *oriV* jest powiązane ze spadkiem poziomu zarówno monomeru i dimeru TrfA, jak i DnaA. Co ciekawe, plazmid nie ulega replikacji również w komórkach kodujących hiperaktywny, monomeryczny wariant TrfA, co sugeruje, że zahamowanie replikacji DNA podczas stresu obejmuje mechanizmy inne niż tworzenie kompleksów typu *handcuff*.

Uzyskane wyniki wskazują, że pełne zahamowanie inicjacji replikacji DNA w warunkach stresu jest konsekwencją równoległego działania kilku mechanizmów. Zmiany

zachodzące podczas stresu są odwracalne, co pozwala na wznowienie replikacji chromosomalnego oraz plazmidowego DNA po ustąpieniu stresu. Praca ta poszerza wiedzę na temat regulacji replikacji DNA podczas stresu i rzuca nowe światło na mechanizmy warunkujące przetrwanie bakterii w niekorzystnych warunkach, co może stanowić podstawę do opracowania nowych terapii przeciwdrobnoustrojowych oraz strategii wspierających antybiotykoterapię i ograniczających występowanie oporności na antybiotyki warunkowanej przez plazmidy.

2. ABSTRACT

Bacteria can rapidly adapt to changing environmental conditions through precise regulation of cellular processes, including DNA replication. The molecular basis of chromosomal DNA replication initiation is well understood, but much less is known about how this process is inhibited under stress. Even less information is available on the regulation of plasmid replication during stress, despite its key role in the dissemination of antibiotic resistance genes. The aim of this study was to analyze the initiator proteins, DnaA and TrfA, in *Escherichia coli* cells during stress conditions. DnaA is responsible for initiating chromosomal replication, whereas TrfA serves as the initiator of RK2 plasmid replication. Under optimal conditions, DnaA binds to the *origin* of chromosomal replication (*oriC*), leading to the initiation of DNA replication. I demonstrated that during amino acid starvation, DnaA molecules do not bind *oriC*, and this phenomenon correlates with an increase of DnaA acetylation level. Moreover, during stress the intracellular level of DnaA gradually decreases, although it never drops below the detection limit. ChIP-seq analysis revealed that DnaA molecules present in the cell during stress exhibit an altered DNA interaction profile. During stress, DNA regions bound under optimal conditions are no longer occupied, while new interactions appear in other sites. The intracellular localization of DnaA also changes, as under stress the protein does not form the distinct foci characteristic for cells growing under optimal conditions. Taken together, the results show that the level, localization, DNA interaction profile, and acetylation of DnaA change under stress, which ultimately prevents initiation of chromosomal DNA replication. In *E. coli*, DnaA cooperates with the plasmid initiator TrfA during the initiation of RK2 plasmid replication. I showed that during amino acid starvation, initiation of RK2 plasmid replication is inhibited due to the absence of DnaA and TrfA binding to plasmid replication *origin* (*oriV*). The reduction in initiator binding to *oriV* correlates with a decrease of the levels of TrfA monomers and dimers as well as DnaA. Interestingly, the plasmid also does not replicate in cells expressing a hyperactive monomeric TrfA variant, suggesting that replication blockade involves mechanisms other than the formation of handcuff complexes.

The results indicate that complete inhibition of DNA replication initiation under stress is a consequence of several parallel mechanisms. Changes occurring during stress are reversible, which allows for resumption of both chromosomal and plasmid replication once stress is relieved. This work expands our understanding of DNA replication regulation under stress and provides new insights into the mechanisms that enable bacterial survival in

unfavorable conditions, which may form the basis for developing novel antimicrobial therapies as well as strategies that support antibiotic treatment and limit plasmid-mediated antibiotic resistance.

3. WYKAZ SKRÓTÓW

ATP	adenozynotrifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
ADP	adenozynodifosforan (ang. <i>adenosine diphosphate</i>)
BSA	albumina surowicy bydlęcej (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
ChIP	immunoprecypitacja chromatyny (ang. <i>chromatin immunoprecipitation</i>), technika badania oddziaływania białko–DNA <i>in vivo</i>
ChIP-seq	immunoprecypitacja chromatyny połączona z sekwencjonowaniem nowej generacji (ang. <i>chromatin immunoprecipitation followed by next generation sequencing</i>), metoda globalnej analizy oddziaływania białko–DNA <i>in vivo</i>
Ct	próg cyklu (ang. <i>cycle threshold</i>), parametr w qPCR określający numer cyklu, w którym sygnał fluorescencji próbki przekracza ustalony próg detekcji
DARS	sekwencja reaktywacji białka DnaA (ang. <i>DnaA reactivating sequence</i>), element regulujący status nukleotydowy DnaA
DBD	domena wiążąca DNA (ang. <i>DNA-binding domain</i>)
DDAH	hydroliza DnaA–ATP zależna od regionu <i>datA</i> (ang. <i>datA-dependent DnaA-ATP hydrolysis</i>), mechanizm kontroli aktywności DnaA
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DnaA-box	sekwencja rozpoznawana przez białko DnaA
DOR	region oligomeryzacji białka DnaA (ang. <i>DnaA oligomerization region</i>)
DUE	region <i>oriC</i> , w którym dochodzi do rozwinięcia dwuniciowej struktury DNA (ang. <i>DNA unwinding element</i>)
dsDNA	Dwuniciowy DNA (ang. <i>double-stranded DNA</i>)
EDTA	kwask wersenowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMSA	test opóźnienia migracji DNA w żelu (ang. <i>electrophoretic mobility shift assay</i>), metoda badania wiązania białko–DNA
EtBr	bromek etydyiny (ang. <i>ethidium bromide</i>), barwnik fluorescencyjny interkalujący do dsDNA
EYFP	białko żółtej fluorescencji (ang. <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>), konstytutywnie fluorescencyjne zielono-żółte białko fluorescencyjne uzyskane z <i>Aequorea victoria</i>
Fis	białko Fis (ang. <i>factor for inversion stimulation</i>)

GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i>), białko fluorescencyjne pochodzące z meduzy <i>Aequorea victoria</i> , emitujące zielone światło
IBS	miejsce wiązania białka IHF (ang. <i>IHF binding sequence</i>), sekwencja DNA znajdująca się w oriC, do której wiąże się białko IHF
IP	immunoprecypitacja
IHF	czynn timer integracyjny gospodarza (ang. <i>integration host factor</i>), białko regulatorowe wiążące DNA należące do grupy NAP
LB / LA	pożywka/agar LB (ang. <i>Luria-Bertani broth/agar</i>), podłoże hodowlane dla bakterii
LLPS	separacja faz ciecz–ciecz (ang. <i>liquid–liquid phase separation</i>), proces fizykochemiczny prowadzący do powstawania kondensatów w komórkach
MACS	metoda analizy danych ChIP-Seq oparta na modelach (ang. <i>Model-based Analysis of ChIP-Seq data</i>)
MST	termoforeza mikroskalowa (ang. <i>microscale thermophoresis</i>), technika badania oddziaływań biomolekularnych oparta na ruchu cząsteczek w gradiencie temperatury
NAP	białka związane z nukleoidem (ang. <i>nucleoid-associated proteins</i>), grupa białek uczestniczących w organizacji struktury nukleoidu
NGS	sekwencjonowanie nowej generacji (ang. <i>next generation sequencing</i>), metoda wysokoprzepustowego odczytu sekwencji DNA/RNA
OD600	gęstość optyczna przy długości fali 600 nm (ang. <i>optical density</i>)
PBS	bufor fosforanowy (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>), metoda amplifikacji fragmentów DNA
PDAP	proteoliza białka DnaA zależna od polyP (ang. <i>polyP-dependent DnaA proteolysis</i>)
polyP	polifosforan
ppGpp	guanozynotetra-/pentaosforan, alarmon odpowiedzi ścisłej
qPCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)

Rep	białko inicjatorowe replikacji plazmidowego DNA (ang. <i>Replication initiator protein</i>)
RIDA	system inaktywacji białka DnaA (ang. <i>Regulatory Inactivation of DnaA</i>)
RNA	kwasy rybonukleinowe (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RSH	homologi RelA/SpoT (ang. <i>RelA/SpoT homologues</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (ang. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SHX	hydroksamian seryny (ang. <i>serine hydroxamate</i>), analog seryny stosowany do indukcji głodu aminokwasowego
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SOC / SOB	pożywki SOB/SOC (ang. <i>Super Optimal broth with/without Catabolite repression</i>), bogate podłoża hodowlane
ssDNA	Jednoniciowy DNA (ang. <i>single-stranded DNA</i>)
TBE	bufor tris-borany z EDTA (ang. <i>Tris-borate-EDTA buffer</i>)
UV	światło ultrafioletowe
WH	(ang. <i>winged helix</i>), motyw strukturalny białek wiążących DNA
WT	typu dzikiego (ang. <i>wild type</i>)

4. WSTĘP

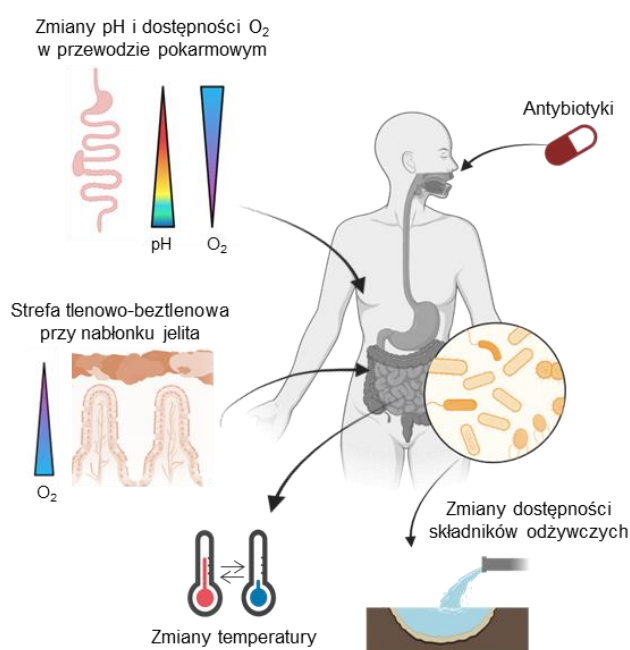
Replikacja DNA jest procesem kluczowym dla zapewnienia prawidłowego funkcjonowania i podziału komórki, a jednocześnie procesem szczególnie wrażliwym na warunki stresowe. W sytuacjach stresu priorytetem komórki staje się zahamowanie inicjacji replikacji DNA i ochrona integralności genomu. Mechanizmy kontroli inicjacji replikacji chromosomalnego DNA, zapewniające synchronizację tego procesu z cyklem komórkowym i zapobiegające nadmiernej inicjacji warunkach optymalnego wzrostu są dobrze poznane¹. Jednak nadal brakuje pełnego zrozumienia, w jaki sposób inicjacja replikacji chromosomalnego DNA jest blokowana w warunkach stresu. Jeszcze mniej wiadomo o regulacji replikacji elementów pozachromosomalnych, takich jak plazmidy, w warunkach stresu. W prognozie obejmującej dane z 204 krajów szacuje się, że w latach 2025–2050 oporność bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe będzie bezpośrednią przyczyną 39 milionów zgonów². W tym kontekście zrozumienie odpowiedzi komórek bakteryjnych na stres, w tym ten wywołany antybiotykami, zmianami temperatury bądź dostępnością składników odżywczych, ma kluczowe znaczenie dla opracowania nowych terapii przeciwdrobnoustrojowych.

4.1. *Escherichia coli* jako organizm modelowy w badaniach odpowiedzi na stres

Warunki środowiskowe wywołujące stres w komórkach E. coli

Idealnym organizmem modelowym do badań odpowiedzi komórki na stres środowiskowy jest *Escherichia coli*, bakteria powszechnie występująca w środowiskach o zmiennych i często niekorzystnych warunkach. Prosty i dobrze scharakteryzowany genom, szybki wzrost, możliwość łatwej manipulacji genetycznej oraz szeroka gama dostępnych szczepów delecyjnych czynią ją wyjątkowo użytecznym narzędziem badawczym³. *E. coli* stanowi naturalny składnik mikroflory przewodu pokarmowego zdrowego człowieka, jednak niektóre szczepy mogą w określonych warunkach wykazywać właściwości patogenne i prowadzić do rozwoju zakażeń⁴. Bytowanie w organizmie człowieka sprawia, że pałeczki *E. coli* zmagają się ze zmianami dostępności składników odżywczych podczas przejść między bogatym w substancje pokarmowe środowiskiem jelita a ubogim środowiskiem zewnętrznym, obecnością antybiotyków, zmianami temperatury, pH oraz tlenu (Rycina 1)^{5,6}. Jako fakultatywny anaerob *E. coli* potrafi dostosować swój metabolizm

do warunków tlenowych i beztlenowych, wykorzystując tlen jako ostateczny akceptor elektronów, a w warunkach deficytu tlenu przechodząc na alternatywne ścieżki oddychania lub fermentację⁷. Komórki *E. coli* szczepu typu dzikiego, np. K12, dysponują pełnym zestawem genów niezbędnych do biosyntezy aminokwasów, co umożliwia im przetrwanie w środowisku pozbawionym egzogennych źródeł tych związków. Skuteczna adaptacja do tak zmiennych warunków wymaga jednak wyspecjalizowanych mechanizmów detekcji bodźców środowiskowych oraz szybkiego uruchamiania odpowiednich szlaków regulacyjnych.

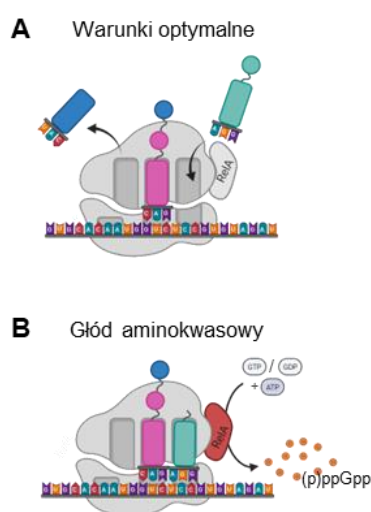


Rycina 1. Źródła stresu dla *E. coli* w układzie pokarmowym i środowisku. Schemat pokazuje wybrane stresory oddziałujące na bakterie *E. coli*: zmiany pH i natlenienia wzdłuż przewodu pokarmowego, strefę tlenowo-beztlenową blisko nabłonka jelita, ekspozycję na antybiotyki, wahania temperatury oraz przejście z bogatego w składniki odżywcze jelita do uboższego środowiska zewnętrznego.

Odpowiedź komórki na stres

W komórkach bakteryjnych, w odpowiedzi na stres aktywowany zostaje konserwowany mechanizm nazwany odpowiedzią ścisłą (ang. *stringent response*). Charakteryzuje się on gwałtowną akumulacją alarmonów, guanozyno-3',5'-bis(pirofosforanu) (ppGpp) i guanozyno-5'-trifosforano-3'-difosforanu (pppGpp), łącznie określanych mianem (p)ppGpp⁸. (p)ppGpp wiążą się bezpośrednio do dwóch podjednostek polimerazy RNA. Pierwsze miejsce wiązania to powierzchnia oddziaływania podjednostek ω i β' , a drugie to powierzchnia kontaktu podjednostki β' i czynnika transkrypcyjnego DksA^{9,10}. Efektem tego wiązania jest globalna zmiana ekspresji genów. Dochodzi do

obniżenia transkrypcji genów kodujących białka niezbędne do wzrostu i podziałów komórkowych, a także elementy aparatu translacyjnego, w tym rRNA i białka rybosomalne. Równocześnie przyłączenie (p)ppGpp do cząsteczki polimerazy RNA prowadzi do zwiększenia ekspresji genów uczestniczących w odpowiedzi na stres, transporcie składników odżywczych oraz syntezie aminokwasów^{11,12}. Mechanizm, w którym (p)ppGpp może zarówno aktywować, jak i hamować ekspresję genów, pozostaje nie do końca wyjaśniony. Wykazano, że (p)ppGpp odgrywa rolę w regulacji oporności bakterii na antybiotyki¹³, a jego znaczenie w patogenności niektórych gatunków bakterii sprawia, że trwają prace nad analogami tej cząsteczki jako potencjalnymi środkami o działaniu przeciwbakteryjnym¹⁴. Poziom (p)ppGpp w komórce regulowany jest przez enzymy należące do rodziny białek RSH (ang. *RelA/SpoT homologues*). W komórkach *E. coli* obecne są dwa takie białka: syntaza RelA, która odpowiada wyłącznie za syntezę (p)ppGpp, oraz enzym SpoT, zdolny zarówno do syntezy, jak i degradacji (p)ppGpp¹⁵. Enzym RelA aktywowany jest wyłącznie w odpowiedzi na niedobór aminokwasów¹⁶. W komórkach, cząsteczki tego białka związane są z rybosomami i reagują na zatrzymanie syntezy łańcucha polipeptydowego spowodowane wiązaniem nienaładowanego tRNA^{16,17} (Rycina 2). Z kolei enzym SpoT reaguje na szersze spektrum bodźców środowiskowych, takich jak niedobór fosforu¹⁸, węgla¹⁷, czy żelaza^{18,19}. Oba enzymy katalizują transfer grup fosforanowych z ATP na GMP, GDP lub GTP, prowadząc do powstania (p)ppGpp¹⁵.



Rycina 2. Schemat zależnej od RelA syntezy (p)ppGpp podczas głodu aminokwasowego. Schemat przedstawia aktywność rybosomu i białka RelA w warunkach optymalnych (A) i podczas głodu aminokwasowego (B). W warunkach optymalnych elongacja łańcucha polipeptydowego przebiega prawidłowo dzięki przyłączaniu aminoacylo-tRNA, a związane z rybosomem białko RelA pozostaje nieaktywne. Podczas głodu aminokwasowego w komórce wzrasta liczba deacylowanych tRNA, co prowadzi do wstrzymania elongacji, aktywacji białka RelA i uruchomienia odpowiedzi ścisłej. Białko RelA katalizuje transfer grup fosforanowych z ATP na GDP lub GTP, prowadząc do syntezy (p)ppGpp.

Innym istotnym elementem odpowiedzi na stres jest akumulacja polifosforanu (polyP)²⁰. PolyP to liniowy, wysoce ujemnie naładowany polimer zbudowany z nawet tysiąca reszt fosforanowych połączonych wysoko energetycznymi wiązaniami fosforanowymi. Obecność łańcuchów polyP została potwierdzona zarówno u prokariota, jak i eukariota, a ich funkcja, mimo że nie w pełni poznana, uznawana jest za ważną w regulacji homeostazy komórkowej^{21,22}. W komórkach *E. coli* za syntezę polifosforanu odpowiada wyłącznie kinaza polifosforanowa (PPK). Enzym ten katalizuje odwracalny transfer reszty γ -fosforanowej z cząsteczki ATP na łańcuch polyP^{23,24}. Mimo że PPK wykazuje aktywność hydrolityczną, głównym enzymem odpowiedzialnym za degradację polyP jest egzopolifosfataza (PPX), która usuwa terminalne reszty fosforanowe^{25,26}. W odróżnieniu od grzybów czy protistów, bakterie nie posiadają endopolifosfataz, przez co nie są zdolne do skracania długich cząsteczek polyP do krótszych fragmentów. W komórkach *E. coli* regulacja akumulacji polyP zachodzi prawdopodobnie przede wszystkim poprzez modulację aktywności białek PPK i PPX, a nie zmianę ich poziomu, na co wskazuje fakt, że poziom ekspresji genów *ppk* i *ppx*, zlokalizowanych w jednym operonie, nie ulega zmianie w odpowiedzi na stres^{27,28}. Wykazano, że (p)ppGpp poprzez bezpośrednie wiązanie hamują aktywność PPX, co przez długi czas uważano za kluczowy mechanizm sprzyjający akumulacji polyP w warunkach stresowych²⁹. Obecnie wiadomo, że ta hipoteza jest zbyt uproszczona. Wykazano, że w pożywce optymalnej komórki szczepu ΔppX nie akumulują polyP²⁷. Co więcej, wykazano że sama nadprodukcja (p)ppGpp w komórkach *E. coli* hodowanych w warunkach optymalnych jest niewystarczająca do spowodowania akumulacji polyP²⁷. Aktualne dane wskazują, że akumulacja polyP jest wynikiem złożonej regulacji angażującej wiele czynników, jednak dokładne mechanizmy tego procesu pozostają niejasne. W warunkach stresu polyP gromadzi się w cytoplazmie komórek bakteryjnych, tworząc granule cechujące się separacją faz ciekłych, LLPS (ang. *liquid-liquid phase separation*)^{30,31}. Struktury te są obecnie klasyfikowane jako organella bezbłonowe (MLO, ang. *membrane-less organelles*) i pełnią rolę przestrzennego rusztowania dla licznych białek regulatorowych^{32,33}. Wykazano, że do polyP wiążą się m.in. proteaza Lon^{34,35}, a także inne białka zaangażowane w odpowiedź na stres oraz regulację metabolizmu³⁶. Co istotne, ze względu na silnie ujemny ładunek, wiązanie polyP może wpływać na konformację i aktywność funkcjonalną białek, prowadząc zarówno do aktywacji, jak i zahamowania ich aktywności³⁷. Ciągłe trwają badania nad identyfikacją białek związanych z granulami polyP i ich znaczenia dla fizjologii komórki. Akumulacja polyP w komórkach bakteryjnych obserwowana jest podczas stresu osmotycznego, stresu oksydacyjnego, szoku termicznego,

a najsilniej w warunkach niedoboru składników odżywczych np. aminokwasów, kwasów tłuszczowych czy jonów żelaza³⁸. Co istotne, akumulację polyP można wywołać również farmakologicznie, np. przy użyciu hydroksyamatu seryny (SHX). Związek ten imituje stan głodu aminokwasowego poprzez hamowanie syntetazy serylo-tRNA, co prowadzi do zablokowania aktywności rybosomów i w efekcie do aktywacji odpowiedzi ścisłej za pośrednictwem białka RelA^{39,40} (Rycina 2).

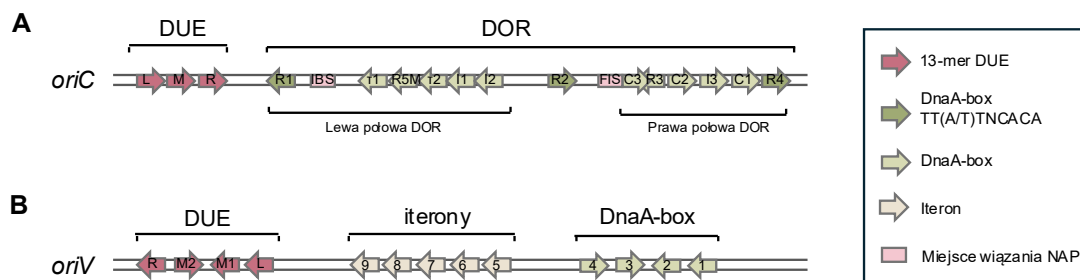
Podczas niesprzyjających warunków środowiska, w komórkach bakteryjnych dochodzi do akumulacji (p)ppGpp oraz polyP²⁹. Efektem akumulacji (p)ppGpp jest zmiana transkrypcji genów oraz aktywności białek regulacyjnych co przekłada się na metabolizm komórki. Działanie enzymów aktywowanych podczas odpowiedzi ścisłej, między innymi PPK, SpoT i RelA, wiąże się z intensywnym wykorzystaniem ATP, co skutkuje obniżeniem poziomu ATP w komórce nawet o 30–50%⁴¹. W przypadku polyP mechanizmy odpowiedzialne za jego funkcję regulacyjną nie są jeszcze w pełni poznane, choć wiadomo, że cząsteczka ta odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi na stres⁴². Choć odpowiedź ścisła może różnić się intensywnością i zakresem w zależności od rodzaju stresu, jej ostatecznym celem jest zahamowanie procesów anabolicznych, w tym syntezy rybosomów, replikacji DNA i podziałów komórkowych⁴³. Warto podkreślić, że regulacja inicjacji replikacji DNA jest kluczowa nie tylko w odpowiedzi na warunki stresowe. Proces ten wymaga dokładnej kontroli również w warunkach optymalnych, tak aby replikacja była precyzyjnie zsynchronizowana z cyklem komórkowym¹. Zrozumienie regulacji replikacji DNA podczas stresu wymaga zatem uwzględnienia mechanizmów, które funkcjonują w stanie homeostazy, jak i podczas zmiany warunków środowiskowych.

4.2. Kontrola inicjacji replikacji chromosomalnego DNA w warunkach optymalnych

Struktura origin replikacji chromosomalnego DNA u E. coli

Replikacja DNA jest fundamentalnym etapem cyklu komórkowego, który we wszystkich znanych systemach rozpoczyna się od związania inicjatora replikacji z określonym miejscem na DNA zwanym *origin* replikacji⁴⁴. Region inicjacji replikacji chromosomalnego DNA w komórkach *E. coli* (*oriC*), o długości 245 par zasad (pz), składa się z miejsca oligomeryzacji inicjatora replikacji DnaA (DOR, ang. *DnaA oligomerization region*), miejsca wiązania białka IHF (IBS, ang. *IHF binding sequence*) oraz regionu DUE (ang. *DNA unwinding element*)(Rycina 3A)^{45,46}. Region DOR zawiera zestaw sekwencji

DnaA-box, stanowiących miejsca wiązania białka DnaA, których liczba i rozmieszczenie mogą różnić się w zależności od gatunku bakterii⁴⁷. W przypadku *origin* chromosomu *E. coli* pierwotnie zidentyfikowanych zostało 5 sekwencji DnaA-box (R1-R5) o długości 9 nukleotydów⁴⁸. Obecnie w *oriC* zdefiniowano 12 sekwencji DnaA-box, które są wiązane przez DnaA z różnym powinowactwem⁴⁹. Spośród nich jedynie trzy (R1, R2 i R4) o sekwencji najwyższej zgodności TT(A/T)TNCACA wykazują bezpośrednie wiązanie z DnaA w warunkach *in vitro*, co potwierdzono metodą retardacji migracji DNA w żelu⁵⁰. Białko DnaA wiąże się do tych miejsc z wysokim powinowactwem, przy stałej dysocjacji (Kd) mieszczącej się w zakresie 4–20 nM⁵⁰. Obsadzenie pozostałych miejsc wiązania DnaA zachodzi dzięki kooperatywnemu oddziaływaniu między cząsteczkami DnaA związanymi z sąsiednimi sekwencjami DnaA-box o wyższym powinowactwie⁵¹. Oligomeryzacja cząsteczek białka DnaA wzdłuż dwuniciowego DNA (dsDNA) prowadzi do lokalnego rozplecenia dwuniciowej struktury w bogatym w pary A–T regionie DUE⁵². Region DUE tworzą trzy 13-nukleotydowe sekwencje ułożone tandemowo i wykazujące jednakową orientację (Rycina 3A), charakteryzujące się sekwencją najwyższej zgodności GATCTNTTNTTT⁵³. Oprócz regionów DUE i DOR, w obrębie *oriC* znajduje się także region IBS, zlokalizowany w lewej części DOR, pomiędzy DnaA-box R1 a R5M. Miejsce to stanowi miejsce wiązania białka IHF (Integration Host Factor) należącego do grupy białek histonopodobnych związanych z nukleoidem (NAP, ang. *nucleoid-associated protein*). W regionie *oriC* znajduje się jeszcze jedno miejsce wiązania białka należącego do grupy NAP – białka Fis (ang. *factor for inversion stimulation*). Miejsce to zlokalizowane jest w prawej połowie DOR, między sekwencjami DnaA-box R2 a C3 (Rycina 3A). Białka NAP występują obficie i po za uczestniczeniem w inicjacji replikacji DNA, odgrywają różnorodne role w regulacji ekspresji genów, rekombinacji^{54,55} i regulacji aktywności białek, w tym białka DnaA.



Rycina 3. Organizacja origin replikacji chromosomalnego i plazmidowego DNA. Schemat przedstawia regiony inicjacji replikacji chromosomu *E. coli*, *oriC* (A), oraz plazmidu RK2, *oriV* (B). Zaznaczono kluczowe dla inicjacji replikacji elementy, w tym sekwencje powtórzone regionu DUE (kolor ciemno-różowy), miejsca wiązania białka DnaA (DnaA-box) (kolor zielony), miejsca wiązania białek NAP (kolor jasno-różowy) oraz iterony (kolor beżowy). Ciemnozielonymi strzałkami oznaczono sekwencje DnaA-box o sekwencji najwyższej zgodności TT(A/T)TNCACA.

Białko DnaA – inicjator replikacji DNA w komórkach *E. coli*

W komórkach bakteryjnych białko inicjujące replikację chromosomalnego DNA to DnaA. Białko DnaA *E. coli*, składa się z czterech domen (I–IV)^{56,57}, z których trzy pełnią odrębne, lecz wzajemnie zależne funkcje. Domena I (reszty aminokwasowe 1–86) oraz domena III (135–374) biorą udział w oligomeryzacji DnaA w regionie DOR^{58,59} oraz rekrutacji helikazy, DnaB^{60,61}. Domena I oddziałuje również z innymi białkami uczestniczącymi w inicjacji replikacji⁶². Domena III, należąca do rodziny domen AAA⁺, wiąże ATP i ADP^{63–65}, wykazuje aktywność ATP-azową⁶⁶ oraz oddziałuje z błonami zawierającymi fosfolipidy o ujemnie naładowanych grupach^{64,65}. Domena IV (375–467) to domena wiążąca dsDNA (DBD, ang. *DNA binding domain*), odpowiadająca za specyficzne wiązanie DnaA do sekwencji DnaA-box⁶⁷. Oprócz tych dobrze ustrukturyzowanych regionów, DnaA zawiera również domenę II (reszty 87–134). Do tej pory uważano, że służy ona jako łącznik odpowiadający za przestrzenne ustawienie domen I i III oraz wspomagający optymalną rekrutację helikazy⁴⁶. Wykazano, że delecja tej domeny nie wpływa na częstotliwość inicjacji replikacji chromosomalnego DNA w komórkach *E. coli*⁶⁸. Jednak najnowsze prace donoszą, że domena ta może przyczyniać się do wiązania ATP i oddziaływania z błonami podczas replikacji⁶⁹.

Oprócz budowy, istotnym aspektem mającym wpływ na aktywność białka DnaA jest jego rozmieszczenie w komórce. Pierwsze doniesienia o wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka DnaA w warunkach optymalnych sugerowały, że białko to jest związane głównie z błonami komórkowymi⁷⁰. W późniejszych pracach, za pomocą techniki frakcjonowania komórkowego, wykazano że zaledwie około 10% cząsteczek białka DnaA lokalizuje się

w błonach komórkowych⁷¹. Obecnie wiadomo, że w warunkach optymalnego wzrostu, białko DnaA jest rozmieszczone w obrębie nukleoidu, a jego dokładna lokalizacja zależy od etapu cyklu komórkowego⁶⁸. Wykazano, że białko DnaA, w fazie poprzedzającej inicjację replikacji DNA, tworzy wyraźne skupiska kolokalizujące z regionem *oriC*, zlokalizowane głównie w pozycjach $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$ wzdłuż długiej osi komórki⁶⁸. W genomie *E. coli* zidentyfikowano 308 sekwencji DnaA-box zgodnych z sekwencją najwyższej zgodności TT(A/T)TNCACA, z czego jedynie trzy znajdują się w regionie *oriC*⁷². Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka DnaA w obrębie całego nukleoidu potwierdza, że białko to może wiązać się z wieloma miejscami na chromosomie oraz że jego funkcja nie ogranicza się wyłącznie do inicjacji replikacji w *oriC*. Oprócz podstawowej funkcji białka DnaA jako inicjatora replikacji, pełni ono rolę czynnika transkrypcyjnego⁷³. DnaA może pełnić funkcję represora, aktywatora lub terminatora transkrypcji⁷³. Początkowo, wykorzystując techniki *in vitro* m. in. footprinting, analizy aktywności promotorów i testy EMSA udowodniono, że DnaA pozytywnie reguluje ekspresję genów takich jak *nrdA*, *glpD*, *polA* czy *fliC*⁷³⁻⁷⁶ oraz hamuje ekspresję *mioC*, *uvrB*, *aldA*, *guaB*, *proS*, *rpoH* i *iraD*⁷⁷⁻⁸². Mechanizm regulacji ekspresji genów przez DnaA, w szczególności jego rola jako aktywatora, pozostaje słabo poznany. Wiadomo jednak, że białko DnaA może promować terminację transkrypcji, działając jako fizyczna bariera dla polimerazy RNA po związaniu z DNA⁸³⁻⁸⁵. DnaA wiąże się także do promotora własnego genu, regulując jego ekspresję na zasadzie autorepresji. Uważa się, że mechanizm ten pozwala na utrzymanie stabilnego poziomu białka DnaA w komórce i zabezpiecza przed nadmierną inicjacją replikacji⁸⁶⁻⁸⁸. Sugeruje się, że powinowactwo DnaA do sekwencji regulatorowych DNA zmienia się w zależności od etapu cyklu komórkowego, co może być związane ze stężeniem formy DnaA-ATP oraz jego dynamicznym wiązaniem z *oriC*⁸⁹. Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej umożliwiających analizę oddziaływań białek z DNA, takich jak ChIP-Chip czy ChIP-seq, coraz większe wysiłki badawcze koncentrują się na szczegółowym poznaniu miejsc wiązania białka DnaA na chromosomie bakteryjnym. Przykładem są badania prowadzone na *Bacillus subtilis*, w których zastosowanie metody *in vitro* IDAP-Seq (ang. *in vitro DNA affinity purification and deep sequencing*) pozwoliło na identyfikację 269 miejsc wiązania DnaA w chromosomie *B. subtilis*^{90,91}. Spośród 269 miejsc zaobserwowano, że jedynie osiem najsilniej wiązanych regionów DNA pokrywa się z miejscami DNA wiązanymi przez DnaA w warunkach *in vivo*, co sugeruje, że inne czynniki komórkowe lub liczba dostępnych cząsteczek DnaA *in vivo* ograniczają wiązanie DnaA do pozostałych miejsc⁹⁰⁻⁹². Analiza ChIP-seq z 2024 roku dostarczyła długo

oczekiwane dane dla *E. coli*, które potwierdziły wcześniejsze obserwacje uzyskane dla *B. subtilis*, wskazujące, że białko DnaA w warunkach optymalnych wiąże się nie tylko z *oriC*, lecz także w licznych innych miejscach chromosomu, w tym w regionach promotorowych genów związanych z replikacją, metabolizmem RNA, naprawą DNA i biosyntezą nukleotydów. Wykazano również, że białko DnaA preferencyjnie wiąże się do par sekwencji DnaA-box oddzielonych 2–3 nukleotydami, a zarówno mutacja jednej z sekwencji, jak i zmiana odstępów między nimi zaburza to wiązanie⁹³. Co ciekawe w komórkach *E. coli* w stanie homeostazy liczba cząsteczek DnaA utrzymuje się na względnie stałym poziomie i wynosi od około 800 do 2100 cząsteczek na komórkę⁹⁴. Wykazano, że stężenie białka DnaA w komórkach *E. coli* hodowanych w różnych pożywkach, zapewniających zróżnicowane tempo wzrostu, również pozostaje względnie stałe i jest niezależne od szybkości wzrostu komórek⁹⁵. Aby zainicjować rundę replikacji, około 20 cząsteczek białka DnaA musi wiązać się do sekwencji DnaA-box znajdujących się w regionie *oriC*^{96,97}.

Inicjacja replikacji chromosomalnego DNA u E. coli

Przed rozpoczęciem inicjacji replikacji DNA, sekwencje DnaA-box zlokalizowane w *origin* replikacji wykazujące wysokie powinowactwo do DnaA (R1, R2 i R4) są związane przez cząsteczki DnaA-ATP lub DnaA-ADP, natomiast pozostałe sekwencje DnaA-box znajdujące się w *oriC* pozostają wolne⁹⁸. W tym samym czasie z *oriC* związane jest białko Fis, którego obecność powoduje wygięcie DNA o ponad 50°⁹⁹ oraz uniemożliwia wiązanie DnaA do sekwencji DnaA-box o niższym powinowactwie^{100,101}. Zakłada się, że dopiero utworzenie filamentu cząsteczek DnaA-ATP w prawej części *oriC* prowadzi do dysocjacji cząsteczki białka Fis i umożliwia wiązanie białka IHF do sekwencji IBS^{102,103} (Rycina 3A). Związanie białka IHF powoduje wygięcie DNA nawet o 180°¹⁰⁴, co sprzyja powstaniu drugiego filamentu DnaA-ATP na sekwencjach DnaA-box w lewej części *oriC*. W rezultacie dochodzi do napięcia w strukturze DNA, prowadzącego do lokalnego rozplecenia podwójnej helisy w regionie DUE¹⁰⁵. Po rozpleceniu nici DNA, powstający jednoniciowy DNA (ssDNA) bogaty w tyminę wiązany jest przez cząsteczki DnaA związane w regionie DOR, co stanowi kluczowy etap inicjacji replikacji¹⁰⁶. Badania *in vitro* wykazały, że wiązanie białka IHF do *oriC* stymuluje rozplecenie regionu DUE. Funkcję tę może również pełnić inne białko należące do grupy NAP – HU¹⁰⁷. Obecność IHF lub HU sprzyja wiązaniu DnaA do sekwencji DnaA-box o niskim powinowactwie, jak również do jednoniciowego DNA

DUE^{108,109}. W kolejnym kroku do kompleksu DnaA – DNA rekrutowana jest helikaza DnaB, dostarczana na ssDNA w postaci kompleksu z białkiem pomocniczym DnaC⁶¹. Po związaniu DnaB z ssDNA i uwolnieniu DnaC, helikaza rozpoczyna rozwijanie podwójnej helisy w kierunku widełek replikacyjnych. Równocześnie rekrutowane są kolejne składniki replisomu, w tym prymaza (DnaG) syntetyzująca startery RNA oraz kompleks polimerazy DNA III, odpowiedzialny za elongację nowych nici. Pełna inicjacja replikacji umożliwia dwukierunkową syntezę DNA^{110,111}. Proces inicjacji replikacji wymaga precyzyjnej regulacji, aby zapewnić prawidłową liczbę rund replikacji w cyklu komórkowym oraz ich koordynację ze wzrostem i podziałami komórki¹¹².

Regulacja aktywności białka DnaA i kontrola replikacji chromosomalnego DNA w warunkach optymalnych

Już 57 lat temu Donachie zauważył, że zależność rozmiaru komórki od rodzaju pożywki może być wyjaśniona przy założeniu, że: 1) inicjacja replikacji zachodzi przy stałym stosunku masy komórki do liczby miejsc *oriC* w różnych warunkach wzrostu, oraz 2) podział komórki następuje po stałym, niezależnym od pożywki czasie od momentu inicjacji¹¹³. Kwestia stałego stosunku wielkości komórki do liczby miejsc *origin* pozostaje nadal obszarem badań naukowych, a najnowsze prace dostarczają zarówno argumentów potwierdzających tę hipotezę^{114,115}, jak i ją podważających¹¹⁶. W przeciwieństwie do komórek eukariotycznych, w których kluczowe procesy cyklu komórkowego są często regulowane poprzez oscylacje stężeń czynników regulatorowych^{117,118}, w komórkach bakteryjnych regulacja inicjacji replikacji w warunkach optymalnych nie opiera się na zmiennym poziomie białka DnaA¹¹⁹. Zamiast tego, bakterie wykorzystują szereg innych mechanizmów kontrolnych, które zapewniają precyzyjne rozpoczęcie replikacji zgodnie z tempem podziałów i chronią przed jej nadmierną inicjacją. Ścisła kontrola częstotliwości inicjacji replikacji jest niezbędna, ponieważ jej zaburzenia mogą prowadzić do destabilizacji widełek replikacyjnych oraz ograniczać zdolność komórki do skutecznej naprawy uszkodzeń DNA¹²⁰. Jednym z bardziej oczywistych mechanizmów kontroli procesu replikacji DNA jest regulacja aktywności inicjatora replikacji, białka DnaA.

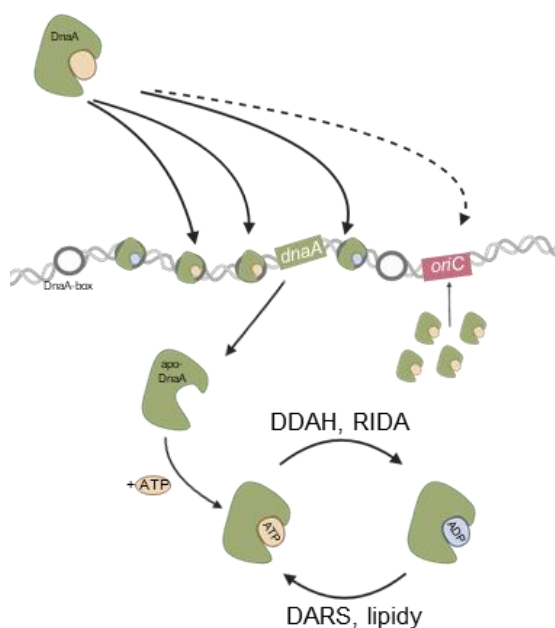
Białko DnaA występuje w komórkach w trzech formach, związanej z ATP, związanej z ADP oraz apoenzymu (Rycina 4). Zarówno DnaA-ATP, jak i DnaA-ADP mogą wiązać się z sekwencjami DnaA-box o wysokim powinowactwie¹²¹, jednak tylko cząsteczki DnaA-ATP oddziałują z sekwencjami DnaA-box o niższym powinowactwie^{106,122}. Dzięki temu to właśnie cząsteczki DnaA-ATP mogą tworzyć filament w obrębie *oriC* i inicjować

formowanie kompleksu inicjacyjnego^{121,123}. Co więcej, kooperatywne wiązanie aktywnej formy DnaA-ATP do *oriC* wspomagane jest przez białko DiaA (ang. *DnaA initiator-associating protein*), które ułatwia tworzenie filamentu DnaA i wspiera terminową inicjację replikacji¹²⁴. Obecność DiaA stymuluje zmiany topologii DNA, prowadząc do lokalnego rozplecenia regionu DUE⁶². W warunkach optymalnych, cykliczne wahania poziomu DnaA-ATP, osiągające maksimum tuż przed inicjacją, zapewniają inicjację replikacji we właściwym momencie cyklu komórkowego, jednocześnie zapobiegając jej przedwczesnej reinicjacji¹²⁵. Po inicjacji replikacji aktywność białka DnaA jest regulowana przez systemy kontrolujące jego status nukleotydowy. W komórkach *E. coli* funkcjonują co najmniej trzy takie systemy^{125–127} (Rycina 4). Jednym z kluczowych mechanizmów dezaktywacji białka DnaA jest system RIDA (ang. *regulatory inactivation of DnaA*), w którym aktywna forma DnaA-ATP ulega hydrolizie do postaci DnaA-ADP. Mechanizm ten opiera się na współdziałaniu białka Hda z podjednostkami β polimerazy DNA III, które po rozpoczęciu replikacji pozostają związane z nowo powstałym DNA. Kompleks Hda- β kłamra oddziałuje z DnaA, indukując zmiany konformacyjne w jego strukturze, co stymuluje aktywność ATPazową DnaA i umożliwia hydrolizę związanej cząsteczki ATP^{128–131}. Drugim mechanizmem jest DDAH (ang. *datA-dependent DnaA-ATP hydrolysis*), zależny od niekodującego regionu *datA* w chromosomie *E. coli*, zawierającego klastery sekwencji DnaA-box oraz miejsce wiązania białka IHF. Kompleks *datA*-IHF, formujący się tuż po inicjacji replikacji, stymuluje oligomeryzację cząsteczek DnaA-ATP w *datA* i promuje hydrolizę ATP niezależnie od systemu RIDA¹³². Trzecim mechanizmem regulacji aktywności białka DnaA jest reaktywacja, czyli przywrócenie możliwości wiązania cząsteczki ATP. W komórkach *E. coli* forma DnaA-ATP może powstać poprzez syntezę *de novo* cząsteczek białka, jak również poprzez uwolnienie nukleotydu z cząsteczek DnaA-ADP¹³³. Jednym ze sposobów reaktywacji cząsteczek białka DnaA jest oddziaływanie DnaA-ADP z fosfolipidami błony komórkowej, takimi jak kardiolipina czy fosfatydyloglicerol, które wspomagają dysocjację ADP i umożliwiają ponowne związanie ATP. Choć dokładny mechanizm i znaczenie *in vivo* tego procesu pozostają nie w pełni poznane, wiadomo, że mutanty z obniżonym poziomem kwasowych fosfolipidów wykazują obniżony poziom inicjacji replikacji i spowolniony wzrost¹³⁴. Oprócz oddziaływań z fosfolipidami błonowymi, reaktywacja DnaA-ADP może zachodzić z udziałem specyficznych regionów chromosomu, określanych jako DARS1 i DARS2 (ang. *DnaA-reactivating sequences*). Sekwencje te wspomagają dysocjację ADP z cząsteczki DnaA, umożliwiając ponowne związanie ATP i przywrócenie jej aktywności

replikacyjnej^{135,136}. W warunkach *in vitro* reaktywacja DnaA-ADP przy udziale DARS1 zachodzi niezależnie od dodatkowych czynników, natomiast skuteczne usunięcie ADP z DnaA z udziałem DARS2 wymaga obecności białek IHF i Fis, które specyficznie wiążą się z DNA i indukują jego wygięcie. Oba regiony DARS zawierają klaster trzech sekwencji DnaA-box, z których dwie są ułożone w przeciwnych orientacjach. Choć mechanizm działania nie został jeszcze w pełni wyjaśniony, przypuszcza się, że taka konfiguracja sprzyja oddysocjowaniu ADP z cząsteczki DnaA. Delecja DARS2 silniej obniża wewnątrzkomórkowy poziom DnaA-ATP niż usunięcie DARS1, co sugeruje, że DARS1 odpowiada głównie za utrzymanie podstawowego poziomu aktywnego białka, podczas gdy DARS2 pełni kluczową rolę w podwyższaniu poziomu DnaA-ATP i tym samym określaniu momentu inicjacji replikacji^{135,136}. Dotychczasowe modele regulacji inicjacji replikacji w warunkach optymalnych zakładały kluczową rolę regulatorów statusu nukleotydowego białka DnaA, jednak najnowsze badania zweryfikowały to założenie pokazując, że mechanizmy regulujące konwersję DnaA-ATP/ADP, takie jak RIDA, DDAH czy DARS, okazują się zbędne w warunkach wolnego wzrostu. Ich rola staje się jednak kluczowa przy szybkim tempie podziałów komórek, kiedy zapewniają stabilność inicjacji replikacji¹³⁷. Co więcej, analiza pojedynczych komórek *E. coli* pokazała, że osiągnięcie wysokiego poziomu DnaA-ATP, choć niezbędne, nie stanowi samo w sobie wystarczającego sygnału do rozpoczęcia replikacji DNA, co wskazuje na udział dodatkowych czynników kontrolnych¹³⁸. Co raz większą rolę w kontroli inicjacji replikacji przypisuje się tzw. modelowi miareczkowania inicjatora (ang. *titration model*) zaproponowanego w 1991 przez Hansena i współpracowników^{139,140}. Zakłada on, że precyzyjny moment rozpoczęcia replikacji zależy od stosunku liczby cząsteczek białka DnaA do liczby dostępnych miejsc wiązania na chromosomie¹³⁹. Kluczowym elementem tego mechanizmu jest region *datA*, zawierający klaster sekwencji DnaA-box, który po replikacji wiąże nadmiarowe cząsteczki DnaA i tymczasowo obniża stężenie wolnego białka poniżej progu wymaganego do reinicjacji replikacji. Pomimo obecności 308 kanonicznych miejsc wiązania DnaA w genomie *E. coli*, to właśnie region *datA* wykazuje istotne funkcje w miareczkowaniu inicjatora, co potwierdzają dane analizy z wykorzystaniem szczepów delecyjnych¹⁴¹. W 2023 roku klasyczny model miareczkowania inicjatora został uaktualniony¹⁴² (Rycina 4). Nowa koncepcja uwzględnia wiedzę zdobytą w ostatnich dekadach na temat regulacji białka DnaA, w szczególności istnienie jego dwóch form, aktywnej DnaA-ATP i nieaktywnej DnaA-ADP, różniących się powinowactwem do DNA. Nowa wersja modelu zakłada, że większość cząsteczek DnaA, wiąże się najpierw z sekwencjami DnaA-box o wysokim

powinowactwie, wykazującymi sekwencję najwyższej zgodności TT(A/T)TNCACA. Przypomnę, że w genomie *E. coli* zidentyfikowano łącznie 308 takich miejsc, z których jedynie 3 spośród 12 sekwencji DnaA-box obecnych w obrębie *oriC* spełniają ten warunek. Dalej model zakłada, że dopiero po „wysyceniu” silnych miejsc wiązania, aktywna forma DnaA-ATP może zająć miejsca o niższym powinowactwie, w tym te znajdujące się w obrębie *oriC*. Tylko przy odpowiednio wysokim poziomie DnaA-ATP możliwe jest utworzenie filamentu DnaA i zapoczątkowanie inicjacji replikacji¹⁴². Model ten lepiej odzwierciedla złożoną dynamikę regulacji inicjatora i dostarcza nowego spojrzenia na kontrolę replikacji w cyklu komórkowym bakterii, choć wciąż nie uwzględnia wszystkich aspektów, takich jak na przykład kooperatywność wiązania cząsteczek DnaA do *oriC*.

