

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Želimira Filić

**Istraživanje biološke uloge proteina SsbB u segregaciji
kromosoma tijekom reproduktivne faze bakterije
*Streptomyces coelicolor***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

**Istraživanje biološke uloge proteina SsbB u segregaciji kromosoma
tijekom reproduktivne faze bakterije *Streptomyces coelicolor***

Želimira Filić

Disertacija je izrađena u: Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Mentorica: dr.sc. Dušica Vujaklija, viša znanstvena suradnica

U ovom radu dobivene su nove spoznaje o strukturnim i funkcionalnim karakteristikama paralognog proteina SsbB koji ima važnu ulogu tijekom segregacije kromosoma u presporogene odjeljke zračnih hifa bakterije *S. coelicolor*. Biofizičkim i imunološkim metodama pokazana je važnost Cys7 za stabilizaciju tetramera SsbB i za pravilno vezanje jIDNA. Višestruke mutacije gena koji sudjeluju u procesu segregacije kromosoma (Δssb , $\Delta parB$ i/ili Δsmc) smanjuju defekt anukleiranosti ali povećavaju rasap duljine spora. Metodom BACTH je otkrivena, te CD spektrometrijom potvrđena interakcija proteina SsbB s transkripcijskim regulatorom DevA i njegovom promotorskom regijom što ukazuje na postojanje jednog novog mehanizma regulacije procesa sporulacije.

Broj stranica: 137

Broj slika: 50

Broj tablica: 16

Broj literaturnih navoda: 136

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: SsbB, disulfidni mostovi, *S. coelicolor*, segregacija kromosoma

Datum obrane: 11. rujna 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences**

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

**Analysis of biological role of SsbB protein in chromosome segregation
during reproductive stage of *Streptomyces coelicolor***

Želimira Filić

Thesis performed at: Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Supervisor: dr. sc. Dušica Vujaklija, Senior research associate

This study presents new insights into structural i functional characteristics of the paralogous protein SsbB, which is important for chromosomal segregation during the reproductive stage of the bacterium *S. coelicolor*. The importance of Cys7 for SsbB tetramer stabilization i its binding to ssDNA was confirmed by biophysicalal i immunological methods. Multiple mutations of genes involved in sporulation proceses (Δssb , $\Delta parB$ and/or Δsmc) decrease the annucleation defect i increases the variance of spore size distribution. The BATCH method identified a novel interaction between SsbB i transcriptional regulator DevA as well as its promoter region. This interaction, confirmed by CD spectrometry, is suggestsing a new regulatory mechanism involved in the control of sporulation process.

Number of pages: 137

Number of figures: 50

Number of tables: 16

Number of references: 136

Original in: Croatian

Key words: SsbB, S-S bridges, *S. coelicolor*, chromosome segregation

Date of the thesis defense: 11. September 2019.

Reviewers:

Thesis deposited in: National i University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City i University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Istraživanja za izradu ove doktorske disertacije provedena su u Laboratoriju za molekularnu genetiku, Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Dušice Vujaklije u sklopu poslijediplomskog interdisciplinarnog sveučilišnog studija Molekularne bioznanosti, smjer Biologija. Istraživanja su provedena uz potporu MZO-a Republike Hrvatske [broj projekta 098-0982913-2877], HRZZ-a [IP2018-01-1754], te FEMS-ove kratkoročne stipendije za mlade znanstvenike dodijeljene Želimiri Filić za boravak na Odjelu za molekularnu mikrobiologiju, Biotehnološki fakultet, Sveučilište u Wrocławu, Poljska.

Posvećujem ovu doktorsku disertaciju svojim najmilijima Aljoši, Franji, i Ani koji daju smisao svakom mom danu.

Posvećujem je i svojim roditeljima, mami Ivanki i tati Želimiru koji su me uvijek podupirali i osigurali mi život pun ljubavi. Uvijek ćete mi biti uzor u svim životnim poljima.

Zahvaljujem se prvenstveno svojoj mentorici dr.sc. Dušici Vujaklija, što mi je pružila priliku da se priključim njezinoj istraživačkoj grupi i time uronim u svijet znanosti. Zahvaljujem se na ukazanom povjerenju i na svemu što me naučila. Zahvaljujem se na uloženom trudu i vremenu u moj znanstveni napredak i što uvijek nalazi vremena za kritičko diskutiranje rezultata i nesebično prenošenje vlastitih znanja i iskustava. Osim toga, hvala joj na detaljnom i kritičkom čitanju ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svojoj kolegici i dragoj prijateljici dr.sc. Tini Paradžik, svojoj laboratorijskoj partnerici u sretnim i manje sretnim trenucima muka po streptomicetima. Hvala i doc.dr.sc. Ani Bielen, koja me zajedno s Tinom na početku rada uputila u nove laboratorijske tehnike te tješila kada stvari nisu išle prema planu. Hvala im objema na prekrasnom prijateljstvu.

Zahvaljujem se dr.sc. Ivi Crnolatu na suradnji u dijelu kalorimetrijskih i spektrofotometrijskih tehnika koje su važan dio ove doktorske disertacije. Zahvaljujem i prof. dr.sc. Dagmari Jakimowicz koja me primila u svoj laboratorij tijekom tromjesečne FEMS-ove stipendije te mi omogućila primjenu metode koja je također pridonijela kvaliteti ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se i kolegici dr.sc. Vlatki Godinić Mikulčić koja mi je svojim savjetima i iskustvom pomogla proširiti spoznaje o tehnikama manipulacije proteina.

Veliko hvala svim članovima Laboratorija za molekularnu genetiku, posebno dr.sc. Heleni Četković, dr.sc. Andreji Mikoč, dr.sc. Mirni Imešek, dr.sc. Heleni Bilandžiji, dr.sc. Bruni Pleše i dr.sc. Matiji Harcetu koji su me od početka prijateljski primili i bili na raspolaganju kako tehničkim, tako i prijateljskim savjetom. Zahvaljujem se i našoj najmlađoj laboratorijskoj kolegici Eli Šarić na prijateljskoj podršci i pomoći kada je bila panika oko dovršetka pokusa. Hvala „Ekipici” koja mi uveseljava svakodnevnice na poslu i osigura preporučenu dnevnu dozu smijeha za bolje zdravlje. Hvala i mojim dragim sadašnjim i bivšim CIR-ovcima Filipu, Hrvoju, Mariu i Marku bez kojih Ruđer ne bi bio isti.

Hvala mojoj pametnici Martici, hvala svim mojim Filićima i mojim Dupličima, posebno hvala svim bakama, dedama pa i prabakama koji su uskakali u čuvanju mojih hahara dok sam ja bdjela nad doktoratom.

1	Uvod	1
1.1	Općenito o streptomicetima	2
1.1.1	Regulacija stanične diferencijacije kod streptomiceta	7
1.1.2	Uloga oksidacijskog stresa kod streptomiceta	11
1.1.3	Regulacija segregacije kromosoma	14
1.1.4	Završna faza diferencijacije - sazrijevanje spora	15
1.2	Proteini SSB i njihova uloga u replikaciji DNA kod streptomiceta	20
1.2.1	Paralogni proteini SSB kod bakterije <i>S. coelicolor</i>	23
1.2.2	Uloga S-S mostova u stabilnosti proteina tijekom oksidacijskog stresa	25
1.3	Ciljevi istraživanja	27
2	Materijali i metode	28
2.1	Materijali	29
2.1.1	Kemikalije	29
2.1.2	Mikroorganizmi	33
2.1.3	Uzgoj mikroorganizama	34
2.2	Metode	35
2.2.1	Pročišćavanje DNA	35
2.2.2	Kloniranje	35
2.2.3	Lančana reakcija polimerazom PCR	35
2.2.4	Metoda ciljane mutageneze	37
2.2.5	Restriksijska digestija i ligacija DNA	38
2.2.6	Konstrukcija plazmida	39
2.2.7	Transformacija bakterijskih stanica	42
2.2.8	Zamjena gena i komplementacija (REDIRECT PCR-targeting)	43
2.2.9	Bakterijski sustav dvaju hibrida (engl. Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System – BACTH)	45
2.2.10	Priprema staničnog ekstrakta i pročišćavanje proteina	48
2.2.11	Određivanje koncentracije proteina	49
2.2.12	Elektroforetske metode analize proteina	50
2.2.12.1	Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)	50
2.2.13	Metoda određivanja kompleksa DNA i proteina na temelju zaostajanja u gelu (EMSA)	51
2.2.14	Kalorimetrijske analize proteina	51
2.2.14.1	Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC – Isothermal Titration Calorimetry)	52
2.2.14.2	Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC – Differential scanning calorimetry)	52
2.2.15	Spektroskopska analiza proteina metodom kružnog dikroizma (CD – Circular dichroism)	54
2.2.16	Imunološke metode analize proteina	55
2.2.16.1	Western blot	55
2.2.16.2	Kapljična analiza proteina (engl. Dot-blot analysis)	55
2.2.17	Fluorescencijska mikroskopija (konfokalna laserska mikroskopija)	56
3	Rezultati	57
3.1	Uloga disulfidnih mostova u stabilizaciji i funkciji homotetramera proteina SsbB	58
3.1.1	Kloniranje, prekomjerna ekspresija i pročišćavanje divljeg tipa proteina SsbB te mutiranih varijanti SsbBCys ₇ Ala i SsbBCys ₇ Ser	58
3.1.2	Utvrđivanje stabilnosti strukture proteina SsbB, SsbBCys ₇ Ala i SsbBCys ₇ Ser u ovisnosti o reducirajućem agensu	59
3.1.3	Vežanje proteina SsbB na j1DNA u ovisnosti o disulfidnim mostovima	60
3.1.4	Fenotipska karakterizacija zamjene aminokiseline Cys u Ala i Ser	62
3.2	Usporedna analiza stabilnosti proteina SsbB u ovisnosti o S-S mostovima	63

3.2.1	Određivanje stabilnosti proteina metodom ITC	63
3.2.2	Određivanje stabilnosti proteina metodom DSC.....	67
3.2.3	Određivanje stabilnosti proteina metodom CD.....	68
3.3	Razjašnjavanje uloge proteina SsbB u procesu segregacije kromosoma tijekom sporulacije bakterije <i>S. coelicolor</i>	72
3.3.1	Konstrukcija i fenotipska karakterizacija mutanata Δ ssbB::Hyg, Δ smc Δ ssbB::Hyg, Δ parB Δ ssbB::Hyg, Δ parB Δ smc Δ ssbB::Apra,Hyg	72
3.3.2	Analize zračnih micelija i spora mutanata Δ ssbB::Hyg, Δ smc Δ ssbB::Hyg, Δ parB Δ ssbB::Hyg, Δ parB Δ smc Δ ssbB::Apra,Hyg pomoću fluorescencijske mikroskopije.....	76
3.4	Identifikacija interaktanata proteina SsbB pomoću bakterijskog sustava dvaju hibrida (BACTH)	80
3.4.1	Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina DevA.....	83
3.5	Usporedna analiza interakcija proteina SsbB i DevA primjenom <i>in vitro</i> metoda	84
3.5.1	Ispitivanje interakcija proteina SsbB i DevA metodom kapljične analize proteina.....	84
3.5.2	Utvrđivanje interakcije proteina SsbB i DevA metodom EMSA	85
3.5.1	Analiza kompleksa DevA-SsbB metodom CD spektroskopije.....	86
3.6	Fenotipska i morfološka analiza dvostrukog mutanta Δ devA Δ ssbB	89
4	Rasprava	92
4.1	Disulfidni mostovi proteina stabiliziraju tetramer SsbB i doprinose njegovoj biološkoj funkciji	94
4.2	Mutacije u genima <i>parB</i> i <i>smc</i> smanjuju anukleiranost spora u bakteriji <i>S. coelicolor</i> Δ ssbB ...	97
4.3	Protein SsbB ostvaruje interakciju s proteinom DevA	97
4.3.1	Identifikacija proteina DevA kao proteinskog interaktanta proteina SsbB pomoću BACTH	100
4.3.2	Proteini DevA, SsbB i promotorska regija gena <i>devA</i> ostvaruju stabilne interakcije ..	102
4.4	Delecija gena <i>ssbB</i> u mutantu <i>devA</i> smanjuje defekt u razvojnem stadiju bakterije <i>S. coelicolor</i> i deregulira sintezu aktinorodina	103
5	Zaključci	105
6	Literatura	107
7	Sažetak	119
8	Summary	121
9	Kratice	123
10	Životopis	125

1 Uvod

1.1 Općenito o streptomicetima

Streptomiceti su Gram - pozitivne bakterije koje pripadaju redu Actinobacteria, jednom od najvećih poznatih skupina bakterija. Aktinobakterije su tijekom evolucije nastanile brojne ekološke niše te usvojile različite životne stilove. Članovi ove skupine pokazuju širok raspon morfološke i razvojne složenosti, od jednostavnih kokoidnih oblika kao rod *Micrococcus*, fragmentiranih hifalnih formi (*Nocardia* spp.) sve do visoko diferenciranih razgranatih micelija kao u primjeru bakterija roda *Streptomyces* spp. Aktinobakterije mogu naseljavati različite ekološke niše kako u kopnenom, tako i u vodenom okolišu. Naseljavaju tlo (*Streptomyces* spp.), gastrointestinalni trakt (*Bifidobacterium* spp.), mogu biti komenzali na biljkama (*Leifsonia* spp.), simbioti koji fiksiraju dušik (*Frankia* spp.) ili čak patogeni (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. i *Propionibacterium* spp.). Sukladno tome, posjeduju i različite fiziološke i metaboličke osobitosti. Od aktinobakterija, streptomiceti su najpoznatiji po sintezi širokog spektra sekundarnih metabolita, posebice antibiotika, zatim imunosupresora i protutumorskih lijekova (Ventura i sur., 2007), a u novije vrijeme postaju i važan izvor izvanstaničnih hidrolitičkih enzima (Bielen i sur, 2009). Sve ovo svrstava streptomicete u skupinu mikroorganizama od velike važnosti za farmaceutsku i biotehnošku industriju. Ovo najbolje potvrđuje činjenica da se većina antibiotika, koja se primjenjuje u medicini, veterini i poljoprivredi, proizvede pomoću različitih vrsta bakterija iz roda *Streptomyces*. Genomske analize pokazuju kako svaka vrsta sadrži genetički potencijal za sintezu desetaka vrijednih sekundarnih metabolita te se stoga ovi organizmi sve intenzivnije proučavaju s ciljem pronalaska novih terapijskih lijekova u borbi protiv globalnog problema izuzetno povećane rezistencije patogenih bakterija na široki spektar antibiotika, ali i u pronalasku drugih bioaktivnih sastojaka za medicinsku primjenu (Chater, 2016).

Naša grupa se već dugi niz godina bavi istraživanjima streptomiceta. To su višestanične bakterije bogatog GC sastava (između 70 i 74%), koje imaju programiran i složen životni ciklus koji uključuje morfološku diferencijaciju. Budući da njihov razvojni ciklus više nalikuje višestaničnim eukariotima, taksonomija ove skupine nije bila jednostavna. Do '50-ih godina prošlog stoljeća mnogi mikrobiolozi smatrali su da se radi o plijesnima koje pripadaju carstvu gljiva ili nekakvom prijelazu između bakterija i gljiva ali je tek uz pomoć elektronske mikroskopije napokon dokazano da streptomiceti ne sadrže jezgenu membranu već da se nedvojbeno radi o prokariotima (Hopwood 1999, Hopwood, 2006). Streptomiceti su sveprisutne bakterije koje većinom žive kao saprofiti u tlu. Poznati su, između ostaloga, i po tome što sintetiziraju geosmin, spoj koji daje karakterističan miris tlu (Hopwood, 2007). Njihova sposobnost naseljavanja okoliša olakšana je time što iz zračnih hifa razvijaju spore koje se lagano raspršuju okolišem i pomažu im u širenju i opstanku (Kieser i sur., 2000). Spore

također omogućavaju opstanak u nepovoljnim uvjetima jer su otporne na nedostatak hranjivih tvari i vode pa mnoge vrste roda *Streptomyces* mogu preživjeti dulje vrijeme u tlu u toj inaktivnoj formi. Nedavna istraživanja potvrdila su da morski okoliš također sadrži veliki broj streptomiceta koji se ne mogu naći u tlu (Dharmaraj i Sumantha, 2009), i zbog toga ove ekološke niše u novije vrijeme postaju interesantne za traženje novih vrsta streptomiceta (Paulus i sur., 2017).

Do sada najbolje opisani i proučeni predstavnik ovog roda je bakterija *Streptomyces coelicolor*. Ime *S. coelicolor* prvi puta se spominje 1908. godine u Müllerovom opisu aktinomiceta koji proizvodi „nebesko” plavi topivi pigment u podlozi zbog čega je nazvan *Streptothrix coelicolor* (lat. *coelus* - nebo i *color* – boja). Kasnije je vrsta preimenovana u *Actinomyces coelicolor* (Müller) Lieske, zbog velike sličnosti s drugim opisanim organizmom, *Actinomyces violaceus ruber* (Waksman i Curtis). Nakon što je napokon utvrđen rod *Streptomyces*, ime je promijenjeno u *Streptomyces coelicolor* (Müller) Waksman i Henrici (Kutzner i Waksman, 1959). Zanimljivo je da se kod najčešće proučavanog streptomiceta, bakterije *S. coelicolor* A3(2) do danas zadržala taksonomska pogreška. Naime, utvrđeno je kako bi ovaj soj trebao pripadati vrsti *S. violaceoruber* koja se razlikuje od originalnog Müllerovog soja *S. coelicolor* (Kutzner i Waksman, 1959), no kako bi se izbjegle dodatne zabune u znanstvenoj zajednici, ime *Streptomyces coelicolor* A3(2) zadržano je do danas (Hopwood, 1999).

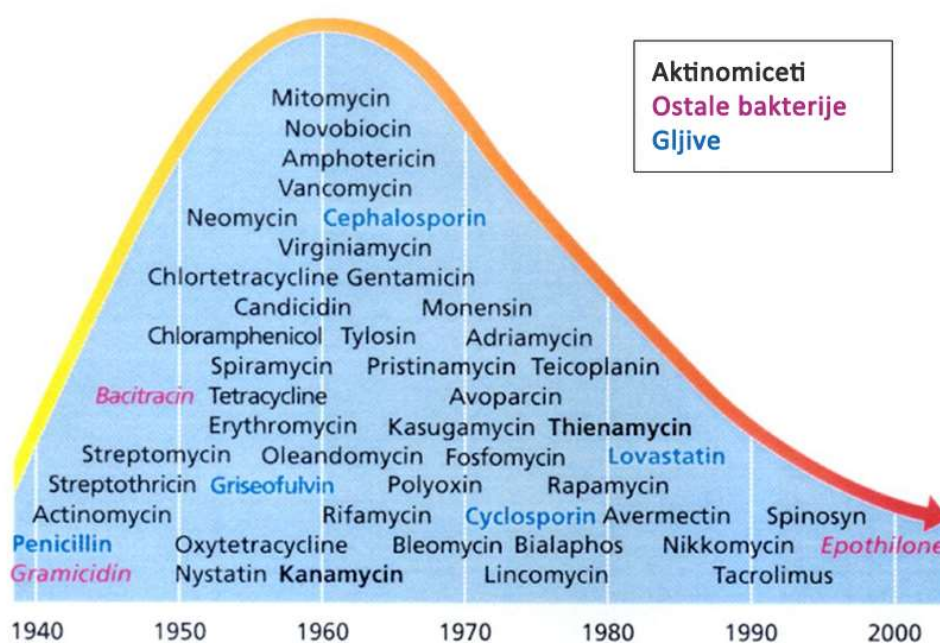


Slika 1.1. Kolonije bakterija *Streptomyces coelicolor* M145 (*act*⁺ derivat soja *S. coelicolor* A3(2)) na MS hranjivoj podlozi. Plava boja podloge na kojoj rastu kolonije dolazi od antibiotika aktinorodina ili γ -aktinorodina kojeg bakterija sintetizira.

Različiti sojevi proizvode karakterističan pigment aktinorodin ili srodne derivate aktinorodina (α -, β -, γ -, Δ -, ϵ - aktinorodin te fenociklinon). Ovaj pigment ujedno je antibiotik ali i pH idnikator koji

pri višim pH vrijednostima daje plavo a pri nižim crveno obojenje. Sastav pigmenata razlikuje se kod pojedinih sojeva streptomiceta, a njihova sinteza ovisi o vrijednostima pH medija u kojem bakterija raste (Bystrykh i sur., 1996).

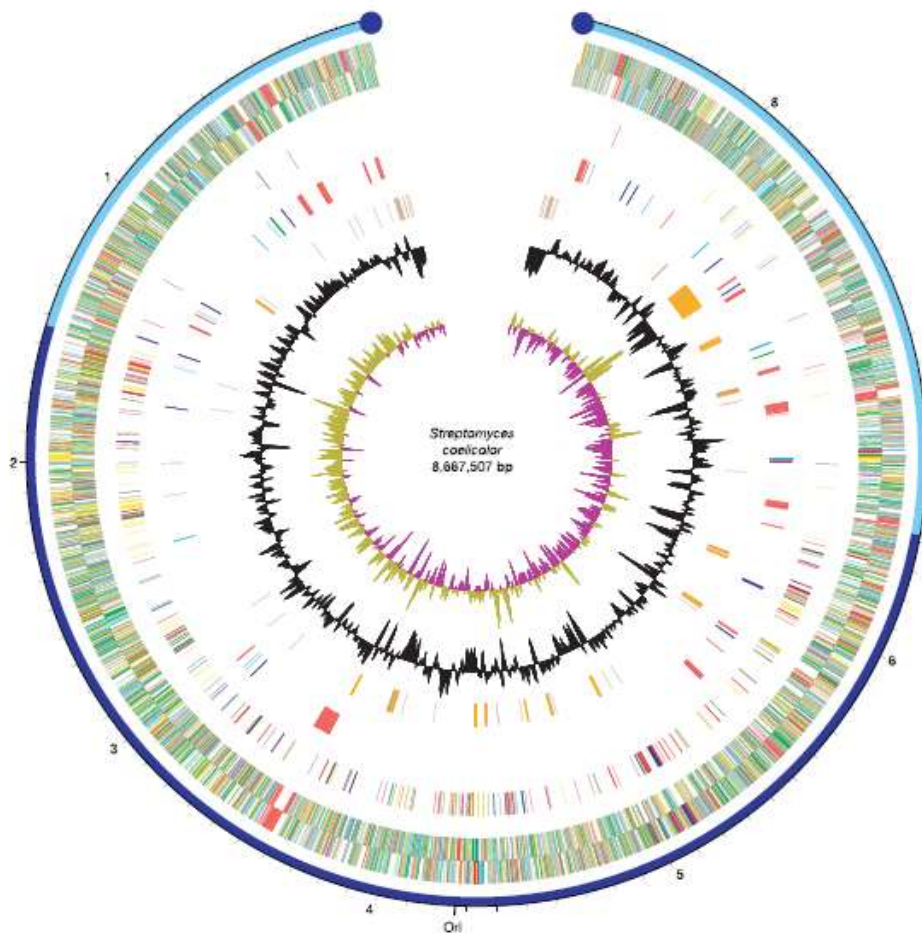
Razdoblje najintenzivnijih istraživanja streptomiceta kao i interes za njihovu eksploataciju od strane farmaceutskih tvrtki bio je tijekom '50-ih do '70-ih godina prošlog stoljeća (slika 1.2) zbog njihovog potencijala proizvodnje velikog broja antibiotika, nakon čega se bilježi pad identifikacije novih aktivnih spojeva. Globalni problem rezistencije patogenih mikroorganizama na postojeće antibiotike, kao i potreba za nekim drugim medicinski važim prirodnim spojevima (protutumosrki lijekovi i imunosupresori) ponovno intenzivira traženje novih streptomicetnih vrsta i identifikaciju novih lijekova (Hopwood, 2007).



Slika 1.2. Proizvodnja bioaktivnih sastojaka u drugoj polovici prošlog stoljeća. Aktinomiceti predstavljaju najveći izvor korisnih sekundarnih metabolita (označeni crnim slovima). Bioaktivni sastojci iz ostalih bakterija prikazani su ružičastom bojom, a iz gljiva plavom. Prilagođeno prema (Hopwood, 2007).

Razvojem novih metoda sekvenciranja veća je i dostupnost cjelovitih genoma streptomiceta provedena s ciljem pronalaska novih metaboličkih produkata. Do 2014. godine kompletno je sekvencirano 19 genoma roda *Streptomyces* dok ih je 125 bilo u tijeku sekvenciranja (Harrison i Studholme, 2014). Trenutno je u NCBI bazi dostupno čak 348 kompletno sekvenciranih genoma roda *Streptomyces*. U 2002. objavljena je sekvenca prvog genoma streptomiceta, modelne bakterije *S. coelicolor* M145 (Bentley i sur., 2002), koja je korištena i u našim istraživanjima. Navedeni soj je

prototrofni derivat roditeljskog soja *Streptomyces coelicolor* A3(2), ali mu nedostaju dva plazmida prisutna u roditeljskom soju (linearni SCP1, 365 kb, AL590463, AL590464; i kružni SCP2, 31 kb, AL645771).



Slika 1.3. Kružni prikaz linearnog kromosoma bakterije *S. coelicolor*. Vanjska skala predstavlja veličinu kromosoma u megabazama. Tamno plavom bojom obilježen je središnji dio kromosoma (engl. core region), dok su svjetlo plavom bojom naznačeni krajevi kromosoma (engl. arms). Različitim bojama izdvojeni su geni koji se razlikuju prema funkcijama (vanjska dva kruga). U trećem krugu izdvojeni su esencijalni geni (smješteni većinom u središnjem dijelu kromosoma) uključeni u staničnu diobu, replikaciju DNA, transkripciju, translaciju te sintezu aminokiselina. Četvrti krug ističe gene uključene u sekundarni metabolizam, a peti krug mobilne elemente. U šestom krugu naznačen je GC sastav, a u sedmom GC odnos ($G - C/G + C$), oker boja predstavlja vrijednost > 1 , a ljubičasta < 1 .

Jedinstveni linearni kromosom (8 667 507 pb) s centralno pozicioniranim mjestom početka replikacije (engl. origin of replication *oriC*) i invertiranim terminalnim ponavljanjima (engl. terminal inverted repeats, TIRs) ima veliki kodirajući potencijal budući da sadrži 7825 otvorenih okvira čitanja (engl. open reading frames, ORFs) za sintezu proteina. Za usporedbu, modelni Gram-negativni bakterijski organizam *Escherichia coli* sadrži 4289 gena, Gram-pozitivni sporulirajući *Bacillus subtilis* 4099 gena, te niži jednostanični eukariot *Saccharomyces cerevisiae* 6203 (Bentley i sur., 2002).

Kromosom bakterije *S. coelicolor* sastoji se od središnjeg dijela veličine 4.9 Mb (eng. *core region*) i krajeva (engl. *chromosome arms*) dugačkih 1.5Mpb (lijevi kraj) te 2.3Mpb (desni kraj) (slika 1.3) .

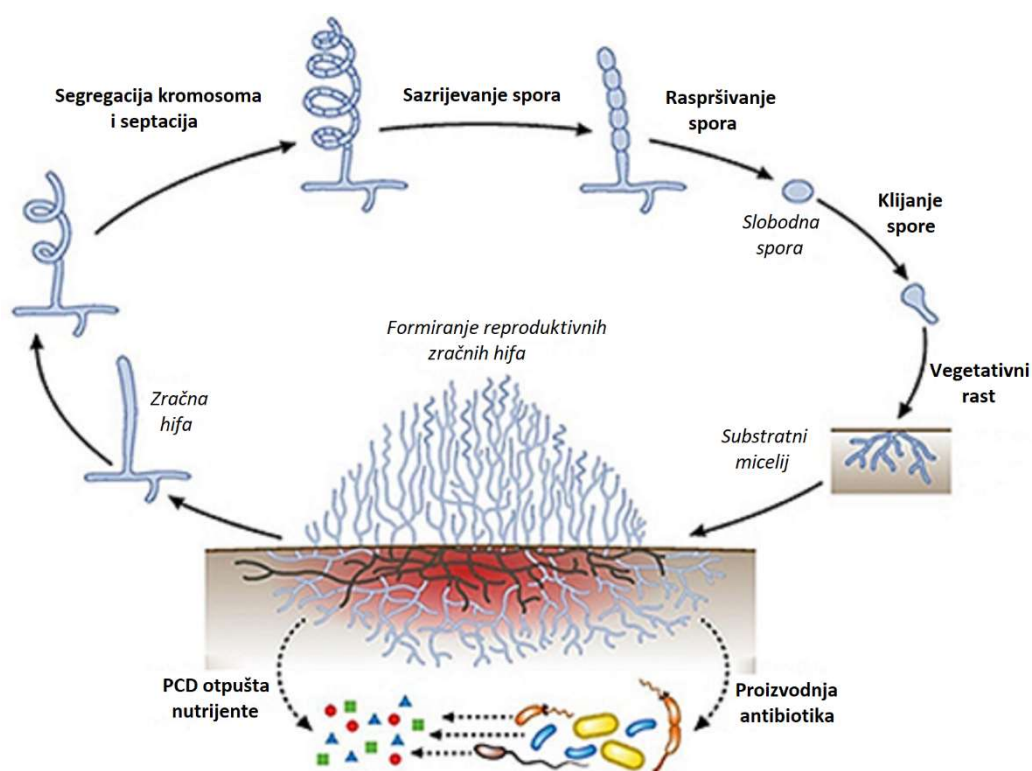
Za više streptomicetnih genoma pokazana je očuvanost redoslijeda gena (sintenijska) u središnjem dijelu kromosoma gdje se nalaze gotovo svi esencijalni geni uključeni u procese stanične diobe, replikacije DNA, transkripcije, translacije te biosinteze aminokiselina. Iznimke esencijalnim genima u centralnom dijelu su geni za koje se uspostavilo da su duplicirani. Krajevi kromosoma su manje očuvani te su podložni opsežnim delecijama i amplifikacijama. Često sadrže veći broj pokretnih genetičkih elemenata poput gena za transpozaze i integraze. Osim toga, pretpostavlja se da geni prisutni na krajevima kromosoma kodiraju za neesencijalne funkcije poput proizvodnje sekundarnih metabolita i izvanstaničnih hidrolitičkih enzima (Kieser i sur., 2000; Bentley i sur., 2002; Wang i sur., 2010).

Upravo tako veliki kromosomi s brojnim genima omogućavaju prilagodbu na širok raspon životnih uvjeta te iskorištavanje različitih izvora nutrijenata za rast, razvoj i razmnožavanje. Nije zato neobično da je čak 10,5% gena uključeno u degradaciji izvanstaničnih nutrijenata, a 7,8% u transport (Bentley i sur., 2002). Imaju tako primjerice ključnu ulogu u razgradnji i recikliranju nutrijenata iz globalno obilno prisutnih staničnih stijenki gljiva i biljaka (Chater, 2016). S obzirom na složenost životnog ciklusa kao i veliki potencijal prilagodbe, ova bakterija ima razvijen izuzetno precizan sustav regulacije, zato genom ove bakterije ima 12,3% regulatornih gena (Bentley i sur., 2002).

Iz medicinske perspektive najvažnija biokemijska osobina streptomiceta je njihova mogućnost proizvodnje antibiotika i ostalih bioaktivnih sastojaka, kao što su antitumorske i imunosupresivne tvari. Od 7825 predviđenih gena, preko 20 klastera kodira za poznate ili predviđene sekundarne metabolite (Bentley i sur., 2002). Od svih antibiotika u upotrebi, 2/3 proizvode aktinomiceti, a od toga čak 80% dolazi iz roda *Streptomyces*. Bakterijama to služi kao prilagodba na kompeticiju u životnom okolišu. Antibiotici se sintetiziraju na prijelazu vegetativnog i zračnog stadija rasta kao odgovor na nutritivni stres koji bakterijska kolonija osjeti u svom okolišu (Hopwood, 2007). To je omogućeno vremenskom i prostornom kontrolom genske ekspresije, morfogeneze, metabolizma i protoka metabolita što svrstava streptomicete u složene biološke sustave zanimljive, kako za temeljna znanstvena istraživanja stanične regulacije, tako i za njihovu primjenu u biotehnologiji i medicini. Zato su i različiti aspekti streptomicetne biologije s naglaskom na složeni razvojni ciklus i proizvodnju sekundarnih metabolita česta tema preglednih članaka (Barka i sur., 2016).

1.1.1 Regulacija stanične diferencijacije kod streptomiceta

Razvojni ciklus streptomiceta uključuje koordinirani višestanični razvoj sa složenom fiziološkom i morfološkom diferencijacijom koja kulminira proizvodnjom sekundarnih metabolita i raspršenjem zrelih spora (Flärdh, 2003). Ovo je izuzetno zanimljivo jer se streptomiceti ne dijele standardnom binarnom diobom poput većine bakterija, već poput plijesni stvaraju hife te stoga predstavljaju izvrstan model za proučavanje sačuvanosti osnovnih principa stanične diobe.



Slika 1.4. Životni ciklus streptomiceta započinje klijanjem spore i formiranjem mlade vegetativne hife. Produžnim rastom na vrhu hife, bočnim grananjem te stvaranjem povremenih poprečnih septi, stvara se vegetativni (substratni micelij) u kojem će repliciranjem DNA doći do stvaranja više desetaka kopija kromosoma u svakom odjeljku. Uslijed nedostatka nutrijeneata javlja se fenomen programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death*, PCD) te kaskade signalnih reakcija koje dovode do izbijanja reproduktivnog zračnog micelija. Unutar zračnih hifa dolazi do odvajanja presporogenih odjeljaka (septacija) koji dobivaju samo jednu kopiju kromosoma te na kraju formiraju lance zrelih spora koje mogu biti raspršene u okoliš i započeti novi ciklus u povoljnim životnim uvjetima. preuzeto iz: https://www.universiteitleiden.nl/binaries/content/gallery/ul2/main-images/science/ibl/mbh-3.mcbd-i.actinomycetes_image.jpg/mbh-3.mcbd-i.actinomycetes_image.jpg/d700xvar

Životni ciklus streptomiceta započinje klijanjem spore u povoljnim uvjetima koje se izdužuju tvoreći mlade vegetativne hife (slika 1.4). Tijekom klijanja spore kromosomi se repliciraju, a sama hifa se produžuje i grana, te se poprečno pregrađuje septama. Razgranate hife urastaju u podlogu

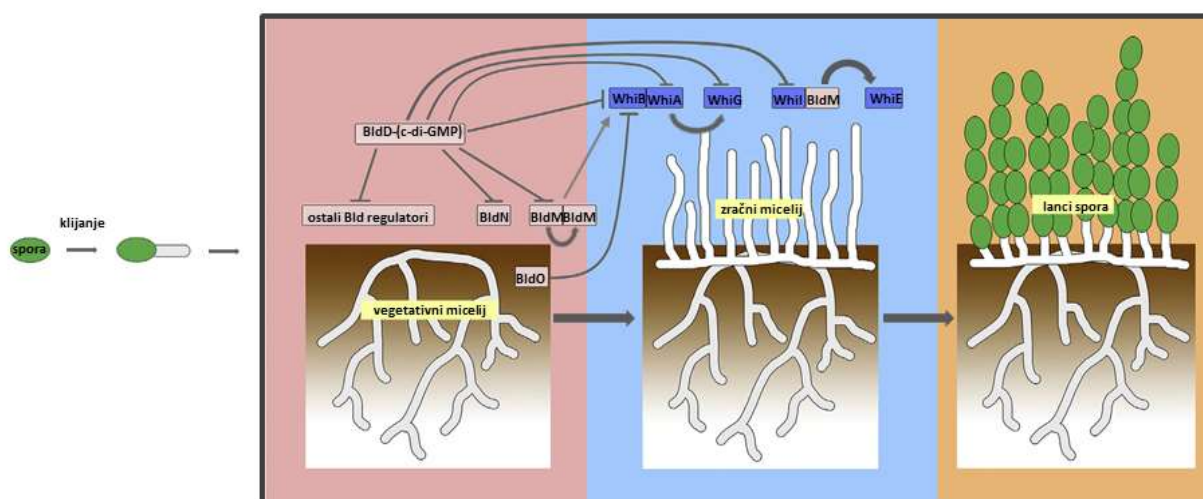
razgrađujući je pri tom hidrolitičkim enzimima. Time se stvara vegetativni ili supstratni micelij u kojem svaki odjeljak sadrži veći broj kopija kromosoma (Hopwood, 2007).

Za razliku od štapićastih bakterija poput *E. coli* i *B. subtilis*, čiji je rast simetričan i odvija se umetanjem novih peptidoglikanskih jedinica unutar lateralnih cilindričnih stijenki, hife streptomiceta izdužuju se na samom vrhu (McCormick i Flärdh, 2012). Takvim polarnim (produžnim) rastom kod streptomiceta upravlja multiproteinski kompleks (polarisom) koji sudjeluje u mobilizaciji peptidoglikanske biosintetske mašinerije na vrh hifa. Do sada je identificirano nekoliko komponenti koje su u međusobnoj interakciji te tvore organizirajući centra vrha hife: DivIVA koji obilježava mjesta za grananja hifa te utvrđuje mjesto produžnog rasta; dugački spiralno smotan protein (*Streptomyces* cytoskeletal element, Scy) koji je odgovoran za organizaciju vrha hife i veže se direktno za protein DivIVA, te treću komponentu polarisoma - proteina koji tvori filamente (filament-forming protein, FILP) čija uloga još nije potpuno razjašnjena (Flärdh, 2003; Hempel i sur., 2008; Holmes i sur., 2013; Jones i Elliot, 2018). Tijekom vegetativnog rasta kromosomi se repliciraju te se višestruke kopije kromosoma odijeljuju povremenim poprečnim stijenkama. Poprečne septe se u vegetativnom miceliju stvaraju povremeno i to u starijim dijelovima micelija te u granama, ali nikad u blizini vrha hife. Bočno grananje događa se iza vrha hife, također produžnim (vršnim) rastom na predodređenim zonama polarnog rasta, koji određuje konačni izgled micelija. Eksponencijalni rast vegetativnog micelija postignut je stoga kombinacijom produžnog rasta te grananja, a ne staničnom diobom. Stanična dioba tijekom vegetativnog rasta rezultira stvaranjem sincicijskog micelija koji sadrži dugačke odjeljke s višestrukim kopijama kromosoma koji su odijeljni povremenim i nejednako raspoređenim poprečnim stijenkama (Schwedock i sur., 1997; Flärdh i sur., 2012; Jakimowicz i van Wezel, 2012; Jones i Elliot, 2018). Osim poprečnih stijenki (koje sadrže peptidoglikan), novija istraživanja upućuju da kod streptomiceta postoje i dodatne membranske strukture, nepropusne za DNA, koje s puno većom frekvencijom ograđuju odjeljke unutar vegetativnih hifa te odvajaju nukleoide (Celler i sur., 2016; Yagüe i sur., 2016).

Kako supstratni micelij postaje stariji i gušći, dolazi do ograničene dostupnosti hranjivih sastojaka te se aktivira složeni sustav stanične signalizacije koja kontrolira i potiče rast zračnih hifa (Willey i sur., 1993). Uslijed nedostatka nurtijeneta streptomiceti prolaze opsežne kemijske i fiziološke promjene s koordiniranom diferencijacijom zračnih hifa te proizvodnjom antibiotika (Flärdh i Buttner, 2009; Barka i sur., 2016). Povećana proizvodnja izvanstaničnih enzima, aktivacija sekundarnog metabolizma te liza pojedinih odjeljaka substratnog micelija označava ulazak kolonije u proces programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death*, PCD) (slika 1.4). PCD se odvija samo na određenim segmentima vegetativnog micelija što može biti objašnjeno kao strategija kojom se

razgradnjom starijih dijelova supstratnog micelija osiguravaju nutrijenati za razvoj zračnog micelija (Miguélez i sur., 1999; Manteca i sur., 2007; Celler i sur., 2016).

U ovoj fazi zračne hife koje se ne dijele izdižu se u zrak, iznad vegetativnog micelija (slika 1.5) formiranjem hidrofobnog proteinskog sloja oko hifa, koji se sastoji od proteina Chp (*engl. chaplins*) i Rdl (*engl. rodlines* - Rdl) te polipeptida SapB (*engl. spore-associated protein B*) (Elliot i sur., 2003). Signalni put aktivacije ekspresije ovih hidrofobnih proteina još je slabo istražen, ali poznat je veći broj gena koji reguliraju formiranje zračnog micelija. Tranziciju iz razgranatog vegetativnog micelija prema zračnom miceliju, kod kojeg nema grananja, dirigiraju geni *bld* (*engl. bald* – ćelavi) nazvani prema fenotipu kolonija mutanata koji ne mogu proizvesti baršunast zračni micelij karakterističan za divlji tip kolonija. Zanimljivo je da su za produkciju SapB i hidrofobnog proteina Chp na bogatom hranjivom mediju potrebni gotovo svi geni *bld*, a povećana produkcija proteina SapB može povratiti fenotip zračnog micelija kod mutanata *bld*, što upućuje na to da aktivnost gena *bld* kulminira u proizvodnji proteina SapB (Nguyen i sur., 2002; Flärdh i Buttner, 2009).

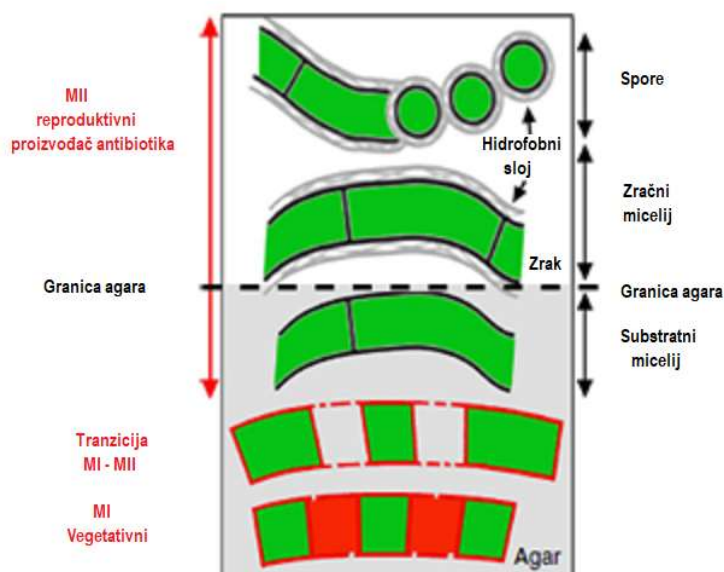


Slika 1.5 Životni ciklus streptomiceta (preuzeto iz: Jones i Elliot, 2018). Proklijala spora izdužuje se i formira vegetativnu hifu koja produžnim rastom na vrhu i grananjem iz bočnih stijenki formira gusti vegetativni micelij. Unutar vegetativnog micelija BldD vezan za c-di-GMP reprimira ostale gene *bld* (uključujući gene koji kodiraju BldM i sigma faktor BldN) te različite gene *whi* (uključujući gene koji kodiraju WhiB, WhiA, WhiG i WhiI). BldM homodimer reprimira sporulacijski regulator WhiB. Kada se oslobodi represija ovisna o BldD, ostali Bld regulatori aktiviraju gene koji su potrebni za formiranje zračnih hifa. Posljedično, zračne hife obložene hidrofobnim slojem izdižu se iznad podloge u zrak. Unutar zračnih hifa protein regulator BldO inicijalno reprimira ekspresiju whiB, a kada se ta represija otpusti, WhiB zajedno s WhiA, te WhiI zajedno s BldM, aktiviraju ostale gene nužne za sporulaciju.

Na vrhu regulatorne mreže nalazi se protein BldD koji uz pomoć c-di-GMP kontrolira morfološku diferencijaciju represijom transkripcije brojnih razvojnih gena (slika 1.5). Na taj način produljuje vegetativni rast i inhibira preuranjenu sporulaciju. BldD reprimira ostale gene *bld* – BldM i BldN te veći broj gena *whi* (*engl. white* - bijeli) - WhiB, WhiA, WhiG i WhiI, uključenih u sporulaciju.

Kada se oslobodi represija ovisna o BldD, ostali Bld regulatori aktiviraju gene koji su potrebni za formiranje zračnih hifa aktivacijom transkripcije gena za SapB, Chp i Rdl te gene uključene u sporulaciju. Osim represije putem BldD, sporulacijski regulator WhiB reprimiran je homodimerom BldM ali i novoidentificiranim represorom BldO čime se inhibira ulazak u sporulaciju represijom samo jednog gena – *whiB*. Kada se otpusti represija gena – *whiB*, protein WhiB zajedno s WhiA, te WhiL zajedno s BldM, aktiviraju ostale gene nužne za diferencijaciju zračnih hifa u dugačke lance spora koje se raspršuju u okoliš i mogu započeti novi životni ciklus (Bush i sur., 2017; Elliot i sur., 2001; Hengst i sur., 2010; Tschowri i sur., 2014; Beites i sur., 2015).

Grupa Manteca i sur. u novijim radovima navode nešto drugačiju nomenklaturu životnih stadija streptomiceta na krutoj hranjivoj podlozi (slika 1.6). Odmah nakon sazrijevanja spora formira se rani micelij s odijeljcima koje sadrže samo jednu kopiju kromosoma i koji je nazvan primarni micelij (MI). MI ima primarni metabolizam i prolazi ranu fazu programirane stanične smrti na određenim segmentima hifa. Sekundarni micelij (MII) koji sadrži veći broj kopija gena, izdiže se iz vijabilnih segmenata MI te počinje rasti iznad krutog medija.