Kolejnym czynnikiem ograniczającym aktywność białka DnaA po inicjacji replikacji jest tymczasowe zahamowanie transkrypcji genu *dnaA*. Pomimo że stężenie białka DnaA w komórce utrzymuje się na względnie stałym poziomie^{94,95}, wykazano że poziom transkryptu *dnaA* podlega cyklicznym wahaniom w trakcie cyklu komórkowego¹⁴³. Po za autoregulacją genu *dnaA*, mechanizmem odpowiedzialnym za ograniczenie ekspresji genu białka DnaA jest tymczasowe wyciszenie jego promotora¹⁴⁴. Proces ten zależy od białka SeqA oraz obecności hemimetylowanych sekwencji GATC w regionie promotora. Proces ten ma udział bezpośrednio po inicjacji replikacji, dzięki czemu komórka uzyskuje dodatkową kontrolę nad zbyt wczesną reinicjacją replikacji DNA¹⁴⁴. Jednakże, najnowsze analizy poziomu syntezy białka DnaA w pojedynczych komórkach szczepów delecyjnych ujawniły, że autorepresja promotora *dnaA* oraz jego sekwestracja mają jedynie marginalny wpływ na działanie DnaA w trakcie cyklu komórkowego¹³⁷.



Rycina 4. Regulacja inicjacji replikacji chromosomalnego DNA *E. coli* w warunkach optymalnych. Schemat przedstawia uaktualniony model miareczkowania inicjatora, który zakłada, że cząsteczki DnaA-ATP są miareczkowane przez liczne miejsca wiązania o wysokim powinowactwie rozmieszczone na chromosomie. Dopiero po ich wysyceniu, cząsteczki DnaA-ATP zajmują sekwencje DnaA-box o niższym powinowactwie, w tym *oriC*. Równocześnie w warunkach optymalnych syntetyzowane są nowe cząsteczki apoenzymu DnaA, które, ze względu na przewagę ATP nad ADP w cytoplazmie, wiążą ATP. Stosunek formy DnaA-ATP do DnaA-ADP regulowany jest przez mechanizmy takie jak DDAH, RIDA, DARS oraz wymiana nukleotydu wspomaganą przez lipidy błonowe.

Regulacja inicjacji replikacji nie ogranicza się wyłącznie do modulacji aktywności białka DnaA. Istotną rolę w kontroli tego procesu odgrywają również właściwości samego DNA, które wpływają na dostępność *origin* replikacji. Jednym z mechanizmów regulujących dostępność regionu *oriC* w trakcie cyklu komórkowego jest metylacja i sekwestracja DNA przez metylotransferazę Dam (ang. *DNA adenine methyltransferase*) oraz białko SeqA¹⁴⁵. Enzym Dam odpowiada za metylację adeniny w DNA w obrębie sekwencji palindromowych GATC, które licznie występują m. in. w regionie *oriC*. W fazie poprzedzającej inicjację replikacji, obie nici DNA są metylowane w sekwencjach GATC. W trakcie replikacji nowo zsintetyzowana nić pozostaje przez krótki czas niemetylowana, tworząc wraz z nicią matrycową hemimetylowaną dwuniciową cząsteczkę DNA¹⁴⁶. Białko SeqA specyficznie rozpoznaje i wiąże hemimetylowany DNA, co prowadzi do czasowej sekwestracji regionu *oriC*, zapobiegając wiązaniu cząsteczek DnaA¹⁴⁷. Sekwestracja *oriC* przez cząsteczki białka SeqA trwa przez określony czas po inicjacji replikacji, aż do momentu ponownej metylacji nici potomnej przez metylotransferazę Dam, co przywraca pełną metylację i umożliwia kolejną rundę replikacji. Mechanizm ten stanowi element zabezpieczający przed przedwczesną inicjacją replikacji¹⁴⁷.

W warunkach optymalnych białka NAP, takie jak Fis czy IHF, odgrywają ważną rolę w kontroli inicjacji replikacji DNA poprzez dynamiczne, sekwencyjne oddziaływanie z *oriC*. Białko Fis wiąże się nie tylko w regionie *oriC*, ale także do DNA o sekwencjach

o wysokim stopniu degeneracji, przy czym równie istotnym czynnikiem jest lokalna topologia DNA. Zestawienie sekwencji DNA znanych miejsc wiązania białka Fis na chromosomie pozwoliło zidentyfikować 15-nukleotydowy motyw, w którym obecność kilku kluczowych zasad (GxxxRxxxxxYxxC, gdzie Y oznacza dowolną pirymidynę, a R purynę) jest niezbędna do efektywnego wiązania białka^{148,149}. Charakterystyczną cechą białek NAP jest zdolność do znacznego wyginania cząsteczki DNA, co wpływa na stopień jej superskręcenia i stanowi kolejny mechanizm regulacji dostępności *oriC*^{1,150}. Co więcej, białko Fis wpływa również na aktywność regionu DARS2. Wykazano, że białko Fis wiąże się z DARS2 głównie w fazie poprzedzającej inicjację replikacji, co umożliwia reaktywację cząsteczek DnaA¹⁵¹.

4.3. Inicjacja replikacji plazmidu RK2 w komórkach *E. coli*

Bakterie często posiadają plazmidy, czyli dodatkowe pozachromosomalne elementy genetyczne, których utrzymanie wymaga wyspecjalizowanych systemów replikacyjnych. Uważa się, że plazmidy funkcjonują jako autonomiczne cząsteczki, których replikacja zwykle przebiega niezależnie od cyklu komórkowego gospodarza¹⁵². Jedną z lepiej poznanych klas pozachromosomalnych elementów genetycznych są plazmidy iteronowe, których miejsce inicjacji replikacji zawiera krótkie, powtarzalne sekwencje DNA stanowiące miejsca wiązania białek inicjatorowych (Rep). Do tej klasy należy plazmid RK2 z grupy niezgodności IncP-1, replikujący się mechanizmem theta i stabilnie utrzymujący się w większości komórek bakterii Gram-ujemnych^{153,154}. Ze względu na szeroki zakres gospodarza oraz obecność trzech genów oporności na antybiotyki (tetracyklinę, kanamycynę i ampicylinę) RK2 stanowi potencjalne zagrożenie epidemiologiczne¹⁵⁵. W komórkach *E. coli* występuje zwykle w liczbie od 4 do 8 kopii na jedną cząsteczkę chromosomalnego DNA¹⁵⁶, lokalizując się głównie w środkowej części komórki oraz w pozycjach odpowiadających 1/4 i 3/4 jej długości¹⁵⁷. Plazmid RK2 o długości około 60 kbp od lat stanowi modelowy układ do badań nad mechanizmami replikacji plazmidów. Kluczową rolę w replikacji plazmidu RK2 odgrywają *origin* replikacji i kodowane na plazmidzie białko Rep, TrfA¹⁵⁸.

Struktura origin replikacji plazmidu RK2

Choć replikacja plazmidów iteronowych i chromosomalnego DNA bakterii opiera się na podobnych etapach, organizacja miejsc *origin* replikacji nieco się różni (Rycina 3). Region *origin* replikacji plazmidu RK2 (*oriV*), o długości 393 pz, obejmuje dwa elementy niezbędne do inicjacji replikacji: region DUE oraz zestaw sekwencji iteronowych. W komórkach *E. coli* istotne znaczenie mają także sekwencje DnaA-box obecne w obrębie *oriV*¹⁵⁹. W przeciwieństwie do *oriC*, gdzie sekwencje DnaA-box zlokalizowane są bezpośrednio przy regionie DUE, w *oriV* plazmidu RK2 region DUE jest oddzielony od sekwencji DnaA-box o około 180 par zasad, a przestrzeń tę zajmują sekwencje iteronowe (Rycina 3B). Ich liczba oraz długość różni się w zależności od plazmidu¹⁵⁴. W *oriV* plazmidu RK2 obecnych jest pięć klasycznych 17-nukleotydowych iteronów (iterony 5-9), do których cząsteczki białka TrfA wiążą się w sposób kooperatywny¹⁵⁹. Wykazano, że cząsteczki białka TrfA preferencyjnie wiążą się z fragmentami DNA zawierającymi co najmniej dwa z pięciu miejsc wiązania, podczas gdy kompleksy utworzone z pojedynczym iteronem są wysoce niestabilne^{158,160}. W regionie *oriV* zidentyfikowano także nieistotne w kontekście samej inicjacji replikacji miejsca wiązania TrfA, nazwane iteronami 1–4 oraz 10, które pełnią funkcje regulacyjne, m.in. uczestnicząc w procesie „handcuffing” zależnym od dimerów TrfA¹⁶¹.

Sekwencje DnaA-box stanowiące plazmidowy region wiązania białka DnaA, wykazują podobieństwo do sekwencji najwyższej zgodności sekwencji DnaA-box w *oriC*. Mogą być one rozpoznawane przez białka DnaA pochodzące od wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych, co odzwierciedla wyjątkowo szeroki zakres gospodarza plazmidów iteronowych¹⁵³. Liczba oraz orientacja sekwencji DnaA-box różni się w zależności od plazmidu⁴⁷. W przypadku plazmidu RK2 są to cztery 9-nukleotydowe sekwencje DnaA-box ułożone w odwrócone pary, zlokalizowane bezpośrednio przed iteronami (Rycina 3B). Ich układ ma kluczowe znaczenie dla inicjacji, ponieważ odwrócenie chociaż jednej sekwencji powoduje całkowite zahamowanie replikacji, mimo że pozostałe trzy miejsca wiązania białka DnaA pozostają funkcjonalne¹⁶². W odróżnieniu od regionu *oriC*, gdzie występuje zdefiniowana sekwencja IBS, w *oriV* plazmidu RK2 opisano jedynie przypuszczalne miejsce wiązania białka IHF¹⁶³. Znajduje się ono przed pierwszą sekwencją DnaA-box. W komórkach *E. coli* delecja sekwencji IBS nie wpływa ani na wydajność replikacji, ani na liczbę kopii plazmidu w komórce, co sugeruje, że jej rola w inicjacji replikacji RK2 może być ograniczona lub pełniona jedynie w określonych warunkach¹⁶³.

W regionie DUE plazmidu RK2 zidentyfikowano cztery powtarzające się sekwencje o długości 13 nukleotydów (L, M1, M2, R), bogate w pary A-T¹⁵³. W przeciwieństwie do *oriC* chromosomu *E. coli*, powtórzenia te nie są ułożone tandemowo. Trzy z nich (L, M1, R) mają jednakową orientację podczas gdy sekwencja M2 jest zorientowana przeciwnie, co ma kluczowe znaczenie dla skutecznego rozplecenia dwuniciowej struktury DNA^{164,165}. Wszystkie cztery powtórzenia są niezbędne do utworzenia stabilnego kompleksu ssDNA-TrfA w trakcie inicjacji, a delecja choćby jednego z nich zaburza replikację plazmidu¹⁶⁶. Mutacje punktowe w obrębie tych sekwencji uniemożliwiają rozwinięcie DUE, co bezpośrednio blokuje proces replikacji^{167,168}.

Struktura białka TrfA

Plazmidowym inicjatorem replikacji niezbędnym do funkcjonowania plazmidu RK2 jest białko TrfA. W odróżnieniu od białka DnaA, białko TrfA jest kodowane na plazmidzie i wykazuje wysoką specyficzność wobec iteronów znajdujących się w *oriV*. Po związaniu iteronów białko TrfA tworzy stabilny nukleo-proteinowy kompleks, stymuluje rozwinięcie dsDNA w DUE, umożliwiając załadowanie elementów maszyny replikacyjnej^{47,169}. W komórkach bakteryjnych, białko TrfA występuje w dwóch izoformach, pełnej TrfA-44 o masie molekularnej 44 kDa oraz krótszej TrfA-33 o masie 33 kDa. TrfA-33 powstaje dzięki obecności alternatywnego miejsca translacji wewnątrz genu *trfA* i jest krótsze od pełnej wersji białka o 98 reszt aminokwasowych^{170–172}. Dłuższa izoforma, TrfA-44, posiada dodatkową domenę na N-końcu białka, która nie jest wymagana do inicjacji replikacji w komórkach *E. coli*, lecz odgrywa istotną rolę w replikacji plazmidu RK2 w innych gatunkach gospodarzy^{173,174}. Analizy strukturalne wykazały, że C-terminalna część białka TrfA (reszty aminokwasowe 190–382) zawiera dwie domeny typu WH (ang. *winged helix*), typowe dla białek wiążących DNA¹⁷⁵. Region poprzedzający domeny WH (reszty aminokwasowe 90–190) stanowi domena DBD, która jest niezbędna do utworzenia funkcjonalnego kompleksu z DNA¹⁷⁶. Należy podkreślić, że białka inicjatorowe plazmidów występują w komórkach głównie w postaci dimerów¹⁷⁷. Zarówno monomery jak i dimery TrfA mogą wiązać się do iteronów, jednak jedynie monomeryczna forma białka jest zdolna inicjować replikację plazmidu RK2¹⁷⁸. Proces monomeryzacji TrfA stanowi kluczowy etap regulacji replikacji RK2 i zostanie omówiony w dalszej części pracy.

Inicjacja replikacji plazmidu RK2 w komórkach E. coli

Inicjacja replikacji plazmidu RK2 w komórkach *E. coli* rozpoczyna się od utworzenia kompleksu nukleo-proteinowego w obrębie *oriV*, w którym białko TrfA, we współpracy z białkiem DnaA gospodarza, stymuluje rozwinięcie dsDNA w regionie DUE¹⁵⁴. Pełne obsadzenie wszystkich pięciu klasycznych iteronów (iterony 5–9) przez monomery białka TrfA jest warunkiem niezbędnym do uruchomienia tego procesu^{160,175}. W przypadku inicjacji replikacji plazmidu RK2 w komórkach *E. coli* niezbędne jest również białko DnaA, kodowane na chromosomie gospodarza, które wiąże się z sekwencjami DnaA-box w obrębie *oriV*. Obecność tego białka stabilizuje otwarty kompleks formowany przez cząsteczki białka TrfA w regionie DUE¹⁶⁴. Podobnie jak w przypadku *oriC*, wiązanie białka DnaA do sekwencji DnaA-box w obrębie *oriV* może być stymulowane przez białka NAP, takie jak IHF i HU¹⁶³. Co ciekawe, w przypadku plazmidu RK2 destabilizacja regionu DUE zachodzi już nawet tylko w obecności TrfA i HU, natomiast obecność DnaA dodatkowo stymuluje ten proces¹⁶⁴. Ponadto, w przeciwieństwie do inicjacji replikacji chromosomalnego DNA, rozwinięcie dwuniciowej struktury DNA w regionie DUE RK2 nie wymaga ATP ani formy DnaA-ATP¹⁶⁴. W następstwie rozwinięcia regionu DUE, cząsteczki TrfA przyłączone do iteronów wiążą w sposób specyficzny ssDNA bogaty w adeniny powstający w wyniku rozplecenia DUE¹⁶⁶. Mechanizm ten opisany jest jako „loop-back model”, w którym cząsteczki białka inicjatorowego w tym samym czasie oddziałują z dsDNA i ssDNA zapętlaając w ten sposób DNA¹⁷⁹. Kolejnym etapem inicjacji replikacji plazmidowego DNA jest rekrutacja helikazy DnaB na jednoniciowy DNA w regionie DUE¹⁸⁰. Podobnie jak w przypadku inicjacji replikacji chromosomalnego DNA, proces ten zachodzi przy udziale kompleksu DnaB-DnaC. Wykazano, że poprzez oddziaływanie białka DnaA z kompleksem DnaBC, helikaza jest najpierw lokalizowana w regionie sekwencji DnaA-box, a następnie poprzez oddziaływanie DnaA-DnaB i TrfA-DnaB jest translokowana na ssDNA regionu DUE^{167,181}. Następnie dołączana jest prymaza, która syntetyzuje startery RNA stanowiące punkt startowy dla syntezy nowych nici prowadzonych przez polimerazę DNA III. W tym etapie istotną rolę odgrywa również białko TrfA, które wiąże się bezpośrednio z podjednostkami α i β polimerazy DNA III, wspierając rekrutację i stabilizację replisomu na matrycy plazmidowego DNA¹⁸². Zarówno polimeraza, jak i pozostała maszyny replikacyjna niezbędna do replikacji plazmidu RK2 kodowana jest na chromosomie gospodarza, z wyjątkiem białka TrfA, które jest kodowane na plazmidzie.

Kontrola inicjacji replikacji plazmidu RK2 w komórkach E. coli w warunkach optymalnych

Utrzymanie odpowiedniej liczby kopii plazmidu RK2 w komórkach jest kluczowe zarówno dla zapewnienia jego stabilnej dziedziczności, jak i dla zapobiegania nadmiernej inicjacji replikacji, która mogłaby obciążać metabolizm gospodarza. Kontrola inicjacji replikacji plazmidu RK2 w komórkach *E. coli* w warunkach optymalnych opiera się przede wszystkim na precyzyjnej regulacji aktywności białka inicjatorowego TrfA. Kluczowym elementem tego mechanizmu jest równowaga między formą monomeryczną i dimeryczną białka TrfA. Jedynie monomery są zdolne do efektywnego uruchomienia replikacji plazmidowego DNA¹⁷⁸. Dimery TrfA wiążąc się do *oriV*, mogą blokować inicjację replikacji poprzez tworzenie tzw. kompleksów *handcuff*, w których dwie cząsteczki plazmidu są ze sobą złączone, co uniemożliwia utworzenie aktywnego kompleksu inicjacyjnego. Wykazano, że kompleksy te cechują się wysoką stabilnością, jednak mogą być dysocjowane przez proteazy Lon lub ClpAP degradujące cząsteczki TrfA, a także przez monomery TrfA, które wypierają dimery z iteronów. W efekcie cząsteczki plazmidowego DNA zostają uwolnione z kompleksu typu *handcuff*, co umożliwia ponowne rozpoczęcie replikacji DNA¹⁸³. W komórkach *E. coli* proces monomeryzacji TrfA jest wspomagany przez białka opiekuńcze i proteazy, w tym białka DnaK/ClpB¹⁸⁴ oraz proteazę ClpX^{175,178}. Aktywność TrfA regulowana jest nie tylko poprzez stan oligomeryczny, ale także poprzez modulowanie poziomu białka TrfA w komórce. W warunkach optymalnych białko TrfA jest degradowane głównie przez proteazę Lon, a w mniejszym stopniu przez proteazy ClpXP, ClpAP i ClpYQ¹⁸⁵. Co istotne, stan oligomeryczny białka TrfA oraz jego oddziaływanie z DNA wpływają na to, czy proteoliza zachodzi i z jaką intensywnością. Badania nad aktywnością proteazy ClpXP wykazały, że monomery i dimery TrfA degradowane są w istotnie różnym tempie¹⁷⁵. Natomiast oddziaływanie białka TrfA z iteronami hamuje degradację prowadzoną przez proteazy ClpXP i ClpYQ, natomiast stymuluje proteazy Lon i ClpAP poprzez formowanie kompleksów nukleo-proteinowych¹⁸⁵.

Warto podkreślić, że w komórkach *E. coli* białko DnaA, mimo iż jest niezbędne do inicjacji replikacji plazmidu RK2, wydaje się mieć ograniczony wpływ na kontrolę tego procesu w warunkach optymalnych. Poziom białka DnaA pozostaje w przybliżeniu stały w trakcie cyklu komórkowego⁹⁴, a status nukleotydowy, kluczowy dla inicjacji replikacji chromosomalnego DNA, nie odgrywa istotnej roli w przypadku inicjacji replikacji plazmidu¹⁶⁴. W efekcie DnaA pełni głównie funkcję czynnika wspomagającego działanie TrfA, stabilizując kompleks inicjacyjny oraz pomagając w rekrutacji helikazy^{164,181}, lecz nie

stanowi głównego elementu regulacyjnego w utrzymaniu liczby kopii plazmidu RK2 w warunkach optymalnych. Utrzymanie odpowiedniej liczby kopii plazmidu RK2 w warunkach optymalnych wymaga ścisłej kontroli aktywności białka TrfA oraz jego ilości w komórce, co zapewniają mechanizmy regulacyjne oparte na równowadze między monomerem a dimerem, proteolizie i interakcjach z DNA. Pozostaje jednak otwarte pytanie, czy te same mechanizmy działają w sposób niezmienny w warunkach stresu środowiskowego, czy też ulegają modyfikacji pod wpływem kluczowych regulatorów odpowiedzi na stres takich jak (p)ppGpp czy polyP.

4.4. Wpływ stresu środowiskowego na replikację DNA

Kontrola inicjacji replikacji chromosomalnego DNA podczas stresu

W warunkach stresu, takich jak np. głód aminokwasowy, dla stabilności genetycznej i przeżycia komórki kluczowe jest ukończenie rozpoczętych rund replikacji DNA oraz zapobieganie inicjacji nowych rund⁴³. Niestety, mechanizmy warunkujące zahamowanie inicjacji replikacji DNA podczas stresu nie są do końca poznane. Dotychczas poznany takim mechanizmem działającym w komórkach *E. coli* podczas głodu aminokwasowego jest polyP-zależna proteoliza DnaA (PDAP, ang. *polyP-dependent DnaA proteolysis*)³⁵. Zarówno proteaza Lon, jak i cząsteczki DnaA w formie związanej z ADP mogą wiązać polyP, a jego obecność stymuluje Lon do degradacji DnaA. Podobny mechanizm opisano w komórkach *Caulobacter crescentus*, gdzie stres proteotoksyczny, wywołany utratą aktywności białka opiekuńczego DnaK i nagromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, allosterycznie aktywuje proteazę Lon do degradacji DnaA, prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego¹⁸⁶. Konsekwencją PDAP w komórkach *E. coli* jest obniżenie poziomu DnaA podczas stresu, choć nie wszystkie cząsteczki białka DnaA są degradowane. Podczas stresu, w komórkach pozostaje populacja cząsteczek DnaA, które nie podlegają proteolizie³⁵. Lokalizacja tych cząsteczek oraz to, czy są one związane z DNA, pozostają jednak nieznane. Jednocześnie brak danych, w jaki sposób zmiany związane ze stresem wpływają na funkcję DnaA jako regulatora transkrypcji. W komórkach poddanych stresowi niektóre białka NAP mogą działać jak elementy szybkiej reakcji, modyfikując topologię DNA w sposób sprzyjający jego ochronie¹⁸⁷. Towarzysząca temu kondensacja DNA oraz reorganizacja przestrzenna chromosomu¹⁸⁸ może mieć potencjalny wpływ na regulację wiązania DnaA do DNA poprzez zmianę dostępności specyficznych odcinków

DNA, w tym *oriC*. W ostatnich latach wykazano również, że w komórkach *E. coli* białko DnaA podlega modyfikacjom potranslacyjnym, a mianowicie acetylacji. Acetylacja białka DnaA jest zależna od fazy wzrostu komórki i obejmuje m.in. reszty K178¹⁸⁹ i K243¹⁹⁰, zlokalizowane odpowiednio w motywie Walker A domeny III oraz domenie wiążącej DNA (domena IV). Substytucja tych reszt aminokwasowych w cząsteczce DnaA wpływa na wiązanie ATP oraz osłabia oddziaływanie z regionem *oriC*^{189,190}. Nie wiadomo jednak czy, i w jakim stopniu acetylacja białka DnaA ogranicza jego wiązanie do *oriC* podczas głodu aminokwasowego.

Kontrola inicjacji replikacji plazmidowego DNA podczas stresu

Ponad 30 lat temu wykazano, że replikacja plazmidowego DNA, podobnie jak replikacja DNA chromosomalnego, jest silnie uzależniona od warunków środowiskowych¹⁹¹. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że podczas odpowiedzi ściślej wywołanej brakiem określonych aminokwasów w pożywce, plazmid RK2 oraz jego pochodne nie replikują w komórkach *E. coli*¹⁹². Nie jest jednak jasne, na jakim etapie replikacji DNA dochodzi do zahamowania tego procesu w warunkach stresu, czy jest to zatrzymanie przed formowaniem kompleksu inicjacyjnego, czy też na późniejszym etapie. W warunkach stresu, molekularne podstawy regulacji replikacji DNA pozostają do tej pory w dużej mierze nieznane. Warto podkreślić, że wcześniejsze badania wykazały, iż w komórkach hodowanych w warunkach optymalnych wysoki poziom (p)ppGpp, uzyskany poprzez indukcję ekspresji genu *relA*, nie hamował replikacji plazmidu RK2, co wskazuje, że (p)ppGpp nie wpływa na replikację plazmidu¹⁹³. W warunkach optymalnych, białko TrfA jest degradowane przez proteazę Lon¹⁸⁵, jednak nie wiadomo, czy, podobnie jak DnaA-ADP, może wiązać się do polifosforanu, co potencjalnie mogłoby wpływać na tempo lub specyficzność jego proteolizy podczas stresu. Brakuje również danych, czy w warunkach głodu aminokwasowego dochodzi do zmian stężenia białka TrfA lub do modyfikacji poziomu lub proporcji monomeru i dimeru TrfA, co mogłoby skutecznie zapobiegać nowym rundom replikacji plazmidowego DNA.

Podsumowując, dostępne dane wskazują, że zarówno replikacja chromosomalnego DNA, jak i plazmidu RK2 ulega skutecznemu zahamowaniu w warunkach stresu, choć mechanizmy tego procesu nie zostały dotychczas w pełni poznane. Nie wiadomo, czy obserwowane zahamowanie nowych rund replikacji DNA wynika głównie z ograniczenia aktywności białek inicjatorowych DnaA i TrfA, czy też jest konsekwencją bardziej

złożonych procesów, takich jak zmiany w strukturze i organizacji DNA, a być może stanowi efekt ich połączenia w ramach skoordynowanej odpowiedzi komórki. Otwarte pozostaje również pytanie, czy mechanizmy ograniczające wiązanie DnaA do *oriC*, takie jak acetylacja, mają znaczenie podczas głodu aminokwasowego oraz czy mogą w podobny sposób oddziaływać na *oriV* plazmidów. Istotne jest także wyjaśnienie, czy lub w jaki sposób białka inicjatorowe oddziałują z DNA w trakcie stresu oraz jakie mechanizmy odpowiadają za ponowne uruchomienie replikacji po ustąpieniu niekorzystnych warunków.

5. CEL PRACY

Celem pracy była analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *E. coli* w warunkach głodu aminokwasowego. Realizacji tego celu służyły następujące zadania badawcze:

- określenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka DnaA przed stresem, podczas stresu i po stresie,
- analiza wewnątrzkomórkowego poziomu białka DnaA podczas głodu aminokwasowego i podczas wyjścia ze stresu,
- identyfikacja regionów chromosomalnego DNA wiązanych przez DnaA przed stresem, podczas głodu aminokwasowego i po stresie,
- sprawdzenie oddziaływania białek inicjatorowych DnaA i TrfA z plazmidowym *oriV* w warunkach stresu i podczas wyjścia ze stresu,
- zbadanie stabilności białka TrfA i jego monomerycznego wariantu podczas stresu i po stresie.

6. MATERIAŁY

6.1. Szczepy bakteryjne

Tabela 1. Szczepy bakteryjne wykorzystane w tej pracy

Szczep	Genotyp	Ref.
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ λ - <i>rph-1 ilvG- rfb-50</i>	194
<i>E. coli</i> MG1655:: <i>dnaA-eyfp</i> (SN101)	MG1655 Δ <i>dnaA</i> :: <i>dnaA-eyfp</i>	68,195
<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ppk</i>	MG1655 Δ <i>ppk</i>	41
<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>fis</i>	MG1655 Δ <i>fis</i>	196
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) <i>U169 phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	197
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	198
<i>E. coli</i> JP313	<i>ara</i> Δ 714 Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169 rpsL150 relA1, thi, flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	199

6.2. Plazmidy

Tabela 2. Plazmidy wykorzystane w tej pracy

Plazmid	Opis	Oporność	Ref.
RK2	Plazmid IncP o szerokim spektrum gospodarza	Apm ^R , Kan ^R , Tet ^R	200
pBAD24	Wektor ekspresyjny zawierający promotor P _{BAD}	Apm ^R	201
pBAD24:: <i>dnaA</i>	Gen <i>EcdnaA</i> wklonowany do wektora pBAD24 z C-końcowym znacznikiem 6xHis	Apm ^R	202
pBAD24:: <i>dnaA-eyfp</i>	Gen <i>EcdnaA-eyfp</i> wklonowany do wektora pBAD24 z C-końcowym znacznikiem 6xHis	Apm ^R	Ta praca
pAT30:: <i>trfAdimer</i>	Plazmid zawierający gen białka TrfA typu dzikiego (dimer) wklonowany do pTrcHisA z N-końcowym znacznikiem 6xHis, ekspresja kontrolowana przez promotor <i>trc</i>	Apm ^R	203
pAT30:: <i>trfA 254D 257L</i>	Pochodna plazmidu pAT30 niosąca gen monomerycznego wariantu białka TrfA-TrfA G254D/S267L, gen <i>trfAG254D/S267L</i> wklonowany do pTrcHisA z N-końcowym znacznikiem 6xHis, ekspresja kontrolowana przez promotor <i>trc</i>	Apm ^R	203,204
pSV16	Plazmid niosący <i>oriV</i>	Kan ^R	205

6.3. Oligonukleotydy

Tabela 3. Startery wykorzystane w łańcuchowych reakcjach polimerazy (PCR)

Nazwa	Sekwencja (5' -> 3')	Zastosowanie
<i>dnaAeyfp-Frw</i>	tctccatacccggttttttgggctagcaggaggaattcacGTGTC ACTTTCGCTTTGGC	Klonowanie genu <i>dnaA-eyfp</i> do wektora pBAD24
<i>dnaAeyfp-Rv</i>	aagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaTCAGTGGTGG TGGTGGTGGTGGCGATGACAATGTTCTGA TTAA	Klonowanie genu <i>dnaA-eyfp</i> do wektora pBAD24
<i>pBADForward</i>	ATGCCATAGCATTTTTATCC	Colony PCR, sekwencjonowanie wektora pBAD24 po klonowaniu
<i>pBADReverse</i>	GATTTAATCTGTATCAGG	Colony PCR, sekwencjonowanie wektora pBAD24 po klonowaniu
<i>oriC_345pz_Frw</i>	GATCTCTTATTAGGATCGCACTG	EMSA z DnaA-EYFP
<i>oriC_345pz_Rv</i>	GGTGCAAAACAGACAGGC	EMSA z DnaA-EYFP
<i>oriC-EMSA-Frw</i>	CCTGGAAAGGATCATTAACTGTG	EMSA
<i>oriC-EMSA-Rv</i>	FAM-GCGATCTACTGTGGATAACTC	EMSA
<i>glpG-EMSA-Frw</i>	ATAACACCCTGCGTCGC	EMSA
<i>glpG-EMSA-Rv</i>	FAM-GAAGCCTGGCAACGTC	EMSA
<i>terC-EMSA-Frw</i>	GAAATAAGAAACCCGGTCGAAAC	EMSA
<i>terC-EMSA-Rv</i>	FAM-AAGACCACTGGGAGCAG	EMSA
<i>oriC_Frw</i>	GATCGCACTGCCCTGTGGATAAC	qPCR, ChIP- qPCR
<i>oriC_Rv</i>	CCAGCTTATACGGTCCAGGATCACC	qPCR, ChIP- qPCR
<i>terC_Frw</i>	ATTAGCAGGCGCTGCATGT	ChIP-qPCR
<i>terC_Rv</i>	TGACCTGGATGCGATTCTCG	ChIP-qPCR
<i>oriV_RK2_Frw</i>	CCCTCAAGTGTCAATACCGCAG	qPCR, ChIP- qPCR
<i>oriV_RK2_Rv</i>	CAGGCTCGATTTTCGGCCG	qPCR, ChIP- qPCR
<i>oriV_iterony_Frw</i>	TGGACAGCCCCTCAAATGTC	ChIP-qPCR
<i>oriV_iterony_Rv</i>	ACAAGCCTGGGGATAAGTGC	ChIP-qPCR
<i>upf_Frw</i>	TGGGCTTTTTCTCCTCGTGC	ChIP-qPCR
<i>upf_Rv</i>	AAGGCTCAGATTCGACGGC	ChIP-qPCR

6.4. Podłoża hodowlane i antybiotyki

6.4.1. Podłoża hodowlane

LB: 0,5 % ekstrakt drożdżowy; 1 % pepton; 1 % NaCl

LA: 0,5 % ekstrakt drożdżowy; 1 % pepton; 1 % NaCl; 1,5 % agar

SOB: 0,5 % ekstrakt drożdżowy; 2 % trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl;
10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄

SOC: SOB + 20 mM glukoza

6.4.2. Antybiotyki

Tabela 4. Antybiotyki wykorzystane w tej pracy

Antybiotyk	Firma	Stężenie końcowe w pożywce
Ampicylina	Carl Roth, Niemcy	50 µg/ml
Tetracyklina	Sigma-Aldrich, USA	12,5 µg/ml
Kanamycyna	BioShop, Kanada	50 µg/ml
Ryfampicyna	BioShop, Kanada	300 µg/ml

6.5. Białka

6.5.1. Białka

DnaA-6xHis, DnaA-EYFP-6xHis - oczyszczono w tej pracy

Proteinaza K, RNAza A – ThermoFisher Scientific, USA

BSA - Sigma-Aldrich, USA

6.5.2. Przeciwciała

Tabela 5. Przeciwciała wykorzystane w analizach Western Blot i ChIP

Przeciwciała	Pochodzenie	Modyfikacja	Firma
Poliklonalne anty-DnaA	Królik	-	Kolekcja ZBM
Monoklonalne anty-GFP	Mysz	-	Roche, Szwajcaria
Monoklonalne anty-HisTag (6xHis)	Mysz	-	GenScript, USA
Monoklonalne anty-acetylowanej lizynie (anty-AcK)	Królik	-	Abcam, Wielka Brytania
Poliklonalne anty-TrfA	Królik	-	GenScript, USA
Poliklonalne anty-królik IgG	Koza	HRP	Bio-Rad, USA
Poliklonalne anty-mysz IgG	Koza	HRP	Bio-Rad, USA
Poliklonalne anty-koza IgG	Osioł	HRP	Jackson Immuno Research

6.6. Sekwencje DNA

Tabela 6. Sekwencje nukleotydowe DnaA-box wykorzystane w analizach bioinformatycznych

DnaAbox	Sekwencja								
<i>R-type</i> DnaA-box	T	T	A T	T	N ¹	C	A	C	A
<i>perfect</i> DnaA-box	T	T	A	T	C	C	A	C	A

¹ Dowolny nukleotyd

7. METODY

7.1. Obserwacja bakterii *E. coli* interwałową techniką ujęć poklatkowych

Analizy mikroskopii poklatkowej przeprowadzano przy użyciu platformy CellASIC ONIX i kompatybilnych płytek B04A (Merck, Niemcy). Hodowlę komórek szczepu *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* (Materiały 6.1) w fazie logarytmicznego wzrostu (OD_{600} 0,6) rozcieńczano w pożywkę LB w stosunku 1:150, a następnie nanoszono do komory obserwacyjnej płytki CellASIC. Do dołków płytki nanoszono w warunkach jałowych, pożywkę LB oraz pożywkę LB z SHX o końcowym stężeniu 1,5 mg/ml. Przepływ pożywki ustawiano według poniższych wytycznych: 40 minut przepływu pożywki optymalnej LB (przed stresem), następnie 120 minut przepływu pożywki LB+SHX (stres), po czym przywracano przepływ pożywki optymalnej (wyjście ze stresu). Równolegle przeprowadzano kontrolę, polegającą na obserwacji komórek, które przez cały czas analizy były zaopatrywane wyłącznie w pożywkę optymalną LB. Wszystkie eksperymenty mikroprzepływowe przeprowadzano pod stałym ciśnieniem 2 psi. Zdjęcia wykonywano w odstępach 2 lub 5-minutowych przy użyciu kontrastu różnicowo-interferencyjnego (DIC) i fluorescencji dla białka YFP (filtr wzbudzenia 500/20 nm, filtr emisji 535/30 nm) za pomocą kamery CoolSnap HQ2 w mikroskopie odwróconym Delta Vision Elite wyposażonym w obiektyw immersyjny 100× oraz komorę utrzymującą temperaturę 30°C. Wszystkie analizy zostały wykonane w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej (Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski).

7.2. Analiza i przetwarzanie danych mikroskopowych

Wszystkie obrazy analizowano przy użyciu pakietów oprogramowania ImageJ Fiji²⁰⁶ i R²⁰⁷, w tym pakietu ggplot2²⁰⁸. W analizach lokalizacji białka DnaA, komórki na obrazach wykrywano manualnie i zbierano sygnał fluorescencji wzdłuż długiej osi komórek. Następnie wykorzystywano program R studio do zestawienia danych intensywności fluorescencji i przedstawienia ich w postaci kymografu. Reprezentatywne zdjęcia, zdjęcia wykorzystane w filmach oraz dane zebrane z kanału fluorescencyjnego zostały poddane działaniu algorytmu Noise2Void (N2V)²⁰⁹. Zastosowanie algorytmu N2V składa się z dwóch kroków. Pierwszy krok polega na trenowaniu sztucznej sieci neuronowej w celu

usunięcia szumów z posiadanych obrazów. Wynikiem treningu jest model. Do stworzenia modelu dla fluorescencji białka DnaA-EYFP według którego program polepszał jakość zdjęć poprzez obniżenie tła, zastosowano 100 epok (ang. *epoch*) i 200 kroków (ang. *steps*). Drugi krok nazywa się predykcją. W tym etapie wytrenowany model zostaje wykorzystany do usuwania szumów ze zdjęć. Do usuwania szumów ze zdjęć obrazujących fluorescencję białka DnaA-EYFP wykorzystano jeden wcześniej wytrenowany model.

7.3. Izolacja i oczyszczanie DNA

Chromosomalny DNA izolowany był zgodnie z instrukcją producenta załączoną do zestawu *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Szwajcaria). Komercyjny zestaw *Plasmid Mini* (A&A Biotechnology, Polska) wykorzystywany był do izolacji plazmidów ekspresyjnych i plazmidów wysokokopijnych. Do izolacji plazmidu RK2 używano zestawu *Plasmid Mini AX* (A&A Biotechnology, Polska). Do oczyszczania DNA z żelu oraz z mieszanin reakcyjnych postępowano według zaleceń producenta zestawu *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Niemcy). Do oczyszczania DNA z próbek po immunoprecypitacji (ChIP) wykorzystano ten sam zestaw, a procedurę izolacji wykonano według protokołu do oczyszczania DNA z próbek zawierających SDS (Buffer NTB).

7.4. Transformacja komórek bakteryjnych

Przygotowanie komórek chemikompetentnych

Do przygotowania komórek chemikompetentnych używano komercyjnego zestawu *Mix&Go* (Zymo Research, USA) lub metody TSS²¹⁰. W pierwszym przypadku postępowano zgodnie z protokołem załączonym do zestawu. Procedurę przeprowadzano dla komórek hodowanych w pożywce SOB z odpowiednimi antybiotykami (Materiały 6.4). W przypadku przygotowywania komórek chemikompetentnych metodą TSS postępowano zgodnie z wcześniej opublikowanym protokołem²¹⁰. W skrócie, hodowlę nocą komórek bakteryjnych odmładzano w pożywce SOB i hodowano w temperaturze 30°C do osiągnięcia OD₆₀₀ 0,2-0,4. Następnie, komórki inkubowano na lodzie, wirowano (2500 g/ 5 min/ 4°C) i zawieszano w buforze TSS (pożywka LB; 10 % PEG-3350; 5 % DMSO; 20 mM MgCl₂; pH 6,5). Komórki porcjowano, mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

Transformacja komórek bakteryjnych

Chemikompetentne komórki bakteryjne rozmrażano w łaźni lodowej. Do 100 μ l zawiesiny komórek dodawano 100 ng plazmidowego DNA (Materiały 6.2) lub 5 μ l mieszaniny reakcyjnej po reakcji Gibsona (Metody 7.6). Transformację przeprowadzano według protokołu załączonego do zestawu *Mix&Go* z hodowlą komórek w pożywce SOC (Materiały 6.4.1) bez antybiotyków lub metodą TSS. W przypadku metody TSS, komórki z DNA inkubowano przez 30 minut na lodzie, po czym przeprowadzano szok termiczny: 30 sekund inkubacji w temperaturze 42°C, następnie 2-minutowa inkubacja na lodzie. Do komórek dodawano 300 μ l pożywki SOC i hodowano bez presji selekcyjnej przez 60 minut z wytrząsaniem 450 obr./min w temperaturze 37°C. W przypadku obu metod transformacji, komórki wysiewano na podłoże stałe LA z odpowiednim antybiotykiem (Materiały 6.4). Hodowle na podłożu LA prowadzono przez noc w temperaturze 37°C.

W przypadku otrzymania szczepu *E. coli* MG1655 niosącego dwa plazmidy (pAT30::*trfA* i pSV16) wykonywano pojedyncze transformacje, tj. pierwszo transformowano chemikompetentne komórki plazmidem kodującym plazmidowy inicjator replikacji (pAT30::*trfA*), następnie ponownie przygotowywano chemikompetentne komórki i wykonywano transformację plazmidem niosącym plazmidowe *origin* replikacji (pSV16).

7.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Do amplifikacji fragmentu DNA kodującego białko DnaA-EYFP wykorzystano polimerazę Phanta Max Fidelity (Vazyme). Reakcje colony PCR przeprowadzono z użyciem gotowej mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę DNA DreamTaq (ThermoFisher Scientific, USA). Do uzyskania fragmentów DNA do testu EMSA oraz weryfikacji próbek input oraz ChIP wykorzystano mieszaninę DreamTaq. Wszystkie startery zaprojektowano w programie SnapGene²¹¹ lub z wykorzystaniem darmowego narzędzia PrimerBlast²¹². Przed amplifikacją DNA, zoptymalizowano temperatury przyłączania starterów poprzez wykonanie gradientowej PCR. Komponenty reakcji dla poszczególnych polimeraz oraz warunki reakcji zestawiono w tabeli 7 i tabeli 8. Wszystkie reakcje przeprowadzono w termocyklerze C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA).

Tabela 7. Komponenty reakcji PCR

Składnik	Phanta Max	DreamTaq – colony PCR	DreamTaq
Bufor	1x Phanta Max buffer	1x DreamTaq Green PCR master Mix	1x DreamTaq Green PCR master Mix
dNTPs	0.2 mM każdy		
Polimeraza	1 U		
10 µM starter 1	0,4 µM	0,5 µM	0,5 µM
10 µM starter 2	0,4 µM	0,5 µM	0,5 µM
Matryca DNA	180 ng genomowego DNA	1 kolonia bakteryjna	200 ng genomowego DNA/ 1 µl input DNA lub ChIP
Objętość końcowa	50 µl	10 µl	10 µl

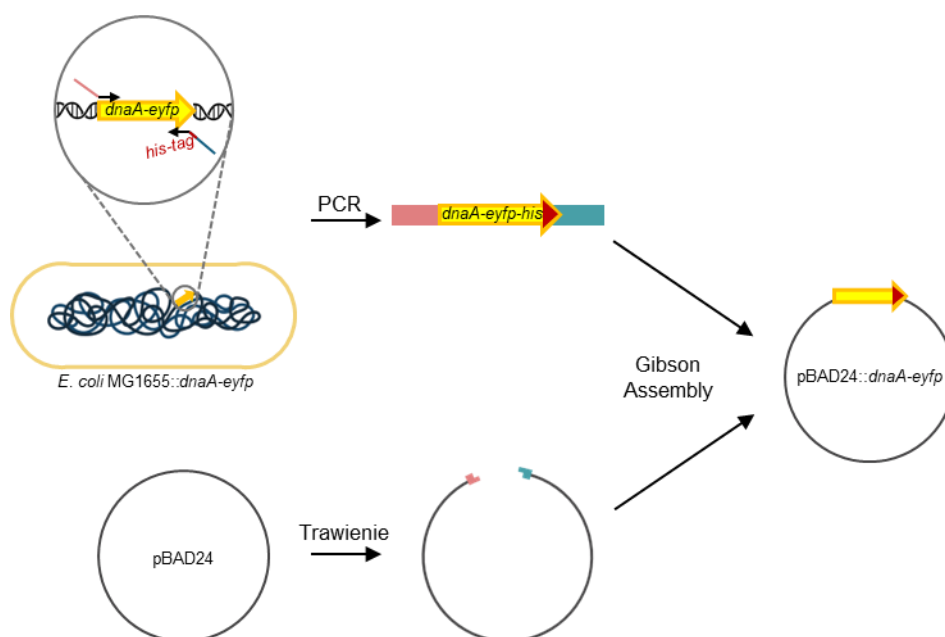
Tabela 8. Temperatury oraz czasy poszczególnych etapów reakcji PCR

Etap	Phanta Max			DreamTaq – colony PCR			DreamTaq		
	Temp.	Czas	Liczba cykli	Temp.	Czas	Liczba cykli	Temp.	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	3 min	1	95°C	5	1	95°C	3 min	1
Denaturacja	95°C	5 s	20	95°C	30 s	30	95°C	30 s	40
Przylączanie	58,9°C	15 s		58,9°C	30 s		62°C	30s	
Elongacja	72°C	1,5 min		72°C	1 min		72°C	35s	
Końcowa elongacja	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1

7.6. Klonowanie metodą Gibsona

Do wklonowania fragmentu DNA kodującego białko DnaA-EYFP do wektora ekspresyjnego pBAD24 (Materiały 6.2) wykorzystano metodę Gibsona²¹³. Schemat klonowania przedstawia Rycina 5. Wstawkę DNA kodującą białko DnaA-EYFP amplifikowano za pomocą reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy *Phanta Max Super-Fidelity DNA* (Vazyme, Chiny) (Metody 7.5). Jako matrycę DNA wykorzystano chromosomalny DNA bakterii *Escherichia coli* MG1655::*dnaA-eyfp* (Materiały 6.1). W reakcji PCR wykorzystano startery dnaAeyfp-Frw oraz dnaA-eyfp-Rv (Materiały 6.3), które zostały zaprojektowane w programie SnapGene z wykorzystaniem protokołu do klonowania metodą Gibsona. Do sekwencji startera przylączającego się do nici dolnej dodano sekwencje kodującą ogonek histydynowy (6xHis). Wektor pBAD24 zlinearyzowano

poprzez podwójne trawienie enzymami XbaI i NcoI. Trawienie prowadzono w końcowej objętości 20 µl w 1x buforze *Tango* (ThermoFisher Scientific, USA) w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Zarówno zlinearyzowany wektor jak i produkt reakcji PCR poddano procedurze oczyszczania z żelu (Metody 7.3). Reakcję Gibsona przeprowadzano zgodnie z instrukcją załączoną do mieszaniny *Gibson Assembly® Master Mix* (New England Biolabs, USA). Po godzinnej inkubacji próbki w temperaturze 50°C, 5 µl wykorzystano do transformacji bakterii chemikompetentnych *Escherichia coli* DH5 (Metody 7.4, Materiały 6.1). W celu weryfikacji wstawienia fragmentu DNA kodującego białko DnaA-EYFP-His do wektora pBAD24, wybrane kolonie bakteryjne, które wyrosły na podłożu stałym z ampicyliną wykorzystano w reakcji colony PCR (Metody 7.5). Z bakterii, które zawierały odpowiedniej długości wstawkę w wektorze pBAD24, wyizolowano plazmidowy DNA i wysłano do sekwencjonowania do firmy zewnętrznej (Genomed, Warszawa), celem potwierdzenia poprawności konstruktów. Startery wykorzystane w reakcjach PCR oraz do sekwencjonowania plazmidów zestawiono w tabeli 3 (Materiały 6.3).



Rycina 5. Schemat klonowania genu *dnaA-eyfp* do wektora ekspresyjnego *pBAD24*. Na schemacie kolorem żółtym zaznaczono fragment DNA kodujący białko DnaA-EYFP, a kolorem czerwonym fragment kodujący sześć reszt histydynowych (his-tag). Kolory różowy i turkusowy oznaczają fragmenty DNA o sekwencjach komplementarnych pomiędzy wstawką a wektorem, umożliwiające ich łączenie w reakcji Gibsona.

7.7. Nadprodukcja i oczyszczanie białek DnaA i DnaA-EYFP

Nadprodukcję białek DnaA-His i DnaA-EYFP-His przeprowadzono w szczepie *E. coli* JP313 (Materiały 6.1) niosącym plazmid pBAD24::*dnaA* lub pBDA24::*dnaA-eyfp* (Materiały 6.2). Hodowlę nocną odmładzano w stosunku 1:30 w pożywce LB z ampicyliną (Materiały 6.4). Hodowlę prowadzono w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 160 obr./min w wytrząsarce powietrznej do osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} = 0,6$. Indukcja następowała poprzez dodanie do hodowli bakteryjnej roztworu arabinozy do końcowego stężenia 0,2 %. Hodowlę kontynuowano przez 2 godziny. Po tym czasie bakterie osadzono poprzez wirowanie (4500 g/ 8 min/ 4°C). Osadzone komórki bakteryjne zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C. Zamrożone komórki rozmrażano w łaźni lodowej. Komórki zawieszano w buforze LS (0,5 M NaCl; 50 mM KPi, pH 8; 2 mM imidazol; 0,1 % TritonX-100) z dodatkiem lizozymu (10 mg/ml) i inkubowano na lodzie przez 40 minut. Następnie próbkę poddawano sonikacji z wykorzystaniem sonikatora *Q700* (QSonica, USA). Lizat wirowano (75000 g/ 25 min/ 4°C) w celu osadzenia resztek komórkowych. W tym czasie złoże Ni^{2+} -NTA (Macherey-Nagel, Niemcy) w objętości 1,5 ml przepłukiwano dwukrotnie wodą destylowaną, a następnie dwukrotnie buforem LS. Płukanie złoża przeprowadzano w probówkach typu „korning” o objętości 50 ml, stosując wirowania 1500 g/ 2 min/ 4°C. Na tak przygotowane złoże nanoszono supernatant po wirowaniu lizatu bakteryjnego. Wiązanie białek do złoża przeprowadzano przez 1 godzinę w temperaturze 7°C, stosując mieszanie rotacyjne. Po związaniu białek do złoża, próbkę wirowano (1500 g/ 2 min/ 4°C). Osadzone złoże przepłukiwano dwukrotnie buforem W (0,5 M NaCl; 50 mM KPi, pH 8; 20 mM imidazol; 0,1 % TritonX-100), a następnie dwukrotnie buforem ST (0,5 M L-kwas glutaminowy; 45 mM Hepes, KOH, pH 7,6; 10 mM $Mg(OAc)_2$; 0,5 mM EDTA; 20 % sacharoza; 0,1 % TritonX-100). Elucję białka ze złoża przeprowadzano czterokrotnie w probówkach typu „korning” za każdym razem dodając do próbki ze złożem 500 μ l buforu E (bufor ST + 250 mM imidazol), inkubując i wirując próbkę (1500 g/ 2 min / 4°C). Obecność białka w zebranych frakcjach oraz ich czystość potwierdzano elektroforezą SDS-PAGE (Metody 7.14). Białko dializowano w buforze D (45 mM Hepes-KOH, pH 7,6; 200 mM L kwas glutaminowy; 1 mM DTT; 20 % sacharoza) stosując woreczki dializacyjne o wartości odcięcia (ang. *cutoff*) 12-14 kDa. Oczyszczony preparat białka porcjowano, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

7.8. Określanie stężenia białek

Określanie stężenia oczyszczonych białek odbywało się za pomocą analizy densytometrycznej, wykonanej po rozdziale w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, Metody 7.14). Pomiary densytometryczne wykonywano w programie *GelQuantNET 1.8.2* (Biochemlabsolutions, University of California, San Francisco, USA). Otrzymane wyniki odnoszono do krzywej wzorcowej białka BSA (Materiały 6.5.1).

7.9. Określanie stabilności termicznej białek *in vitro*

Do określenia stabilności termicznej oczyszczonych białek wykorzystano aparat Tycho NT.6 (NanoTemper, Niemcy). Instrument ten monitoruje zmiany wewnętrznej fluorescencji białka (długości fali 330 i 350 nm) w funkcji temperatury (35-95°C), co pozwala na określenie przybliżonej temperatury topnienia. Pomiar odbywa się w kapilarach. Postępowano zgodnie z instrukcją producenta.

7.10. Test opóźnienia migracji DNA w żelu (EMSA)

Do analizy oddziaływania białek z DNA *in vitro* wykorzystano test opóźnienia migracji DNA w żelu (EMSA, ang. *Electro Mobility Shift Assay*). Wykonywano dwa typy eksperymentów EMSA, ze znakowanym fluorescencyjnie DNA lub z białkiem fluorescencyjnym. W pierwszym przypadku, w reakcjach wykorzystywano stałe stężenie dsDNA wyznakowanego pochodną fluoresceiny 6-FAM, oraz rosnące stężenie białka. Fragmenty DNA uzyskiwano na drodze łańcuchowej reakcji polimerazy (Metody 7.5) z wykorzystaniem znakowanych starterów (Materiały 6.3) i chromosomalnego DNA bakterii *E. coli* MG1655, a następnie oczyszczano produkt reakcji PCR z żelu (Metody 7.3). Stężenie DNA określano za pomocą pomiaru absorbancji (Metody 7.19). Otrzymanie białek opisano w rozdziale 7.7. W drugim wariantcie testu EMSA, w mieszaninach reakcyjnych stosowano stałe stężenie białka fluorescencyjnego DnaA-EYFP, i wykonywano miareczkowanie niewyznakowanym dsDNA. Reakcje oddziaływania białko-DNA przeprowadzano w objętości 20 µl. Każda mieszanina reakcyjna zawierała 2,5 mM ATP, 12,5 mM Mg(OAc)₂, 0,25 µg/µl poly[d(IC)] oraz 1x bufor EDBS (5 mM Tris-HCl, pH 7,6;

0,8 % sacharoza (w/v); 0,8 mM DTT; 0,08 µg/ml BSA). Po dodaniu DNA i białka mieszaniny inkubowano przez 20 min w temperaturze 32°C. Dokładne ilości DNA oraz białka stosowane w reakcjach zostały oznaczone bezpośrednio na rycinach. Po inkubacji, do każdej mieszaniny dodawano 3 µl Ficoll 4000 i całość nanoszono na 5 % żel poliakrylamidowy TBE. Rozdział przeprowadzano w buforze TBE przy stałym napięciu 110 V przez 2 godziny. Wyniki obrazowano za pomocą aparatu *ChemiDoc MP* (Bio-Rad, USA) z wykorzystaniem protokołu do wizualizacji fluoresceiny dla DNA znakowanego FAM lub protokół do wizualizacji barwnika Alexa488 w przypadku DnaA-EYFP.

7.11. Hodowla bakterii przed stresem, w trakcie stresu oraz po stresie

Hodowlę nocną bakterii *E. coli* odmładzano stosunku 1:50 w pożywce LB (Materiały 6.4.1) i hodowano w wytrząsarce powietrznej utrzymującej temperaturę 30°C przy 160 obr./min. do osiągnięcia gęstości optycznej OD₆₀₀ 0,6 (próbka „przed stresem”). Następnie do hodowli dodawano SHX o końcowym stężeniu 0,5 mg/ml i kontynuowano hodowlę przez 2 godziny (próbka „stres”). Po czym, w celu usunięcia SHX, hodowlę wirowano (2500 g/ 5 min/ RT), przepłukiwano dwukrotnie ogrzaną do temperatury 30°C pożywką LB i zawieszano w odpowiedniej objętości ciepłej pożywki LB. Hodowlę prowadzono dalej w temperaturze 30°C przy 160 obr./min przez 30 lub 60 minut (próbka „po stresie”).

7.12. Analiza całkowitej liczby komórek w mililitrze hodowli bakteryjnej (BactoBox)

Do określenia dokładnej liczby żywych komórek bakteryjnych w mililitrze hodowli wykorzystano aparat BactoBox²¹⁴. Sprzęt ten wykorzystuje impedancyjną cytometrię przepływową bez konieczności barwienia próbki (ang. *label-free impedance flow cytometry*) w celu wykrycia nieuszkodzonych błon komórkowych. Martwa bakteria z nieszczelną ścianą komórkową nie zmienia rozkładu linii pola elektrycznego, w związku z czym technika ta pozwala na rozróżnienie martwych i żywych komórek. Próbkę do pomiarów przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta załączoną do sprzętu. Każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.

7.13. Analiza wymiarów komórek bakteryjnych

Hodowle bakteryjne *Escherichia coli* MG1655 (Materiały 6.1) prowadzono jak opisano wyżej (Metody 7.11). Podczas głodu aminokwasowego próbki pobierano co 30 minut, zaś po wymianie pożywki ponownie na optymalną co 15 minut. Za każdym razem pobierano objętość hodowli odpowiadającą 0,5 ml hodowli o OD₆₀₀ 0,6. Komórki osadzano przez wirowanie (2500 g / 5 min/ RT), usuwano pożywkę i zawieszano w 50 µl buforu PBS. Komórki nakładano na szkiełko mikroskopowe pokryte uprzednio polilizyną (Sigma-Aldrich, USA). Na równomiernie rozłożoną próbkę nakrapiano 1 µl buforu PBS z glicerolem (1:1) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Do określenia wymiarów komórek bakteryjnych przed, w trakcie stresu i podczas wyjścia ze stresu wykorzystano fluorescencyjny mikroskop konfokalny Leica TCS SP8 X. Obserwacje prowadzono w świetle widzialnym przy wykorzystaniu immersyjnego obiektywu *HC PL APO 100x/1.40 OIL* i detektora PMT. Podczas wykonywania zdjęć korzystano z programu *LAS X 3.5.7.23225* (Leica, Niemcy). Eksperyment wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych. Pomiary długości i szerokości komórek wykonano w programie ImageJ Fiji²⁰⁶. Do obliczenia objętości komórek przyjęto cylindryczny kształt komórki bakteryjnej i wykorzystano wzór na objętość walca $V = \pi r^2 h$, gdzie r to $\frac{1}{2}$ szerokości komórki, a h oznacza długość komórki.

7.14. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Do rozdzielania elektroforetycznych stosowano 12.5 % lub 9 % stężenie poliakrylamidów w żelu rozdzielającym oraz 5 % w żelu zagęszczającym. Standardowo wykorzystywano 5 µl frakcji po oczyszczaniu białek lub objętość hodowli bakteryjnej odpowiadającą 1 ml hodowli o OD₆₀₀ 0,2 (Metody 7.16). Przed rozdzieleniem próbki były zawieszane w buforze Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 0,01 % błękit bromofenolowy; 25 % glicerol; 360 mM β-merkaptotanol) i inkubowane w temperaturze 95°C przez 5 minut. W przypadku rozdzielenia lizatów bakteryjnych inkubacja w temperaturze 95°C była wydłużana do 10 minut. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparatach *Mini Protean Tetra Cell* (Bio-Rad, USA), przy stałym napięciu 180 V przez 55 minut. Po zakończonym rozdzieleniu żele barwiono barwnikiem Coomassie Blue (0,28 % Coomassie Brilliant Blue G (m/v); 50 % metanol; 10 % kwas octowy) przez 10 minut, a następnie

odbarwiano w roztworze odbarwiacza (20 % metanol; 10 % kwas octowy) przez noc lub wykonywano transfer mokry (Metody 7.15). Wyniki rozdzału żeli barwionych barwnikiem Coomassie Blue wizualizowano z wykorzystaniem systemu obrazującego *ChemiDoc MP* (Bio-Rad, USA).

7.15. Western Blot

Żele poliakrylamidowe po rozdziale elektroforetycznym (Metody 7.14) równoważono przez 10 min w buforze do transferu NBS (48 mM Tris; 39 mM glicyna; 1,3 mM SDS; 10 % metanol). Transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową o średnicy porów 0.22 μm (Amersham Protran, Cytiva, USA) wykonywano w aparacie do transferu mokrego *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad, USA) przy stałym napięciu 110 V przez 1 h lub 25 V przez noc. Membranę blokowano 5 % roztworem odtłuszczonego mleka w proszku rozpuszczonego w buforze TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween-20) i inkubowano z króliczymi przeciwciałami anti-DnaA, anti-TrfA, anti-AcK lub mysimi przeciwciałami anti-GFP lub anti-6xHis (Materiały 6.5.2). W przypadku analizy z wykorzystaniem króliczych przeciwciał skierowanych anti acetylowanej lizynie (anti-AcK) membranę blokowano 3 % roztworem BSA (Materiały 6.5.1) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Rozcieńczenia przeciwciał pierwszorzędowych, czas i temperaturę inkubacji zestawiono w tabeli poniżej (Tabela 9).

Tabela 9. Parametry inkubacji przeciwciał I-rzędowych w technice Western Blot

Przeciwciało	Rozcieńczenie	Czas inkubacji [h]	Temperatura [°C]
anty-DnaA	1:10000	1	21
anty-GFP	1:10000	16	6
anty-TrfA	1:10000	2	21
anty-AcK	1:2000	1,5	21
anty-6xHis	1:5000	1	21

Następnie, po kilkukrotnym płukaniu membrany buforem TBS-T, inkubowano ją z kozimi anti-króliczymi lub kozimi anti-mysimi IgG skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową

(Materiały 6.5.2) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie niezwiązane przeciwciała usuwano za pomocą płukań membrany w buforze TBS-T. W przypadku analizy z wykorzystaniem przeciwciał anti-AcK stosowano jeszcze dodatkowy etap inkubacji membrany z przeciwciałami oślimi anti-kozimi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (Materiały 6.5.2), a następnie membranę znowu płukano w buforze TBS-T. Wyniki wizualizowano z użyciem zestawu *Westar Supernova* (Cyanagen, Włochy) i transiluminatora *ChemiDock MP* (Bio-Rad, USA). Otrzymany obraz analizowano densytometrycznie przy użyciu programu *GelQuantNET 1.8.2* (Biochemlabsolutions, University of California, San Francisco, USA).

W przypadkach kiedy ta sama membrana miała zostać ponownie wykorzystana, przeciwciała były usuwane zgodnie z protokołem *Western Blot membrane stripping for restaining protocol* opublikowanym na stronie Abcam²¹⁵. W skrócie, membranę przepłukiwano dwukrotnie buforem *Mild Stripping Buffer* (200 mM glicyna, 0,1 % SDS, 1 % Tween20, pH 2,2). Następnie membrana była płukana buforem PBS i buforem TBS-T, po czym procedura Western Blot zostawała przeprowadzana na nowo, rozpoczynając od etapu blokowania.

7.16. Określanie poziomu lub stabilności białek w komórkach bakteryjnych

Próbki hodowli bakteryjnych pobierano przed stresem, podczas głodu aminokwasowego i podczas wyjścia ze stresu (Metody 7.11) w wybranych punktach czasowych. W każdym punkcie czasowym pobierano objętość hodowli odpowiadającą 1 ml hodowli o $OD_{600} = 0,3$. Komórki osadzano przez wirowanie, zawieszano w buforze Laemmli, a następnie lizowano przez gotowanie w temperaturze 95 °C przez 10 minut. Otrzymane lizaty rozdzielano w żelach poliakrylamidowych metodą SDS-PAGE (Metody 7.14). W przypadku, gdy próbki z jednego doświadczenia były rozdzielane w dwóch żelach poliakrylamidowych, w celu kontroli potencjalnych różnic między żelami na każdym z nich rozdzielano próbkę referencyjną pobraną w czasie 0. Po rozdziale elektroforetycznym lizatów bakteryjnych, wykonywano Western Blot z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 7.15.

7.17. Cytometria przepływowa

Technika cytometrii przepływowej została użyta do analizy liczby kopii chromosomalnego DNA w komórkach bakteryjnych. Postępowano według protokołu opublikowanego przez Michellle Hawkins i współpracowników²¹⁶ dokonując drobnych modyfikacji. W skrócie, pobierano 100 µl hodowli, wirowano, zawieszano w buforze PBS i utrwalano za pomocą 99 % metanolu. Komórki przemywano buforem PBS i zawieszano w mieszaninie SytoX (1 µM *SYTOX green nucleic acid stain* (ThermoFisher Scientific, USA); 50 µg/ml RNAza A; 1x PBS). Wybarwione komórki bakteryjne poddano analizie z wykorzystaniem cytofluorometru *Guava EasyCyte* (Millipore, Niemcy). Zbierano 20 000 zdarzeń przy szybkości około 800 zdarzeń na sekundę. Do określenia referencyjnej liczby kopii chromosomów, analizowano zarówno hodowle bakteryjne w fazie stacjonarnej, jak i hodowle traktowane ryfampicyną (Materiały 6.4.2). Zgodnie z danymi literaturowymi, maksima fluorescencji otrzymane podczas pomiaru próbek referencyjnych oznaczono jako 1 i 2 kopie chromosomalnego DNA.

7.18. Rozdział DNA w żelu agarozowym

Określenie długości fragmentów DNA w lizatach bakteryjnych

Rozdział DNA z komórek bakteryjnych poddanych sonikacji przeprowadzano w 1,5 % żelu agarozowym przygotowanym w 1x buforze TBE (90 mM Tris; 90 mM kwas borowy; 0,2 mM EDTA). Lizaty bakteryjne po odwróceniu reakcji sieciowania kompleksów białko-DNA (ang. *decrosslinking*) (Metody 7.20) były mieszane w stosunku 2:1 z buforem obciążającym *Trirack* (ThermoFisher Scientific, USA). Jako wzorzec długości fragmentów DNA stosowano marker *GeneRuler 50 bp* lub *GeneRuler 1 kb* (ThermoFisher Scientific, USA). Do wizualizacji DNA stosowano bromek etydy (EtBr). Rozdział prowadzono przy stałym napięciu 90 V przez 90 minut w aparacie do elektroforezy horyzontalnej (Kucharczyk, Polska). Po zakończeniu rozdziału żel umieszczano w transiluminatorze ChemiDocTM MP Imaging System (Bio-Rad, USA), a następnie korzystając z oprogramowania ImageLab (Bio-Rad, USA) przeprowadzano wizualizację DNA w świetle UV.

Weryfikacja produktów reakcji PCR

Rozdział elektroforetyczny mieszanin po PCR (Metody 7.5) wykonywano w 1 % żelu agarozowym w buforze TBE. Do wizualizacji DNA stosowano EtBr dodawany do żelu agarozowego, natomiast w przypadku planowanego oczyszczania DNA z żelu używano barwnika *GreenSafe* (NZYtech, Portugalia). Rozdział przeprowadzano przy stałym napięciu 90 V. Przed rozdziałem do wszystkich prób dodawano bufor obciążający *TriTrack* (ThermoFisher Scientific, USA). Wizualizację rozdzielonych prób przeprowadzano w świetle UV przy użyciu transiluminatora *ChemiDoc MP*.

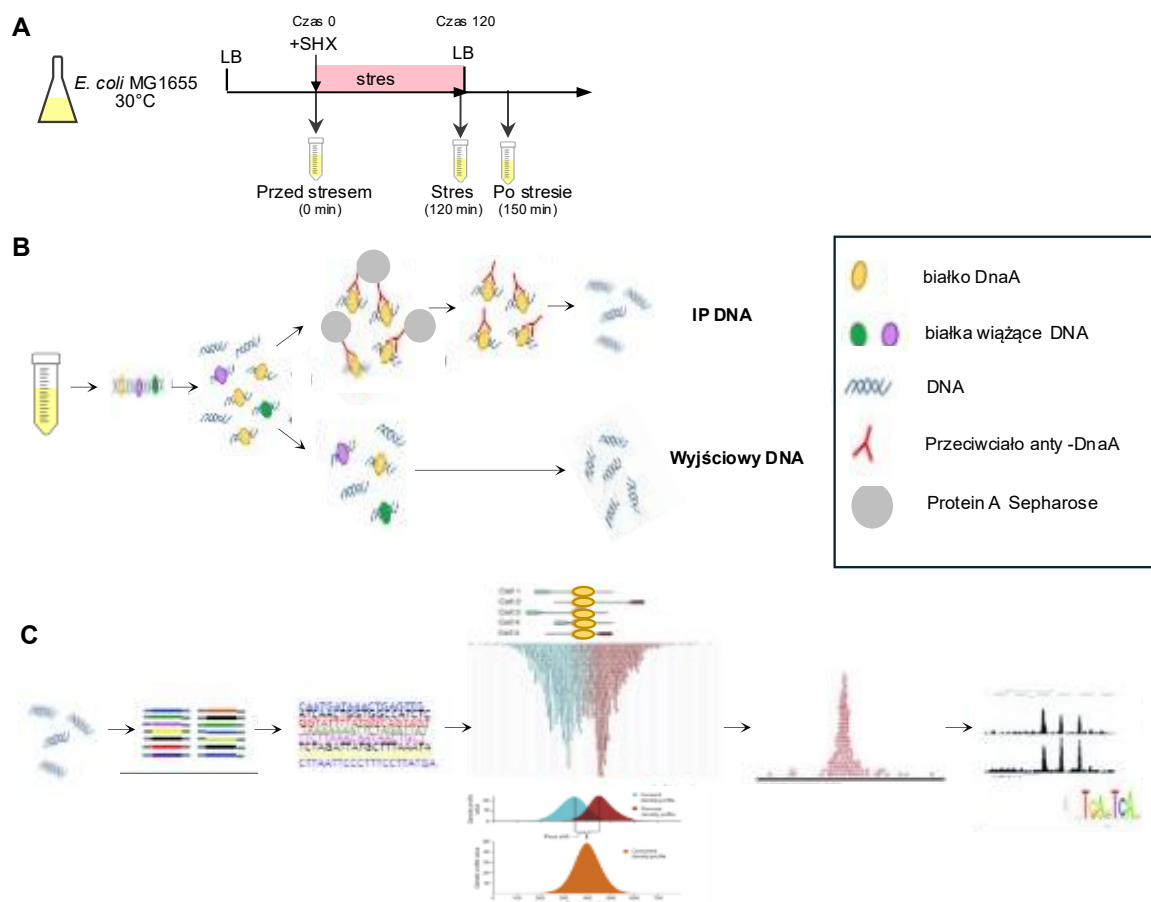
7.19. Określenie stężenia DNA

Aby określić stężenie plazmidowego lub genomowego DNA po przeprowadzeniu izolacji lub oczyszczania (Metody 7.3), wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm, wykorzystując spektrofotometr *UV-Vis NanoDrop 2000* (ThermoFisher Scientific, USA) oraz jałową wodę jako próbkę zerową. W przypadku określania stężenia DNA w próbkach po immunoprecypitacji (Metody 7.20) wykorzystywano metodę opartą na pomiarze fluorescencji. Korzystano wówczas z fluorymetru *Quantus* (Promega, USA) i barwnika znakującego DNA *QuantiFluor® dsDNA System* (Promega, USA) postępując zgodnie z instrukcją producenta.

7.20. Immunoprecypitacja chromatyny (ChIP)

Sieciowanie kompleksów nukleoproteinowych in vivo

Aby utrwalić kompleksy DNA-białko w komórkach bakteryjnych, do 40 ml hodowli bakteryjnej przed stresem, w trakcie głodu aminokwasowego lub po stresie (Metody 7.11, Rycina 6A) dodawano formaldehyd o końcowym stężeniu 1 %. Próbkę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Sieciowanie zatrzymywano poprzez dodanie do próbek 10 ml 2,5-M roztworu glicyny (500 mM końcowe stężenie glicyny w próbce) i 5 minutową inkubację w temperaturze pokojowej. Hodowle następnie wirowano (2500 g/ 5 min/ RT), przepłukiwano dwukrotnie buforem 1x TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl), a supernatant po ostatnim wirowaniu usuwano. Komórki przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.



Rycina 6. Schemat eksperymentów ChIP oraz metody analizy danych ChIP-seq. (A) Schemat przedstawiający warunki i czasy pobierania komórek w eksperymentach ChIP. Komórki *E. coli* MG1655 hodowano w pożywce optymalnej LB w temperaturze 30°C do OD₆₀₀ 0.6 (próbka „przed stresem”). Następnie dodawano SHX i hodowlę kontynuowano przez 2 godziny (próbka „stres”). Po czym komórki przemywano i zmieniano pożywkę z powrotem na LB, kontynuując hodowlę przez 30 minut (próbka „po stresie”). (B) Schemat otrzymywania DNA w doświadczeniach ChIP mający zastosowanie zarówno w analizach ChIP-qPCR i ChIP-seq. Komórki z różnych warunków (patrz panel A) były traktowane formaldehydem w celu zsieciwania kompleksów nukleoproteinowych. Liza komórek i fragmentacja DNA nastąpiły poprzez trawienie lizozymem i sonikację. Aby znormalizować liczbę origin replikacji w każdej próbce, 2 % lizatu odłożono jako kontrolę wyjściowego DNA. Immunoprecypitację przeprowadzono przy użyciu złoża Protein A Sepharose opłaszczonego przeciwciałami anti-DnaA. Elucję i odsiecowanie DNA w próbkach po ChIP i próbkach wyjściowego DNA osiągnięto poprzez grzanie i trawienie proteinazą K. Próbkę były również traktowane RNAzą A. (C) Schemat przedstawiający przebieg analizy danych ChIP-seq. Próbkę po ChIP i próbki wyjściowego DNA (patrz panel B) zostały wysłane do firmy zewnętrznej w celu przygotowania bibliotek i sekwencjonowania DNA. Po otrzymaniu danych, odczyty poddano weryfikacji przy użyciu algorytmu FastQC, następnie mapowaniu do sekwencji genomu *E. coli* MG1655 i sortowaniu odpowiednio przy użyciu Bowtie 2 i SAMTools. Detekcję szczytów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania MACS lub edgeR. Końcowa analiza danych i ich wizualizacja były głównie wykonywane przy użyciu R studio.

Immunoprecypitacja kompleksów białko-DNA

Komórki po procedurze sieciowania zawieszano w 1 ml buforu do lizy (50 mM Hepes-KOH, pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % dezoksycholan sodu; 0,1 % SDS; 2 mg/ml lizozym; inhibitory proteaz) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C z łagodnym wytrząsaniem. Lizaty komórkowe chłodzono poprzez 10 minutową inkubację w lodzie i poddawano sonikacji przy użyciu aparatu *Sonicator Vibra Cell VCX500* (Sonics, USA). Każdą próbkę sonikowano przez łączny czas 2 minut w cyklach 10 s ON/ 50 s OFF, następnie lizaty wirowano (20 000 g/ 5 min/ 4°C). Z każdego lizatu pobierano dwie próbki: 1) 10 µl w celu oszacowania długości fragmentów DNA po sonikacji, 2) 2 % objętości lizatu jako kontrolę wyjściowej ilości DNA (input) (Rycina 6B). Równolegle przygotowywano złoże do immunoprecypitacji. Do probówek typu Eppendorf o zmniejszonej adsorpcji biomolekuł (*Low-Bind Eppendorf tubes*) pobierano 12,5 µl złoża sefarozeowego 6 MB skoniugowanego z białkiem A (Abcam, Wielka Brytania). Złoże przepłukiwano dwukrotnie buforem 1xTBS, a następnie blokowano poprzez godziną inkubację z buforem blokującym (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,2 % BSA; 1 mg/ml PVP) w chłodni. Złoże przepłukiwano buforem 1xTBS, a następnie dodawano 800 µl buforu 1xTBS z 1 µl króliczych przeciwciał anti-DnaA lub anti-TrfA (Materiały 6.5.2) i inkubowano przez 1 godzinę w chłodni. Następnie niezwiązane do złoża przeciwciała usuwano poprzez wirowanie. Lizaty komórkowe nanoszono na przygotowane złoże i inkubowano z rotacją przez 90 minut w chłodni. Po inkubacji z lizatami bakteryjnymi, złoże przepłukiwano dwukrotnie buforem FA150 (50 mM Hepes-KOH, pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % dezoksycholan sodu; 0,1 % SDS; 2; inhibitory proteaz), następnie buforem FA500 (50 mM Hepes-KOH, pH 7,6; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % dezoksycholan sodu; 0,1 % SDS; 2; inhibitory proteaz), buforem W (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 250 mM LiCl; 1 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100; 0,5 % dezoksycholan sodu, inhibitory proteaz) i na koniec buforem TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA). Na wszystkich etapach pracy ze złożem sefarozeowym stosowano parametry wirowania 1500 g/ 2 min/ 4°C. W celu elucji i uwolnienia DNA z utrwalonych kompleksów nukleoproteinowych, próbki po immunoprecypitacji i próbki input mieszano ze 100 µl buforu do elucji (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 250 mM NaCl; 100 mM NaHCO₃; 10 mM EDTA; 1 % SDS) i RNAzą A (20 µg) (Materiały 6.5.1), inkubowano w temperaturze 65°C przez 18 godzin, a następnie wirowano (2000 g/ 1 min/ RT). Aby usunąć białka w próbce, do supernatantów dodawano proteinazę K (40 µg) (Materiały 6.5.1) i inkubowano

w temperaturze 50°C przez 1 godzinę. DNA oczyszczano przy użyciu protokołu do oczyszczania DNA z próbek zawierających SDS (Buffer NTB) załączonego do zestawu *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit* (Macherey-Nagel, Niemcy) (Metody 7.3). Sposób pozyskiwania DNA w eksperymentach ChIP przedstawiono na rycinie 6B. Stężenie DNA oznaczano ilościowo przy użyciu systemu *QuantiFluor dsDNA* (Metody 7.19). Długości fragmentów DNA sprawdzano na podstawie rozdziału DNA w 1,5 % żelach agarozowych barwionych EtBr (Metody 7.18). Analizy ChIP przeprowadzano w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego z analizowanych warunków hodowli. Oczyszczone próbki DNA analizowano metodą NGS (ChIP-seq) lub qPCR (ChIP-qPCR).

7.21. Spektrometria mas

W celu wykluczenia obecności niespecyficznie związanych białek w próbce po immunoprecypitacji z wykorzystaniem przeciwciał anti-DnaA (Metody 7.20) wykonano spektrometrię mas. Próbkę po immunoprecypitacji i płukaniu, ale jeszcze przed etapem odsieciowania kompleksów DNA-białko (Metody 7.20), rozdzielono w 12,5 % żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Metody 7.14). Żel wybarwiono Coomassie Blue i wycięto fragmenty żelu zawierające niebieskie zabarwienie. Analiza spektrometrii mas została wykonana przez pracowników Laboratorium Spektrometrii Mas Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. W skrócie, próbka została poddana trawieniu trypsyną (*in gel digestion protocol*) i poddana analizie z wykorzystaniem systemu MALDI TOF/TOF™ 5800. Uzyskane dane proteomiczne zostały zdeponowane w *ProteomeXchange Consortium* za pośrednictwem repozytorium partnerskiego PRIDE²¹⁷, pod numerem PXD061973. Uzyskane widma MS/MS zostały przeanalizowane w programie *Protein Pilot 4.0*. W analizach wykorzystano proteomiczne bazy danych dla bakterii *Escherichia coli* oraz królika (*Oryctolagus cuniculus*).

7.22. Sekwencjonowanie NGS

Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. *new generation sequencing*) zastosowano jako metodę analizy DNA po immunoprecypitacji kompleksów DnaA-DNA (ChIP-seq). Eksperymenty immunoprecypitacji przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego z analizowanych warunków (przed stresem, w trakcie stresu oraz

po stresie – Metody 7.11), stosując odpowiednią kontrolę input DNA dla każdej próbki (Metody 7.20). W celu przygotowania bibliotek DNA oraz wykonania sekwencjonowania, otrzymane próbki DNA wysłano do firmy zewnętrznej Novogene (Wielka Brytania). Do sekwencjonowania fragmentów DNA wykorzystano sprzęt Illumina Novaseq 6000. Zastosowano sekwencjonowanie z obu końców DNA (ang. *pair-end*) o długości odczytów do 150 nukleotydów. Surowe dane ChIP-Seq wygenerowane w niniejszym badaniu zostały zdeponowane w bazie danych ArrayExpress pod kodem dostępu E-MTAB-14964²¹⁸. Dane sekwencjonowania zostały poddane kontroli jakości z wykorzystaniem programów bcl2fastq v2.20²¹⁹ i FastQC v0.11.5²²⁰.

7.23. Analiza danych ChIP-seq

Pełną analizę bioinformatyczną przeprowadzono przy użyciu pakietów R, takich jak EdgeR (3.30.3), normr (1.14.0) i csaw (1.22.1), a także programu MACS3 (3.0.0). Analizę danych ChIP-seq wiązania DnaA do DNA prowadzono we współpracy z dr Agnieszką Strzałką (Uniwersytet Wrocławski) przy użyciu wcześniej opublikowanego protokołu²²¹. Na rycinie 6C przedstawiono schemat analizy danych ChIP-seq. Mapowanie odczytów do sekwencji chromosomu *E. coli* wykonano przy użyciu z *Bowtie2* (wersja 2.3.5.1)²²². Wykorzystano sekwencję genomu *Escherichia coli* K12 podszczep MG1655 zdeponowaną w bazie NCBI pod numerem NC_000913. Po mapowaniu odczytów do sekwencji genomu referencyjnego wykorzystano program *SAMTools* (wersja 1.10)²²³, który służy do sortowania i indeksowania powstałych danych. Następnie przeprowadzono identyfikację pików, czyli obszarów w genomie, które zostały wzbogacone o dopasowane odczyty w wyniku przeprowadzenia eksperymentu immunoprecypitacji. W tym celu wykorzystano dwa podejścia: *MACS3*²²⁴ i pakiety programu R, *csaw*²²⁵ i *edgeR*²²⁶. Oba programy pozwalają na porównanie rozkładów odczytów w genomie w próbkach po immunoprecypitacji i próbkach input i identyfikują regiony, w których sygnał znacznie odbiega od tła. Proces ten prowadzi do identyfikacji miejsc wiązania DNA przez białko. W przypadku programu *MACS3* wykorzystano dane z próbek input jako kontrole i opcję szerokiego szukania pików (ang. *broad option*). Do dalszych etapów analizy wykorzystano piki o współczynniku zmiany (ang. *fold*) o wartości większej niż 2 i wartości oceny (ang. *score*) większej niż 5000. Pierwszy parametr oznacza stosunek zmiany w stosunku do wartości referencyjnej, zaś drugi odnosi się do statystycznej miary, wyrażanej jako

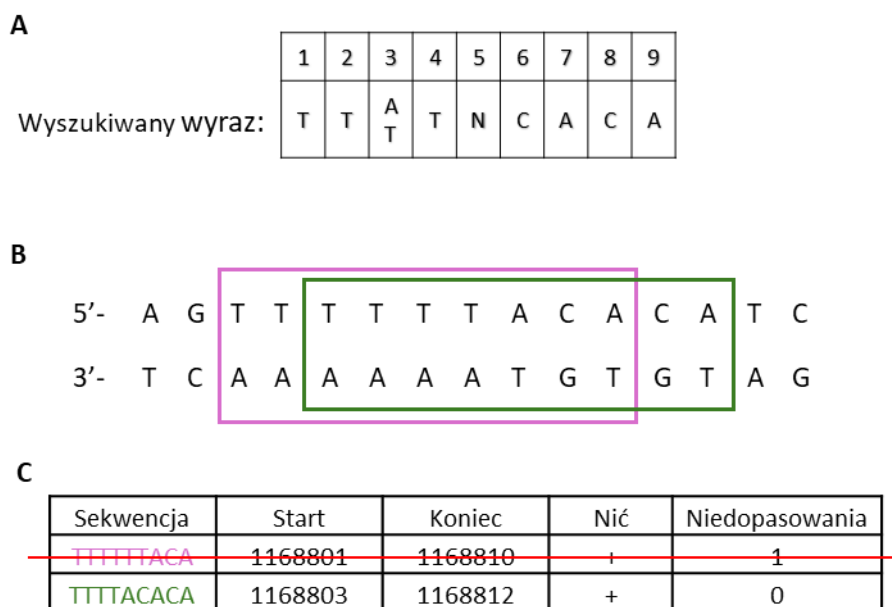
$-10 * \log_{10}(p - value)$, która pomaga określić istotność sygnału. Drugim podejściem identyfikacji miejsc wiązania białka w analizie ChIP-seq było wykorzystanie pakietów *csaw* i *edgeR*, co jest opisane w wyżej wspomnianym protokole²²¹. Statystycznie istotne wzmocnienia sygnału (piki) w zmapowanych odczytach identyfikowano w obrębie przesuwającego się okna o długości 69 pz, przesuwającego się o 23 pz. Wyniki filtrowano metodą lokalną z pakietu *edgeR*, która porównuje w regionie liczbę odczytów z tłem obliczonym w oknie o długości 2000 pz. Do dalszej analizy wykorzystano jedynie piki z $\log_{2}FC$ (ang. *log2-fold change*) wyższym od 2. Każde okno zostało przetestowane przy użyciu testu QLF (ang. *quasi-likelihood F-test*)²²⁷. Regiony oddalone od siebie o mniej niż 100 par zasad połączono i obliczono łączną wartość prawdopodobieństwa testowego (p-value) dla każdego regionu. Tylko regiony o wartościach współczynnika fałszywego odkrycia (FDR, ang. *false discovery rate*) poniżej 0,05 uznano za powiązane w sposób różnicowy między próbkami DNA po immunoprecypitacji, a wyjściowym DNA. Dalsze analizy oraz graficzne prezentacje wyników ChIP-seq prowadzono z wykorzystaniem programu R studio oraz MS Excel. Diagramy Venna przygotowano za pomocą programu *eulerAPE*²²⁸.

7.24. Wyszukiwanie sekwencji DnaA-box i DnaA-box-podobnych w genomie *E. coli*

W celu wyszukania sekwencji DnaA-box i DnaA-box-podobnych w genomie *E. coli* użyto dostosowanego skryptu opartego na algorytmie przesuwającego się okna (ang. *sliding window*) w programie Python. Jako wyraz do wyszukiwania w dziewięcio-nukleotydowym oknie podano sekwencje najwyższej zgodności *R-type* DnaA-box oraz *perfect* DnaA-box (Tabela 6, Materiały 6.6). Zezwolono na zapisywanie wyników idealnie pasujących do wyszukiwanego wyrazu, z 1 lub maksymalnie 2 niedopasowaniami. Skrypt Python powstał dzięki współpracy z mgr. Igorem Grochowiną. Nachodzące na siebie sekwencje DnaA-box, czyli takie, w których początek jednej sekwencji DnaA-box był oddalony od początku następnej o mniej niż 9 nukleotydów, usuwano. Przy usuwaniu nachodzących na siebie wyników wyszukiwania wybierano ten z większą liczbą niedopasowań. Przykład przedstawiono na rycinie poniżej (Rycina 7).

Mając rozmieszczenie sekwencji DnaA-box i DnaA-box-podobnych na chromosomie bakteryjnym, obliczono gęstość ich rozmieszczenia przy użyciu wartości b , zdefiniowanej jako $b = 1/d$, gdzie d oznacza sumę odległości między daną sekwencją

DnaA-box, a jej dwoma najbliższymi sąsiadami, zgodnie z metodą opisaną w pracy Mackiewicz i wsp.²²⁹. Wyższa wartość b wskazuje na większą lokalną gęstość sekwencji DnaA-box i sugeruje obecność skupiska składającego się z co najmniej trzech sekwencji



Rycina 7. Schemat wyszukiwania regionów DNA zawierających sekwencje DnaA-box. (A) Przykład sekwencji DnaA-box długości 9 par zasad wykorzystanej w skrypcie jako wyszukiwany wyraz. (B) Przykładowy wynik wyszukiwania wyrazów w genomie *E. coli* przedstawiający dwa nachodzące na siebie wyniki (zaznaczone fioletową i zieloną ramką). (C) Przykład postępowania w przypadku znalezienia przez algorytm dwóch nachodzących na siebie wyrazów. Wynik zawierający więcej niedopasowań do wyszukiwanego wyrazu zostawał usunięty z listy wyników (czerwone przekreślenie). Start i koniec oznaczają pozycję znalezionego wyrazu względem genomu referencyjnego. W kolumnie „Niść” plusem (+) oznaczano wyraz znaleziony w sekwencji nici wiodącej, a minusem (-) nici opóźnionej.

7.25. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (qPCR)

ChIP-qPCR

Pary starterów używanych w qPCR (Materiały 6.3) zaprojektowano z wykorzystaniem programu Primer Blast²¹², uwzględniając specyficzność wiązania zaprojektowanych starterów względem sekwencji genomu *Escherichia coli* K12. Określono efektywność przyłączania starterów w reakcji PCR, za pomocą krzywej standardowej przygotowanej na matrycy DNA (od 10 ng do 10 fg chromosomalnego DNA *E. coli*

MG1655 lub plazmidu RK2). Efektywność przyłączania starterów wyliczono według poniższego wzoru

$$Efektywność (\%) = \left(10^{\frac{-1}{slope}} - 1 \right) \times 100,$$

gdzie *slope* oznacza nachylenie krzywej wartości Ct (ang. *cycle threshold*) do ilości matrycy DNA. Do analiz wykorzystano tylko pary starterów wykazujące efektywność przyłączania wynoszącą 100 % ±20 %. Reakcje qPCR przeprowadzano w objętości 10 µL przy użyciu mieszaniny *Luna Universal qPCR Master Mix* (New England Biolabs, USA) na platformie *LightCycler® 480* (Roche, Szwajcaria). Do gotowej mieszanki PCR zawierającej barwnik SYBRGreen dodawano matrycę DNA (0,5 µl) oraz startery (250 nM). Parametry reakcji zebrano w tabeli poniżej (Tabela 10).

Tabela 10. Temperatury oraz czasy etapów ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (qPCR)

	Temperatura	Czas
1. Wstępna denaturacja	95°C	3 min
2. Denaturacja	95°C	5 s
3. Hybrydyzacja starterów	60°C	10 s
4. Elongacja	72°C	10 s
5. Odczyt fluorescencji		
Powtórzenie kroków 2-5 45x		
Krzywa topnienia	95°C	5 s
	65°C	1 min
	95°C	∞

Krzywa topnienia została włączona do protokołu qPCR w celu oceny specyficzności amplifikowanych produktów. Każdą reakcję qPCR wykonano w przynajmniej 3 powtórzeniach technicznych. Otrzymane dane analizowano porównując ilość DNA o określonej sekwencji w próbce po immunoprecypitacji względem ilości DNA o tej samej sekwencji w próbce input. Stosowano również kontrolę w postaci pomiaru liczby fragmentów DNA o sekwencji, która nie powinna być wiązana przez immunoprecypitowane białko (region *terC* znajdujący się na chromosomie *E. coli* MG1655 lub *upf* na plazmidzie RK2). W celu normalizacji wyniku względem otrzymanego tła, obliczano stosunek

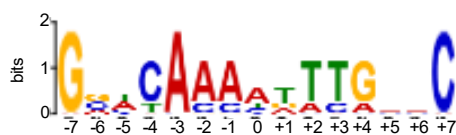
(*oriC* ChIP / *oriC* input) do (*terC* ChIP / *terC* input) lub (*oriV* ChIP / *oriV* input) do (*upf* ChIP / *upf* input).

Oznaczanie relatywnej ilości oriC i oriV w hodowlach bakteryjnych

Próbki hodowli bakteryjnych, każda o objętości 0,5 ml, wirowano (2500 g/ 5 min/ RT), usuwano pożywkę i zawieszono w 200 µl wody wolnej od DNaz i RNaz. Bakterie poddawano lizie poprzez gotowanie w temperaturze 95°C przez 10 minut. Następnie dodawano wodę do końcowej objętości 1 ml i próbki sonikowano przez 2 minuty w cyklach 10 s ON/ 10 s OFF. Następnie, 0,5 µl otrzymanego lizatu komórkowego dodawano do mieszaniny *Luna Universal qPCR Master Mix* (New England Biolabs, USA) ze starterami (250 nm) komplementarnymi do fragmentów DNA *oriC* lub *oriV* (Materiały 6.3). Reakcje przeprowadzano w końcowej objętości 10 µl w urządzeniu LightCycler® 480 (Roche, Szwajcaria) przy użyciu tego samego protokołu, co w przypadku próbek ChIP-qPCR (Tabela 10). Wyniki analizowano przy użyciu metody porównawczej $\Delta\Delta C_t$ względem próbki przez dodaniem SHX (T_0). Próbki pobierano w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego z analizowanych warunków. Każdą reakcję qPCR przeprowadzono w trzech powtórzeniach technicznych.

7.26. Wyszukiwanie potencjalnych miejsc wiązania białka Fis w regionie *oriV*

Aby zidentyfikować potencjalne miejsca wiązania białka Fis w regionie *oriV* plazmidu RK2 przeprowadzono analizę bioinformatyczną z wykorzystaniem programu MEGA-X²³⁰. Jako sekwencje odniesienia użyto pięciu znanych motywów wiązanych przez białko Fis, pochodzących m.in. z regionu *oriC* chromosomu *E. coli*, faga λ , promotora *fis* oraz sekwencji biorących udział w rekombinacji zależnej od Hin. Na podstawie tych sekwencji, przy użyciu narzędzia MEME Tomtom²³¹, przygotowano wzorcowe logo motywu wiążanego przez białko Fis (Rycina 8). Następnie w programie MEGA-X wykonano zestawienie wybranych motywów nukleotydowych z sekwencją *oriV* plazmidu RK2, identyfikując lokalne dopasowanie kandydujące na miejsca wiązania Fis.

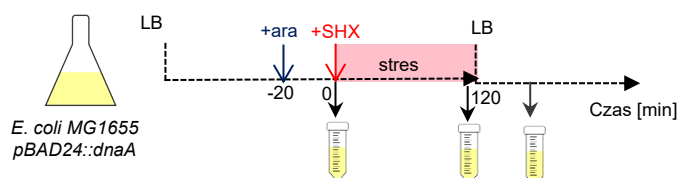


Rycina 8. Logo sekwencji znanych motywów nukleotydowych wiązanych przez białko Fis. Logo przedstawia motyw utworzony na podstawie zestawienia 5 opisanych w literaturze sekwencji DNA wiązanych przez białko Fis. Analizę przeprowadzono przy użyciu narzędzia MEME Tomtom. Sekwencje wykorzystane do stworzenia logo, posłużyły także jako wzorzec do identyfikacji potencjalnych miejsc wiązania białka Fis w regionie *oriV*.

7.27. Analiza poziomu acetylacji białka DnaA *in vivo*

Bakterie *E. coli* MG1655 niosące plazmid pBAD24::*dnaA* (Materiały 6.2) hodowano tak samo jak opisano w rozdziale Metody 7.11 z jedną modyfikacją. Na 20 minut przed osiągnięciem gęstości optycznej (OD_{600}) hodowli wynoszącej 0.6, dodawano do hodowli roztwór arabinozy o końcowym stężeniu 0.2 %. Schemat otrzymywania próbek przedstawia rycina 9. Komórki osadzano przez wirowanie i płukano w buforze 1xTBS. Następnie komórki zawieszano w 1 ml buforu LS (0,5 M NaCl; 50 mM KPi, pH 8; 2 mM imidazol; 0,1 % TritonX-100) z lizozymem (10 mg/ml) i inkubowano przez 30 minut na lodzie. Próbkę poddawano sonikacji przy użyciu aparatu *Sonicator Vibra Cell VCX500* (Sonics, USA) przez łączny czas 2 minut w cyklach 10 s ON/ 30 s OFF. W celu usunięcia pozostałości komórkowych, lizat wirowano (20000 g/ 10 min/ 4°C). Do probówek typu Eppendorf o objętości 1,5 ml pobierano 150 µl złoży agarozowego *Protino Ni-NTA* (Macherey-Nagel, Niemcy). Złoże dwukrotnie przepłukiwano wodą destylowaną, a następnie równoważono buforem LS. Na złoże nanoszono supernatant po wirowaniu lizatów bakteryjnych. Wiązanie białek z ogonkiem histydynowym do złoży przeprowadzano przez godzinę w temperaturze 7°C z mieszaniem 20 obr. /min. Następnie złoże wirowano i płukano dwukrotnie buforem W (0,5 M NaCl; 50 mM KPi, pH 8; 20 mM imidazol; 0,1 % TritonX-100) i ST (0,5 M L-kwas glutaminowy; 45 mM Hepes, KOH, pH 7,6; 10 mM Mg(OAc)₂; 0,5 mM EDTA; 20 % sacharoza; 0,1 % TritonX-100). Elucję białek ze złoży wykonano poprzez dodanie do próbki 35 µl buforu E500 (0,5 M L-kwas glutaminowy; 45 mM Hepes, KOH, pH 7,6; 10 mM Mg(OAc)₂; 0,5 mM EDTA; 5 % sacharoza; 0,1 % TritonX-100, 500 mM imidazol) i 30-minutową inkubację w temperaturze 7°C z mieszaniem 20 obr. / min. Na wszystkich etapach pracy ze złożem stosowano parametry wirowania 1500 g/ 2 min/ 4°C. Poziom acetylacji białka DnaA w komórkach określano metodą Western Blot z użyciem

przeciwciał anty-AcK i anty-HisTag (Materiały 6.5.2, Metody 7.15). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.