Slika 1.6 Razvojni ciklus streptomiceta na krutom agaru (preuzeto iz Yagüe, 2016). Tradicionalna nomenklatura substratnog i zračnog micelija istaknuta je crnim slovima, a nova nomenklatura za faze MI i MII životnog ciklusa obilježena je crvenim slovima lijevo.

Prijelaz u MII razvojni stadij popraćen je uključivanjem razvojnog programa koji podrazumijeva sintezu sekundarnih metabolita te proteina uključenih u razvoj zračnog micelija (Yagüe i sur., 2013). Substratne i zračne hife u MII fazi su fiziološki različite od onih u MI fazi. MI faza odgovara

vegetativnom miceliju, dok substratni i zračni micelij predstavljaju reproduktivnu fazu koja dovodi do sporulacije. Sekundarni metabolizam obično je ograničen na fazu MII. Ono što je tradicionalno smatrano substratnim micelijem odgovara fazi MII bez hidrofobnog ovoja, a zračni micelij MII fazi s hidrofobnim ovojem (slika 1.6). Istovremeno s formiranjem zračnog micelija, najdublji dijelovi micelija prolaze drugi ciklus PCD, vjerojatno kako bi se osigurao dodatni izvor nutrijenata (Manteca i sur., 2007).

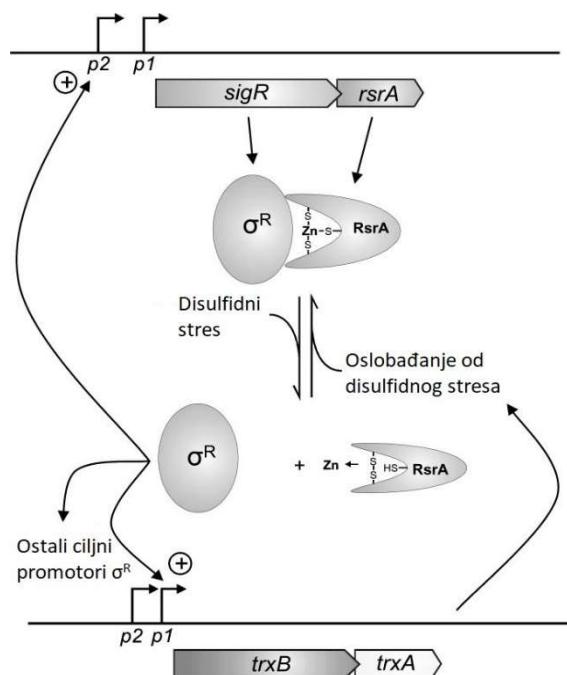
1.1.2 Uloga oksidacijskog stresa kod strepomiceta

Neizbježna posljedica aerobnog metabolizma je proizvodnja reaktivnih radikala kisika koji mogu modificirati brojne stanične komponente uključujući proteine, nukleinske kiseline i lipide, dovodeći do slabljenja staničnih funkcija nazvanih oksidacijski stres (Paget i Buttner, 2003). Oksidacijski stres može također biti izazvan prirodnim ili ksenobiotičkim redoks aktivnim tvarima ili nekim antibioticima koji uzrokuju formiranje ROS unutar stanica. Odgovor uključuje razne enzime koji uklanjaju oksidanse i održavaju optimalnu staničnu fiziologiju (Imlay, 2008; Zuber, 2009). U tome sudjeluju proteini (aktivatori ili represori) koji reguliraju stanični odgovor na ROS. Vrlo često proteini regulirani oksidativnim stresom koriste kemijska svojstva –SH skupine u cisteinskim ostacima koji uslijed izlaganja ROS-ovima prelaze u oksidirano ili reducirano stanje. Oksidacija putem ROS-a može izazvati intramolekularne disulfidne veze između cisteina u proteinu, intermolekularne disulfidne veze (između proteina) ili disulfidnu vezu između proteina koji sadrži cistein i tiola male molekulske mase kao što je glutation ili mikotiol (Paget i Buttner, 2003). Aslund i Beckwith uveli su 1999. godine pojam „disulfidni stres” kako bi opisali štetne promjene u cjelokupnoj tiol – disulfidnoj redoks ravnoteži koje nastaju oksidacijom cisteinskih ostataka (Aslund i Beckwith, 1999).

Citoplazma predstavlja izrazito reducirajući okoliš u kojem cisteinski ostaci proteina zadržavaju svoj tiolni (-SH) ili tiolatni (-S⁻) status i u kojem je formiranje stabilnih disulfidnih veza vrlo rijetko. Žive stanice koriste veći broj reduktivnih enzimatskih puteva za uklanjanje disulfidne veze u citoplazmi. Oni uključuju vrlo čestu disulfid reduktazu, tioredoksin, koja reducira oksidirane proteine koristeći elektrone iz NADPH putem svog reaktivacijskog enzima tioredoksin reduktaze, te manje proširenu disulfid reduktazu, glutaredoksin, koji se reducira pomoću tripeptida glutationa, a čiji se cisteini reduciraju pomoću NADPH-ovisne glutation reduktaze. Osim milimolarnih koncentracija takvih tiolnih pufera, reducirajući okoliš može se održavati i pomoću mikotiola koji su identificirani kao glavni tioli u velikom broju aktinomiceta kod koji ne dolazi do proizvodnje glutationa pa su mikotili identificirani kao glavna linija obrane od oksidacijskih oštećenja. Osim putem ROS, cisteinski tioli mogu

biti modificirani i reaktivnim dušikovim spojevima (*engl. reactive nitrogen species, RNS*) te tiol-reaktivnim elektrofilima (Paget i Buttner, 2003).

Najbolje proučeni primjeri regulatora temeljenih na tiolima koji odgovaraju na ROS u bakterijskim stanicama tijekom oksidacijskog stresa su: OxyR sustav koji detektira H_2O_2 u bakteriji *E. coli*, OhrR osjetljiv na organski peroksid u bakteriji *B. subtilis*, te anti-sigma faktor RsrA koji detektira oksidaciju tiola i modulira aktivnost regulatornog SigR (σ^R) u bakteriji *S. coelicolor* (Paget i Buttner, 2003; D'Autr aux i Toledano, 2007; Antelmann i Helmann, 2011). Uloga σ^R kao ključnog regulatora odgovora na oksidacijski stres kod streptomiceta otkrivena je fenotipskom analizom sigR mutanta bakterije *S. coelicolor* koji je bio djelomično osjetljiviji na spojeve koji generiraju stvaranje superoksidnih radikala, a posebno je bio osjetljiv na diamid, oxidans specifičan za tirole. Disulfidni stres izazvan diamidom kod divljeg tipa *S. coelicolor* inducira snažan odgovor povećanjem aktivnosti disulfid reduktaze koji kod sigR mutanta izostaje (Paget i sur., 1998).



Slika 1.7. Model regulacije σ^R aktivnosti kao odgovor na disulfidni stres (preuzeto iz Paget i Buttner, 2003). Tiol – disulfidni status bakterije *S. coelicolor* kontroliran je regulatornim sustavom koji se sastoji od σ faktora - σ^R i RsrA, anti σ faktor koji sadrži cink. U reducirajućim uvjetima RsrA se veže na σ^R sprječavajući aktivaciju transkripcije. Izlaganje disulfidnom stresu inducira stvaranje intramolekularnih disulfidnih veza u RsrA, zbog čega gubi afinitet za σ^R , oslobađajući tako σ^R koji aktivira transkripciju >30 gena i operona, uključujući *trxB*. Povećana ekspresija *trxB* dovodi do tioredoksin - ovisne redukcije oksidiranog RsrA nazad u stanje u kojemu može vezati σ^R , stoga isključujući transkripciju ovisnu o σ^R . Pored toga, σ^R pozitivno autoregulira ekspresiju *sigR-rsrA* operona što znači da disulfidni stres, ne samo da aktivira σ^R posttranslacijski, već inducira de novo sintezu.

Bakterija *S. coelicolor* detektira i odgovara na disulfidni stres preko σ^R -RsrA sustava koji uključuje ECF (*engl. extracitoplasmic function*) sigma faktor (σ^R) te RsrA - redoks-aktivni anti-sigma faktor (slika 1.7). σ^R i ostale podjedinice RNA polimeraza vezane na pomotor trxBp1, jedan od dva promotora tioredoksin reduktaze (trxBA) operona, u uvjetima disulfidnog stresa induciraju ekspresiju gena za tioredoksin reduktazu. S druge strane, σ^R se veže i na vlastiti promotor, sigRp2, uspostavljajući tako pozitivnu povratnu spregu vlastite sinteze (Paget i sur., 1998). Protein σ^R prisutan je u hifama u reducirajućim uvjetima, ali se nalazi u kompleksu s RsrA. Međutim, tijekom disulfidnog stresa RsrA se inaktivira stvaranjem disulfidne veze i oslobađa σ^R za aktivaciju transkripcije ciljnih gena, uključujući trxBA te ostalih tiol-disulfidnih oksidoreduktaznih gena (Paget i Buttner, 2003).

Do sada je ustanovljeno da σ^R ima preko 100 ciljnih promotora iz različitih staničnih puteva, uključujući i kaskadu regulativnih puteva, što ga čini globalnim regulatorom. Osim gena uključenih u održavanje homeostaze tiola u proteinima i malim molekulama (mikotiolima) te kontrole kvalitete vlastitih proteina koji su u najvećoj mjeri pod utjecajem tiol-reaktivnih/oksidativnih stresnih čimbenika, ovaj sigma faktor inducira brojne gene za komponente vezane uz ribosome, transkripcijske regulatore (uključujući sigma faktore), popravak oštećenja DNA, brojne oksidoreduktaze, kofaktore metabolizma (koji uključuju nekoliko proteina/enzima koji sadrže Fe-S), te sintezu lipida. Također, σ^R direktno održava razinu proteina HrdB, glavnog sigma faktora (*engl. housekeeping*) povećavajući njegovu transkripciju tijekom oksidacijskog stresa. Osim toga povećava otpornost na UV, vjerojatno inducirajući transkripciju enzima uključenih u popravak DNA. Usporednim bioinformatičkih analiza modela σ^R promotora uočena je očuvanost jezgre σ^R regulona u brojnim aktinomycetima, također s najistaknutijom ulogom u održavanju tiol - redoks ravnoteže (Kim i sur., 2012).

Zanimljivo je da kod streptomiceta, za razliku od *E. coli*, odgovor na peroksidni stres odvojen od odgovora na disulfidni stres. Naime niti jedan od identificiranih σ^R ciljnih gena nije vezan uz peroksidni stres (Paget i sur., 2001), koji je reguliran putem OxyR, Fur, OhrR, te σ^B homologa. Stoga σ^R -RsrA sustav specifično sudjeluje u odgovoru na disulfidni stres što upućuje na to da disulfidni i peroksidni stres nisu uvijek prisutni u isto vrijeme (Paget i Buttner, 2003).

Tijekom razvoja streptomiceti prolaze kroz faze programirane stanične smrti. Programirana stanična smrt javlja se kod bakterija (kao i u eukariota) kao odgovor na biotički i abiotički stres. Kod streptomiceta PCD je popraćena sintezom regulatornih proteina, enzima uključenih u degradaciju staničnih makromolekula te proteina induciranih stresom. Povećana sinteza antioksidacijskih proteina sugerira da je oksidacijski stres bilo uzrok ili posljedica programirane stanične smrti (Manteca i sur., 2006). Na primjeru bakterije *Streptomyces natalensis* pokazano je da mutacije u genima koji kodiraju

za enzime uključene u odgovor na oksidacijski stres (alkilhidroperoksid reduktaze - *ahpCD*, katalaze - *katA1*, superoksid dismutaze - *sodF*) dovode do promjena u razini ROS unutar stanica bakterije što utječe na promjene u sekundarnom metabolizmu u tekućem mediju (Beites i sur., 2011). Osim toga mutacija u genu *katA1*, kao i u njegovom represoru *catR* rezultira defektom u formiranju zračnog micelija što predstavlja prvi dokaz o utjecaju oksidacijskog stresa na morfološku diferencijaciju streptomiceta (Beites i sur., 2015).

Temeljem navedenog, osim što su razvili učinkovite mehanizme uklanjanja ROS kako bi se zaštitili od njegovih štetnih posljedica, ROS mogu imati i višestruke funkcije u razvojnom programu mikroorganizama. Budući da ROS mogu biti signalne molekule koje djeluju na specifične signalne puteve (npr. kinaze ili transkripcijske faktore) ili mogu modificirati ostale signalne molekule, ROS imaju signalnu ulogu ili pojačavaju učinak u razvojnom procesu kolonija i biofilмова. U takvim slučajevima enzimi koji proizvode ROS su usko regulirani kao dio razvojnog programa a ROS djeluju kao pojačivači (efektori) nekih unutarnjih regulacija (Čáp i sur., 2012).

1.1.3 Regulacija segregacije kromosoma

Kod većine jednostaničnih bakterija segregacija kromosoma strogo je koordinirana sa staničnim ciklusom pa kromosomi segregiraju tijekom replikacije DNA, prije podijele stanice. Budući da kolonije streptomiceta tvore gustu mrežu razgranatih hifa koje rastu produžnim rastom na vrhu hife, te dioba stanice nije nužna za rast (McCormick 2009), streptomiceti predstavljaju izvrstan model za istraživanje procesa stanične diobe. Kod većine bakterija (osim kod bakterije *E. coli* i nekih γ -proteobakterija) učinkovita segregacija ovisi o aktivnosti proteina ParA i ParB. Oko mjesta za početak replikacije (*engl. origin of replication, ori C*) nalaze se mjesta vezanja proteina *parS* kojeg veže ParB tvoreći veliki nukleoproteinski kompleks. Ubrzo nakon inicijacije replikacije, ParB kompleksi segregiraju na specifičnu lokaciju u stanici temeljem interakcije s ATP-azom ParA (Gerdes i sur., 2010; Mierzejewska i Jagura-Burdzy, 2012). Kod većine jednostaničnih bakterija radi se o pomicanju spomenutog nukleoproteinskog kompleksa prema jednom ili prema oba pola stanice, dok se kod streptomiceta mehanizam segregacije kromosoma razlikuje između stadija sporulacije te vegetativnog rasta. U fazi sporulacije stanične diobe su praćene segregacijom kromosoma, pri čemu se stanice hifa s višestrukim kopijama kromosoma pretvaraju u lance spora sa samo jednom kopijom kromosoma. Međutim, tijekom vegetativnog rasta, hife ne prolaze klasičnu staničnu diobu te se višestruke kopije kromosoma ne repliciraju sinhronizirano i djeluju nepodijeljeno (Jakimowicz i Van Wezel, 2012; Wolánski i sur., 2011). Za razliku od sporulirajućih hifa kod kojih se ParA proteže kroz cijelu stanicu i

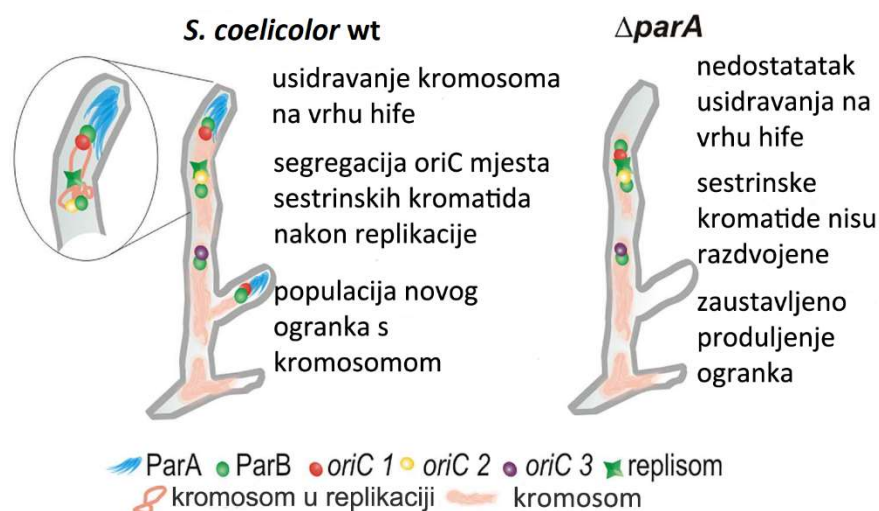
prati niz pravilno raspoređenih kompleksa ParB, u vegetativnim hifama ParA je isključivo vezan uz vrh hife. Osim toga što je važan segregacijski protein, ParA postaje sastavni dio organizacijskog centra koji kontrolira vršni rast hifa interakcijom s ranije spomenutim proteinom Scy. Vežući protein ParA, protein Scy regulira polimerizaciju ParA i time vjerojatno koordinira tranziciju produljenja hifa u fazu sporulacije (Jakimowicz i sur., 2007; Ditkowski i sur., 2013).

U radu Kois-Ostrowska i sur., 2016 prikazan je model kromosomskog usidranja (slika 1.8.) u kojem ParA stupa u interakciju s polarisomom i veže jedno od višestrukih mjesta *oriC* vezanih uz ParB. Ubrzo nakon početka replikacije kromosoma na vrhu hife, ParA „uhvati” mjesto *oriC* jedne sestrinske kromatide koja je bliže vrhu hife i zadržava konstantnu udaljenost od vrha. Druga kromatida se ne udaljava zajedno s vrhom hife već ostaje kao kalup za replikaciju udaljenu od vrha te kao populacija kromosoma u novonastalim granama micelija. ParA tako služi kao „sidro” na vrhu hife koje tijekom uspostavljanja novih ogranaka usmjerava jedan od kompleksa ParB-*oriC* iz odjeljaka s većim brojem kromosoma u novi ogranak.

1.1.4 Završna faza diferencijacije - sazrijevanje spora

Iako stanična dioba nije nužna za vegetativni rast streptomiceta (Flärdh i sur., 2012; McCormick i sur., 1994), ključna je u procesu sporulacije. U zračnom miceliju se odvija intenzivna replikacija DNA te vršni dijelovi zračnih hifa ispočetka tvore sincicij s desecima kopija genoma, a nakon završetka rasta zračnih hifa formiraju se septe koje će odijeliti vršni dio zračne hife u pojedinačne presporogene odjeljke koji sadrže samo po jednu kopiju kromosoma. Kolonije u tom trenutku imaju tipičan bijeli baršunasti izgled površine, a nakon što stanične stijenke odebljaju i u njih se odloži sivi pigment cijela kolonija tada poprima sivi izgled, a zrele spore mogu biti raspršene u okoliš. One omogućuju streptomicetima preživljenje nepovoljnih uvjeta te započinjanje novog životnog ciklusa (Hopwood, 2007; Jakimowicz i van Wezel, 2012). Prijelaz iz stadije zračne hife u lanac zrelih spora uključuje stoga sinhroniziranu podjelu septi popraćenu kondenzacijom i segregacijom više desetaka kromosoma u presporogene odjeljke hifa što zahtjeva visok stupanj stanične regulacije.

Sporulacija kod streptomiceta zahtjeva nekoliko mehanizama specifičnih samo za te bakterije, koji nisu pronađeni u ostalim skupinama bakterija, posebno u smislu regulacije. Važan set gena koji reguliraju sporulaciju su geni *whi* (skraćeno od engl. *white* - bijeli) koji su naziv dobili prema nedostatku pigmentacije mutiranih kolonija (Chater, 1972). Proteini Whi predstavljaju regulatore ranih stadija sporulacije a poznato je da kontroliraju i ekspresiju brojnih gena uključenih u sporulaciju poput *ftsZ*, *parAB*, *sigF*, *ssgAB* i dr. (Jakimowicz i van Wezel, 2012).



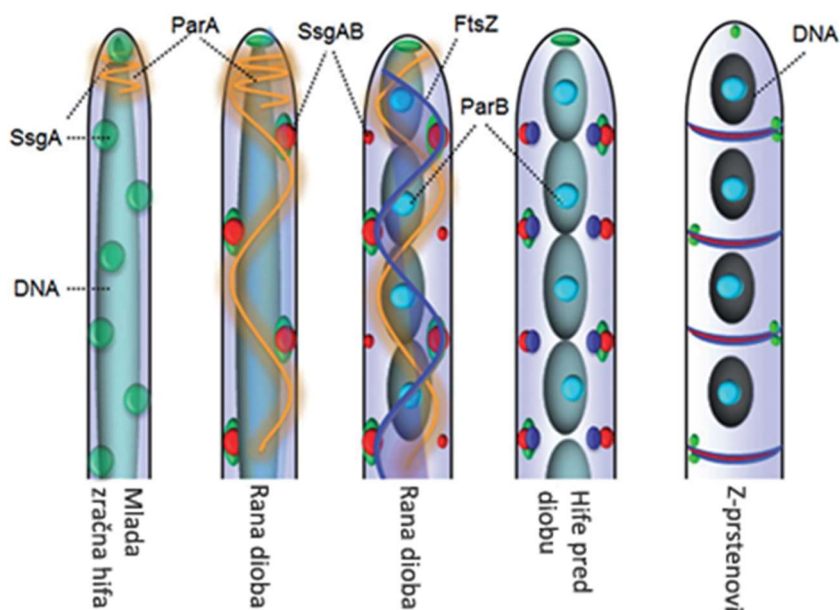
Slika 1.8 Model usidranja kompleksa *oriC*/ParB pomoću proteina ParA na vrhu hife koja se izdužuje. Tijekom replikacije protein ParA veže polarisom tako što „uhvati” *oriC* mjesto sestrinske kromatide koja je bliže vrhu te održava njezinu stalnu udaljenost od vrha hife. Replisom druge kromatide, zajedno s *oriC* mjestom zaostaje za vrhom koji se izdužuje. Također tijekom stvaranja novih ogranaka protein ParA usidri kompleks *oriC*/ParB koji se nalazi u blizini vrha nove hife i usmjerava ga u novu granu. Nedostatak proteina ParA ($\Delta parA$) onemogućuje usidranje kromosoma te dolazi do smanjene ekstenzije novih ogranaka zbog odgođenog naseljavanja ogranaka populacijom kromosoma. Prilagođeno prema Kois-Ostrowska i sur., 2016.

Slično kao kod ostalih bakterija, segregacija kromosoma kod streptomiceta uključuje proteine ParA i ParB. Homolozi proteina ParA su Walker A ATPaze koje tvore filamente i osiguravaju energiju za kretanje segregacijskog kompleksa ParB (Leonard i sur., 2005). Homolozi proteina ParB su proteini koji vežu DNA te tvore nukleoproteinske komplekse višeg reda oko mjesta *parS* (*engl. partitioning sites*) u blizini mjesta početka replikacije-*oriC*, a proteini ParA omogućuju ranije spomenuto usidranje kompleksa ParB-*oriC* na vrhu hife (Kois-Ostrowska i sur., 2016). Stoga proteini ParAB osiguravaju pravilno razdvajanje kromosoma u presporogene odjeljke zračnih hifa prije zatvaranja septi (Kim i sur., 2000). Kod bakterije *S. coelicolor* oba gena (*parA* i *parB*) sastavni su dio operona s dva promotora od kojih je *parABp₁* konstitutivni i važan u formiranju nukleoproteinskih kompleksa u vegetativnim hifama, dok je drugi promotor (*parABp₂*) snažno indukiran neposredno prije sporulacije te je nužan za učinkovitu segregaciju kromosoma u procesu formiranja spora. Ekspresija promotora *parABp₂*, pa tako i stvaranje ParB kompleksa u presporogenim odjeljcima zračnih hifa, u potpunosti je ovisna o aktivnosti regulatornih gena *whiA* i *whiB*, a djelomično i o *whiH* i *whiI*. Sva četiri regulatorna gena nužna su kako bi se pomoću ParB mogla odvijati pravilna kondenzacija i segregacija kromosoma (Jakimowicz i sur., 2006).

Identificiran je još jedan protein koji je interakcijski partner proteina ParA a to je ParJ. On negativno regulira polimerizaciju proteina ParA *in vitro* i važan je za učinkovitu segregaciju kromosoma tijekom sporulacije. Protein ParJ lokalizira u zračnim hifama čak i u nedostatku proteina ParA (Ditkowski i sur., 2010).

Kao i kod ostalih bakterija, stanična dioba streptomiceta predvođena je konzerviranim proteinom stanične diobe – FtsZ. Polimerizacijom u prstenaste citoskeletne strukture - Z-prstenove (*engl. Z-rings*) FtsZ osigurava potporu za konstrikciju stanice te predstavlja skelu za vezanje ostalih komponenti multiproteinskog kompleksa koji povezuje Z-prstenove sa sintezom peptidoglikana septe (McCormick i sur., 1994; Erickson i sur., 2010). Kod bakterija koje se dijele binarnom diobom formira se jedna septa u sredini stanice procesom kojim upravlja protein FtsZ (Bi i Lutkenhaus, 1991) dok se kod stanične diobe specifične za sporulaciju streptomiceta gotovo istovremeno formira stotine prstenastih struktura (Z rings) koji dijele zračnu hifu s višestrukim kopijama kromosoma u dugi lanac spora sa samo jednim nukleoidom (Schwedock i sur., 1997). Budući da se jednostanične bakterije mogu razmnožavati samo stvaranjem stanica kćeri, protein FtsZ nužan je za njihovo preživljenje. S druge strane, mutanti bakterije *S. coelicolor* kojima nedostaje gen *tfsZ* vijabilni su, iako ne postoje poprečne septe niti u jednom dijelu kolonije (McCormick sur., 1994). Mutacijom gena *ftsZ* ne zaustavlja se eksponencijalni produžni rast i grananje hifa, ali se ne mogu formirati spore. Također, primijećeno je da njihovi miceliji mogu biti fragmentirani bez da se sadržaj izlije iz stanica (Jakimowicz i Van Wezel, 2012). Novija istraživanja primjenom suvremene mikroskopije daju odgovor tome u postojanju prethodno spomenutih poprečnih membranskih struktura koje odvajaju odjeljke vegetativnih hifa. One su nepropusne za DNA, ali mogu biti propusne ili nepropusne za citosol. Osim toga na pojedinim mjestima poprečnih membrana formiraju se nove stijenke, a to omogućuje zaštitu DNA kako ne bi došlo do njezinog oštećenja prilikom stvaranje nove septe (Celler i sur., 2016; Yagüe i sur., 2016).

Budući da mnogi procesi uključeni u sazrijevanje spora zahtjevaju visok stupanj kontrole, postoje mehanizmi koji osiguravaju vremenski koordiniranu ekspresiju pojedinih proteina, pa tako i FtsZ koji je pod supresijom kompleksa BldD:ciklički di-GMP (Bush i sur., 2015). Osim kontrole vremenske ekspresije, vjerojatno aktivirano hidrolizom cikličkog di-GMP, mora postojati i mehanizam za pravilno pozicioniranje sporulacijske septe. Novija istraživanja potvrđuju da mali transmembranski protein SepG (smješten uz gen *divIVA* na genomu mnogih Gram-pozitivnih bakterija) ima važnu ulogu u određivanju mjesta na kojem će nastati septa tako što osigurava da se SsgB lokalizira na mjestu buduće septe vežući kompleks SsgB-FtsZ nakon čega SepG ne postaje dio proteina diobe (divisoma) već se relocira na periferiju (pre)spora, vjerojatno na mašineriju sinteze stanične stijenke (Zhang i sur., 2016).



Slika 1.9 Model kontrole stanične diobe streptomiceta tijekom sporulacije. U mladoj zračnoj hifi protein SsgA lokalizira dok su SsgB i FtsZ još difuzni. Protein ParA smješten je na vrhu hife. U fazi rane diobe SsgA i SsgB privremeno kolokaliziraju izmjenično na nasuprotnim stranama hife, dok se filamentozni protein ParA proteže kroz hifu. U prisutnosti proteina ParA nukleoproteinski kompleks ParB formira se na još nekondenziranoj molekuli DNA. Prije stanične diobe specifične za sporulaciju, protein FtsZ pojavljuje se kao dugačak spiralni filament kroz hifu koji kolokalizira s proteinom SsgB, a pred diobu protein SsgB veže FtsZ za membranu. U stadiju sporulacije formiraju se Z-prstenovi nakon čega slijedi kondenzacija i segregacija kromosoma te formiranje septi spora. Prilagođeno prema Jakimowicz i van Wezel, 2012.

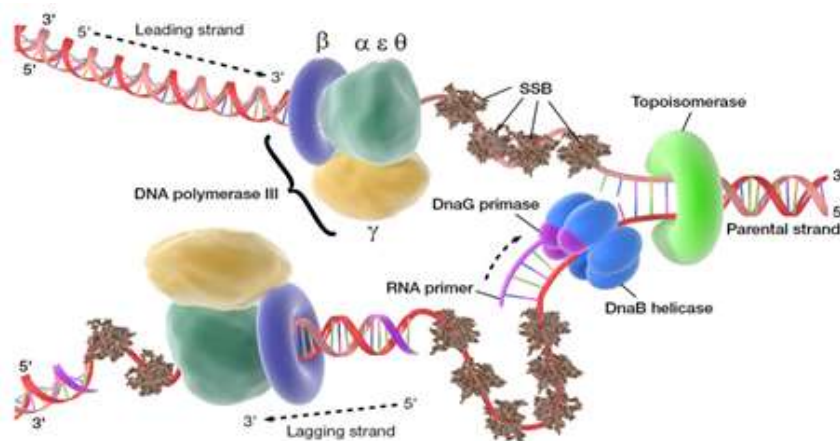
Protein SsgB dio je važne skupine proteina u morfogenezi i kontroli stanične diobe, specifične za streptomicete - skupina proteina SALP (*engl. SsgA-like proteins*). Pored njega, u aktivaciji formiranja septe u vegetativnim hifama bakterije *S. coelicolor* važnu ulogu ima i protein SsgA (van Wezel i sur., 2000; van Wezel i sur., 2006), koji također aktivira klijanje spore i staničnu diobu. Pomoću fluorescencijske mikroskopije pokazano je da protein SsgA lokalizira na mjesto remodeliranja stanične stijenke (slika 1.9.). Mutacija u genu *ssgA* izaziva pojačanu ekspresiju gotovo svih razvojnih gena uključujući *bld* i *whi*, te *divIVA* i brojne druge gene uključene u segregaciju kromosoma (Noens i sur., 2007). Protein SsgB je nužan za sporulaciju te lokalizira s ranije spomenutim proteinom FtsZ tijekom stanične diobe specifične za sporulaciju (Willemse i sur., 2011). Protein SsgB lokalizira tijekom rane faze rasta zračnog micelija dok su mjesta vezanja proteina FtsZ još difuzna (slika 1.9.) i to na vrlo sličan način neovisno da li se radi o divljem tipu ili mutantu kojem nedostaje gen *ftsZ* (Jakimowicz i Van Wezel, 2012).

Proteine koje je još značajno spomenuti a koji su uključeni u organizaciju i raspodijelu kromosoma tijekom sporulacije kod streptomiceta su proteini SMC i FtsK. Protein važan u održavanju strukture kromosoma, SMC (*engl. structural maintenance of chromosomes*), kojemu je funkcionalni homolog MukB u *E.coli*, veže se na DNA te sudjeluje u višim stupnjevima organizacije kromosoma (Kois i sur., 2009). Pored njega, protein FtsK pokretački je protein koji osigurava da svaka spora dobije kompletni kromosom prije zatvaranja septi. Stoga, mutanti kojima nedostaje gen *ftsK* često imaju nepravilan sadržaj DNA zbog velikih terminalnih delecija na jednom od krajeva kromosoma koji nisu bili dobro raspoređeni. Budući da mnoge spore ipak sadržavaju i intaktne kromosome, vjerojatno postoji još neki mehanizam koji doprinosi raspodijeli kromosoma (Wang i sur., 2007).

Budući da mutacije u svim spomenutim proteinima koji sudjeluju u složenom procesu segregacije kromosoma i formiranja septi tijekom sporulacije streptomiceta i dalje daju vijabilne spore, dodatni geni moraju biti identificirani kako bi se dobila kompletna slika procesa sporulacije streptomiceta.

1.2 Proteini SSB i njihova uloga u replikaciji DNA kod streptomiceta

Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju, za razliku od jednostaničnih bakterija kod kojih je replikacija kromosoma strogo vezana uz staničnu diobu, kod streptomiceta ta dva procesa nisu direktno povezana. U svakom odjeljku hife nalaze se višestruke kopije kromosoma i replikacija kromosoma se događa neovisno u svakom odjeljku vegetativne ili zračne hife, s time da je replikacijska aktivnost najviša u vršnim odjeljcima zračnog micelija (kod kojih će doći do formiranja spora). Vidljiva replikacijska mašinerija unutar pojedinog odjeljka je niža od broja kromosoma prisutnih u odjeljku što upućuje da taj proces nije sinkroniziran te da samo određeni kromosomi prolaze replikaciju u datom trenutku (D. A. Hopwood, 2007; Ruban-Ośmiałowska i sur., 2006).



Slika 1.10 Prikaz replikacijske viljuške u procesu replikacije DNA (prilagođeno prema www.pdbj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A3BEP).

Premda u mnogo čemu replikacija DNA kod streptomiceta nalikuje onoj kod ostalih prokariota, linearni kromosom zahtjeva posebne replikacijske mehanizme u odnosu na kružni kromosom, posebno u smislu zaštite slobodnih dvolančanih krajeva kromosoma kako ih endonukleaze ne bi razgradile (Voff i Altenbuchner, 2000). Kao i kod ostalih bakterija sinteza nove DNA se odvija na regiji nazvanoj početak replikacije (*engl. origin of replication, oriC*). Kod bakterije *E. coli* mjesto *oriC* se sastoji od tri A-T bogata oligomerna ponavljanja od 13 nukleotida te četiri ponavljanja od 9 nukleotida (Baker i Wickner, 1992), dok se kod streptomiceta sastoji od 19 kopija sekvenci od 9 parova baza (DnaA boxes) koje su odvojene nizom od 134 pb i nalaze se unutar 800 pb oko *oriC* mjesta, te predstavljaju produženo mjesto za početak sinteze gdje sjeda protein inicijator, DnaA (Jakimowicz i sur., 2000).

Odmatanje DNA na mjestu početka replikacije te sinteza novog lanca tvori replikacijsku viljušku. DNA polimeraza, zajedno s brojnim drugim proteinima koji sudjeluju u formiranju replikacijske viljuške, omogućuje sintezu i produljenje novog DNA lanca. Budući da DNA polimeraza može sintetizirati lanac u smjeru 5' - 3' (slika 1.10) replikacija se odvija kontinuirano u jednom smjeru i taj se novonastali lanac zove vodeći (*engl. leading strand*), dok se u suprotnom smjeru lanac sintetizira u Okazakijevim fragmentima i naziva se tromi lanac (*engl. lagging strand*).

Budući da DNA polimeraza može sintetizirati novi lanac samo na postojećem kalupu, nakon što se ukloni zadnja RNA početnica s tromog lanca ostaju viseći 3' krajevi vodećeg lanca koji zahtijevaju obradu kako se ne bi degradirali prilikom svake nove replikacije. Streptomiceti kao rješenje za taj univerzalni „problem“ krajeva kromosoma imaju terminalni protein (Tpg) koji je kovalentno vezan za 5' kraj kromosoma. Njegovo vezanje na DNA omogućava Tap (*engl. telomere-associated protein*) koji se veže na točno određeni nukleotidni slijed 3' visećeg kraja vodećeg lanca i to omogućuje DNA polimerazi početak sinteze Okazakijevih fragmenata s krajeva kromosoma bez potrebe dodavanja RNA početnice (Bao i Cohen, 2003).

Održavanje stabilnosti genoma ovisi o učinkovitom staničnom mehanizmu održavanja DNA. U ovom procesu jednu od ključnih uloga imaju proteini koji vežu jednolančanu DNA (*engl. single-stranded DNA binding proteins, SSBs*) te štite jednolančanu DNA od nastanka sekundarnih struktura koje bi ometale proteinsku mašineriju u procesima replikacije, rekombinacije i popravka. (Glassberg i sur., 1979; Shereda i sur., 2009). Proteini SSB prisutni su u svim domenama života i virusima te su neophodni su za preživljenje stanice (Szczepankowska i sur., 2011) Njihova glavna uloga sastoji se u zaštiti jednolančanih intermedijera DNA koji nastaju prilikom odmatanja dvolančane DNA (dDNA), a podložni su kemijskoj i nukleolitičkoj razgradnji koji mogu dovesti do lomova i oštećenja DNA. Proteini SSB vežu dDNA velikom afinitetom i neovisno o nukleotidnom slijedu te ju na taj način štite od razgradnje i formiranja sekundarnih struktura (slika 1.10) koje bi ometale funkciju ostalih proteina uključenih u metabolizam DNA (Shereda i sur., 2009).

Većina eubakterijskih proteina SSB sastoji se od dvije glavne domene: N-terminalne domene koja sadrži očuvani oligonukleotidni-oligosaharidni način smatanja (*engl. oligonucleotide-oligosaccharide fold, OB-fold*) koji veže dDNA, te C-terminalne domene (Ct) bogate glicinom i kiselim aminokiselinskim ostacima. Domena OB-fold koja veže dDNA strukturno je jednaka kod velikog broja proteina za koje je poznato da vežu oligonukleotide ili oligosaharide (Murzin, 1993). Iako ti proteini ne dijele homologiju u aminokiselinskom slijedu, isti način smatanja N-terminalne domene upućuje na to da imaju sličan način djelovanja. Veliki broj studija proteina SSB napravljene su na primjeru *E.coli* pa je

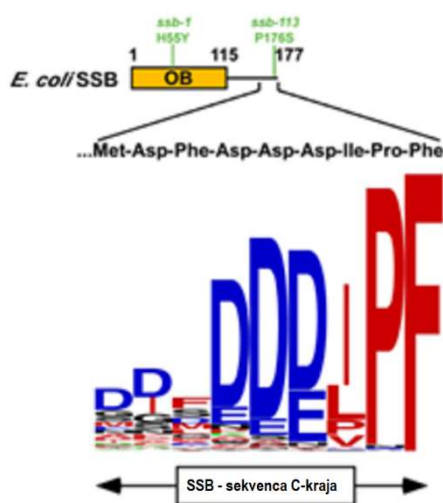
protein SSB_{Eco} postao prototipski model proučavanja interakcija jIDNA i proteina SSB (Shereda i sur., 2009). OB-fold se sastoji od antiparalelnih β -vrpca koje tvore bačvastu strukturu s definiranim rascjepom (slika 1.11) i veže jIDNA elektrostatskim interakcijama. Aktivna forma većine eubakterijskih proteina SSB nastaje oligomerizacijom u strukturu homotetramera pri čemu četiri OB-foldova smata jIDNA. Postoje rijetke iznimke u arhitekturi OB domena poput proteina SSB iz bakterije *Deinococcus radiodurans* (DraSSB) i *Thermus aquaticus* (taqSSB) kod kojih se dva monomera sklapaju u homodimere, ali budući da svaki monomer sadrži po dva OB-foldova, na kraju opet četiri OB-foldova vežu jIDNA (Bernstein i sur., 2004; Fedorov i sur., 2006). Kod ostalih sustava koji nisu bakterijski, kvartarna struktura proteina SSB dosta se razlikuje. Protein SSB kod eukariota, protein A (*engl. replication protein A*, RPA) ima strukturu heterotrimeru pri čemu se većina vezanja jIDNA odvija preko najveće podjedinice proteina. Njegova glavna uloga također je stabilizacija jIDNA intermedijera te interakcija s ostalim proteinima uključenim u procese replikacije, rekombinacije i popravka DNA. Stoga RPA ima i regulatornu ulogu jer te interakcije predstavljaju ključni korak u inicijaciji metabolizma DNA (Wold, 1997). Dodatne iznimke u kvartarnoj strukturi proteina SSB predstavljaju također monomeri te dimeri kod bakteriofaga i virusa (Shamoo i sur., 1995).

Zbog prisustva četiri OB - fold strukture u svakom tetrameru, proteini SSB_{Eco} mogu ostvariti interakciju s jIDNA na nekoliko načina. Postoje dva glavna modela vezanja DNA i proteina SSB. U (SSB)₃₅ načinu vezanja dvije podjedinice tetramera *E. coli* veže 35 nukleotida, dok u (SSB)₆₅ načinu vezanja sve četiri podjedinice sudjeluju u vezanju svih 65 nukleotida. Relativna stabilnost određenog načina vezanja ovisi o vsti i koncentraciji soli (Lohman i Overman, 1985; Bujalowski i Lohman, 1986) te omjeru proteina i DNA u reakcijskoj smjesi (Roy i sur., 2007). Način vezanja (SSB)₆₅ prisutan je pri koncentracijama NaCl > 200 mM, dok je pri koncentracijama NaCl < 20 mM i visokom omjeru proteina u odnosu na jIDNA, favoriziran (SSB)₃₅ način vezanja. U zadnjem slučaju eubakterijski protein SSB može vezati DNA na visoko kooperativan način, što dovodi do formiranja filamenata proteina SSB na dugačkoj jIDNA. Nije razjašnjeno da li različiti načini vezanja imaju uloge u *in vivo* funkciji proteina, ali pretpostavlja se da bi mogli biti korišteni u različitim procesima u stanici (Lohman i Ferrari 1994).

Ct regija proteina SSB obogaćena glicinima i prolinima te kiselim aminokiselinskim ostacima u heksapeptidnom motivu (D-D-D-I/L-P-F) važna je za interakciju s drugim proteinima (slika 1.11). Za razliku od sekvence bogate glicinima i prolinima, zadnjih 10 aminokiselina visoko su očuvane među prokariotskim proteinima SSB. Pokazano je da delecija Ct regije slabo utječe na vezanje nukleinskih kiselina *in vitro*, ali zato *in vivo* ova regija ima esencijalnu ulogu u funkciji proteina (Curth i sur., 1996). Dok delecija Ct proteina SSB_{Eco} ima letalan učinak na bakteriju *E. coli*, delecija C kraja proteina SSB kod

bakterije *B. subtilis* ima samo blagi učinak na rast iako je pokazan utjecaj na učinkovitost popravka oštećenja DNA te zaustavljanje replikacijske viljuške poremećajem u radu proteina replisoma.

Proteini SSB kod eubakterija stupaju u interakcije s preko desetak staničnih proteina, a većina interakcija odvija se preko C-terminalne regije. Ct proteina SSB_{Eco} sadrži sekvencu aminokiselina Asp-Phe-Asp-Asp-Asp-Ile-Pro-Phe (DFDDDIPF) koja je očuvana i među ostalim bakterijama (slika 1.12). Iako se često naziva kiseli rep, radi se o amfipatskom elementu budući da postoje tri hidrofobne aminokiseline na samom kraju sekvence (Shereda i sur. 2008).



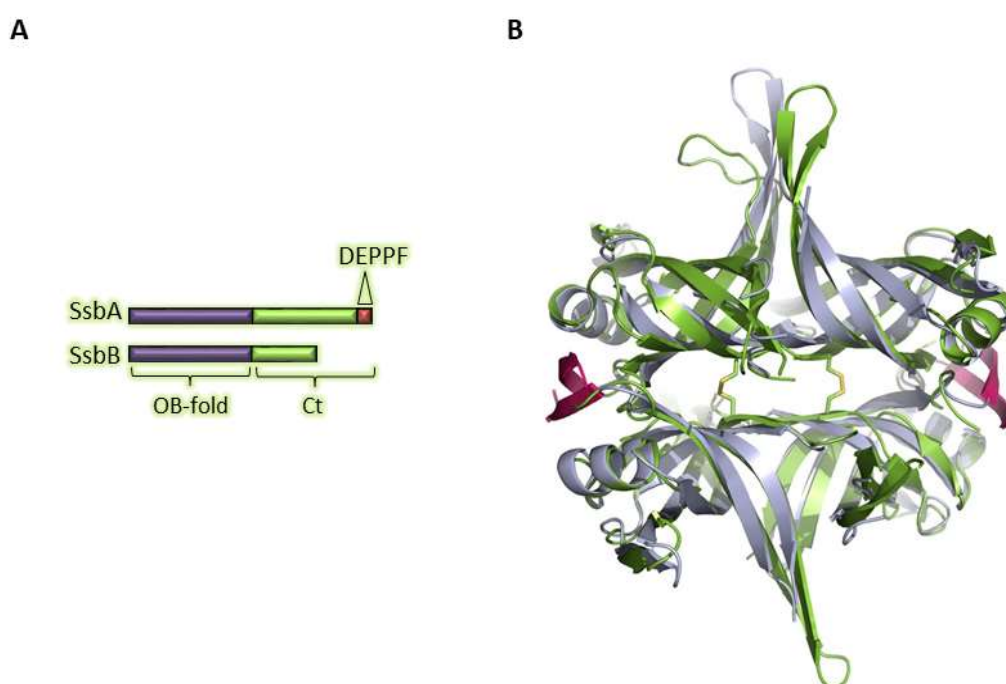
Slika 1.11. Sekvenca C-terminalnog dijela proteina SSB_{Eco} koja je očuvana kroz 280 bakterijskih vrsta. Visina prikazanog aminokiselinskog ostatka odgovara učestalosti na datoj poziciji. Hidrofobne aminokiseline prikazane su crvenom bojom, elektronegativne plavom, polarne crnom a elektropozitivne zelenom. Prilagođeno prema Shereda i sur. 2008.

Do sada istražene interakcije proteina SSB_{Eco} identificirale su proteine važne za sve aspekte metabolizma DNA uključujući replikaciju (DNA polimeraza III, primaza, topoizomeraza III), rekombinaciju (RecQ, RecO, RecJ, RecG), ponovni početak replikacije (PriA i PriB) te popravak DNA (egzonukleaza, uracil DNA glikozilaza, DNA polimeraza II, DNA polimeraza V) (Shereda i sur., 2008).