Rycina 9. Schemat warunków i czasów pobierania próbek hodowli bakteryjnej w analizach poziomu acetylacji białka *DnaA* in vivo. Na schemacie zaznaczono czas dodania do hodowli roztworu arabinozy (niebieska strzałka) oraz SHX (czerwona strzałka). Kolorem różowym oznaczono czas hodowli prowadzonej w głodzie aminokwasowym.

7.28. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne wykonywano w programie R. Dobór testu został dostosowany do charakteru danych i został podany w opisie poszczególnych rycin. Wyniki przedstawiano na wykresach z oznaczeniami istotności: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, n.s.– brak istotności. Analizie statystycznej poddano wyłącznie próby o liczebności $n > 3$, gdzie możliwa była wiarygodna ocena rozkładu danych.

8. WYNIKI

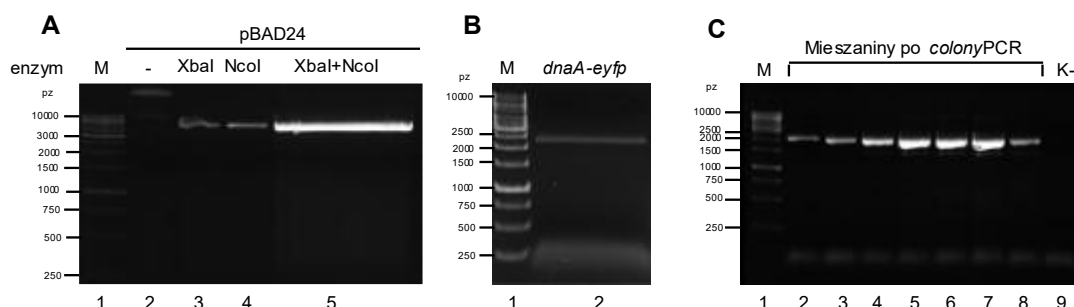
8.1. Określenie aktywności białka DnaA-EYFP

Do badań lokalizacji białka DnaA w komórkach *E. coli* potrzebowałam wariantu białka umożliwiającego obserwację w żywych komórkach, a jednocześnie który nie zakłócałby natywnej aktywności białka DnaA. Ponieważ, wcześniejsze badania wykazały, że zastąpienie fragmentu genu *dnaA*, kodującego drugą domenę białka, sekwencją *eyfp* nie wpływa na proces replikacji DNA ani na długość komórek *E. coli*⁶⁸, rozważyłam wykorzystanie białka DnaA-EYFP do analiz lokalizacji. Aby upewnić się, że taki wariant zachowuje właściwości funkcjonalne charakterystyczne dla białka typu dzikiego, oczyściłam preparat DnaA-EYFP i sprawdziłam jego aktywność *in vitro*.

Otrzymanie konstruktów do nadprodukcji białka DnaA-EYFP

Białko DnaA z ogonkiem histydynowy jest rutynowo oczyszczane w Zakładzie Biologii Molekularnej. Do nadprodukcji białka typu dzikiego wykorzystywany jest plazmid pBAD24::*dnaA* (Materiały 6.2). Postanowiłam wykorzystać ten sam wektor ekspresyjny do nadprodukcji białka fluorescencyjnego DnaA-EYFP. Do skonstruowania wektora wybrałam klonowanie metodą Gibsona²¹³ (Metody 7.6). W tej metodzie wektor musi zostać zlinearyzowany poprzez trawienie enzymami restrykcyjnymi lub amplifikację metodą PCR, aby umożliwić efektywne wstawienie pożądanego fragmentu DNA. Linearyzację plazmidu pBAD24 przeprowadziłam poprzez podwójne trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi XbaI i NcoI. Produktem tej reakcji enzymatycznej był liniowy fragment DNA o długości 4510 pz (Rycina 10A). Do powielenia wstawki DNA zawierającej gen *dnaA-eyfp* wykorzystałam PCR (Metody 7.5). Jako matrycę wykorzystałam genomowy DNA bakterii *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp*. Do sekwencji startera przyłączającego się do nici dolnej dodałam sekwencje kodującą ogonek histydynowy (6xHis). Jako wynik PCR otrzymałam liniowy fragment DNA o długości 2206 pz (Rycina 10B). Otrzymane fragmenty DNA zostały poddane reakcji Gibsona, a następnie wtransformowane do chemikompetentnych komórek *E. coli* DH5α (Materiały 6.1 i Metody 7.4). Wybrane komórki bakteryjne tworzące kolonie zostały poddane weryfikacji metodą colony PCR (Metody 7.5). Otrzymanie po reakcji produktu DNA o długości 2279 świadczyło o obecności wektora pBAD24::*dnaA-eyfp* w komórkach poddanych weryfikacji (Rycina 10C). Wynik

klonowania potwierdziłam również poprzez sekwencjonowanie plazmidowego DNA (Metody 7.6). Sekwencjonowanie potwierdziło otrzymanie wektora pBAD24 z fragmentem DNA kodującym białko DnaA-EYFP z ogonkiem histydynowy na C końcu białka.

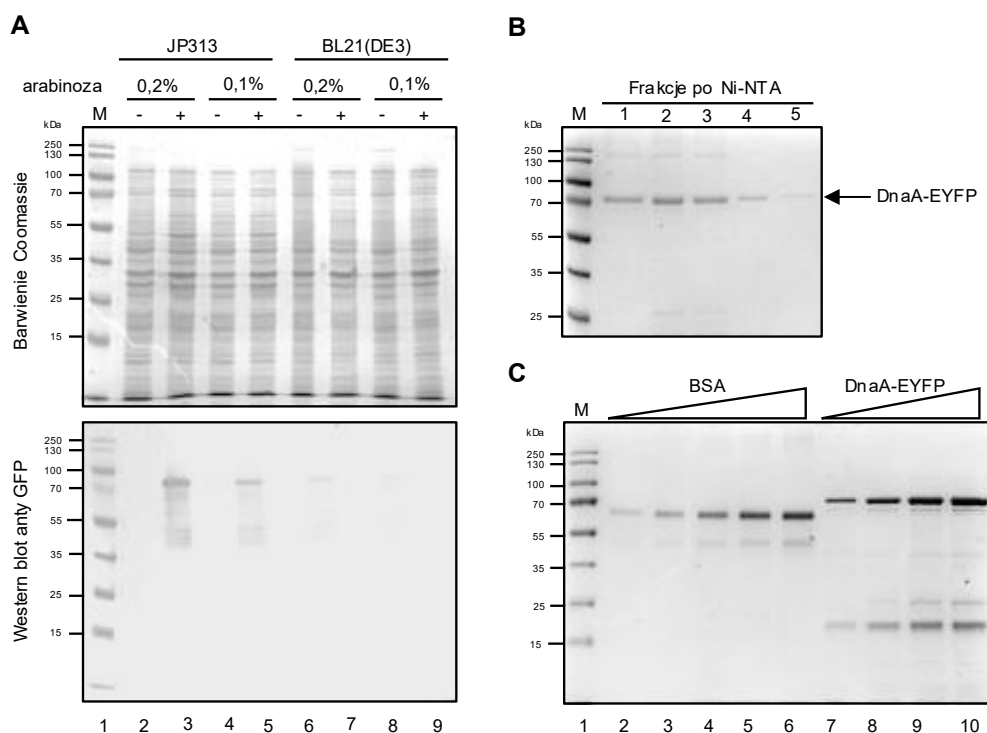


Rycina 10. Otrzymanie wektora ekspresyjnego pBAD24::dnaA-eyfp-his metodą klonowania Gibsona. (A) Wynik trawienia restrykcyjnego wektora pBAD24 za pomocą enzymów restrykcyjnych XbaI (ścieżka 3), NcoI (ścieżka 4) lub oboma enzymami (ścieżka 5). Jako kontrolę negatywną wykorzystano mieszaninę bez enzymów restrykcyjnych (ścieżka 2). (B) Produkt otrzymany po amplifikacji genu *dnaA-eyfp* metodą PCR z wykorzystaniem starterów z końcami komplementarnymi do wektora pBAD24. (C) Wynik weryfikacji obecności wektora pBAD24::dnaA-eyfp za pomocą colony PCR przeprowadzonej na lizatach komórek bakteryjnych tworzących kolonie na podłożu stałym z ampicyliną (ścieżki 2-8). Reakcja bez matrycowego DNA została wykorzystana jako kontrola negatywna (ścieżka 9). Na wszystkich panelach, w pierwszej ścieżce widać rozdzielony marker molekularny GeneRuler 1 kb DNA Ladder (M).

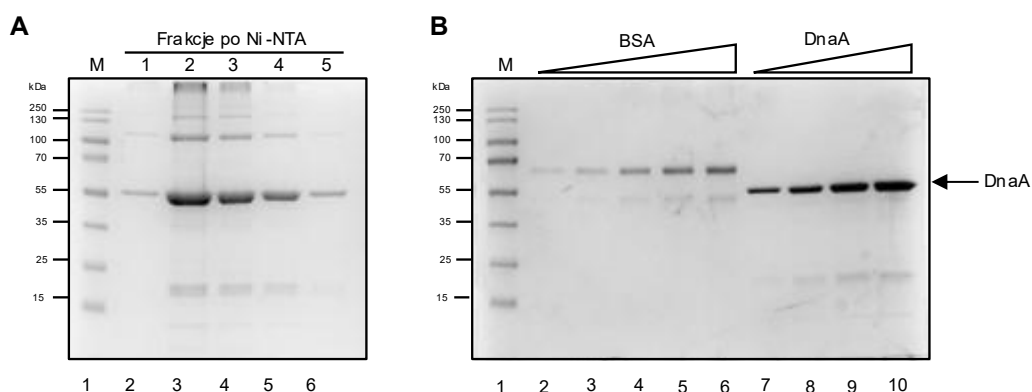
Nadprodukcja i oczyszczenie białka DnaA-EYFP

Najbardziej rozpowszechnionym szczepem *E. coli* do nadprodukcji białek jest BL21(DE3) (Materiały 6.1). Komórki tego szczepu wykazują wysoką wydajność procesu nadprodukcji białka ze względu na niedobór dwóch kluczowych proteaz (Lon i OmpT). Jednakże indukcja ekspresji genu *dnaA* kontrolowana przez promotor arabinozowy wydajniejsza jest w komórkach szczepu *E. coli* JP313 (Materiały 6.1). Komórki tego szczepu posiadają delecję części operonu arabinozowego przez co nie mogą wykorzystywać arabinozy jako źródła węgla. Co ciekawe, komórki te charakteryzuje również niedobór białka RelA, czyli enzymu odpowiedzialnego za syntezę ppGpp oraz uruchomienie odpowiedzi ścisłej^{39,40}. Przetestowałam, który z wyżej wymienionych szczepów będzie wydajniejszy w nadprodukcji białka rekombinowanego DnaA-EYFP. Chemikompetentne komórki *E. coli* BL21(DE3) lub *E. coli* JP313 transformowałam plazmidem pBAD24::dnaA-eyfp (Metody 7.4). Następnie przeprowadziłam nadprodukcję białka w małej objętości hodowli zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Metody 7.7. Do indukcji

ekspresji genu *dnaA-eyfp* wykorzystałam arabinozę w dwóch stężeniach: 0,1% oraz 0,2%. Pobrałam próbki hodowli komórkowych przed dodaniem arabinozy i po 2-godzinnej nadprodukcji białka. Próbki rozdzieliłam w dwóch żelach akrylamidowych, jeden analizowałam za pomocą barwienia Coomassie (Metody 7.14, Rycina 11A, górny panel), a drugi za pomocą techniki Western Blot z wykorzystaniem przeciwciał anty-GFP (Metody 7.15, Rycina 11B, dolny panel). Wyniki analizy pokazały, że nadprodukcja białka DnaA-EYFP, o oczekiwanej masie molekularnej 80 kDa, najwydajniej zachodzi w komórkach *E. coli* JP313 przy wykorzystaniu arabinozy o końcowym stężeniu 0,2% (Rycina 11A, ścieżka 3). To właśnie te warunki zastosowałam celem nadprodukcji i oczyszczenia białka DnaA-EYFP. Po wykonanej nadprodukcji, oczyściłam preparat białka DnaA-EYFP zgodnie z protokołem wykorzystywanym rutynowo w Zakładzie Biologii Molekularnej (Metody 7.7, Rycina 11B). Stężenie otrzymanego preparatu białka DnaA-EYFP wynosiło 9 μ M (727 ng/ μ l, M=80 kDa) (Metody 7.8, Rycina 11C). Postępując w ten sam sposób, oczyściłam również białko DnaA typu dzikiego otrzymując preparat o stężeniu 13,8 μ M (719 ng/ μ l, M=55 kDa) (Rycina 12).



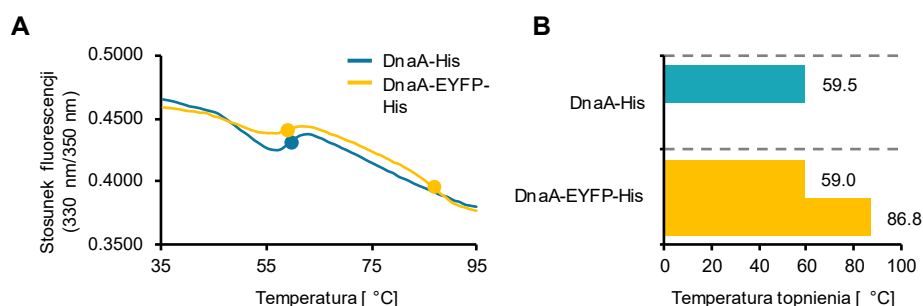
Rycina 11. Nadprodukcja oraz oczyszczanie białka DnaA-EYFP. (A) Wynik rozdzielu SDS-PAGE lizatów komórek *E. coli* JP313 lub *E. coli* BL21(DE3) niosących plazmid pBAD24::*dnaA-eyfp* (górny panel). Próbkę zostały pobrane przed dodaniem arabinozy i po 2-godzinnej nadprodukcji białka z wykorzystaniem arabinozy o końcowym stężeniu 0,2 lub 0,1%. Te same próbki zostały poddane analizie Western Blot z wykorzystaniem przeciwciał anty-GFP (dolny panel). (B) Zdjęcie żelu SDS-PAGE, w którym rozdzielono frakcje zebrane podczas elucji białka DnaA-EYFP-His ze złoża Ni-NTA. Wizualizacja białek w żelu nastąpiła poprzez barwienie Coomassie. Strzałką zaznaczono prążek odpowiadający białku o masie około 80 kDa. (C) Zdjęcie żelu stężeniowego SDS-PAGE ze wzorcem BSA (ścieżki 2-6) zastosowanego do wyznaczenia stężenia preparatu białka DnaA-EYFP (ścieżki 7-10). Ilości BSA użyte w krzywej wzorcowej to 150, 250, 500, 750 i 1000 ng. W ścieżkach 7-10 rozdzielono 1, 2, 3 i 4 μ l preparatu białka DnaA-EYFP. Na wszystkich panelach, w pierwszej ścieżce widać rozdzielony marker molekularny PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (M).



Rycina 12. Oczyszczanie białka DnaA typu dzikiego. (A) Zdjęcie żelu SDS-PAGE, w którym rozdzielono frakcje zebrane podczas elucji białka DnaA-His ze złoża Ni-NTA. Wizualizacja białek w żelu nastąpiła poprzez barwienie Coomassie. (C) Zdjęcie żelu stężeniowego SDS-PAGE ze wzorcem BSA (ścieżki 2-6) zastosowanego do wyznaczenia stężenia preparatu białka DnaA (ścieżki 7-10). Ilości BSA użyte w krzywej wzorcowej to 150, 250, 500, 750 i 1000 ng. W ścieżkach 7-10 rozdzielono 1, 2, 3 i 4 μ l preparatu białka DnaA. Strzałką zaznaczono prążek odpowiadający białku o masie około 55 kDa. Na wszystkich panelach, w pierwszej ścieżce widać rozdzielony marker molekularny PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (M).

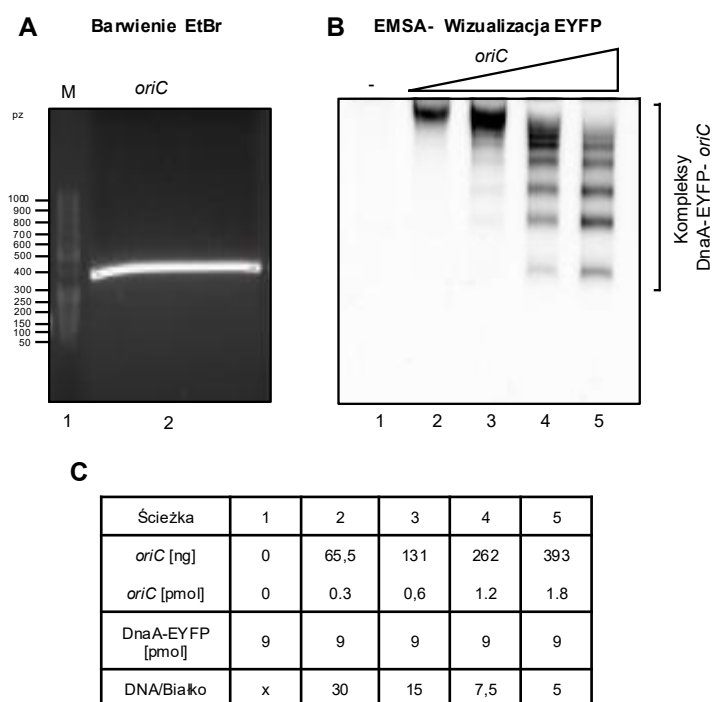
Weryfikacja aktywności białka DnaA-EYFP *in vitro*

Porównałam stabilność termiczną i wyznaczyłam temperatury topnienia otrzymanych białek za pomocą pomiarów wewnętrznej fluorescencji (długości fali emisji 330 i 350 nm) w funkcji temperatury (Metody 7.9). Białko DnaA-EYFP wykazywało profil wewnętrznej fluorescencji o zbliżonym kształcie do profilu fluorescencji białka typu dzikiego (Rycina 13A). Wyznaczone temperatury topnienia były zbliżone dla obu białek i wynosiły odpowiednio 59°C oraz 59,5°C dla DnaA-EYFP oraz DnaA typu dzikiego (Rycina 13B). Dla białka DnaA-EYFP wykryto jeszcze jeden punkt przegięcia krzywej fluorescencji w funkcji temperatury w punkcie 86,8°C (Rycina 13). Najprawdopodobniej punkt ten odpowiada temperaturze denaturacji białka EYFP, ponieważ temperatura topnienia białka GFP, charakteryzującego się strukturą β -beczułki tak samo jak białko EYFP, wynosi 83°C²³².



Rycina 13. Porównanie profili topnienia białek DnaA-His i DnaA-EYFP-His. (A) Krzywe przedstawiające zmiany w stosunku sygnałów fluorescencji (350/330 nm) w funkcji temperatury dla białek DnaA-His (niebieska linia) i DnaA-EYFP-His (żółta linia), zmierzone za pomocą aparatu Tycho. Punkty zaznaczone na wykresie wskazują temperatury, przy których następuje przegięcie krzywej, czyli największa zmiana w strukturze białek odpowiadająca ich denaturacji. (B) Wykres słupkowy przedstawiający wartości temperatur topnienia wyznaczonych dla DnaA-His DnaA-EYFP-His za pomocą analizy w aparacie Tycho.

W celu potwierdzenia aktywności białka rekombinowanego DnaA-EYFP zweryfikowałam jego oddziaływanie z *oriC*. Wykonałam test EMSA (Metody 7.10) wykorzystując otrzymane białko fluorescencyjne oraz niewyznakowany fluorescencyjnie, dwuniciowy DNA zawierający sekwencje *oriC*. DNA o długości 345 pz otrzymałam poprzez PCR z wykorzystaniem starterów *oriC*_345bp_Frw/Rv (Materiały 6.3, Metody 7.5, Rycina 14A). W teście zastosowałam stałe stężenie białka oraz rosnące stężenie dsDNA. Podczas odczytu wyniku testu EMSA zaobserwowałam drabinkę prążków w żelu poliakrylamidowym, co świadczy o zdolności białka DnaA-EYFP do oddziaływania z *oriC* oraz tworzenia kompleksów nukleoproteinowych o wyższych stopniach oligomeryzacji (Rycina 14) co jest charakterystyczne dla interakcji DnaA z *oriC*. Obecność prążków wykazujących fluorescencję podczas wizualizacji żelu z wykorzystaniem protokołu dla białek żółtej fluorescencji (Metody 7.10) potwierdza także poprawne sfałdowanie i aktywność białka EYFP (Rycina 14).



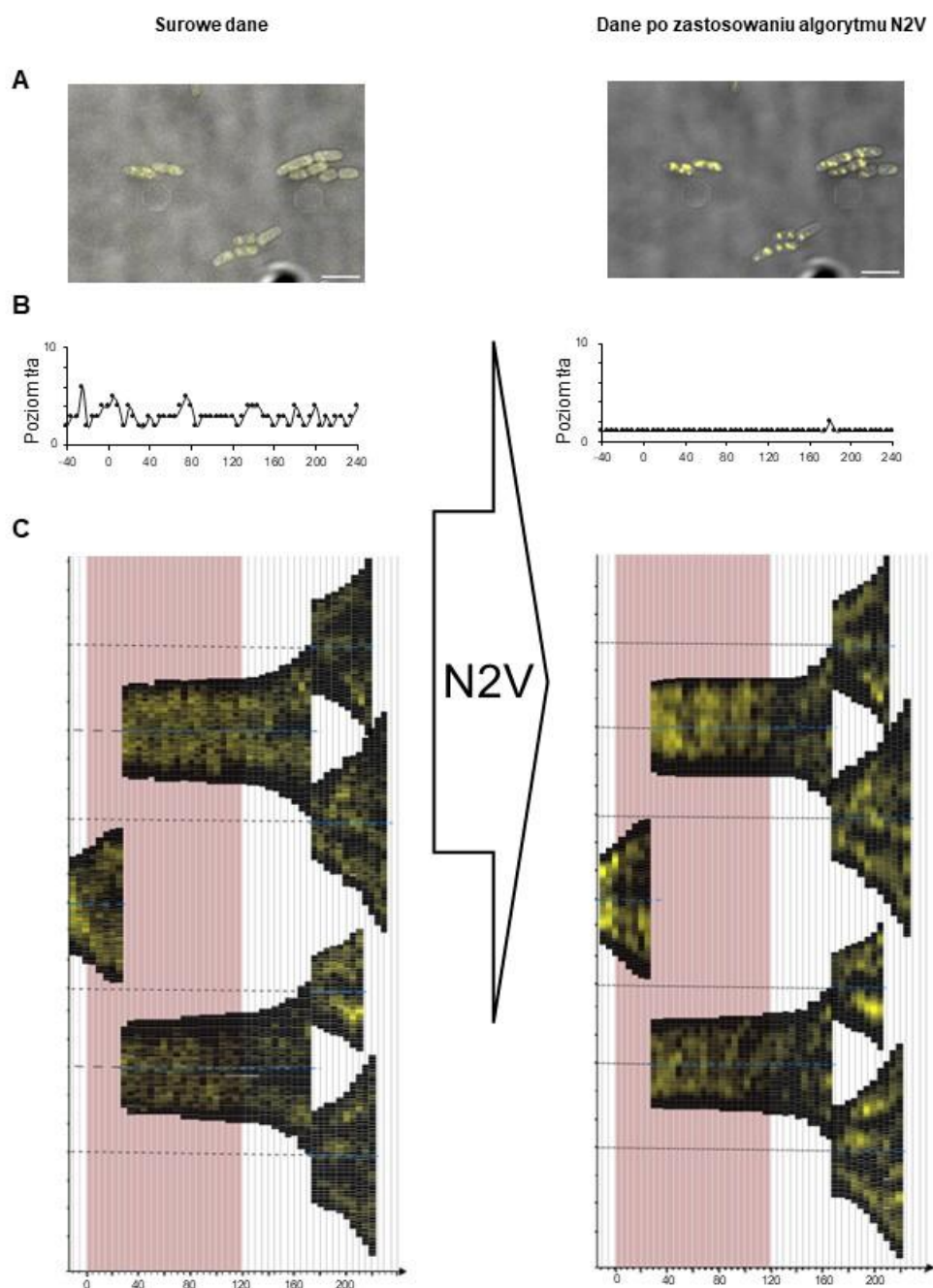
Rycina 14. Analiza oddziaływania białka DnaA-EYFP z *oriC* metodą EMSA. (A) Wynik rozdziału w żelu agarozowym mieszaniny po PCR z wykorzystaniem starterów komplementarnych do *oriC*. W pierwszej ścieżce rozdzielono marker GeneRuler 50 bp. Żel agarozowy został wybarwiony bromkiem etydyny. Widoczny prążek odpowiada dsDNA o długości 345 pz, który po oczyszczeniu z żelu został wykorzystany w teście EMSA (panel B). (B) Wynik testu EMSA z użyciem rosnących stężeń dsDNA *oriC* i stałego stężenia białka DnaA-EYFP. Ilości dsDNA i białka wykorzystane w reakcjach zestawiono poniżej (panel C). Wizualizacja prążków w żelu została przeprowadzona z wykorzystaniem protokołu do wizualizacji znacznika Alexa488 (Metody 7.10). (C) Zestawienie przedstawiające ilości dsDNA *oriC* oraz białka DnaA-EYFP wykorzystane w teście EMSA, którego wynik pokazano w panelu B. Na samym dole podano stosunek molowy dsDNA do białka.

Podsumowując, skonstruowany przeze mnie wektor ekspresyjny pozwolił na nadprodukcję oraz oczyszczenie białka fluorescencyjnego DnaA-EYFP przy zastosowaniu tego samego protokołu jak w przypadku oczyszczania białka DnaA typu dzikiego (Rycina 11 i Rycina 12). Struktura oczyszczonego białka rekombinowanego zawiera elementy struktury białka typu dzikiego oraz białka fluorescencyjnego (Rycina 13A). Stabilność termiczna oraz aktywność uzyskanego preparatu białka DnaA-EYFP są identyczne jak w przypadku białka typu dzikiego (Rycina 13B i Rycina 14).

8.2. Wykorzystanie algorytmu N2V do analizy zdjęć mikroskopowych i przygotowania kymografów

W eksperymentach mikroskopii fluorescencyjnej połączonej z techniką ujęć poklatkowych, obrazy uzyskane z kanału fluorescencyjnego poddane były procesowi obróbki z wykorzystaniem algorytmu N2V, który oparty jest na uczeniu maszynowym i służy do usuwania szumów z obrazów (ang. *denoising*)²⁰⁹. Zanim jednak zastosowałam ten algorytm do analizy wszystkich uzyskanych danych, sprawdziłam jego wpływ na jakość obrazów mikroskopowych oraz przede wszystkim na wzór lokalizacji białka DnaA w komórkach. Aby zwizualizować wpływ algorytmu N2V na dane z doświadczeń mikroskopii fluorescencyjnej, zestawiałam przykładowe zdjęcia, wartości poziomu tła oraz kymografy przed oraz po zastosowaniu algorytmu N2V (Rycina 15). Wykorzystałam zdjęcia bakterii *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* wykonane podczas doświadczeń mikroskopii poklatkowej (Rycina 15A). Poziom intensywności tła przedstawiłam mierząc intensywność fluorescencji w miejscu po za komórką bakteryjną (Rycina 15B). Kymografy zostały przygotowane zarówno z danych przed jak i po działaniu algorytmu N2V (Rycina 15C). Zestawienie pokazuje, że po zastosowaniu algorytmu N2V, następuje wyraźna poprawa widoczności skupisk fluorescencji na zdjęciach mikroskopowych (Rycina 15A). Poziom tła podczas całego eksperymentu, przed zastosowaniem algorytmu oscylował między 2 a 6 stopniem intensywności fluorescencji mierzonej w skali szarości (Rycina 15B, lewy panel). Zastosowanie algorytmu N2V wyrównało poziom tła do wartości 1 (Rycina 15B, prawy panel). Zestawienie kymografów pokazuje, że charakterystyczny wzór lokalizacji białka DnaA jest łatwiej dostrzegalny po działaniu algorytmu (Rycina 15C). Co istotne, działanie algorytmu nie wpływa na sam wzór wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka, a jedynie podbija jego widoczność. Podsumowując, wykorzystanie algorytmu N2V

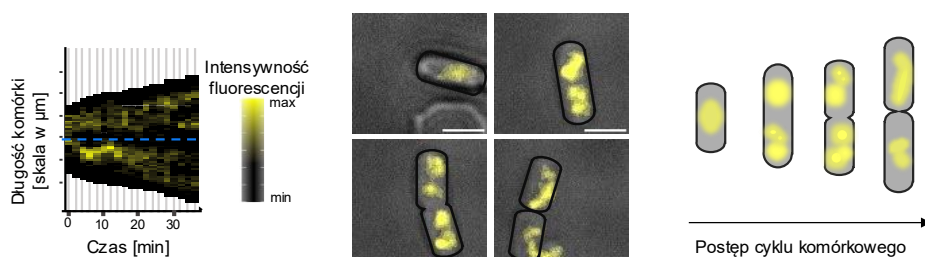
poprawia widoczność skupisk fluorescencji, poprzez wyrównanie poziomu tła, nie wpływając przy tym na wzór wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka DnaA przedstawiony za pomocą kymografów. Dlatego algorytm ten uznałam za odpowiedni do prezentacji danych i zastosowałam go we wszystkich analizach obrazów uzyskanych techniką mikroskopii poklatkowej opisanych w dalszej części pracy.



Rycina 15. Analiza zdjęć otrzymanych podczas mikroskopii fluorescencyjnej techniką ujęć poklatkowych z wykorzystaniem algorytmu Noise2Void. (A) Przykładowe zdjęcia komórek bakterii *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* przed (po lewej) i po zastosowaniu algorytmu N2V (po prawej). Podziałka liniowa, 5 μm . (B) Wykresy intensywności tła fluorescencji przed oraz po zastosowaniu algorytmu N2V. (C) Kymograf ilustrujący lokalizację białka DnaA-EYFP w reprezentatywnej komórce i jej dwóch kolejnych generacjach (patrz opis Rycina 17) przygotowany z danych przed i po zastosowaniu algorytmu N2V.

8.3. Lokalizacja białka DnaA w komórkach *E. coli* w warunkach optymalnych

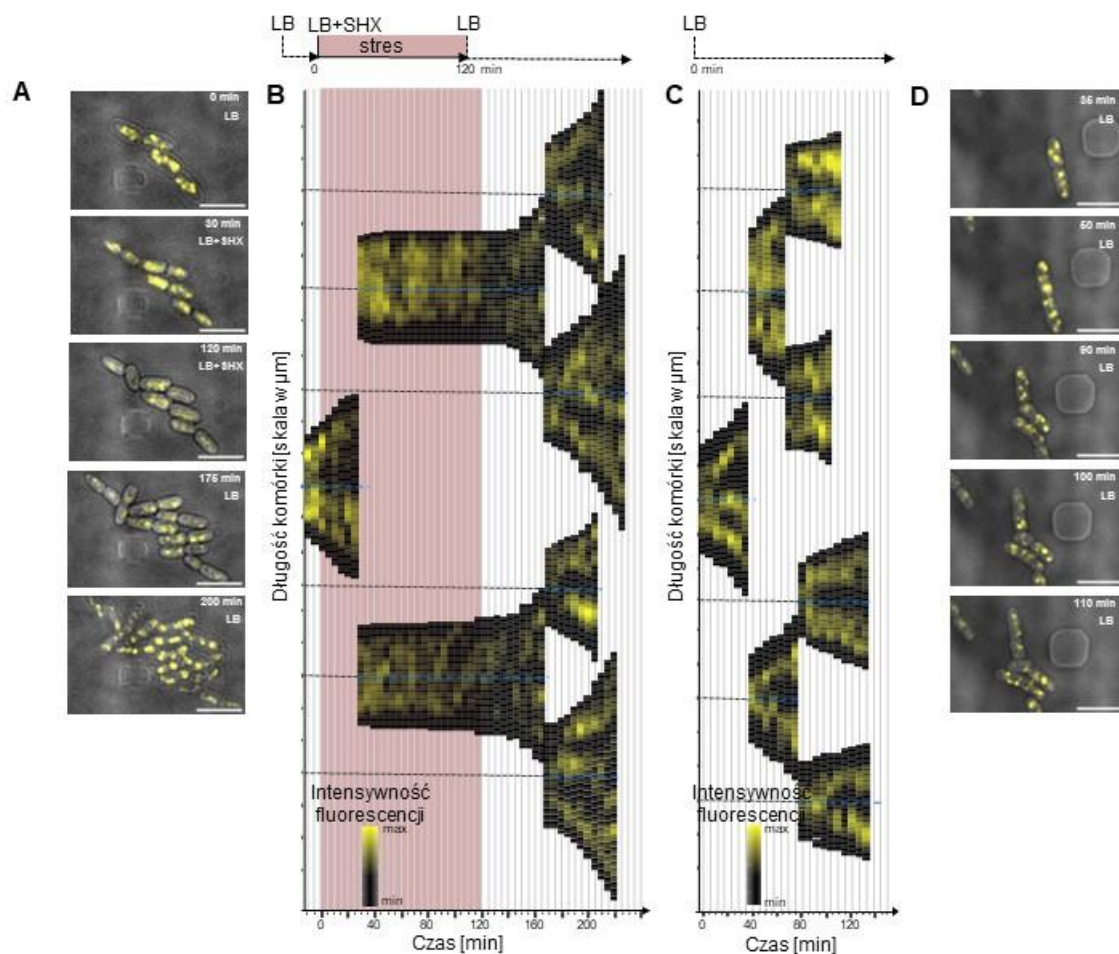
Wiadomo, że białko DnaA pełni centralną rolę w procesie inicjacji replikacji DNA, a jego lokalizacja zależna jest od etapu cyklu komórkowego⁶⁸. Aby zaobserwować zmiany lokalizacji białka DnaA w warunkach optymalnych w trakcie cyklu komórkowego, wykorzystałam mikroskopię fluorescencyjną połączoną z techniką ujęć poklatkowych oraz systemem mikroprzepływowym (Metody 7.1). W analizach wykorzystałam komórki szczepu *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp*. Podczas analiz zapewniony był przepływ pożywki optymalnej LB do komory obserwacyjnej, a zdjęcia były wykonywane w 2-minutowych interwałach (Metody 7.1). Zaobserwowałam, że na początku cyklu komórkowego, tuż po podziale komórkowym, fluorescencja białka DnaA-EYFP lokalizowała się w centralnej części komórki. Wraz z wydłużaniem się komórki obserwowałam od dwóch do sześciu skupisk białka DnaA-EYFP, znajdujących się w pozycjach około $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$ od bieguna komórki (Rycina 16). Nie zaobserwowałam fluorescencji białka DnaA-EYFP w pobliżu biegunów komórek. Lokalizację białka DnaA w warunkach optymalnych zilustrowałam kymografem przygotowanym dla reprezentatywnej komórki hodowanej w pożywce LB (Rycina 16, lewy panel). W tej pracy na kymografach, intensywność fluorescencji białka DnaA-EYFP zestawiałam względem długości komórki mierzonej w μm (oś OY) oraz czasu mierzonego w minutach (oś OX). Sygnał fluorescencji białka DnaA-EYFP przedstawiłam w skali barw, gdzie niższe wartości oznaczałam odcieniami szarości, a wyższe kolorem żółtym.



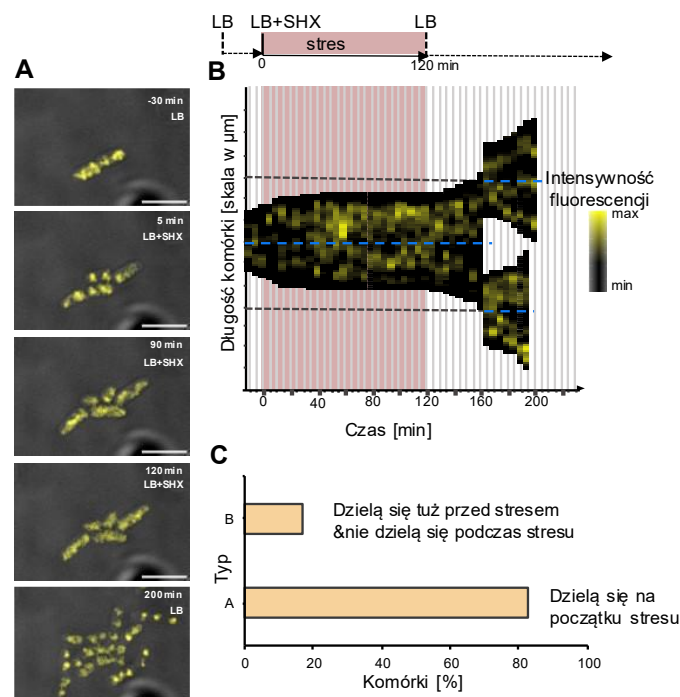
Rycina 16. Lokalizacja białka DnaA-EYFP w komórce bakteryjnej hodowanej w warunkach optymalnych. Mikroskopia fluorescencyjna połączona z interwałową techniką ujęć poklatkowych została wykorzystana do obserwacji lokalizacji białka DnaA-EYFP w komórkach *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* przy stałym przepływie optymalnej pożywki LB i temperaturze 30°C. Zdjęcia były wykonywane w 2-minutowych interwałach (Metody 7.1). Na lewym panelu pokazano kymograf przedstawiający lokalizację białka DnaA-EYFP w pojedynczej reprezentatywnej komórce. Jeden odcinek podziałki osi OY odpowiada 1 μm . Zbieranie danych rozpoczęło się natychmiast po podziale komórki i trwało do następnego podziału. Pokazano także reprezentatywne zdjęcia i model wewnątrzkomórkowej lokalizacji DnaA w trakcie cyklu komórkowego. Dla przejrzystości, na zdjęciach zaznaczono kontury komórek. Podziałka liniowa, 2 μm .

8.4. Lokalizacja białka DnaA w komórkach *E. coli* podczas głodu aminokwasowego

Aby określić wpływ głodu aminokwasowego na wewnątrzkomórkową lokalizację białka DnaA, wykonałam analizę mikroskopii poklatkowej połączonej z systemem mikroprzepływowym. Pojedyncze komórki *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* obserwowałam przed stresem (pożywka LB), podczas głodu aminokwasowego (pożywka LB+SHX) i podczas wyjścia ze stresu (przywrócenie przepływu pożywki LB) (Metody 7.1, Rycina 17). Równolegle wykonywałam eksperyment kontrolny, w którym komórki były zaopatrywane wyłącznie w pożywkę optymalną LB. W obu przypadkach, komórki były obserwowane przez dwa kolejne podziały komórkowe. Ze względu na dłuższy czas obserwacji oraz większą liczbę obserwowanych komórek w porównaniu do doświadczenia opisanego w rozdziale 8.3, zdjęcia wykonywane były w 5-minutowych interwałach. Podczas przepływu pożywki optymalnej, przed stresem, lokalizacja białka DnaA-EYFP w komórce była taka sama jak w doświadczeniu opisanym w rozdziale 8.3. Po zmianie medium w komorze obserwacyjnej na pożywkę z SHX, skupiska fluorescencyjne białka DnaA-EYFP zlokalizowane w $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$ długości komórki zanikały i fluorescencja białka DnaA-EYFP rozpraszała się w komórce (Rycina 17A-C). W trakcie głodu aminokwasowego wywołanego przepływem pożywki LB z SHX, 83% analizowanych komórek ukończyło podział komórkowy (Rycina 17A-C), natomiast 17% komórek nie podzieliło się (Rycina 18A-C). Po przywróceniu przepływu pożywki optymalnej, wszystkie komórki dzieliły się po około 40 minutach i następnie odtwarzały charakterystyczną dla białka DnaA lokalizację wewnątrzkomórkową, tj. skupiska białka zlokalizowane w $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$ długości komórki. W doświadczeniu kontrolnym, w którym komórki były stale zaopatrywane w pożywkę optymalną (Rycina 17D-F), komórki dzieliły się i wykazywały charakterystyczny wzór lokalizacji białka DnaA taki sam jak przedstawiono na rycinie 16.



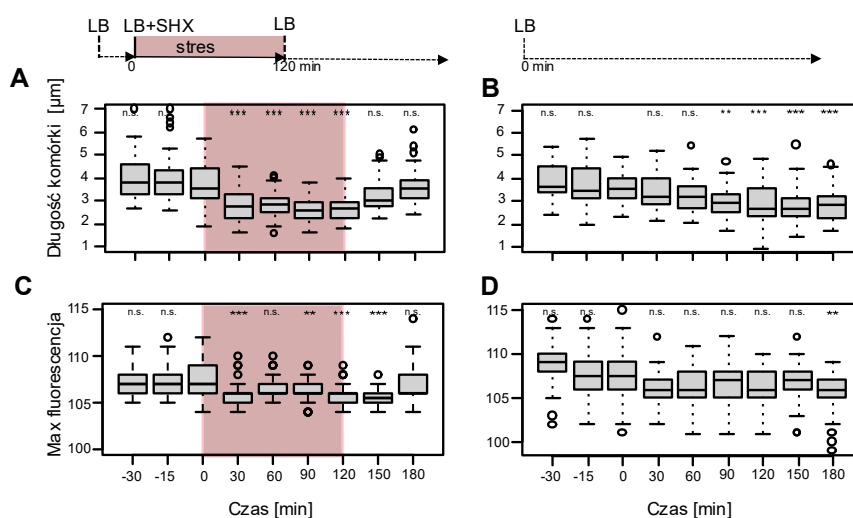
Rycina 17. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka DnaA przed stresem, w trakcie stresu oraz po stresie. Lokalizację białka DnaA w pojedynczych komórkach określono za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej połączonej z techniką ujęć poklatkowych. Zdjęcia wykonywane były w 5-minutowych interwałach (Metody 7.1). Do analiz wykorzystano szczep *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp*. W analizie monitorowano pojedyncze komórki przez dwa podziały. Na górze ryciny umieszczono schematy dostarczania pożywki w systemie mikroprzepływowym. Kolorem różowym zaznaczano czas trwania głodu aminokwasowego. Czas zmiany pożywki na LB+SHX traktowano jako czas 0. Na panelach A i B przedstawiono wyniki analizy lokalizacji wewnątrzkomórkowej białka DnaA-EYFP przed stresem, podczas trwania stresu i po stresie. (A) Reprezentatywne zdjęcia z poszczególnych etapów eksperymentu. Czas oraz rodzaj płynącej pożywki wskazano w prawy, górnym rogu zdjęcia. Podziałka skali, 5 μ m. (B) Kymograf ilustrujący lokalizację białka DnaA-EYFP w reprezentatywnej komórce i jej dwóch kolejnych generacjach. Jeden odcinek podziałki osi OY odpowiada 1 μ m. Na panelach C i D przedstawiono wyniki doświadczenia kontrolnego, w którym komórki *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* były zaopatrywane wyłącznie w pożywkę optymalną LB przez cały czas trwania analizy. (C) Kymograf przedstawiający lokalizację białka DnaA-EYFP w reprezentatywnej komórce i jej dwóch kolejnych generacjach. Zastosowano te same parametry jak na panelu B. (D) Reprezentatywne zdjęcia. Zastosowano te same parametry jak na panelu A.



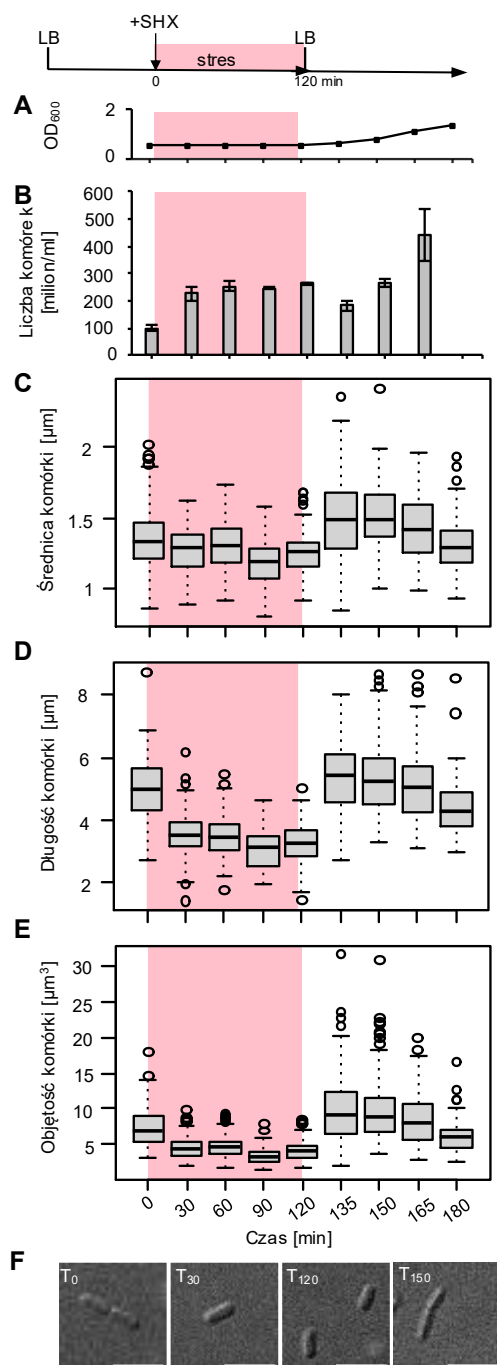
Rycina 18. Lokalizacja białka DnaA w komórkach *E. coli* niedzielących się podczas stresu (A) Obrazy z mikroskopii fluorescencyjnej poklatkowej komórek *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* w warunkach przedstawionych na schemacie u góry. Podziałka liniowa, 5 μm. (B) Kymograf przedstawiający lokalizację białka DnaA-EYFP w reprezentatywnej komórce, która nie dzieli się podczas przejścia z warunków optymalnych w stresowe, oraz jej następnej generacji. (C) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek komórek sklasyfikowanych w zależności od ich podziału podczas głodu aminokwasowego: typ A – komórki dzielące się (patrz Rycina 17C), typ B – komórki niedzielące się (Rycina 18B). Łącznie przeanalizowano 129 komórek.

Przeprowadziłam również analizę długości komórek obserwowanych podczas eksperymentów z wykorzystaniem systemu mikroprzepływowego. Wyniki analizy wykazały, że w warunkach stresu komórki były krótsze (średnia długość komórek podczas przepływu pożywki LB+SHX wynosi 2,7 μm) i nie wykazywały wzrostu aż do zakończenia stresu. Powrót do średniej długości sprzed stresu (średnia wartość = 3,8 μm) następował po około 30 minutach po przywróceniu pożywki optymalnej (Rycina 19A). Tendencja ta nie była zauważalna w doświadczeniach kontrolnych, w których komórki były stale zaopatrywane w pożywkę optymalną (Rycina 19B). W eksperymentach kontrolnych, po 90-tej minucie doświadczenia, średnia długość komórek malała, co prawdopodobnie wynika z pokrycia większości powierzchni komory obserwacyjnej przez komórki. W celu potwierdzenia czy zmiany morfologii komórek podczas stresu nie wynikały wyłącznie z zastosowania układu mikroprzepływowego lub komórek *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp*, przeprowadziłam analizę z użyciem komórek szczepu typu dzikiego, *E. coli* MG1655,

odzwierciedlając w hodowli płynnej warunki zastosowane w układzie mikroprzepływowym. Głód aminokwasowy indukowałam poprzez dodanie do hodowli SHX (czas 0), a wyjście ze stresu przeprowadziłam poprzez wymianę pożywki na pożywkę LB (czas 120) (Metody 7.11). W wybranych punktach czasowych pobierałam próbki hodowli bakteryjnej w celu: 1) określenia ilości bakterii na podstawie zmętnienia zawiesiny (OD₆₀₀), 2) bezpośredniego zliczenia komórek oraz 3) pomiaru długości i szerokości komórek za pomocą obserwacji pod mikroskopem świetlnym (Metody 7.12 i 7.13). Wyniki pomiarów wykonane dla komórek w hodowli płynnej odzwierciedlały obserwacje z eksperymentów z zastosowaniem systemu mikroprzepływowego. Komórki szczepu typu dzikiego w pożywce z SHX nie dzieliły się (Rycina 20A-B), nie rosły (Rycina 20C-E) i były statystycznie krótsze od komórek hodowanych w pożywce optymalnej przed dodaniem SHX (Rycina 20D i F), jednakże efekty te były odwracalne po usunięciu SHX z pożywki. Zbieżność wyników z obu doświadczeń potwierdza, że opisane zmiany morfologiczne stanowią odpowiedź *E. coli* na głód aminokwasowy, a nie artefakt zastosowanego systemu badawczego.



Rycina 19. Długość komórek oraz maksymalne wartości fluorescencji w doświadczeniach mikroskopii poklatkowej. Ilościowe analizy długości komórek (A i B) oraz maksymalnych wartości intensywności fluorescencji (C i D) w wybranych punktach czasowych eksperymentów mikroskopii fluorescencyjnej techniką ujęć poklatkowych z wykorzystaniem szczepu *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp*. Wykresy pudełkowe na panelach A i C prezentują dane uzyskane podczas eksperymentów z indukcją głodu aminokwasowego, a na panelach B i D z doświadczeń kontrolnych z zastosowaniem wyłącznie optymalnych warunków wzrostu. Czas zmiany pożywki na LB+SHX traktowano jako czas 0. W każdym punkcie czasowym zmierzono 50 komórek. Na górze ryciny przedstawiono schematy przepływu pożywki w systemie mikroprzepływowym. Istotność statystyczną oceniono za pomocą dwustronnego testu t-studenta. Analizę statystyczną ograniczono do porównań wyników z danego wykresu z wartością w czasie 0. Wyniki zostały oznaczone na wykresach w następujący sposób: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ oraz „n.s.” dla braku istotności. Czas trwania głodu aminokwasowego zaznaczono kolorem różowym.



Rycina 20. Pomiar parametrów komórek przed stresem, podczas stresu i po stresie w hodowli płynnej. Komórki *E. coli* MG1655 hodowano w kolbach, a próbki pobierano przed stresem, podczas stresu i w trakcie wyjścia ze stresu (Metody 7.11). (A) Wzrost hodowli bakterii monitorowano za pomocą pomiarów gęstości optycznej zawiesiny (OD₆₀₀). Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. (B) Liczba żywych komórek mierzona za pomocą urządzenia BactoBox (ang. *intact cell number*), przedstawiona jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. W wybranych punktach czasowych, komórki obrazowano za pomocą mikroskopii świetlnej, a następnie mierzono ich średnicę (C) oraz długość (D). Objętość komórek (E) obliczono przy założeniu cylindrycznego kształtu komórki. W każdym punkcie czasowym zmierzono 117 komórek. (F) Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe komórek *E. coli* MG1655 w wybranych punktach czasowych: w optymalnych warunkach przed wprowadzeniem stresu (T₀), podczas głodu aminokwasowego (T₃₀ i T₁₂₀) oraz w trakcie wyjścia ze stresu (T₁₅₀). Skala: 5 μ m. Analizę wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

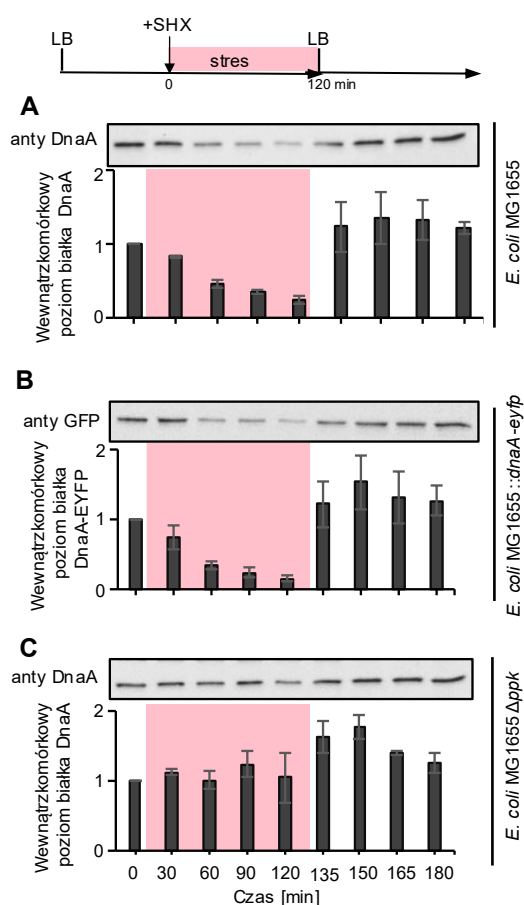
Podczas doświadczeń mikroskopii połączonej z systemem mikroprzepływowym, poza długością komórek, mierzyłam również maksymalne wartości intensywności fluorescencji (Rycina 19C-D). W warunkach optymalnych, przed wprowadzeniem pożywki z SHX, maksymalne wartości intensywności fluorescencji pozostawały stabilne. W trakcie stresu zaobserwowałam statystycznie istotny spadek tych wartości, po czym po zmianie

pożywki na optymalną wartości te stopniowo wracały do poziomu sprzed stresu (Rycina 19C). W eksperymentach kontrolnych, w których zapewniony był ciągły przepływ pożywki optymalnej, maksymalne wartości intensywności fluorescencji pozostawały stabilne w analizowanych punktach czasowych. Wyjątkiem jest wartość osiągnięta w ostatnim analizowanym punkcie czasowym (180 min), kiedy komórki pokryły większość powierzchni płytki obserwacyjnej, co mogło częściowo imitować fazę stacjonarną i wpłynąć na zburzenie formowania skupisk przez DnaA. Warto jednak zauważyć, że w doświadczeniach kontrolnych wartości maksymalnej intensywności fluorescencji charakteryzowały się dużym rozrzutem danych (Rycina 19D), co mogło wynikać z braku synchronizacji podziałów komórkowych.

8.5. Wpływ głodu aminokwasowego na wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA i DnaA-EYFP

Jak opisałam we wstępie, podczas głodu aminokwasowego, wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA maleje na skutek PDAP³⁵. Nie wiadomo jednak, jak szybko po przywróceniu optymalnych warunków wzrostu rozpoczyna się synteza nowych cząsteczek DnaA oraz czy proteolizie ulega białko rekombinowane DnaA-EYFP. Aby zbadać wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA i DnaA-EYFP w trakcie stresu jak i po stresie, wykonałam analizy Western Blot z wykorzystaniem lizatów komórek szczepu *E. coli* MG1655 i *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp*. Ponieważ w komórkach bakteryjnych nie zidentyfikowano białka, które w warunkach zarówno optymalnych jak i stresowych mogłoby pełnić rolę wiarygodnej kontroli nanoszonej ilości lizatu (ang. *loading control*), dlatego zdecydowałam się na normalizację ilości nanoszonego materiału w analizach Western Blot na podstawie stałej liczby komórek wyznaczonej na podstawie wartości OD₆₀₀. Jak wykazano we wcześniejszej pracy, szacowanie liczby komórek na podstawie wartości OD₆₀₀ jest wiarygodne, a różnice względem wyników uzyskiwanych metodą bezpośredniego zliczania komórek bakteryjnych w komorze Petroffa-Hausera nie przekraczają 7,7%³⁵. Co więcej, przeprowadziłam analizę Western Blot z wykorzystaniem komórek szczepu *E. coli* Δ *ppk*, w których poziom białka DnaA pozostaje stabilny podczas stresu³⁵, co stanowi dodatkowy element kontroli w eksperymencie. W wybranych punktach czasowych pobierałam objętość hodowli odpowiadającą 1 ml hodowli o gęstości optycznej OD₆₀₀ 0,3 i zebrane próbki analizowałam metodą Western Blot (Metody 7.15). Zgodnie

z oczekiwaniami, wyniki analizy wykazały, że poziom białka DnaA w komórkach *E. coli* MG1655 spadał po zaindukowaniu stresu poprzez dodanie SHX do hodowli (Rycina 21A). Po usunięciu SHX z pożywki, poziom DnaA wzrastał osiągając najwyższy poziom w 150 minucie doświadczenia (Rycina 21A). Potwierdziłam, że obserwowana tendencja dotyczy również białka DnaA-EYFP (Rycina 21B). Co interesujące, poziom białka DnaA-EYFP, podobnie jak wcześniej opisywany poziom białka DnaA, nigdy nie osiągnął zera, co wskazuje na obecność populacji DnaA pozostającej w komórce. Po wyjściu ze stresu, wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA-EYFP szybko wzrastał, osiągając szczyt około 30 minut po wymianie pożywki na optymalną (Rycina 21B). Zgonie z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi w naszym zespole³⁵, w komórkach szczepu kontrolnego *E. coli* *Appk*, poziom białka DnaA nie zmieniał się podczas stresu (Rycina 21C). Co ciekawe, w tych komórkach poziom białka DnaA wzrósł po wymianie pożywki na optymalną, osiągając najwyższą wartość w 150 minucie doświadczenia (Rycina 21C).



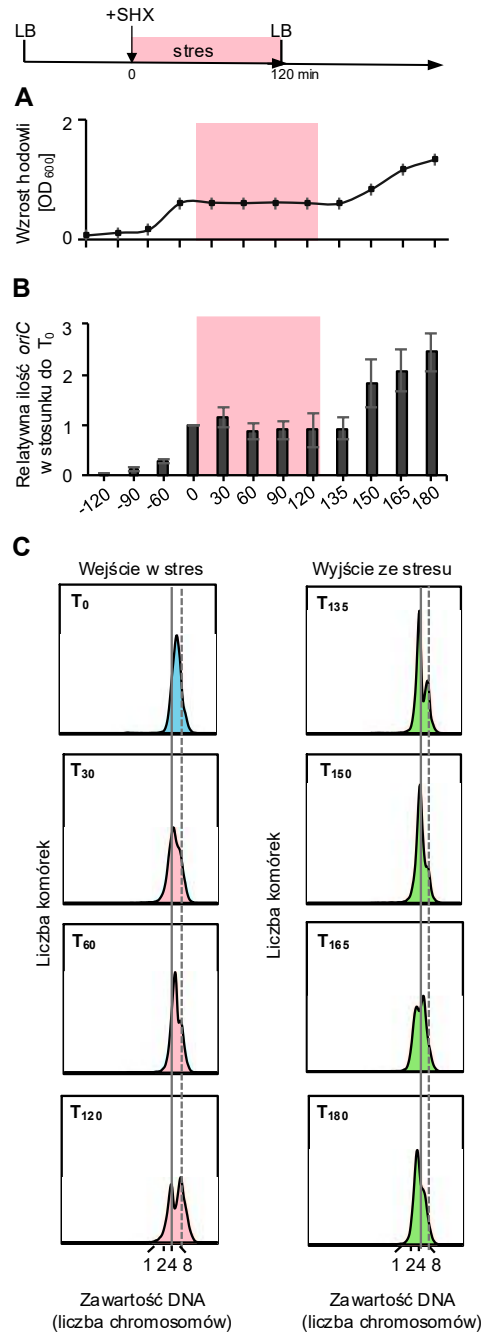
Rycina 21. Wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA przed stresem, podczas stresu i po stresie.

Wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA lub DnaA-EYFP analizowano w komórkach szczepów *E. coli* MG1655 (A), *E. coli* MG1655::*dnaA-eyfp* (B) oraz *E. coli* MG1655 Δppk (C) w wybranych punktach czasowych za pomocą techniki Western Blot. Na górze, przedstawiono schemat warunków hodowli płynnej. W każdym panelu przedstawiono reprezentatywne zdjęcie wyniku analizy Western Blot oraz wykresy słupkowe obrazujące wyniki analizy densytometrycznej. Wewnątrzkomórkowe poziomy białka DnaA zaprezentowano jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych, odniesione do poziomu sprzed stresu (czas 0).

8.6. Analiza replikacji chromosomalnego DNA w komórkach poddanych stresowi

Aby ocenić, jak głód aminokwasowy wpływa na replikację chromosomalnego DNA, przeprowadziłam eksperyment z wykorzystaniem komórek szczepu *E. coli* MG1655, monitorując wzrost hodowli, rozpoczęcie nowych rund replikacji DNA oraz liczbę kopii chromosomalnego DNA, przed stresem, w trakcie jego trwania oraz po stresie (Metody 7.11). Wyniki spektrofotometrycznych pomiarów gęstości hodowli potwierdziły, że w zastosowanych przeze mnie warunkach doświadczalnych SHX hamuje podziały komórek bakteryjnych (Rycina 22A). Komórki wznawiały podziały komórkowe po około 30 minutach po usunięciu SHX z pożywki (Rycina 22A), co jest zgodne z wcześniej przeprowadzonymi przeze mnie analizami (Rycina 20A). Proces inicjacji replikacji DNA analizowałam z wykorzystaniem ilościowej PCR pobierając w wybranych punktach czasowych równą objętość hodowli bakteryjnej i sprawdzając relatywną ilość DNA *oriC* (Metody 7.25). W tej analizie qPCR, stały relatywny poziom fragmentów *oriC* oznaczałby brak zwiększenia liczby kopii tego regionu, a tym samym brak rozpoczęcia nowych rund replikacji DNA. Ponieważ w każdym punkcie czasowym analizie poddawałam tą samą objętość hodowli, wzrost relatywnej ilości *oriC* wskazywałby na rozpoczęcie nowych rund replikacji. W tak skonstruowanym eksperymencie spadek relatywnej ilości *oriC* oznaczałby degradację DNA w komórkach, co jest mało prawdopodobne, lub wskazywałby na błąd techniczny na etapie przygotowania próbek, np. niecałkowitą lizę komórek czy obecność DNAz. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie analiz qPCR wykazały, że przed dodaniem SHX, wzrost poziomu *oriC* w hodowli bakteryjnej wzrastał wykładniczo (Rycina 22B, T₋₁₂₀ do T₀). W trakcie głodu aminokwasowego nie zaobserwowałam wzrostu relatywnej ilości *oriC* (Rycina 22B, T₀ do T₁₂₀). Wzrost poziomu *oriC*, a tym samym nowe rundy replikacji DNA, nastąpił w 150 minucie doświadczenia, a więc po wymianie pożywki LB z SHX na LB (Rycina 22B). Równolegle do analiz qPCR, w tych samych próbkach, monitorowałam liczbę kopii chromosomalnego DNA w komórkach z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (Metody 7.17). Większość komórek bakterii *E. coli* w pożywce optymalnej przed dodaniem SHX, posiadała ilość DNA odpowiadającą niepełnej liczbie chromosomów, co wskazuje na trwające rundy replikacji (Rycina 22C, T₀). Taki wynik analizy ilości DNA za pomocą cytometrii przepływowej jest charakterystyczny dla niesynchronizowanej hodowli komórek *E. coli* w pożywce LB²³³. Po dodaniu SHX do hodowli, ilość chromosomalnego DNA w komórkach wyrównała się, osiągając po 2 godzinach wartości odpowiadające 4 lub 8 kopiom chromosomalnego DNA (Rycina 22C, T₃₀, T₆₀, T₉₀). Wynik

ten jest zgodny z wcześniej opublikowanymi danymi dotyczącymi synchronizacji cyklu komórkowego przez SHX²³⁴. Po usunięciu SHX i wymianie pożywki na optymalną, w komórkach liczba chromosomów powracała do poziomów obserwowanych przed stresem, co świadczy o przywróceniu cyklu komórkowego i aktywności replikacyjnej (Rycina 22C, prawy panel). Co ciekawe, 15 minut po usunięciu SHX z pożywki, zwiększyła się populacja komórek posiadających 4 kopie chromosomalnego DNA w stosunku do komórek posiadających 8 kopii (Rycina 22C, T₁₃₅) co sugeruje wystąpienie podziału komórkowego.



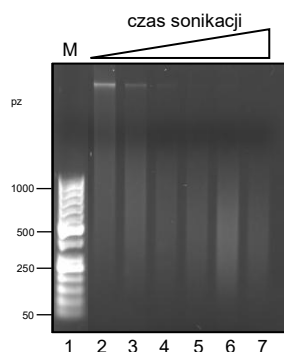
Rycina 22. Podziały komórkowe oraz replikacja DNA w komórkach *E. coli* przed stresem, w trakcie stresu oraz podczas wyjścia ze stresu. W analizie wykorzystano komórki *E. coli* MG1655 hodowane w optymalnej pożywce, podczas głodu aminokwasowego oraz po ponownym przeniesieniu komórek do pożywki optymalnej. Warunki hodowli schematycznie przedstawiono na górze ryciny. (A) Wzrost hodowli monitorowano za pomocą pomiaru gęstości optycznej (OD₆₀₀). Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD (n=3). (B) Wykres słupkowy przedstawiający ilość *oriC* w hodowli bakteryjnej w stosunku do poziomu *oriC* w próbce przed dodaniem SHX (czas 0). Relatywną ilość DNA określono za pomocą ilościowej PCR. W każdym punkcie czasowym poddano analizie stałą objętość hodowli. Doświadczenie wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD. (C) Reprezentatywne profile cytometrii przepływowej określające zawartość DNA w komórkach *E. coli* MG1655 w wybranych punktach czasowych: przed stresem (niebieskie), w trakcie stresu (różowe) oraz podczas wyjścia ze stresu (zielone). Na każdym histogramie oś OY pokazuje liczbę komórek, a oś OX intensywność fluorescencji, która odpowiada określonej liczbie kopii chromosomalnego DNA. Intensywność fluorescencji odpowiadająca danej liczbie chromosomów określono na podstawie analizy cytometrii przepływowej komórek *E. coli* w fazie stacjonarnej i traktowanych ryfampicyną. Linie ciągłe i przerywane wskazują zawartość DNA odpowiadającą czterem i ośmiu chromosomom.

8.7. Wiązanie białka DnaA do chromosomalnego DNA w warunkach głodu aminokwasowego

Powyżej opisane wyniki pokazały, że podczas głodu aminokwasowego poziom DnaA w komórce ulega obniżeniu, ale nie całkowicie, oraz że podczas stresu białko DnaA wykazuje odmienny wzór lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Postawiłam hipotezę, że zanik skupisk białka DnaA obserwowany podczas stresu wynika z utraty jego oddziaływania z regionem *oriC*. Zadałam też pytanie, czy w tych warunkach białko to wiąże się z innymi obszarami chromosomu. Aby to sprawdzić, przeprowadziłam immunoprecypitację chromatyny połączoną z sekwencjonowaniem DNA (ChIP-seq), co pozwoliło określić profil oddziaływania cząsteczek DnaA z chromosomalnym DNA przed stresem, w trakcie stresu jak i podczas wyjścia ze stresu.

Optymalizacja metody ChIP oraz weryfikacja otrzymanych próbek

Na początku zoptymalizowałam metodę immunoprecypitacji kompleksów DnaA-DNA. Do uzyskania fragmentów DNA o odpowiedniej długości zastosowałam sonikację, ponieważ technika ta jest standardowo wykorzystywana także do lizy bakterii w protokołach oczyszczania białka DnaA. W celu określenia optymalnego czasu sonikacji pobierałam próbki z hodowli *E. coli* MG1655 prowadzonej w pożywce LB, a następnie poddawałam je procedurze sieciowania kompleksów nukleoproteinowych *in vivo* (Metody 7.20). Otrzymane próbki poddałam sonikacji stosując czas sonikacji od 0 do 180 sekund, w cyklach 10 s ON/10 s OFF. Aby określić długość fragmentów DNA po sonikacji, lizaty oraz marker molekularny rozdzieliłam w żelu agarozowym (Metody 7.18). Wraz ze wzrostem czasu sonikacji, smuga DNA identyfikowana była co raz niżej w żelu agarozowym, co świadczy o co raz krótszych fragmentach DNA (Rycina 23). Po 60 sekundach sonikacji, większość fragmentów DNA miała długość między 500, a 1000 pz (Rycina 23, ścieżka 4). Prążek widoczny u góry żelu, odpowiadający chromosomalnemu DNA, zanika całkowicie po 120 sekundach sonikacji (Rycina 23, ścieżka 5). W związku z powyższym, jako czas sonikacji potrzebny do uzyskania fragmentów DNA o długości około 1000 pz wybrałam 120 sekund. Dodatkowo, moje kolejne próby optymalizacji metody ChIP, pokazały, że wydłużenie czasu sonikacji powyżej 2 min, znacznie obniża ilość immunoprecypitowanych kompleksów DnaA-DNA.

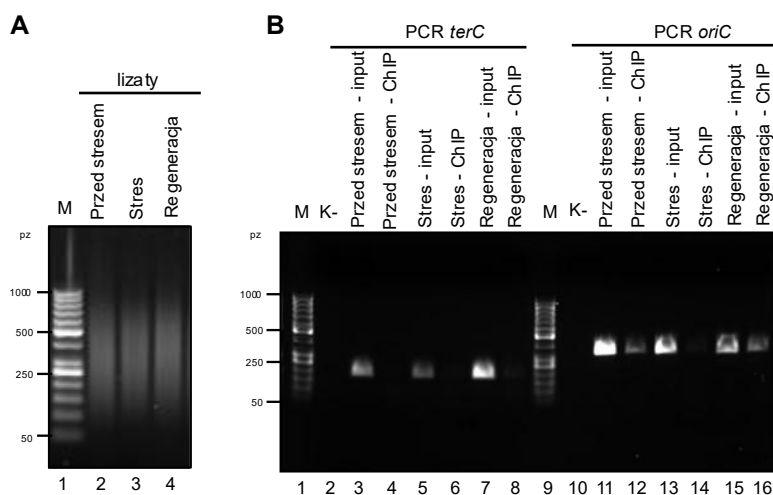


Rycina 23. Optymalizacja czasu sonikacji hodowli bakteryjnych do ChIP.

Próbki bakterii *E. coli* MG1655 hodowanych w pożywce optymalnej LB zostały poddane lizie poprzez inkubację z lizozymem. Następnie próbki sonikowano przez 0, 30, 60, 120, 180 lub 240 sekund i rozdzielono w żelu agarozowym (ścieżki 2-7). Żel agarozowy został wybarwiony EtBr. Pierwsza ścieżka przedstawia rozdzielony marker GeneRuler 50 bp.

W kolejnych etapach zoptymalizowałam czas oraz temperaturę sieciowania kompleksów nukleoproteinowych *in vivo*, długość inkubacji lizatu ze złożem opłaszczonym przeciwciałami anti-DnaA, ilość wykorzystywanych przeciwciał anti-DnaA oraz metodę blokowania niespecyficznych oddziaływań DNA ze złożem sefaryzowym. Za pomocą analizy Western Blot weryfikowałam obecność białka DnaA w immunoprecypitowanych próbkach lub za pomocą PCR obecność fragmentów DNA zawierających sekwencje *oriC* i *terC*. Region *terC* pełnił rolę kontroli negatywnej, ponieważ nie zawiera sekwencji DnaA-box, co wyklucza specyficzne wiązanie białka DnaA z tym fragmentem chromosomu. W wyniku optymalizacji powstał protokół opisany w rozdziale Metody 7.20. Wykorzystując ten protokół otrzymałam próbki anti-DnaA ChIP przygotowane z lizatów *E. coli* MG1655 przed stresem, w trakcie stresu i podczas wyjścia ze stresu. Dla każdej immunoprecypitowanej próbki przygotowałam kontrolę wyjściowego DNA (input). Doświadczenie wykonałam w trzech powtórzeniach biologicznych, co dało łącznie 9 próbek ChIP oraz 9 próbek input. W otrzymanych próbkach zweryfikowałam długość fragmentów DNA (Rycina 24A, Metody 7.18), obecność fragmentów DNA *oriC* i *terC* (Rycina 24B, Metody 7.5), oraz stężenie DNA (Metody 7.19). Rozdział lizatów bakteryjnych, wykorzystanych do ChIP pokazał, że długość otrzymanych po sonikacji fragmentów DNA wynosiła między 100 a 1000 pz (Rycina 24A). W próbkach wyjściowego DNA były obecne zarówno fragmenty DNA zawierające sekwencje *oriC* jak i *terC*, co było zgodne z oczekiwanym wynikiem kontroli (Rycina 24B, ścieżki 3,5,7,11,13,15). W próbkach po precypitacji z wykorzystaniem przeciwciał anti-DnaA nie wykryłam fragmentów *terC* co potwierdziło specyficzność przeprowadzonej immunoprecypitacji (Rycina 24B, ścieżki 4,6,8). Immunoprecypitowane próbki „przed stresem” oraz „po stresie” zawierały fragmenty DNA z sekwencją *oriC* (Rycina 24B, ścieżki 12,16). Fragmentów tych nie wykryłam w próbce ChIP ze stresu (Rycina 24B, ścieżka 14). Ilości DNA w otrzymanych próbkach

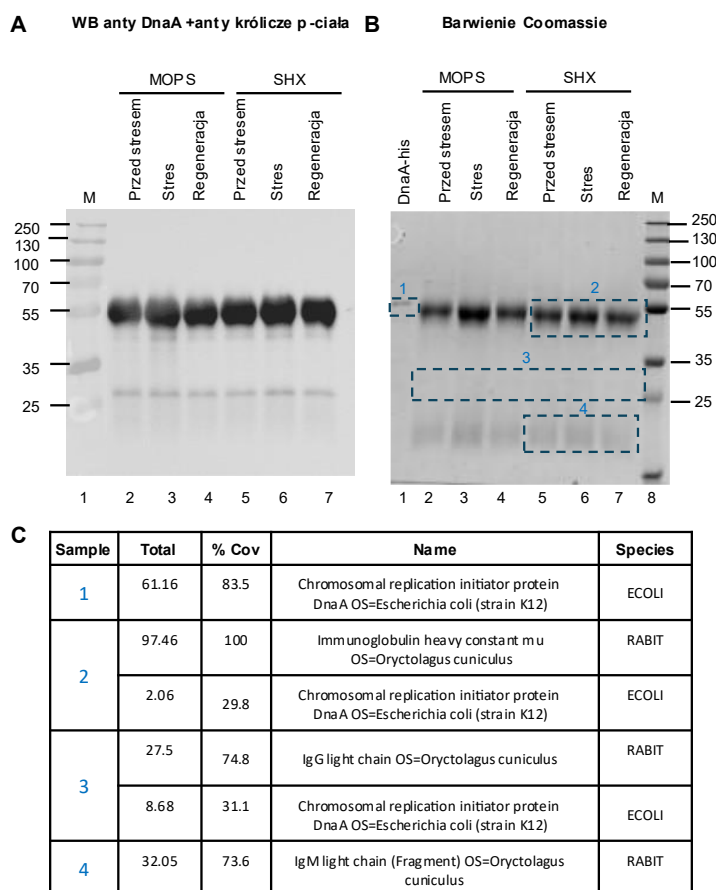
ChIP i input, określone za pomocą fluorescencyjnego pomiaru stężenia DNA (Metody 7.19), wynosiły od 0,13 ng do 1,38 µg, co odpowiada około $1,58 \times 10^8$ - $1,68 \times 10^{12}$ cząsteczek dsDNA o długości 800 pz (Mw= 494300g/mol). Uzyskane ilości DNA były wystarczające do analizy metodą sekwencjonowania nowej generacji.



Rycina 24. Weryfikacja próbek po ChIP pod kątem długości fragmentów DNA oraz obecności *oriC* i *terC*. (A) Zdjęcie żelu agarozowego po rozdziale lizatów bakteryjnych *E. coli* MG1655. Próbkę hodowli pobrano przed stresem, w trakcie stresu i po stresie, następnie inkubowano z lizozymem i poddano sonikacji. Lizaty rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym w celu określenia długości fragmentów DNA. (B) Weryfikacja obecności *oriC* i *terC* w próbkach wyjściowego DNA (input) i próbkach po immunoprecypitacji (ChIP) za pomocą PCR. Wykonano również kontrolę negatywną PCR, czyli reakcję bez matrycowego DNA (K-). W PCR wykorzystano startery specyficzne dla regionów *oriC* oraz *terC* (Materiały 6.3). Mieszaniny po PCR rozdzielono w żelu agarozowym. Zdjęcie żelu po zakończonym rozdziale elektroforetycznym przedstawiono na panelu B. Na obu panelach w pierwszych ścieżkach widać rozdzielony marker Gene Ruler 50 bp (M). Wizualizacja DNA w żelach agarozowych następowała poprzez barwienie bromkiem etydyny.

Weryfikując obecność białka DnaA w immunoprecypitowanych próbkach za pomocą metody Western Blot, po za obecnością białka odpowiadającego masie białka DnaA (55 kDa) zaobserwowałam obecność białka lub peptydu o masie około 30 kDa (Rycina 25A). Białko to było obecne w próbkach przed stresem, w trakcie stresu i po stresie, zarówno dla zestawu gdzie głód aminokwasowy indukowałam za pomocą SHX jak i pożywki minimalnej MOPS (Rycina 25A). Aby zidentyfikować to białko oraz określić specyficzność przeciwciał anti-DnaA wykorzystywanych w ChIP wykonałam analizę spektrometrii mas (Metody 7.21). Próbkę po immunoprecypitacji rozdzieliłam w żelu SDS-PAGE, który wybarwiłam Coomassie (Metody 7.14, Rycina 25B). Z żelu wycięłam cztery fragmenty, które przekazałam do zakładu spektrometrii mas, w celu analizy białek w nich zawartych (Rycina 25B, ramki 1-4). Wyniki spektrometrii mas potwierdziły obecność białka DnaA

i króliczych przeciwciał w próbkach ChIP (Rycina 25C). Prążek odpowiadający białku o masie około 30 kDa widoczny podczas analizy Western Blot (Rycina 25A) okazał się produktem degradacji białka DnaA. Pozostałe prążki to ciężkie (~50 kDa) i lekkie (~25 kDa) łańcuchy przeciwciał.



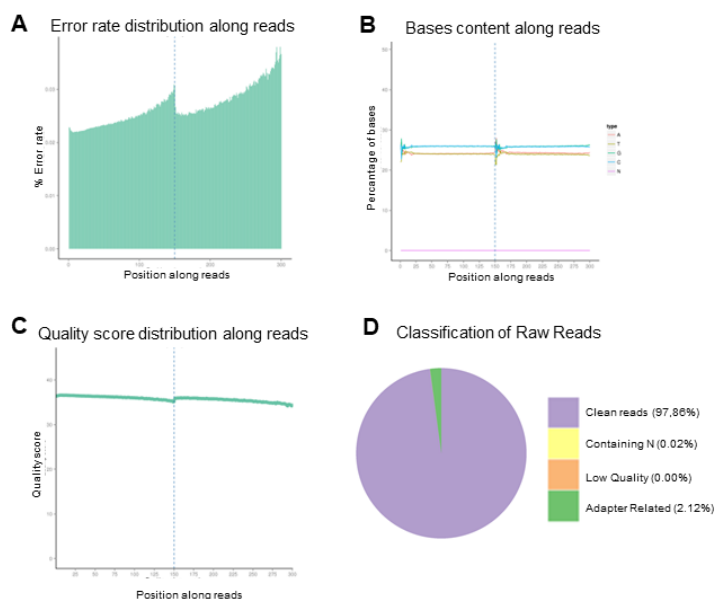
Rycina 25. Weryfikacja specyficzności ChIP z wykorzystaniem przeciwciał anty-DnaA. Do ChIP wykorzystano lizaty komórek *E. coli* MG1655 hodowanych przed stresem, w trakcie stresu oraz podczas wyjścia ze stresu. Do indukcji głodu aminokwasowego zastosowano SHX lub minimalną pożywkę MOPS. (A) Analiza Western Blot próbek po ChIP z wykorzystaniem przeciwciał anty-DnaA. W analizie Western Blot użyto króliczych przeciwciał anty-DnaA oraz kozich przeciwciał anty-króliczych sprzężonych z HRP. Pierwsza ścieżka zawiera rozdzielony marker Page Ruler Plus (M). (B) Żel SDS-PAGE po elektroforezie próbek anty-DnaA ChIP. Żel wybarwiono Coomassie. W pierwszej ścieżce rozdzielono preparat białka DnaA-His (200 ng), a w ostatniej marker Page Ruler Plus (M). Niebieskie, przerywane ramki (1-4) wskazują obszary żelu poddane analizie MS. (C) Tabela przedstawiająca kluczowe wyniki analizy spektrometrii mas. Identyfikację peptydów przeprowadzono w oparciu o wyszukiwania w bazach danych *E. coli* oraz królika (*Oryctolagus cuniculus*).

Podsumowując, zoptymalizowałam metodę ChIP. Za pomocą zoptymalizowanej procedury, immunoprecypitowałam kompleksy DnaA-DNA oraz pobierałam kontrolę input dla każdego testowanego warunku. Obecność białka DnaA w immunoprecypitowanych

próbkach potwierdziłam za pomocą Western Blot i spektrometrii mas (Rycina 25). Po odwróceniu sieciowania i oczyszczeniu DNA, uzyskałam 18 próbek DNA o średniej długości fragmentów około 500 pz (Rycina 24A). Próbki zostały wysłane do firmy zewnętrznej w celu przygotowania bibliotek oraz sekwencjonowania DNA (Metody 7.22).

Sekwencjonowanie oraz weryfikacja jakości danych

Jakość, stężenie, oraz długość fragmentów DNA w uzyskanych próbkach zostały pozytywnie zweryfikowane w laboratoriach Novogen. Do końców fragmentów DNA zostały przyłączone nukleotydy adeninowe, a następnie za pomocą ligacji adaptory wykorzystywane w sekwenatorach Illumina. Finalną bibliotekę DNA uzyskano poprzez selekcję fragmentów DNA o odpowiedniej długości i ich amplifikację za pomocą PCR. Tak przygotowane biblioteki zostały poddane sekwencjonowaniu z obu końców DNA (Metody 7.22). Przeprowadzono również ocenę otrzymanych odczytów. Etap ten obejmował analizę wskaźnika błędu, częstości występowania zasad azotowych oraz jakości sekwencjonowania (Rycina 26A-C). Wskaźnik błędu (e) dla wszystkich próbek był niski, co wskazuje na wysoką jakość danych (Tabela 11). Rozkład wskaźnika błędu wykazywał wzrost wartości wraz z długością odczytu oraz podwyższony poziom błędu w pierwszych sześciu pozycjach (Ryc. 26A). Oba te zjawiska są charakterystyczne dla technologii Illumina i były wcześniej opisywane w literaturze, gdzie tłumaczy się je odpowiednio zużyciem odczynników sekwencjonowania^{235,236} oraz niepełnym wiązaniem starterów do matrycy RNA podczas syntezy cDNA²³⁶. Zawartość zasad GC w otrzymanych sekwencjach wynosiła od 50,78 do 51,75% (Tabela 11), co jest oczekiwanym wynikiem. Rozkład częstości występowania zasad azotowych w analizowanych fragmentach DNA był równomierny (Rycina 26B). Małe wahania dla pierwszych 6-7 nukleotydów są normalne dla technologii Illumina (Rycina 26B). Wyniki te sugerują brak uprzedzeń w sekwencjonowaniu. Parametr oceny sekwencjonowania zasady (Quality score, Q-score) został wyznaczony na podstawie częstotliwości błędu zasady (e) ($Q\text{-score} = -10\log_{10} e$) (Tabela 12). Wartości Q-score pozostają wysokie (>30) dla danych z wszystkich prób na całej długości odczytu, co potwierdza wiarygodność otrzymanych danych (Rycina 26C, Tabela 11).



Rycina 26. Analiza jakości sekwencjonowania na przykładzie wybranej próbki DNA. Wyniki przedstawione są dla danych otrzymanych z próbki po precypitacji z wykorzystaniem przeciwciał anty-DnaA. Do ChIP wykorzystano komórki bakteryjne *E. coli* MG1655 pobrane podczas hodowli w LB+SHX (Tabela 12, próbka C stres, ChIP). (A) Rozkład wskaźnika błędu dla każdej pozycji w odczycie (e). Pozycje zasad przedstawiono na osi poziomej, a wskaźnik błędu na osi pionowej. (B) Rozkład częstości zasad podczas sekwencjonowania. (C) Rozkład wartości Q_{score} w zależności od pozycji w odczycie. (D) Procentowa zawartość uzyskanych czystych odczytów oraz odczytów o niskiej jakości.

Tabela 11. Podsumowanie danych otrzymanych z sekwencjonowania próbek ChIP i input

Próbka ¹	Próbka	Liczba odczytów ²	Surowe dane ³	Skuteczność (%) ⁴	Błąd (%) ⁵	Q20 (%) ⁶	Q30 (%) ⁶	GC (%) ⁷
A przed stresem	ChIP	4.7E+07	7.1	94.06	0.03	97.38	93.03	51.71
A po stresie	input	4.1E+07	6.1	97.23	0.03	97.34	92.75	51.52
A stres	ChIP	4E+07	6.1	88.48	0.03	96.65	92.16	51.6
B przed stresem	input	4.5E+07	6.7	95.99	0.03	97.47	93.23	51.54
B po stresie	ChIP	4.2E+07	6.3	96.32	0.03	97.25	92.82	51.45
B stres	input	4.4E+07	6.7	95.48	0.03	97.32	92.99	51.69
C przed stresem	ChIP	4.6E+07	6.9	98.05	0.03	96.99	92.31	51.13
C po stresie	input	5E+07	7.6	97.64	0.03	97.11	92.66	51.57
C stres	ChIP	4.6E+07	6.9	99.13	0.03	97.07	92.38	50.78
A przed stresem	input	4.8E+07	7.2	93.93	0.03	97.55	93.22	51.26
A po stresie	ChIP	4.1E+07	6.2	98.58	0.03	97.23	92.77	51.14
A stres	input	4.5E+07	6.8	93.85	0.03	97.41	93.13	51.52
B przed stresem	ChIP	4.6E+07	6.9	98.08	0.03	97.24	92.71	51.69
B po stresie	input	4.8E+07	7.1	97.25	0.03	97.74	93.66	51.52
B stres	ChIP	4.7E+07	7	88.56	0.03	96.92	92.52	51.63
C przed stresem	input	4.3E+07	6.5	98.38	0.03	97.14	92.64	51.25
C po stresie	ChIP	4.5E+07	6.8	97.86	0.03	97.25	92.76	51.75
C stres	input	4.9E+07	7.4	97.06	0.03	97.31	92.77	51.25

¹ A, B lub C oznaczają kolejne powtórzenia biologiczne ChIP

² Całkowita liczba odczytów, liczba ta odpowiada sumie odczytów read1 i read2 (*pair-end sequencing*)

³ Iloczyn liczby odczytów i długość otrzymanych sekwencji, podawany w Giga (G)

⁴ (Czyste odczyty / liczba odczytów) * 100%

⁵ Wskaźnik błędu na zasadę (e)

⁶ (Liczba zasad o wartości (Q-score > 20 lub 30) / (Całkowita liczba zasad)

⁷ (Liczba zasad G i C) / (Całkowita liczba zasad)

Łączna ilość uzyskanych surowych danych ze wszystkich próbek to 122.1 G (Tabela 11). W celu usunięcia odczytów zawierających sekwencje adapterów, odczytów zawierających więcej niż 10% zasad „N” (zasada, której nie można określić) oraz odczytów niskiej jakości (z Q-score < 5 w ponad 50% pozycji), dane poddano filtrowaniu. Proces ten został przeprowadzony przez firmę Novogen. Liczba usuniętych odczytów dla wszystkich prób była niska, co pozwoliło na zachowanie od 88,48 do 99.13% odczytów do dalszych analiz (Tabela 11, Rycina 26D). Dalsza analiza danych została wykonana przeze mnie we współpracy z dr Agnieszką Strzałką (Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski).

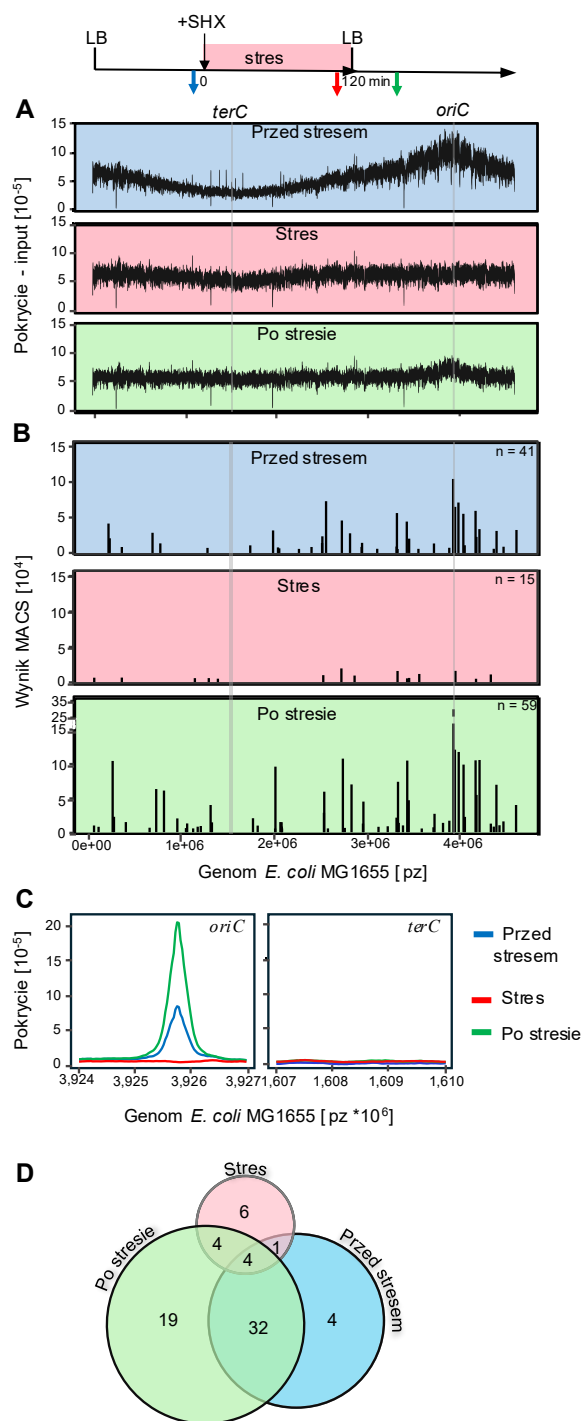
Tabela 12. Zależność między częstotliwością błędu zasady (e) a wartością Qscore

Error base (e)	Right base	Q-score
1/10	90%	Q10
1/100	99%	Q20
1/1000	99.9%	Q30
1/10000	99.99%	Q40

Analiza danych anty-DnaA ChIP-seq

Analiza danych z doświadczenia anty-DnaA ChIP-seq obejmowała mapowanie odczytów do genomu referencyjnego, detekcję pików oraz weryfikację otrzymanych regionów. Dokładny sposób w jaki analizowałam dane został opisany w rozdziale Metody 7.23. Odczyty z próbek input zmapowałam do genomu *E. coli* w celu monitorowania postępu replikacji DNA (Rycina 27A). Większe pokrycie genomu w regionach flankujących *oriC* w porównaniu do *terC* wskazuje na trwającą dwukierunkową replikację DNA. Dane z próbek input wykazały trwające rundy replikacji przed stresem, zatrzymanie replikacji podczas głodu aminokwasowego oraz rozpoczęcie nowych rund replikacji podczas wyjścia ze stresu (Rycina 27A). Wynik ten jest w zgodzie z wynikami pomiaru poziomu *oriC* w kulturach bakteryjnych metodą qPCR (Rycina 22B). Do identyfikacji regionów DNA charakteryzujących się statystycznie istotnym zwiększeniem liczby zmapowanych odczytów w próbkach po immunoprecypitacji wykorzystałam program MACS3. Po normalizacji danych uzyskanych w analizie ChIP-seq z próbek po immunoprecypitacji względem odpowiadających im próbek input zidentyfikowałam 41 regionów DNA wiązanych przez cząsteczki białka DnaA przed stresem, 15 podczas stresu i 59 podczas

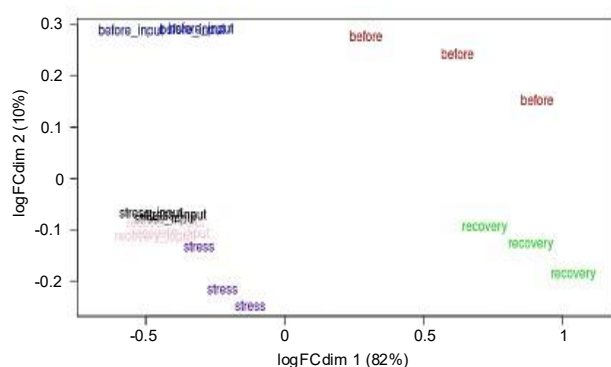
wyjścia ze stresu (Rycina 27B). Wiązanie białka DnaA do regionu *oriC* było silniejsze po stresie osiągając wartość 2,88 razy wyższą niż przed stresem, natomiast w trakcie stresu nie wykryłam sygnału wiązania do tego regionu. Nie wykryłam wiązania białka DnaA w obrębie *terC* w żadnym z testowanych warunków (Rycina 27C). Poza regionem *oriC*, zidentyfikowałam 31 innych regionów wiązanych przez białko DnaA zarówno przed, jak i po stresie (Rycina 27D). Regiony te obejmują m.in. geny *mioC*, *yjeV* (*datA*), *dnaA* i *purH*. Analiza danych ChIP-seq wykazała sześć regionów DNA wiązanych przez DnaA specyficznie podczas stresu, a są to miejsca przed genami *glpG*, *uspE*, *tsaC*, *rpoS*, *ilvL* i region wewnątrz genu *zipA*. Cztery regiony były wiązane wyłącznie przed stresem, natomiast 19 regionów specyficznie podczas wyjścia ze stresu. Cztery regiony zidentyfikowałam we wszystkich testowanych warunkach. Łącznie analiza ChIP-seq wykazała 70 różnych regionów DNA wiązanych przez białko DnaA we wszystkich testowanych warunkach (Rycina 27D).



Rycina 27. Analiza wiązania białka DnaA do chromosomu *E. coli* MG1655 przed stresem, w trakcie stresu oraz podczas wyjścia ze stresu. Wyniki analizy ChIP-seq z użyciem komórek *E. coli* MG1655 i przeciwciał anti-DnaA. Na górze ryciny umieszczono schemat warunków hodowli bakteryjnej ilustrujący czasy zbierania próbek. Próbkę hodowli pobierano przed stresem (kolor niebieski), w trakcie stresu (kolor różowy) i podczas wyjścia ze stresu (kolor zielony). (A) Zestawienie odczytów ChIP-seq z próbek wyjściowego DNA (input) pobranych przed stresem, w trakcie stresu i po stresie do sekwencji genomu *E. coli* MG1655 (oś OX). Szarymi paskami oznaczono region *terC* lub *oriC*. (B) Profile wiązania białka DnaA (wynik MACS) wzdłuż chromosomu *E. coli* MG1655. Wartości na osi OY reprezentują wartości z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych ChIP znormalizowanych względem odczytów uzyskanych dla próbek wyjściowego DNA. Szare paski na wykresie podkreślają regiony *terC* i *oriC*. (C) Pokrycie odczytów ChIP-seq w regionach *oriC* (po lewej) i *terC* (po prawej). (D) Diagram Venna ilustrujący relacje pomiędzy regionami DNA wykrytymi w analizie ChIP-seq w trzech testowanych warunkach. Analiza wykazała 70 różnych regionów ChIP-seq wiązanych przez DnaA.

Podczas powyżej opisanych analiz danych z doświadczenia ChIP-seq, przyjąłam metodę zakładającą normalizację danych względem liczby odczytów uzyskanych dla każdej biblioteki, a następnie połączenie wyników z trzech powtórzeń biologicznych i ich dalszą analizę jako jednej wspólnej próby. Aby zweryfikować podobieństwo między powtórzeniami biologicznymi oraz zasadność ich połączenia wykonałam skalowanie

wielowymiarowe (MDS, *Multidimensional scaling*). MDS rozmieszcza punkty na wykresie tak, aby odległości między nimi odpowiadały różnicom między próbkami, przy czym wartości na osiach nie odnoszą się do konkretnych zmiennych. W skrócie, obiekty podobne do siebie znajdują się bliżej. Odczyty z powtórzeń biologicznych próbek ChIP i próbek input z odpowiednich warunków były spójne i wykazywały klastrowanie w dwóch pierwszych wymiarach wykresu MDS (Rycina 28). Największe zróżnicowanie między próbkami biologicznymi zaobserwowałam w próbkach immunoprecypitowanych zebranych przed stresem, co prawdopodobnie wynika z użycia niesynchronizowanych hodowli bakteryjnych, które osiągnęły synchronizację cyklu komórkowego po potraktowaniu SHX.