1.2.1 Paralogni proteini SSB kod bakterije *S. coelicolor*

Bakterija *S. coelicolor* u centralnoj regiji kromosoma sadrži dva paralogna gena koja kodiraju za protein SSB. Gotovo svi esencijalni geni koji su uključeni u procese stanične diobe, replikacije, transkripcije, translacije te proizvodnje važnih primarnih metabolita, locirani su u centralnoj regiji kromosoma. Iznimka su geni koji su dupllicirani (Bentley i sur., 2002) a u taj slučaj spadaju i paralogni proteini SSB bakterije *S. coelicolor*. Nema puno podataka o biološkim ulogama paralognih proteina kod drugih bakterija. Postoje podaci za paralogne proteine bakterije *B. subtilis* koji su pokazali esencijalnu ulogu jednog od proteina SSB, dok drugi sudjeluje u procesima rekombinacije vezane uz kompetenciju ove prirodno transformabilne bakterije, s time da je podijela rada između proteina SsbA i SsbB tijekom

genetičke rekombinacije objavljena tek kasnije (Lindner i sur., 2004; Yadav i sur., 2012). Osim toga, različita svojstva vezanja proteina SsbA i SsbB s jIDNA pokazane su i na bakteriji *Streptococcus pneumoniae*, također prirodno transformabilnoj bakteriji (Grove i sur., 2005). U radu Paradžik i sur. na temelju mutacijskih analiza objavljena je uloga paralognog proteina SsbB u segregaciji kromosoma u procesu morfološke diferencijacije tijekom sporulacije s obzirom da je utvrđen nedostatak DNA u gotovo 30 % spora, dok se učinak mutacije SsbA nije mogao analizirati budući da je esencijalan. Ekspresijske analize pokazale su produljenu ekspresiju oba gena u minimalnom mediju i pojačanu ekspresiju proteina SsbB u kasnijoj fazi rasta, što je u skladu s predloženom ulogom proteina SsbB u reproduktivnoj fazi rasta (Paradžik i sur., 2013).



Slika 1.12. A) Shematski prikaz proteina SsbA i SsbB iz bakterije *S. coelicolor*. Sličnost u sekvenci između dva paralogna proteina zadržana je uglavnom u domeni koja veže DNA (OB-fold), dok je Ct regija proteina SsbB reducirana na 50 a.k. bez C-kiselog kraja. B) 3D struktura proteina SsbA (sivo) i SsbB (zeleno) iz bakterije *S. coelicolor*. Disulfidni mostovi proteina SsbB prikazani su kao žuti štapići između dimernih podjedinica, dok su strukture stezaljki u proteinu SsbA naznačene ljubičastom bojom.

Proteini SSB bakterije *S. coelicolor* dijele 35% sličnosti u primarnoj sekvenci (slika 1.12. A), sačuvanoj uglavnom u prvih 110 aminokiselina na N-kraju u području OB-fold regije koje veže DNA. C-terminalna regija proteina SsbA sadrži 89 aminokiselina uključujući kiselu DEPPF sekvencu te >50% glicinskih ostataka koji osiguravaju fleksibilnost, neorganiziranost i sklonost reakcijama s ostalim proteinima ili OB-fold regijom (Stefanić i sur., 2009; Paradžik i sur., 2013). Premda kvartarna struktura proteina SsbA i SsbB dijele mnogo sličnosti (slika 1.12. B), vidljive su i jedinstvene varijacije u građi.

Mehanizam „stezaljke“ (*engl. clamp mechanism*) prisutan u proteinu SsbA, nije očuvan u proteinu SsbB. Očuvana sekvenca ATAKVTK u mehanizmu stezaljke vjerojatno doprinosi stabilnosti SsbA homotetramera, bitnoj za bakterije bogatog GC sastava (Stefanić i sur., 2009)). U proteinu SsbB ova je struktura funkcionalno zamijenjena s dva disulfidna mosta između dvije dimerne podjedinice koji održavaju stabilnost kvartarne strukture (slika 1,12, B).

1.2.2 Uloga S-S mostova u stabilnosti proteina tijekom oksidacijskog stresa

Kristalna struktura proteina SsbB pokazala je jedinstveno svojstvo proteina SsbB u bakteriji *S. coelicolor* kod kojeg dolazi do formiranja dva intermolekularna disulfidna mosta između cisteina na poziciji 7 u monomeru. To je prva struktura proteina SSB u kojoj je objavljeno da disulfidni mostovi sudjeluju u formiranju oligomera (Paradžik i sur., 2013). Protein PriB, multienzimski kompleks nužan za inicijaciju replikacije kod *E. coli* (Liu i sur., 2004) također pokazuje prisutnost disulfidnih mostova među podjedinicama, međutim zanimljivo je da je protein PriB vjerojatno evoluirao iz proteina SSB Proteobakterija (Ponomarev i sur., 2003). Kao što je ranije spomenuto, razvojni program streptomiceta povezan je s okolišnim stresnim uvjetima (kao npr. nedostatkom nutrijenata) a to je obično popraćeno i oksidacijskim stresom u bakterija, a poznato je da oksidacijski stres potiče oksidaciju tiolnih skupina odnosno stvaranje disulfidnih mostova (Beites i sur. 2015; Gunasekera i sur., 2008; Khakimova i sur. 2013; Rodríguez-García i sur. 2007).

Nedavno istraživanje (Touma i sur., 2017) strukture humanog proteina SSB 1 (hSSB1) pokazalo je formiranje stabilnih oligomera hSSB1 u oksidirajućim uvjetima koje je omogućeno formiranjem dva disulfidna mosta te hidrofilnim i hidrofobnim aminokiselinskim ostacima koji sudjeluju u formiranju tetramera hSSB1 prilikom oksidacijskog stresa u stanici. Osim već poznate uloge hSSB1 u popravku dvolančanih lomova DNA kao sastavni dio kompleksa hSSB1/NABP2/OBFC2B, u kojima protein hSSB1 sudjeluje kao monomer, pokazano je da je protein hSSB1 ključan i u ekscizijskom popravku baza (*engl. base excision repair, BER*) u kojem sudjeluje kao tetramer. BER mehanizam popravka nastupa nakon oksidacijskog oštećenja DNA i u tom procesu ključno je formiranje stabilnih oligomera hSSB1 u oksidirajućim uvjetima za njegovu pravilnu funkciju uklanjanja oksidativnih lezija DNA (Paquet i sur., 2016). Tetramer hSSB1 strukturno je sličan proteinu SSB *E. coli* a stabilizacija strukture postignuta je nizom nabijenih i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka uz dva površinski izložena cisteina (C81 i C99) koji najvjerojatnije tvore intermolekularne S-S mostove (Touma i sur., 2017). Protein hSSB1 sadrži u svojoj primarnoj strukturi još jedan cistein (C 41) koji je uložen duboko u hidrofobnu jezgru proteina te stoga ne može tvoriti intermolekularne disulfidne veze, ali ipak ima

važnu ulogu u procesu oligomerizacije hSSB1 (Paquet i sur., 2016) jer djeluje kao senzor oksidativnog statusa čime utječe na strukturu proteina (Touma i sur., 2017).

Temeljem naših dosadašnjih podataka kao i dostupnih literaturnih podataka, mogu se postaviti slijedeće hipoteze:

Zbog mogućih stvaranja disulfidnih mostova, biološka uloga proteina SsbB ovisna je o prisustvu cisteina na poziciji 7. Formiranje S-S mostova dešava se tijekom oksidacijskog stresa u hifama bakterije *S. coelicolor* pri čemu se najvjerojatnije povećava stabilnost homotetramera. Ciljanom mutacijom cisteinskih ostataka proteina SsbB onemogućiti će se ostvarivanje S-S mostova što bi moglo promijeniti afinitet vezanja proteina SsbB za jDNA, te tako utjecati na učinkovitost biološke funkcije ovog proteina tijekom sporulacije.

Segregacija kromosoma u sporogene odjeljke pod kontrolom je niza identificiranih proteina, poput izuzetno važnih proteina SMC i ParB. Barem neki od proteina koji imaju važnu ulogu u citokinezi ostvaruju i interakcije s proteinom SsbB. Uvođenjem višestrukih mutacija, koje uključuju ključne gene *ssbB*, *smc* i *parB*, uzrokovat će u bakteriji *S. coelicolor* dodatne promjene staničnih mehanizama koji su odgovorni za preciznu kromosomsku segregaciju i učinkovito sazrijevanja spora.

Kontrolu procesa segregacije kromosoma tijekom sporulacije protein SsbB ostvaruje putem interakcije s većim brojem proteina pri čemu je C-kraj proteina važan za ostvarivanje proteinskih interakcija. Pretraživanjem biblioteke gena *S. coelicolor* identificirati će se dodatni protein/i koji s proteinom SsbB ostvaruju do sada nepoznate interakcije tijekom reproduktivne faze rasta.

1.3 Ciljevi istraživanja

- Glavni cilj ove disertacije je istražiti biološku ulogu i strukturne karakteristike proteina SsbB te pojasniti stanični mehanizam u kojem sudjeluje ovaj protein, a koji je važan za razdvajanje bakterijskog kromosoma u presporogene odjeljke tijekom reproduktivne faze rasta bakterije *S. coelicolor*.
- Ciljanom mutacijom cisteinskih ostataka proteina SsbB ispitati važnost disulfidnih veza na stabilnost homotetramera proteina SsbB te istražiti ima li formiranje disulfidnih veza utjecja na pravilnu funkciju proteina SsbB.
- Metodom REDIRECT deletirati gen *ssbB* u mutantima bakterije *S. coelicolor* kojima nedostaju geni za pravilnu segregaciju kromosoma (*smc*, *parB*) te u tako dobivenim dvostrukim i trostrukim mutantima ispitati učinak ovih mutacija na segregaciju kromosoma.
- Pretraživanjem postojeće biblioteke gena bakterije *S. coelicolor* bakterijskim sustavom dvaju hibrida (BACTH) identificirati proteine koji ostvaruju interakcije s proteinom SsbB kako bi se dobio bolji uvid u stanične procese u kojima sudjeluje paralogni protein SsbB.
- Za odabrane interaktante istražiti važnost C-kraja proteina SsbB u ostvarivanju interakcija.

2 Materijali i metode

2.1 Materijali

2.1.1 Kemikalije

Kemikalije korištene za eksperimentalni dio ovoga rada nabavljene su većinom od tvrtki Sigma-Aldrich i Kemika. Sastav otopina i reagensa navedeni su u tablici 2.1. Vrsta i naziv molekularnih biljega prikazani su u tablici 2.2. Korišteni enzimi popisani su u tablici 2.3, a komercijalni kompleti u tablici 2.4.

Tablica 2.1. Otopine

Otopine	Sastav
TAE pufer za agaroznu elektroforezu	242 g TRIS, 57,1 ml ledene octane kiseline, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)
Boja za nanošenje DNA (6xSB, engl. sample buffer)	0.25% brom-fenol plavo, 0.25% ksilen - cijanol FF, 30% glicerol
Pufer za metodu EMSA	40 mM TRIS-acetat (pH 7,5), 12 mM MgCl ₂ , 0,1 M NaCl
Pufer za nanošenje DNA u agarozni gel u metodi EMSA	40 mM TRIS-acetat, 50% glicerol
Na-fosfatni pufer (EMSA, spektrometrijske i kalorimetrijske analize te imunološke reakcije)	50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaCl, pH 7,0
Pufer A (proteinski pufer za lizu stanica)	50 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 10% glicerol
Pufer B (pufer za ispiranje)	Pufer A + 30 mM imidazol
Pufer C (pufer za eluciju)	Pufer A + 300 mM imidazol
Pufer za SDS-PAGE (10x)	30,3 g L ⁻¹ TRIS, 144 g L ⁻¹ glicin, 10 g L ⁻¹ SDS
Boja za proteine (4xSB; engl. sample buffer)	200 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 400 mM DTT, 8% SDS, 0,04% brom-fenol plavo, 40% glicerol
Pufer za transfer	25 mM TRIS-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol
TBST 1 x	50 mM TRIS (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20
PBS 1 x	8 g L ⁻¹ NaCl, 0,2 g L ⁻¹ KCl, 1,44 g L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , (pH 7,4)
Puferi za pripremu i transformaciju protoplasta	(Vujaklija i Bielen, 2007)
Puferi za izolaciju genomske DNA iz streptomiceta	(Kieser i sur., 2000)
Puferi za izolaciju kozmidne DNA iz streptomiceta	(Gust i sur., 2004)

Tablica 2.2. Molekularni biljezi

Naziv	Originalan naziv	Proizvođač
DNA biljeg za određivanje koncentracije i veličine DNA odsječaka	MassRuler DNA Ladder, Mix	Fermentas
DNA biljeg za određivanje veličine DNA odsječaka	Wide-Range DNA Ladder (50-10,000 bp)	TaKaRa
Proteinski biljeg za određivanje mase proteina	Precision Plus Protein Standard Unstained	BioRad
Obojani proteinski biljeg za određivanje mase proteina	Precision Plus Protein Standard: Prestained Dual Colour	BioRad

Tablica 2.3. Enzimi

Enzimi	Proizvođač
Restriksijski enzimi: BamHI, EcoRI, HindIII, SpeI, EcoRV, PstI, XbaI, KpnI	Fermentas
Klenow enzim (engl. Klenow enzyme)	Roche
T4 DNA ligaza (engl. T4 DNA ligase)	Fermentas
Lizozim (engl. Lysozyme)	Sigma
RNAzaA (engl. RNase A)	Sigma
DNaza (engl. DNase I)	Promega
Alkalna fosfataza iz račića (engl. Alkaline Phosphatase, shrimp)	Roche

Tablica 2.4. Komercijalni kompleti

Naziv kompleta	Namjena	Proizvođač
QIAquick® PCR Purification Kit	Pročišćavanje odsječaka DNA do 10 kb	Quiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Pročišćavanje plazmidne DNA	Quiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Pročišćavanje DNA iz agaroznog gela	Quiagen
Quick Start Bradford Protein Assay Kit	Određivanje koncentracije proteina	Biorad
SlowFade® Antifade Kit	Produljena fluorescencija	Invitrogen
Broad pI Kit, pH 3–10	Komplet za izoelektrično fokusiranje	GE Healthcare
ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent kit	Detekcija proteina imobiliziranih na membrani	GE Healthcare

Vektori koji su korišteni za kloniranje navedeni su u tablici 2.5 dok se popis korištenih početnica za sintezu DNA nalazi u tablici 2.6.

Tablica 2.5. Plazmidi i kozmidi

Vektor	Opis	Izvor
pQE-30	Ekspresijski vektor za <i>E.coli</i> , <i>Amp</i> ^R	Qiagen
pETDuet-1	Ekspresijski vektor za <i>E.coli</i> , <i>Amp</i> ^R	Novagen
pGEM-T	Vektor za kloniranje u <i>E.coli</i> , <i>Amp</i> ^R	Promega
pKT25 pKNT25 pUT18 pUT18C	Ekspresija T25 katalitičke podjedinice CyaA na N kraju proteina, <i>Kan</i> ^R Ekspresija T25 katalitičke podjedinice CyaA na C kraju proteina, <i>Kan</i> ^R Ekspresija T18 katalitičke podjedinice CyaA na N kraju proteina, <i>Amp</i> ^R Ekspresija T18 katalitičke podjedinice CyaA na C kraju proteina, <i>Amp</i> ^R	(Euromedex, 2006) (ljubaznošću prof. Jakimowicz, D., University of Wrocław)
pT25	Vektor koji sadrži biblioteku bakterije <i>S. coelicolor</i> , <i>Cm</i> ^R	Ljubaznošću Prof. Nodwell, J.R., McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada;
pIJ10700	Plazmid korišten kao kalup za Hyg rezistencijsku kazetu P1-FRT-oriT-Hyg-FRT-P2	(Gust i sur., 2004) Ljubaznošću prof. Jakimowicz, D., University of Wrocław, Poland
pGEM-ssbB	Konstrukt korišten za kloniranje gena <i>ssbB</i> , <i>Amp</i> ^R	(Paradžik i sur., 2013)
pGEM-pssbB	Konstrukt korišten za kloniranje gena <i>ssbB</i> s promotorskom regijom, <i>Amp</i> ^R	(Paradžik i sur., 2013)
pQE-ssbB	Konstrukt korišten za prekomjernu ekspresiju gena <i>ssbB</i> , <i>Amp</i> ^R	(Mijaković i sur., 2006)
C607.1.c02.EZR1.seq.	Kozmid s transpozonom Tn5062 u genu <i>ssbB</i> bakterije <i>S. coelicolor</i> na poziciji 109 od start kodona (pozicija na genomu: 2916741 – 2949123) <i>Neo</i> ^R , <i>Amp</i> ^R , <i>Apr</i> ^R	(Fernández-Martínez i sur. 2011) http://strepdb.streptomyces.org.uk/
pDevA	Plazmid za prekomjernu ekspresiju DevA, 6xHis na C-kraju, <i>Amp</i> ^R	Ljubaznošću Hoskisson, P. Strathclyde Institute of Pharmacy i Biomedical Sciences, Glasgow, UK
pUCdevAups	Plazmid za umnažanje uzvodne regije <i>devA</i> gena	Ljubaznošću Hoskisson, P. Strathclyde Institute of Pharmacy i Biomedical Sciences, Glasgow, UK
6CO7::Hyg	6CO7Δ <i>ssbB</i> , <i>Neo</i> ^R , <i>Amp</i> ^R , <i>Hyg</i> ^R	ovaj rad
pMS82b	Integrativni vektor za streptomicete, ΦBT1 <i>attP</i> -int, <i>Hyg</i> ^R	(Gregory i sur., 2003)
pANT849	Ekspresijski vektor za streptomicete, <i>Thio</i> ^R	(DeSanti i Strohl, 2003)
pANT-ssbB	Izolacija His-obilježenog proteina <i>SsbB</i> proteina iz <i>S. coelicolor</i> , <i>Thio</i> ^R	ovaj rad
pMS-pssbBCys ₇ Ala	Integrativni vektor pMS82b koji sadrži gen <i>ssbB</i> (mutiran u aminokiselini Cys) i njegovu promotorsku regiju, ΦBT1 <i>attP</i> -int, <i>Hyg</i> ^R	ovaj rad
pMS-pssbBCys ₇ Ser	Integrativni vektor pMS82b koji sadrži gen <i>ssbB</i> (mutiran u aminokiselini Cys) i njegovu promotorsku regiju, ΦBT1 <i>attP</i> -int, <i>Hyg</i> ^R	ovaj rad

Tablica 2.6. Početnice

Početnica	Oligoukleotidni slijed 5'-3'	Namjena
T7f pUCM13f pUCM13r pQEprom pT25fw	TAATACGACTCACTATAGGG, GTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC CCCGAAAAGTGCCACCTG GATTACCTGGCGGCACG	Kloniranje i Sekvenciranje.
SSBBFc.o.2 SSBBc.o..P2R	CCCGTGGGGAGGGAGGACTCGCGATGAACGAGACGATGATTCCGGGG ATCCGTCGACC GACAAATCCATCCCGTTCGTCGCCCGGGGTTGGCCTCATGTAGGCTGGA GCTGCTTC	Amplifikacija kazete (FRT- <i>oriT-Hyg-FRT</i>) iz pIJ10700 za disrupciju gena <i>ssbB</i> .
oligo70	GCGGATCCAGCAGCAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGAGCTTG ACTTTGTCATCGTCGCTTG	Oligonukleotid za eksperimente kapljične analize
HygseqF HygseqR prijeSSBB izaSSBB	GGGATCGTCGACTTCACC CGGCATCAGTTACCGTGAG GGGACAGACCCGTGCGG ATCGACAAATCCATCCCG	Provjera ugađnje rezistencijske kazete unutar gena <i>ssbB</i> .
pEcoRIssbbF pBamHIssbbR	CCTGAATTCGCTGCCACCCGTGCGGGTGC CTGGGATCCTCTCCTCCCTCCCGCACGGGTC	Kloniranje promotora gena <i>ssbB</i> (za kloniranje u pMS82).
SSBBSerF SSBBSerR SSBBAlaF SSBBAlaR	GAACGAGACGATGATCTCCGCGGTGGGGAACGTG CACGTTCCCCACCGCGGAGATCATCGTCTCGTTC GAACGAGACGATGATCGCCGCGGTGGGGAACGTG CACGTTCCCCACCGCGGCGATCATCGTCTCGTTC	Unos ciljane mutacije u genu <i>ssbB</i> .
XbaIssbB ssbBKpnI ssbB-cKpnI	CGTCTAGAGATGAACGAGACGATGATC CGGGTACCCTCCACCGGACGGG CGGGTACCCCTGGCGGTGCGCCG	Kloniranje gena <i>ssbB</i> u ekspresijske vektore za CyaA katalitičke podjedinice.
SCO4848F SCO4848R SCO4848int	GTCTCCTGGTTCCTGCTCG, CGGCGCAGTGCGCGCACGC GCGACATGCCTAGATCTTGG	Integracija unutar attP mjestu na kromosomu <i>S.coelicolor</i> .

EcoRI, BamHI, KpnI, XbaI, crvenim slovima označeni su promijenjeni nukleotidi u mutagenim početnicama koji zamjenjuju aminokiselinu Cys u Ala i Ser.

2.1.2 Mikroorganizmi

Sojevi bakterija korištenih u izradi ove doktorske disertacije navedeni su u tablici 2.7.

Tablica 2.7. Bakterijski sojevi

Soj	Genotip	Izvor
<i>E. coli</i> XL1	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	New England Biolabs
<i>E. coli</i> NM522	supE, thi, Δ(lac-proAB), hsd5 (r ⁻ , m ⁻), [F', proAB, lacI ^q ΔM15]	New England Biolabs
<i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 ⁺ (DE3) pLysS	Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+ lacI q pro] trxB pLysSRARE23 (CamR, StrR)	Merck
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	dam13::Tn9(Chl ^R) dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-201::Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtlI glnV44, pUZ8002(Kan ^R)	(MacNeil i sur., 1992)
<i>E. coli</i> BW25113(pIJ790)	ΔaraBAD, ΔrhaBAD, pIJ790 -λRED (gam, bet, exo), cat, araC, rep101 ^{ts}	(Gust i sur., 2003)
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁻ , cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str _r), hsdR2, mcrA1, mcrB1	(Euromedex, 2006;) ljubaznošću prof. Jakimowicz, D., University of Wrocław, Poland
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻	(Kieser, 2000)
TSB01	M145 ssbB::Tn5062, Apra ^R	(Paradzik i sur., 2013)
<i>S. coelicolor</i> TSB06	M145 ssbB::Tn5062/ssbB ⁺ , Apra ^R , pMS82 ssbB ⁺ Cys ₇ Ala at ΦBT1 attP site, Hyg ^R	ovaj rad
<i>S. coelicolor</i> TSB07	M145 ssbB::Tn5062/ssbB ⁺ , Apra ^R , pMS82 ssbB ⁺ Cys ₇ Ser at ΦBT1 attP site, Hyg ^R	ovaj rad
<i>S. coelicolor</i> J3305	M145 ΔparB::scar	(Kois i sur., 2009) ljubaznišću prof. Jakimowicz, D., University of Wrocław, Poland
<i>S. coelicolor</i> ΔparBΔssbB	M145 ΔparB::scar, ΔssbB::Hyg ^R	ovaj rad
<i>S. coelicolor</i> Δsmc	M145 Δsmc::scar	ljubaznišću prof. Jakimowicz, D., University of Wrocław, Poland
<i>S. coelicolor</i> ΔsmcBΔssbB	M145 Δsmc::scar, ΔssbB::Hyg ^R	ovaj rad
<i>S. coelicolor</i> ΔparBΔsmc	M145 ΔparBΔsmc::Apra ^R	(Kois i sur., 2009) ljubaznišću prof. Jakimowicz, D., University of Wrocław, Poland
<i>S. coelicolor</i> ΔparBΔsmcΔssbB	M145 ΔparBΔsmc::Apra ^R , ΔssbB::Hyg ^R	ovaj rad
<i>S. coelicolor</i> J3102	M600 (SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻) devA::Tn5062,	(Hoskisson i sur., 2006) ljubaznošću prof. P.A.Hoskisson, John Innes Center, Norwich, UK
<i>S. coelicolor</i> ΔdevAΔssbB	M600 (SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻) devA::Tn4560::Vio ^R , ΔssbB::Hyg ^R	ovaj rad

2.1.3 Uzgoj mikroorganizama

Pri uzgoju bakterijskih sojeva *E. coli* korištene su standardne tehnike uzgoja u krutoj i tekućoj Luria-Bertani (LB) hranjivoj podlozi (Sambrook i sur., 1989). Sojevi *E. coli* NM522, ET12567 i XL 1-Blue, uzgajani su pri 37°C, dok su sojevi BW25113 (pIJ790) i BTH101 inkubirani pri temperaturi od 30°C. Hranjivoj LB podlozi dodan je prema potrebi antibiotik u slijedećim koncentracijama: 100 µg mL⁻¹ ampicilin, 50 µg mL⁻¹ kanamicin, 25 µg mL⁻¹ kloramfenikol te 50 µg mL⁻¹ higromicin. U eksperimentima bakterijskog sustava dvaju hibrida (poglavlje 2.2.9) u pripremi standardnog LB medija korištena je dvostruka koncentracija NaCl-a te su u podlogu dodane otopine 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid (X-gal; konačne koncentracije 20 µg/mL) i izopropil-beta-D-tiogalaktozid (IPTG; konačne koncentracije 0,5 mM).

Tablica 2.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterije *S. coelicolor*

Naziv hranjive podloge	Vrsta podloge	Referenca	Namjena
CRM (Complete regeneration medium)	bogata hranjiva podloga/tekuća	(Pigac i Schrempf, 1995)	izolacija plazmidne DNA i priprema inokuluma
MS (Mannitol soya flour)	sporo razgradivi izvor ugljika/kruta	(Kieser, 2000)	rast i sporulacija
MM (Minimal medium)	minimalna podloga/tekuća ili kruta	(Kieser, 2000)	sporulacija, proizvodnja sekundarnih metabolite
R5 (Regeneration medium)	regenerirajuća hranjiva podloga /kruta	(Kieser, 2000)	regeneracija protoplasta
TSB (Tryptic soy broth)	bogata hranjiva podloga /kruta	Difco™	brzi nesporulirajući rast

Bakterija *S. coelicolor* M145 uzgajana je pri 30°C na različitim podlogama, ovisno o namjeni, opisanim u tablici 2.8. Antibiotici su prema potrebi dodani u slijedećim koncentracijama: 50 µg mL⁻¹ apramicin, 50 µg mL⁻¹ kanamicin, 25 µg mL⁻¹ nalidiksična kiselina te 50 µg mL⁻¹ higromicin. Kod uzgoja u tekućoj hranjivoj podlozi bakterije su uzgajane u tresilici uz odgovarajuću temperaturu i 250 okretaja u minuti.

2.2 Metode

2.2.1 Pročišćavanje DNA

Plazmidna DNA izdvojena je iz bakterije *E. coli* pomoću kompleta QIAprep Spin Miniprep Kit (tablica 2.4) prema uputama proizvođača. DNA iz agaroznog gela ili otopine izdvojena je također pomoću odgovarajućih kompleta navedenih u tablici 2.4. Genomska DNA iz bakterije *S. coelicolor* izdvojena je metodom opisanom u radu (Kieser, 2000), dok je kozmidna DNA iz streptomiceta izdvojena metodom alkalne lize nakon čega slijedi ekstrakcija pomoću fenol/kloroforma (Gust i sur., 2004).

2.2.2 Kloniranje

Genetički konstrukti pripremljeni su postupcima kloniranja prema standardnim molekularno-biološkim tehnikama opisanim u (Sambrook i sur., 1989). Prvi korak podrazumijeva dobivanje željenog produkta dDNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR) nakon čega se produkt pročisti pomoću odgovarajućeg komercijalnog kompleta (tablica 2.4) a krajevi PCR produkta se razgrađuju restrikcijskim enzimima (tablica 2.3). Takav obrađeni odsječak DNA će se uklopiti u odgovarajući vektor (tablica 2.5). Istovremeno se Vektor odabran za kloniranje također razgrađuje istim restrikcijskim enzimima, zatim se odsječci DNA odvajaju u agaroznom gelu kako bi se izdvojio samo odsječak DNA željene veličine pomoću kompleta za ekstrakciju iz agaroznog gela (tablica 2.4). Ta se dva odsječka (vektor i insert) ligiraju pomoću enzima ligaza (poglavlje 2.2.5) nakon čega slijedi transformacija kompetentnih bakterijskih stanica (poglavlje 2.2.7) i probir kolonija s ugrađenim željenim insertom na selektivnim hranjivim podlogama. Pomoću PCR reakcije na bakterijskim kolonijama (poglavlje 2.2.3) potvrđuje se mjesto ugradnje inserta i njegova očekivana veličina, a iz pozitivnih kolonija izdvaja se plazmidna DNA te se nukleotidni slijed potvrđuje komercijalnim sekvenciranjem (u DNA servisu, IRB, Zagreb ili Macrogen, Inc.).

2.2.3 Lančana reakcija polimerazom PCR

Lančane reakcije polimerazom ili reakcije PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) koje omogućavaju umnožavanje ciljanih odsječaka DNA pripremljene su prema uputama proizvođača pojedine polimeraze. Volumeni reakcijskih smjesa prilagođeni su potrebama eksperimenata, od 12,5 µL za PCR reakcije na kolonijama, do 50 µL u svrhu dobivanja veće količine odsječka DNA za kloniranje.

Sastojci različitih PCR reakcijskih smjesa te njihova primjena u sklopu ovog rada navedeni su u tablici 2.9. Ukoliko nije drugačije navedeno, uvjeti PCR reakcije provedeni su prema uputama proizvođača, uključujući koncentraciju početnica i vrijeme denaturacije. Vrijeme produljivanja lanaca prilagođeno je očekivanoj duljini PCR produkta, a temperatura sparivanja početnica s jDNA kalupom (T_{ann} - engl. *annealing temperature*) prilagođeno je svakom paru početnica ovisno o njihovoj duljini i GC sastavu. Ukoliko se T_{ann} početnica u reakciji razlikovala, korištena je temperatura početnice s nižom T_{ann} . Količina DNA kalupa u PCR reakcijama u pravilu je iznosila <20 ng/ μ l. Standardni broj ciklusa bio je 30, osim u slučaju C (navedenom niže u tekstu) kada je broj ciklusa povećan na 35. Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 1% agaroznom gelu, a prema potrebi pročišćeni iz gela pomoću komercijalnog kompleta za pročišćavanje odsječaka DNA (tablica 2.4). U nastavku su navedeni uvjeti PCR reakcijskih smjesa u ovisnosti o njihovoj namjeni:

- A) U PCR reakciji za kloniranje korištena je LA Taq[®] (tablica 2.9, A) optimizirana za umnažanje duljih odsječaka DNA. Ova je polimeraza korištena za umnažanje čitavih gena i za umnažanje gena za rezistenciju na antibiotike (tzv. rezistencijske kazete) za potrebe mutacije gena u streptomicetima (poglavlje 2.2.8). Uvjeti PCR reakcije u tom slučaju prilagođeni su prema protokolu (Gust i sur. 2004):

Denaturacija	94°C, 2 min	
Denaturacija	94°C, 45 sek	} 10 ciklusa
Sparivanje početnica	50°C, 45 sek	
Produljivanje lanaca	72°C, 90 sek	
Denaturacija	94°C, 45 sek	} 15 ciklusa
Sparivanje početnica	55°C, 45 sek	
Produljivanje lanaca	72°C, 90 sek	
Završno produljivanje lanaca	72°C, 5 min	

- B) Za odabir transformiranih bakterijskih kolonija sa željenim insertom korištena je metoda PCR na kolonijama i reakcijska smjesa B (tablica 2.9). U tom slučaju umjesto izdvojene DNA, u PCR reakcijsku smjesu dodaje se mala količina bakterija (dodana vrhom čačkalice) te se vrijeme početne denaturacije produljuje na 10 minuta. Ova reakcijska smjesa korištena je i pri umnažanju gena *ssbB* s konstrukta pGEM-ssbB u svrhu kloniranja u druge plazmide.
- C) Reakcijska smjesa C (tablica 2.9) korištena je za dobivanje veće količine odsječaka DNA za potrebe biokemijskih analiza (poglavlja 2.2.13 i 2.2.15).

D) U metodi ciljane mutageneze korištena je reakcijska smjesa D (poglavlje 2.2.4).

Tablica 2.9. Sastojci u PCR reakcijama A, B, C i D

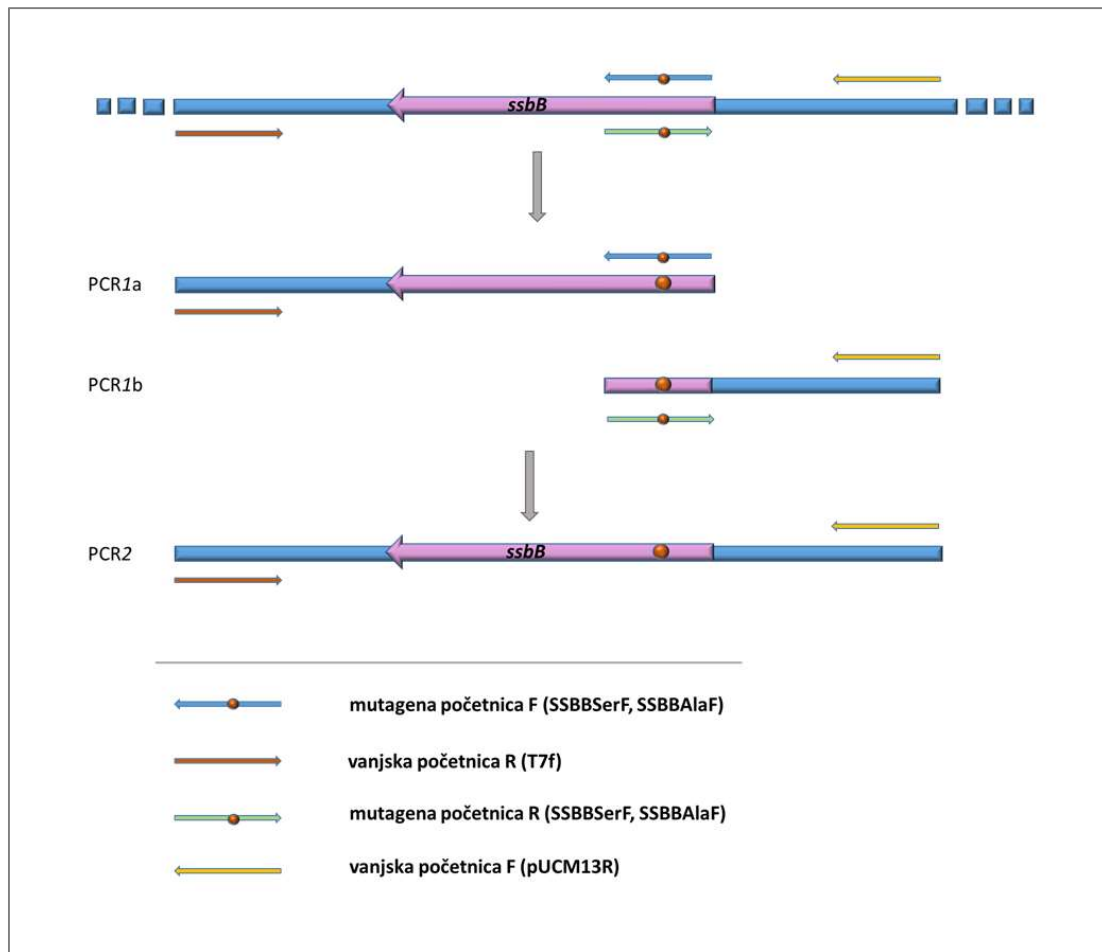
	Polimeraza	Količina enzima	dNTP	Koncentracija početnica	Pufer	DMSO	Proizvođač
A	LA Taq®	1.25 U	400 µM	0.5 µM	GC II	2%	TaKaRa
B	EmeraldAmp®MAX PCR Master Mix	-	-	0.5 µM	-	-	TaKaRa
C	AmplyTaq Gold®360 Master Mix			0,4 µM	GC Enhancer (10%)		TaKaRa
D	PfuUltra	0.6 U	200 µM	0.2 µM	1x Pfu buffer	4%	Stratagene

2.2.4 Metoda ciljane mutageneze

Metodom ciljane mutageneze uvedena je točkasta mutacija u genu *ssbB* kojom se u proteinskom produktu zamjenjuje aminokiselina cistein (Cys) na poziciji 7 u serin (protein SsbBCys₇Ser), odnosno alanin (protein SsbBCys₇Ala). Protokol je modificiran prema Xiao i sur., 2007 te priručniku QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, 2011). Shema osnovnog postupka prikazana je na slici 2.1 a opis postupka naveden je niže u tekstu.

Za pripremu mutacije bilo je potrebno konstruirati dvije unutarnje oligonukleotidne početnice koje hibridiziraju s ciljnim mjestom mutacije, te dvije vanjske početnice koje se sparuju s vektorom (tablica 2.6). Prvo se naprave dvije PCR1 reakcije (slika 2.1, PCR1a i b) u kojima je kalup divlji tip gena *ssbB* unutar konstrukta pGEM-*ssbB* (tablica 2.5) uz jednu vanjsku i jednu mutagenu početnicu te u reakcijskoj smjesi D (tablica 2.9) s tom razlikom što je radna koncentracija vanjske početnice 25 pmol a mutagene 5 pmol, uz T_{ann} 50°C. Dobiveni odsječci DNA na svojim krajevima sadržavali su željenu mutaciju u genu (prikazana crvenom točkom, slika 2.1).

U slijedećoj reakciji PCR2 se umjesto uobičajenog kalupa u smjesu dodaju odsječci iz prethodnog PCR-a u jednakom molarnom odnosu i u količini do 50 ng, te dvije vanjske početnice uz T_{ann} također od 50°C. PCR produkti iz reakcija PCR1a i b će za vrijeme denaturacije i renaturacije hibridizirati i tijekom prvih ciklusa PCR sintetizirat će se odsječak DNA s ciljanom mutacijom, a zatim će se ovaj produkt PCR-a umnožiti pomoću vanjskih početnica (slika 2.1). Zamijenjeni nukleotidi u konačnom PCR produktu potvrđeni su komercijalnim sekvenciranjem (u DNA servisu, IRB, Zagreb ili Macrogen, Inc.).



Slika 2.1. Shematski prikaz slijeda PCR reakcija u metodi ciljane mutageneze

2.2.5 Restriksijska digestija i ligacija DNA

Razgrađivanje DNA restriksijskim enzimima provedena je u odgovarajućem puferu prema uputama proizvođača u ukupnom volumenu reakcije 15 – 30 μ l. Vrijeme inkubacije bilo je minimalno 30 minuta pa do 3 sata. U slučaju dvostruke razgradnje korišten je pufer kompatibilan za oba enzima. Popis restriksijskih enzima nalazi se u tablici 2.3. Razgradnja restriksijskim enzimima koristila se za obradu krajeva produkata PCR reakcije ili za pročišćavanje ciljanih odsječaka DNA iz vektora. Produkti PCR reakcije su nakon razgradnje pročišćeni pomoću komercijalnog kompleta QIAquick® PCR Purification Kit, a u slučaju razgradnje iz vektora odsječci DNA su prvo razdvojeni na agaroznom gelu, zatim je odsječak DNA željene veličine izrezan iz gela i pročišćen pomoću komercijalnog kompleta QIAquick® Gel Extraction Kit.

Nakon obrade restrikcijskim enzimima vektor i odsječak DNA (insert) spojeni (ligirani) su prema uvjetima navedenima u tablici 2.10 pomoću enzima T4 DNA ligaze (Fermentas). Koncentracije DNA odsječaka prije ligacije određene su u agaroznom gelu pomoću koncentracijskog markera MassRuler DNA Ladder, Fermentas. Volumen ligacijske smjese u pravilu je iznosio 15 μ L.

U slučaju ligacije tupih krajeva DNA ili kada je pri kloniranju korišteno samo jedno restrikcijsko mjesto, krajevi vektora su prije ligacije defosforiliran pomoću alkalne fosfataze prema uputama proizvođača (tablica 2.3) kako bi se izbjeglo spontano spajanje krajeva vektora odnosno njegovo zatvaranje prije umetanja inserta.

Tablica 2.10. Ligacijske smjese

Vrsta ligacije	Omjer vektor:insert	Količina vektora	T4 DNA ligaze (Weiss jedinice)	Inkubacija	PEG4000
Ljepljivi krajevi	1:3	100 ng	5	16°C, ON	-
Tupi krajevi	1:6	100-150 ng	10	8°C, ON	10 %

2.2.6 Konstrukcija plazmida

Plazmidi korišteni u ovom radu pripremljeni su koristeći metode kloniranja navedne u poglavlju 2.2.2. Odsječci DNA pripremljeni su reakcijom PCR ili su dobiveni razgradnjom pomoću restrikcijskih enzima iz postojećih konstrukata. Popis konstruiranih plazmida, te način pripreme vektora i inserta za svaki konstrukt navedeni su u tablici 2.11.

Tablica 2.11. Popis plazmida konstruiranih za potrebe ovog rada i postupak izrade.

Naziv konstrukta	Insert				Restriksijska mjesta	Vektor
	Insert iz ranijih konstrukata	PCR				
		Kalup	Početnice (tablica 2.6)	Ligacijska smjesa (tablica 2.9)		
pGEM-ssbBCys ₇ Ala	-	pGEM-ssbB (Paradžik i sur., 2013)	SSBBAlaF, T7f pUCM13R, SSBBAlaR	D	EcoRI/HindIII	pGEM-T
pGEM-ssbBCys ₇ Ser	-	pGEM-ssbB (Paradžik i sur., 2013)	SSBBSerF, T7f pUCM13R, SSBBSerR	D	EcoRI/HindIII	pGEM-T
pQE-ssbBCys ₇ Ala	<u>pGEM-ssbBCys₇Ala</u>	-	-	-	BamHI/HindIII	pQE-30
pQE-ssbBCys ₇ Ser	<u>pGEM-ssbBCys₇Ser</u>			-	BamHI/HindIII	pQE-30
pGEM-pssbBCys ₇ Ala	<u>pGEM-ssbBCys₇Ala</u>			-	BamHI/HindIII	pGEM-pssbB (Paradžik i sur., 2013)
pGEM-pssbBCys ₇ Ser	<u>pGEM-ssbBCys₇Ser</u>			-	BamHI/HindIII	pGEM-pssbB (Paradžik i sur., 2013)
pMS-pssbBCys ₇ Ala	<u>pGEM-pssbBCys₇Ala</u>			-	SpeI/EcoRV	pMS82b
pMS-pssbBCys ₇ Ser	<u>pGEM-pssbBCys₇Ser</u>			-	SpeI/EcoRV	pMS82b
pUT18-ssbB pUT18C-ssbB		pGEMssbB (Paradžik i sur., 2013)	XbalssbB, ssbBKpnI	A	XbaI/KpnI	pUT18 pUT18C
pUT18-ssbBΔC pUT18C-ssbBΔC		pGEM-ssbB119 (Paradžik i sur., 2013)	XbalssbB, ssbB-CKpnI	A	XbaI/KpnI	pUT18 pUT18C
pKT25-ssbB PKNT25-ssbB		pGEMssbB (Paradžik i sur., 2013)	XbalssbB, ssbBKpnI	A	XbaI/KpnI	pKT25 pKNT25
pKT25-ssbBΔC PKNT25-ssbBΔC		pGEMssbB (Mijaković i sur., 2006)	XbalssbB, ssbB-CKpnI	A	XbaI/KpnI	pKT25 pKNT25

Gen *ssbB* iz bakterije *S. coelicolor* (NCBI, Gene ID: 1098117) prethodno je kloniran kako je opisano u (Mijaković i sur. 2006) te je nazvan pQE-ssbB. Ovaj konstrukt korišten je za prekomjernu ekspresiju divljeg tipa gena *ssbB* te kao izvorišni plazmid za konstrukciju plazmida pGEM-ssbB i pGEM-pssbB (Paradžik i sur. 2013) koji su u ovoj studiji korišteni kao izvorišni plazmidi za konstrukciju ostalih rekombinantnih gena *ssbB*. Plazmid pGEM-pssbB za razliku od pGEM-ssbB, ispred gena *ssbB* ima i njegovu regulatornu regiju (promotor i mjesto vezanja ribosoma – RBS, engl. *ribosome binding site*). Plazmid pGEM-ssbB (Paradžik i sur. 2013) korišten je kao kalup za dobivanje ciljane zamjene aminokiseline cistein na poziciji 7 u alanin, odnosno serin u proteinu SsbB, metodom ciljane mutageneze detaljno opisane u poglavlju 2.2.4. Insert dobiven ciljanom mutacijom obrađen je endonukleazama EcoRI i HindIII (poglavljje 2.2.5) te je ligan s vektorom pGEM dobivenim iz plazmida pGEM-ssbB (Paradžik i sur. 2013) nakon razgradnje restriksijskim enzimima EcoRI i HindIII, te

pročišćavanjem željenog fragmenta iz agaroznog gela (tablica 2.4). Dobiveni konstrukti nazvani su pGEM-ssbBCys₇Ala i pGEM-ssbBCys₇Ser. Kako bi se mogla dobiti prekomjerna ekspresija mutiranih gena u heterolognom domaćinu, bakteriji *E. coli*, konstruirani su i plazmidi pQE-ssbBCys₇Ala i pQE-ssbBCys₇Ser. Razgradnjom plazmida pGEM-ssbBAla i pGEM-ssbBSer pomoću enzima BamHI i HindIII dobiveni su geni *ssbBAla* odnosno *ssbBSer* koji su zatim ligirani u ekspresijski vektor pQE prethodno također obrađen endonukleazama BamHI i HindIII. Ovi plazmidi omogućavaju sintezu mutiranih proteina SsbB koji imaju privjesak od 6 histidina na N-kraju proteina.