Rycina 28. Podobieństwo danych uzyskanych w analizie ChIP-seq. Wykres MDS ilustrujący podobieństwa między danymi uzyskanymi dla próbek po ChIP i wyjściowego DNA pobranych przed stresem (before i before_input), w trakcie stresu (stress i stress_input) i w trakcie wyjścia ze stresu (recovery i recovery_input) z trzech powtórzeń biologicznych.

Weryfikacja wyników analizy *anti-DnaA ChIP-seq*

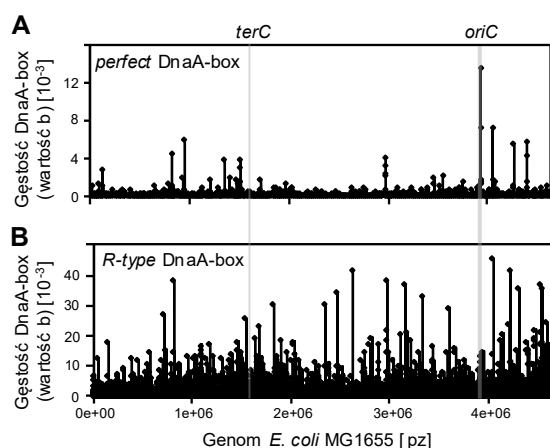
W celu weryfikacji zidentyfikowanych podczas analizy ChIP-seq regionów DNA wiązanych przez białko DnaA sprawdziłam obecność sekwencji DnaA-box w tych regionach. Zaczęłam od wyszukania w genomie *E. coli* MG1655 sekwencji DnaA-box i DnaA-box-podobnych, czyli takich które różnią się maksymalnie 2 nukleotydami od sekwencji najwyżej zgodności, (Metody 7.24). W wyszukiwaniach zastosowałam dwie sekwencje DnaA-box, *perfect* DnaA-box oraz *R-type* DnaA-box (Materiały 6.6). *Perfect* DnaA-box, czyli taki, do którego cząsteczki DnaA wiążą się z największym powinowactwem¹⁵⁰. Takich miejsc w genomie *E. coli* jest 32, z czego 2 znajdują się w *oriC* (DnaA-box R1 i R4). Jeżeli w wyszukiwaniu pozwolimy na jedno niedopasowanie od

wyszukiwanego wyrazu wtedy liczba zidentyfikowanych miejsc w genomie *E. coli* rośnie do 1344 (Tabela 13). Wyszukiwanie sekwencji *perfect* DnaA-box i zezwolenie na 1 niedopasowanie jest perfekcyjną metodą do wyszukiwania miejsc inicjacji replikacji DNA bakterii (Rycina 29A oraz ²²⁹), jednak jest bardzo rygorystyczna i nie odzwierciedla potencjalnych miejsc wiązania cząsteczek białka DnaA. W związku z tym postanowiłam wykorzystać do wyszukiwań sekwencję najwyższej zgodności DnaA-box (*R-type* DnaA-box, TT(A/T)TNCACA, Materiały 6.6)⁵⁰. Wyniki wyszukiwania pokazały, że takich sekwencji w genomie *E. coli* MG1655 jest 308 (Tabela 13), co jest zgodne z danymi literaturowymi⁷². Do fragmentów DNA zawierających sekwencję *R-type* DnaA-box wykazano specyficzne wiązanie białka DnaA *in vitro*⁵⁰. Jednak jest to bardzo rygorystyczna definicja sekwencji najwyższej zgodności DnaA-box. Bardziej zrelaksowaną sekwencję najwyższej zgodności T(T/C)(A/T)T(A/C)CA(C/A)A zdefiniowano przy użyciu np. metody footprinting⁴⁸. Jeszcze bardziej rozluźnioną sekwencję najwyższej zgodności, (T/C)(T/C)(T/A/C)T(A/C)C(A/G)(A/C/T)(A/C), zdefiniowano wykorzystując zdolność kompleksu DnaA-DnaA-box do blokowania polimerazy RNA *in vivo*²³⁷. W związku z tak dużą rozbieżnością sekwencji najwyższej zgodności DnaA-box, do których doświadczalnie potwierdzono wiązania białka DnaA, zezwoliłam w wyszukiwaniach na 1 lub 2 niedopasowania od wyszukiwanego wyrazu, czyli sekwencji *R-type* DnaA-box. Wtedy liczba wyników wyszukiwania wzrosła do 8226 i 78662 znalezionych sekwencji w genomie *E. coli* odpowiednio dla 1 i 2 niedopasowań od sekwencji najwyższej zgodności *R-type* DnaA-box (Tabela 13).

Tabela 13. Liczba sekwencji DnaA-box i DnaA-box-podobnych w genomie *E. coli* MG1655

DnaA-box	Sekwencja	Niedopasowania	Zidentyfikowano
<i>perfect</i>	TTATCCACA	0	32
<i>perfect</i>	TTATCCACA	0, 1	1344
<i>R-type</i>	TT(AT)TNCACA	0	308
<i>R-type</i>	TT(AT)TNCACA	0, 1	8226
<i>R-type</i>	TT(AT)TNCACA	0, 1, 2	78662

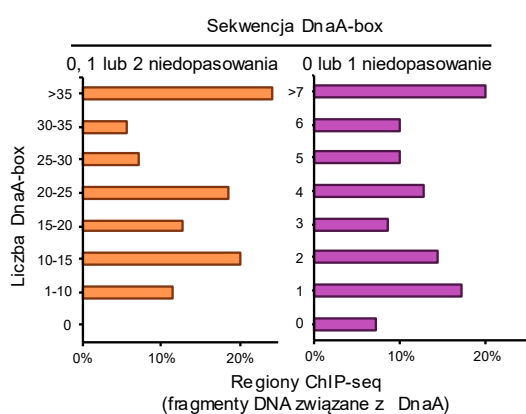
Sprawdziłam rozmieszczenie sekwencji *perfect* DnaA-box oraz *R-type* DnaA-box (Materiały 6.6) w genomie *E. coli* (Rycina 29, Metody 7.24). Największa liczba sekwencji identycznych lub różniących się 1 nukleotydem od sekwencji najwyższej zgodności *perfect* DnaA-box jest zlokalizowana w regionie *oriC* (Rycina 29A). Mówiąc o gęstości sekwencji DnaA-box w genomie *E. coli* należy zwrócić uwagę na rozmieszczenie słabszych miejsc wiązania białka DnaA, czyli identycznych lub różniących się 1 nukleotydem od sekwencji najwyższej zgodności *R-type* DnaA-box. Miejsca te są bardziej rozpowszechnione, jednak wykazują kumulację w regionach wokół regionu *oriC*, a nie w samym miejscu inicjacji (Rycina 29B).



Rycina 29. Rozmieszczenie sekwencji DnaA-box w genomie *E. coli* MG1655. Wykres przedstawia miejsca identyczne lub różniące się jednym nukleotydem od sekwencji *perfect* DnaA-box (TTATCCACA) (panel A) lub *R-type* DnaA-box (TT(AT)TNCACA) (panel B). Wartości na osi OY reprezentują gęstość sekwencji DnaA-box wyrażoną jako wartość b (Metody 7.24).

Mając zlokalizowane sekwencje DnaA-box w genomie *E. coli* MG1655, zweryfikowałam ile z wykrytych w analizie ChIP-seq regionów DNA zawiera sekwencje DnaA-box lub DnaA-box-podobne. Spośród 70 zidentyfikowanych regionów, 100% zawierało sekwencje identyczne lub różniące się o jeden lub dwa nukleotydy od sekwencji *R-type* DnaA-box (Rycina 30, lewy panel). Gdy analizę ograniczyłam do sekwencji identycznych lub różniących się tylko jednym nukleotydem, 93% zidentyfikowanych regionów nadal zawierało sekwencje DnaA-box podobne (Rycina 30, prawy panel). Metoda ta potwierdziła możliwość wiązania białka DnaA do regionów DNA zidentyfikowanych w analizie ChIP-seq poprzez wykazanie w ich obrębie sekwencji DnaA-box-podobnych, jednak ta metoda nie jest pozbawiona ograniczeń. Każde

niedopasowanie, bez względu na pozycję w sekwencji, ma taką samą wagę. Ograniczenie poszukiwań do jednego niedopasowania jest rygorystyczne, podczas gdy zezwolenie na dwa niedopasowania od sekwencji najwyższej zgodności skutkuje nadmierną liczbą przewidywanych sekwencji DnaA-box-podobnych w całym genomie. Kolejnym utrudnieniem w tej analizie jest długość regionów ChIP-seq zdefiniowanych przez program MACS3 jako statystycznie istotnych (średnia długość regionów wynosi 2167 ± 1780 pz). Dlatego aby potwierdzić wyniki wyżej opisanej analizy ChIP-seq wykonałam identyfikację pików za pomocą pakietu edgeR (Metody 7.23).



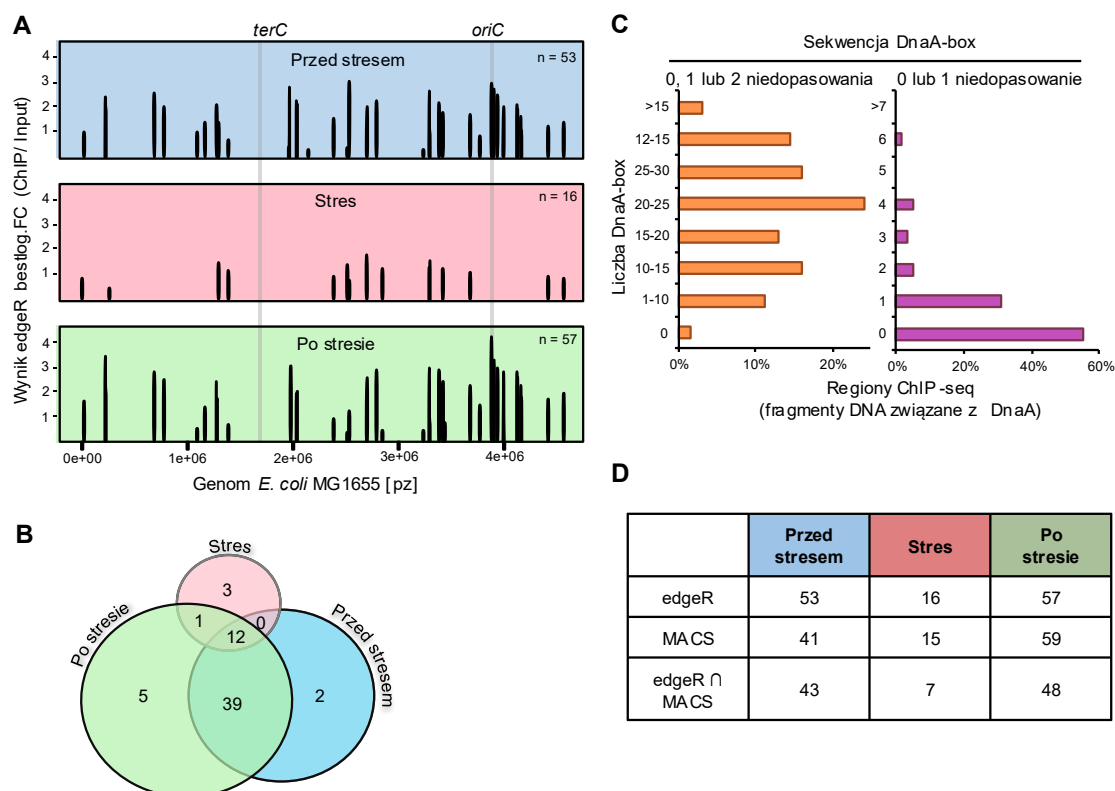
Rycina 30. Odsetek regionów ChIP-seq zawierających sekwencje DnaA-box. Wykresy słupkowe przedstawiają procentowy udział wszystkich regionów DNA zidentyfikowanych w analizie ChIP-seq jako wiązane przez białko DnaA (regiony ChIP-seq), w których wykryto określoną na osi OY liczbę motywów DnaA-box. W obrębie całej długości każdego regionu ChIP-seq zidentyfikowanego metodą MACS3 wyszukiwano sekwencje zgodnych z sekwencją *R-type* DnaA-box (TT(AT)TNCACA), dopuszczając dwa niedopasowania (lewy panel) lub jedno niedopasowanie (prawy panel) (Metody 7.24).

Weryfikacja regionów DNA wiązanych przez DnaA za pomocą edgeR

Identyfikacja regionów DNA charakteryzujących się statystycznie istotnym zwiększeniem liczby zmapowanych odczytów w próbkach po immunoprecypitacji za pomocą pakietu edgeR (Metody 7.23) potwierdziła znaczące zmiany profilu wiązania chromosomalnego DNA przez białko DnaA w warunkach stresowych w porównaniu z warunkami optymalnymi (Rycina 31A). Białko DnaA znacznie silniej wiązało się do *oriC* podczas wyjścia ze stresu w porównaniu do warunków przed stresem. Nie wykryłam wiązania białka DnaA do *oriC* w warunkach głodu aminokwasowego (Rycina 31A). W żadnym z testowanych warunków identyfikacja nie wykazała także wzmocnienia liczby odczytów w regionie *terC*. Łącznie analiza z wykorzystaniem pakietu edgeR zidentyfikowała sześćdziesiąt dwa regiony DNA wiązane przez DnaA we wszystkich testowanych warunkach (Rycina 31B). Trzy regiony były specyficznie wiązane

w warunkach stresowych. Trzydzieści dziewięć regionów było wiązanych przez DnaA zarówno przed stresem jak i podczas wyjścia ze stresu. Dwanaście regionów było wspólnych dla wszystkich testowanych warunków (Rycina 31B). 98,4% zidentyfikowanych przez edgeR regionów DNA zawierało sekwencje DnaA-box, identyczne lub różniące się 1 lub 2 nukleotydami od sekwencji najwyższej zgodności *R-type* DnaA-box (Metody 7.24)(Rycina 31C, lewy panel). Jednak po zaostrożeniu analizy do sekwencji identycznych lub tylko z 1 niedopasowaniem od sekwencji najwyższej zgodności *R-type* DnaA-box, liczba ta spadła do 45% (Rycina 31C, prawy panel). Średnia długość regionów DNA wykrytych w analizie z wykorzystaniem pakietu edgeR wynosi 420 ± 158 pz. Porównałam wyniki otrzymane przez analizę danych z pakietem edgeR z danymi otrzymanymi przez program MACS3 (Rycina 31D). Analiza porównawcza wykazała, że w każdym z testowanych warunków są regiony, które zostały zidentyfikowane przez oba programy.

Dane z analizy ChIP-seq wykazały, że białko DnaA w warunkach głodu aminokwasowego zmienia profil oddziaływania z chromosomalnym DNA, tracąc powinowactwo do miejsc wiązanych w warunkach optymalnych i zajmując nowe regiony genomu. Co ciekawe, regiony o najwyższej gęstości sekwencji *perfect* DnaA-box (Rycina 29A), na przykład takie jak *oriC*, nie były wiązane przez białko DnaA podczas głodu aminokwasowego, mimo silnego wiązania zarówno przed jak i po stresie. Wyniki te sugerują, że podczas stresu uruchamiane są mechanizmy, które hamują wiązanie białka DnaA w niektórych regionach DNA, jednocześnie promując wiązanie tego białka w innych miejscach.

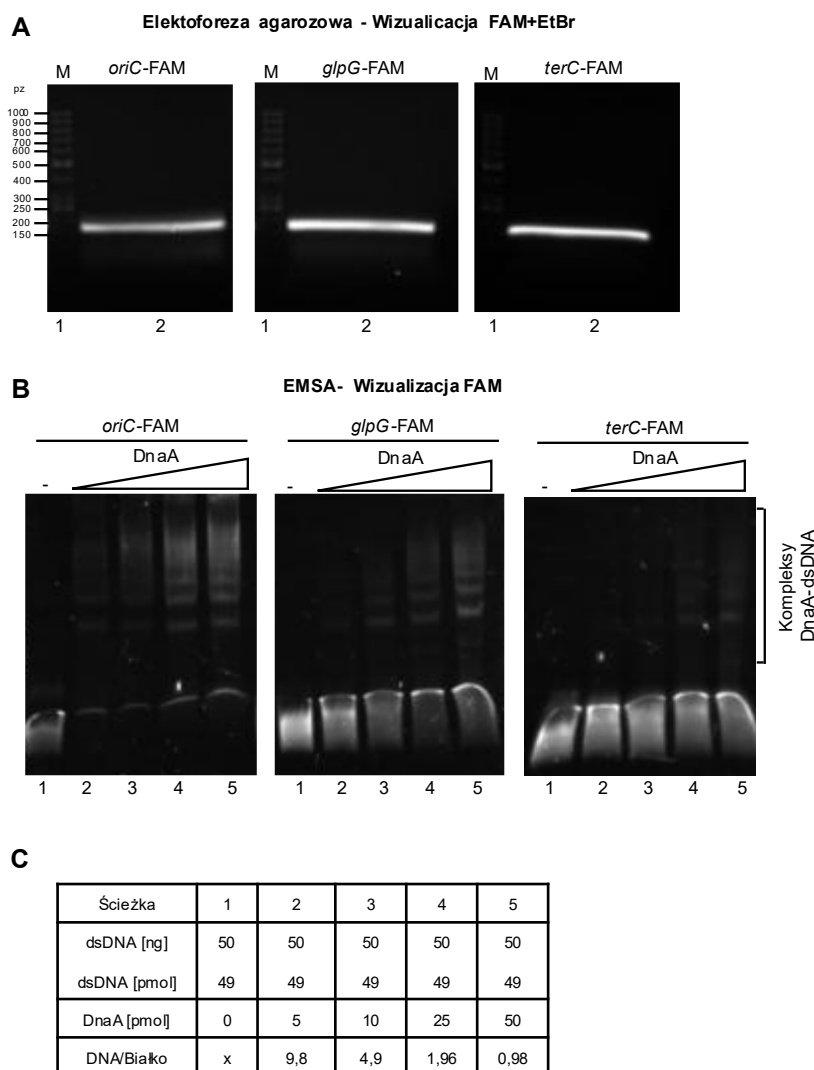


Rycina 31. Identyfikacja regionów istotnie wzbogaconych w analizie ChIP-seq za pomocą pakietu edgeR.

(A) Identyfikacja regionów DNA wiązanych przez białko DnaA przed stresem (kolor niebieski), podczas stresu (kolor czerwony) oraz po stresie (kolor zielony) za pomocą pakietu edgeR. Wartości na osi OY reprezentują wartości z trzech powtórzeń biologicznych ChIP znormalizowanych względem odczytów uzyskanych dla próbek wyjściowego DNA (input). Szare paski na wykresie podkreślają regiony *terC* i *oriC*. (B) Diagram Venna ilustrujący relacje pomiędzy regionami DNA wiazanymi przez białko DnaA w trzech testowanych warunkach wykrytymi za pomocą pakietu edgeR. Przy użyciu pakietu edgeR zidentyfikowano 62 różne regiony ChIP-seq wiązane przez DnaA. (C) Odsetek regionów ChIP-seq zidentyfikowanych pakietem edgeR zawierających sekwencje DnaA-box (patrz opis Rycina 27). (D) Tabela zestawiająca liczbę regionów wiązanych przez DnaA zidentyfikowanych w analizach edgeR i MACS. Trzeci wiersz zawiera liczbę regionów wspólnych dla obu analiz. Większa liczba regionów wspólnych niż dla samej analizy MACS wynika z faktu, że MACS identyfikuje dłuższe obszary wiązania, które czasem obejmują dwa krótsze regiony wykrywane przez edgeR.

Weryfikacja wybranych regionów DNA wskazanych w analizie ChIP-seq metodą EMSA

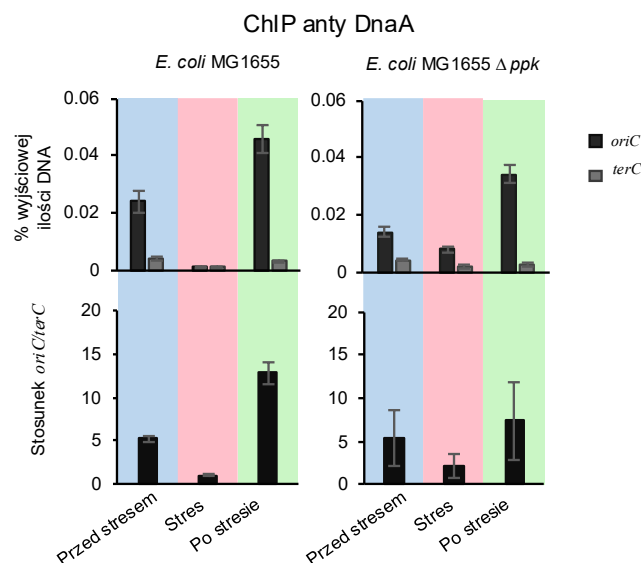
Aby potwierdzić wyniki analizy ChIP-seq, przeprowadziłam testy EMSA dla wybranych regionów DNA, sprawdzając zdolność białka DnaA do ich wiązania *in vitro*. Na podstawie wyników analizy ChIP-seq wybrałam trzy regiony DNA o różnym charakterze wiązania przez białko DnaA *in vivo* (Rycina 27). Pierwszy z nich to region *oriC*, którego ilość w próbkach po precypitacji za pomocą przeciwciał anti-DnaA była wzmocniona przed stresem oraz podczas wyjścia ze stresu. Drugi to region *glpG*, który wiązany był przez białko DnaA wyłącznie podczas stresu. Ostatni to region stanowiący kontrolę negatywną, czyli region *terC*, który nie wykazywał wzbogacenia w żadnym z testowanych warunków. Do wybranych sekwencji DNA zaprojektowałam komplementarne startery (Materiały 6.3) i za pomocą PCR przygotowałam znakowane fragmenty dsDNA odpowiadające regionom *oriC*, *glpG* oraz *terC* (Metody 7.10). Otrzymałam znakowane fragmenty dsDNA o długościach odpowiednio 162 pz (*oriC*), 169 pz (*glpG*) i 163 pz (*terC*) (Rycina 32A). W wybranych do doświadczenia EMSA, krótkich regionach DNA określiłam zawartość sekwencji DnaA-box identycznych lub różniących się 1 nukleotydem od sekwencji *perfect* DnaA-box (Materiały 6.6). Otrzymany przeze mnie 162-nukleotydowy fragment dsDNA *oriC* zawierał cztery takie sekwencje, fragment *glpG* pojedynczy DnaA-box, natomiast fragment *terC*, jak wspomniano wcześniej, nie zawiera żadnej sekwencji DnaA-box. Analizę EMSA przeprowadziłam przy stałym stężeniu wyznakowanego fluorescencyjnie dsDNA i rosnących stężeniach białka DnaA (Metody 7.10). Wyniki wizualizowałam po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym wykorzystując protokół do wizualizacji znacznika FAM (Metody 7.10). Dla fragmentu *oriC* zaobserwowałam stopniowe przesunięcie prążków, odpowiadających tworzeniu kompleksów DNA-białko, wraz ze wzrostem stężenia DnaA (Rycina 32B). W przypadku fragmentu *glpG*, również widoczne były przesunięcia obserwowanych prążków, wskazujące na formowanie się kompleksów DNA-DnaA. Dla fragmentu *terC* nie zaobserwowałam pojawienia się kompleksów przy niższych stężeniach białka DnaA. Pojawienie się kompleksów DNA-białko przy najwyższych zastosowanych stężeniach białka DnaA (Rycina 32B, prawy panel, ścieżki 4 i 5) może świadczyć o oddziaływaniach niespecyficznych.



Rycina 32. Analiza oddziaływania białka DnaA z wybranymi fragmentami DNA *in vitro*. Do analizy oddziaływania białka DnaA z *oriC*, *glpG* oraz *terC* zastosowano test EMSA. (A) Zdjęcia żeli agarozowych po rozdziale mieszanin po PCR z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie starterów. W reakcjach PCR użyto pary starterów flankujące region *oriC* (162 pz), *glpG* (169 pz) lub *terC* (163 pz). Widoczne prążki DNA, wycięto z żelu, oczyszczono i wykorzystano w dalszych analizach EMSA. Wizualizacja produktów PCR odbyła się za pomocą protokołu do wizualizacji fluoresceiny (FAM). W pierwszych ścieżkach każdego żelu rozdzielono marker masowy GeneRuler 50 bp. Dla widoczności prążków markera masowego, żel wybarwiono dodatkowo EtBr. (B) Wyniki testów EMSA sprawdzających oddziaływanie białka DnaA z *oriC*, *glpG* lub *terC*. W analizach wykorzystano stałe ilości wyznakowanych fragmentów dsDNA i rosnące stężenia białka DnaA. Wizualizacja prążków w żelu została przeprowadzona z wykorzystaniem protokołu do wizualizacji fluoresceiny (FAM). (C) Tabela przedstawiająca ilości dsDNA oraz białka DnaA w reakcjach EMSA z panelu B, wraz z obliczonym stosunkiem molowym DNA:białko.

8.8. Wiązanie białka DnaA do *oriC* w komórkach szczepu typu dzikiego i *Δppk* podczas stresu

Brak wiązania białka DnaA do *oriC* w warunkach stresu może wynikać ze spadku jego wewnątrzkomórkowego poziomu. Jak pokazałam wcześniej, podczas głodu aminokwasowego poziom białka DnaA obniżał się w komórkach szczepu typu dzikiego, natomiast pozostawał stabilny w komórkach szczepu delecyjnego *E. coli Δppk* (Rycina 21). Aby sprawdzić, czy poziom białka DnaA podczas stresu wpływa na zdolność DnaA do oddziaływania z DNA, przeprowadziłam analizy ChIP-qPCR z użyciem przeciwciał anti-DnaA oraz komórek szczepu typu dzikiego oraz *Δppk*. Próbkę do analiz pobierałam analogicznie do doświadczeń ChIP-seq, czyli w trzech punktach czasowych: w pożywce LB przed dodaniem SHX (przed stresem), w pożywce LB+SHX (stres) oraz po usunięciu SHX (po stresie) (Metody 7.11). Próbkę DNA do tych doświadczeń uzyskiwałam wykorzystując ten sam protokół, co w przypadku analizy ChIP-seq (Metody 7.20). Wyniki ChIP-qPCR uzyskane dla komórek szczepu typu dzikiego MG1655 potwierdziły dane z analizy ChIP-seq. Białko DnaA wiązało się z regionem *oriC* w komórkach hodowanych w pożywce optymalnej przed wywołaniem warunków stresowych, wykazywało poziom wiązania bliski tłu po dodaniu SHX, a następnie odzyskiwało zdolność wiązania *oriC* po wymianie pożywki na optymalną (Rycina 33). Podobny trend zaobserwowałam w komórkach szczepu *E. coli Δppk*, jednak stopień zahamowania oddziaływania białka DnaA z *oriC* podczas stresu był mniej nasilony w porównaniu do komórek szczepu typu dzikiego (odpowiednio 2,52-krotny vs. 5,57-krotny spadek sygnału, Rycina 33). W próbkach po immunoprecypitacji uzyskanych z komórek zarówno szczepu typu dzikiego, jak i *Δppk*, poziom fragmentów DNA *terC* był bardzo niski we wszystkich testowanych warunkach, co interpretowałam jako brak wiązania DnaA, potwierdzając tym samym specyficzność oddziaływania z *oriC* (Rycina 33). Otrzymane dane wskazują, że brak obniżenia poziomu białka DnaA w komórkach szczepu *Δppk* podczas stresu nie wystarcza do pełnego przywrócenia wiązania białka DnaA do *oriC*. Sugeruje to, że podczas głodu aminokwasowego w komórkach *E. coli* oprócz redukcji poziomu DnaA mogą istnieć inne mechanizmy ograniczające wiązanie DnaA z *oriC*.



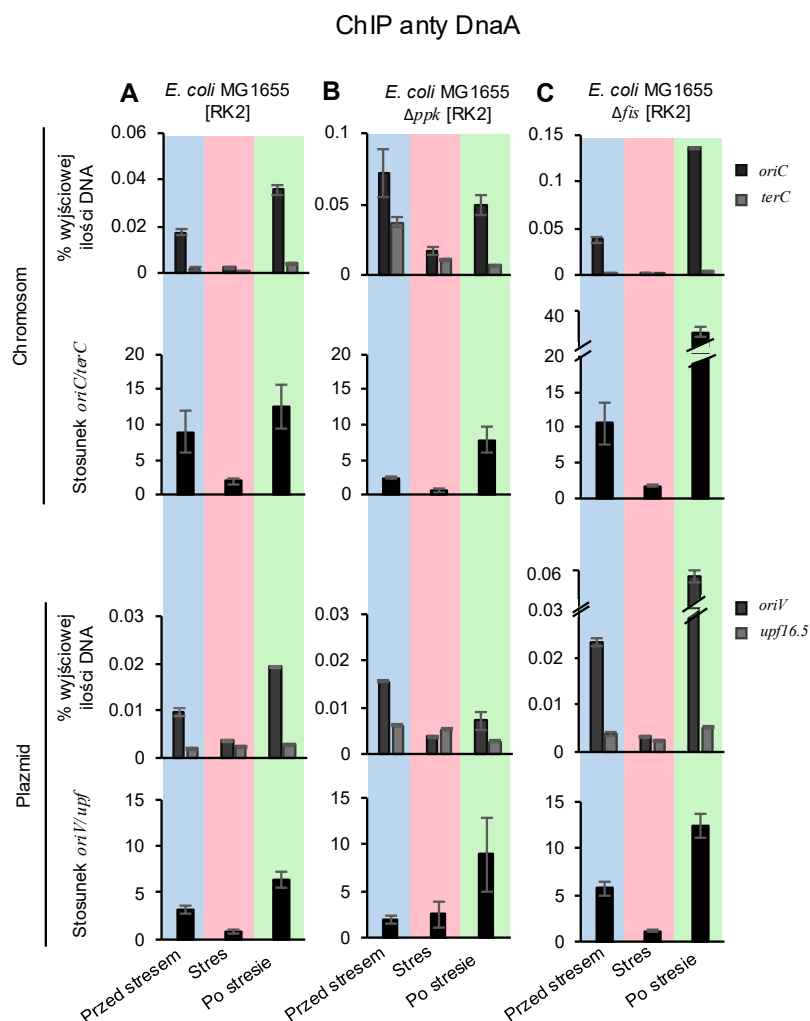
Rycina 33. Wiązanie białka DnaA do regionu *oriC* w komórkach *E. coli* MG1655 oraz *E. coli* Δ ppk przed stresem, w trakcie stresu oraz po stresie. Do analizy wiązania białka DnaA *in vivo* do wybranych regionów chromosomu wykorzystano metodę ChIP-qPCR z zastosowaniem przeciwciał anty-DnaA oraz komórek *E. coli* MG1655 (lewa strona) lub *E. coli* Δ ppk (prawa strona). Górne panele ilustrują procent wyjściowego DNA wyosobnionego dla regionu *oriC* (czarne słupki) oraz regionu *terC*, który pełnił rolę kontroli negatywnej (szare słupki). Przedstawiono reprezentatywne wyniki z jednego powtórzenia biologicznego. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z trzech powtórzeń technicznych reakcji qPCR. Dolne panele ilustrują średnią stosunku (*oriC* ChIP / *oriC* input) do (*terC* ChIP / *terC* input) uzyskaną z trzech lub czterech powtórzeń biologicznych. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe średniej. Kolorystyka odpowiada punktom czasowym pobierania próbek, zgodnie z opisem Rycina 27.

8.9. Wiązanie DnaA do *oriV* w komórkach szczepu typu dzikiego i Δ ppk podczas stresu

Postanowiłam sprawdzić, czy mechanizmy ograniczające wiązanie białka DnaA do DNA w trakcie głodu aminokwasowego dotyczą wyłącznie chromosomalnego miejsca inicjacji replikacji, czy mogą również wpływać na oddziaływanie białka DnaA z plazmidowym *origin* replikacji. Przeprowadziłam analizy ChIP-qPCR z wykorzystaniem bakterii *E. coli* MG1655 niosących plazmid RK2 sprawdzając wiązanie DnaA zarówno do chromosomalnego regionu *oriC*, jak i plazmidowego *oriV* przed stresem w warunkach optymalnych, podczas głodu aminokwasowego wywołanego SHX, oraz po ponownym przeniesieniu komórek do pożywki optymalnej (Metody 7.11). W komórkach *E. coli* MG1655 niosących plazmid RK2 zaobserwowałam wiązanie białka DnaA do regionu *oriC* w warunkach optymalnych, przed dodaniem SHX do pożywki (Rycina 34A). Podczas hodowli w pożywce LB z SHX, sygnał wiązania DnaA do *oriC* spadł do poziomu tła,

określonego na podstawie ilości fragmentów *terC* obecnych w próbkach po immunoprecypitacji (Rycina 34A). Po przeniesieniu komórek z powrotem do pożywki optymalnej, wiązanie białka DnaA z regionem *oriC* zostało przywrócone (Rycina 34A). Wyniki te są zgodne z obserwacjami, które uzyskałam wcześniej dla komórek szczepu typu dzikiego niezawierającego plazmidowego DNA (Rycina 33). W warunkach optymalnych, przed indukcją stresu, wykryłam również wiązanie białka DnaA do plazmidowego miejsca inicjacji replikacji *oriV*, o czym świadczy obecność fragmentów DNA zawierających sekwencję *oriV* w immunoprecypitowanych próbkach (Rycina 34A). Podczas stresu wiązanie to uległo osłabieniu, zaobserwowałam 3,72-krotny spadek ilości immunoprecypitowanych fragmentów DNA *oriV* w porównaniu do warunków sprzed stresu (Rycina 34A). Otrzymany poziom był zbliżony do tła, wyznaczonego na podstawie ilości fragmentów DNA *upf16.5* w immunoprecypitowanych próbkach (Rycina 34A). Region *upf16.5* jest fragmentem plazmidu RK2, nie zawiera sekwencji DnaA-box i nie są mi znane dane sugerujące, by białko DnaA mogło się z nim specyficznie wiązać, w związku z czym w doświadczeniu ChIP-qPCR został wykorzystany jako kontrola negatywna. Po usunięciu SHX i zmianie pożywki na optymalną, analiza ChIP-qPCR wykazała odtworzenie wiązania DnaA do *oriV* (Rycina 34A). Aby zweryfikować, czy obserwowany silny spadek poziomu wiązania DnaA do *oriV* podczas stresu wynika ze spadku wewnątrzkomórkowego poziomu białka, ponownie wykonałam analizy ChIP-qPCR wykorzystując komórki *E. coli* Δppk [RK2]. W komórkach tego szczepu, wiązanie białka DnaA do regionu *oriC* odpowiadało wcześniejszym obserwacjom dla komórek szczepu Δppk nieniosącymi plazmidu (Rycina 34B i Rycina 33). W komórkach szczepu Δppk niosących plazmid RK2, w warunkach optymalnych przed indukcją stresu, obecne były kompleksy białka DnaA z regionami *oriC* i *oriV*, co potwierdziłam, wykrywając odpowiadające im fragmenty DNA w próbkach po immunoprecypitacji (Rycina 34B). Niestety, w tych próbkach poziom tła, mierzony ilością niespecyficznych fragmentów *terC* oraz *upf16.5*, był stosunkowo wysoki, co mogło wynikać na przykład z zbyt krótkiego czasu sonikacji. Po dodaniu SHX do pożywki oddziaływanie białka DnaA z regionem *oriC* w komórkach szczepu Δppk [RK2], uległo osłabieniu, jednak spadek ten był mniej wyraźny niż w komórkach szczepu typu dzikiego (3,52-krotny vs 4,56-krotny spadek; Rycina 34B). Po przeniesieniu komórek do pożywki optymalnej, wiązanie DnaA z *oriC* zostało przywrócone (Rycina 34B). Analiza wiązania białka DnaA z plazmidowym DNA w tym szczepie była trudna. Wyniki uzyskane z poszczególnych powtórzeń biologicznych różniły się, a wysoki poziom tła utrudniał jednoznaczną interpretację. W związku z tym nie mogę stwierdzić, czy poziom wiązania

białka DnaA do *oriV* w komórkach *E. coli* Δ *appk* [RK2] podczas głodu aminokwasowego rzeczywiście uległ obniżeniu (Rycina 34B). Niemniej jednak, analizując średnie wartości z trzech powtórzeń biologicznych, mogę potwierdzić, że podczas wyjścia ze stresu, czyli po przeniesieniu komórek do pożywki optymalnej, zaobserwowałam znacznie wyższy poziom wiązania białka DnaA do *oriV* (Rycina 34B).



Rycina 34. Wiązanie białka DnaA do *oriC* i *oriV* w komórkach *E. coli* MG1655 oraz komórkach szczepów delecyjnych *Appk* i *Δfis* zawierających plazmid RK2. Do sprawdzenia wiązania białka DnaA do chromosomalnego miejsca inicjacji replikacji (*oriC*) oraz miejsca inicjacji replikacji plazmidu RK2 (*oriV*) przed stresem (kolor niebieski), podczas stresu (kolor czerwony) oraz po stresie (kolor zielony) wykorzystano metodę ChIP-qPCR. Eksperymenty wykonano dla komórek szczepu typu dzikiego *E. coli* MG1655 z plazmidem RK2 (A) lub komórek szczepów delecyjnych *E. coli* MG1655 Δ *appk* (B) i *E. coli* MG1655 Δ *fis* (C) zawierających ten sam plazmid. Doświadczenia przeprowadzono z zastosowaniem przeciwciał anti-DnaA. Wykresy przedstawiają procent wyjściowej ilości DNA wyosobnionego dla regionu *oriC* lub *oriV* (czarne słupki) oraz kontroli negatywnej *terC* lub *upf16.5* (szare słupki) z jednego reprezentatywnego powtórzenia z słupkami błędów przedstawiającymi odchylenie standardowe z trzech technicznych powtórzeń reakcji qPCR. Pod wykresami przedstawiającymi % wyjściowej ilości DNA przedstawiono stosunek (*oriC* ChIP / *oriC* input) do (*terC* ChIP / *terC* input) lub stosunek (*oriV* ChIP / *oriV* input) do (*upf* ChIP / *upf* input) z trzech powtórzeń biologicznych z słupkami błędów przedstawiającymi SD.

8.10. Wpływ białka Fis i acetylacji na wiązanie DnaA do DNA *in vivo*

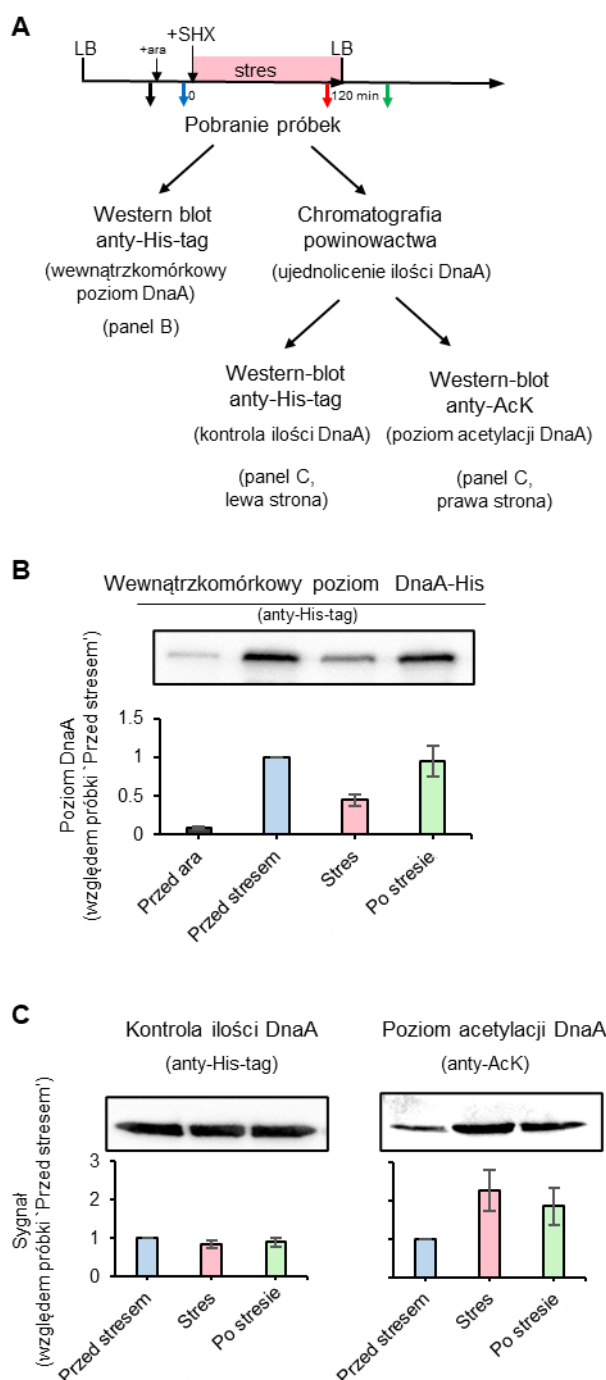
Ponieważ spadek wewnątrzkomórkowego poziomu DnaA nie tłumaczył w pełni obserwowanego braku jego wiązania z regionami *oriC* i *oriV*, rozważyłam udział innych białek w hamowaniu wiązania białek inicjatorowych z regionami *origin*. Naturalnymi kandydatami były białka NAP, które mogą wiązać się do regionów *origin* i tym samym wpływać na lokalną topologię DNA¹⁸⁷. Szczególną uwagę zwróciłam na białko Fis, którego ekspresja wzrasta w warunkach stresu wywołanego obecnością ampicyliny²³⁸. Aby ocenić jego rolę, przeprowadziłam analizy ChIP-qPCR z zastosowaniem przeciwciał anty-DnaA, wykorzystując komórki szczepu delecyjnego *E. coli* MG1655 Δfis zawierające plazmid RK2 (Materiały 6.1). Wyniki tego eksperymentu wykazały, że w komórkach szczepu Δfis profil oddziaływania białka DnaA z *oriC* jest podobny do profilu obserwowanego w komórkach szczepu typu dzikiego, tj. oddziaływanie DnaA–*oriC* występowało w warunkach optymalnych przed stresem, następnie poziom immunoprecypitowanych kompleksów DnaA–*oriC* spadał do wartości tła, a w trakcie wyjścia ze stresu wiązanie to było przywracane. Co istotne, po stresie poziom wiązania DnaA do *oriC* w komórkach szczepu Δfis przewyższał wartości obserwowane w komórkach szczepu typu dzikiego (Rycina 34C vs A). Podczas stresu wywołanego SHX, poziom oddziaływania białka DnaA z *oriV* w komórkach szczepu Δfis był zbliżony do tego obserwowanego w komórkach szczepu typu dzikiego (Rycina 34C vs A, dolne panele). Po przeniesieniu komórek do pożywki optymalnej, w komórkach szczepu Δfis ilość kompleksów DnaA–*oriV* była nieco wyższa niż w komórkach szczepu typu dzikiego, jednak wzrost ten był mniej wyraźny niż w przypadku kompleksów DnaA z *oriC*. Może to sugerować udział białka Fis w regulacji replikacji plazmidowego DNA i zapobieganiu nadmiernej inicjacji, jednak kwestia ta wymaga dalszych badań. Nie ma potwierdzonych dowodów na bezpośrednie wiązanie białka Fis z *origin* replikacji plazmidu RK2. Ze względu na zdolność białka Fis do wiązania się do DNA o wysoce zdegenerowanych sekwencjach, w regionie *oriV* zidentyfikowałam potencjalny motyw wiązania pasujący do sekwencji GxxxRxxxxYxxC, gdzie Y oznacza dowolną pirymidynę, a R purynę¹⁴⁸ (Rycina 35).



Rycina 35. Fragment sekwencji oriV plazmidu RK2 z zaznaczonymi sekwencjami iteronów oraz przypuszczalną sekwencją wiązaną przez białko Fis. Na rycinie kolorem fioletowym wyróżniono dwa iterony obecne w regionie oriV. Kolorem pomarańczowym zaznaczono potencjalną sekwencję wiązaną przez białko Fis. Sekwencja ta została wyznaczona na podstawie zestawienia sekwencji regionu oriV do sekwencji znanych regionów DNA wiązanych przez białko Fis (Metody 7.26).

Ponieważ acetylacja była postulowana jako czynnik wpływający na oddziaływanie białka DnaA z regionem *oriC in vitro*¹⁹⁰, założyłam, że może ona zapobiegać wiązaniu cząsteczek DnaA do miejsc inicjacji replikacji w warunkach stresu. Aby zweryfikować tę hipotezę, zbadalam poziom acetylacji DnaA *in vivo*, w tych samych warunkach hodowli, co w eksperymentach ChIP (Rycina 36A, Metody 7.27). Aby zwiększyć liczbę cząsteczek DnaA i umożliwić późniejszą normalizację ilości białka, w tym doświadczeniu wykorzystałam szczep *E. coli* MG1655 niosący plazmid ekspresyjny pBAD24::*dnaA-his* (Materiały 6.2). Analiza Western Blot wykazała, że 20-minutowa indukcja ekspresji genu *dnaA* za pomocą arabinozy powodowała 10,87-krotny wzrost poziomu białka DnaA-His (Rycina 36B, przed arabinozą vs. przed stresem), nie zmieniając przy tym charakterystycznych zmian jego poziomu w trakcie stresu i po stresie, tj. poziom białka DnaA obniżał się podczas stresu i wzrastał podczas wyjścia ze stresu (Rycina 36B), co świadczy o tym, że mechanizmy regulujące poziom białka DnaA w warunkach stresu i po stresie zachowują swoją skuteczność również przy podwyższonej ilości białka DnaA w komórce. Następnie za pomocą chromatografii powinowactwa wyizolowałam białko DnaA-His (Metody 7.27). Używałam minimalnej objętości złoża niklowego, aby zapewnić pełne wysycenie jego miejsc wiązania, co umożliwiło normalizację ilości białka w próbkach (Rycina 36C, lewy panel). Poziom acetylacji białka DnaA oceniałam metodą Western Blot z użyciem przeciwciał anti-AcK. Wyniki pokazały, że podczas hodowli komórek w pożywce LB z SHX, poziom acetylacji lizyn białka DnaA wzrastał 2,25-krotnie i pozostawał podwyższony także po wymianie pożywki na optymalną, osiągając wartość 1,85 razy wyższą niż przed stresem (Rycina 36C, prawy panel). Wyniki te wskazują, że w warunkach głodu aminokwasowego większy odsetek cząsteczek DnaA ulega acetylacji i/lub więcej reszt aminokwasowych w pojedynczej cząsteczce DnaA jest zmodyfikowanych przez acetylację (Rycina 36B-C). Może to wynikać ze zwiększonej acetylacji cząsteczek

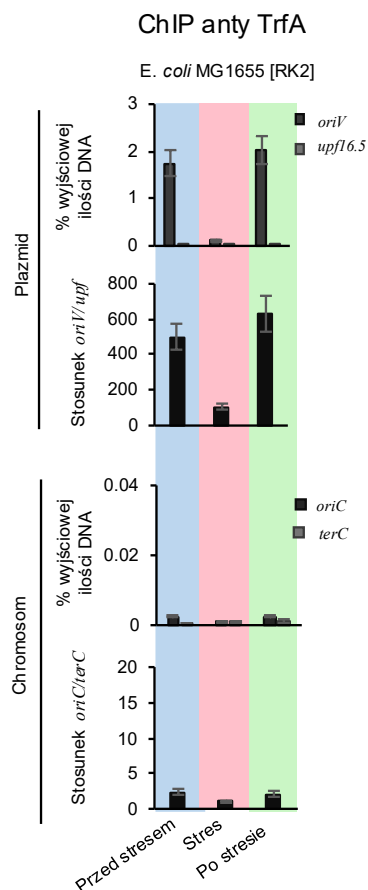
DnaA, zahamowania lub zmniejszenia aktywności deacetylazy bądź selektywnej proteolizy ukierunkowanej na nieacetylowane cząsteczki DnaA. W trakcie wyjścia ze stresu poziom acetylacji DnaA obniżał się w porównaniu do poziomu acetylacji w trakcie stresu, co prawdopodobnie mogło wynikać z syntezy nowych, nieacetylowanych cząsteczek DnaA i/lub aktywacji mechanizmów deacetylacji.