Kako bi se mutirani geni eksprimirali u bakteriji *S. coelicolor* bilo je potrebno gen *ssbB* s njegovim regulatornim regijama ugraditi u vektor koji se može integrirati u genom bakterije *S. coelicolor*. U tu svrhu iskorišten je integrativni vektor pMS82b. U plazmid pGEM-pssbB (Paradžik i sur. 2013) umjesto gena *ssbB* umetnut je mutirani gen *ssbBCys₇Ala* odnosno *ssbBCys₇Ser* (izdvojeni iz plazmida pGEM-ssbBCys₇Ala i pGEM-ssbBCys₇Ser) u restrikcijska mjesta BamHI/HindIII. Dobiveni plazmidi pGEM-pssbBCys₇Ala i pGEM-pssbBCys₇Ser obrađeni su endonukleazom HindIII, a potom i Klenowim fragmentom kako bi se dobili tupi krajevi. Iz lineariziranih plazmida su razgradnjom pomoću enzima SpeI dobiveni fragmenti pssbBCys₇Ala i pssbBCys₇Ser koji su potom ugrađeni u EcoRV i SpeI mjesta na plazmidu pMS82b. Dobiveni plazmidi pMS-pssbCys₇Ala i pMS-pssbCys₇Ser korišteni su u eksperimentima komplementacije, odnosno za integraciju mutiranih gena u kromosom bakterije *S. coelicolor* koja nema funkcionalni gen *ssbB* (TSB01, tablica 2.7). Soj dobiven komplementacijom TSB01 s plazmidom pMS-pssbCys₇Ala nazvan je TSB06, a onaj komplementiran plazmidom pMS-pssbCys₇Ser nazvan je TSB07.

U svrhu identifikacije interaktanata proteina SsbB pomoću bakterijskog sustav dvaju hibrida (BACTH, poglavlje 2.2.9) u komercijalne plazmide pUT18, pUT18C, pKT25 i pKNT25 (Euromedex) umetnut je gen *ssbB* ili *ssbBΔC*. Gen *ssbB* s odgovarajućim restrikcijskim mjestima za ugradnju u vektore za BACTH dobiven je odgovarajućom reakcijom PCR pomoću početnica navedenih u tablici 2.11 s plazmida pGEMssbB. Insert je nakon toga obrađen endonukleazama XbaI i KpnI (poglavlje 2.2.5) te je ligiran s prije navedenim komercijalnim vektorima, također obrađenim restrikcijskim enzimima XbaI i KpnI. Dobiveni konstrukti nazvani su pUT18ssbB, pUT18CssbB, pKT25ssbB i pKNT25ssbB. Gen *ssbBΔC* s odgovarajućim restrikcijskim mjestima na krajevima inserta, dobiven je odgovarajućom reakcijom PCR pomoću početnica navedenih u tablici 2.11 s plazmida pGEM-ssbB119. Ligacijom tako dobivenog inserta i komercijalnih vektora obrađenih endonukleazama XbaI i KpnI, dobiveni su konstrukti pUT18ssbBΔC, pUT18CssbBΔC, pKT25ssbBΔC i pKNT25ssbBΔC.

Ispravan slijed nukleotida u svim vektorima potvrđen je sekvenciranjem (Macrogen ili IRB) pomoću specifičnih početnica koje sjedaju na vektore (tablica 2.6).

2.2.7 Transformacija bakterijskih stanica

Bakterijske stanice *E. coli* transformirane su pomoću elektroporatora *Electroporator 2510* (Eppendorf). Elektrokompetentne bakterijske stanice pripremljene su prema protokolu iz (Sambrook i sur., 1989). U kivetu promjera 2 mm (BioRad) dodano je 40 μ L elektrokompetentnih *E. coli* te po 1 μ L plazmida (10 -100 ng DNA), kozmida ili ligacijske smjese. Stanice su zatim izložene pulsus struje visokog napona (2.5 kV, 400 Ω i 25 μ F). Tako transformirane stanice inkubirane su u 1 mL tekućeg LB-a kroz 1 h na 37°C pri 250 o/min u tresilici Eppendorf ThermoMixer®, kako bi se regenerirale. Nakon toga stanice su nacijepljene na krutu LB podlogu uz dodatak odgovarajućih antibiotika te inkubirane preko noći na 37°C.

Prilikom transformacije bakterijskih stanica *S. coelicolor* korištene su slijedeće metode:

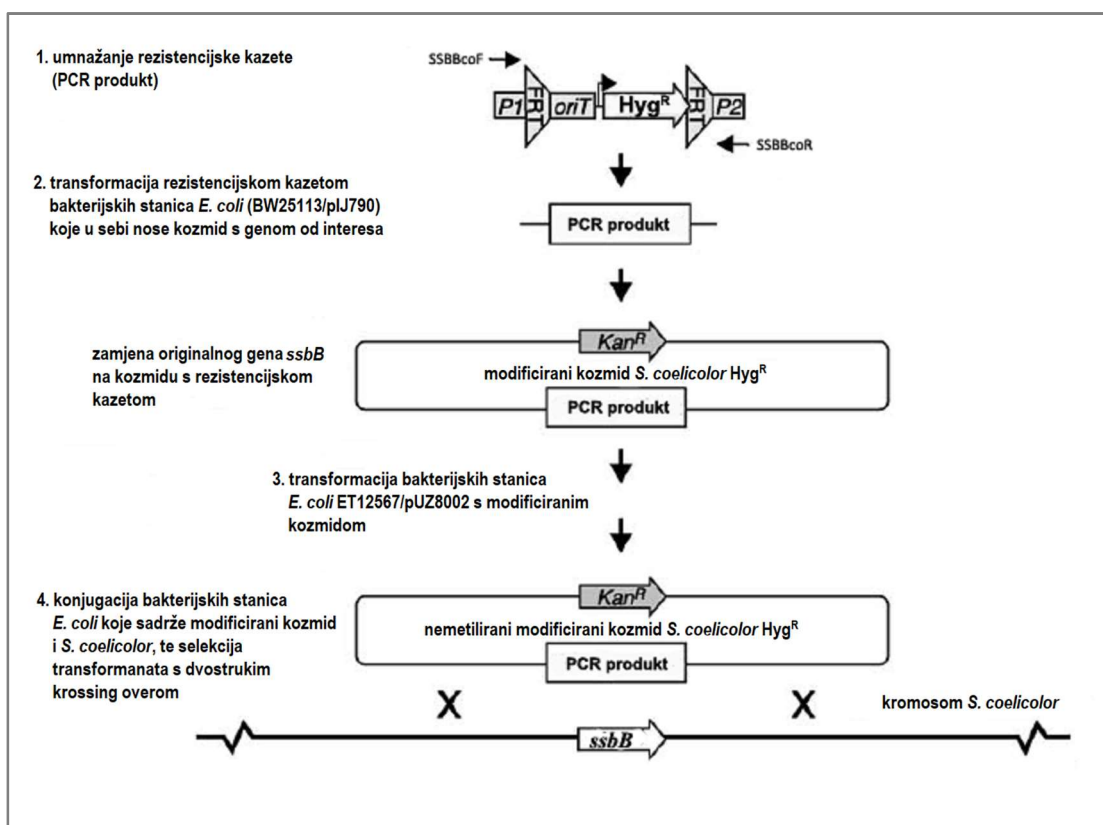
1. Metoda transformacije protoplasta prema Vujaklija i Bielen, 2007. Ovom metodom se 5-7 μ L ligacijske smjese (70-200 ng DNA) doda u 50 μ L prethodno pripremljenih protoplasta bakterije *S. coelicolor* i na to se odmah doda 200 μ L T + PEG pufera te nježno pomiješa pipetom 2-3 puta. Protoplasti se zatim nježno razmažu na R5 regeneracijsku podlogu i ostave preko noći na 30°C. Idući dan se ploče preliju odgovarajućim antibiotikom i inkubiraju još tri dana.

2. Metoda konjugacije s bakterijom *E. coli* omogućava prijenos kozmida ili plazmida u streptomicete. Pri tome se koristi soj *E. coli* ET12567 koji ima plazmid pUZ8002 (tablica 2.7). Ovaj plazmid se ne može prenositi u bakteriju recipijenta ali može pomoću gena *tra* (engl. *transfer*) mobilizirati druge vektore u streptomicete. Također, soj *E. coli* ET12567 nema sposobnost metilacije DNA, a to je potrebno kako bi se premostio metil - specifični restriksijski sustav bakterije *S. coelicolor*. Naime, efikasnost streptomiceta metiliranom DNA je izuzetno niska, ponekad i nemoguća jer ove bakterije prepoznaju i brzo razgrađuju unesenu meteliranu DNA. Ovom metodom napravljena je ciljana zamjena gena kako bi se inaktivirao gen *ssbB* ugradnjom kazete koja nosi rezistenciju na higromicin (detaljno opisano u poglavlju 2.2.8). Osim toga, bakterija *E. coli* ET12567 korištena je i za transformaciju streptomiceta drugim plazmidima, primjerice za komplementaciju inaktiviranog gena *ssbB* pomoću integrativnog vektora za streptomicete pMS82 (tablica 2.5). Vektor je za potrebe ovih istraživanja sadržavao različite konstrukte gena *ssbB* (*ssbBCys₇Ala* i *ssbBCys₇Ser*, tablica 2.11) koji su opisani ranije u poglavlju 2.2.6. Pomoću plazmida pMS82 ovi konstrukti su integrirani unutar Φ BT1 *attP* mjesta na

kromosomu *S. coelicolor*. U oba slučaja, kozmidom ili plazmidom su najprije transformirane nemetilirajuće *E. coli* ET12567/pUZ8002 koje su zatim uzgajane do srednje eksponencijalne faze rasta, pomiješane s 10^8 spora streptomiceta te naciepljene na MS krutu podlogu. Nakon 20 sati inkubacije na 30°C ploče su prelivene nalidiksičnom kiselinom ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) kojom je spriječena sinteza DNA u bakteriji *E. coli*, a ekskonjuganti su izdvojeni antibiotskom selekcijom. Ugradnja plazmida unutar $\Phi\text{BT1 attP}$ mjesta na kromosomu *S. coelicolor* sa željenom sekvencom potvrđena je metodom PCR-a na kolonijama pomoću specifičnih početnica (tablica 2.6).

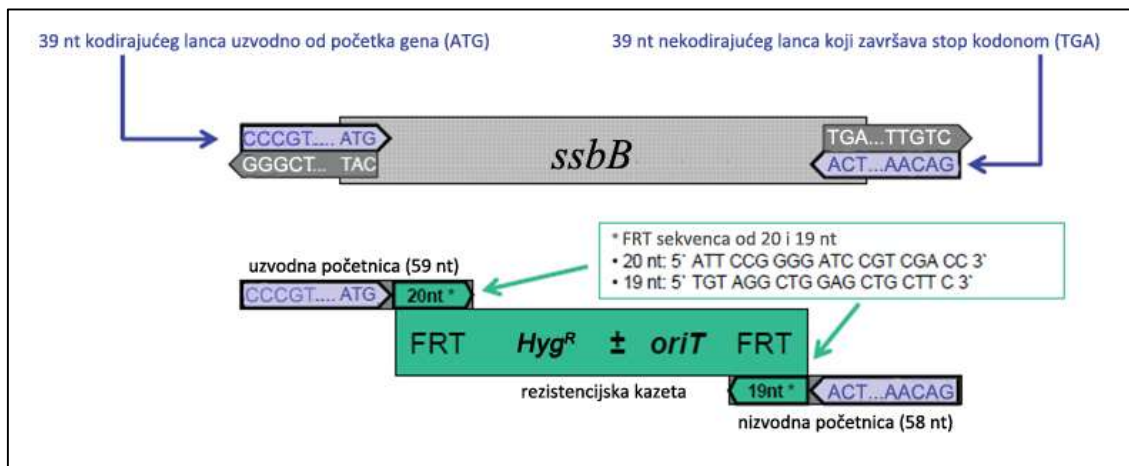
2.2.8 Zamjena gena i komplementacija (REDIRECT PCR-targeting)

Zamjena gena ili komplementacija gena na kromosomu načinjena je prema metodi (Gust i sur., 2004) koja se izvodi u nekoliko glavnih koraka shematski prikazanih na slici 2.2:



Slika 2.2. Shematski prikaz delecije gena *ssbB* unutar okvira čitanja. Selektivni marker se umnaža pomoću PCR reakcije koristeći početnice koje imaju 20 nt FTR regije i 39 nt uzvodno od gena (SSBBcoF) odnosno 19 nt FRT regije i 39 nt nizvodno od gena (SSBBcoR) koji se želi zamijeniti (tablica 2.6). Regije od 39 nt koje se unose početnicama omogućuju rekombinaciju između homolognih regija PCR produkta i kozmida (točka 2). *oriT* regija u rezistencijskoj kazeti omogućuje prijenos modificiranog kozmida u bakteriju *S. coelicolor* putem konjugacije. Preuzeto iz Gust i sur., 2004.

1. Umnažanje kazete s odabranim selekcijskim markerom (u ovom radu gen za rezistenciju na higromicin - Hyg^R) reakcijom PCR te rekombinacija dobivenog produkta PCR s kozmidom bakterije *S. coelicolor* koji sadrži gen od interesa.
2. Transformacija elektrokompetentne bakterije *E. coli* ET12567/pZU8002 s dobivenim rekombinantnim kozmidom koji sadrži rezistencijsku kazetu umetnutu na mjesto gena od interesa.
3. Prijenos kozmida iz bakterije *E. coli* ET12567/pZU8002 u bakteriju *S. coelicolor* putem konjugacije.
4. Antibiotička selekcija ekskonjuganata kod kojih je došlo do dvostrukog prekriženja (engl. „crossing over“ odnosno homologne rekombinacije između homolognih regija kromosoma i kozmida).



Slika 2.3. Shematski prikaz dizajna početnica za konstrukciju rezistencijske kazete. Sivom bojom označen je gen *ssbB* koji treba biti zamijenjen rezistencijskom kazetom (FRT-*oriT*- Hyg^R -FRT). Početnice sadržavaju 39 nt uzvodne i nizvodne regije gena te FRT sekvence koje se u PCR reakciji sparuju s FRT regijama na kalupu koji sadrži kazetu za ugradnju (plazmid pIJ10700, tablica 2.5). Preuzeto iz Gust i sur, 2004.

U ovom radu za potrebe zamjene gena *ssbB* s higromicinskom kazetom korišten je kozmid C607.1.c02.EZR1.seq.(tablica 2.5). Mutagena kazeta (FRT-*oriT*- Hyg^R -FRT) s DNA fragmentima uzvodno i nizvodno od gena *ssbB* (slika 2.3) dobivena je pomoću PCR reakcije čiji su uvjeti opisani u poglavlju 2.2.3, a kalup za PCR reakciju dobiven je EcoRI/HindIII restrikcijskom digestijom plazmida pIJ10700 (tablica 2.5). Početnice korištene u PCR reakciji (SSBcoF i SSBcoR, tablica 2.6) dizajnirane su tako da sadržavaju odsječak DNA koji pokriva uzvodnu, odnosno nizvodnu regiju s početkom i krajem gena, te 20 odnosno 19 nt od FRT regije (engl. *Flippase Recognition Target*). SSBcoF ima ukupno 59 nt: 24 nt je uzvodno od gena *ssbB*, 15 nt s početka gena i 20 nt od FTR regije, dok SSBcoR ima 58 nt: 3nt s

kraja gena, 36 nt nizvodno od gena i 19 nt FRT regije. FRT regije su identične u svim kazetama, a omogućuju sparivanje s homolognom regijom na rezistencijskoj kazeti u PCR reakciji. Ove početnice omogućavaju dobivanje produkta PCR koji na svojim krajevima nosi regiju za homolognu rekombinaciju s kozmidom C607.1.c02.EZR1.seq. U slijedećem koraku pripremljena je elektrokompentna bakterija *E. coli* BW25113/pIJ790 (Cm^R) (tablica 2.7) koja sadrži kozmid C607.1.c02.EZR1.seq. (Amp^R, Kan^R, Apr^R), i transformirana je s dobivenim produktom PCR. Tijekom pripreme elektrokompentnih stanica dodatkom 50 mM L-arabinoze pred kraj rasta bakterije induciraju se produkti gena *red* za λRED posredovanu rekombinacija između rezistencijske kazete i kozmida preko homolognih regija (39 nt uzvodno i nizvodno od gena koji treba biti zamijenjen). Odgovarajućom antibiotskom selekcijom (Kan^R, Hyg^R) izdvojeni su transformanti koji nose kozmid s integriranom Hyg^R kazetom. Nakon provjere ugradnje rezistencijske kazete PCR reakcijom, kozmid 6CO7::Hyg (tablica 2.5) je izdvojen fenol - kloroformskom ekstrakcijom (Gust i sur., 2004) i njime su transformirane elektrokompentna nemetilirajuća bakterija *E. coli* ET12567/pUZ8002. Kozmid 6CO7::Hyg mobiliziran je u divlji tip bakterije *S. coelicolor* ili u sojeve Δsmc , $\Delta parB$ i $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB$. Ekskonjuganti kod kojih je nakon višekratnih precjepljivanja utvrđena higromicinska rezistencija i kanamicinska osjetljivost provjereni su dodatno PCR reakcijom pomoću specifičnih početnica kojom je potvrđena ugradnja rezistencijske kazete unutar gena *ssbB* (tablica 2.6).

2.2.9 Bakterijski sustav dvaju hibrida (engl. *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System – BACTH*)

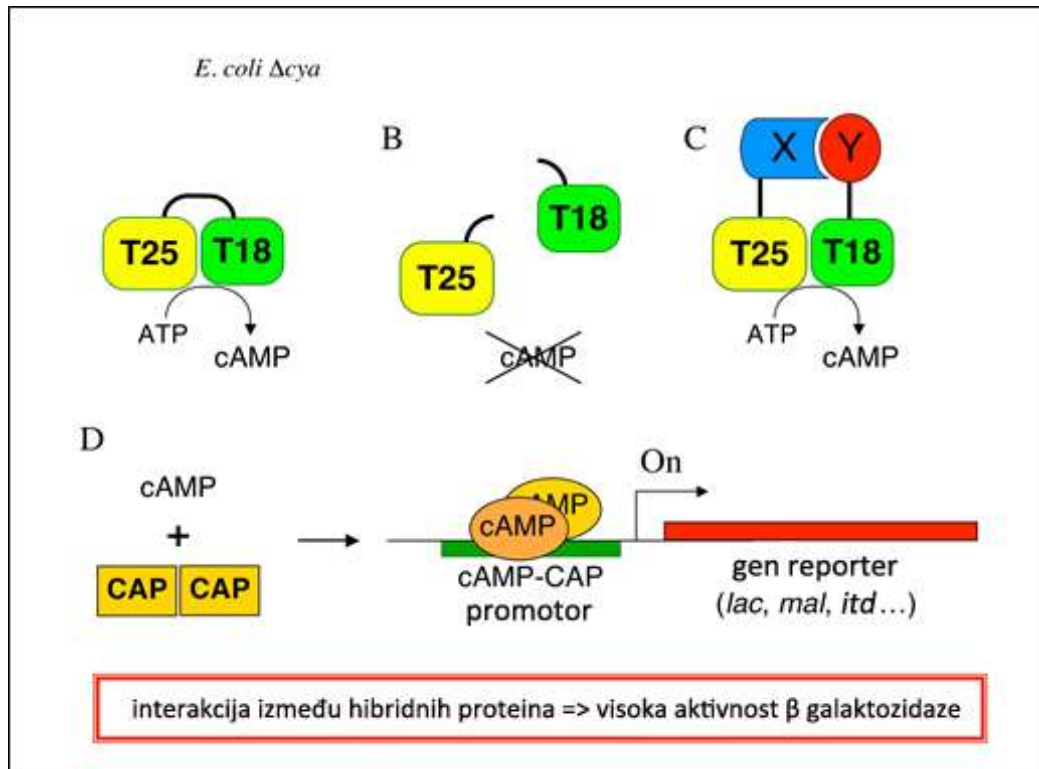
Bakterijski sustav dvaju hibrida (BACTH) upotrijebljen je za *in vivo* analize proteinskih interakcija koje ostvaruje protein SsbB s ostalim staničnim proteinima bakterije *S. coelicolor*. BACTH sustav se temelji na rekonstituciji aktivnosti enzima adenilat ciklaze u soju *E. coli* BTH101 (tablica 2.7) kojem nedostaje gen za adenilat ciklazu (*cya*) Karimova i sur., 1998; Euromedex, 2006). Katalitičke domene adenilat ciklaze (CyaA) iz bakterije *Bordetella pertussis* sastoje se od dva komplementarna fragmenta T25 i T18 koji su klonirane u zasebnim vektorima (slika 2.4, A). Nakon sinteze ovih polipeptida u stanicima domaćina enzim postaje aktivan tek kada oni dođu u fizički kontakt (slika 2.4, B). Geni proteina koji potencijalno ostvaruju interakciju moraju biti klonirani u okviru čitanja s genom podjedinice T25 odnosno podjedinice T18 (tablica 2.11). U slučaju protein – protein interakcije dolazi do funkcionalne komplementacije Cya što rezultira sintezom cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) (slika 2.4, C). Time se aktivira transkripcija *lac* ili *mal* operona za katabolizam laktoze odnosno maltoze (slika 2.4, D) i kolonije ostvaruju karakteristični fenotip (obojenje) na selektivnim podlogama.

Vektori koji se koriste za koekspresiju proteina s katalitičkim podjedinicama proteina CyaA navedeni su u tablici 2.5. Gen *ssbB* umnožen je pomoću reakcije PCR (tablica 2.9, reakcija A) koristeći specifične početnice kojima je uklonjen STOP kodon na kraju gena (tablica 2.12).

Tablica 2.12. Početnice korištene za kloniranje, provjeru ugradnje gena u BACTH, te sekvenciranje potencijalnih kandidata proteinske interakcije. Žutom bojom istaknuta su restrikcijska mjesta umetnuta ispred i nakon gena *ssbB*, a zelenom bojom su označeni umetnuti nukleotidi kako bi gen bio u okviru čitanja podjedinice CyaA.

Naziv početnice	Sekvenca	Namjena
XbaI <i>ssbB</i>	5' CGTCTAGAGATGAACGAGACGATGATC 3'	Kloniranje gena <i>ssbB</i> i <i>ssbB</i> -c s restrikcijskim mjestima kompatibilnim za kloniranje u plazmide za BACTH.
<i>ssbB</i> KpnI:	5' CGGGTACCCCTCCACCGGGACGGG 3'	
<i>ssbB</i> -cKpnI	5' CGGGTACCCCTGGCGGTGCGCCG 3'	
pKT25R	5' CGA CGT TGT AAA ACG ACG 3'	Početnica za provjeru ugradnje gena u plazmide pKT i pKNT.
pUT18R	5' CAACAAGTCGATGCGTTC 3'	Početnica za provjeru ugradnje gena u plazmid pUT18.
pUT18CR	5' CTGAGAGTGCACCATATTAC 3'	Početnica za provjeru ugradnje gena u plazmid pUT18C.
pUT18CFw	5' GTCACCCGATTGCGCGGC 3'	Početnica za provjeru ugradnje gena u plazmid pUT18C.
pT25fw	5' GATTACCTGGCGGCACG 3'	Početnica za sekvenciranje plazmida kandidata za proteinsku interakciju.

Dobiveni fragmenti DNA sadrže restrikcijska mjesta za kloniranje unutar okvira čitanja katalitičke podjedinice CyaA što omogućuje njihovo kloniranje standardnim protokolima na N- ili C-kraju katalitičkih domena (tablica 2.6). Tako pripremljenim vektorima kotransformiraju se elektrokompetentne *E. coli* BTH101 (poglavlje 2.2.7) i nacijspe na LB-IPTG-X-gal selektivnu podlogu (poglavlje 2.1.3) uz dodatak odgovarajućih antibiotika.



Slika 2.4. Shematski prikaz rekonstrukcije aktivnosti CyaA (sinteze cAMP-a) i aktivacije operona za katabolizam laktoze ili maltoze ostvarene putem interakcije fuzijskih proteina (X, Y). Preuzeto iz Eutomedex, 2006.

Ovaj je sustav korišten za pretraživanje biblioteke gena bakterije *S. coelicolor* uklonirane u vektor pT25 (Cm^R) (biblioteku izradio Prof. Nodwell, J.R., DeGroot Institute for Infectious Disease Research, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada; ljubaznošću prof. Jakimowicz D., Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Poland). Time se mogu identificirati proteini koji ostvaruju interakciju s proteinom SsbB. Protein kojime se pretražuje biblioteka naziva se protein „mamac”, a protein koji pokaže interakciju sa željenim proteinom – protein „lovina”.

Prije pretraživanja biblioteke potrebno je napraviti unakrsno testiranje svih konstrukata, uključujući plazmide bez ukloniranog gena mamca. Kao pozitivna kontrola koriste se plazmidi pKT25-zip i pUT18C-zip koji nakon kotransformacije u *E. coli* BTH101 vraćaju tipičan Cya⁺ fenotip.

Nakon što se pokazalo da kolonije ne pokazuju lažno plavi fenotip kotransformiran je jedan alikvot kompetentnih *E. coli* BTH101 s plazmidom koji sadrži uklonirani gen „mamac” i plazmidom pT25 koji sadrži biblioteku te je napravljeno nekoliko razrijeđenja kako bi se odredila transformabilnost stanica i odredilo razrjeđenje od približno 500 kolonija po ploči. Minimalno 50 000 kolonija po plazmidu pregledano je na plavi fenotip. Budući je fragment genoma zastupljen u plazmidu „plijen” veličine oko

1,5 kb, a ukupni genom bakterije *S. coelicolor* iznosi 8 667 507 pb (približno 10^4 kb), računa se da je vjerojatnost pronalaska određenog gena po koloniji (P) prema formuli: $P = (t - f)/G$. Pri čemu je t - veličina relevantne transkripcijske jedinice (za streptomicete 1 kb); f - prosječna veličina fragmenata genoma u vektoru (1,5 kb); G - veličina ukupnog genoma (10^4 kb) (Hopwood i sur., 1986).

Transformirane kolonije inkubirane su 2 dana na 30°C, a zatim još 2 dana na +4°C budući da se pojedine interakcije ostvaruju tek nakon duže inkubacije. Kolonije koje su rezultirale plavim fenotipom uzgojene su u prekonoćnoj LB tekućoj kulturi na 37°C i iz njih su izdvojeni plazmidi pomoću adekvatnog kompleta (tablica 2.4). Ovim plazmidima transformirane su stanice *E. coli* XL1-Blue (tablica 2.7) i nacijepljene na ploče samo s antibiotikom Cm kako bi se preferencijalno odabrale one kolonije u kojima je plazmid biblioteke s potencijalnim genom „lovinom”. Prije pročišćavanja plazmida 5-10 kolonija koje su narasle na LB—Cm podlozi se precijepljuju na dvije ploče i odabiru samo one kolonije osjetljive na Amp a rezistentne na Cm. Iz tih kolonija izdvaja se plazmidna DNA (pT25 s fragmentima genoma *S. coelicolor*) kojom se još jednom kotransformira *E. coli* BTH101 zajedno s vektorom „mamcem” te testira na Cya⁺ fenotip.

Od onih kolonija kod kojih se ponavio plavi fenotip, plazmid pT25 s uklopljenim fragmentom iz biblioteke *S. coelicolor* poslan je na komercijalno sekvenciranje (DNA servis, IRB, Zagreb i Macraogen, Inc.) koristeći početnicu pT25fw (tablica 2.12). Dobivene sekvence analizirane se pomoću internetskog alata BLASTN i StrepDB.

2.2.10 Priprema staničnog ekstrakta i pročišćavanje proteina

Upotrebom pQE ekspresijskog sustava postignuta je prekomjerna ekspresija gena *ssbB* te njegovih varijanti (*ssbBAla* i *ssbBSer*- tablica 2.11) u *E. coli* NM522. Protein SsbB obilježen je s nizom od 6 histidinskih ostataka (6xHis privjesak, histidinski privjesak, engl. His-tag) na N – kraju proteina.

Za prekomjernu ekspresiju proteina DevA (6xHis privjesak na C-kraju) (tablica 2.5) korištene su *E. coli* Rosetta-gami2 (DE3) *pLysS* (tablica 2.7). Obilježavanje proteina biljegom od 6 histidinskih ostataka omogućava jednostavno pročišćavanje proteina iz staničnog lizata putem afinitetne kromatografije na nosaču s imobiliziranim ionima nikla (Ni-NTA agaroz, Qiagen).

Kompetentne stanice *E. coli* NM522 ili *E. coli* Rosetta-gami2 (DE3) *pLysS* (tablica 2.7) transformirane su plazmidima za prekomjernu ekspresiju proteina i selektirane na Amp rezistenciju na LB krutom mediju. Kolonije su idući dan nacijepljene u 10 mL LB medija s $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina, uzgajane preko noći na 37°C (odnosno *E. coli* Rosetta-gami2 (DE3) *pLysS* na 30°C), a iduće jutro 1/100

volumena naciepljena je u 500 mL LB medija sa svježim antibiotikom. Kultura je uzgajana na 30°C do optičke gustoće (A_{600}) = 0,4 – 0,5 nakon čega je ekspresija rekombinantnog proteina inducirana dodatkom 1 mM IPTG-a (Sambrook i sur. 1989). Indukcija proteina SsbB tijekom 3 sata na 30°C, dok je protein DevA induciran preko noći na 18°C.

Bakterijska kultura centrifugirana je 15 min na 5000 x g. Talog dobiven iz 500 mL stanične kulture resuspendiran je u puferu A (tablica 2.1) s dodatkom 10 µg/mL Dnaze nakon čega su stanične stijenke razbijene primjenom ultrazvučnih valova (4 · 30 s) s amplitudom 40 % maksimalne vrijednosti koja se može postići na sonikatoru „Ultrasonic processor (Cole–Parmer)”. Ekstrakt je zatim centrifugiran 10 000 x g, 10 min kako bi se istaložio netopljivi stanični ostatak, a supernatant je dalje korišten za pročišćavanje proteina preko kolone s mobiliziranim metalom. Svi koraci u pripremi staničnog ekstrakta provedeni su na 4°C te s puferima ohlađenim na ledu.

Tako pripremljeni stanični lizat bakterije *E. coli* nanesen je na nosač s imobiliziranim ionima nikla (engl. *Ni²⁺-nitrilotriacetic acid agarose column*) prethodno ekvilibriran s 10 volumena kolone pufera A (tablica 2.1). Nakon što je uzorak propušten dva puta kroz kolonu, kolona je oprana puferom B uz dodatak 30 mM imidazola (tablica 2.1). Protein koji je vezan na Ni – agarozu eluiran je kompeticijskim vezanjem imidazola (300 mM) u puferu C (tablica 2.1), uz praćenje elucijske frakcije pomoću Bradfordovog reagensa (poglavlje 2.2.11).

Čistoća frakcije s pročišćenim proteinima analizirana je na gelu poliakrilamida (poglavlje 2.2.12.1). PD10 kolone (GE Healthcare) su se koristile za promjenu pufera eluiranih proteina u odgovarajući pufer za daljnju analizu:

a) 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 50 mM NaCl, pH 7,0 - za spektrometrijske i kalorimetrijske metode analize proteinskih reakcija (poglavlja 2.2.14 i 2.2.15), te za imunološke metode (poglavlje 2.2.16)

b) 20 mM Tris pufer, pH 7,4 – za EMSA analizu (poglavlje 2.2.13)

2.2.11 Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu korištena je kolorimetrijska metoda po Bradfordu 1976 uz upotrebu Bradfordovog reagensa i komercijalnog kompleta za određivanje koncentracije proteina (Quick Start Bradford Protein Assay Kit, Bio-Rad).

Za svaki uzorak mjerenja su napravljena u triplikatima na spektrofotometru (Ultrospec™ 2100 *pro*, Biochrom US) pri valnoj duljini 595 nm, a koncentracija je određena usporedbom sa standardnom

krivuljom izrađenom upotrebom komercijalnih standarda BSA (tablica 2.4). Metoda određivanja koncentracije pomoću Bradfordovog reagensa koristila se i za brzo određivanje količine proteina (u eluatima tijekom pročišćavanja proteina na koloni, poglavlje 2.2.10) tako da je 5 μL uzorka pomiješano s 20 μL Bradfordovog reagensa u kapljici. Količina proteina je procijenjena prema vidljivoj promjeni boje reagensa iz smeđe u plavu.

Za određivanje koncentracije pročišćenih proteinskih uzoraka osim metode po Bradfordu 1976 korištena je i metoda određivanja koncentracije mjerenjem apsorbancije pri 280 nm (A_{280}) na uređaju NanoDrop®. Mjerenja su također rađena u triplikatima, a za svaki uzorak je ProtParam alatom (ExpASY web-server) određena molekulska masa (g mol^{-1}) i ekstinkcijski koeficijent ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Lambert-Beer-ova jednadžba korištena je za određivanje koncentracije iz apsorbancije ($A = E \cdot b \cdot c$). A - predstavlja vrijednost apsorbancije izmjerene pri 280 nm, E - molarni apsorpcijski koeficijent ovisan o valnoj duljini (ekstinkcijski koeficijent) s mjernom jedinicom $\text{dm}^3 \text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$, b - duljina koju prijeđe svjetlosna zraka, a c - množinska koncentracija izražena u mol L^{-1} .

2.2.12 Elektroforetske metode analize proteina

2.2.12.1 Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Proteini su razdvajani pomoću jednodimenzionalne diskontinuirane elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, engl. *Polyacrylamide gel electrophoresis*) sustavom za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III (BioRad) pri sobnoj temperaturi. Gel za SDS-PAGE se sastoji gornjeg gela za sabijanje (5 % akrilamid:bisakrilamid 29:1, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.05 % APS, 0.1 % TEMED) i donjeg gela za razdvajanje (12 % akrilamid:bisakrilamid 29:1, 375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.05 % APS, 0.1 % TEMED). Prije nanošenja, u uzorke je dodana boja za proteine (4xSB) (tablica 2.1) te su uzorci inkubirani 5 min pri 95°C. Na gel je dodan i proteinski biljeg za određivanje veličine proteina (tablica 2.2). Elektroforeza je započeta pri naponu struje od 150 V dok se uzorak sabija u gornjem gelu, a zatim na 180V dok boja ne dostigne kraj gela. Nakon izvršene elektroforeze proteinske vrpce obojane su bojom Coomassie briljant plavo (engl. *Coomassie Brilliant Blue*, CBB) (PhastGel®Blue R, Sigma), uz odbojavanje s otopinom 10% octene kiseline i 10% izopropanola.

2.2.13 Metoda određivanja kompleksa DNA i proteina na temelju zaostajanja u gelu (EMSA)

Metoda zaostajanja u gelu ili EMSA (engl. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) koristi se za proučavanje interakcija proteina i DNA razdvajanjem u agaroznom ili poliakrilamidnom gelu.

Ova metoda korištena je za analizu vezanja proteina SsbB ili njegovih varijanti (SsbBCys₇Ala; SsbBCys₇Ser) i λ DNA, gdje su rastuće koncentracije proteina SsbB (0,25 – 1,25 μ M) pomiješane s jednakom količinom λ DNA (7 nM Φ X174, 5386 pb, Sigma-Aldrich) u 20 μ l TRIS-acetatnog pufera s dodatkom MgCl₂ i NaCl-a. Prije nanošenja uzorci su inkubirani 15 min na 37°C. Sastav pufera u kojemu je provođena elektroforeza, kao i pufer za nanošenje uzoraka na 0,6% agarozni gel, navedeni su u tablici 2.1. Za elektroforezu su korišteni uvjeti jakosti struje 2V/cm gela kroz 14 sati.

EMSA metodom analizirana je i protein – protein interakcija između proteina SsbB i DevA s dodatkom λ DNA odsječka (devAups regijom, 373 pb). DNA je dobivena PCR reakcijom C (tablica 2.9) s početnicama T7f i pUCM13r (tablica 2.6), dok je kalup bio plazmid pUCdevAups, (tablica 2.5). Produkt ove PCR reakcije obuhvaća 35 pb od gena SCO4189, 191 pb regije uzvodno od gena devA, te 147 pb s početka gena devA (SCO4190). Fiksna koncentracija proteina DevA (450 nM) inkubirana je sa 750 nM λ DNA (devAups) 20 min, pri sobnoj temperaturi, a zatim su dodane rastuće koncentracije proteina SsbB (1,5 – 3,0 μ M). Kao kontrola vezan je protein SsbB u istim rastućim koncentracijama sa 750 nM λ DNA. Pufer koji je u ovom slučaju korišten je Na-fosfatni pufer čiji je sastav naveden u tablici 2.1. Za elektroforezu su korišteni uvjeti jakosti struje 3,5 V/cm gela kroz 3 sata.

2.2.14 Kalorimetrijske analize proteina¹

Parametri koji se obično koriste za opisivanje stabilnosti sustava su konstanta vezanja (K_s) ili slobodna Gibbsova energija (ΔG°) prijelaza između dva stanja (npr. nativna i denaturirana konformacija proteina) u stanju ravnoteže koja predstavlja sumu entalpijskih (ΔH°) i entropijskih (ΔS°) uvjeta. Ti su parametri ovisni o temperaturi preko promjene toplinskog kapaciteta (ΔC_p).

¹ Mjerenja su napravljena u suradnji s dr.sc. I. Crnolatcom, Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković

Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC – engl. *Isothermal Titration Calorimetry*) i diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) su jedine metode kojima je moguće direktno mjeriti termodinamičke parametre bioloških molekula.

2.2.14.1 Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC – *Isothermal Titration Calorimetry*)

Metoda izotermalne titracijske kalorimetrije korištena je za proučavanje interakcija između proteina SsbB, odnosno njegovih mutiranih varijanti (SsbBCys₇Ala, SsbBCys₇Ser) i jIDNA (45 dT oligonukleotida).

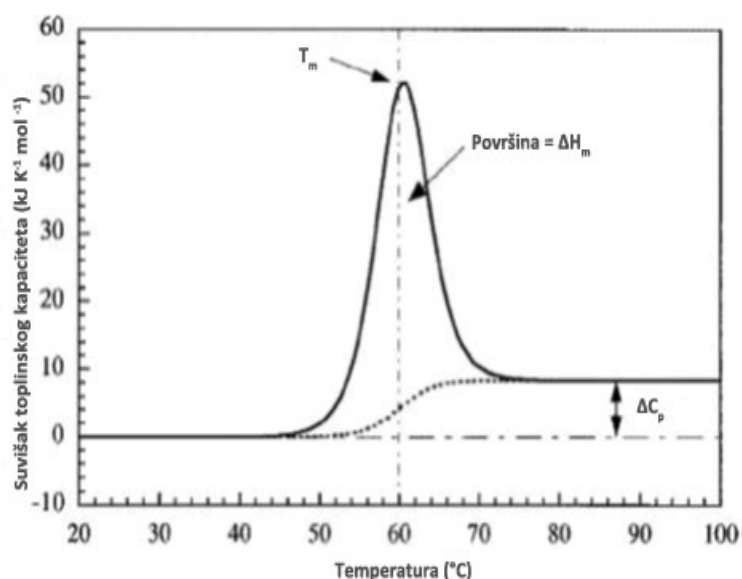
Titracije su provedene na uređaju MicroCal VP-ITC (Malvern, UK), a rezultati mjerenja obrađeni su pripadajućim programom Origin 7.0. Otopina supstrata – protein SsbB, SsbBCys₇Ala ili SsbBCys₇Ser (0,5 μM) u Na-fosfatnom puferu (tablica 2.1) titrirana je otopinom liganda – jIDNA (45 dT, 10 μM) u identičnom puferu. Alikvoti liganda (jedan alikvot od 2 μL, 19 alikvota od 5 μL i 16 alikvota od 10 μL) ubrizgani su putem rotirajuće šprice (220 o min⁻¹) u termostatiranu ćeliju sa supstratom. Vremenski intervali između ubrizgavanja liganda bili su u rasponu 240-360 s što omogućava da se sustav vrati u ravnotežno stanje (na baznu liniju). Početno vrijeme odgode titracije radi stabilizacije bazne linije bilo je 2000 s u svim eksperimentima. Titracija je provedena pri temperaturi od 25°C, a svi uzorci su prije titracije odzračeni na vakuum pumpi pri 0.48 bar, 10 min.

Direktnim mjerenjem dobivena je promjena entalpije (Δ_rH), stehiometrija (N) i konstanta vezanja (K_s). Vrijednost promjene Gibbsove energije (Δ_rG) izračunata je preko konstante vezanja ($\Delta_rG = -RT \ln K_s$) a promjena entropije reakcije izračunata je iz entalpije vezanja i Gibbsove energije ($\Delta_rS = (\Delta_rH - \Delta_rG)/T$).

2.2.14.2 Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC – *Differential scanning calorimetry*)

Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) je metoda koja omogućava mjerenje i karakterizaciju termičkih svojstava materijala, te je posebno pogodna za proučavanje termički induciranih tranzicija bioloških makromolekula. Toplinska analiza DSC-om zasniva se na zagrijavanju (ili hlađenju) uzorka te inertnog referentnog materijala (pufera) programiranom brzinom. Dobivena razlika u toplini predstavlja endotermne i egzotermne prijelaze otopine molekula od interesa (C_p) koji se prikazuju kao funkcija temperature (slika 2.5). Točku tranzicije (T_m) predstavlja oštar vrh krivulje toplinskog prijelaza gdje je smješten i maksimum C_p vrijednosti. Integracija C_p prema krivulji T daje entalpiju tranzicijske promjene (ΔH^*_m), a pomak u baznoj liniji predstavlja ΔC_p . DSC je stoga metoda kojom je moguće direktno odrediti entalpiju tranzicijske promjene molekula (Bruylants i sur., 2005).

Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) korištena je kako bi se odredila termička stabilnost proteina čime je moguće dobiti i određene informacije o strukturi molekule. Na početku DSC mjerenja nema razlike u temperaturi između ispitivanog i referentnog uzorka, a zagrijavanjem ili hlađenjem javljaju se toplinski prijelazi koji rezultiraju endotermnom ili egzotermnom promjenom. Sekundarna i tercijarna struktura proteina narušava se porastom temperature (kinetičke energije) na način da je temperatura (T_m), na kojoj je pola molekula proteina još uvijek u smotanom, a pola u razmotanom obliku, specifična za određeni protein. T_m ovisi o prisutnosti eventualnih primjesa koje se vežu na proteine i na taj ih način stabiliziraju (T_m se pomiče ka višim temperaturama) ili destabiliziraju (T_m je niži) sekundarnu strukturu proteina.



Slika 2.5. DSC eksperiment dvo-faznog odmatanja globularnog proteina (preuzeto iz Bruylants i sur 2005).

DSC mjerenja provedena su na Nano DSC uređaju (TA Instruments, SAD). U mjernu ćeliju dodana je otopina proteina SsbB, SsbBCys₇Ala ili ssbBCys₇Ser (1 mg/mL) u fosfatnom puferu (tablica 2.1) a u referentnoj ćeliji bio je sam pufer. Volumen svake ćelije je 300 μ L. Svi uzorci su prije titracije odzračeni na vakuum pumpi pri 0.48 bar, 15 min. Nakon perioda uravnoteženja sustava (10 min) uzorak se zagrijava brzinom 1°C/min u rasponu 25-100°C, tlak u sustavu podešen je na 6 bara.

DSC mjerenjem dobiveni su podaci o temperaturi pri kojoj dolazi do termičke tranzicije proteina (engl. *melting temperature* – T_m), a podaci su obrađeni pomoću programa NanoAnalyze (TA Instruments, SAD).

2.2.15 Spektroskopska analiza proteina metodom kružnog dikroizma (CD – Circular dichroism)²

Metoda kružnog dikroizma primijenjena je kako bi se utvrdila promjena sekundarne strukture proteina ili smjese proteina i liganada u ovisnosti o porastu temperature, a temelji se na različitoj apsorpciji lijevo i desno kružno polariziranog zračenja kiralnih molekula. Spektri kružnog dikroizma (CD) su izmjereni JASCO J-815 spektropolarimetrom s automatskom kontrolom temperature, koristeći kvarcnu kivetu podobnu za termostatiranje (Hellma Analytics 170-QS) duljine optičkog puta 1 mm za mjerenje proteina, te „sandwich” kiveti optičkog puta 0,1 mm za analizu interakcije proteina i DNA zbog primjene manjeg volumena.

Termička denaturacija proteina SsbB, SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser (1 mg/mL u 50 mM Na-fosfatnom puferu, pH 7 (tablica 2.1) praćena je snimanjem spektara kružnog dikroizma koristeći kvarcnu kivetu optičkog puta 1 mm u temperaturnom intervalu od 20 - 70°C. Istovremeno je pri valnoj duljini 208 nm, snimljen spektar (200 - 350 nm) svaka 2°C pri standardnoj rezoluciji 100 mdeg. Gubitak elemenata sekundarne strukture (α -heliksa) praćen je preko elipticiteta pri 208 nm čime je dobivena krivulja iz koje je izračunata prva derivacija te iz koje je onda iščitana srednja temperatura denaturacije proteina, T_m (engl. *Melting Temperature*) za svki protein (pomoću računalnog programa Origin 7).