Rycina 36. Poziom acetylacji białka DnaA w komórkach *E. coli* przed stresem, w trakcie stresu i po stresie. (A) Schemat eksperymentu oceniającego poziom acetylacji białka DnaA przed stresem (kolor niebieski), podczas głodu aminokwasowego (kolor czerwony) oraz po stresie (kolor zielony). W eksperymencie wykorzystano komórki *E. coli* MG1655 niosące plazmid kodujący białko DnaA-His. (B) Wynik analizy Western Blot z zastosowaniem przeciwciał anty-HisTag pokazujący wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA-His przed dodaniem arabinozy (Przed ara), przed dodaniem SHX (Przed stresem), podczas hodowli w LB+SHX (Stres) oraz po wymianie pożywki na optymalną (Po stresie). Wykres słupkowy przedstawia wyniki analizy densytometrycznych jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych, odniesione do poziomu białka DnaA sprzed stresu. (C) Białko DnaA-His izolowano z pobranych próbek hodowli z wykorzystaniem minimalnej objętości złoża Ni-NTA²⁺, co pozwoliło na znormalizowanie poziomu DnaA-His, co potwierdzono metodą Western Blot z użyciem przeciwciał anty-HisTag (lewy panel). Acetylację białka DnaA-His analizowano za pomocą przeciwciał anty-AcK (prawy panel). Pokazano reprezentatywne wyniki analiz Western Blot oraz wykresy słupkowe przedstawiające wyniki analizy densytometrycznych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych z oznaczonym odchyleniem standardowym.

8.11. Wpływ stresu na oddziaływanie białka TrfA z *oriV*

Przeprowadzone przeze mnie analizy ChIP-qPCR wykazały, że w warunkach głodu aminokwasowego białko DnaA nie wiąże się z miejscem inicjacji replikacji plazmidu RK2 (Rycina 34). Dlatego uznałam za istotne zbadanie, czy w tych samych warunkach dochodzi również do zaburzenia wiązania plazmidowego inicjatora replikacji, białka TrfA, z regionem *oriV*. Przeprowadziłam analizę ChIP-qPCR sprawdzając wiązanie białka TrfA do regionu *oriV* przed stresem, w trakcie stresu oraz podczas wyjścia ze stresu. Doświadczenia, podobnie jak w przypadku analizy wiązania białka DnaA, wykonałam wykorzystując komórki *E. coli* MG1655 [RK2]. W warunkach optymalnego wzrostu, przed dodaniem SHX do pożywki, zaobserwowałam wyraźne wzbogacenie fragmentów DNA zawierających sekwencję *oriV* w próbkach po immunoprecypitacji (Rycina 37), co potwierdza interakcję TrfA z *oriV* i jego rolę w inicjacji replikacji plazmidu RK2. Po indukcji głodu aminokwasowego przez dodanie SHX do pożywki nadal obserwowałam wzbogacenie *oriV* w próbkach ChIP, jednak wiązanie TrfA było wyraźnie osłabione, wykazując około 5-krotny spadek w porównaniu z poziomem sprzed stresu (Rycina 37). Po usunięciu SHX i wymianie pożywki na świeżą, poziom immunoprecypitowanych kompleksów TrfA-*oriV* powrócił do wartości obserwowanych przed stresem (Rycina 37). W żadnej z analizowanych próbek nie wykryłam wzbogacenia regionu kontrolnego *upf16.5*, co potwierdza specyficzność zastosowanego testu (Rycina 37). W celu dalszej weryfikacji specyficzności metody ChIP z przeciwciałami anty-TrfA sprawdziłam wiązanie TrfA do chromosomalnego DNA. Zgodnie z oczekiwaniami nie zaobserwowałam wiązania TrfA do regionów *oriC* ani *terC* w żadnym z badanych warunków (Rycina 37).

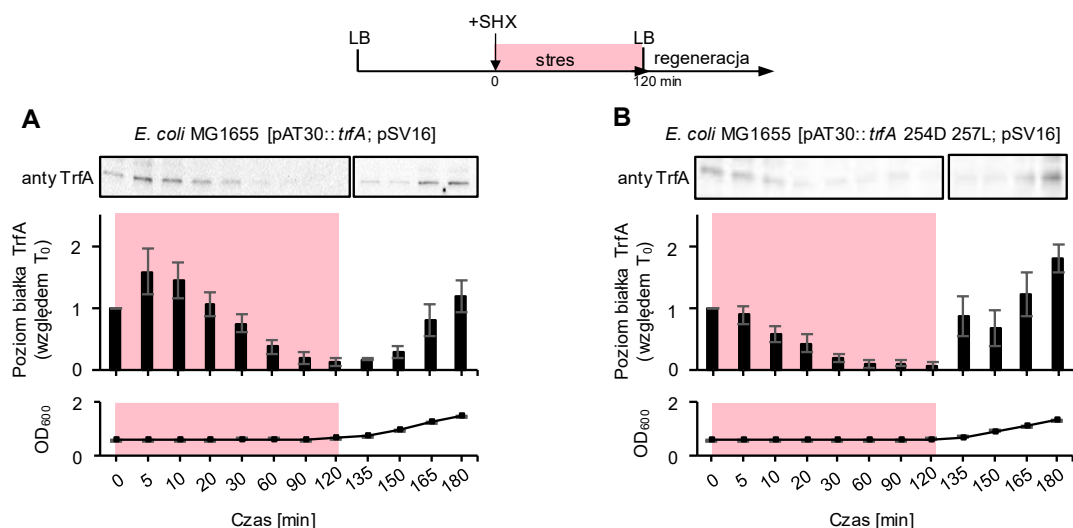


Rycina 37. Wiązanie białka TrfA do *oriV* w komórkach *E. coli* przed stresem, w trakcie stresu i po stresie. Wiązanie białka TrfA do sekwencji *oriV* *in vivo* oceniano metodą ChIP-qPCR z wykorzystaniem komórek *E. coli* MG1655 zawierających plazmid RK2. Warunki pobierania próbek opisano w części Metody 7.11. Doświadczenia przeprowadzono z zastosowaniem przeciwciał anty-TrfA. Próbkę wyjściowego DNA (input) oraz DNA po immunoprecypitacji (ChIP) poddano reakcji qPCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla regionów *oriV* i *upf16.5* plazmidu RK2. Region *upf16.5* pełnił rolę kontroli negatywnej, ponieważ zgodnie z obecną wiedzą białko TrfA nie powinno wiązać się z tym regionem. Jako dodatkową kontrolę negatywną sprawdzono wiązanie białka TrfA do chromosomalnych regionów *oriC* oraz *terC*. Pierwszy i trzeci panel przedstawiają procent wyjściowej ilości DNA dla immunoprecypitowanego regionu *oriV* lub *oriC* (czarne słupki) oraz *upf16.5* lub *terC* (szare słupki). Wykresy te przedstawiają wynik otrzymany dla jednego reprezentatywnego powtórzenia biologicznego, z błędami standardowymi z trzech powtórzeń technicznych qPCR. Drugi i czwarty panel pokazują stosunek (*oriV* ChIP / *oriV* input) do (*upf16.5* ChIP / *upf16.5* input) lub (*oriC* ChIP / *oriC* input) do (*terC* ChIP / *terC* input). Wartości przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych.

8.12. Stabilność białka TrfA w trakcie głodu aminokwasowego

Ponieważ w warunkach stresu białko DnaA ulega degradacji, co prowadzi do obniżenia jego wewnątrzkomórkowego poziomu³⁵, założyłam, że podobne mechanizmy mogą dotyczyć również plazmidowego inicjatora replikacji. Aby to zweryfikować, postanowiłam zbadać wewnątrzkomórkowy poziom białka TrfA typu dzikiego (Rycina 38A) oraz jego monomerycznego wariantu TrfA G254D/S267L (Rycina 38B) przed stresem, w trakcie głodu aminokwasowego wywołanego SHX oraz podczas wyjścia ze stresu. Do analiz wykorzystałam metodę Western Blot (Metody 7.16), nanosząc na żele równą liczbę komórek, wyznaczaną na podstawie wartości OD₆₀₀, tak jak w przypadku analiz wewnątrzkomórkowego poziomu białka DnaA (patrz Wyniki 8.5). Równolegle w zbieranych próbkach monitorowałam wzrost i podziały komórek poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli (OD₆₀₀). Ze względu na niską ekspresję genu *trfA* z natywnego promotora, nie byłam w stanie wykryć białka TrfA w lizatach komórek niosących plazmid

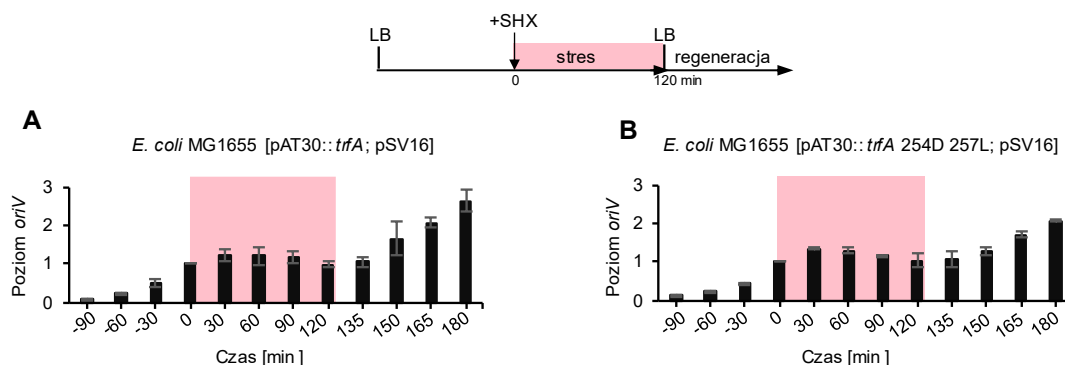
RK2. Aby obejść to ograniczenie, skonstruowałam szczep *E. coli* zawierający dwa plazmidy: pAT30 oraz pSV16 (Materiały 6.2, Metody 7.4). Pierwszy z plazmidów koduje białko TrfA-33 typu dzikiego lub jego monomeryczny wariant pod kontrolą promotora indukowanego laktozą, natomiast drugi to mini-replikon RK2, zawierający region *oriV*. Plazmid pSV16 wymaga do swojej replikacji i utrzymania w komórkach inicjatora TrfA działającego *in trans*. Aby ocenić stabilność białka TrfA w warunkach stresu wywołanego SHX, przeprowadziłam analizy Western Blot nieszczelną ekspresję promotora laktozowego w plazmidzie pAT30 (Metody 7.16). Wyniki analizy Western Blot pokazały, że poziomy zarówno białka typu dzikiego, jak i monomeru TrfA stopniowo malały przez cały czas hodowli w pożywce z SHX (Rycina 38). Spadek ten utrzymywał się aż do końca głodu aminokwasowego, osiągając najniższe wartości. W pożywce z SHX, wzrost hodowli komórek eksprymujących białko TrfA typu dzikiego, jak i jego monomeryczny wariant, był zahamowany (Rycina 38A-B). Ze względu na zahamowanie podziałów komórek jedynym prawdopodobnym wyjaśnieniem obserwowanego stopniowego spadku poziomu TrfA jest jego proteoliza. W przypadku białka typu dzikiego zmniejszenie poziomu białka było widoczne już 60 minut po dodaniu SHX (Rycina 38). W komórkach zawierających TrfA typu dzikiego zaobserwowałam niewielki wzrost poziomu białka po 5 i 10 minutach od dodania SHX do hodowli, poprzedzający jego późniejszy spadek (Rycina 38A). Ten przejściowy wzrost może wynikać z początkowej nierównowagi między syntezą a degradacją białka, być może spowodowanej wolniejszą degradacją dimerów TrfA oraz niepełnym zahamowaniem aktywności rybosomów w pierwszych minutach po dodaniu SHX. W przeciwieństwie, wariant monomeryczny TrfA charakteryzował się nieco szybszym tempem degradacji, z zauważalnym spadkiem poziomu już po 30 minutach od wprowadzenia SHX i bez początkowego niewielkiego wzrostu poziomu białka na początku stresu (Rycina 38B). Podczas wyjścia ze stresu, po zastąpieniu pożywki świeżą, bez SHX, poziomy TrfA zaczęły ponownie wzrastać, co zbiegało się z przywróceniem podziałów komórek (Rycina 38).



Rycina 38. Wewnątrzkomórkowy poziom białka TrfA oraz wzrost hodowli bakteryjnych przed stresem, podczas stresu i w trakcie wyjścia ze stresu. Poziom białka TrfA oraz wzrost hodowli monitorowano przed stresem, w trakcie stresu i po stresie w komórkach *E. coli* MG1655 zawierających plazmidy pSV16 oraz plazmid pAT30 kodujący białko TrfA-33 typu dzikiego (A) lub jego monomeryczny wariant TrfA 254D/257L (B). Próbkę hodowli pobierano w wybranych punktach czasowych względem momentu indukcji głodu aminokwasowego, kiedy do pożywki LB dodano SHX (czas 0) i poddano analizie Western Blot z przeciwciałami anti-TrfA (Metody 7.16). Intensywności prążków analizowano densytometrycznie i normalizowano względem poziomu z czasu 0. Wzrost hodowli monitorowano poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali 600 nm (dolne panele). Różowym kolorem zaznaczono fazę stresu, podczas której SHX był obecny w pożywce LB. Na wszystkich panelach słupki przedstawiają średnią $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych.

8.13. Wpływ głodu aminokwasowego na inicjację replikacji plazmidu RK2

Ponieważ w warunkach stresu wywołanego SHX zaobserwowałam degradację białka TrfA oraz zahamowanie wiązania TrfA oraz DnaA do *oriV*, zweryfikowałam, czy w tych warunkach oraz podczas wyjścia ze stresu następuje inicjacja replikacji plazmidu pSV16. W tym celu monitorowałam ilość *oriV* w hodowlach *E. coli* MG1655 [pSV16, pAT30::*trfA*] oraz *E. coli* MG1655 [pSV16, pAT30::*trfA* G254D/S267L] metodą qPCR (Metody 7.25, Rycina 39).



Rycina 39. Inicjacja replikacji pochodnej plazmidu RK2 przed stresem, w trakcie stresu i wyjścia ze stresu. Inicjację replikacji plazmidu zawierającego *oriV* oceniano przed stresem, w trakcie stresu i po jego zakończeniu w komórkach *E. coli* MG1655 zawierających plazmidy pSV16 oraz plazmid pAT30 kodujący białko TrfA-33 typu dzikiego (A) lub jego monomeryczny wariant TrfA 254D/257L (B). Próbkę hodowli pobierano w określonych punktach czasowych względem momentu rozpoczęcia głodu aminokwasowego, kiedy do pożywki LB dodano SHX (czas 0). W celu oceny zachodzenia inicjacji replikacji plazmidu monitorowano poziom *oriV* w hodowli bakteryjnej za pomocą metody qPCR. Równe objętości hodowli poddawano lizie, a następnie analizowano metodą qPCR z użyciem starterów flankujących region sekwencji iteronowych *oriV* plazmidu pSV16. Wyniki przedstawiono jako zmiany względem poziomu *oriV* przed indukcją stresu (czas 0). Wynik przedstawia średnie $\pm$ SD ($n=3$).

W warunkach optymalnego wzrostu, przed dodaniem SHX do pożywki, poziom *oriV* wzrastał wykładniczo zarówno w komórkach syntetyzujących białko TrfA typu dzikiego (Rycina 39A), jak i jego monomeryczny wariant (Rycina 39B), co odzwierciedlało aktywną replikację plazmidu. W ciągu 30 minut od dodania SHX poziom *oriV* przestał wzrastać, co wskazuje na zahamowanie inicjacji replikacji w komórkach *E. coli*, i pozostawał na tym poziomie przez czas hodowli w pożywce z SHX (Rycina 39A). Co istotne, zahamowanie inicjacji replikacji podczas głodu aminokwasowego obserwowałam również w komórkach, w których dochodzi do ekspresji genu kodującego białko TrfA 254D 257L (Rycina 39B). Co interesujące, po wymianie pożywki na optymalną, zaobserwowałam ponowny, wzrost poziomu *oriV* w obu hodowlach (Rycina 39B), co świadczy o restarcie replikacji plazmidowego DNA w komórkach, które wychodzą ze stresu.

9. DYSKUSJA

9.1. Białka inicjatorowe DnaA i TrfA w komórkach *E. coli* w warunkach optymalnych

Przeprowadzone w pracy obserwacje pojedynczych komórek hodowanych w warunkach optymalnych wykazały, że lokalizacja białka DnaA w komórkach *E. coli* zmienia się w trakcie cyklu komórkowego. Tuż po podziale, cząsteczki białka DnaA obecne są w środkowej części komórki, natomiast w miarę wzrostu komórki pojawiają się skupiska DnaA zlokalizowane w charakterystycznych pozycjach odpowiadających około $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$ długości komórki. Na żadnym etapie cyklu nie obserwowałam lokalizacji białka DnaA w biegunach komórki. Obserwowane rozmieszczenie białka DnaA jest zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi na temat lokalizacji tego białka w trakcie cyklu komórkowego⁶⁸. W literaturze opisano również inne modele wewnątrzkomórkowej lokalizacji DnaA, zakładające m.in. jego asocjację z błoną komórkową lub tworzenie struktur o układzie helikalnym wzdłuż długiej osi komórki^{70,239}. W wynikach moich analiz nie znalazłam jednak potwierdzenia takiego wzoru lokalizacji białka DnaA. Różnice w obserwacjach mogą wynikać z zastosowania innego układu eksperymentalnego. We wspomnianych pracach analizowano lokalizację białka rekombinowanego DnaA-GFP, w którym GFP znajdowało się na C-końcu białka DnaA, a gen kodujący ten wariant białka znajdował się na plazmidzie. Wykazano przy tym, że komórki zawierające taki konstrukt charakteryzowały się obniżoną częstością inicjacji i asynchronizacją replikacji². Natomiast ekspresja rekombinowanego białka DnaA-EYFP, w którym fragment genu kodującego II domenę DnaA został zastąpiony sekwencją EYFP, zarówno w badaniach Nozaki i wsp.⁶⁸, jak i w moich obserwacjach, nie powodowała zmiany długości komórek ani zmiany częstości inicjacji replikacji DNA w porównaniu z wartościami obserwowanymi dla komórek szczepu typu dzikiego. Aby upewnić się, że białko rekombinowane DnaA-EYFP zachowuje aktywność biologiczną, oczyściłam preparat tego białka i przeprowadziłam analizę wiązania białka do DNA *in vitro* metodą EMSA. Uzyskane wyniki potwierdziły, że białko DnaA-EYFP wiąże się do *oriC* tak samo jak białko DnaA typu dzikiego. Oznacza to, że zastąpienie domeny II białka DnaA sekwencją aminokwasową EYFP nie zaburza aktywności białka. Co więcej, struktura białka DnaA-EYFP wykazywała cechy stabilności białka typu dzikiego w analizie Tycho, co czyni białko DnaA-EYFP doskonałym narzędziem nie tylko do badań *in vivo*, ale także do analiz biochemicznych *in vitro*. Coraz

częściej fluorescencyjne białka rekombinowane są wykorzystywane w metodach takich jak MST czy badania LLPS, ponieważ dzięki własnej fluorescencji nie wymagają przeprowadzania dodatkowego etapu znakowania po oczyszczeniu. W tym kontekście białko rekombinowane DnaA-EYFP łączy funkcjonalność natywnego białka z praktycznymi zaletami technicznymi, co czyni je wartościowym narzędziem do przyszłych badań. Analiza ChIP-seq wykazała, że w warunkach optymalnych największe nagromadzenie białka DnaA występuje w obrębie regionu *oriC*, co sugeruje, że obserwowane w mikroskopii skupiska DnaA-EYFP odzwierciedlają interakcje inicjatora właśnie z tym fragmentem chromosomu, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami¹. Analiza ChIP-seq ujawniła ponadto, że w warunkach optymalnych, cząsteczki DnaA wiążą się łącznie do 41 regionów chromosomu. Wśród tych 41 miejsc znalazły się zarówno wcześniej opisane regiony zlokalizowane m. in. przed genami *mioC*, *yjeV*, *datA* i *purH*⁹³ jak i nowe, dotąd niewspomniane w literaturze lokalizacje, takie jak *malT*, *rrsC* czy *mltA*. W moich analizach nie zaobserwowałam sygnału wiązania w regionach DARS1 i DARS2 ani w niektórych miejscach opisanych w badaniu ChIP-seq z 2024 roku, takich jak *nrdA* czy *rpoH*⁵. Może to sugerować, że interakcje te mają charakter krótkotrwały i są trudne do uchwycenia. Warto podkreślić, że w badaniu z 2024 roku dane ChIP-seq anty-DnaA uzyskano dla komórek hodowanych w temperaturze 37°C z wykorzystaniem białka DnaA znakowanego na C-końcu (DnaA-SPA), natomiast w moich eksperymentach zastosowałam natywne białko i hodowle prowadzone w temperaturze 30°C, co może tłumaczyć obserwowane różnice w lokalizacji i sile sygnału wiązania.

Analiza pojedynczych komórek wykazała, że w temperaturze 30°C w pożywce optymalnej komórki *E. coli* dzielą się średnio co 30–40 minut, co jest zgodne z danymi literaturowymi²⁴⁰. W tych warunkach zachodzi inicjacja replikacji zarówno chromosomu, jak i plazmidu RK2, co wykazały doświadczenia opisane w tej pracy, obejmujące analizę liczby kopii regionów *oriC* i *oriV* w hodowlach bakteryjnych. Obecność plazmidu iteronowego RK2 w komórkach sprawia, że cząsteczki DnaA w warunkach optymalnych wiążą się nie tylko z chromosomalnym *origin* replikacji, ale również z plazmidowym, *oriV*. Do *oriV* wiąże się także plazmidowy inicjator, białko TrfA. W optymalnych warunkach poziomy obu inicjatorów są wystarczająco wysokie, by zapewnić skuteczną inicjację replikacji plazmidowego DNA. Szacuje się, że w komórce *E. coli* zawierających plazmid RK2 znajduje się około 220 monomerów TrfA-33 oraz 80 monomerów TrfA-44²⁴¹. W komórce obecnych jest średnio około 15 kopii plazmidu RK2²⁴¹. Każdy plazmid posiada 10 miejsc wiązania białka TrfA, pięć klasycznych iteronów (5–9) niezbędnych do

rozpoczęcia replikacji oraz pięć iteronów regulacyjnych (1–4 i 10), które nie są bezpośrednio wymagane w tym procesie¹⁶¹. Wynika z tego, że w komórce dostępnych jest około 150 miejsc wiązania TrfA, czyli zdecydowanie mniej niż cząsteczek inicjatora. Większa liczba cząsteczek białka TrfA od liczby dostępnych miejsc wiązania zapewnia pełne obsadzenie iteronów i umożliwia inicjację replikacji. Warto podkreślić, że związanie cząsteczek TrfA z każdym z pięciu iteronów 5–9 w obrębie *oriV* jest warunkiem koniecznym do rozpoczęcia tego procesu¹⁶⁰.

9.2. Białka inicjatorowe DnaA i TrfA w komórkach *E. coli* podczas głodu aminokwasowego

W warunkach głodu aminokwasowego obraz komórek *E. coli* ulega całkowitej zmianie. Przeprowadzone w tej pracy obserwacje pojedynczych komórek ujawniły, że w warunkach głodu aminokwasowego następują zmiany morfologii komórek *E. coli* oraz wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka DnaA. Po indukcji stresu około 80% komórek kończy podział komórkowy, po czym ich wzrost zostaje zahamowany, natomiast pozostałe 20% nie dzieli się podczas stresu aż do momentu wyjścia ze stresu. Wynik ten ma potwierdzenie we wcześniejszych doniesieniach wskazujących, że podział komórek zachodzi jeszcze przez krótki okres po dodaniu czynnika hamującego syntezę DNA, jeśli przed wystąpieniem stresu zakończy się runda replikacji chromosomu^{242,243}. Wskazuje to, że o podziale komórki na początku stresu najprawdopodobniej decyduje moment zakończenia replikacji chromosomalnego DNA. W wyniku podziału komórek na samym początku stresu i braku ich dalszego wzrostu, obserwowane w stresie komórki są krótsze niż w warunkach optymalnych. Obserwowany przeze mnie spadek średniej długości komórek w warunkach głodu aminokwasowego jest zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi komórek poddanych głodowi²⁴⁴. Wcześniejsze badania wskazują ponadto, że nagły niedobór składników odżywczych może prowadzić w komórkach *E. coli* nie tylko do zmniejszenia długości komórek, ale także do obkurczania się błony wewnętrznej i spadku objętości cytoplazmy, co w konsekwencji zwiększa gęstość cytoplazmy i zmienia dynamikę wewnątrzkomórkową²⁴⁵. Wykazałam, że w tych warunkach białko DnaA nie tworzy wyraźnych skupisk charakterystycznych dla komórek rosnących, lecz wykazuje rozproszone rozmieszczenie w centralnej części komórki, przy braku lokalizacji w biegunach. W trakcie głodu aminokwasowego, fluorescencja białka DnaA-EYFP stopniowo zanikała. Analiza

ilościowa wykazała statystycznie istotny spadek maksymalnych wartości intensywności fluorescencji podczas stresu, co koreluje z zanikiem zdefiniowanych skupisk DnaA i wskazuje na reorganizację lokalizacji białka w odpowiedzi na stres. Stężenie białka DnaA jak i DnaA-EYFP stopniowo spada w trakcie głodu aminokwasowego, co tłumaczy obserwowany zanik sygnału fluorescencji i jest spójne z wcześniej opublikowanymi obserwacjami³⁵. Podczas oznaczania poziomu białka DnaA-EYFP w komórkach, analizy Western Blot przeprowadzone z użyciem przeciwciał anty-GFP nie wykazały obecności prążka odpowiadającego masie samego EYFP. Wyklucza to możliwość, że rozproszony sygnał fluorescencyjny obserwowany w komórkach podczas stresu wynikał z częściowej degradacji białka rekombinowanego. Należy podkreślić, że EYFP zastępuje drugą domenę białka DnaA, a nie stanowi jego końcowego fragmentu. Biorąc pod uwagę, że bakteryjne proteazy najczęściej degradują substraty od C lub N końca²⁴⁶, pozostawienie stabilnego fragmentu EYFP po częściowej degradacji wydaje się mało prawdopodobne.

Zaobserwowałam, że podczas głodu aminokwasowego wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA obniżał się w czasie, lecz nie spadał do zera, co pozostaje zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi PDAP³⁵. Nie było jednak jasne, czy cząsteczki DnaA pozostające w komórce w warunkach stresu oddziałują z DNA. Zakładałam, że obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu białka przełoży się na równomierne zmniejszenie wiązania białka do wszystkich miejsc genomu. Co więcej, ze względu na nagromadzenie sekwencji DnaA-box w regionie *oriC*, efekt ten powinien być tam relatywnie najslabiej widoczny. Tymczasem analizy ChIP-seq, wykazały, że w przeciwieństwie do warunków optymalnych, podczas stresu cząsteczki białka DnaA nie wiążą się do *oriC*. Wynik ten został potwierdzony niezależnie metodą ChIP-qPCR, która również nie wykazała interakcji DnaA z tym regionem *in vivo* podczas głodu aminokwasowego. Utrata wiązania z *oriC* tłumaczy zanik wyraźnych skupisk fluorescencyjnych obserwowanych w obrazie mikroskopowym pojedynczych komórek poddanych stresowi. Co szczególnie interesujące, analiza ChIP-seq ujawniła natomiast inne miejsca wiązane przez białko DnaA w warunkach stresu, zlokalizowane m.in. w pobliżu genów *glpD*, *uspE*, *rpoS*, *tsaC* czy *zipA*. Regiony w sąsiedztwie genów *uspE*, *tsaC*, *rpoS*, *ilvL* i *zipA* stanowią dotąd nieopisane w literaturze miejsca wiązania białka DnaA, które wymagają dalszych badań w celu określenia roli białka DnaA i jego wpływu na regulację ekspresji tych genów. Natomiast oddziaływanie białka DnaA z promotorem *glpD* było wcześniej postulowane na podstawie analiz *in vitro*⁷³. W wynikach analizy ChIP-seq opublikowanych w 2024 roku przez Stringer i wsp., przeprowadzonej na komórkach *E. coli* rosnących w warunkach optymalnych, nie wykryto

oddziaływania białka DnaA z promotorem genu *glpD*⁹³, co pozostaje zgodne z faktem, że w moich analizach pojawiała się ona wyłącznie w warunkach stresu. Obserwacje uzyskane metodą ChIP-seq potwierdziłam wykonując test EMSA, który wykazał, że *in vitro* cząsteczki białka DnaA tworzą kompleksy z fragmentami DNA obejmującymi sekwencje promotora *glpD*. Chociaż analiza ChIP-seq umożliwia identyfikację miejsc wiązania DnaA w różnych warunkach, nie daje odpowiedzi na pytanie, o status nukleotydowy cząsteczek DnaA wiążących się do zidentyfikowanych regionów DNA. Można przypuszczać, że w warunkach stresu, biorąc pod uwagę specyficzność systemu PDAP wobec formy DnaA-ADP, dominującą populację cząsteczek stanowi DnaA-ATP. Jednak sama przewaga formy DnaA-ATP podczas stresu nie wyjaśnia zmiany profilu oddziaływania z chromosomem, gdyż w warunkach optymalnych występują zarówno cząsteczki DnaA-ATP, jak i DnaA-ADP, a mimo to nie obserwuje się wiązania w niektórych regionach, które są wiązane wyłącznie podczas stresu.

Brak wiązania DnaA do *oriC* w warunkach stresu można teoretycznie interpretować w świetle modelu miareczkowania inicjatora. Zgodnie z jego założeniami, cząsteczki białka DnaA są początkowo sekwestrowane przez liczne miejsca wiązania o wysokim powinowactwie rozmieszczone w całym chromosomie, a dopiero po ich wysyceniu możliwe staje się wiązanie DnaA-ATP z miejscami o niższym powinowactwie w *oriC*, utworzenie filamentu DnaA i rozpoczęcie replikacji DNA^{139,142}. Przy spadku wewnątrzkomórkowego poziomu białka DnaA brak jego interakcji z *oriC* można byłoby zatem interpretować jako efekt niedostatecznego nasycenia miejsc wiązania na chromosomie. Jednak uzyskane przeze mnie wyniki analizy ChIP-seq nie potwierdzają takiego wyjaśnienia. Zamiast proporcjonalnego obniżenia sygnału we wszystkich dotychczasowych regionach, w warunkach stresu zaobserwowałam wyraźną zmianę profilu oddziaływań DnaA z chromosomalnym DNA, obejmującą utratę wiązania w regionach zidentyfikowanych w optymalnych warunkach oraz pojawienie się nowych miejsc interakcji. Wnioski z analiz ChIP-seq zostały dodatkowo wsparte danymi uzyskanymi dla komórek szczepu Δppk , które nie mogą syntezować polyP. W tym przypadku wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA w warunkach głodu aminokwasowego pozostawał stabilny. Mimo to, w komórkach Δppk obserwowałam obniżenie poziomu wiązania białka DnaA do *oriC* względem poziomu sprzed stresu, przy czym efekt ten był mniej nasilony niż w komórkach szczepu typu dzikiego. Obserwacja ta jest spójna z wcześniejszymi wynikami, w których wykazano, że sztuczne podniesienie poziomu białka DnaA, poprzez indukcję ekspresji genu tego białka podczas odpowiedzi ścisłej nie przywraca inicjacji replikacji²³⁴. Wynik ten idealnie

uzupełnia moje obserwacje, wskazując, że samo obniżenie poziomu DnaA nie jest wystarczającym wyjaśnieniem obniżenia wiązania cząsteczek białka DnaA do *oriC*, lecz jest efektem równolegle działających, mechanizmów regulacyjnych, które zapobiegają wiązaniu DnaA do *origin* replikacji w warunkach stresu. Jednym z takich mechanizmów jest acetylacja lizyn w cząsteczce DnaA, która osłabia wiązanie białka do sekwencji DnaA-box w *oriC*^{189,190}. Wykazano, że podczas fazy stacjonarnej poziom acetylacji białka DnaA w komórkach *E. coli* ulega zwiększeniu¹⁸⁹, a w moich analizach podobny efekt zaobserwowałam w czasie głodu aminokwasowego indukowanego SHX. Wyniki te sugerują, iż wzrost poziomu acetylacji białka DnaA może być uniwersalnym elementem odpowiedzi komórki na warunki stresu. Mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Jednakże doświadczenia przeprowadzone w laboratorium prof. Koniecznego wykazały, że aktywność deacetylazy CobB ulega zahamowaniu w obecności polyP²⁴⁷, co może przyczyniać się do wzrostu poziomu acetylowanych cząsteczek białka DnaA, mających ograniczoną zdolności do wiązania *oriC*. Oprócz acetylacji, istotnym mechanizmem zapobiegającym inicjacji replikacji w warunkach stresu może być zmiana topologii DNA. Wykazano, że w komórkach *E. coli* podczas indukowanej odpowiedzi ściślej dochodzi do zmian superskrętności chromosomu, co utrudnia wiązanie DnaA do *oriC*²³⁴. Reorganizację nukleoidu obserwowano także w komórkach *P. aeruginosa* podczas głodu azotowego, gdzie polyP modulował dynamikę chromosomu i cytoplazmy, natomiast delecja genu *ppk* powodowała rozluźnienie tych struktur²⁴⁸. Co więcej, w *E. coli* wykazano, że polyP sprzyja tworzeniu kondensatów z udziałem białka Hfq w regionach bogatych w AT, co promuje formowanie heterochromatyny bakteryjnej i sprzyja wyciszaniu ekspresji genów²⁴⁹. Wyniki te wskazują, że reorganizacja nukleoidu w stresie może obejmować różne poziomy regulacji, od zmian superskrętności chromosomu po tworzenie kondensatów z udziałem polyP. W ten schemat wpisuje się także białko Hfq, znane głównie jako regulator metabolizmu RNA, ale pełniące również funkcję białka NAP zdolnego do kondensacji DNA²⁵⁰. Istotną rolę w modulacji architektury genomu odgrywają ponadto inne białka nukleoidu, takie jak HU, IHF, SeqA czy Fis²⁵¹, które mogą sprzyjać nadmiernej kondensacji DNA lub bezpośrednio ograniczać interakcję DnaA z DNA. Warto zwrócić uwagę, iż nie tylko nadmierna aktywność białek NAP, lecz także zaburzenie ich funkcji może prowadzić do zahamowania procesu inicjacji replikacji. W literaturze podkreśla się rolę kondensatów biomolekularnych i LLPS jako kluczowych regulatorów cyklu komórkowego, odpowiadających za organizację hiperstruktur, w tym nukleoidu²⁵². Wykazano, że zagęszczenie makrocząsteczek (ang. *crowding*) jest niezbędnym elementem

do przebiegu reakcji replikacji *oriC in vitro*⁴⁶ oraz że LLPS ma ogromne znaczenie podczas segregacji nowo zsyntetyzowanych chromosomów²⁵³. W tym kontekście można przypuszczać, że zarówno nadmierna kondensacja DNA w warunkach stresu, jak i jej brak w wyniku zaburzenia aktywności białek NAP i LLPS mogą uniemożliwiać prawidłowe wiązanie DnaA z *oriC* i skutecznie blokować inicjację replikacji chromosomu. Interesującym kierunkiem dalszych badań pozostaje określenie, w jakim stopniu białka NAP oraz LLPS wpływają na inicjację replikacji DNA w warunkach stresu. Ponieważ analizy transkryptomyczne wykazały wzrost ekspresji genu *fis* w komórkach *E. coli* w warunkach stresu wywołanego obecnością ampicyliny²³⁸, w przedstawionej pracy podjęłam próbę sprawdzenia roli białka Fis w regulacji wiązania DnaA do *oriC* podczas stresu. Analizy ChIP-qPCR przeprowadzone na komórkach szczepu Δfis wykazały, że brak białka Fis nie powoduje przywrócenia wiązania białka DnaA do *oriC* w warunkach głodu aminokwasowego, co wskazuje, że białko to nie odpowiada za hamowanie oddziaływania DnaA z tym regionem podczas stresu. Mimo że opisane powyżej mechanizmy, tj. PDAP, acetylacja DnaA, reorganizacja nukleoidu, wydają się istotne w ograniczaniu inicjacji replikacji chromosomalnego DNA podczas stresu pozostaje wiele pytań. Nie wiadomo, czy mechanizmy te działają równolegle, czy sekwencyjnie. Czy ich aktywacja zależna jest od czynników wywołujących stres czy stanowi uniwersalną odpowiedź bakterii? Czy podobne mechanizmy występują powszechnie wśród bakterii, czy są charakterystyczne tylko dla *E. coli*?

Brak wiązania DnaA do *oriC* w warunkach głodu aminokwasowego skłonił do postawienia pytania, czy w tych warunkach białko DnaA oddziałuje z plazmidowym *origin* replikacji. W warunkach optymalnych DnaA wspiera inicjację replikacji plazmidu RK2, wiążąc się do sekwencji DnaA-box w obrębie *oriV*¹⁸¹. Przeprowadzone przeze mnie analizy ChIP-qPCR wykazały, że czasie głodu aminokwasowego wiązanie DnaA do *oriV* ulega obniżeniu, co koreluje z brakiem inicjacji replikacji plazmidu RK2. W celu określenia wpływu polyP oraz PDAP na hamowanie wiązania białka DnaA do *oriV* podczas stresu wykonałam analizy w komórkach *E. coli* Δppk niosących plazmid RK2. Uzyskane wyniki były niejednoznaczne, tj. duża zmienność pomiędzy powtórzeniami biologicznymi i wysoki poziom tła uniemożliwiały jednoznaczną interpretację. Nie mogę więc stwierdzić, czy brak polyP łagodzi efekt spadku poziomu wiązania DnaA do *oriV* podczas głodu aminokwasowego, tak jak ma to miejsce w przypadku wiązania do *oriC*. Potrzebne są dalsze badania, aby poznać mechanizmy ograniczające wiązanie białka DnaA do *oriV* w warunkach

stresu. Interesującym kierunkiem jest ocena potencjalnego wpływu acetylacji białka DnaA na jego oddziaływanie z *oriV*, który dotychczas nie został zbadany.

Wykazałam, że podczas głodu aminokwasowego poziom wiązania plazmidowego inicjatora, białka TrfA, do *origin* replikacji plazmidu RK2 ulega znacznemu obniżeniu. Dotychczas nie przedstawiono dowodów na bezpośrednie oddziaływanie cząsteczek TrfA z cząsteczkami DnaA. Wykazano natomiast, że białko TrfA oddziałuje z helikazą DnaB¹⁸¹ oraz z podjednostkami α i β polimerazy DNA III¹⁸². Co istotne, cząsteczki TrfA nie oddziałują z cząsteczkami DnaA związanymi do sekwencji DnaA-box¹⁸¹. W świetle uzyskanych przeze mnie wyników oznacza to, że obserwowany spadek poziomu wiązania TrfA do *oriV* w warunkach stresu nie jest konsekwencją braku DnaA w tym regionie, lecz wynika z niezależnych mechanizmów regulacyjnych. Zahamowanie wiązania zarówno DnaA, jak i TrfA do *oriV* korelowało z zahamowaniem inicjacji nowych rund replikacji plazmidu, co potwierdziły analizy qPCR. Zatrzymanie inicjacji replikacji było widoczne już po 30 minutach od wprowadzenia stresu. Niestety nie mogę określić, jak szybko po indukcji głodu aminokwasowego następuje zahamowanie wiązania białek inicjatorowych do *oriV*, ponieważ analizowałam ten proces tylko w jednym punkcie czasowym (120 min). W przyszłości warto byłoby zatem przeprowadzić analizy obejmujące więcej punktów czasowych, szczególnie na wczesnym etapie odpowiedzi na stres. Co istotne, zahamowanie nowych rund replikacyjnych plazmidowego DNA, obserwowałam również w komórkach eksprymujących monomeryczny wariant białka TrfA, który nie wymaga monomeryzacji i nie tworzy hamujących replikację kompleksów typu *handcuff*¹⁸³. Wynik ten wskazuje, że brak replikacji plazmidowego DNA w warunkach stresu nie wynika ani z zaburzenia stosunku monomerów do dimerów TrfA, ani z tworzenia kompleksów typu *handcuff*. Moje analizy wykazały, że podczas głodu aminokwasowego wewnątrzkomórkowy poziom białka TrfA stopniowo się obniżał, zarówno w przypadku białka typu dzikiego, jak i jego monomerycznego wariantu. W komórce stężenie białek jest wynikiem równowagi pomiędzy ich syntezą a degradacją. Podczas stresu wywołanego za pomocą SHX translacja białek zostaje zablokowana, co oznacza, że synteza *de novo* cząsteczek TrfA nie może zachodzić. Wykazałam, że w tych warunkach komórki nie dzielą się. W konsekwencji jedynym mechanizmem wyjaśniającym obserwowany spadek wewnątrzkomórkowego poziomu białka TrfA jest jego proteoliza. Tempo proteolizy białka TrfA obserwowane przeze mnie podczas głodu aminokwasowego jest porównywalne z tym opisanym po zablokowaniu translacji tetracykliną w warunkach optymalnych, kiedy cząsteczki TrfA ulegają całkowitej degradacji po około 30 minutach¹⁸⁵. Sugeruje to, że obserwowany spadek

wewnątrzkomórkowego poziomu białka TrfA podczas stresu może odzwierciedlać proteolizę białka zachodzącą podczas normalnego wzrostu. Nie można jednak wykluczyć, że w warunkach głodu aminokwasowego proteoliza TrfA jest stymulowana przez polyP czy (p)ppGpp. Interesującym kierunkiem przyszłych badań byłaby identyfikacja proteaz i kofaktorów potencjalnie zaangażowanych w degradację TrfA w warunkach stresu. Otwartą kwestią pozostaje również to, czy TrfA może bezpośrednio oddziaływać z polyP.

W warunkach optymalnych liczba cząsteczek TrfA przewyższa liczbę dostępnych miejsc ich wiązania z DNA^{161,241}, co zapewnia pełne wysycenie iteronów niezbędne do rozpoczęcia replikacji. Sugeruje to, że spadek poziomu TrfA może prowadzić do niewystarczającego zajęcia iteronów i w konsekwencji uniemożliwiać inicjację replikacji. Należy przy tym podkreślić, że w zastosowanym w tej pracy układzie eksperymentalnym ekspresja genu *trfA* była kontrolowana przez promotor laktozowy, co powodowało podwyższony poziom białka w stosunku do poziomu uzyskiwanego podczas ekspresji kontrolowanej przez natywny promotor *trfA*. Można więc przypuszczać, że w warunkach naturalnych, gdzie stężenie TrfA jest istotnie niższe, efekt proteolizy będzie jeszcze bardziej wyraźny utrzymując poziom białka znacznie poniżej progu wymaganego do inicjacji replikacji. Spadek wewnątrzkomórkowego poziomu białka TrfA obserwowany podczas głodu aminokwasowego nie wydaje się wynikać ze zmian transkrypcji jego genu. Choć wiadomo, że czynniki plazmidowe, takie jak KorA i TrfB mogą regulować ekspresję genu *trfA*^{254,255}, brak jest dowodów, aby mechanizmy te były aktywowane w warunkach stresu. Co więcej, nawet ewentualne obniżenie transkrypcji nie tłumaczyłoby zahamowania replikacji plazmidu w dzielących się komórkach, gdyż przy stałym poziomie cząsteczek TrfA inicjacja mogłaby wciąż zachodzić. Uzyskane wyniki wskazują, że degradacja białek inicjatorowych i wynikający z niej spadek ich wewnątrzkomórkowego poziomu stanowią kluczowy czynnik zapobiegający inicjacji replikacji plazmidu RK2 w warunkach stresu. Degradacji w warunkach stresu podlegają zarówno DnaA, jak i TrfA, co wykazały analizy Western blot wykonane w tej pracy oraz wcześniejsze obserwacje dotyczące DnaA³⁵. Nie można jednak całkowicie wykluczyć, że do zahamowania replikacji plazmidowego DNA w warunkach stresu przyczyniają się również inne mechanizmy regulacyjne. W przypadku plazmidu pBR322 wykazano, że zdolność komórek *E. coli* do przetrwania długotrwałego głodu jest powiązana z utrzymaniem odpowiedniego poziomu superskrętności cząsteczki plazmidu, którego zaburzenie prowadzi do spadku przeżywalności komórek²⁵⁶. Nie ustalono jednak, czy w przypadku plazmidu RK2 zmiany topologii DNA w odpowiedzi na stres mają miejsce i czy wpływają na dostępność *oriV* dla inicjatorów lub skuteczność formowania

kompleksu inicjacyjnego. W przeciwieństwie do białka DnaA, dla białka TrfA nie wykazano dotąd obecności modyfikacji potranslacyjnych, takich jak acetylacja, ani ich wpływu na powinowactwo białka do *oriV*. Nie jest również jasne, czy acetylacja białka DnaA może modulować jego interakcje z *oriV*, tak jak ma to miejsce w przypadku *oriC*¹⁹⁰. Chociaż nie można wykluczyć udziału zmian topologii DNA czy modyfikacji potranslacyjnych w regulacji inicjacji replikacji RK2 podczas stresu, uzyskane w tej pracy wyniki wskazują, że istotną rolę w zapobieganiu inicjacji replikacji plazmidu w stresie odgrywa proteoliza białek inicjatorowych. Zahamowanie aktywności obu inicjatorów, gospodarza i plazmidowego, poprzez obniżenie ich poziomu prowadzi do szybkiego zatrzymania replikacji pozachromosomalnego DNA w warunkach stresu. Mechanizm ten można interpretować jako strategię adaptacyjną, która pozwala komórce dostosować replikację plazmidowego DNA do własnego metabolizmu i tym samym ograniczać koszty energetyczne w warunkach niedoboru zasobów. W szerszej perspektywie wskazuje to, że plazmidy iteronowe nie funkcjonują w pełni autonomicznie, lecz ich replikacja została w toku ewolucji powiązana z fizjologią gospodarza, co sprzyja zarówno przeżyciu komórki, jak i stabilności plazmidu w populacji komórek bakteryjnych.