Kako bi se utvrdila strukturna promjena dvojnih kompleksa proteina (DevA ili SsbB) i DNA te trojnog kompleksa dva proteina i DNA uslijed interakcije liganada mjereni su CD signali 6 μ M proteina SsbB i DevA te 3 μ M dDNA odsječka (devAups, poglavlje 2.2.13) u 50 mM u Na-fosfatnom puferu, pH 7 (tablica 2.1). Prije mjerenja CD spektra ligandi su pomiješani i inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Mjerenja CD spektara provedena su u „sandwich” kiveti optičkog puta 0,1 mm u temperaturnom intervalu od 20 - 90°C pri valnoj duljini 208 nm, ujedno je spektar (200 - 350 nm) snimljen svaka 2°C pri standardnoj rezoluciji 100 mdeg. Gubitak elemenata sekundarne strukture (α -heliksa) praćen je preko elipticiteta pri 208 nm čime je dobivena krivulja iz koje je izračunata prva derivacija te iz koje je onda iščitana srednja temperatura denaturacije proteina, T_m za svki protein ili kompleks (pomoću računalnog programa Origin 7).

² Mjerenja su napravljena u suradnji s dr.sc. I. Crnolatcom, Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković

Iz pojedinačnih CD spektara ptoreina računalnim programom DichroWeb, CDSSTR metodom (Sreerama i Woody, 2000) izračunat je i postotak sekundarnih struktura (α -heliksa i β -ploča). Ostali parametri za snimanje CD spektara bili su slijedeći: rezolucija (engl. *Data Pitch*) 0,1 nm, širina puta zrake 2 nm, vrijeme mjerenja u jednoj točki (eng. *Response*) 1 s i brzina snimanja 200 nm min⁻¹. Obrada krivulja snimljenih CD spektara napravljena je u programu Origin 7.0.

2.2.16 Imunološke metode analize proteina

2.2.16.1 Western blot

Proteini su preneseni s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu (Amersham Hybond P 0.45, GE Healthcare) pomoću sustava za prijenos proteina (Bio-Rad) 1h na 300 mA, koristeći pufer za prijenos naveden u tablici 2.1. Membrane su blokirane u TBST puferu (tablica 2.1) s 5 % mlijekom u prahu (Milchpulver, Roth) ili 3% BSA (kroz 1h pri sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja slijedila je inkubacija s primarnim antitijelima ovisno o proteinu ili specifičnom privjesku na proteinu koji se detektira:

a) anti-SsbB antitijelima (iz zeca - Pineda, Anticörper-Service, Germany) membrane su inkubirane preko noći na 4°C ili 2h na sobnoj temperaturi u omjeru 1:10000;

b) anti-His antitijelima (iz miša - GE Healthcare) membrane su inkubirane 1h na sobnoj temperaturi u omjeru (2:10000) u otopini za blokiranje.

Membrane su nakon ispiranja (3 x 5 min) u TBST puferu, inkubirane sa sekundarnim antitijelima (Polyclonal Anti-Rabbit Antibodies, 1:10000, GeHealthcare) 1h na sobnoj temperaturi. Nakon toga je slijedilo ponovno ispiranje membrane i detekcija pomoću kompleta za vizualizaciju (tablica 2.4). Kemiluminiscentni signali detektirani su u tamnoj komori na filmu „Amersham Hyperfilm ECL” (GE Healthcare), razvijanjem pomoću razvijачa i fiksira (AGFA G138i developer, AGFA G338 fixer).

2.2.16.2 Kapljična analiza proteina (engl. *Dot-blot analysis*)

Dot-blot metoda temelji se na western-blot analizi s tom razlikom da se proteini ne prenose na membranu elektro-transferom, već se 1 μ g proteina ili dDNA, (devAups, poglavlje 2.2.13) nanese direktno na nitroceluloznu membranu (Hybond ECL, 0,45 μ m, Amersham Biosciences). Na membranu su nanoseni proteini DevA i SsbB pročišćeni postupkom opisanim u poglavlju 2.2.10. Regija uzvodno od gena *devA* (devAups) dobivena je umnažanjem odsječaka DNA s plazmida pUCdevAups (tablica 2.5) koristeći početnice pUCM13f i pUCM13r (tablica 2.6) i reakcijsku smjesu C (tablica 2.9). Na PCR produkt od 373 pb nalazi se mjesto vezanja proteina DevA. Protein BSA korišten je kao negativna

kontrola, a SsbB kao pozitivna. Nakon nakapavanja proteina membrana je sušena na zraku 10 min nakon čega je slijedilo blokiranje membrane 1h s 3% BSA (Sigma-Aldrich) u TBST (tablica 2.1) te nakon toga je slijedila inkubacija s 121 nM SsbB u TBST, 1h. U početnu inkubaciju s proteinom SsbB dodana je 120 nM dIDNA (devAups) ili 121 μ M jIDNA (oligo70, tablica 2.6). Koncentracije supstrata podešene su tako da bude jednak broj molekula proteina SsbB i DNA u otopini kojom se inkubira membrana. Ispiranje membrane i inkubacija s primarnim antitijelom anti-SsbB (1:10 000) te ostali koraci slijedili su kao i u metodi western blot prethodno opisani u poglavlju 2.2.16.1.

2.2.17 Fluorescencijska mikroskopija (konfokalna laserska mikroskopija)

Za potrebe mikroskopskih analiza sojevi bakterije *S. coelicolor* M145 uzgajani su na pokrovnim stakalcima (20x20 mm) ukoso umetnutim u MS hranjivu podlogu (tablica 2.8). Vrijeme potrebno da se postigne stadij rane sporulacije potvrđeno je za pojedine uzorke brзом analizom bojanjem DAPI bojom (4',6-diamino-2-phenylindole) u koncentraciji 1 μ g mL⁻¹. Nakon 60 do 72 h inkubacije pokrovnice su izvađene iz podloge, a micelij je fiksiran otopinom glutaraldehyd : formaldehyd (0.0045% : 2.8%) u puferu PBS (tablica 2.1) i dalje tretiran kao što je opisano u (Schwedock i sur., 1997). Za vizualizaciju DNA korištena je otopina propidij-jodida, a peptidoglikani u stijenci obojani su bojom FITC-WGA (Invitrogen™). Uzorci su na kraju tretirani otopinama iz kompleta SlowFade® Antifade Kit kako bi se spriječilo slabljenje signala fluorescentno obilježenih molekula.

Uzorci su analizirani pomoću konfokalnog laserskog mikroskopa Leica SP8 X FLIM. Slike su analizirane programom IPLabs 3.7 image processing software (BD Biosciences Bioimaging, Rockville, MD). Statističke analize spora provedene su pomoću programa Prism7 - GraphPad Software Inc.

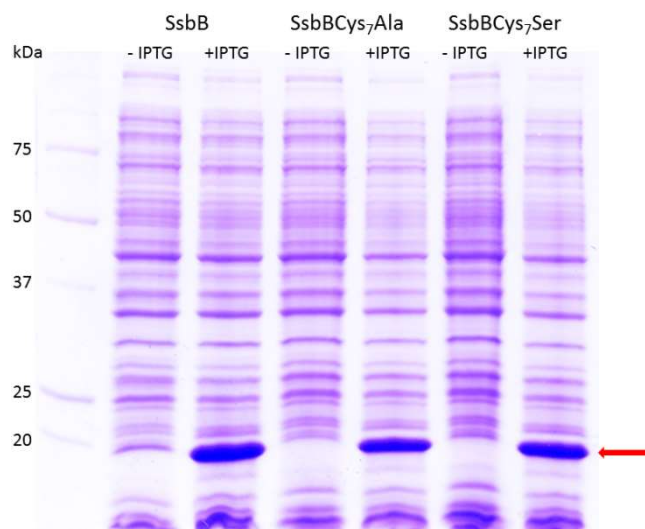
3 Rezultati

3.1 Uloga disulfidnih mostova u stabilizaciji i funkciji homotetramera proteina SsbB

U svrhu ispitivanja ovisnosti funkcije proteina SsbB o stvaranju disulfidnih mostova, načinjena je ciljana mutacija jedine aminokiseline cistein u primarnoj strukturi (na položaju 7) u alanin odnosno serin. Serin i alanin odabrani su kao zamjenske aminokiseline zbog sastava bočnih ogranaka, kako bi se minimalno remetila struktura proteina. Kod mutanta sa serinom, atom sumpora zamijenjen je kisikom te su time veličina molekule i hidrofobnost ostali isti, s minimalno promijenjenim redoks potencijalom. U slučaju alaninskog mutanta, veličina molekule je smanjena a povećana je hidrofobnost.

3.1.1 Kloniranje, prekomjerna ekspresija i pročišćavanje divljeg tipa proteina SsbB te mutiranih varijanti SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser

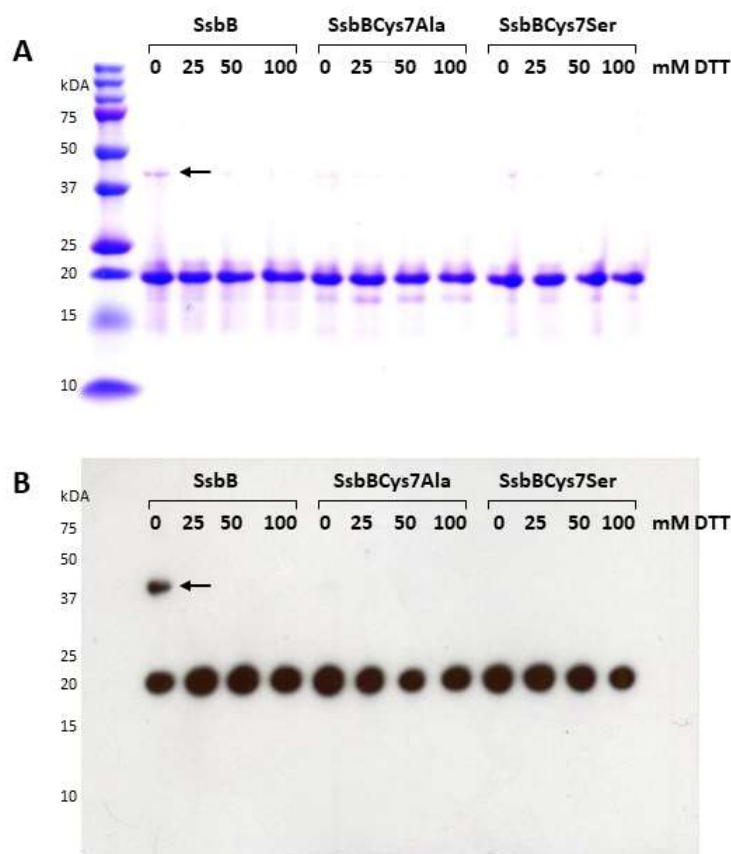
Kako bi se mogle provesti biokemijska i funkcionalna karakterizacija proteina SsbB te njegovih mutiranih varijanti bez mogućnosti stvaranja cisteinskih mostova, načinjena je ciljana mutacija aminokiseline cistein u alanin odnosno serin, prema metodi detaljno opisanoj u poglavlju 2.2.4 gen koji sadrži mutaciju na mjestu aminokiseline cistein ugrađen je u ekspresijski vektor pQE (poglavlje 2.2.6) kojim je transformiran heterologni domaćin, bakterija *E. coli* NM522 postupkom opisanim u poglavlju 2.2.7. Dodatkom IPTG-a testirana je ekspresija mutiranih gena najprije u malom volumenu uzgojenih transformanata (10 mL). Prekomjerna sinteza proteina u transformiranim stanicama potvrđena je razdvajanjem ukupnog staničnog ekstrakta u PAGE (slika 3.1). Isti transformanti korišteni su za uzgoj u većem volumenu (500 mL). Uzgoj bakterija, prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina preko histidinskog privjeska provedeno je prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.10. Pročišćeni proteini korišteni su za daljnje biokemijske analize.



Slika 3.1. SDS gel elektroforeza prekomjerne ekspresije gena *ssbB*, *ssbBCys₇Ala* i *ssbBCys₇Ser*. Stanični lizati prije indukcije (-IPTG) i nakon 3h indukcije dodatkom 1mM IPTG-a (+IPTG) u hranjivom mediju LB prikazani su redom za divlji tip proteina *SsbB*, *SsbBAla* te *SsbBSer*. Indukcija proteina veličine oko 19 kDa vidljiva je u sva tri analizirana uzorka (crvena strelica). Proteinski standard nanesen je u krajnju lijevu jažicu.

3.1.2 Utvrđivanje stabilnosti strukture proteina *SsbB*, *SsbBCys₇Ala* i *SsbBCys₇Ser* u ovisnosti o reducirajućem agensu

U ovom radu analizirana je uloga S-S mostova u stabilnosti strukture tetramera proteina *SsbB* dodatkom rastuće koncentracije reducirajućeg agensa (DTT-a), a struktura dimera na očekivanoj veličini 39 kDa dodatno je potvrđena pomoću Western blot analize (slika 3.2). Razdvajanjem jednake količine proteina (1,4 µg) bez dodatka reducirajućeg agensa, te s rastućim koncentracijama DTT-a (25 - 100 mM) u poliakrilamidnom gelu (prema metodi opisanoj u poglavlju 2.2.12.1) uočena je jasno vidljiva struktura dimera jedino na divljem tipu proteina *SsbB* koja se gubi pod djelovanjem DTT-a (slika 3.2, A), što je zatim potvrđeno specifičnim protutijelima metodom Western blot (poglavlje 2.2.16.1) (slika 3.2, B). Western blot analiza mutiranih varijanti pri koncentraciji proteina 350 ng i ekspoziciji od 30 sekundi prikazana je na slici 3.2, A. Struktura dimera nije očekivana kod mutiranih proteina *SsbBCys₇Ala* i *SsbBCys₇Ser* koji nemaju sposobnost stvaranja S-S mostova, pa stoga niti dodatak reducirajućeg agensa ne bi trebao imati utjecaja na njihovo rastvaranje. Međutim, moguće je primijetiti, iako znatno manje, dimerne strukture i u mutiranih varijanti proteina *SsbB* vjerojatno zbog stvaranja intermolekulaskih interakcija (ionske, hidrofobne) između polipeptida dimera.



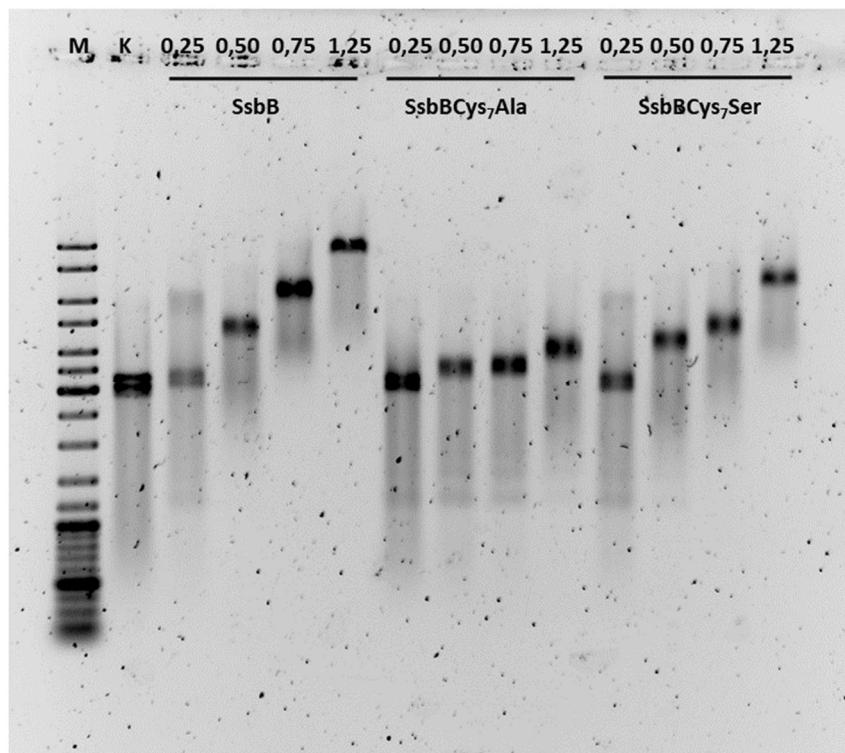
Slika 3.2. Analiza prisustva disulfidnih veza u proteinu SsbB, SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser. A) 1,4 µg proteina pomiješano je s puferom za nanošenje uzoraka u SDS elektroforezi bez DTT-a te s dodatkom rastuće koncentracije (25 – 100 mM) DTT-a. Položaj dimerne strukture proteina naznačena je strelicom. B) Western blot analiza proteina SsbB, SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser s antiSsbB antitijelima. Na poliakrilamidni gel je nanešeno 350 ng proteina bez reducirajućeg agensa (0 mM DTT) ili s dodatkom rastuće koncentracije (25 – 100 mM) DTT-a. Detektirani dimer proteina SsbB na 39 kDa označen je strelicom.

3.1.3 Vezanje proteina SsbB na jIDNA u ovisnosti o disulfidnim mostovima

Stabilnost tetramera SsbB mogla bi biti regulirana tijekom oksidacijskog stresa u bakteriji *S. coelicolor* koji potiče formiranje disulfidnih mostova. Glavna biološka uloga proteina SSB je vezanje jIDNA kako bi spriječila njezina razgradnja i/ili formiranje sekundarnih struktura ukosnica tijekom procesa DNA rekombinacije, replikacije i popravka (Glassberg i sur., 1979). U ovom radu ispitana je važnost S-S mostova u proteinu SsbB na afinitet vezanja jIDNA.

Proteini izolirani iz heterolognog domaćina *E. coli* ispitani su metodom određivanja kompleksa jIDNA i proteina metodom zaostajanja u gelu (EMSA) (poglavlje 2.2.13) pri čemu je rastuća koncentracija (0,25 – 1,25 µM) proteina SsbB i njegovih mutiranih varijanti (SsbBCys₇Ser i SsbBCys₇Ala) inkubirana s fiksnom koncentracijom kružne jIDNA ΦX1748 (7 nM). Povećanjem koncentracije proteina SsbB uočava se i veće zaostajanje kompleksa proteina i jIDNA. Sporija pokretljivost kompleksa

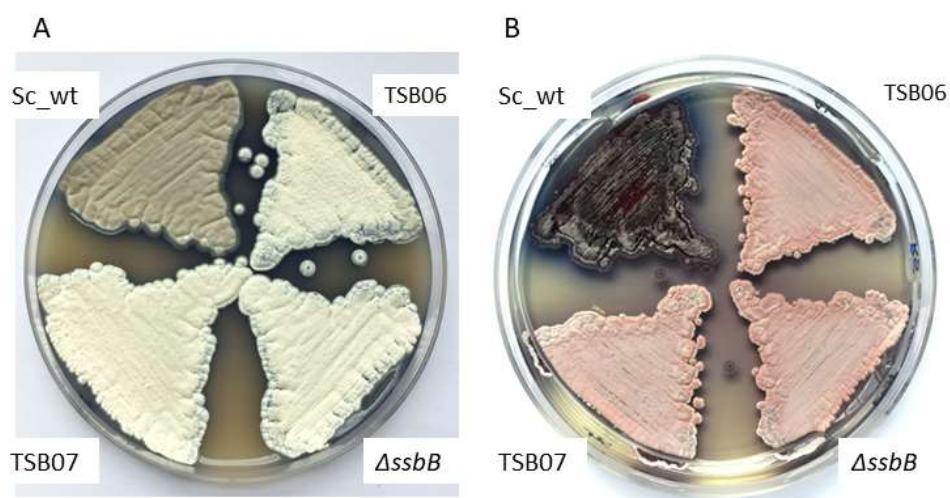
SsbB/jDNA vidljiva je kod sve tri varijante proteina s time da je zaostajanje u gelu najizraženije kod divljeg tipa proteina SsbB, manje izraženo u slučaju proteina SsbBCys₇Ala a najmanje kod proteina SsbBCys₇Ser (slika 3.3). Veća mobilnost jDNA ukazuje na slabiju sposobnost vezanja mutiranih varijanti proteina na kružnu jDNA ΦX1748.



Slika 3.3. Određivanje kompleksa ΦX174 DNA i proteina SsbB, SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser na temelju zaostajanja u gelu. Rastuće koncentracije proteina (0,25 – 1,25 μM) inkubirane su sa 7 nM ΦX174 15 min na 37°C, a zatim su kompleksi razdvojeni u 0,6% agaroznom gelu 14h, 2V/cm. (M) molekularni biljeg - MassRuler™ DNA Ladder Mix.

3.1.4 Fenotipska karakterizacija zamjene aminokiseline Cys u Ala i Ser

Kako bi se ispitala biološka funkcija proteina SsbB mutiranog u aminokiselini cistein, načinjeni su mutanti soja $\Delta ssbB$ koji je komplementiran s genom *ssbB* kojemu je aminokiselina cistein zamijenjena alaninom odnosno serinom. Metoda ciljane mutageneze aminokiseline cistein opisana je u poglavlju 2.2.4, a proces komplementacije u poglavlju 2.2.7. Dobiveni sojevi TSB06 i TSB07 fenotipski su uspoređeni su divljim tipom bakterije *S. coelicolor* te sojem $\Delta ssbB$.



Slika 3.4. Usporedba sojeva bakterije *S. coelicolor* koje nose deleciju gena $\Delta ssbB$, te sojeva koji su komplementirani genom *ssbB* s mutacijama u aminokiselini Cys (TSB06 - $\Delta ssbB_{cys7/ala}$ i TSB07 - $\Delta ssbB_{cys7/ser}$). A) Fenotip sojeva Sc wt, $\Delta ssbB$, TSB06 i TSB07 nakon 3 dana rasta na MS krutoj podlozi. B) Fenotip sojeva Sc wt, TSB06 i TSB07 nakon 3 dana rasta na R5 krutoj podlozi.

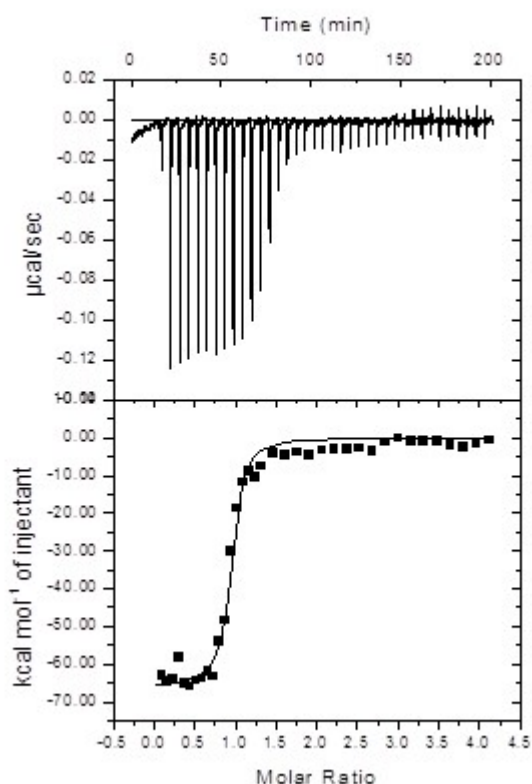
Kako je vidljivo na slici 3.4, fenotip mutanta TSB06 i TSB07 ne razlikuje se od prethodno opisanog $\Delta ssbB$ koji pokazuje bijeli (whi) fenotip karakterističan za mutante koji ne mogu dovršiti proces sazrijevanja spora. Bijeli fenotip, vidljiv na krutoj MS podlozi na sva tri soja, upućuje da komplementacija nedostatnog gena *ssbB* nije bila moguća s genom *ssbB* kojemu je onemogućeno formiranje cisteinskih mostova u kvartarnoj strukturi proteina.

3.2 Usporedna analiza stabilnosti proteina SsbB u ovisnosti o S-S mostovima

Termodinamički parametri proteina SsbB i njegovih mutiranih varijanti SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser, koji daju informacije o stabilnosti proteina ili proteinskih kompleksa dobiveni su kalorimetrijskim metodama izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC) i diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), te spektrometrijskom metodom kružnog dikroizma (CD). Vrijednosti konstante vezanja (K_s), slobodne Gibbsove energije (ΔG), entalpije (ΔH), entropije (ΔS) sustava te temperatura termičke tranzicije (T_m) dobiveni su mjerenjima pomoću metoda ITC i DSC, dok je mjerenjem CD spektara izračunat elipticitet pri 208 nm (detaljno objašnjeno u poglavlju 2.2.14).

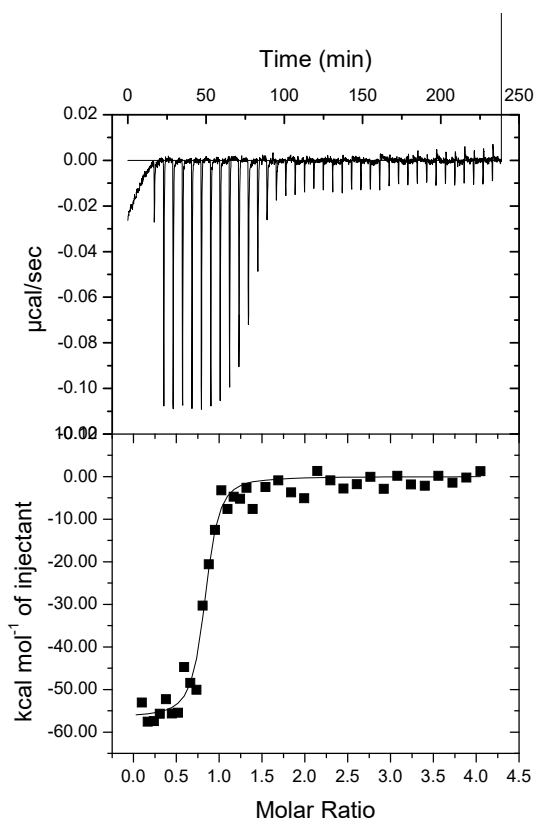
3.2.1 Određivanje stabilnosti proteina metodom ITC

Metoda ITC korištena je kako bi se dobile kvantitativne informacije o interakciji između proteina SsbB (odnosno njegovih mutiranih varijanti SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser) i jIDNA. Titracija se odvijala kao što je opisano u poglavlju 2.2.14.1 dodavanjem alikvota 10 μM oligonukleotida (dT)₄₅ u ćeliju s 0,5 μM proteinom SsbB. Pri svakoj injekciji bilježio se negativan odklon signala od bazne linije koje ukazuju da se otpušta toplina, odnosno da je reakcija vezanja proteina SsbB i jIDNA egzotermna (slike 3.5 - 3.7). Povratak na baznu liniju označilo je da je uspostavljena ravnoteža između proteina i jIDNA. Kako proces titracije napreduje, protein u ćeliji zasićuje se s jIDNA tako da je na kraju titracije jedini odziv topline posljedica razrijeđenja jIDNA. U donjem dijelu slika 3.5 - 3.7 prikazane su titracijske izoterme koje prikazuju integrirane toplinske odgovore normalizirane na količinu injektirane jIDNA (nakon oduzimanja toplina razrijeđenja) te prikazane u odnosu na molarni odnos ukupne jIDNA prema proteinu. Izmjereni termodinamički parametri tijekom vezanja naznačeni su u kvadratu pored svake slike.



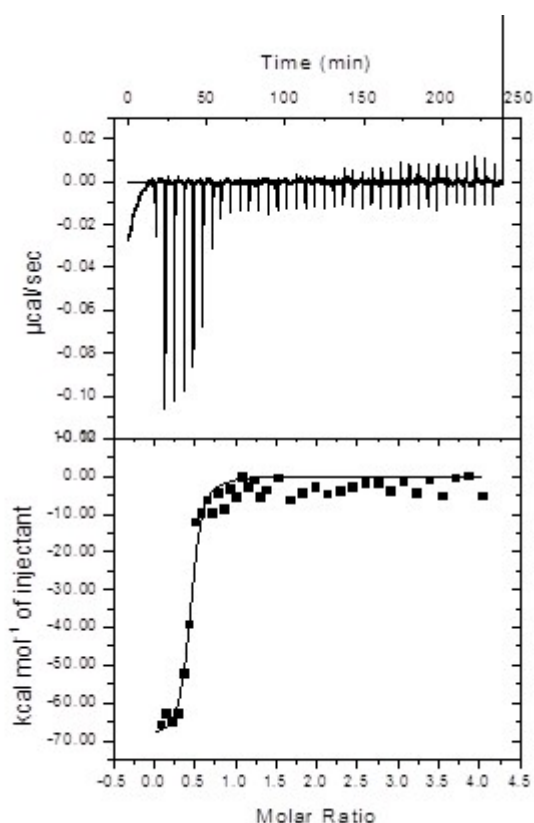
Data: (dT)₄₅, SsbB
 Model: OneSites
 N 0,928 ± 0.00998 Sites
 K_S 2,46E8 ± 5,41E7 M⁻¹
 Δ_rH -6,591E4 ± 1105 cal/mol
 Δ_rS -183 cal/mol/deg

Slika 3.5. Rezultati titracije proteina SsbB s oligonukleotidom (dT)₄₅ metodom ITC. U gornjem grafu prikazani su neobrađeni podaci titracije prikazani kao signal topline (mikrokalerija po sekundi) u ovisnosti o vremenu (izraženo u minutama). Donji graf prikazuje integrirane toplinske odgovore po injekciji, normalizirane na molove injektiranog oligonukleotida (dT)₄₅, te prikazne u odnosu na molarni odnos (Molar Ratio) ukupnog oligonukleotida i proteina [(dT)₄₅]_{tot}/[SsbB]_{tot}. Kontinuirana krivulja najbolje odgovara modelu vezanja 1:1 (OneSites) gdje su dobivene vrijednosti N = 0,928 ± 0.00998, K_S = 2,46 · 10⁸ ± 5,41E7 M⁻¹, Δ_rH = -6,591 · 10⁴ ± 1105 cal/mol, Δ_rS = -183 cal/mol/deg.



Data: (dT)₄₅, SsbCys₇Ala
 Model: OneSites
 N 0,810 ± 0,0121 Sites
 K_S 2,40E8 ± 6,72E7 M⁻¹
 Δ_rH -5,653E4 ± 1290 cal/mol
 Δ_rS -151 cal/mol/deg

Slika 3.6. Rezultati titracije proteina SsbBCys₇Ala s oligonukleotidom (dT)₄₅ metodom ITC. U gornjem grafu prikazani su sirovi podaci titracije prikazani kao signal topline (mikrokalerija po sekundi) u ovisnosti o vremenu (izraženo u minutama). Donji graf prikazuje integrirane toplinske odgovore po injekciji, normalizirane na molove injektiranog oligonukleotida (dT)₄₅, te prikazne u odnosu na molarni odnos (Molar Ratio) ukupnog oligonukleotida i proteina [(dT)₄₅]_{tot}/[SsbB]_{tot}. Kontinuirana krivulja najbolje odgovara modelu vezanja 1:1 (OneSites) gdje su dobivene vrijednosti N = 0,810 ± 0,0121, K_S = 2,40 · 10⁸ ± 6,72 · 10⁷ M⁻¹, Δ_rH = -5,653 · 10⁴ ± 1290 cal/mol, Δ_rS = -151 cal/mol/deg.

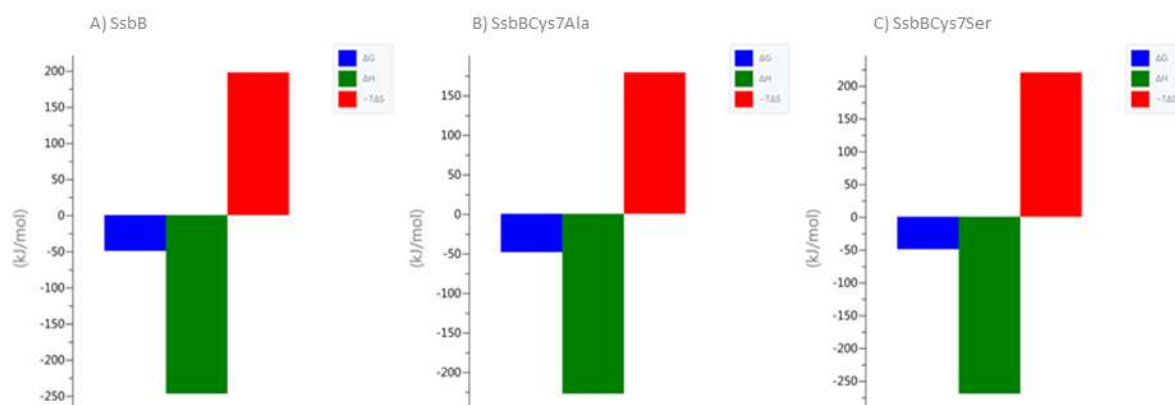


Data:	:(dT) ₄₅ , SsbBCys ₇ Ser
Model:	OneSites
N	0,430 ± 0,0122 Sites
K _S	2,06E8 ± 7,61E7 M ⁻¹
Δ _r H	-6,922E4 ± 2862 cal/mol
Δ _r S	-194 cal/mol/deg

Slika 3.7. Rezultati titracije proteina SsbBCys₇Ala s oligonukleotidom (dT)₄₅ metodom ITC. U gornjem grafu prikazani su sirovi podaci titracije prikazani kao signal topline (mikrokalorija po sekundi) u ovisnosti o vremenu (izraženo u minutama). Donji graf prikazuje integrirane toplinske odgovore po injekciji, normalizirane na molove injektiranog oligonukleotida (dT)₄₅, te prikazne u odnosu na molarni odnos (Molar Ratio) ukupnog oligonukleotida i proteina [(dT)₄₅]_{tot}/[SsbB]_{tot}. Kontinuirana krivulja najbolje odgovara modelu vezanja 1:1 (OneSites) gdje su dobivene vrijednosti N = 0,430 ± 0,0122, K_S = 2,06 · 10⁸ ± 7,61 · 10⁸ M⁻¹, Δ_rH = -6,922E4 ± 2862 cal/mol, Δ_rS = -194 cal/mol/deg.

Parametri termodinamičkog procesa vezanja oligonukleotida (dT)₄₅ i sve tri varijante proteina SsbB prikazani su i grafički radi zornijeg prikaza (slika 3.8). Na grafu je vidljiv najveći prinos entalpije (Δ_rH) koji ima negativan predznak te pozitivan prinos entropije vezanja (Δ_rS) u ukupnom negativnom prinosu slobodne Gibbsove energije (ΔG) koja je usporediva za sva tri mjerenja.

Termodinamički parametri dobiveni ili izračunati kalorimetrijskom titracijom oligonukleotidnih sekvenci (dT)₄₅ s proteinom SsbB provedene metodom ITC pokazuju usporedive konstante vezanja (K_S), entalpije (Δ_rH) i entropije (Δ_rS) između različitih varijanti proteina SsbB (slike 3.5 - 3.7), međutim razlika je vidljiva u stehiometriji vezanja prema kojoj omjer vezanja oligonukleotida i proteina pada u nizu SsbB (N = 0,928 ± 0.00998) > SsbBCys₇Ala (N = 0,810 ± 0,0121) > SsbBCys₇Ser (N = 0,430 ± 0,0122).



Slika 3.8. Grafički prikaz termodinamičkih parametara vezanja s 10 μM oligonukleotidom (dT)₄₅ dobivenih titracijom s 0,5 μM proteinima SsbB (A), SsbBCys₇Ala (B) i SsbBCys₇Ser (C) prema vrijednostima dobivenim u eksperimentima ITC prikazanim na slikama 3.5 - 3.7.

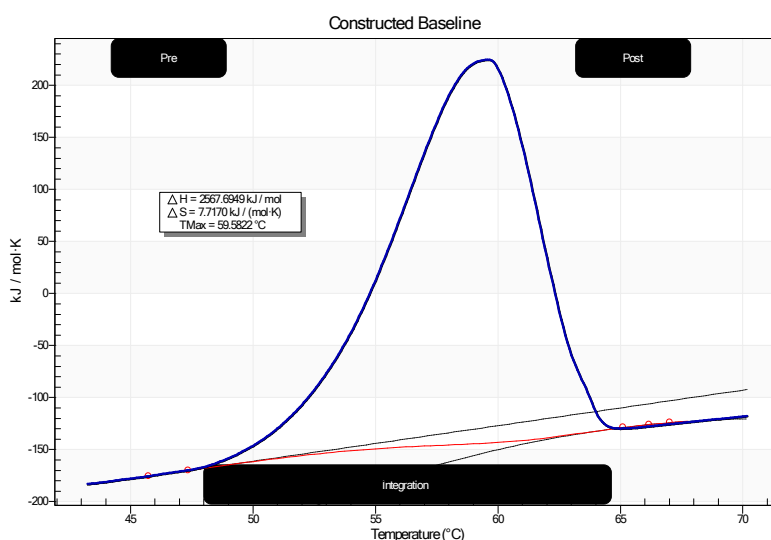
S obzirom da su se koncentracije proteina određivale posrednim spektrofotometrijskim metodama, te tako nije bilo uvida u stvarne koncentracije aktivnih konformacija proteina (tetramera) koji sudjeluju u procesu vezanja jLDNA, stehiometrijski omjeri vezanja (N) dobiveni ITC titracijama nisu se mogli precizno utvrditi odgovarajućim računskim modelom (model jednog veznog mjesta - engl. *one set of sites model*). U takvim slučajevima može se prilikom izračuna fiksirati N na poznatu veličinu (u pripadajućem programu Origin7) pa se računskim modelom dobiva koncentracija aktivne konformacije supstrata u ćeliji. Poznato je da se tetramer proteina SSB_{EC} i (dT)₄₅ vežu u omjeru 1:1, tj da je N = 1 (Lohman i Overman, 1985), pa su na taj način dobivene koncentracije tetramera prisutnih u ITC ćeliji. Računajući da su spektrofotometrijske koncentracije proteina u svim slučajevima bile jednake (0.5 μM), može se zaključiti da postotak aktivne konformacije proteina SsbB pada u nizu SsbB (92,4%) > SsbBCys₇Ala (80,2%) > SsbBCys₇Ser (41,6%) (tablica 3.1).

Tablica 3.1. Prikaz termodinamičkih parametara vezanja 10 μM oligonukleotida (dT)₄₅ dobivenih titracijom s 0,5 μM proteinima SsbB (A), SsbBCys₇Ala (B) i SsbBCys₇Ser (C) nakon obrade rezultata fiksiranjem vrijednosti N = 1.

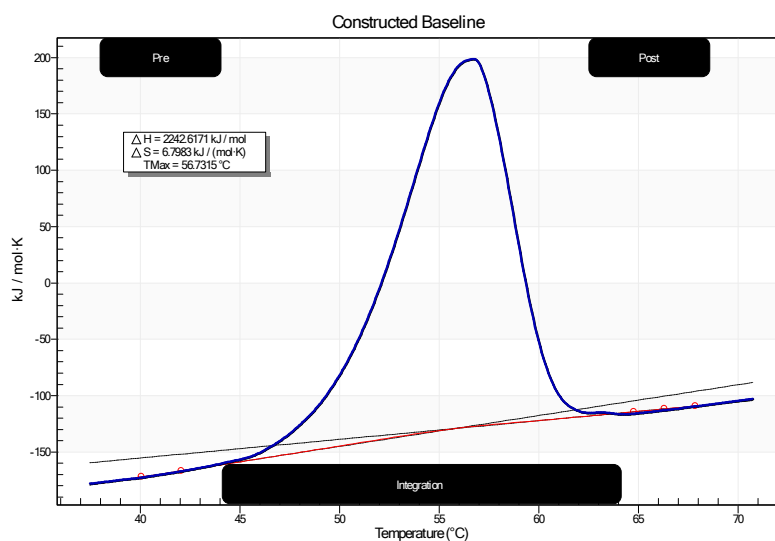
	[45dT] (μM)	[SsbB] (μM)	%[tetramer]/[protein]	N (mjesta)
SsbB	10	0,462	92,4	1
SsbBCys₇Ala	10	0,401	80,2	1
SsbBCys₇Ser	10	0,208	41,6	1

3.2.2 Određivanje stabilnosti proteina metodom DSC

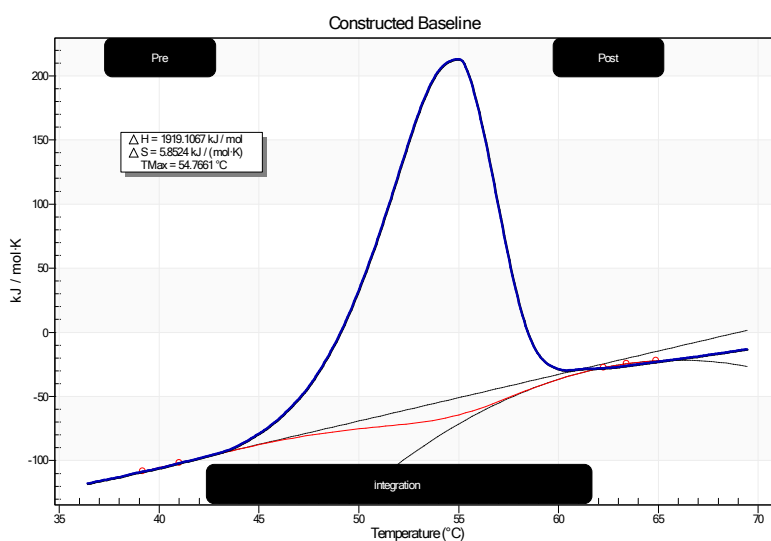
Za određivanje termičke stabilnosti proteina SsbB te njegovih mutiranih varijanti SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser korištena je razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) prema metodi opisanoj u poglavlju 2.2.14.2 čime je određena temperatura termalne tranzicije (engl. *melting temperature* – T_m) proteina SsbB, SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser. Grafičkim prikazima u nastavku prikazane su krivulje toplinskog kapaciteta u ovisnosti o temperaturi (termogrami).



Slika 3.9. Grafički prikaz podataka za entalpiju konformacijske tranzicije proteina dobivene zagrijavanjem proteina SsbB (1mg/mL u 50 mM fosfatnom puferu, pH7). Temperatura pri kojoj se dešava konformacijska tranzicija iznosila je za protein SsbB $T_m = 59,5822 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 3.10. Grafički prikaz podataka za entalpiju konformacijske tranzicije proteina dobivene zagrijavanjem proteina SsbBCys₇Ala (1mg/mL u 50mM fosfatnom puferu, pH7). Temperatura pri kojoj se dešava konformacijska tranzicija iznosila je za protein SsbBCys₇Ala $T_m = 56,7315 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 3.11. Grafički prikaz podataka za entalpiju konformacijske tranzicije proteina dobivene zagrijavanjem proteina SsbBCys₇Ser (1mg/mL u 50mM fosfatnom puferu, pH7). Temperatura pri kojoj se dešava konformacijska tranzicija iznosila je za protein SsbBCys₇Ser $T_m = 54,7661$ °C.

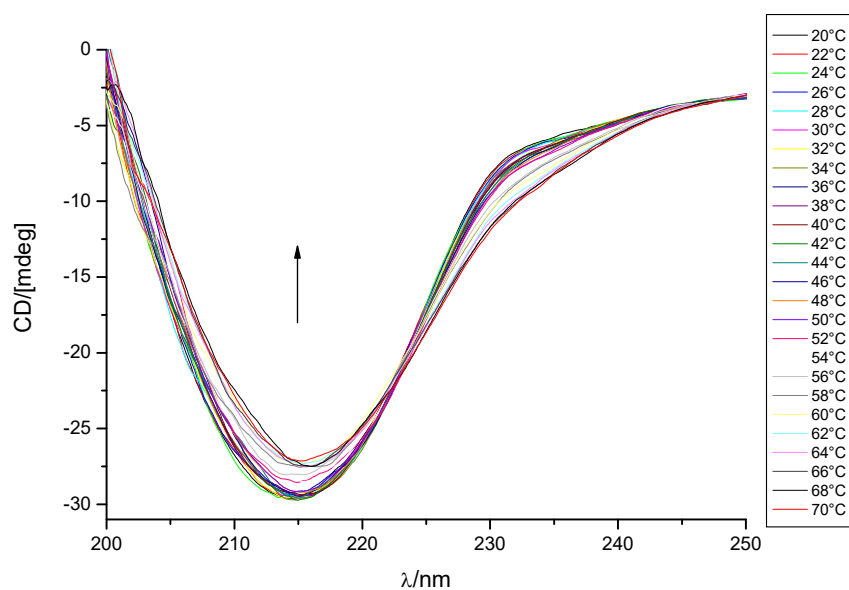
Kako je prikazano na slikama 3.9 - 3.11. prema izmjenjenim T_m vrijednostima proteina SsbB ($T_m=59,5822$ °C), SsbBCys₇Ala ($T_m=56,7315$ °C) i SsbBCys₇Ser ($T_m=54,7661$ °C) vidljiv je pad u termičkoj stabilnosti mutiranih varijanti proteina u odnosu na divlji tip proteina SsbB.

3.2.3 Određivanje stabilnosti proteina metodom CD

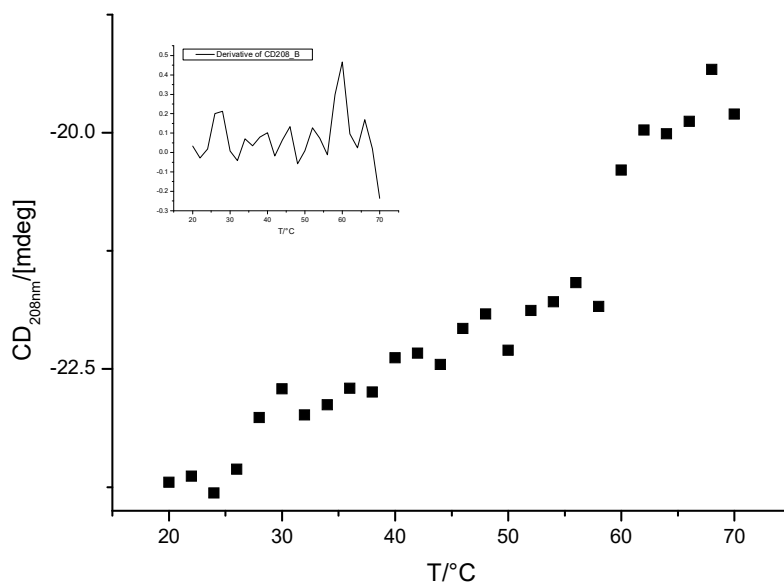
Pored DSC analize napravljene su komplementarne analize pomoću CD spektrometrije koje daju dodatne informacije o konformaciji sekundarnih struktura proteina (Kirkitadze i sur., 1999). Kako bi se utvrdilo postoje li razlike u strukturi divljeg tipa proteina SsbB te njegovih mutiranih varijanti, SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser, izmjereni su CD spektri za pročišćene proteine kako je opisano u poglavlju 2.2.15.

Spektri kružnog dikroizma otopine proteina SsbB, SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser te promjene u vrpčama α -heliksa tijekom zagrijavanja proteina prikazane su na slikama 3.12 - 3.17. Iako se CD spektri proteina SsbB i SsbBCys₇Ala ne razlikuju bitno tijekom zagrijavanja proteina, iz CD spektra proteina SsbBCys₇Ser vidljiva je termička tranzicija pri nešto nižoj temperaturi u odnosu na SsbB ili SsbBCys₇Ala (slike 3.13, 3.15 i 3.17). Mjerenjem promjene u CD signalu pri 208 nm, odnosno gubitka α -heliksa dobivena je krivulja iz koje je izračunata prva derivacija (insert u slikama) a iz koje je zatim iščitana T_m za svki protein (origin 7). Srednja temperatura denaturacije proteina za divlji tip proteina SsbB i protein

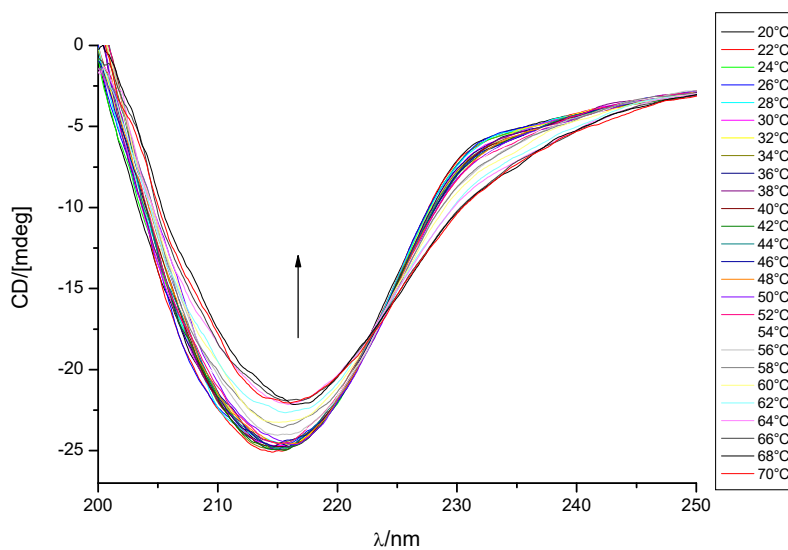
SsbBCys₇Ala iznosi 60°C, dok je kod proteina SsbBCys₇Ser najveća konformacijska promjena bila na 58°C.



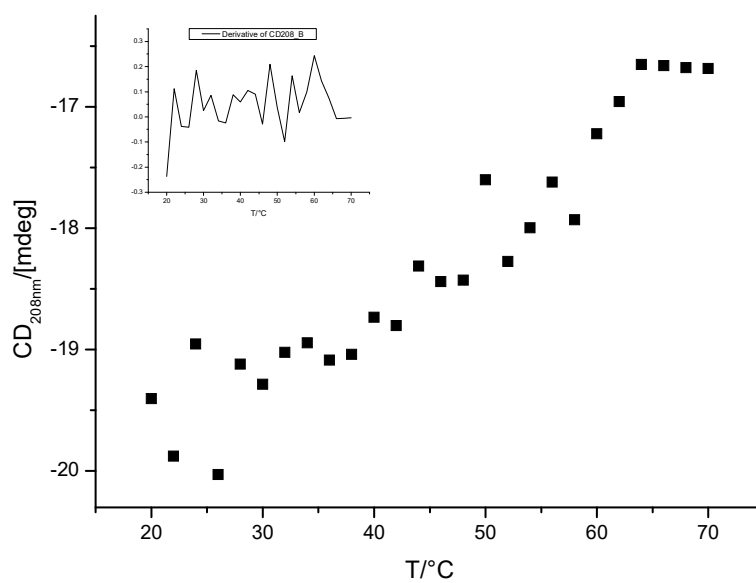
Slika 3.12. Spektri kružnog dikroizma (CD) snimljeni prilikom zagrijavanja SsbB (1mgmL^{-1} u 50mM fosfatnom puferu, pH7) u rasponu temperature 20-70°C.



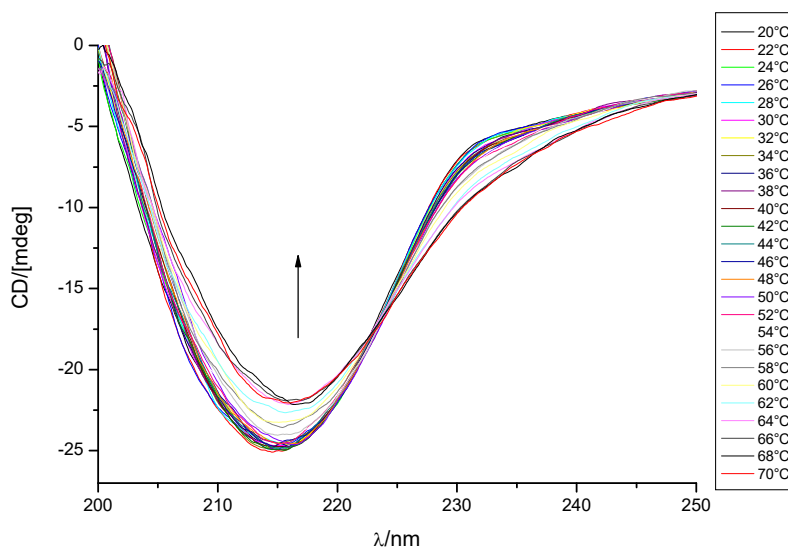
Slika 3.13. Promjena CD signala pri 208nm (vrpca α -heliksa) prilikom zagrijavanja SsbB (1mgmL^{-1} u 50mM fosfatnom puferu, pH7) u rasponu temperature 20-70°C. Insert je derivacija dobivenih rezultata, pik je na 60°C.



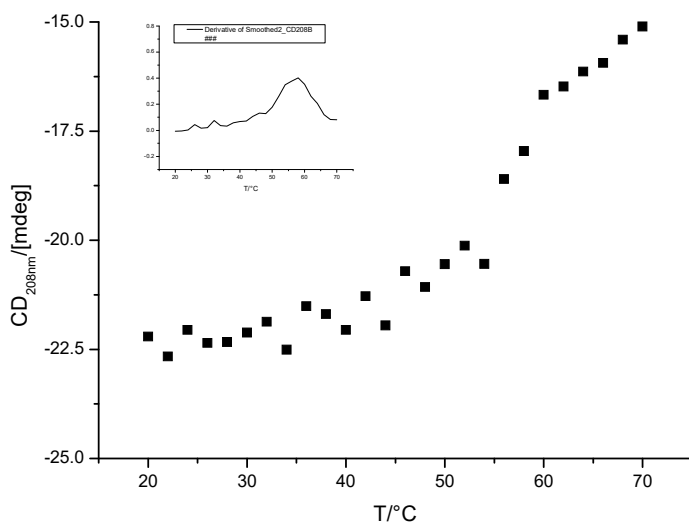
Slika 3.14. Spektri kružnog dikroizma (CD) snimljeni prilikom zagrijavanja i SsbBCys₇Ala (1mgmL⁻¹ u 50mM fosfatnom puferu, pH7) u rasponu temperature 20-70°C.



Slika 3.15. Promjena CD signala pri 208nm (vrpca α -heliksa) prilikom zagrijavanja i SsbBCys₇Ala (1mgmL⁻¹ u 50mM fosfatnom puferu, pH7) u rasponu temperature 20-70°C. Inset je derivacija dobivenih rezultata, pik je na 60°C.



Slika 3.16. Spektri kružnog dikroizma (CD) snimljeni prilikom zagrijavanja i SsbBCys₇Ser (1mgmL⁻¹ u 50mM fosfatnom puferu, pH7) u rasponu temperature 20-70°C.



Slika 3.17. Promjena CD signala pri 208nm (vrpca α -heliksa) prilikom zagrijavanja SsbBCys₇Ser (1mgmL⁻¹ u 50mM fosfatnom puferu, pH7) u rasponu temperature 20-70°C. Insert je derivacija dobivenih rezultata, pik je na 58°C.

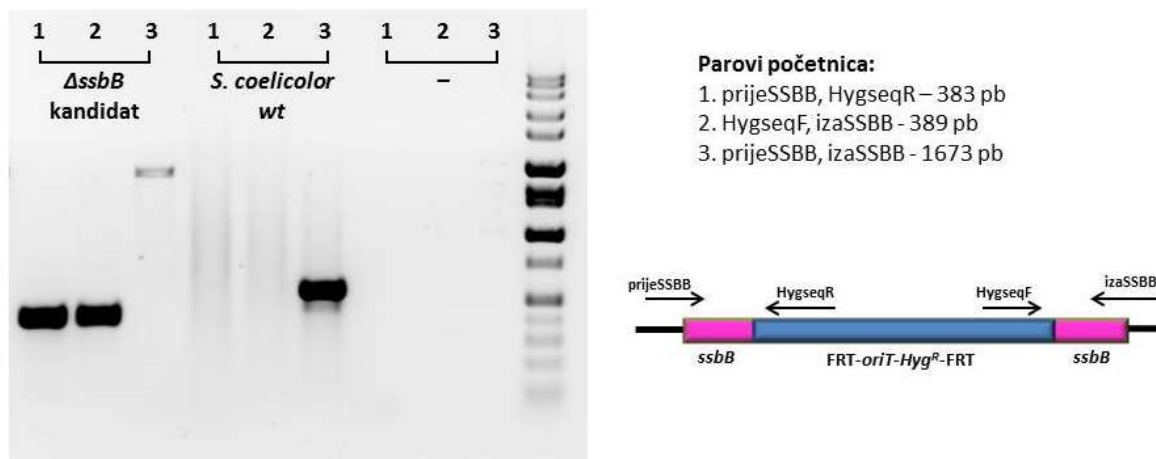
3.3 Razjašnjavanje uloge proteina SsbB u procesu segregacije kromosoma tijekom sporulacije bakterije *S. coelicolor*

3.3.1 Konstrukcija i fenotipska karakterizacija mutanata $\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta smc\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta parB\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB::Apra,Hyg$

Kako bi se pobliže razjasnila uloga proteina SsbB u procesima segregacije kromosoma tijekom sporulacije, metodom detaljno opisanom u poglavlju 2.2.8, načinjeni su dvostruki i trostruki mutanti gena *ssbB* u sojevima za koje je također poznato da sudjeluju u segregaciji kromosoma (Δsmc , $\Delta parB$, te u dvostrukom mutantu $\Delta smc\Delta parB$ dobiveni ljubaznošću prof. Jakimowicz D., Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Poland).

Gen *ssbB* zamijenjen je genom koji nosi rezistenciju na antibiotik u sva tri soja metodom opisanom u poglavlju 2.2.8. Budući da dvostruki mutant za *smc* i *parB* nosi Apra rezistenciju, a transpozonski kozmid pomoću kojega je napravljena mutacija gena *ssbB* sadrži istu rezistenciju, u prvom koraku bilo je potrebno napraviti zamjenu rezistencijske kazete na kozmidu kojim će se provesti konjugacija te ponoviti mutaciju gena *ssbB* s novom (Hyg) rezistencijom. U tu svrhu korišten je plazmid pIJ10700 (tablica 2.5) kao kalup za dobivanje mutagene kazete (FRT-*oriT*-Hyg^R-FRT). Ta je kazeta dalje unesena u kozmid homolognom rekombinacijom te je dobiveni kozmid nazvan 6CO7Hyg.

Pomoću ovog kozmida je provedena konjugacija s gore navedenim sojevima te divljim tipom *S. coelicolor* M145, čime su dobiveni jednostruki, dvostruki i trostruki mutanti kako slijedi: $\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta smc\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta parB\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB::Apra,Hyg$ (tablica 3.2). Nakon konjugacije ispitano je približno 100 kolonija ekskonjuganata za svaki eksperiment, od čega je oko 10% kolonija imalo željeni genotip, što je u skladu s očekivanim rezultatima dvostruke rekombinacije (Gust i sur., 2004). Ekskonjuganati koji su imali očekivani genotip, Kan^SHyg^R te Kan^SApra^RHyg^R (vidi poglavlje 2.2.8) dodatno su ispitani PCR reakcijom pomoću parova početnica navedenih u tablici 3.1 i 2.6, kako bi se potvrdila ugradnja rezistencijske kazete na mjestu gena *ssbB* (slika 3.18).



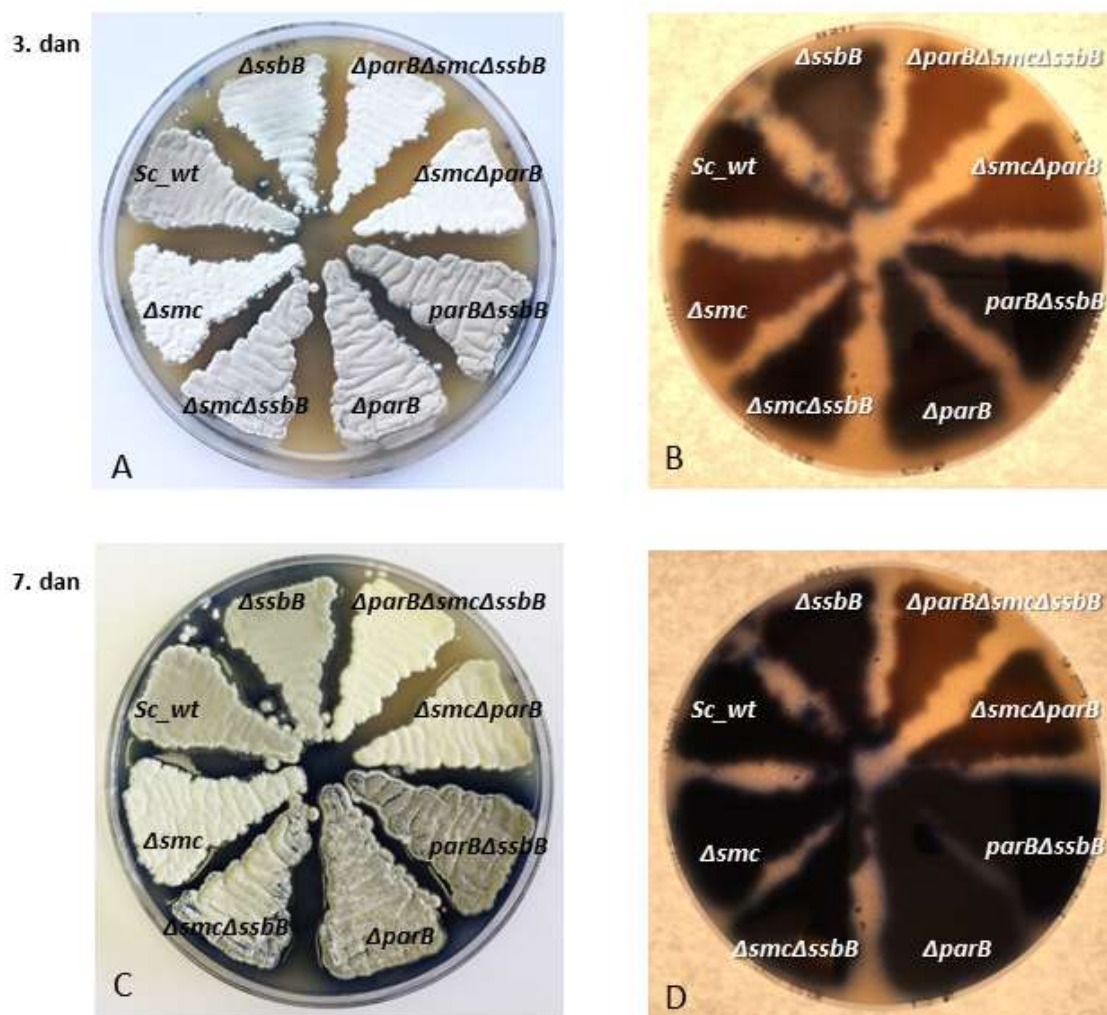
Slika 3.18. PCR produkti koji potvrđuju ispravno mjesto ugradnje rezistencijske kazete FRT-oriT-HygR-FRT unutar gena *ssbB*. Brojevi iznad jažica označavaju par početnica korišten u reakciji PCR, naznačen desno zajedno s veličinom dobivenog odsječka DNA. Reakcija PCR s istim parom početnica provedena je i s genomskom DNA divljeg tipa bakterije *S. coelicolor* M145 kao kalupom, te bez kalupa kao negativna kontrola (-). Soj mutiran u genu *ssbB* sadrži integriranu rezistencijsku kazetu (linija 1, 2 i 3, $\Delta ssbB$ kandidat) za razliku od divljeg tipa M145 gdje je vidljiv samo produkt čija veličina od 542 pb odgovara divljem tipu gena *ssbB* (linija 3, *S. coelicolor* wt).

Tablica 3.2. Konstrukcija dvostrukih i trostrukih mutanata pomoću kozmida 6CO7Hyg.

Početni soj <i>S. coelicolor</i>	Kozmid za konjugaciju	Dobiveni soj i rezistencija
wt	6CO7Hyg	$\Delta ssbB::Hyg$
Δsmc	6CO7Hyg	$\Delta smc\Delta ssbB::Hyg$
$\Delta parB$	6CO7Hyg	$\Delta parB\Delta ssbB::Hyg$
$\Delta parB\Delta smc::Apra$	6CO7Hyg	$\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB::Apra, Hyg$

Dobiveni sojevi uzgojeni su u tekućem mediju CRM (poglavlje 2.1.3) nakon čega su naciepljeni na krutu podlogu MS i uzgajani pri optimalnoj temperaturi tijekom 7 dana radi daljnjih fenotipskih analiza (slika 3.19). Kao što je navedeno u uvodnom dijelu, ParB tvori nukleoproteinski kompleks vežući *parS* mjesta na DNA u blizini mjesta *oriC*, te pomoću ATPaze ParA, segregira te komplekse na odgovarajuća mjesta u stanici (Gerdes i sur., 2010; Kois-Ostrowska i sur., 2016; Mierzejewska i Jagura-Burdzy, 2012), dok SMC sudjeluje u kondenzaciji i organizaciji nukleoida (Kois i sur., 2009). Budući da oba proteina tvore nukleoproteinske komplekse nužne za učinkovitu segregaciju kromosoma, testirali smo učinak dvostruke mutacije genotipova $\Delta parB$ i Δsmc s genom *ssbB* ($\Delta parB\Delta ssbB$ i $\Delta smc\Delta ssbB$), te trostruke mutacije $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB$ kako bi odredili sudjeluju li produkti

ovih gena u istom ili različitom staničnom procesu (mehanizmu) koji kontrolira segregaciju bakterijskog kromosma tijekom reproduktivne faze kao i produkt gena *ssbB*.



Slika 3.19. Usporedba fenotipova divljeg tipa bakterije *S. coelicolor* M145 s dvostrukim i trostrukim mutantima *ssbB*: $\Delta ssbB::Hyg$; $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB::Apra,Hyg$; $\Delta smc\Delta parB::Apra$; $\Delta parB\Delta ssbB::Hyg$; $\Delta parB$; $\Delta smc\Delta ssbB::Hyg$; Δsmc te divlji tip *Sc wt* (M145). Sojevi su nacijepljeni na kruti MS medij i uzgajane pri 30°C. Fenotipovi mutanata zabilježeni su 3. i 7. dan (A i C) dok se količine izlučenog antibiotika pojedinih sojeva bolje uočavaju na poledini Petrijeve zdjelice (B i D) kao tamno plavo obojenje podloge.

Kao što je vidljivo na slici 3.19, fenotip soja kojemu je *ssbB* zamijenjen higromicinskom kasetom, također zadržava bijeli fenotip nakon 3 dana rasta na MS podlozi. Međutim, nakon produljenog rasta (7. dan) vidljivo je da površina kolonija postaje sivkasta, ukazujući da nakon nekog vremena dio spora može dovršiti proces pigmentacije, odnosno zrele spore u kojima su se kromosomi pravilno razdijelili, akumulirali su u svojim stjenkama sivi pigment (Chater i Chandra, 2006). Zamjena gena *ssbB* u jednostrukim mutantima Δsmc i $\Delta parB$ te u dvostrukom mutantu $\Delta smc\Delta parB$ pomoću higromicinske rezistencijske kazete (detaljno opisano u poglavlju 2.2.8) dala je vijabilne kolonije koje

nisu vidljivo zaostajale u rastu. Soj $\Delta parB\Delta ssbB$ ističe se izrazito sivom pigmentacijom spora, koja je bila intenzivnija od spora koje su se razvile na površini kolonija divljeg tipa *S. coelicolor*. Također se uočava kako dvostruki mutant $\Delta parB\Delta ssbB$ u usporedbi s ostalim sojevima intenzivno luči aktinorodin, antibiotik plavog obojenja (slika 3.19, B i D). Za usporedbu, jednostruki mutant $\Delta parB$ se ne razlikuje u ranoj fazi od $\Delta parB\Delta ssbB$ ili divljeg tipa *S. coelicolor*, ali nakon produljenog rasta (7. dan) na površini se uočava više bijelih točkastih područja koja ukazuju kako nije došlo do pravilnog sazrijevanja spora. Kod soja $\Delta parB$ se također uočava intenzivna produkcija aktinorodina (slika 3.19 B i D).

Soj Δsmc pokazuje heterogeni uzorak zračnog micelija, ali je u provedenom eksperimentu zadržao svjetlije obojenje (svjetlo siva površina). Na površini su u prvim fazama rasta (nakon 3 dana) uočena siva točkasta područja, ali je nakon sedam dana uzgoja prevladao bijeli fenotip (slika 3.19, C). Soj $\Delta smc\Delta ssbB$ fenotipski je bio sličan divljem tipu nakon 3 dana, ali nakon toga zadržava svjetliju boju. Osim toga, na površini koja graniči s $\Delta parB$ nakuplja se aktinorodin. Zanimljivo, trostruki mutant $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB$ zadržava izrazito bijeli fenotip i ističe se potpunom supresijom lučenja antibiotika čak i nakon produžene faze rasta (slika 3.19, B i D).

3.3.2 Analize zračnih micelija i spora mutanata $\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta smc\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta parB\Delta ssbB::Hyg$, $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB::Apra, Hyg$ pomoću fluorescencijske mikroskopije

Kako bi se dodatno analizirao defekt u segregaciji kromosoma na razini spora, navedeni mutanti analizirani su konfokalnom laserskom mikroskopijom (poglavlje 2.2.17). Vizualizacija DNA provedena je pomoću propidij-jodida, a peptidoglikana u stijenci pomoću boje FITC-WGA kao što je opisano u poglavlju 2.2.17.

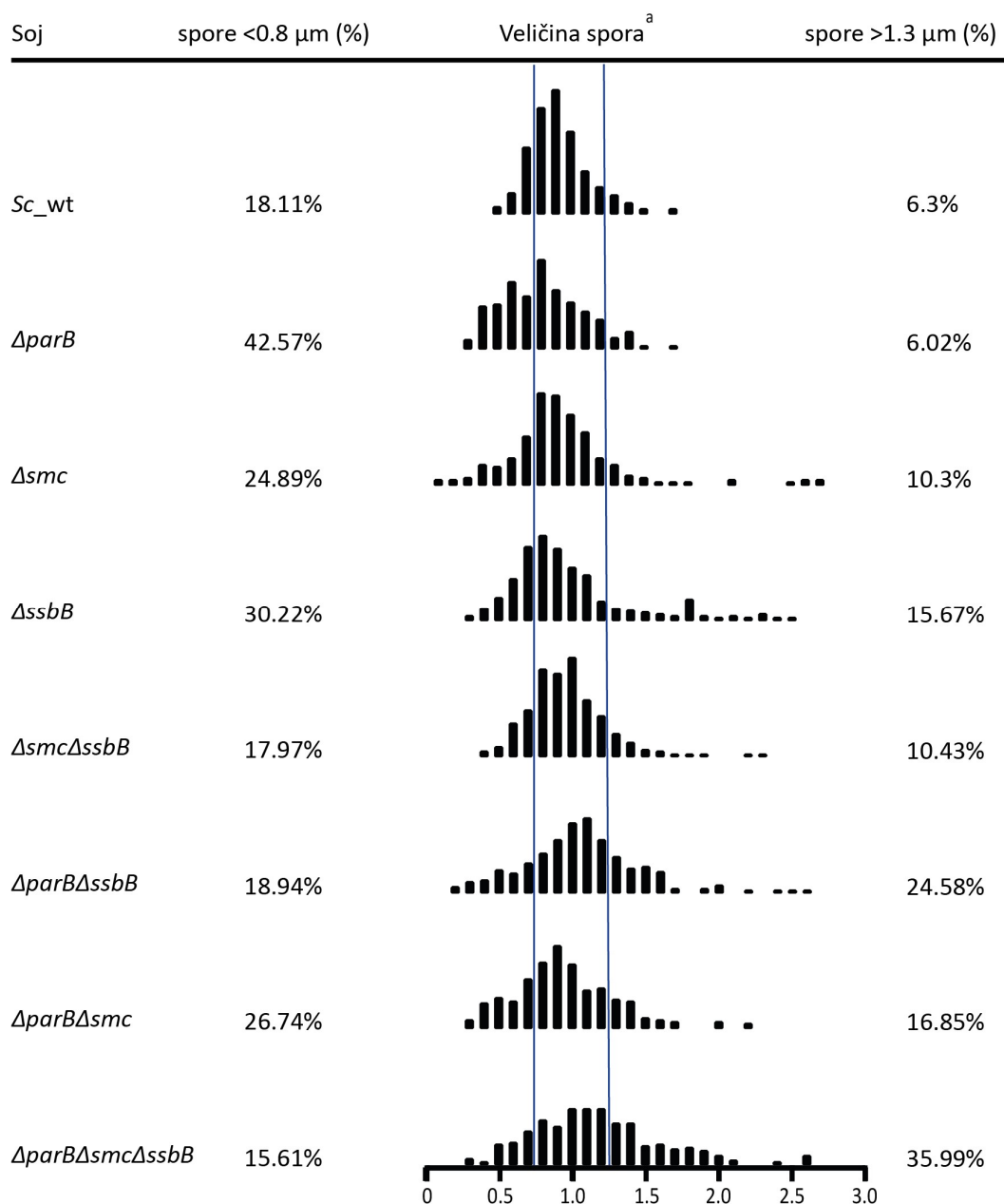
Mikroskopska analiza spora u soju $\Delta ssbB::Hyg$ pokazala je anukleiranost u 31% spora, što je u skladu s prethodnim rezultatima za $\Delta ssbB$ koji nosi rezistenciju na apramicin (Paradžik i sur., 2013). Soj Δsmc pokazao je defekt u segregaciji spora od 7%, što je u skladu s postojećim literaturnim podacima (tablica 3.3), dok je dvostruki mutant $\Delta smc\Delta ssbB$ imao smanjeni postotak anukleiranih spora (svega 7%) u odnosu na samu mutaciju $\Delta ssbB$, ali je uočena promjena u razdiobi kromosoma po sporama gdje su vidljive spore s izraženim viškom DNA (slika 3.21). Analiza veličine spora pokazuju smanjenu frekvenciju spora ispod prosječne duljine, u odnosu na pojedinačne mutanate (slika 3.20). Osim toga, zračne hife sa sporama su kod $\Delta smc\Delta ssbB$ bile rijetke i s jako izraženom hidrofobnosti zbog čega je bilo teško pronaći pojedinačne hife za analizu. Vrlo sličan efekt uočava se u dvostrukoj mutaciji gena $parB$ i $ssbB$ gdje se postotak anukleiranosti spora preklapa sa samom mutacijom u genu $parB$ (16%) (tablica 3.3), ali se dodatni segregacijski defekt uočen je i kod ovog mutanta (slike 3.22). Analiza veličina spora pokazala je smanjenje u frekvenciji ispodprosječno dugačkih spora, dok se povećao udio spora iznad prosječne veličine (slika 3.20).

Tablica 3.3. Utjecaj nedostatka gena $ssbB$, smc i $parB$ na segregaciju kromosoma *S. coelicolor*. Rezultati su uspoređeni s postojećim literaturnim podacima.

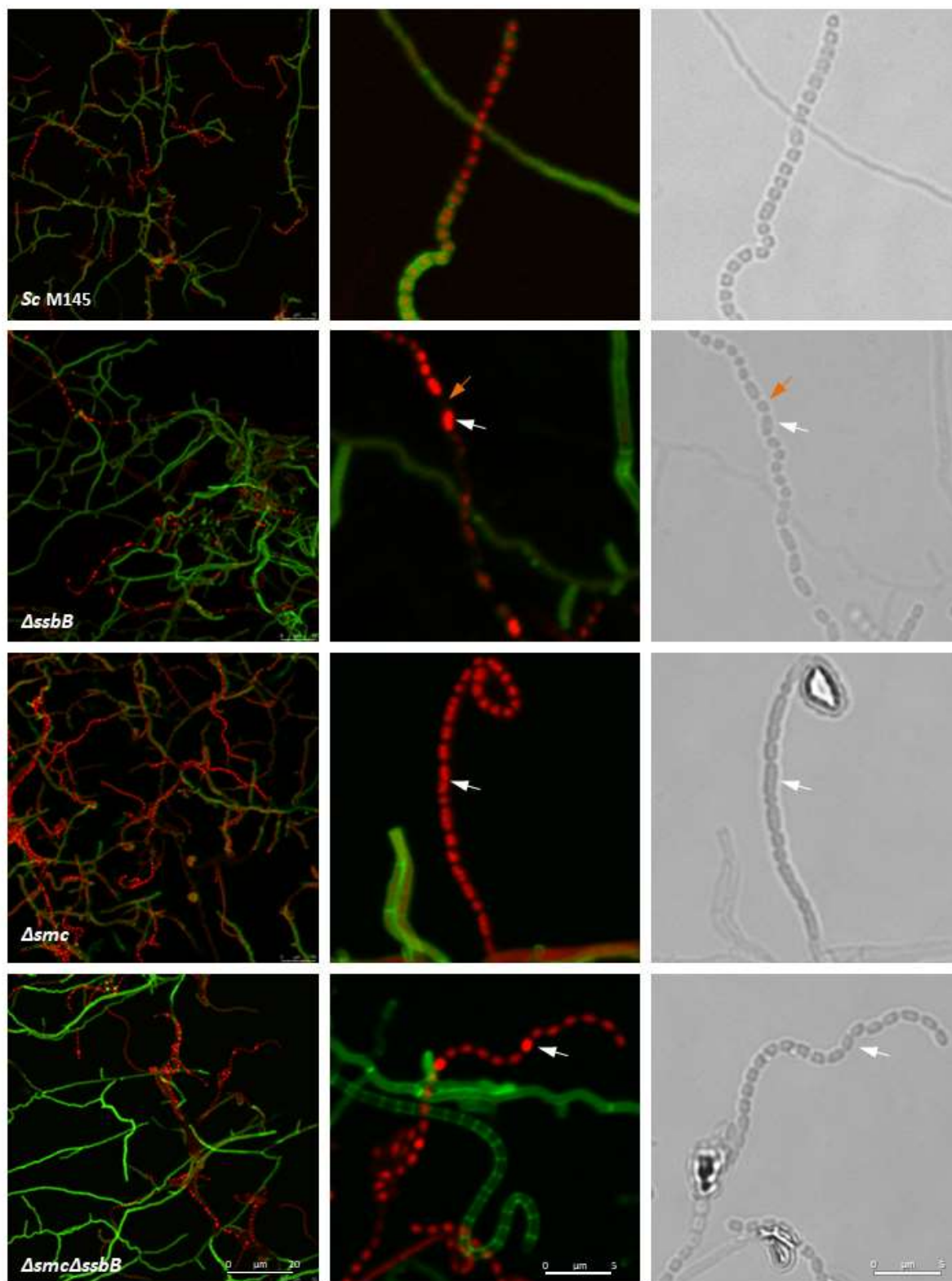
Soj ili genotip	Postotak anukleiranih spora (%) ^a (ovaj rad)	Postotak anukleiranih spora (%) (Kois i sur, 2009)	Postotak anukleiranih spora (%) (Dedrick i sur, 2009)
<i>S. coelicolor</i> M145	0,5	1,4	0,8
$\Delta ssbB::Hyg$	31		
Δsmc	7,5	7,5	7
$\Delta smc\Delta ssbB::Hyg$	7		
$\Delta parB$	16	19,5	12
$\Delta parB\Delta ssbB::Hyg$	16		
$\Delta smc\Delta parB::Apra$	19	24,5	24
$\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB::Apra, Hyg$	16		

^a Izračunato na minimalno 500 spora za svaki mutirani genotip te divlji tip *S. coelicolor*

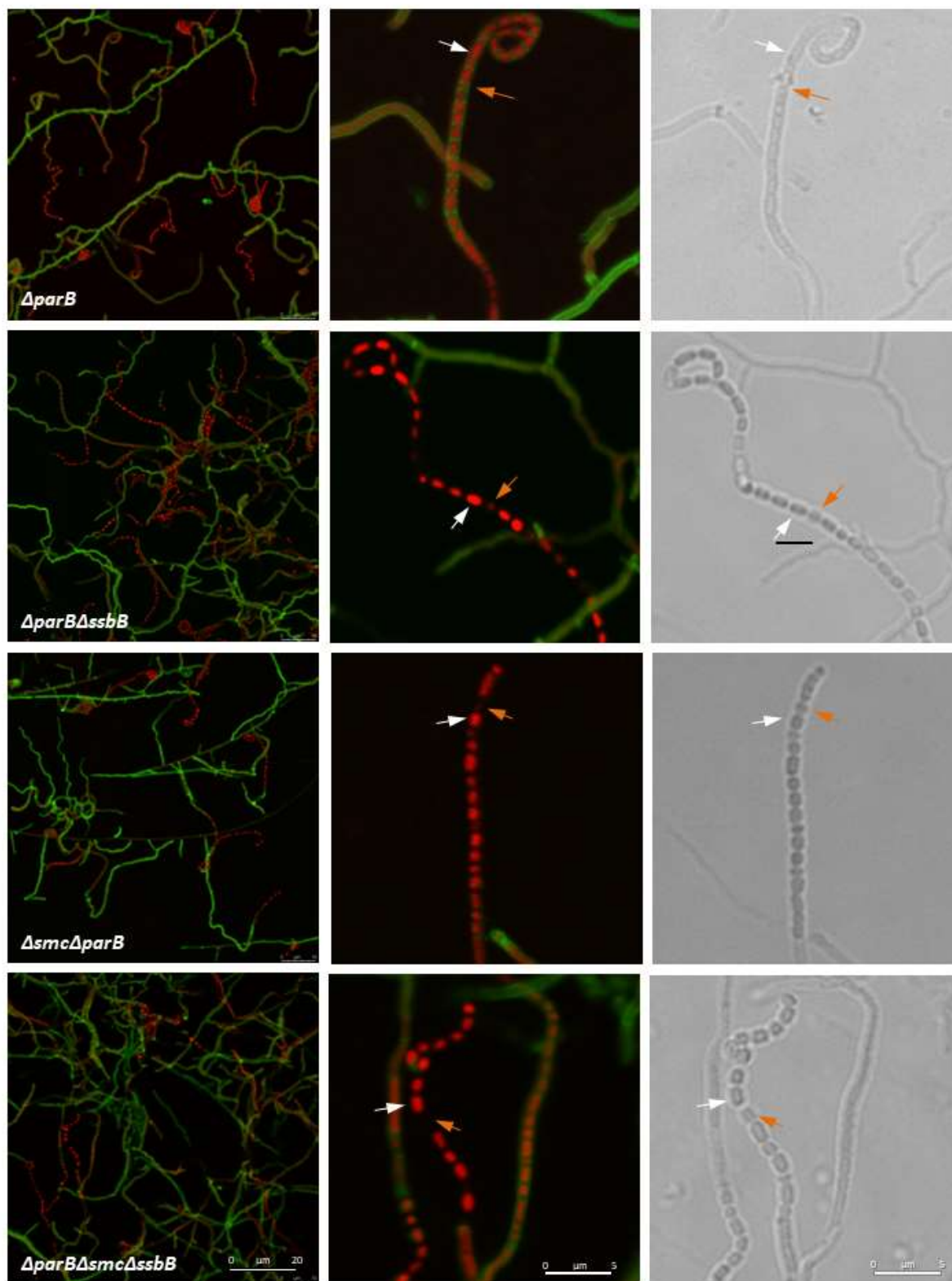
Trostruka mutacija $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB$ također nije dala aditivni efekt u smislu anukleiranosti spora, budući da svega 16% spora ne sadrži uopće DNA. Međutim, već sam fenotip pokazuje da se ne radi o „bald” efektu, ali je formiranje zračnog micelija slabije u odnosu na ostale analizirane sojeve i na mjestima gdje se pronalaze sporogeni lanci, oni su manji ili znatno duži od prosjeka s vidljivim defektom u segregaciji (slika 3.20 i 3.22). Analize duljine spora pokazale su naveću frekvenciju spora koje sadrže više DNA (35.99%) od svih analiziranih mutanata, dok je udio spora manjih od prosječne duljine bio manji od pojedinačnih mutacija, blizu divljem tipu (slika 3.20).



Slika 3.20. Statistička analiza veličine spora različitih mutanata. Uz grafički prikaz različite distribucije veličine spora navedeni su postoci spora koji se nalaze ispod (<0,8 μm) ili iznad (>1,3 μm) prosječne vrijednosti duljine spora za divlji tip *S. coelicolor*. Prosječna duljina spora nalazi se između plavih linija.



Slika 3.21. Mikroskopske analize konfokalnom mikroskopijom prikazuju sporulaciju i defekt u segregaciji kromosoma divljeg tipa bakterije *S. coelicolor* te mutanata $\Delta ssbB$, Δsmc i $\Delta smc\Delta ssbB$. U prvom stupcu prikazan je vegetativni micelij s lancima spora (skala - 20 μm). U srednjem i desnom stupcu uvećani su lanci spora karakteristični za određeni fenotip (skala-5 μm). Bijele strelice ističu spore s povećanim sadržajem DNA, a narančaste strelice prikazuju spore s malom količinom DNA ili prazne spore. Prva dva stupca prikazuju spojene snimke fluorescencije propidij-jodida (nukleoida) i WGA (stanične stijenke), dok je u krajnjem desnom stupcu prikaz svjetlog polja.

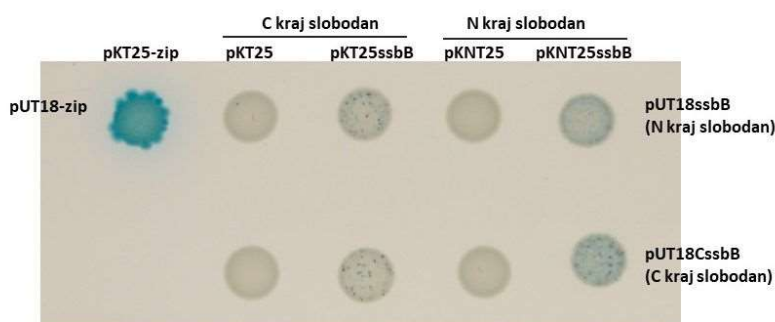


Slika 3.22. Mikroskopske analize napravljene konfokalnom mikroskopijom prikazuju sporulaciju i defekt u segregaciji kromosoma mutanata *S. coelicolor* $\Delta parB$, $\Delta parB\Delta ssbB$, $\Delta smc\Delta parB$ i $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB$. U prvom stupcu prikazan je vegetativni micelij s lancima spora (skala - 20 μm). U srednjem i desnom stupcu istaknuti su lanci spora karakteristični za određeni fenotip (skala - 5 μm). Bijele strelice ističu spore s povećanim sadržajem DNA, a narančaste strelice prikazuju spore s malom količinom DNA ili prazne spore. Prva dva stupca prikazuju spojene snimke fluorescencije propidij-jodida (nukleoida) i WGA (stanične stijenke), dok je u krajnjem desnom stupcu prikaz svjetlog polja.

3.4 Identifikacija interaktanata proteina SsbB pomoću bakterijskog sustava dvaju hibrida (BACTH)

U ovom radu prikazane analize dvostrukih i trostrukih mutanata ukazale su na dodatne defekte tijekom sazrijevanja spora (poglavlje 3.2). No, iz dobivenih rezultata nije se mogao identificirati stanični proces ili mehanizam u kojem sudjeluje protein SsbB, a koji je odgovoran za defekt segregacije u bakteriji *S. coelicolor*. Zato je u nastavku istraživanja primjenjen bakterijski sustav dvaju hibrida (BACTH) kako bi se identificirale proteinske interakcije koje ostvaruje protein SsbB. Kao što je opisano u poglavlju 2.2.9, bakterijski sustav dvaju hibrida se temelji na aktivaciji ekspresije gena *lacZ* nakon interakcije dviju podjedinica adenilat-ciklaze (Karimova i sur., 1998) koje uzrokuje plavo obojenje kolonija. Postupak izrade plazmida koji sadrže gen *ssbB* i služe kao „mamac”, i plazmida koji sadrže dijelove genoma („plijena”) te kontrolnih plazmida, detaljno je opisan u poglavlju 2.2.9. Genetički konstrukti napravljeni u ovom radu omogućili su praćenje ostvarivanja interakcija preko N ili C kraja proteina SsbB te time identifikaciju i domenu koja je važna za pojedinačnu interakciju.

Unakrsno testiranje svih konstrukata provedeno je prije pretraživanja biblioteke kako bi se isključile lažno pozitivne reakcije između plazmida mamca i plazmida plijena. Kako je prikazano (slika 3.23) kotransformacija plazmida s genom *ssbB* i plazmida bez fragmenata genoma *S. coelicolor* rezultiralo je bijelim kolonijama. Nasuprot tome, pojedinačne kolonije plavog obojenja uočene su kotransformacijom plazmida (mamca i plijena) koji imaju gen *ssbB*. Ovaj fenotip se pojavljivao u svim kombinacijama slobodnih krajeva polipeptida SsbB.



Slika 3.23. Kontrolna transformacija konstrukata plazmida za pretraživanje biblioteke gena bakterije *S. coelicolor*. Kontrole uključuju kotransformaciju plazmida mamca koji sadrži gen *ssbB* s T18 podjedinicom CyaA (pUT18*ssbB* i pUT18C*ssbB*) te plazmida koji sadrži T25 podjedinicu CyaA s genom *ssbB* (pKT25*ssbB* i pKNT25*ssbB*) ili bez ukloniranog gena *ssbB* (pKT25 i pKNT25). Kao pozitivna kontrola koriste se plazmidi pKT25-*zip* i pUT18C-*zip* koji nakon kotransformacije u *E. coli* BTH101 vraćaju tipičan Cya⁺ fenotip.

Pretraživanje biblioteke genoma bakterije *S. coelicolor* obavljeno je na minimalno 50 000 kolonija za protein sa slobodnim C-krajem (plazmidom „mamcem” pUT18CsbB), te isto toliko za SsbB sa slobodnim N-krajem (plazmidom „mamcem” pUT18ssbB). Tijekom 2 do 4 dana plavi fenotip pojavio se u 56 kolonija. Plazmidi s genima koji kodiraju za potencijalne proteine interaktante su izolirani i ponovno kotransformirani s plazmidima mamcima. Kod 26 kolonija zadržao se CyaA⁺ fenotip (plave kolonije) te su njihovi plazmidi poslani na sekvenciranje. Kako bi se provjerilo da li je u ovim proteinskim interakcijama važan C- kraj proteina SsbB, napravljene su dodatne analize kotransformacije, bez ukupne analize biblioteke. Izdvojeni plazmidi, koji sadrže potencijalne proteinske interaktante, kotransformirani su s plazmidima pUT18ssbBΔC (slobodan C-kraj proteina T18-SsbBΔC) i pUT18NssbBΔC (slobodan N-kraj proteina SsbBΔC-T18) koji kodiraju za protein SsbBΔC kojem nedostaje 111 aminokiselina na C-kraju. Pozitivnu reakciju (plavi fenotip) nakon kotransformacije imale su sve analizirane kolonije kao i u slučaju divljeg tipa proteina (tablica 3.4, zadnja dva stupca).