9.3. Białka inicjatorowe DnaA i TrfA w komórkach *E. coli* w trakcie wyjścia ze stresu

W trakcie głodu aminokwasowego komórki *E. coli* wykazywały zmienioną morfologię i traciły zdolność do podziałów. Towarzyszyły temu zmiany wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka DnaA, obniżenie jego poziomu, zmiana profilu oddziaływań z DNA oraz wzrost stopnia jego acetylacji. Zmiany te skutkowały zahamowaniem inicjacji replikacji chromosomalnego DNA. Usunięcie czynnika stresowego i powrót do warunków optymalnych skutkowały stopniowym odwróceniem tych zjawisk. Komórki odzyskiwały zdolność do wzrostu i wznawiały podziały komórkowe, co wiązało się z zwiększeniem ich długości oraz ponownym pojawieniem się charakterystycznych skupisk DnaA. Wznowienie replikacji chromosomalnego DNA było zauważalne po około 30 minutach od usunięcia SHX, co potwierdziły zarówno analizy qPCR, jak i pomiary cytometrii przepływowej. Co interesujące, dane z cytometrii sugerują, że kolejność zdarzeń podczas wyjścia ze stresu może nie być przypadkowa. Najpierw obserwowałam zmniejszenie liczby kopii chromosomalnego DNA w komórkach, co sugeruje podział komórkowy, a dopiero później

uruchomienie nowej syntezy DNA. Wyniki analizy cytometrii przepływowej wykazały, że pożywce LB w temperaturze 30°C komórki *E. coli* mogą posiadać nawet powyżej ośmiu kopii chromosomalnego DNA. Można więc rozważyć sytuację, w której w momencie indukcji stresu komórka zawiera osiem kopii chromosomalnego DNA. Podział na początku stresu prowadziłby do powstania dwóch komórek potomnych, z których każda posiadałaby cztery kopie genomu. Oznaczałoby to, że podczas wychodzenia ze stresu takie komórki dysponowałyby „zapasem” kopii chromosomalnego DNA, umożliwiającym przeprowadzenie co najmniej jednego kolejnego podziału bez konieczności inicjowania nowych rund replikacji DNA. Zjawisko to może mieć znaczenie fizjologiczne, jednak jego rola w regulacji cyklu komórkowego wymaga dalszych badań. Wznowienie replikacji chromosomalnego DNA korelowało z ponownym pojawieniem się wyraźnych skupisk DnaA w komórkach, które lokalizowały się w charakterystycznych pozycjach, takich samych jak obserwowane przed wprowadzeniem stresu. Pojawienie się skupisk DnaA po wyjściu ze stresu nie byłoby możliwe bez wzrostu jego poziomu w komórkach. Rzeczywiście, obserwowałam zwiększanie wewnątrzkomórkowego poziomu białka DnaA po usunięciu SHX z pożywki. Co interesujące, niewielki wzrost poziomu tego białka podczas wyjścia ze stresu zaobserwowałam również w komórkach szczepu Δppk , w którym stężenie DnaA nie ulegało obniżeniu podczas stresu. Może to oznaczać, że podczas wychodzenia ze stresu kluczowe jest nie tylko przywrócenie poziomu DnaA sprzed stresu, lecz także dodatkowe zwiększenie jego ilości, konieczne do ponownej inicjacji replikacji. Podczas wyjścia ze stresu oddziaływanie białka DnaA z *oriC* zostało przywrócone. Ze względu na fakt, że analizy ChIP-seq i ChIP-qPCR zostały wykonane w jednym punkcie czasowym podczas wyjścia ze stresu, nie jest możliwe pełne określenie dynamiki odtwarzania interakcji DnaA z DNA. Interesującym kierunkiem dalszych badań byłyby analizy obejmujące wczesne fazy tego procesu, które mogłyby uchwycić jego przebieg w czasie. Wyniki analizy ChIP-seq wykazały, że podczas wyjścia ze stresu białko DnaA odzyskuje zdolność do oddziaływania z tymi samymi fragmentami chromosomu, z którymi wiązało się w warunkach optymalnych przed indukcją stresu, a dodatkowo pojawiają się miejsca charakterystyczne dla etapu wychodzenia ze stresu. Do takich miejsc należą m. in. regiony zlokalizowane przed genami *obgE*, *ompA* i *rpsP*. Najsilniejszy sygnał wiązania DnaA zaobserwowałam w regionie *oriC*, co sugeruje, że ponownie pojawiające się podczas wyjścia ze stresu skupiska DnaA-EYFP wynikają z oligomeryzacji cząsteczek DnaA w tym regionie chromosomu. W kontekście uzyskanych wyników spadek poziomu acetylacji DnaA wydaje się odgrywać kluczową rolę w przywróceniu jego oddziaływania z *oriC* podczas

wyjścia ze stresu. Nie można również wykluczyć, że w przywróceniu zdolności DnaA do wiązania *oriC* rolę odgrywają także inne mechanizmy, takie jak zmiany topologii DNA czy reorganizacja nukleoidu. Choć kwestia ta pozostaje otwarta, stanowi interesujący kierunek przyszłych badań, pozwalający lepiej zrozumieć dynamikę odzyskiwania funkcji replikacyjnych. O ile białko Fis nie odpowiada za zapobieganie wiązaniu DnaA do *oriC* w trakcie głodu aminokwasowego, to analizy ChIP-qPCR wykazały, że podczas wyjścia ze stresu poziom wiązania DnaA do *oriC* w komórkach szczepu Δfis był znacznie wyższy niż w komórkach szczepu typu dzikiego. Wynik ten sugeruje, że białko Fis może pełnić rolę w zapobieganiu nadmiernej inicjacji replikacji w warunkach, gdy stężenie DnaA w komórce jest wysokie. Podczas wyjścia ze stresu przywracane było nie tylko wiązanie DnaA do chromosomalnego DNA, ale także oddziaływanie DnaA i TrfA z *oriV*, co prowadziło do wznowienia replikacji plazmidowego DNA. Synchronizacja replikacji plazmidu razem z chromosomalnym DNA i przywróceniem podziałów komórkowych może nieść podwójną korzyść. Z jednej strony w okresie ograniczonych zasobów komórki unikają kosztownego kopiowania plazmidowego DNA, z drugiej, po ustąpieniu stresu odzyskują stabilne dziedziczenie elementów pozachromosomalnych.

Uzyskane wyniki wskazujące na wielopoziomową regulację inicjacji replikacji chromosomalnego i plazmidowego DNA w warunkach stresu mają potencjalne znaczenie aplikacyjne. Zrozumienie mechanizmów prowadzących do zahamowania wiązania białek inicjatorowych DnaA i TrfA do *origin* replikacji może w przyszłości stanowić podstawę do projektowania nowych strategii antybiotykowych, ukierunkowanych na modulowanie replikacji DNA. Co więcej, stymulowanie naturalnych mechanizmów blokujących inicjację replikacji DNA mogłoby wspierać działanie antybiotykoterapii i ograniczać rozwój oporności na antybiotyki warunkowanej przez plazmidy. Z drugiej strony, celowe zniesienie tej kontroli, poprzez blokowanie mechanizmów hamujących replikację, mogłoby prowadzić do niekontrolowanego uruchomienia replikacji DNA podczas stresu, a tym samym do nadmiernego obciążenia energetycznego komórki i w konsekwencji jej śmierci. Oba podejścia ilustrują, jak wiedza o naturalnej regulacji replikacji DNA bakterii może w przyszłości stanowić podstawę opracowania innowacyjnych terapii przeciwdrobnoustrojowych.

10.LITERATURA

1. Grimwade, J. E. & Leonard, A. C. Blocking, Bending, and Binding: Regulation of Initiation of Chromosome Replication During the Escherichia coli Cell Cycle by Transcriptional Modulators That Interact With Origin DNA. *Front Microbiol* 12, 732270 (2021).
2. Naghavi, M. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet* 404, 1199–1226 (2024).
3. Ruiz, N. & Silhavy, T. J. How Escherichia coli Became the Flagship Bacterium of Molecular Biology. *J Bacteriol* 204, e00230-22 (2022).
4. Proença, J. T., Barral, D. C. & Gordo, I. Commensal-to-pathogen transition: One-single transposon insertion results in two pathoadaptive traits in Escherichia coli -macrophage interaction. *Scientific Reports* 2017 7:1 7, 1–12 (2017).
5. Alteri, C. J. & Mobley, H. L. T. Escherichia coli Physiology and Metabolism Dictates Adaptation to Diverse Host Microenvironments. *Curr Opin Microbiol* 15, 3 (2011).
6. Brune, A., Frenzel, P. & Cypionka, H. Life at the oxic–anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol Rev* 24, 691–710 (2000).
7. Uden, G. & Bongaerts, J. Alternative respiratory pathways of Escherichia coli: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1320, 217–234 (1997).
8. Irving, S. E., Choudhury, N. R. & Corrigan, R. M. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 19, 256–271 (2021).
9. Weaver, J. W. *et al.* Control of transcription elongation and DNA repair by alarmone ppGpp. *Nature Structural & Molecular Biology* 2023 30:5 30, 600–607 (2023).
10. Ross, W. *et al.* PpGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response. *Mol Cell* 62, 811–823 (2016).
11. Sanchez-Vazquez, P., Dewey, C. N., Kitten, N., Ross, W. & Gourse, R. L. Genome-wide effects on Escherichia coli transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 8310–8319 (2019).
12. Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R. & Ding, J. J. Transcription profiling of the stringent response in Escherichia coli. *J Bacteriol* 190, 1084–1096 (2008).
13. Qi, W., Jonker, M. J., de Leeuw, W., Brul, S. & ter Kuile, B. H. Role of RelA-synthesized (p)ppGpp and ROS-induced mutagenesis in de novo acquisition of antibiotic resistance in E. coli. *iScience* 27, (2024).
14. Ezequiel, W., Jehoshua, K., Gad, G. & Roe, V. ppGpp analogues as antibacterial compounds. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 633–634 (2008) doi:10.1093/NASS/NRN320,.
15. Atkinson, G. C., Tenson, T. & Hauryliuk, V. The RelA/SpoT Homolog (RSH) superfamily: Distribution and functional evolution of ppgpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One* 6, (2011).
16. Li, W. *et al.* Effects of amino acid starvation on RelA diffusive behavior in live Escherichia coli. *Mol Microbiol* 99, 571 (2015).
17. Brown, A., Fernández, I. S., Gordiyenko, Y. & Ramakrishnan, V. Ribosome-dependent activation of stringent control. *Nature* 534, 277–280 (2016).
18. Bougdour, A. & Gottesman, S. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12896–12901 (2007).
19. Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M. & D’Ari, R. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 56, 958–970 (2005).
20. Rao, N. N., Gómez-García, M. R. & Kornberg, A. Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem* 78, 605–647 (2009).
21. Kim, K.-S., Rao, N. N., Fraley, C. D. & Kornberg, A. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 7675–7680 (2002).
22. Kumble, K. D. & Kornberg, A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5818–5822 (1995).
23. Ahn, K. & Kornberg, A. Polyphosphate kinase from Escherichia coli. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 265, 11734–11739 (1990).
24. Zhu, Y., Lee, S. S. K. & Xu, W. Crystallization and characterization of polyphosphate kinase from Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 997–1001 (2003).
25. Akiyama, M., Crooke, E. & Kornberg, A. An exopolyphosphatase of Escherichia coli. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *Journal of Biological Chemistry* 268, 633–639 (1993).
26. Bolesch, D. G. & Keasling, J. D. Polyphosphate Binding and Chain Length Recognition of Escherichia coli Exopolyphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33814–33819 (2000).

27. Gray, M. J. Inorganic Polyphosphate Accumulation in *Escherichia coli* Is Regulated by DksA but Not by (p)ppGpp. *J Bacteriol* 201, e00664-18 (2019).
28. Rudat, A. K., Pokhrel, A., Green, T. J. & Gray, M. J. Mutations in *Escherichia coli* Polyphosphate Kinase That Lead to Dramatically Increased In Vivo Polyphosphate Levels. *J Bacteriol* 200, e00697-17 (2018).
29. Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. & Kornberg, A. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272, 21240–21243 (1997).
30. Azaldegui, C. A., Vecchiarelli, A. G. & Biteen, J. S. The emergence of phase separation as an organizing principle in bacteria. *Biophys J* 120, 1123–1138 (2021).
31. Chawla, R., Klupt, S., Patsalo, V., Williamson, J. R. & Racki, L. R. The Histone H1-Like Protein AlgP Facilitates Even Spacing of Polyphosphate Granules in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 13, (2022).
32. Frank, C. & Jendrossek, D. Acidocalcisomes and Polyphosphate Granules Are Different Subcellular Structures in *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Environ Microbiol* 86, e02759-19 (2020).
33. Wang, X. *et al.* An Inorganic Biopolymer Polyphosphate Controls Positively Charged Protein Phase Transitions. *Angew Chem Int Ed Engl* 59, 2679–2683 (2020).
34. Nomura, K., Kato, J., Takiguchi, N., Ohtake, H. & Kuroda, A. Inorganic polyphosphate stimulates lon-mediated proteolysis of nucleoid proteins in *Escherichia coli*. in *Cellular and Molecular Biology* vol. 52 23–29 (2006).
35. Gross, M. H. & Konieczny, I. Polyphosphate induces the proteolysis of ADP-bound fraction of initiator to inhibit DNA replication initiation upon stress in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 48, 5457–5466 (2021).
36. Bowlin, M. Q. & Gray, M. J. Inorganic polyphosphate in host and microbe biology. *Trends Microbiol* 29, 1013–1023 (2021).
37. Nomura, K., Kato, J., Takiguchi, N., Ohtake, H. & Kuroda, A. Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 34406–34410 (2004).
38. Guan, J. & Jakob, U. The Protein Scaffolding Functions of Polyphosphate. *J Mol Biol* 436, 168504 (2024).
39. Tosa, T. & Pizer, L. I. Effect of serine hydroxamate on the growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 106, 966–971 (1971).
40. Tosa, T. & Pizer, L. I. Biochemical bases for the antimetabolite action of L-serine hydroxamate. *J Bacteriol* 106, 972–982 (1971).
41. Gray, M. J. *et al.* Polyphosphate Is a Primordial Chaperone. *Mol Cell* 53, 689–699 (2014).
42. Seufferheld, M. J., Alvarez, H. M. & Farias, M. E. Role of Polyphosphates in Microbial Adaptation to Extreme Environments. *Appl Environ Microbiol* 74, 5867 (2008).
43. Heinrich, K., Leslie, D. J. & Jonas, K. Modulation of bacterial proliferation as a survival strategy. *Adv Appl Microbiol* 92, 127–171 (2015).
44. Jacob, F., Brenner, S. & Cuzin, F. On the Regulation of DNA Replication in Bacteria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 28, 329–348 (1963).
45. Messer, W. *et al.* Origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: nucleotide sequence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 1, 139–145 (1979).
46. Fuller, R. S., Kaguni, J. M. & Kornberg, A. Enzymatic replication of the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7370–7374 (1981).
47. Wegrzyn, K. & Konieczny, I. Toward an understanding of the DNA replication initiation in bacteria. *Front Microbiol* 14, (2023).
48. Fuller, R. S., Funnell, B. E. & Kornberg, A. The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell* 38, 889–900 (1984).
49. Rozgaja, T. A. *et al.* Two oppositely oriented arrays of low-affinity recognition sites in *oriC* guide progressive binding of DnaA during *Escherichia coli* pre-RC assembly. *Mol Microbiol* 82, 475–488 (2011).
50. Schaper, S. & Messer, W. Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17622–17626 (1995).
51. Miller, D. T. *et al.* Bacterial origin recognition complexes direct assembly of higher-order DnaA oligomeric structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18479–18484 (2009).
52. Bramhill, D. & Kornberg, A. Duplex opening by *dnaA* protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* 52, 743–755 (1988).
53. Swinger, K. K. & Rice, P. A. IHF and HU: Flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* 14, 28–35 (2004).
54. Rice, P. A. Making DNA do a U-turn: IHF and related proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7, 86–93 (1997).

55. Finkel, S. E. & Johnson, R. C. The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol Microbiol* 6, 3257–3265 (1992).
56. Sutton, M. D. & Kaguni, J. M. The Escherichia coli dnaA gene: Four functional domains. *J Mol Biol* 274, 546–561 (1997).
57. Saxena, R., Fingland, N., Patil, D., Sharma, A. K. & Crooke, E. Crosstalk between DnaA protein, the initiator of Escherichia coli chromosomal replication, and acidic phospholipids present in bacterial membranes. *Int J Mol Sci* 14, 8517–8537 (2013).
58. Simmons, L. A., Felczak, M. & Kaguni, J. M. DnaA Protein of Escherichia coli: Oligomerization at the E. coli chromosomal origin is required for initiation and involves specific N-terminal amino acids. *Mol Microbiol* 49, 849–858 (2003).
59. Saxena, R. *et al.* A nucleotide-dependent oligomerization of the Escherichia coli replication initiator DnaA requires residue His136 for remodeling of the chromosomal origin. *Nucleic Acids Res* 48, 200–211 (2020).
60. Sutton, M. D., Carr, K. M., Vicente, M. & Kaguni, J. M. Escherichia coli DnaA protein. The N-terminal domain and loading of DnaB helicase at the E. coli chromosomal origin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 34255–34262 (1998).
61. Marszalek, J. & Kaguni, J. M. DnaA Protein Directs the Binding of DnaB Protein in Initiation of DNA Replication in Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 4883–4890 (1994).
62. Keyamura, K. *et al.* The interaction of DiaA and DnaA regulates the replication cycle in E. coli by directly promoting ATP-DnaA-specific initiation complexes. *Genes Dev* 21, 2083–2099 (2007).
63. Mizushima, T. *et al.* Site-directed mutational analysis for the ATP binding of DnaA protein: Functions of two conserved amino acids (Lys-178 and Asp-235) located in the ATP-binding domain of DnaA protein in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 273, 20847–20851 (1998).
64. Garner, J., Durrer, P., Kitchen, J., Brunner, J. & Crooke, E. Membrane-mediated release of nucleotide from an initiator of chromosomal replication, Escherichia coli DnaA, occurs with insertion of a distinct region of the protein into the lipid bilayer. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5167–5173 (1998).
65. Garner, J. & Crooke, E. Membrane regulation of the chromosomal replication activity of E. coli DnaA requires a discrete site on the protein. *EMBO J* 15, 3477 (1996).
66. Nishida, S. *et al.* A nucleotide switch in the Escherichia coli DnaA protein initiates chromosomal replication. Evidence from a mutant DnaA protein defective in regulatory ATP hydrolysis in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14986–14995 (2002).
67. Fujikawa, N. *et al.* Structural basis of replication origin recognition by the DnaA protein. *Nucleic Acids Res* 31, 2077–2086 (2003).
68. Nozaki, S., Niki, H. & Ogawa, T. Replication initiator DnaA of Escherichia coli changes its assembly form on the replication origin during the cell cycle. *J Bacteriol* 191, 4807–4814 (2009).
69. Hou, Y. *et al.* The linker domain of the initiator DnaA contributes to its ATP binding and membrane association in E. coli chromosomal replication. *Sci Adv* 8, 6657 (2022).
70. Newman, G. & Crooke, E. DnaA, the Initiator of Escherichia coli Chromosomal Replication, Is Located at the Cell Membrane. *J Bacteriol* 182, 2604 (2000).
71. Regev, T., Myers, N., Zarivach, R. & Fishov, I. Association of the Chromosome Replication Initiator DnaA with the Escherichia coli Inner Membrane In Vivo: Quantity and Mode of Binding. *PLoS One* 7, e36441 (2012).
72. Christensen, B. B., Atlung, T. & Hansen, F. G. DnaA Boxes Are Important Elements in Setting the Initiation Mass of Escherichia coli. *J Bacteriol* 181, 2683 (1999).
73. Messer, W. & Weigel, C. DnaA initiator--also a transcription factor. *Mol Microbiol* 24, 1–6 (1997).
74. Quiñones, A., Wandt, G., Kleinstäuber, S. & Messer, W. DnaA protein stimulates polA gene expression in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 23, 1193–1202 (1997).
75. Augustin, L. B., Jacobson, B. A. & Fuchs, J. A. Escherichia coli Fis and DnaA proteins bind specifically to the nrd promoter region and affect expression of an nrd-lac fusion. *J Bacteriol* 176, 378–387 (1994).
76. Mizushima, T., Tomura, A., Shinpuku, T., Miki, T. & Sekimizu, K. Loss of flagellation in dnaA mutants of Escherichia coli. *J Bacteriol* 176, 5544–5546 (1994).
77. Sass, T. H., Ferrazzoli, A. E. & Lovett, S. T. DnaA and SspA Regulation of the iraD gene of E. coli: an alternative DNA damage response independent of LexA/RecA. doi:10.1101/2021.05.20.444958.
78. Wurihan *et al.* DnaA and LexA proteins regulate transcription of the uvrB gene in Escherichia coli: The role of DnaA in the control of the SOS regulon. *Front Microbiol* 9, 1212 (2018).
79. van Den Berg, E. A. *et al.* Analysis of regulatory sequences upstream of the E. coli uvrB gene; involvement of the DnaA protein. *Nucleic Acids Res* 13, 1829–1840 (1985).
80. Ozaki, T., Kumaki, Y., Kitagawa, R. & Ogawa, T. Anomalous DnaA Protein Binding to the Regulatory Region of the Escherichia Coli AldA Gene. *Microbiology* vol. 147 (2001).

81. Tesfa-Selase, F. & Drabble, W. T. Regulation of the *gua* operon of *Escherichia coli* by the DnaA protein. *MGG Molecular & General Genetics* 231, 256–264 (1992).
82. Wang, Q. & Kagunis, J. M. DnaA Protein Regulates Transcription of the *rpoH* Gene of *Escherichia coli**. *J Biol Chem* 264, 7338–7344 (1989).
83. Schaefer, C. & Messer, W. Termination of the *Escherichia coli* *asnC* transcript. The DnaA protein/dnaA box complex blocks transcribing RNA polymerase. *Gene* (1988).
84. Gielow, A., Kücherer, C., Kölling, R. & Messer, W. Transcription in the region of the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*: Termination of *asnC* transcripts. *Molecular and General Genetics* 214, 474–481 (1988).
85. Tesfa-Selase, F. & Drabble, W. T. Specific binding of DnaA protein to a DnaA box in the *guaB* gene of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 241, 411–416 (1996).
86. Atlung, T., Clausen, E. S. & Hansen, F. G. Autoregulation of the *dnaA* gene of *Escherichia coli* K12. *MGG Molecular & General Genetics* 200, 442–450 (1985).
87. Masters, M. *et al.* The effect of DnaA protein levels and the rate of initiation at *oriC* on transcription originating in the *ftsQ* and *ftsA* genes: In vivo experiments. *MGG Molecular & General Genetics* 216, 475–483 (1989).
88. Kücherer, C., Luther, H., Schauzu, M.-A. & Messer, W. *Regulation of Transcription of the Chromosomal DnaA Gene of Escherichia Coli*. vol. 205 (1986).
89. Menikpurage, I. P., Woo, K. & Mera, P. E. Transcriptional Activity of the Bacterial Replication Initiator DnaA. *Front Microbiol* 12, (2021).
90. Ishikawa, S. *et al.* Distribution of stable DnaA-binding sites on the *Bacillus subtilis* genome detected using a modified ChIP-chip method. *DNA Research* 14, 155–168 (2007).
91. Smith, J. L. & Grossman, A. D. In Vitro Whole Genome DNA Binding Analysis of the Bacterial Replication Initiator and Transcription Factor DnaA. *PLoS Genet* 11, (2015).
92. Seid, C. A., Smith, J. L. & Grossman, A. D. Genetic and biochemical interactions between the bacterial replication initiator DnaA and the nucleoid-associated protein Rok in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 103, 798–817 (2017).
93. Stringer, A. M., Fitzgerald, D. M. & Wade, J. T. Mapping the *Escherichia coli* DnaA-binding landscape reveals a preference for binding pairs of closely spaced DNA sites. *Microbiology (United Kingdom)* 170, 001474 (2024).
94. Sekimizu, K., Yat-ming Yung, B. & Kornberg, A. The *dnaA* protein of *Escherichia coli*. Abundance, improved purification, and membrane binding. *Journal of Biological Chemistry* 263, 7136–7140 (1988).
95. Hansen, F. G. *et al.* Initiator (DnaA) protein concentration as a function of growth rate in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 173, 5194 (1991).
96. Weigel, C., Schmidt, A., Rückert, B., Lurz, R. & Messer, W. DnaA protein binding to individual DnaA boxes in the *Escherichia coli* replication origin, *oriC*. *EMBO J* 16, 6574–6583 (1997).
97. Crooke, E., Thresher, R., Hwang, D. S., Griffith, J. & Kornberg, A. Replicatively active complexes of DnaA protein and the *Escherichia coli* chromosomal origin observed in the electron microscope. *J Mol Biol* 233, 16–24 (1993).
98. Samitt, C. E., Hansen, F. G., Miller, J. F. & Schaechter, M. In vivo studies of DnaA binding to the origin of replication of *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 8, 989–993 (1989).
99. Gille, H., Egan, J. B., Roth, A. & Messer, W. The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 19, 4167–4172 (1991).
100. Filutowicz, M., Ross, W., Wild, J. & Gourse, R. L. Involvement of *fis* protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* 174, 398–407 (1992).
101. Wold, S., Crooke, E. & Skarstad, K. The *Escherichia coli* Fis protein prevents initiation of DNA replication from *oriC* in vitro. *Nucleic Acids Res* 24, 3527–3532 (1996).
102. Ryan, V. T., Grimwade, J. E., Camara, J. E., Crooke, E. & Leonard, A. C. *Escherichia coli* prereplication complex assembly is regulated by dynamic interplay among Fis, IHF and DnaA. *Mol Microbiol* 51, 1347–1359 (2004).
103. Polaczek P. Bending of the origin of replication of *E. coli* by binding of IHF at a specific site. *New Biol* (1990).
104. Rice, P., Yang, S. & Mizuuchi, K. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 1295–306 (1996).
105. Shimizu, M. *et al.* Near-atomic structural model for bacterial DNA replication initiation complex and its functional insights. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E8021–E8030 (2016).
106. Ozaki, S. *et al.* A common mechanism for the ATP-DnaA-dependent formation of open complexes at the replication origin. *Journal of Biological Chemistry* 283, 8351–8362 (2008).

107. Hwang, D. S. & Kornbergs, A. Opening of the Replication Origin of Escherichia coli by DnaA Protein with Protein HU or IHF*. *Journal of Biological Chemistry* 267, 23083–23086 (1992).
108. Grimwade, J. E., Ryan, V. T. & Leonard, A. C. IHF redistributes bound initiator protein, DnaA, on supercoiled oriC of Escherichia coli. *Mol Microbiol* 35, 835–844 (2000).
109. Ozaki, S. & Katayama, T. Highly organized DnaA-oriC complexes recruit the single-stranded DNA for replication initiation. *Nucleic Acids Res* 40, 1648–1665 (2012).
110. Fang, L., Davey, M. J. & O'Donnell, M. Replisome assembly at oriC, the replication origin of E. coli, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol Cell* 4, 541–553 (1999).
111. Johnson, A. & O'Donnell, M. Cellular DNA replicases: Components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* 74, 283–315 (2005).
112. Dennis, P. P. & Bremer, H. Macromolecular composition during steady state growth of Escherichia coli B/r. *J Bacteriol* 119, 270–281 (1974).
113. Donachie, W. D. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication [36]. *Nature* 219, 1077–1079 (1968).
114. Si, F. *et al.* Mechanistic Origin of Cell-Size Control and Homeostasis in Bacteria. *Current Biology* 29, 1760–1770.e7 (2019).
115. Govers, S. K., Campos, M., Tyagi, B., Laloux, G. & Jacobs-Wagner, C. Apparent simplicity and emergent robustness in the control of the Escherichia coli cell cycle. *Cell Syst* 15, 19–36.e5 (2024).
116. Zheng, H. *et al.* General quantitative relations linking cell growth and the cell cycle in Escherichia coli. *Nat Microbiol* 5, 995–1001 (2020).
117. Wolpert, L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 25, 1–47 (1969).
118. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389–396 (1983).
119. Jun, S., Si, F., Pugatch, R. & Scott, M. Fundamental principles in bacterial physiology—history, recent progress, and the future with focus on cell size control: a review. *Reports on Progress in Physics* 81, 056601 (2018).
120. Reed, T. T., Kendal, A. H., Wozniak, K. J., Simmons, L. A. & Henkin, T. M. DNA replication initiation timing is important for maintaining genome integrity. *J Bacteriol* (2025) doi:10.1128/JB.00175-25.
121. Sekimizu, K., Bramhill, D. & Kornberg, A. ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the E. coli chromosome. *Cell* 50, 259–265 (1987).
122. McGarry, K. C., Ryan, V. T., Grimwade, J. E. & Leonard, A. C. Two discriminatory binding sites in the Escherichia coli replication origin are required for DNA strand opening by initiator DnaA-ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2811–2816 (2004).
123. Ozaki, S., Noguchi, Y., Nishimura, M. & Katayama, T. Stable nucleotide binding to DnaA requires a specific glutamic acid residue within the AAA+ box II motif. *J Struct Biol* 179, 242–250 (2012).
124. Ishida, T. *et al.* DiaA, a novel DnaA-binding protein, ensures the timely initiation of Escherichia coli chromosome replication. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45546–45555 (2004).
125. Katayama, T., Kasho, K. & Kawakami, H. The DnaA cycle in Escherichia coli: Activation, function and inactivation of the initiator protein. *Frontiers in Microbiology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02496> (2017).
126. Skarstad, K. & Katayama, T. Regulating DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, 1–17 (2013).
127. Riber, L., Frimodt-Møller, J., Charbon, G. & Løbner-Olesen, A. Multiple DNA binding proteins contribute to timing of chromosome replication in E. coli. *Front Mol Biosci* 3, (2016).
128. Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E. & Sekimizu, K. The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the E. coli Chromosomal replicase. *Cell* 94, 61–71 (1998).
129. Kato, J. I. & Katayama, T. Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in Escherichia coli. *EMBO Journal* 20, 4253–4262 (2001).
130. Su'etsugu, M., Nakamura, K., Keyamura, K., Kudo, Y. & Katayama, T. Hda monomerization by ADP binding promotes replicase clamp-mediated DnaA-ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 283, 36118–36131 (2008).
131. Kim, J. S. *et al.* Dynamic assembly of Hda and the sliding clamp in the regulation of replication licensing. *Nucleic Acids Res* 45, 3888–3905 (2017).
132. Kasho, K. & Katayama, T. DnaA binding locus datA promotes DnaA-ATP hydrolysis to enable cell cycle-coordinated replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 936–941 (2013).
133. Bochner, B. & Ames, B. Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 257, 9759–9769 (1982).

134. Fingland, N. *et al.* Depletion of acidic phospholipids influences chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* 1, 450–466 (2012).
135. Fujimitsu, K., Senriuchi, T. & Katayama, T. Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes Dev* 23, 1221–1233 (2009).
136. Kasho, K., Fujimitsu, K., Matoba, T., Oshima, T. & Katayama, T. Timely binding of IHF and Fis to DARS2 regulates ATP-DnaA production and replication initiation. *Nucleic Acids Res* 42, 13134–13149 (2014).
137. Boesen, T. O. *et al.* Dispensability of extrinsic DnaA regulators in *Escherichia coli* cell-cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121, e2322772121 (2024).
138. Iuliani, I., Mbemba, G., Lagomarsino, M. C. & Sclavi, B. Direct single-cell observation of a key *Escherichia coli* cell-cycle oscillator. *Sci Adv* 10, (2024).
139. Hansen, F. G., Christensen, B. B. & Atlung, T. The initiator titration model: computer simulation of chromosome and minichromosome control. *Res Microbiol* 142, 161–167 (1991).
140. Olivi, L. *et al.* The *Escherichia coli* replication initiator DnaA is titrated on the chromosome. *Nature Communications* 2025 16:1 16, 1–18 (2025).
141. Ogawa, T., Yamada, Y., Kuroda, T., Kishi, T. & Moriya, S. The *datA* locus predominantly contributes to the initiator titration mechanism in the control of replication initiation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 44, 1367–1375 (2002).
142. Fu, H., Xiao, F. & Jun, S. Bacterial Replication Initiation as Precision Control by Protein Counting. *PRX Life* 1, 013011 (2023).
143. Sakakibara, Y. & Yuasa, S. Continuous synthesis of the *dnaA* gene product of *Escherichia coli* in the cell cycle. *MGG Molecular & General Genetics* 186, 87–94 (1982).
144. Campbell, J. L. & Kleckner, N. *E. coli* *oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell* 62, 967–979 (1990).
145. Brendler, T. & Austin, S. Binding of SeqA protein to DNA requires interaction between two or more complexes bound to separate hemimethylated GATC sequences. *EMBO J* 18, 2304–2310 (1999).
146. Geier, G. E. & Modrich, P. Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J Biol Chem* 254, 1408–1413 (1979).
147. Lu, M., Campbell, J. L., Boye, E. & Kleckner, N. SeqA: A negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* 77, 413–426 (1994).
148. Shao, Y., Feldman-Cohen, L. S. & Osuna, R. Functional characterization of the *Escherichia coli* Fis-DNA binding sequence. *J Mol Biol* 376, 771 (2007).
149. Hengen, P. N., Bartram, S. L., Stewart, L. E. & Schneider, T. D. Information Analysis of Fis Binding Sites. *Nucleic Acids Res* 25, 4994–5002 (1997).
150. Wolanski, M., Donczew, R., Zawilak-Pawlik, A. & Zakrzewska-Czerwinska, J. *oriC*-encoded instructions for the initiation of bacterial chromosome replication. *Front Microbiol* 6, 124887 (2015).
151. Miyoshi, K., Tatsumoto, Y., Ozaki, S. & Katayama, T. Negative feedback for DARS2–Fis complex by ATP–DnaA supports the cell cycle-coordinated regulation for chromosome replication. *Nucleic Acids Res* 49, 12820–12835 (2021).
152. Solar, G. del, Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M. & Díaz-Orejas, R. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 434 (1998).
153. Doran, K. S., Konieczny, I. & Helinski, D. R. Replication Origin of the Broad Host Range Plasmid RK2. *J Biol Chem* 273, 8447–8453 (1998).
154. Kolatka, K., Kubik, S., Rajewska, M. & Konieczny, I. Replication and partitioning of the broad-host-range plasmid RK2. *Plasmid* 64, 119–134 (2010).
155. Villarroel, R. *et al.* Heteroduplex analysis of P-plasmid evolution: the role of insertion and deletion of transposable elements. *SpringerR Villarroel, RW Hedges, R Maenhaut, J Leemans, G Engler, M Van Montagu, J SchellMolecular and General Genetics MGG, 1983•Springer* 189, 390–399 (1983).
156. Thomas, C. M., Cross, M. A., Hussain, A. A. & Smith, C. A. Analysis of copy number control elements in the region of the vegetative replication origin of the broad host range plasmid RK2. *EMBO J* 3, 57–63 (1984).
157. Kolatka, K., Witosinska, M., Pierechod, M. & Konieczny, I. Bacterial partitioning proteins affect the subcellular location of broad-host-range plasmid RK2. *Microbiology (N Y)* 154, 2847–2856 (2008).
158. Perri, S., Helinski, D. R. & Toukdarian, A. Interactions of plasmid-encoded replication initiation proteins with the origin of DNA replication in the broad host range plasmid RK2. *Journal of Biological Chemistry* 266, 12536–12543 (1991).
159. Thomas, C. M., Meyer, R. & Helinski, D. R. Regions of broad-host-range plasmid RK2 which are essential for replication and maintenance. *J Bacteriol* 141, 213–222 (1980).
160. Perri, S. & Helinski, D. R. DNA sequence requirements for interaction of the RK2 replication initiation protein with plasmid origin repeats. *Journal of Biological Chemistry* 268, 3662–3669 (1993).

161. Maurya, A. P. *et al.* Iteron control of oriV function in IncP-1 plasmid RK2. *Plasmid* 126, 102681 (2023).
162. Doran, K., Helinski, D. & Konieczny, I. A Critical DnaA Box Directs the Cooperative Binding of the Escherichia coli DnaA Protein to the Plasmid RK2 Replication Origin. *Journal of Biological Chemistry* 274, 17918–17923 (1999).
163. Shah, D. S., Cross, M. A., Porter, D. & Thomas, C. M. Dissection of the Core and Auxiliary Sequences in the Vegetative Replication Origin of Promiscuous Plasmid RK2. *J Mol Biol* 254, 608–622 (1995).
164. Konieczny, I., Doran, K. S., Helinski, D. R. & Blasina, A. Role of TrfA and DnaA proteins in origin opening during initiation of DNA replication of the broad host range plasmid RK2. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20173–20178 (1997).
165. Rajewska, M., Wegrzyn, K. & Konieczny, I. AT-rich region and repeated sequences—the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev* (2012).
166. Wegrzyn, K. *et al.* Sequence-specific interactions of Rep proteins with ssDNA in the AT-rich region of the plasmid replication origin. *Nucleic Acids Res* 42, 7807–7818 (2014).
167. Kowalczyk, L., Rajewska, M. & Konieczny, I. Positioning and the specific sequence of each 13-mer motif are critical for activity of the plasmid RK2 replication origin. *Mol Microbiol* 57, 1439–1449 (2005).
168. Rajewska, M., Kowalczyk, L., Konopa, G. & Konieczny, I. Specific mutations within the AT-rich region of a plasmid replication origin affect either origin opening or helicase loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11134–11139 (2008).
169. Jiang, Y., Pacek, M., Helinski, D. R., Konieczny, I. & Toukdarian, A. A multifunctional plasmid-encoded replication initiation protein both recruits and positions an active helicase at the replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8692–8697 (2003).
170. Fang, F. C. & Helinski, D. R. Broad-host-range properties of plasmid RK2: Importance of overlapping genes encoding the plasmid replication initiation protein TrfA. *J Bacteriol* 173, 5861–5868 (1991).
171. Yano, H., Deckert, G. E., Rogers, L. M. & Top, E. M. Roles of long and short replication initiation proteins in the fate of IncP-1 Plasmids. *J Bacteriol* 194, 1533–1543 (2012).
172. Shingler, V. & Thomas, C. M. Analysis of the trfA region of broad host-range plasmid RK2 by transposon mutagenesis and identification of polypeptide products. *J Mol Biol* 175, 229–249 (1984).
173. Caspi, R. *et al.* A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *EMBO J* 20, 3262 (2001).
174. Zhong, Z., Helinski, D. & Toukdarian, A. A Specific Region in the N Terminus of a Replication Initiation Protein of Plasmid RK2 Is Required for Recruitment of Pseudomonas aeruginosa DnaB Helicase to the Plasmid Origin. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45305–45310 (2003).
175. Pierechod, M. *et al.* Conformation of a plasmid replication initiator protein affects its proteolysis by ClpXP system. *Protein Sci* 18, 637 (2009).
176. Wegrzyn, K. *et al.* Defining a novel domain that provides an essential contribution to site-specific interaction of Rep protein with DNA. *Nucleic Acids Res* 49, 3394 (2021).
177. Le Chatelier, E., Jannière, L., Ehrlich, S. D. & Canceill, D. The RepE Initiator is a Double-stranded and Single-stranded DNA-binding Protein that Forms an Atypical Open Complex at the Onset of Replication of Plasmid pAM β 1 from Gram-positive Bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 276, 10234–10246 (2001).
178. Konieczny, I. & Helinski, D. R. The replication initiation protein of the broad-host-range plasmid RK2 is activated by the ClpX chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14378–14382 (1997).
179. Wegrzyn, K. *et al.* Rep protein accommodates together dsDNA and ssDNA which enables a loop-back mechanism to plasmid DNA replication initiation. *Nucleic Acids Res* 51, 10551–10567 (2023).
180. Konieczny, I. Strategies for helicase recruitment and loading in bacteria. *EMBO Rep* 4, 37–41 (2003).
181. Pacek, M., Konopa, G. & Konieczny, I. DnaA Box Sequences as the Site for Helicase Delivery during Plasmid RK2 Replication Initiation in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* 276, 23639–23644 (2001).
182. Wawrzycka, A., Gross, M., Wasaznik, A. & Konieczny, I. Plasmid replication initiator interactions with origin 13-mers and polymerase subunits contribute to strand-specific replisome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E4188–E4196 (2015).
183. Bury, K., Wegrzyn, K. & Konieczny, I. Handcuffing reversal is facilitated by proteases and replication initiator monomers. *Nucleic Acids Res* 45, 3953–3966 (2017).
184. Konieczny, I. & Liberek, K. Cooperative action of Escherichia coli ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18483–18488 (2002).
185. Kubik, S., Wegrzyn, K., Pierechod, M. & Konieczny, I. Opposing effects of DNA on proteolysis of a replication initiator. *Nucleic Acids Res* 40, 1148–1159 (2012).

186. Jonas, K., Liu, J., Chien, P. & Laub, M. T. Proteotoxic Stress Induces a Cell-Cycle Arrest by Stimulating Lon to Degrade the Replication Initiator DnaA. *Cell* 154, 623–636 (2013).
187. Hołówka, J. & Zakrzewska-Czerwińska, J. Nucleoid Associated Proteins: The Small Organizers That Help to Cope With Stress. *Front Microbiol* 11, 590 (2020).
188. Shechter, N. *et al.* Stress-induced condensation of bacterial genomes results in re-pairing of sister chromosomes: Implications for double strand dna break repair. *Journal of Biological Chemistry* 288, 25659–25667 (2013).
189. Zhang, Q. *et al.* Reversible lysine acetylation is involved in DNA replication initiation by regulating activities of initiator DnaA in Escherichia coli. *Sci Rep* 6, (2016).
190. Li, S., Zhang, Q., Xu, Z. & Yao, Y.-F. Acetylation of Lysine 243 Inhibits the oriC Binding Ability of DnaA in Escherichia coli. *Front Microbiol* 8, (2017).
191. Węgrzyn, G. Replication of plasmids during bacterial response to amino acid starvation. *Plasmid* 41, 1–16 (1999).
192. Wrobel, B. & Węgrzyn, G. *Replication of Plasmids Derived from P1, F, R1, R6K and RK2 Replicons in Amino Acid-Starved Escherichia Coli Stringent and Relaxed Strains. J. Basic Microbiol* vol. 37 (1997).
193. Herman, A. & Węgrzyn, G. Effect of increased ppGpp concentration on DNA replication of different replicons in Escherichia coli. *J Basic Microbiol* 35, 33–39 (1995).
194. Blattner, F. R. *et al.* The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science* 277, 1453–1462 (1997).
195. NBRP Ecoli Strain. <https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/resource/strainGeneMutant/about>.
196. Baba, T. *et al.* Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* (2006) doi:10.1038/msb4100050.
197. Taylor, R. G., Walker, D. C. & McInnes, R. R. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21, 1677 (1993).
198. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113–130 (1986).
199. Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B. & Wickner, W. SecA Membrane Cycling at SecYEG Is Driven by Distinct ATP Binding and Hydrolysis Events and Is Regulated by SecD and SecF. *Cell* 83, 1171–1181 (1995).
200. Ingram, L. C., Richmond, M. H. & Sykes, R. B. Molecular Characterization of the R Factors Implicated in the Carbenicillin Resistance of a Sequence of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Burns. *Antimicrob Agents Chemother* 3, 279 (1973).
201. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J Bacteriol* 177, 4121–4130 (1995).
202. Caspi, R., Helinski, D. R., Pacek, M. & Konieczny, I. Interactions of DnaA proteins from distantly related bacteria with the replication origin of the broad host range plasmid RK2. *Journal of Biological Chemistry* 275, 18454–18461 (2000).
203. Toukdarian, A. E., Helinski, D. R. & Perri, S. The plasmid RK2 initiation protein binds to the origin of replication as a monomer. *J Biol Chem* 271, 7072–7078 (1996).
204. Kongsuwan, K., Josh, P., Picault, M. J., Wijffels, G. & Dalrymple, B. The plasmid RK2 replication initiator protein (TrfA) binds to the sliding clamp beta subunit of DNA polymerase III: implication for the toxicity of a peptide derived from the amino-terminal portion of 33-kilodalton TrfA. *J Bacteriol* 188, 5501–5509 (2006).
205. Valla, S., Haugan, K., Durland, R. & Helinski, D. R. Isolation and properties of temperature-sensitive mutants of the trfA gene of the broad host range plasmid RK2. *Plasmid* 25, 131–136 (1991).
206. Schindelin, J. *et al.* Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682 (2012).
207. R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
208. H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.
209. Krull, A., Buchholz, T. O. & Jug, F. Noise2Void - Learning Denoising from Single Noisy Images. *Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* 2019-June, 2124–2132 (2018).
210. Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci US A* 86, 2172–2175 (1989).
211. SnapGene | Software for everyday molecular biology. <https://www.snapgene.com/>.
212. Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134 (2012).

213. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343–345 (2009).
214. BactoBox. <https://sbtinstruments.com/bactobox>.
215. Western blot membrane stripping for restaining protocol.
216. Hawkins, M., Atkinson, J. & McGlynn, P. Escherichia coli Chromosome Copy Number Measurement Using Flow Cytometry Analysis. in 151–159 (2016). doi:10.1007/978-1-4939-3631-1_12.
217. Perez-Riverol, Y. *et al.* The PRIDE database at 20 years: 2025 update. *Nucleic Acids Res* 53, D543–D553 (2025).
218. Parkinson, H. *et al.* ArrayExpress—a public database of microarray experiments and gene expression profiles. *Nucleic Acids Res* 35, D747 (2006).
219. bcl2fastq2 Conversion Software v2.20. <https://sapac.support.illumina.com/downloads/bcl2fastq-conversion-software-v2-20.html?langsel=/sg/>.
220. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
221. Zhu, J. *et al.* Open Peer Review From reads to regions: a Bioconductor workflow to detect differential binding in ChIP-seq data [version 2; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]. (2016) doi:10.12688/f1000research.7016.1.
222. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012 9:4 9, 357–359 (2012).
223. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079 (2009).
224. Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, 1–9 (2008).
225. Lun, A. T. L. & Smyth, G. K. csaw: a Bioconductor package for differential binding analysis of ChIP-seq data using sliding windows. *Nucleic Acids Res* 44, e45 (2016).
226. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140 (2010).
227. Lund, S. P., Nettleton, D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. Detecting differential expression in RNA-sequence data using quasi-likelihood with shrunken dispersion estimates. *Stat Appl Genet Mol Biol* 11, (2012).
228. Luana Micallef and Peter Rodgers (2014). eulerAPE: Drawing Area-proportional 3-Venn Diagrams Using Ellipses. PLoS ONE 9(7): e101717. doi:10.1371/journal.pone.0101717. <http://www.eulerdiagrams.org/eulerAPE>.
229. Mackiewicz, P., Zakrzewska-Czerwińska, J., Zawilak, A., Dudek, M. R. & Cebrat, S. Where does bacterial replication start? Rules for predicting the oriC region. *Nucleic Acids Res* 32, 3781–3791 (2004).
230. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. doi:10.1093/molbev/msy096.
231. Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L. & Noble, W. S. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol* 8, (2007).
232. Nagy, A., Málnási-Csizmadia, A., Somogyi, B. & Lorinczy, D. Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP): A preliminary study. *Thermochim Acta* 410, 161–163 (2004).
233. Tobiason, D. M. & Seifert, H. S. The Obligate Human Pathogen, Neisseria gonorrhoeae, Is Polyploid. *PLoS Biol* 4, e185 (2006).
234. Kraemer, J. A., Sanderlin, A. G. & Laub, M. T. The Stringent Response Inhibits DNA Replication Initiation in E. coli by Modulating Supercoiling of oriC. *mBio* 10, (2019).
235. Erlich, Y., Mitra, P. P., delaBastide, M., McCombie, W. R. & Hannon, G. J. Alta-Cyclic: a self-optimizing base caller for next-generation sequencing. *Nat Methods* 5, 679–682 (2008).
236. Jiang, L. *et al.* Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments. *Genome Res* 21, 1543–1551 (2011).
237. Schaefer, C. & Messer, W. DnaA protein/DNA interaction. Modulation of the recognition sequence. *MGG Molecular & General Genetics* 226, 34–40 (1991).
238. Deter, H. S., Hossain, T. & Butzin, N. C. Antibiotic tolerance is associated with a broad and complex transcriptional response in E. coli. *Scientific Reports* 2021 11:1 11, 1–15 (2021).
239. Boeneman, K. *et al.* Escherichia coli DnaA Forms Helical Structures Along the Longitudinal Cell Axis Distinct From MreB Filaments. *Mol Microbiol* 72, 645 (2009).
240. Hadizadeh Yazdi, N., Guet, C. C., Johnson, R. C. & Marko, J. F. Variation of the folding and dynamics of the Escherichia coli chromosome with growth conditions. *Mol Microbiol* 86, 1318 (2012).

241. Durland, R. H. & Helinski, D. R. Replication of the broad-host-range plasmid RK2: direct measurement of intracellular concentrations of the essential TrfA replication proteins and their effect on plasmid copy number. *J Bacteriol* 172, 3849 (1990).
242. Helmstetter, C. E. & Pierucci, O. Cell Division During Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 95, 1627–1633 (1968).
243. Clark, D. J. Regulation of Deoxyribonucleic Acid Replication and Cell Division in *Escherichia coli* B/r. *J Bacteriol* 96, 1214–1224 (1968).
244. Grossman, N., Ron, E. Z. & Woldringh, C. L. Changes in Cell Dimensions During Amino Acid Starvation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 152, 35–41 (1982).
245. Shi, H. *et al.* Starvation induces shrinkage of the bacterial cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, (2021).
246. Sauer, R. T. & Baker, T. A. AAA+ Proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu Rev Biochem* 80, 587–612 (2011).
247. Sroka, M. The role of inorganic polyphosphate in the regulation of *Escherichia coli* CobB deacetylase activity during amino acid starvation. *Rozprawa doktorska, Gdańsk* (2025).
248. Magkiriadou, S., Stepp, W. L., Newman, D. K., Manley, S. & Racki, L. R. Polyphosphate affects cytoplasmic and chromosomal dynamics in nitrogen-starved *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121, (2024).
249. Beaufay, F. *et al.* Polyphosphate drives bacterial heterochromatin formation. *Sci Adv* 7, (2021).
250. Malabirade, A. *et al.* Revised role for Hfq bacterial regulator on DNA topology. *Sci Rep* 8, 1–12 (2018).
251. Zawilak-Pawlik, A., Donczew, R. & Zakrzewska-Czerwińska, J. Beyond DnaA: The Role of DNA Topology and DNA Methylation in Bacterial Replication Initiation. *J Mol Biol* 426, 2269–2282 (2014).
252. Gao, Z. *et al.* Liquid-Liquid Phase Separation: Unraveling the Enigma of Biomolecular Condensates in Microbial Cells. *Front Microbiol* 12, (2021).
253. Woldringh, C. L. The Bacterial Nucleoid: From Electron Microscopy to Polymer Physics—A Personal Recollection. *Life* 13, 895 (2023).
254. Shingler, V. & Thomas, C. M. Transcription in the *trfA* region of broad host range plasmid RK2 is regulated by *trfB* and *korB*. *MGG Molecular & General Genetics* 195, 523–529 (1984).
255. Jagura-Burdzy, G. & Thomas, C. M. KorA protein of promiscuous plasmid RK2 controls a transcriptional switch between divergent operons for plasmid replication and conjugative transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10571 (1994).
256. Conter, A. Plasmid DNA supercoiling and survival in long-term cultures of *Escherichia coli*: Role of NaCl. *J Bacteriol* 185, 5324–5327 (2003).