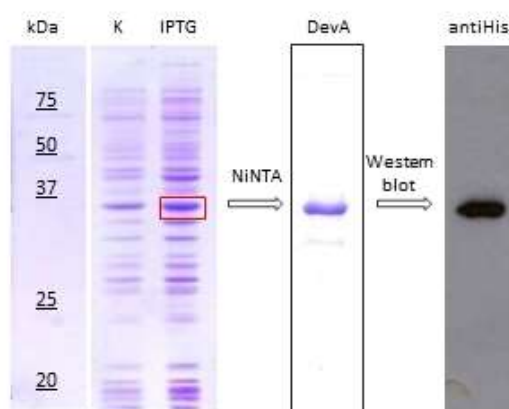
Tablica 3.4. Prikaz rezultata pretrage biblioteke gena *S. coelicolor* bakterijskim sustavom dvaju hibrida. Različitim bojama naglašeni su stanični procesi u koje su uključeni identificirani geni, a svjetlo plavom bojom ostvarene proteinske interakcije.

Stanični procesi	DNA fragment iz biblioteke <i>S. coelicolor</i> koji kodira za	SsbB-T18	T18-SsbB	SsbBΔC-T18	T18-SsbBΔC
Metabolizan	navodna sekretorna hidrolaza	22	4C		
	navodna sekretorna oksidoreduktaza		6C, 17C		
	navodna 2 - izopropilmalat sintaza	2, 8, 42	10C		
Regulacija transkripcije	GntR - transkripcijski regulator	13, 23, 27, 28, 43	8C, 12C		
	navodni lysR - transkripcijski regulator	38			
Transport	navodni ABC transporter	14	7C		
	navodni sekretorni protein	16			
	probable secreted substrate-binding protein ; MULTISPECIES: glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein [Streptomyces]	33			
Hipotetski	hipotetski protein		9C		
	hipotetski protein		3C		
	hipotetski protein (protein koji veže DNA)		18C		
	hipotetski protein, MULTISPECIES: protein stresa [Streptomyces]	31			
Regulacija odgovora	moгуća histidinska kinaza	9			
Membranski	navodni integralni membranski protein	14			
	navodni membranski protein	21			

Analizom dobivenih sekvenci identificirani su proteini, odnosno mogući interaktanti proteina SsbB (tablica 3.4). Iz tablice je vidljivo da SsbB i SsbBΔC moguće ostvaruju interakcije s proteinima uključenim u različite stanične procese. Također je analiza baze podataka bakterije *S. coelicolor* pokazala kako većina ovih proteina su ili hipotetski ili im je funkcija pretpostavljena, odnosno temelji se na sličnosti DNA skvence sa srodnim organizmima. Prema intenzitetu plavog obojenja najviše se isticala kolonija u kojoj je SsbB ostvarivao interakciju s GntR - transkripcijski regulatorom. Također je uočeno kako se ovaj gen nalazi i u najvećem broju kotransformanata (čak 7) dobivenih kolonija bez obzira na kojem se kraju gena *ssbB* nalazio DNA fragment za T18 podjedinicu adenilat ciklaze. GntR - transkripcijski regulator označen je kao gen SCO4190 koji kodira za protein DevA. Nedostatak ovog gena u bakteriji *S. coelicolor* uzrokuje defekt tijekom reproduktivne faze rasta (Hoskisson i sur.,2006). Zato je protein DevA odabran za daljnju analizu i potvrdu interakcije s proteinom SsbB.

3.4.1 Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina DevA

Kako bi se mogle provoditi daljnje analize interakcije proteina DevA i proteina SsbB, bilo je nužno protein DevA prekomjerno eksprimirati i izdvojiti iz ukupnog staničnog lizata pomoću afinitetne kromatografije. Gen *devA* prekomjerno je eksprimiran s plazmida pDevA (tablica 2.5) u heterolognom domaćinu za prekomjernu ekspresiju, bakteriji *E. coli* Rosetta-gami2 (DE3) *pLysS* (slika 3.24). Uvjeti uzgoja stanične kulture te pročišćavanje proteina detaljnije su opisani u poglavlju 2.2.10.



Slika 3.24. Analiza staničnog lizata nakon prekomjerne ekspresije i pročišćavanja proteina DevA te western blot analiza pročišćenog proteina. SDS-PAGE analizom razdvojeno je 5 μ l (približno 15 μ g) staničnog ekstrakta prije (K) te nakon prekonocne indukcije dodatkom 1 mM IPTG-a (IPTG). Prekomjerna ekspresija proteina veličine oko 37 kDa označena je crvenim okvirom. Nakon primjene NiNTA kolone, pročišćeni protein DevA nakon gel elektroforeze u poliakrilamidu vizualiziran je pomoću Coomassie brilijant plavila. 100 ng pročišćenog proteina korišteno je za western blot analizu pomoću anti-His antitijela kojim je potvrđen protein DevA.

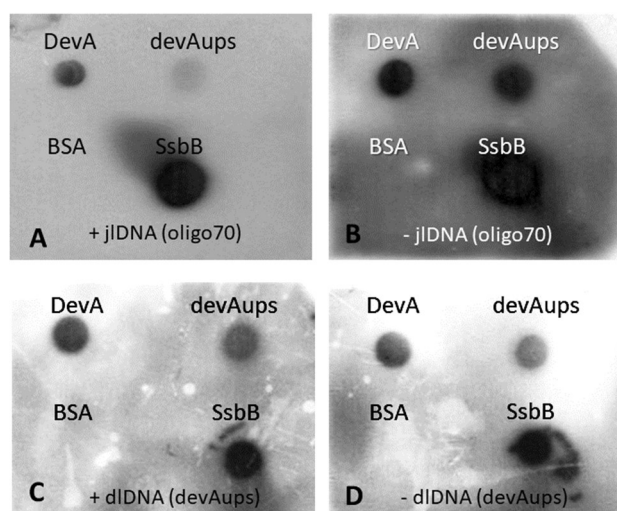
Iz 0,5 L stanične kulture izdvojeno je približno 6 mg proteina DevA. S obzirom da protein DevA ima na svom C-kraju histidinski privjesak (6X His) protein je potvrđen Western blot analizom pomoću anti-His antitijela (slika 3.24). Detaljan opis analize ekspresije, pročišćavanja proteina, određivanja koncentracije te zamijene pufera opisani su u poglavljima 2.2.11 i 2.2.12.1.

3.5 Usporedna analiza interakcija proteina SsbB i DevA primjenom in vitro metoda

3.5.1 Ispitivanje interakcija proteina SsbB i DevA metodom kapljične analize proteina

Nakon pročišćavanja proteina DevA, interakcija s proteinom SsbB analizirana je nizom odabranih metoda. Kao prva i najbrža metoda utvrđivanja proteinske interakcije odabrana je metoda kapljične analize proteina (engl. *Dot-blot analysis*) detaljno opisana u poglavlju 2.2.16.2. Za analizu imunoreaktivnih signala korišten je pročišćeni protein DevA (poglavljje 2.2.10), dIDNA (devAups, poglavljje 2.2.13) koja sadrži vezno mjesto proteina DevA, BSA kao negativna kontrola, te SsbB kao pozitivna kontrola.

Tijekom inkubacije proteina DevA s proteinom SsbB dodan je oligonukleotid (oligo70, tablica 2.6) kako bi se utvrdilo je li za interakciju proteina potrebna jIDNA koju protein SsbB veže s velikim afinitetom pri čemu se, prema literaturnim podacima, oslobađa njegov C-kraj (Marintcheva i sur., 2008). Prema rezultatima prikazanim na slici 3.25 (A i B) vidljivo je da imunoreaktivne signale na membrani daju uzorci DevA, devAups (dIDNA) i pozitivna kontrola (protein SsbB), ali signali nedostaju na negativnoj kontroli (protein BSA). Najjači signal vidi se na mjestu nakapavanja proteina SsbB (pozitivna kontrola). Signal interakcija proteina DevA i SsbB je prisutan neovisno o dodatku jIDNA, ali vidljivo je jači u odsustvu jIDNA. SsbB vezao se i na devAups (dIDNA) iako znatno slabije prilikom inkubacije s jIDNA (oligo70).

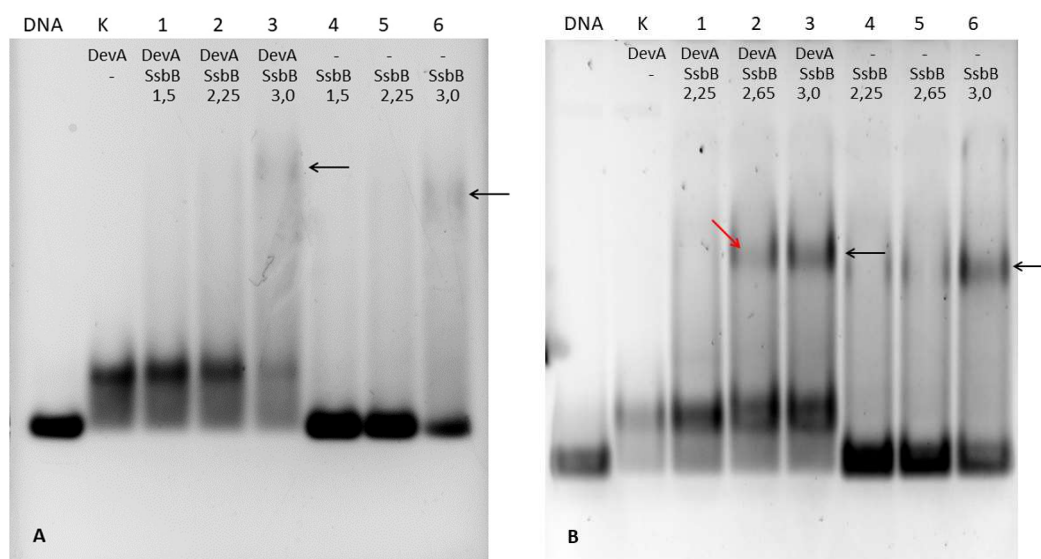


Slika 3.25. Kapljična analiza interakcije proteina DevA i SsbB. Na nitroceluloznim membranama nakapano je 1 μ g proteina DevA, SsbB (pozitivna kontrola), BSA (negativna kontrola) te 1 μ g dvolančanog DNA fragmenta (devAups). A) Membrana je inkubirana s 121 nM proteinom SsbB i 121 μ M oligonucleotidom (oligo70). B) Membrana je inkubirana samo s proteinom SsbB. C) Membrana je inkubirana s 121 nM proteinom SsbB i 120 nM dIDNA (devAups). D) Membrana je inkubirana samo s proteinom SsbB. Nakon primarne inkubacije s proteinom SsbB (uz ili bez dodatka DNA), western-blot analizom s antitijelima anti-SsbB detektiran je protein SsbB.

Kako bi se utvrdilo da li je interakcija DevA i SsbB ovisna o promotorskoj regiji gena *devA* (*devAups*) koju veže protein DevA (Hoskisson i sur., 2006), u početnu inkubaciju s proteinom SsbB dodana je dDNA (*devAups*). Rezultati prikazani na slici 3.25 (C i D) pokazuju da su i u ovom slučaju imunoreaktivni signali prisutni kod DevA, *devAups* i u pozitivnoj kontroli (SsbB), ali nedostaju na negativnoj kontroli BSA. Za razliku od prethodnog eksperimenta na slici je vidljivo kako je u prisustvu dvolančane DNA regije uzvodno od gena *devA*, signal intenzivniji i na mjestu proteina DevA i na *devAups*.

3.5.2 Utvrđivanje interakcije proteina SsbB i DevA metodom EMSA

Metodom određivanja kompleksa DNA i proteina na temelju zaostajanja u gelu (poglavlje 2.2.4) dodatno se potvrdila interakcija između proteina SsbB i DevA. Pri inkubaciji proteina DevA i dDNA (*devAups*, poglavlje 2.2.13) vidljivo je zaostajanje kompleksa DevA-dDNA u gelu u odnosu na samu dDNA (slika 3.26). Dodatkom rastuće koncentracije proteina SsbB počinje formiranje kompleksa DNA-DevA-SsbB između koncentracija 2,25 – 3,0 μM SsbB (slika 3.26, A).



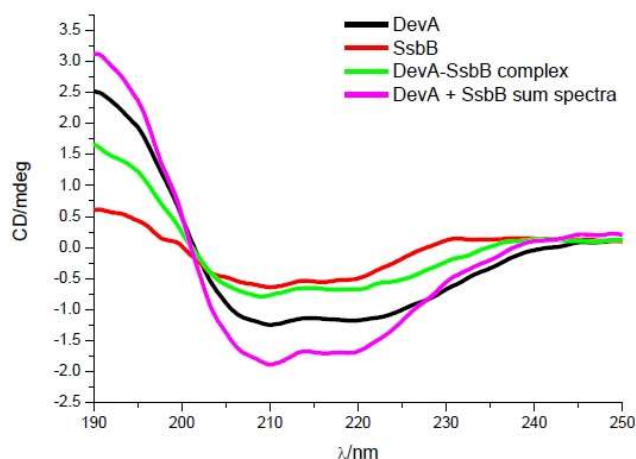
Slika 3.26. Vezanje trojnog kompleksa DNA, DevA i SsbB metodom zaostajanja u gelu. U oba gela je u prvu jažicu dodana dDNA (750 nM; DNA), dok je u drugoj protein DevA (450 nM; K). A) Rastuće koncentracije proteina SsbB (1,5 - 3,0 μM , jažice 1 - 3) dodane su u reakcijsku smjesu proteina DevA (450 nM) i promotorske regije *devAups* (750 nM DNA). Linije 4 - 6 služe kao kontrola vezanja rastuće koncentracije proteina SsbB na DNA. Crnom strelicom na liniji 3 obilježen je trojni kompleks DNA, DevA i SsbB koji je viši nego kompleks DNA i SsbB u liniji 6. B) Uzorci su nanoseni kao na slici A, s time da je dodana koncentracija proteina SsbB 2,65 μM (linije 2 i 5). U liniji 2 crvenom strelicom je naznačen kompleks koji nije vidljiv u kontrolnoj reakciji (linija 5). Crnim strelicama istaknut je trojni kompleks DNA, DevA i SsbB (linija 3) koji je viši nego kompleks DNA i SsbB u liniji 6.

Sam protein SsbB također ima afinitet za vezanje dDNA zbog čega je u reakciji vidljivo zaostajanje u gelu u uzorcima gdje DevA nije prisutan (linije 4 - 6, slika 3.26) iako se vidi da je taj afinitet niži u odnosu na afinitet vezanja proteina DevA. Daljnjim raščlanjivanjem koncentracija proteina SsbB uočeno je stvaranje trojnog kompleksa DNA-DevA-SsbB pri koncentraciji SsbB 2,65 μ M dok pri istoj koncentraciji proteina SsbB inkubiranim samo s dDNA nije bio vidljiv pomak u odnosu na kontrolnu dDNA (3.26, B).

3.5.3 Analiza kompleksa DevA-SsbB metodom CD spektroskopije

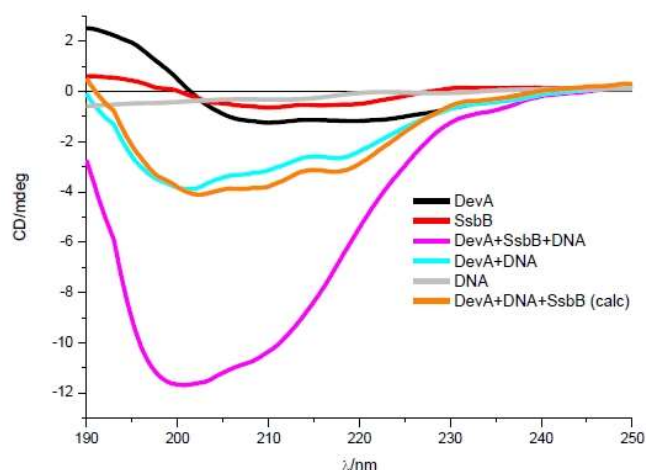
Kako bi se utvrdile razlike u konformacijskim promjenama uslijed interakcije proteina DevA i SsbB korištena je analiza pomoću CD spektroskopije prema uputama u poglavlju 2.2.15. Spektri su izmjereni za svaki pojedinačni protein, te za sve kombinacije proteina i dDNA (devAups, poglavlje 2.2.13).

Iz pojedinačnih CD spektara izmjerenih za svaki istraživani protein (slika 3.27) računalnim programom DichroWeb, CDSSTR method (Sreerama i Woody, 2000) izračunato je da je protein SsbB sastavljen prvenstveno od β -ploča (38%), 6% čine α -zavojnice, 21% zavoji i 33% je neorganizirano, dok je protein DevA sastavljen od 26% α -zavojnica, 23% β -ploča, 20% zavoja i 29% neorganizirane strukture. Osim toga, sam izgled krivulje CD spektra proteina DevA prikazuje dva lokalna minimuma pri 210 i 220 nm koji su tipični za protein sastavljen predominantno od α -zavojnica. Izmjereni spektar smjese proteina DevA i SsbB bitno se razlikuje od spektra dobivenog zbrojem dvaju pojedinačnih spektara što potvrđuje interakciju između analiziranih proteina.



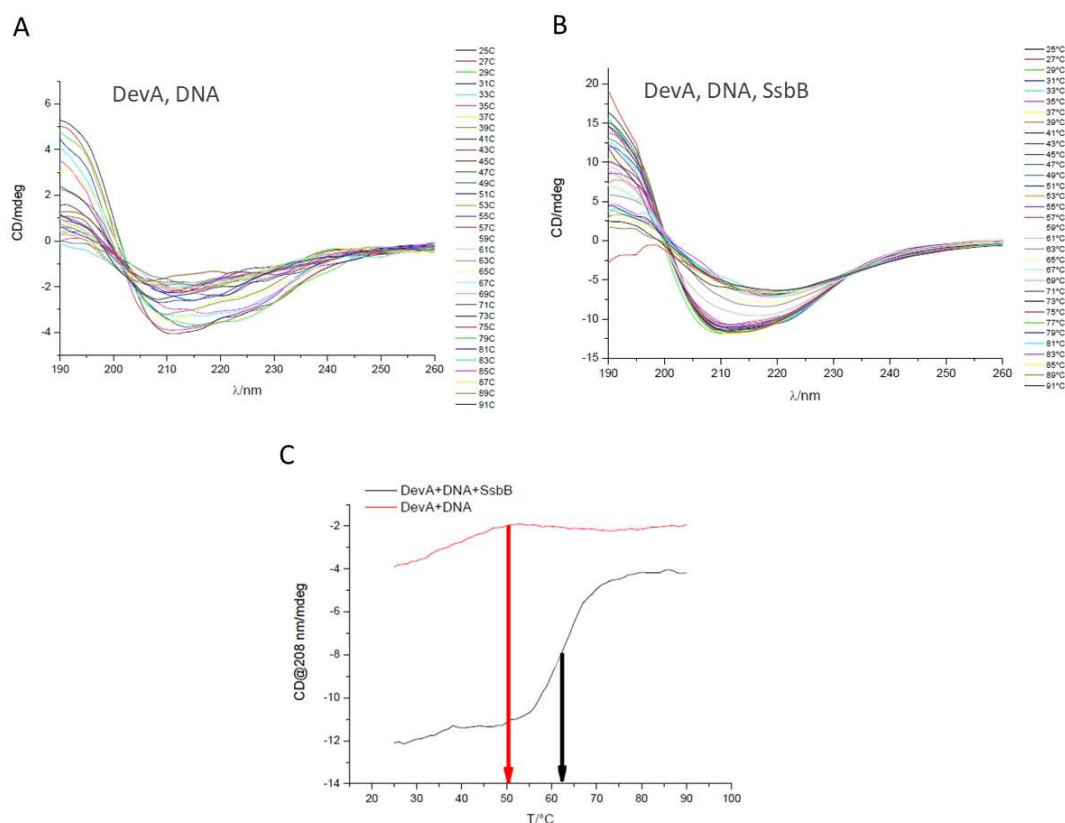
Slika 3.27. CD spektri kompleksa SsbB i DevA pri 25 °C bez prisustva DNA. Crna, crvena i zelena linija prikazuju izmjerene signale proteina u ovisnosti o valnoj duljini, dok ljubičasta linija prikazuje sumu spektara DevA i SsbB izračunatu kao zbroj vrijednosti pojedinačnih spektara.

Kako bi se utvrdilo ima li vezanje proteina DevA na promotorsku regiju gena *devA* (*devAups*) utjecaja na konformacijske promjene prilikom interakcije dvaju ispitivana proteina, u sustav je dodana dDNA (slika 3.28). Izmjereni CD spektar smjese proteina DevA, SsbB i DNA razlikuje se od bilo kojeg izmjenog spektra, te od izračunate sume pojedinačnih spektara. U ovom slučaju uočen je znatno jači signal u CD spektru trojnog kompleksa (oko -12 mdeg) nego u bilo kojem izmjenom CD spektru pojedinačnog interaktanta ili smjese interaktanata, koji nije prešao -4 mdeg.



Slika 3.28. CD spektri trojnog kompleksa DevA, i SsbB pri 25 °C uz prisustvo DNA (*devAups*). Narančasta linija prikazuje sumu spektara DevA, DNA (*devAups*) i SsbB koja se bitno razlikuje od izmjenog spektra tog trojnog kompleksa (ljubičasta linija). CD pektri pojedinačnih proteina i/ili dDNA prikazani su bojama naznačenima u legendi na slici.

Kako bi se utvrdila stabilnost dvojnog (DevA/DNA) odnosno trojnog kompleksa (DevA/DNA/SsbB), CD spektar mjeren je zagrijavanjem smjese na temperaturi u rasponu od 25 - 90 °C. Slika 3.29 prikazuje CD spektre DevA/DNA (slika 3.29, A) i DevA/DNA/SsbB (slika 3.29, B) kompleksa. Spektar trojnog kompleksa DevA/DNA/SsbB pokazuje veću stabilnost i gubitak heličnosti pri višim temperaturama u odnosu na dvojni kompleks DevA/DNA. Krivuljom CD signala izmjenom pri 208 nm dobivena je temperatura T_m koja je za dvojni kompleks iznosila 50 °C a za trojni 62 °C.

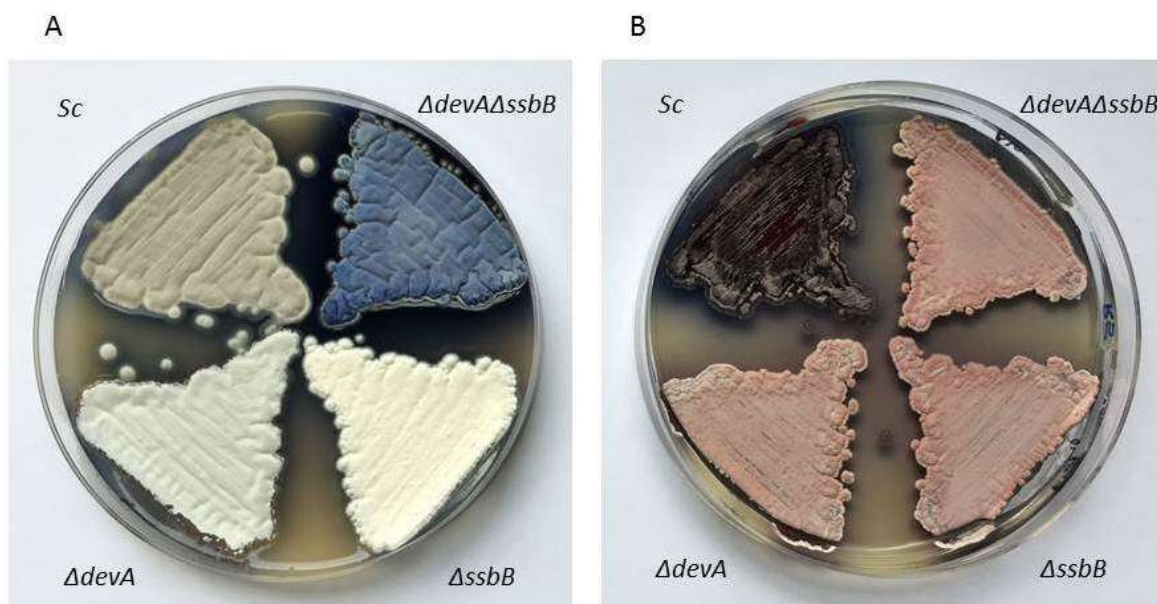


Slika 3.29. A) CD spektri prilikom zagrijavanja kompleksa 6 μ M DevA i 3 μ M DNA (devAups) 25 - 90 °C. B) CD spektri prilikom zagrijavanja kompleksa 6 μ M DevA, 3 μ M DNA (devAups) i 6 μ M SsbB 25 - 90 °C. C) CD signal pri 208 nm dobiveno mjerenjem CD spektara pri zagrijavanju 25-90 °C. Crvenom linijom prikazan je gubitak heličnosti kompleksa DevA i DNA (devAups), dok je crnom linijom prikazan gubitak heličnosti kompleksa DevA, DNA (devAups) i SsbB. Strelicama su istaknute temperature na kojima se nalazi T_m pri kojem dolazi do konformacijske promijene.

3.6 Fenotipska i morfološka analiza dvostrukog mutanta $\Delta devA\Delta ssbB$

Nakon što je metodom BACTH identificiran protein DevA koji je s obzirom na svoju biološku ulogu jedan od najzanimljivijih interaktanata proteina SsbB (poglavlje 3.4), te nakon potvrde ove interakcije imunološkim i biofizičkim metodama (poglavlje 3.5), biološki značaj ostvarivanja interakcija ovih proteina ispitan je u domaćinu *S. coelicolor*. Kako bi se mogla analizirati promjena u fenotipu koju uzrokuje nedostatak ova dva proteina, napravljen je soj kojem nedostaju oba gena (dvostruki mutant $\Delta devA\Delta ssbB$).

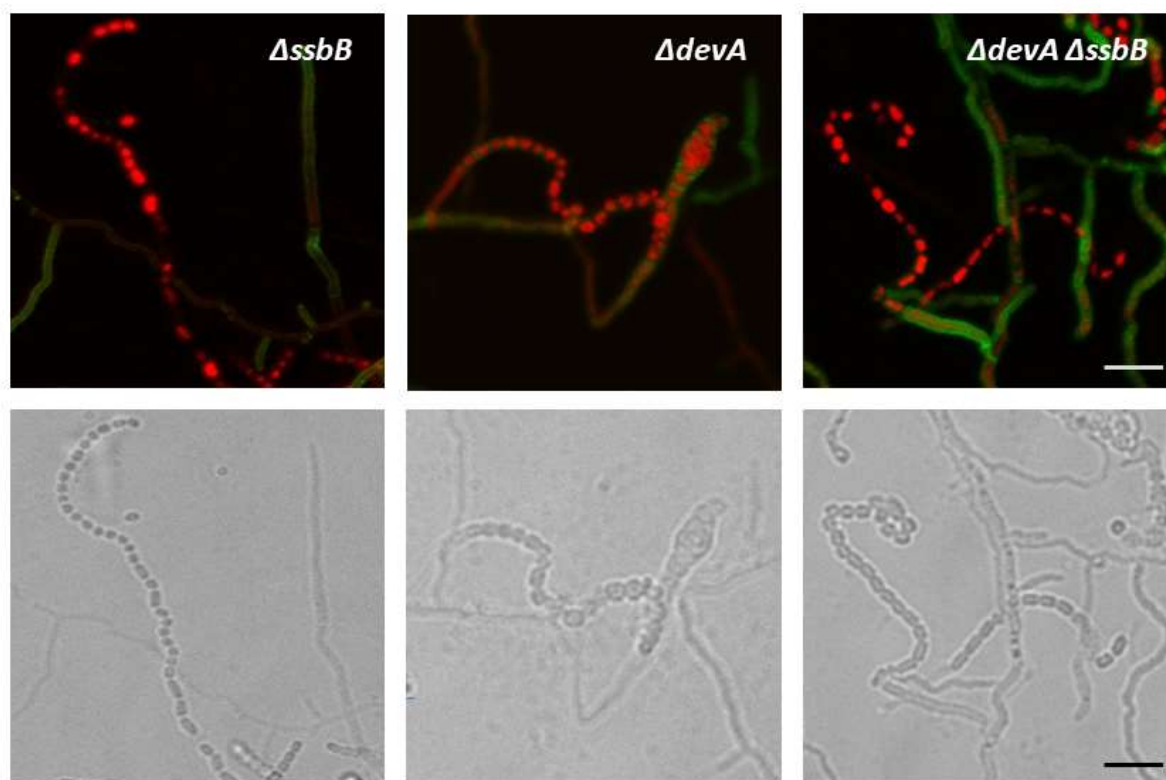
U soju mutiranom u genu *devA*, (J3102; tablica 2.7) gen *ssbB* zamijenjen je Hyg rezistencijskom kazetom pomoću kozmida 6COHyg ranije opisanom REDIRECT metodom (poglavlje 2.2.8). Nakon konjugacije ispitano je približno 100 kolonija, ekskonjuganati koji su imali očekivani genotip, Kan^SHyg^R (vidi poglavlje 2.2.8) dodatno su ispitani PCR reakcijom pomoću parova početnica navedenih u tablici 3.1 i 3.6 kako bi se potvrdila ugradnja rezistencijske kazete na mjestu gena *ssbB* (slika 3.18). Potvrđeni dvostruki mutant $\Delta devA\Delta ssbB$ naciepljen je zatim na MS i R5 kruti medij radi fenotipske analize.



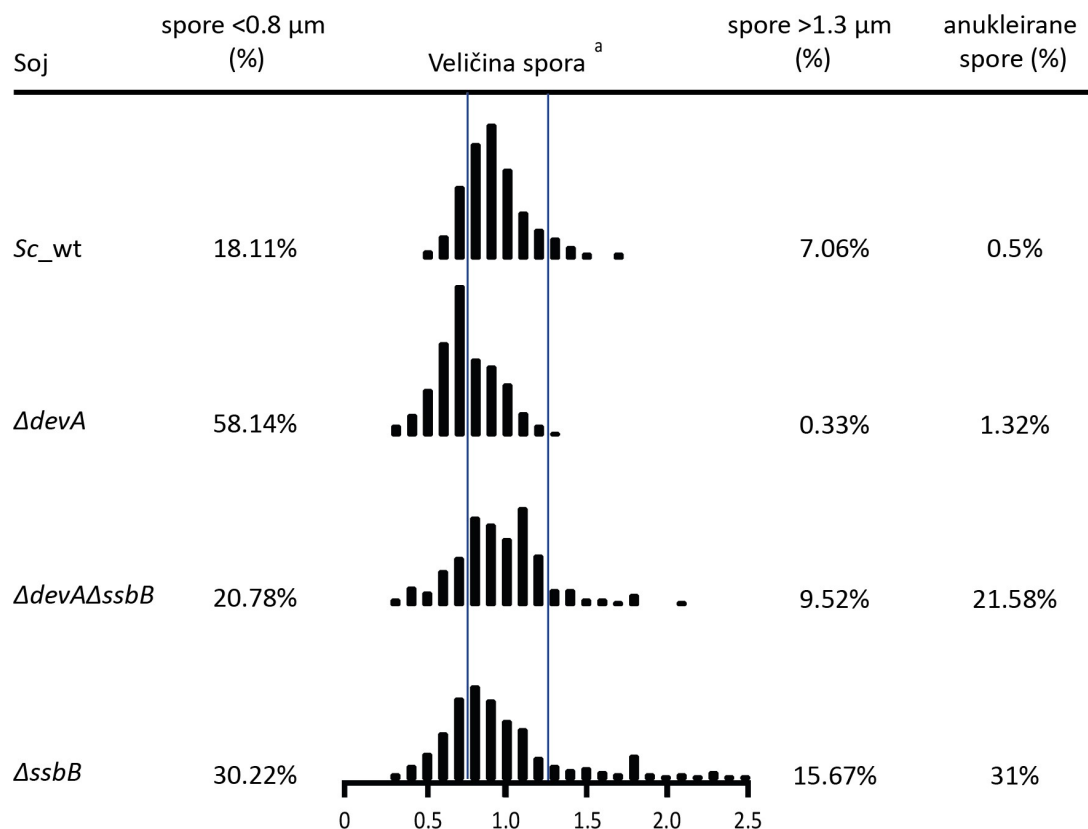
Slika 3.30. Usporedba fenotipova pojedinačnih mutanata $\Delta ssbB$ i $\Delta devA$, te dvostrukog mutanta $\Delta devA\Delta ssbB$ u odnosu na divlji tip bakterije *S. coelicolor*. A) Sojevi su naciepljeni na krutu SM podlogu te su inkubirani na 30 °C tijekom tri dana. B) Isti sojevi naciepljeni su na krutu R5 podlogu te inkubirani tijekom tri dana na 30 °C.

Kako je vidljivo na slici 3.30, pojedinačni mutanti $\Delta devA$ i $\Delta ssbB$ daju bijeli zračni micelij u odnosu na divlji tip bakterije *S. coelicolor*, dok dvostruka mutacija uzrokuje intenzivno plavo obojenje površine kolonije s izraženom proizvodnjom antibiotika. Fenotipske karakteristike divljeg tipa i različitih mutanata ispitane su i na bogatoj hranjivoj podlozi R5. Vidljivo je da pojedinačni te dvostruki mutant pokazuju sličan fenotip. Kod svih sojeva dolazi do nakupljanja svjetlo crvenog pigmenta, za razliku od divljeg tipa *S. coelicolor* (slika 3.30, B).

Kako bi se detaljnije analizirao defekt u segregaciji kromosoma tijekom sporulacije, navedeni mutanti analizirani su konfokalnom laserskom mikroskopijom nakon 72 h rasta na MS krutoj podlozi (poglavlje 2.2.17). Vizualizacija DNA provedena je bojanjem micelija pomoću propidij-jodida, a peptidoglikane u stijenkama hifa pomoću boje FITC-WGA kao što je opisano u poglavlju 2.2.17.



Slika 3.31. Mikroskopske analize napravljene konfokalnom mikroskopijom prikazuju sporulaciju i defekt u segregaciji kromosoma mutanata $\Delta ssbB$, $\Delta devA$ i $\Delta devA\Delta ssbB$. Na gornjem dijelu slike prikazana je spojena snimka fluorescencije propidij-jodida (nukleoida) i WGA (stanične stijenke), dok je u donjem dijelu slike prikaz svjetlog polja.



Slika 3.32. Statistička analiza anukleiranosti i veličine spora divljeg tipa *S.coelicolor*, te mutanata $\Delta ssbB$, $\Delta devA$ i $\Delta devA\Delta ssbB$. mutanata. Uz grafički prikaz različite distribucije veličine spora navedeni su postoci spora koji se nalaze ispod (<0,8 μm) ili iznad (>1,3 μm) prosječne vrijednosti duljine spora za divlji tip *S. coelicolor* (omeđene plavim linijama).

Rezultati mikroskopske analize i usporedni fenotipovi mutanata $\Delta ssbB$, $\Delta devA$ i $\Delta devA\Delta ssbB$ prikazani su na slici 3.30 i 3.31. Već je u poglavlju 3.3.2 opisani segregacijski defekt mutanta $\Delta ssbB$ bio vidljiv u anukleiranosti spora od 30% većem od divljeg tipa, te povećanom udjelu spora koje su veće od prosječne duljine (15,67%) u odnosu na iznadprosječno dugačke spore divljeg tipa *S. coelicolor* (6,3%). Mutant $\Delta devA$ pokazuje segregacijski defekt od svega 1,32% anukleiranih spora, ali zato veliki udio spora koje su ispod prosječne duljine 58,14%, (41,03% više nego divlji tip). Osim toga, u mutantu $\Delta devA$ se uočavaju izrazito kratki lanci spora s nedostatkom kondenzacije kromosoma (slika 3.31). Kod dvostrukog mutanta $\Delta devA\Delta ssbB$ spore imaju izgled sličniji samom mutantu $\Delta ssbB$. Kromosomi su bolje kondenzirani u odnosu na $\Delta devA$, a broj anukleiranih spora raste s 1,32% na 21,58%. Broj spora ispod prosjeka iznosile su u dvostrukom mutantu 20,78%, a iznadprosječno dugačkih spora 9,52% (slika 3.32).

4 Rasprava

Rezultati dugogodišnjih istraživanja naše grupe pokazuju kako su paralogni proteini SSB bakterije *S. coelicolor* evoluirali i specijalizirali se u svojim biološkim funkcijama. Za razliku od esencijalnog proteina SsbA, koji ima nezamjenjivu ulogu u procesima metabolizma DNA, paralogni protein SsbB nije važan za stanično preživljenje ali ima važnu ulogu u kromosomskoj segregaciji tijekom kasne faze životnog ciklusa, budući da njegov nedostatak uzrokuje neravnomjernu raspodjelu DNA u sporama (Paradžik i sur. 2013).

Kao što je opisano u uvodnom dijelu (poglavlje 1.2.1), između proteina SsbA i SsbB vidljive su i jedinstvene varijacije u strukturama njihovih homotetramera. U kvartarnoj strukturi proteina SsbA β -vrpce dvaju monomera (A i B te C i D) stvaraju strukturu „stezaljke” koja nije očuvana u proteinu SsbB. Pretpostavlja se da ova struktura doprinosi stabilnosti SsbA homotetramera kod bakterija koje imaju genome bogatog GC sastava (Stefanić i sur., 2009). U proteinu SsbB ova struktura izostaje i najvjerojatnije je funkcionalno zamijenjena s dva disulfidna mosta koji stabiliziraju dimerne podjedinice (Paradžik i sur., 2013). Za sada nema literaturnih podataka o ulozi i važnosti disulfidnih mostova kod bakterijskih proteina SSB. Naime, kristalna struktura proteina SsbB je prva objavljena struktura proteina SSB u kojoj su uočeni disulfidni mostovi. Kao što se vidi na strukturi homotetramera (slika 1.12), Cys₇ aminokiselinski ostaci u monomerima formiraju dva intermolekularna S-S mosta koji pridonose stabilizaciji dimera (Paradžik i sur. 2013). Disulfidne mostove između podjedinica u svojoj kristalnoj strukturi ima i dimerni protein PriB iz bakterije *E. coli* (Liu et al. 2004). Analize primarnih struktura proteina PriB pokazale su da su ovi proteini tijekom evolucije nastali duplikacijom i funkcijskom specijalizacijom iz proteina SSB (Ponomarev i sur., 2003) što dovodi do pretpostavke da je možda ovaj tip intermolekulskog povezivanja sačuvan nakon odvajanja i funkcijske specijalizacije proteina PriB. Nedavno je objavljen jako zanimljiv rezultat o humanom protenu, hSSB1. Kod ovog proteina također su pronađeni disulfidni mostovi (Paquet i sur., 2016), a opisana je i važnost S-S mostova za funkciju ovog proteina, što će detaljnije biti diskutirano u nastavku ovog poglavlja.

Uz razlike u strukturi homotetramera proteina SSB iz bakterije *S. coelicolor*, uočene su također i razlike u njihovih ekspresiji. Protein SsbB je najviše eksprimiran u kasnoj fazi i to u minimalnom mediju. Ovi uvjeti slični su uvjetima kasne faze rasta streptomicetne kolonije na krutom mediju kada bakterija ulazi u reproduktivni ciklus. Svi dosadašnji rezultati jasno su pokazali kako su tijekom evolucije ovi paralogni proteini preuzeli različite biološke funkcije, barem u nekim staničnim procesima. Važnost proteina SsbB u segregaciji kromosoma do sada je opažena jedino kod streptomiceta (Paradžik i sur., 2013), a sam stanični mehanizam nije još dobro razjašnjen. Zato je cilj ovog doktorskog rada bio detaljnije istražiti mehanizam segregacije kromosoma u kojem sudjeluje protein SsbB, a koji je odgovoran za sporulaciju bakterije *S. coelicolor*.

4.1 Disulfidni mostovi stabiliziraju tetramer SsbB i doprinose njegovoj biološkoj funkciji

U prvom dijelu ovih istraživanja cilj je bio ispitati važnost uočenih strukturnih specifičnosti proteina SsbB za njegovu biološku funkciju tijekom reproduktivne faze rasta bakterije *S. coelicolor*. U povoljnim životnim uvjetima kod svih stanica u citoplazmi je prisutan reducirajući okoliš koji spriječava formiranje disulfidnih mostova (Paget i Buttner, 2003). Kako je već spomenuto u uvodnom dijelu, u kasnoj fazi životnog ciklusa bakterija dolazi do oksidacijskog stresa i stvaranja reaktivnih radikala kisika (ROS). Oksidacija putem ROS-a izaziva stvaranja intramolekulskih disulfidnih veza između cisteina u proteinu, intermolekulskih disulfidnih veza (između proteina) ili stvaranja disulfidnih veza između proteina koji sadrži cistein i tiola male molekulske mase kao što je glutation ili mikotiol koji održavaju reducirajući okoliš u stanici. Kod streptomiceta oksidacijski stres se dešava upravo tijekom formiranja zračnog micelija, kada dolazi do nedostatka hranjivih tvari i programirane stanične smrti vegetativnog micelija (Paget i Buttner, 2003; Beites i sur., 2015). Nedostatak hranjiva dovodi i do povećane ekspanzije proteina SsbB (Paradžik i sur., 2013), što ukazuje da je njegova prisutnost u stanici važna u fazi rasta koja korelira s oksidacijskim stresom.

Oksidacijski stres koji omogućava stvaranje disulfidnih veza kod većine proteina stvara nepoželjne strukturne promjene. No, poznati su i proteini čija je funkcija regulirana promjenama oksidacijsko-redukcijskog potencijala u citoplazmi (Paget i Buttner, 2003;). Ove činjenice dovele su i do pretpostavke da je i funkcija proteina SsbB regulirana tijekom oksidacijskog stresa. Kako bi se ova pretpostavka istražila, konstruirani su mutanti proteina SsbB koji ne mogu stvarati S-S mostove. Kao što je i opisano u poglavlju 2.2.4, aminokiselina Cys u monomeru zamijenjena je aminokiselinama Ala ili Ser. Ove aminokiseline su odabrane kako bi se u što manjoj mjeri narušila struktura proteina. Prvi rezultati analiza počišćenih proteina SsbB i dobivenih mutiranih varijanti proteina SsbBCys7Ala ili SsbBCys7Ser, pokazali su da se kod divljeg tipa proteina stvara dimerna struktura koja se može narušiti dodatkom reducirajućeg agensa (DTT-a) za razliku od mutiranih varijanti proteina. U rezultatima su prikazane (Slika 3.2 A,) pruge blagog intenziteta na poziciji dimera proteina SsbB i kod mutanata, koje nisu narušene dodatkom DTT-a. Western analize su identificirale ove proteina kao protein SsbB. U ovom slučaju pretpostavljamo da se radi o strukturama dimera proteina SsbB koji nastaju uslijed različitih inermolekulskih interakcija monomera. Unakrsno vezanje proteina može nastati i nakon post-translacijskih modifikacija (Srivastava i sur., 2004) čak i u odsustvu cisteina (Friedrich i sur., 2017). Oksidacija metionina i triptofana, ili konverzija serina do dehidroalanina, mogu u konačnici dovesti do unakrsnog vezanja proteina. Western analiza je u ovom radu pokazala da je udio ovih dimernih formi zanemariv (slika 3.2 B). Nadalje, rezultati ispitivanja važnosti prisustva cisteina u proteinu SsbB za vezanje JLDNA (Φ X174, 5386 pb) pokazali su da obje mutirane forme proteina imaju smanjen afinitet

za vezanje jIDNA. Unatoč tome protein SsbBCys7Ala je u ostvarivanju interakcija s dugom jIDNA bio puno sličniji divljem tipu proteina SsbB (slika 3.3) i zato je pretpostavka tijekom ovih istraživanja bila kako bi protein koji ima cistein zamijenjen alaninom mogao zamijeniti nedostatak divljeg tipa proteina SsbB u bakteriji *S. coelicolor* TSB01 (Δ ssbB).

Kako bi se ispitala ova hipoteza, odnosno provjerila biološka funkcionalnost proteinskih varijanti konstruiranih u ovom radu, načinjeni su eksperimenti komplementacije bakterije *S. coelicolor* TSB01. Provedeno ispitivanje pokazalo je da soj s delecijom u genu *ssbB*, kao i sojevi koji nose mutirane gene, *ssbBCys7Ala* ili *ssbBCys7Ser*, pokazuju bijeli fenotip koji nastaje kao posljedica defekta tijekom sazrijevanja spora (slika 3.4). Unatoč tome što je afinitet vezanja proteina SsbBCys7Ala bio sličan divljem tipu ovaj protein nije mogao funkcionalno zamijeniti protein SsbB. Ovi rezultati sugeriraju kako je formiranje S-S mostova, barem u određenom udjelu homotetramera, važno za funkcionalnost proteina SsbB. Ovu hipotezu podupiru nedavno objavljeni rezultati. Kako je spomenuto i u uvodnom dijelu ovog poglavlja, istraživanja strukture humanog proteina hSSB1 pokazalo je da oksidacijom potaknuto formiranje disulfidnih mostova dovodi do formiranja stabilnih oligomera humanog proteina hSSB1. Osim sudjelovanja u popravku dvolančanih lomova DNA, u kojima je protein hSSB1 uključen kao monomer, protein hSSB1 ključan je i u ekscizijskom popravku baza (engl. base excision repair, BER) koji nastupa nakon oksidacijskog oštećenja DNA. Upravo je u takvim oksidirajućim uvjetima ključno formiranje stabilnih tetramera hSSB1 kako bi ovaj protein mogao učinkovito sudjelovati u uklanjanju oksidativnih lezija DNA (Touma i sur., 2017).

Tijekom ovih istraživanja je bilo potrebno ispitati jesu li ciljane aminokiselinske promjene promijenile strukturu proteina ili narušile stabilnost homotetramera. Strukturne promjene mogu dovesti do smanjenog afiniteta vezanja jIDNA. Ova istraživanja provedena su pomoću kalorimetrijskih i spektrometrijskih metoda. Proučavanje proteina i njihovih kompleksa kao termodinamičkih sustava su općenito od velikog značaja za utvrđivanje stabilnosti proteina, utvrđivanje specifičnosti kompleksa ili mehanizama interakcija. Još uvijek nema puno podataka o primjenama navedenih metoda u istraživanjima proteina SSB. Do sada je najbolje proučen modelni protein SSB iz bakterije *E. coli* čija je termodinamika vezanja s jIDNA provedena prvenstveno pomoću metode izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC) kako bi se dobio bolji uvid u termičke tranzicije sustava (Kozlov i Lohman, 2012). Manji broj analiza ITC dostupno je i za protein SSB bakterije *Deinococcus radiodurans*, te za eukariotski analog, protein RPA iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Kumaran i sur., 2006; Kozlov i sur., 2010).

U ovom radu rezultati ITC analize su pokazali da se vezanje oligonukleotida (dT)₄₅ i sve tri mutirane varijante proteina SsbB odvija spontano budući da je predznak ukupne Gibbsove energije

(ΔG) negativan. Vidljivo je iz tablice 3.1, da najveći doprinos tome ima negativan predznak entalpije vezanja (ΔH), predvođene vodikovim i van der Waalovim vezama, dok je pozitivan prinos entropije nastao zbog središnjosti sustava vezanjem proteina i jIDNA, pri čemu se gube stupnjevi slobode liganada. Usporedive vrijednosti konstante vezanja (K_s), entalpije ($\Delta_r H$) i entropije ($\Delta_r S$) za sva tri proteina govore u prilog tome da se po termodinamičkim parametrima ova tri proteina bitno ne razlikuju.

Nasuprot tome, jasna razlika između varijanti proteina SsbB uočava se u stehiometriji vezanja jIDNA (tablica 3.1) prema kojoj omjer vezanja oligonukleotida i proteina pada u nizu SsbB > SsbBCys₇Ala > SsbBCys₇Ser. Budući da je poznato iz literature da tetramer SSB_{EC} veže oligonutid (dT)₄₅ u omjeru 1:1 (Lohman i Overman, 1985), prilikom izračuna prema modelu jednog veznog mjesta (engl. *one set of sites model*), omjer vezanja fiksiran na poznatu veličinu (1). Izračunom je na taj način dobiven postotni udio aktivne konformacije homotetramera u reakcijskoj smjesi. Dobiveni rezultati koji su iznosili za SsbB - 92,4%, SsbBCys₇Ala - 80,2% te za SsbBCys₇Ser - 41,6% u skladu su i pobliže objašnjavaju rezultate prikazane metodom zaostajanja u gelu (EMSA). Naime, ovom metodom jasno je pokazano kako se pri istoj koncentraciji proteina SsbB i njegovim proteinskim varijantama učinkovitost vezanja duge jIDNA mijenja (slika 3.3). Ovi rezultati pokazuju i kako protein SsbBCys₇Ala s puno jačim afinitetom (sličnije divljem divljem tipu proteina SsbB) veže dugu jIDNA.

Za razliku od metode ITC koja mjerenjem topline otopina pri fiksnim temperaturama prati termodinamiku interakcija, razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) proučava osobine proteina u različitom temperaturnom rasponu pri čemu se prikupljaju informacije o stabilnosti proteinske strukture. Budući da su ove metode komplementarne, obje se koriste za potpuno razumijevanje stabilnosti proteina i ostvarivanja njegovih kompleksa (Kozlov i Lohman, 2012). Prema izmjerenim T_m vrijednostima proteina uočava se kako je stabilnost proteina narušena u smjeru SsbB ($T_m=59,5822^\circ\text{C}$) > SsbBCys₇Ala ($T_m=56,7315^\circ\text{C}$) > SsbBCys₇Ser ($T_m=54,7661^\circ\text{C}$). Ovaj rezultat dobro korelira s udjelom aktivnih formi tetramera izmjerenih metodom ITC. Iz rezultata DSC i ITC analiza vidi se kako je zamjenom Cys₇/Ser u odnosu na Cys₇/Ala došlo do većeg narušavanja stabilnosti i afiniteta vezanja jIDNA. Pretpostavljamo da uvođenje serina, odnosno molekule kisika umjesto sumpora u aminokiselinski ostatak povećava elektornegativnost mikrookolišu strukture na kojoj je bio Cys aminokiselinski ostatak. Moguće je da se time narušava udaljenosti između dodirnih površina dvaju monomera ili dolazi do nekih drugih mikrostrukturnih promjena što u konačnici dovodi do smanjene stabilnosti proteina i smanjene efikasnosti vezanja.

Upravo spektrometrijska analiza kružnog dikroizma (CD), koja osim informacije o temperaturi denaturacije daje i dodatne informacije o konformaciji sekundarnih struktura proteina (Kirkitadze i sur., 1999) pokazuje podatke o gubitku heličnosti ispitivanih proteina. Rezultati su također u skladu s prije opisanim rezultatima. Odnosno, tijekom zagrijavanja prvo dolazi do konformacijske promjene proteina SsbBCys₇Ser (58°C), za razliku od divljeg tipa proteina SsbB i proteina SsbBCys₇Ala koji su imali najveću konformacijsku promjenu pri 60°C.

Istraživanja temperaturnih stabilnosti i promijena afiniteta vezanja jDNA mutiranih varijanti proteina SsbB u ovom su radu pomogla boljem razumijevanju važnosti disulfidnih mostova u stabilizaciji strukture tetramera koja je ključna za pravilnu funkciju proteina. Svi rezultati govore u prilog tome da je funkcija proteina SsbB narušena uklanjanjem aminokiseline Cys koja omogućava stvaranje S-S mostova, jer se smanjuje udio aktivnih tetramera. Premda se uvođenjem mutacije smanjila stabilnost proteina, posebno u slučaju proteina SsbBCys₇Ser (poglavlja 3.2.2 i 3.2.3), svi analizirani mutanti još uvijek formiraju određen postotak tetramera koji imaju usporedive vrijednosti entalpije, entropije i slobodne Gibbsove energije što upućuje da ove mutacije, iako ukazuju na smanjenu reproduktivnu sposobnost bakterije *S. coelicolor*, nisu esencijalne za preživljavanje.

4.2 Mutacije u genima *parB* i *smc* smanjuju anukleiranost spora u bakteriji *S. coelicolor* Δ *ssbB*

Istraživanja disulfidnih mostova proteina SsbB pomogle su u boljem razumijevanju strukturnih detalja tetramera proteina SsbB koji su evoluirali i prilagođavali se zahtjevima njegove biološke uloge. No iz dobivenih rezultata nije bilo jasno da li protein SsbB iz bakterije *S. coelicolor* sudjeluje u nekom staničnom procesu koji je važan za segregaciju kromosoma tijekom sporulacije i koji uključuje barem neke od prije opisanih proteina. Sporulacija je kod streptomiceta reproduktivan proces koji tim bakterijama omogućava rasprostranjivanje u okolišu ali i opstanak u nepovoljnim uvjetima. U smislu regulacije, taj proces zahtjeva kompleksnu regulatornu kaskadu te međudjelovanje proteina specifičnih samo za te bakterije, što je detaljno opisano u uvodnom dijelu ovog rada. Visok stupanj koordinacije brojnih regulatornih gena ključan je za pravilan razvoj ovih višestaničnih bakterija sa složenom fiziološkom i morfološkom diferencijacijom, koja kulminira proizvodnjom sekundarnih metabolita (npr. antibiotika) i raspršenjem zrelih spora (Flärdh, 2003). Prijelaz iz stadija zračne hife u lanac zrelih spora uključuje procese kondenzacije i segregacije kromosoma koji se odvijaju sinhronizirano s formiranjem septi u sincicijskom zračnom miceliju kako bi svaki presporogeni odjeljak dobio po jednu kopiju kromosoma (Jakimowicz i Van Wezel, 2012). Dosadašnje spoznaje o procesima

segregacije kromosoma i replikacije temeljile su se uglavnom na bakterijskim organizmima koji prolaze binarnu diobu. Streptomiceti stoga predstavljaju izvrstan model za istraživanje procesa stanične diobe budući da stanična dioba nije nužna za vegetativni rast streptomiceta ali je ključna u procesu sporulacije (McCormick i sur., 1994; Flärdh i sur., 2012; Jakimowicz i Van Wezel, 2012).

Kako je već navedeno mutacija u genu *ssbB* uzrokuje nepravilnu segregaciju kromosoma tijekom sporulacije te pojavu kolonija bijelog fenotipa (Paradžik i sur., 2013) kod kojih se zbog defekta tijekom reproduktivne faze sivi pigment, ne akumulira u stjenkama spora (*whi* fenotip) (Jakimowicz i sur., 2006). Uzimajući u obzir biološke uloge proteina SMC i ParB, kao i poremećaji u segregaciji kromosoma koje nastaju delecijom njihovih gena, bilo je važno istražiti mogući sinergijski učinak u bakteriji koja ima višestruke mutacije ovih gena s genom *ssbB*. Do sada analizirane pojedinačne mutacije u genima *smc*, *parB* ili *ssbB* nisu potpuno blokirale segregaciju kromosoma tijekom sporulacije. Mikroskopske analize pokazale su odstupanja u kondenzaciji i segregaciji kromosoma u sva tri slučaja (Dedrick i sur., 2009; Kois i sur., 2009; Paradžik i sur., 2013). Treba istaknuti kako je najveći uočeni učinak na segregacijski defekt imala pojedinačna mutacija u genu *ssbB* (31% anukleiranih spora). Ovaj najveći postotak anukleiranosti spora ukazuje da je protein SsbB jedan od ključnih proteina za segregaciju kromosoma u presporogene odjeljke. Tijekom ispitivanja svih mutanata dobiveni su usporedivi rezultati s literaturnim podacima (tablica 3.3). Određena odstupanja u rezultatima analiza anukleiranosti spora koja su dobivena tijekom ovih eksperimenata i navedena u tablici, uočavaju se i u objavljenim rezultatima drugih grupa, a mogu se pripisati razlikama u pripremi uzorka, jačini signala na fluorescencijskom mikroskopu ili tehnici brojanja koja može biti subjektivna.

Kako se uočava u tablici 3.3 kod dvostruke mutacije gena *smc/parB* segregacijski defekt iznosi približno kao zbroj učinka pojedinačne mutacije Δsmc (7%) i $\Delta parB$ (12%), što upućuje da ova dva gena sudjeluju u različitim staničnim procesima odgovornim za segregaciju (Dedrick i sur., 2009). Suprotno ovim rezultatima, dvostruke mutacije gena *smc* ili *parB* u kombinaciji s genom *ssbB* (tablica 3.3) dovode do smanjenja postotka anukleiranih spora kojem pridonosi $\Delta ssbB$. Soj $\Delta smc\Delta ssbB$ pokazuje isti segregacijski učinak, u smislu anukleiranih spora, kao i mutacija samog gena *smc* (7%), a $\Delta parB\Delta ssbB$ (16%) kao i sam $\Delta parB$. Kada bi postotak anukleiranih spora u dvostrukom mutantu bio sličan ili jednak soju s većim postotkom, to bi ukazivalo da analizirani proteini sudjeluju u istom staničnom procesu. Očito je kako nedostatak produkta oba gena kompenzira učinak nedostatka gena *ssbB*. U ovom trenutku se pretpostavlja kako protein SsbB regulira aktivnosti oba proteina jer se u njegovom odsustvu akumulira defekt u segregaciji. Ovo ne isključuje mogućnost, štoviše govori u prilog, o dodatnom procesu/proteinu koji je važan za segregaciju kromosoma, a također je pod kontrolom proteina SsbB.

Analiza razdiobe veličina spora (slika 3.20) pokazuje sličan efekt kod dvostrukih mutanata. Dodatna mutacija u genu *ssbB* značajno smanjuje udio spora ispod prosječne duljine, dok se promjena % spora iznad prosječne duljine značajnije povećava kod $\Delta parB\Delta ssbB$. Suprotno tome, kod mutanta $\Delta smc\Delta ssbB$ se uočava smanjenje % spora iznad prosječne duljine, iako ne tako značajno. Svakako je najinteresantniji fenotip pokazala trostruka mutacija *parB/smc/ssbB* koja je izazvala izraziti rasap veličine spora, sa značajnim povećanjem udijela iznadprosječno velikih spora (35,99%), dok se s druge strane, postotak ispodprosječno dugačkih spora nije značajno promijenio. Ovo pokazuje da i bez funkcije sva tri gena koji sudjeluju u segregaciji kromosoma, bakterija *S. coelicolor* može stvarati dovoljan broj spora koje su vijabilne, no s druge strane rasap distribucije spora koji se značajno promijenio u odnosu na divlji tip, ukazuje kako mehanizmi koji su odgovorni za sporulaciju bez deletiranih gena ne rade učinkovito. Sličan efekt uočen je i u slučaju trostrukog mutanta $\Delta smc\Delta parB\Delta ftsK$ gdje se parcijalno olakšava segregacijski defekt dvostruke mutacije gena *smc* i *parB* te je 90% spora i dalje dobivalo genetički materijal (Dedrick i sur., 2009).

Kako je prikazano na slici 3.19, različite mutacije dovode do poremećaja u sazrijevanju spora, odnosno do različite akumulacije sivog pigmenta u stjenkama spora. Bijeli fenotip se se nakon 3 dana jasno uočava kod $\Delta ssbB$, Δsmc , $\Delta smc\Delta parB$ i $\Delta smc\Delta parB\Delta ssbB$. Nakon 7 dana, soj koji ima deletirani gen *ssbB* lagano sivi. Ova observacija je jako zanimljiva s obzirom da ovaj soj ima najveći % anukleiranih spora i nužni su dodatni eksperimenti za objašnjenje ovog fenomena. U svakom slučaju, bijeli fenotip bio je najizraženiji u soju s mutacijom u sva tri gena *parB/smc/ssbB*, što ukazuje na najveći defekt u akumulaciji sivog pigmenta u stjenkama spora. Važno je spomenuti kako je kod trostrukog mutanta došlo i gotovo do potpune blokade u sintezi antibiotika aktinorodina, tipičnog za bakteriju *S. coelicolor*, čak i nakon produženog rasta od 7 dana (slika 3.19, D). Ovaj podatak sugerira jedan novi kontrolni mehanizam sinteze antibiotika za koji je važno prisustvo barem jednog od ispitivanih proteina.

U literaturi postoje podatci kako osim navedenih gena, mutacije u genima *scpA* i *scpB* (engl. *segregation i condensation protein*), koji stupaju u interakciju s proteinom SMC i sastavni su dio zajedničkog operona kod arhea i gram-pozitivnih bakterija (Mascarenhas i sur., 2002; Soppa i sur., 2002), pokazuju karakterističan fenotip segregacijskog defekta kao i mutant Δsmc (anukleirane spore, spore s viškom kromosoma te podijela kromosoma s tzv. efektom giljotine) (Soppa i sur., 2002). Proteini ScpAB imaju svoje homologe u *E. coli* (MukEF) koji bi mogli služiti za regulaciju vezanja SMC (MukB) na DNA (Mascarenhas i sur. 2005; Petrushenko i sur., 2006). U radu (Dedrick i sur., 2009) pokazano je na bakteriji *S. coelicolor* da mutacija u genima *scpA* i *scpB* više utječe na morfologiju nukleoida u odjeljcima prespora nego što utječe na segregaciju. Značajan dio nukleoida nije pratio konture presporogenih odjeljaka već je dio prespora u $\Delta scpA$ (15%) te spora u $\Delta scpAB$ (26%) sadržavao

po dva nukleoida („bilobed“ fenotip). Slično zadržavanje po dva ili više nukleoida primijećeno je i u slučaju mutacije gena *parB* ili *ssbB* (slike 3.21 i 3.22), međutim, anukleirane spore sačinjavale su svega 1% što ukazuje na mehanizam u koji vjerojatno nije uključen protein SsbB.

Zanimljiva sličnost s analiziranim mutantima u ovom radu vidljiva je u mutantu $\Delta sepG$ koji također pokazuje defektan segregacijski fenotip sličan soju Δsmc i $\Delta ssbB$. Nukleoidi su manje kondenzirani, raspršeni, s nedostatkom DNA u središtu spora. Osim toga značajni dio spora dulji je u odnosu na divlji tip *S. coelicolor*, a gotovo bijeli fenotip nakon produljenog rasta bakterija počinje siviti. Poznato je da je SepG protein također neophodan u procesu sporulacije jer osigurava lokalizaciju kompleksa SsgB-FtsZ na mjesto buduće septe (Zhang i sur., 2016).

Budući da mutacije u svim spomenutim genima koji sudjeluju u složenom procesu segregacije kromosoma i formiranja septi tijekom sporulacije streptomiceta i dalje daju vijabilne kolonije koje mogu formirati određen udio zrelih spora, pretpostavljamo da još predstoji identifikacija dodatnih gena, kao i bolje razumijevanje interakcija njihovih produkata, kako bi se dobila kompletna slika procesa koji kontroliraju ili sudjeluju u reproduktivnom ciklusu – sporulaciji kod streptomiceta.

4.3 Protein SsbB ostvaruje interakciju s proteinom DevA

4.3.1 Identifikacija proteina DevA kao proteinskog interaktanta proteina SsbB pomoću BACTH

Rezultati analiza dvostrukih i trostrukih mutanata gena *smc*, *parB* i *ssbB* ukazuju kako protein SsbB vjerojatno sudjeluje u više mehanizama koji su odgovorni za ispravnu segregaciju kromosoma tijekom reproduktivne faze bakterije *S. coelicolor*. Identifikacija proteinskih interakcija omogućava bolji uvid u sve stanične procese u kojima sudjeluje ispitivani protein, odnosno cjelovitije razumijevanje njegove biološke uloge. Stoga je za nastavak istraživanja staničnih procesa u kojima sudjeluje protein SsbB, primjenjen bakterijski sustav dvaju hibrida (BACTH) kako bi se identificirale proteinske interakcije koje protein SsbB ostvaruje *in vivo*. Iako se ovaj sustav često koristi, uočeni su i određeni nedostaci BACTH metode. Prvi nedostatak javlja se zbog tehnike izrade biblioteke gena koja je često ne sadrži sve gene jednog genoma (Kieser i sur., 2000). Drugi nedostatak se javlja zbog identifikacije „lažnih“ pozitivna. Na primjer, transkripcijski faktori iz biblioteke gena mogu aktivirati transkripciju adenilat ciklaze bakterije domaćina bez ostvarivanja interakcije s proteinom „mamcem“. Također, biblioteka može sadržavati i DNA fragmente koji sadrže dva (kao npr. kandidat 14, tablica 3.4) ili više gena ili dijelove istog gena koji se također mogu transkribirati i translirati u okviru čitanja te ostvariti interakciju. U

ovom slučaju potrebno je nakon identifikacije DNA fragmenta provesti dodatne molekularne analize kako bi se točno identificirao protein ili dio proteina koji je ostvario interakciju s proteinom od interesa.

Uzimajući ove mogućnosti u obzir tijekom izrade ovog doktorskog rada načinjeni su različiti kontrolni eksperimenti unakrsnog testiranja konstruktata plazmida „mamaca” i plazmida „plijena”. Treba napomenuti kako se plavo obojenje pojedinačnih kolonija pojavilo u slučaju kotransformacije plazmida „mamaca” i „plijena” koji oba eksprimiraju protein SsbB, bez obzira na kojem kraju proteina se nalazi podjedinica CyaA (slika 3.23). S obzirom da protein SsbB u citoplazmi formira tetramere pretpostavljamo kako polipeptidi eksprimirani s oba plazmida, tvore monomere koji zatim ostvaruju homotetramere ili neke druge oligomerne strukture. Time podjedinice T18 i T25 CyaA dolaze u neposrednu blizinu što omogućuje rekonstituciju aktivnosti adenilat ciklaze. Također postoji i mogućnost da tetrameri s podjedinicom T18 i tetrameri s podjedinicom T25 CyaA dođu u neposrednu blizinu prilikom kooperativnog vezanja jIDNA (Lohman i Ferrari, 1994). Tijekom ovih eksperimenata uzet je u obzir i statistički izračun (vjerojatnost) broja kolonija koje je potrebno pregledati kako bi se našao željeni gen. Zato je biblioteka ispitana na minimalno 50 000 kolonija za svaki plazmid „mamac”.

Rezultati BACTH metode sažeti u tablici 3.24 prikazuju sve potencijalne interaktante proteina SsbB koji su identificirani metodom BACTH. Proteini identificirani kao proteinski interaktanti su jako raznoliki s obzirom na pripisane im stanične funkcije i ni za jednog od navedenih nema literaturnih podataka da ostvaruju interakcije s proteinima SSB. Uz to, većini ovih proteina funkcije su pretpostavljene temeljem sličnosti DNA skvence sa srodnim organizmima. Također je važno napomenuti kako se pojedine interakcije preferencijalno ostvaruju s N – krajem (7) ili C - krajem (4) proteina SsbB i to bez obzira ima li na C kraju proteina deleciju od 37 aminokiselina. Ovo je zanimljivo jer sugerira kako aminokiselinska sekvenca C-kraja nije važna, odnosno da protein ostvaruje interakciju preko neopisanog motiva koji je smješten bliže C-kraju. Prema dosadašnjim spoznajama esencijalni proteini SSB imaju očuvan kiseli C-kraj s kojim ostvaruju interakcije s različitim proteinima iz metabolizma DNA (Shereda i sur., 2008). Nasuprot tome protein SsbB nema očuvan kiseli C-kraj, a ovi rezultati pokazali su kako kod paralognog proteina SsbB C-kraj nije ključan u ostvarivanju interakcija.

Od svih dobivenih prikazanih potencijalnih interaktanata najzanimljiviji za daljnje istraživanje i potvrdu interakcije s obzirom na potvrđenu funkciju u genomu, bio je protein DevA. Ovaj protein pripada velikoj porodici proteina GntR, transkripcijskih regulatora, koji su pod kontrolom signalnih molekula (*engl. effector molecules*). Gen *devA* (SCO4190) tvori operon s nizvodnim genom *devB* koji kodira za pretpostavljenu hidrolazu (fosfatazu) uključenu u formiranje zračnog micelija (Hoskisson i sur., 2006). Budući da poput gena *ssbB*, nedostatak gena *devA* u bakteriji *S. coelicolor* uzrokuje defekt

u reproduktivnoj fazi rasta, bilo za očekivati kako sudjeluju u istom staničnom mehanizmu tijekom sporulacije.

4.3.2 Proteini DevA, SsbB i promotorska regija gena devA ostvaruju stabilne interakcije

Prema rezultatima dot-blot analize (slika 3.25) pokazano je kao je u prisustvu dDNA (devAups) interakcija SsbB i DevA jača u odnosu na reakcijsku smjesu kojoj je dodana jDNA (jDNA i tetramera SsbB u omjeru 1:1). Iz literaturnih podataka poznato je kako DevA veže i samoregulira svoju transkripciju (Hoskisson i sur., 2006). Temeljem ovih rezultata pretpostavljeno je kako je interakcija između proteina dovoljno jaka te nije došlo do titracije proteina SsbB s molekulama jDNA u reakcijskoj smjesi (slika 3.25, A i B). Također se uočava kako se SsbB veže i na dDNA. Moguće je da ova regija ostvaruje strukture uzvojnice s jDNA na koju se SsbB veže s visokim afinitetom (slika 3.25, B). Iz navedene slike se jasno vidi kako prisustvo dDNA pridonosi ovoj interakciji (slika 3.25, C). Ovaj rezultat se može objasniti da prilikom vezanja DevA za promotorsku regiju nastaju male regije jDNA što pomaže efikasnijem vezanju proteina SsbB pri čemu se ostvaruju i snažnije interakcije između ova dva proteina. Ne može se isključiti ni mogućnost da tijekom vezanja DevA s dDNA regijom dolazi do malih promjena u strukturi DevA koje zatim omogućavaju efikasniju interakciju ovog proteina s proteinom SsbB.

Metodom EMSA dodatno se potvrdila interakcija između proteina SsbB i DevA stvaranjem trojnog kompleksa SsbB-DevA-dDNA pri različitim koncentracijama proteina i dDNA (devAups) (slika 3.26). Prema zaostajanju u gelu vidi se ostvarivanje trojnog (SsbB-DevA-dDNA) kompleksa. Međutim pri višim koncentracijama samog proteina SsbB uočava se i formiranje dvojnog kompleksa (dDNA-SsbB). Ostvarivanje ovih interakcija proteina SsbB s dDNA u odsustvu proteina DevA može se objasniti nastajanjem jDNA na krajevima dDNA molekula gdje uobičajeno dolazi do lakšeg narušavanja vodikovih veza između baza, koje protein SSB veže s velikim afinitetom. Također, kako je već diskutirano u odlomku prije, kod dl DNA molekula mogu nastati i strukture ukosnice s jDNA regijama koje također mogu biti mjesta vezanja proteina SSB. Zbog navedenih razloga kao i male razlike u zaostajanju u gelu između dvojnog i trojnog kompleksa u gelu ova metoda se nije pokazala dovoljno precizna za analizu ispitivanih interakcija.

Za smjesu proteina DevA i SsbB jasno je potvrđeno kako ova dva proteina ostvaruju međusobnu interakciju. Prema izmjerenim CD spektrima proteina DevA i SsbB te kombinacijama proteina i dDNA, vidljivo je također da je ova interakcija neovisna o dDNA (slika 3.28). I ova metoda je poput metode Dot-blot i EMSE pokazala kako je interakcija proteina DevA i SsbB moguća i bez DNA, ali isto tako i da je proteinska interakcija stabilnija ukoliko se u smjesu doda dDNA(devAups) (slika

3.25, C i D). Uz to treba istaknuti kako trojni kompleks SsbB-DevA-dlDNA ima znatno višu T_m od dvojnog kompleksa DevA-dlDNA što ukazuje na povećanje stabilnosti kada se kompleksu DevA-dlDNA doda protein SsbB.

4.4 Delecija gena *ssbB* u mutantu *devA* smanjuje defekt u razvojnem stadiju bakterije *S. coelicolor* i deregulira sintezu aktinorodina

Biološki značaj ostvarivanja interakcije proteina SsbB-DevA ispitan je *in vivo* u homolognom domaćinu *S. coelicolor*. Pojedinačne mutacije ovih gena kod bakterije *S. coelicolor* rezultira razvojnim defektom u fazi sporulacije (Hoskisson i sur., 2006; Paradžik i sur., 2013) što ukazuje da su njihove biološke uloge uključene u stanične procese koji kontroliraju reproduktivnu fazu. Za razliku od $\Delta ssbB$, mutacija gena *devA* uzrokuje veći defekt u veličini spora, kondenzaciji kromosoma i septaciji, te produkciji vrlo kratkih lanaca spora (slika 3.31). Naša analiza pokazala je kako u mutantu $\Delta devA$ postotak anukleiranih spora ne odstupa bitno od divljeg tipa, ali se zato skoro 60% spora nalazi ispod prosječne duljine (slika 3.32). Neočekivano, kada je mutantu $\Delta devA$ dodana mutacija i u genu *ssbB*, smanjen je defekt uzrokovan mutacijom gena *devA*. Lanci spora mutanta $\Delta devA \Delta ssbB$ bili su duži i veličine spora u lancu približile su se vrijednostima divljeg tipa bakterije *S. coelicolor*, ali se zato pojavio defekt u segregaciji kromosoma koji je bio sličan mutantu $\Delta ssbB$. Kao što je objašnjeno u uvodnom dijelu ovog rada, proteini SSB u stanicama modificiraju aktivnost (povećavaju ili smanjuju) cijelog niza proteina koji sudjeluju u metabolizmu DNA. Uzimajući u obzir do sada objavljene podatke o proteinima SSB kao i rezultate dobivene u ovom radu, pretpostavljamo da je djelomična supresija *devA* mutacije u soju kojem nedostaje protein SsbB uzrokovana uključivanjem nekih staničnih proteina odnosno procesa koji nisu pod kontrolom proteina SsbB. Zanimljivo je spomenuti kako se defekt delecije gena *ssbB* uočava tijekom sporulacije, iako se geni *devA* i *devB* transkribiraju s promotora gena *devA* samo tijekom vegetativnog rasta. Ova transkripcija je pod kontrolom proteina DevA koji specifično veže svoju promotorsku regiju i time negativno regulira vlastitu ekspresiju (Hoskisson i sur., 2006). Naši rezultati dobiveni pomoću različitih *in vivo* i *in vitro* metoda (BACTH metoda, Dot-blot, EMSA, i CD spektrometrije) sugeriraju kako u represiji gena *devA/devB* sudjeluje i protein SsbB. Naime, rezultati ovog rada jasno pokazuju kako SsbB-DevA ostvaruju stabilne interakcije na promotorskoj regiji gena *devA*. Također, naši objavljeni rezultati pokazali su kako se SsbB eksprimira puno bolje u minimalnom mediju (MM), dok je njegova ekspresija bila jedva na granici detekcije u bogatom mediju (Paradžik i sur., 2013). Hoskisson i autori su pokazali kako se mutant $\Delta devB$ (kondicionalni mutant) ponaša u minimalnom i bogatom mediju. Dok u bogatom mediju ovaj mutant nije mogao stvarati zračne hife, u minimalnom mediju ih je stvarao, ali bez poprečnih septi. S obzirom da je SsbB u minimalnom mediju prisutan u većoj količini, pretpostavljamo kako je i represija gena *devA/devB* jača u takvim uvjetima.

Poznato je kako bakterija *S. coelicolor* puno brže sporulira u minimalnoj hranjivoj podlozi, pa se ovaj efekt može objasniti barem djelomično, prisustvom veće koncentracije proteina SsbB te boljoj represiji transkripcije gena *devA/devB*.

Osim zanimljivih morfoloških promjena koje su uočene u dvostrukom mutantu bakterije *S. coelicolor* ($\Delta devA \Delta ssbB$), ove mutacije su neočekivano uzrokovale izrazito povećanu sintezu antibiotika aktinorodina koji je cijelom zračnom miceliju dao plavo obojenje (slika 3.30). Analiza objavljenih rezultata i slika $\Delta devA$ mutanta pokazuje kako već ovaj jednostruki mutant ima nešto veću produkciju aktinorodina (Clark i Hoskisson, 2011) u odnosu na divlji tip bakterije, iako to sami autori nisu komentirali u svom radu. Može se pretpostaviti kako DevA funkcionira i kao represor nekih gena ili aktivatora sinteze sinteze aktinorodina. Pretpostavljamo kako mu u tome pomaže protein SsbB kako je opisano za *devA* promotorsku regiju. To objašnjava zašto nedostatak oba gena uzrokuje sintezu aktinorodina u značajno većoj količini. Također i ovaj rezultat upućuje kako interakcija proteina SsbB i DevA pojačava represorsku funkciju proteina DevA. I dvostruki mutant $\Delta parB \Delta ssbB$ također pojačava proizvodnja aktinorodina (slika 3.19), no ovaj efekt je puno manje izražen, te se može zaključiti kako proteini DevA i SsbB imaju ključnu ulogu u regulaciji sinteze antibiotika aktinorodina.

5 Zaključci

Pri izradi ove doktorske radnje dobivene su nove spoznaje o strukturnim i funkcionalnim karakteristikama paralognog proteina SsbB koji je važan tijekom reproduktivne faze bakterije *S. coelicolor*:

- Analizom mutanata dobivenih ciljanom mutagenezom pokazana je važnost prisustva cisteina (Cys7) za ostvarivanje stabilnije kvartarne strukture proteina SsbB u odnosu na mutirane proteine SsbBCys₇Ala i SsbBCys₇Ser.
- Stabilne forme tetramera proteina SsbB doprinose pravilnom sazrijevanju spora te završetku sporulacijskog ciklusa.
- Mutacije u genima *parB* i *smc ΔssbB* smanjuju anukleiranost spora i povećavaju rasap duljina spora kod bakterije *S. coelicolor*. Duljina spora se najviše povećava kod trostrukog mutanta *ΔparBΔsmcΔssbB*.
- BACHT metoda ukazuje kako protein SsbB ostvaruje interakcije s proteinima koji sudjeluju u različitim staničnim procesima. Identificirane interakcije ostvarivale su se preko N- i/ili C-krajeva proteina SsbB.
- Protein SsbB ostvaruje interakciju s transkripcijskim regulatorom DevA:
 - Proteini DevA, SsbB i promotorska regija gena *devA* ostvaruju stabilne interakcije pri čemu protein SsbB pridonosi represijskoj funkciji proteina DevA.
 - Delecija gena *ssbB* u mutantu *ΔdevA* smanjuje defekt u razvojnom stadiju bakterije *S. coelicolor* i deregulira sintezu aktinorodina.

6 *Literatura*

- Agilent Technologies (2011) 'QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit', *Instruction Manual*, Revision D.
- Antelmann, H. i Helmann, J. D. (2011) 'Thiol-Based Redox Switches and Gene Regulation', *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(6), pp. 1049–1063.
- Aslund, F. i Beckwith, J. (1999) 'Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation.', *Cell*, 96(6), pp. 751–3.
- Baker, T. A. i Wickner, S. H. (1992) 'Genetics and Enzymology of DNA Replication in Escherichia Coli', *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews, 26(1), pp. 447–477.
- Bao, K. i Cohen, S. N. (2003) 'Recruitment of terminal protein to the ends of Streptomyces linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication', *Genes and Development*, 17(6), pp. 774–785. doi: 10.1101/gad.1060303.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. P. (2016) 'Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), pp. 1–43.
- Beites, T., Oliveira, P., Rioseras, B., Pires, S. D. S., Oliveira, R., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., Manteca, Á., Mendes, M. V. (2015) 'Streptomyces natalensis programmed cell death and morphological differentiation are dependent on oxidative stress', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(July), pp. 1–15.
- Beites, T., Pires, S. D. S., Santos, C. L., Osório, H., Moradas-Ferreira, P., Mendes, M. V. (2011) 'Crosstalk between ROS homeostasis and secondary metabolism in s. natalensis atcc 27448: Modulation of pimaricin production by intracellular ros', *PLoS ONE*, 6(11).
- Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. a, Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., Hopwood, D. a (2002) 'Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Nature*, 417(6885), pp. 141–147.
- Bernstein, D. A, Eggington, J. M., Killoran, M. P., Misic, A. M., Cox, M. M., Keck, J. L. (2004) 'Crystal structure of the Deinococcus radiodurans single-stranded DNA-binding protein suggests a mechanism for coping with DNA damage.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), pp. 8575–8580.
- Bi, E. i Lutkenhaus, J. (1991) 'FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli', *Nature*, 354(6349), pp. 161–164.
- Bielen, A., Četković, H., Long, P. F., Schwab, H., Abramić, M., Vujaklija, D. (2009) 'The SGNH-hydrolase of Streptomyces coelicolor has (aryl)esterase and a true lipase activity', *Biochimie*, 91(3), pp. 390–400.

- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254.
- Bruylants, G., Wouters, J., Michaux, C. (2005) 'Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design', *Current Medicinal Chemistry*, 12(17), pp. 2011–2020.
- Bujalowski, W. i Lohman, T. M. (1986) 'Escherichia coli Single-Strand Binding Protein Forms Multiple, Distinct Complexes with Single-Stranded DNA', *Biochemistry*, 25(24), pp. 7799–7802.
- Bush, M. J., Chandra, G., Findlay, K. C., Buttner, M. J. (2017) 'Multi-layered inhibition of Streptomyces development: BldO is a dedicated repressor of whiB', *Molecular Microbiology*, 104(5), pp. 700–711.
- Bush, M. J., Tschowri, N., Schlimpert, S., Flärdh, K., Buttner, M. J. (2015) 'C-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 749–760.
- Bystrykh, L. V, Fernandez-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A., Dijkhuizen, L. (1996) 'Production of Actinorhodin-Related " Blue Pigments " by Streptomyces coelicolor A3(2).', *Journal of Bacteriology*, 178(8), pp. 2238–2244.
- Celler, K., Koning, R. I., Willemsse, J., Koster, A. J., van Wezel, G. P. (2016) 'Cross-membranes orchestrate compartmentalization and morphogenesis in Streptomyces', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7(May), pp. 1–8.
- Chater, K. F. (1972) 'A Morphological and Genetic Mapping Study of White Colony Mutants of Streptomyces coelicolor', *Journal of General Microbiology*, 72(1), pp. 9–28.
- Chater, K. F. (2016) 'Recent advances in understanding Streptomyces', *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev), p. 2795.
- Chater, K. F. i Chandra, G. (2006) 'The evolution of development in Streptomyces analysed by genome comparisons', *FEMS Microbiology Reviews*, 30(5), pp. 651–672.
- Clark, L. C. i Hoskisson, P. A. (2011) 'Duplication and evolution of devA-like genes in Streptomyces has resulted in distinct developmental roles', *PLoS ONE*, 6(10).
- Curth, U., Genschel, J., Urbanke, C., Greipel, J. (1996) 'In vitro and in vivo function of the C-terminus of Escherichia coli single-stranded DNA binding protein', *Nucleic Acids Research*, 24(14), pp. 2706–2711.
- Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z. (2012) 'Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.
- D'Autréaux, B. i Toledano, M. B. (2007) 'ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 813–824.
- Dedrick, R. M., Wildschutte, H., McCormick, J. R. (2009) 'Genetic interactions of smc, ftsK, and parB

- genes in *Streptomyces coelicolor* and their developmental genome segregation phenotypes', *Journal of Bacteriology*, 91(1), pp. 320–332.
- DeSanti, C. L. i Strohl, W. R. (2003) 'Characterization of the *Streptomyces* sp . Strain C5 snp Locus and Development of snp -Derived Expression Vectors', 69(3), pp. 1647–1654.
- Dharmaraj, S. i Sumantha, A. (2009) 'Bioactive potential of *Streptomyces* associated with marine sponges', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), pp. 1971–1979.
- Ditkowski, B., Holmes, N., Rydzak, J., Donczew, M., Bezulska, M., Ginda, K., Kędzierski, P., Zakrzewska-Czerwińska, J., Kelemen, G. H., Jakimowicz, D. (2013) 'Dynamic interplay of ParA with the polarity protein, Scy, coordinates the growth with chromosome segregation in *Streptomyces coelicolor*', *Open Biology*, 3(MAR).
- Ditkowski, B., Troć, P., Ginda, K., Donczew, M., Chater, K. F., Zakrzewska-Czerwińska, J., Jakimowicz, D. (2010) 'The actinobacterial signature protein ParJ (SCO1662) regulates ParA polymerization and affects chromosome segregation and cell division during *Streptomyces* sporulation', *Molecular Microbiology*, 78(6), pp. 1403–1415.
- Elliot, M. A., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Leskiw, B. K. (2001) 'BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Molecular Microbiology*, 40(1), pp. 257–269.
- Elliot, M. A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M. J., Cohen, S. N., Kao, C. M., Buttner, M. J. (2003) 'The chaplins: A family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*', *Genes and Development*, 17(14), pp. 1727–1740.
- Erickson, H. P., Anderson, D. E., Osawa, M. (2010) 'FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), pp. 504–528.
- Euromedex (2006) 'Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit', *Euromedex*, pp. 1–21.
- Fedorov, R., Witte, G., Urbanke, C., Manstein, D. J., Curth, U. (2006) '3D structure of *Thermus aquaticus* single-stranded DNA-binding protein gives insight into the functioning of SSB proteins', *Nucleic Acids Research*, 34(22), pp. 6708–6717.
- Fernández-Martínez, L. T., Del Sol, R., Evans, M. C., Fielding, S., Herron, P. R., Chandra, G., Dyson, P. J. (2011) 'A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(3), pp. 515–522.
- Flärdh, K. (2003) 'Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Molecular Microbiology*, 49(6), pp. 1523–1536.
- Flärdh, K. i Buttner, M. J. (2009) '*Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium', *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), pp. 36–49.
- Flärdh, K., Richards, D. M., Hempel, A. M., Howard, M., Buttner, M. J. (2012) 'Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*', *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), pp. 737–743.

- Friedrich, M. G., Wang, Z., Oakley, A. J., Schey, K. L., Truscott, R. J. W. (2017) 'Hotspots of age-related protein degradation: the importance of neighboring residues for the formation of non-disulfide crosslinks derived from cysteine', *Biochemical Journal*, 474(14), pp. 2475–2487.
- Gerdes, K., Howard, M., Szardenings, F. (2010a) 'Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation', *Cell*, 141(6), pp. 927–942.
- Gerdes, K., Howard, M., Szardenings, F. (2010b) 'Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation', *Cell*, pp. 927–942.
- Glassberg, J., Meyer, R. R., Kornberg, A. (1979) 'Mutant single-strand binding protein of *Escherichia coli*: genetic and physiological characterization', *J Bacteriol*, 140(1), pp. 14–19.
- Gregory, M. A., Till, R., Smith, M. C. M. (2003) 'Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 185(17), pp. 5320–5323.
- Grove, D. E., Willcox, S., Griffith, J. D., Bryant, F. R. (2005) 'Differential single-stranded DNA binding properties of the paralogous SsbA and SsbB proteins from *Streptococcus pneumoniae*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), pp. 11067–11073.
- Gunasekera, T. S., Csonka, L. N., Paliy, O. (2008) 'Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses', *Journal of Bacteriology*, 190(10), pp. 3712–3720.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., Chater, K. F. (2003) 'PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), pp. 1541–6.
- Gust, B., Rourke, S. O., Bird, N., Kieser, T., Chater, K. (2004) 'Recombineering in *Streptomyces coelicolor*', (April), pp. 1–22.
- Harrison, J. i Studholme, D. J. (2014) 'Recently published *Streptomyces* genome sequences', *Microbial Biotechnology*, 7(5), pp. 373–380.
- Hempel, A. M., Wang, S. B., Letek, M., Gil, J. A., Flärdh, K. (2008) 'Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*', *Journal of Bacteriology*, 190(22), pp. 7579–7583.
- Hengst, C. D. den, Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K., Buttner, M. J. (2010) 'Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth', *Molecular Microbiology*, 78(2), pp. 361–379.
- Holmes, N. A., Walshaw, J., Leggett, R. M., Thibessard, A., Dalton, K. A., Gillespie, M. D., Hemmings, A. M., Gust, B., Kelemen, G. H. (2013) 'Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), pp. E397–E406.
- Hopwood, D. A. (1999) 'Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in

- silico', *Microbiology*, 145(9), pp. 2183–2202.
- Hopwood, D. A. (2006) 'Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome.', *Annual review of genetics*, 40(1), pp. 1–23.
- Hopwood, D. A. (2007) 'Streptomyces in nature and medicine : the antibiotic makers', *New York: Oxford University Press*, 63(2), pp. 273–274.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., Schrempf, H. (1986) *Genetic Manipulation of Streptomyces: A laboratory manual, Biochemical Education*.
- Hoskisson, P. A., Rigali, S., Fowler, K., Findlay, K. C., Buttner, M. J. (2006) 'DevA, a GntR-like transcriptional regulator required for development in *Streptomyces coelicolor*', *Journal of Bacteriology*, 188(14), pp. 5014–5023.
- Imlay, J. A. (2008) 'Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide', *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), pp. 755–776.
- Jakimowicz, D., Majka, J., Konopa, G., Wegrzyn, G., Messer, W., Schrempf, H., Zakrzewska-Czerwińska, J. (2000) 'Architecture of the *Streptomyces lividans* DnaA protein-replication origin complexes', *Journal of Molecular Biology*, 298(3), pp. 351–364.
- Jakimowicz, D., Mouz, S., Zakrzewska-Czerwińska, J., Chater, K. F. (2006) 'Developmental control of a parAB promoter leads to formation of sporulation-associated ParB complexes in *Streptomyces coelicolor*', in *Journal of Bacteriology*, pp. 1710–1720.
- Jakimowicz, D. i Van Wezel, G. P. (2012) 'Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: How to build a septum in the middle of nowhere?', *Molecular Microbiology*, 85(3), pp. 393–404.
- Jakimowicz, D., Zydek, P., Kois, A., Zakrzewska-Czerwińska, J., Chater, K. F. (2007) 'Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces* hyphae', *Molecular Microbiology*, 65(3), pp. 625–641.
- Jones, S. E. i Elliot, M. A. (2018) "Exploring" the regulation of *Streptomyces* growth and development', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 42(Figure 1), pp. 25–30.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., Ladant, D. (1998) 'A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), pp. 5752–5756.
- Khakimova, M., Ahlgren, H. G., Harrison, J. J., English, A. M., Nguyen, D. (2013) 'The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance', *Journal of Bacteriology*, 195(9), pp. 2011–2020.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. (2000) 'Practical *Streptomyces* Genetics', *John Innes Centre Ltd.*, p. 529.
- Kim, H., Calcutt, M. J., Schmidt, F. J., Chater, K. F., Teknik, D., Centre, J. I., Nr, N., Kingdom, U., Al, K. I. M. E. T. (2000) 'Partitioning of the Linear Chromosome during Sporulation of *Streptomyces*

- coelicolor A3 (2) Involves an oriC -Linked parAB Locus', 182(5), pp. 1313–1320.
- Kim, M. S., Dufour, Y. S., Yoo, J. S., Cho, Y. B., Park, J. H., Nam, G. B., Kim, H. M., Lee, K. L., Donohue, T. J., Roe, J. H. (2012) 'Conservation of thiol-oxidative stress responses regulated by SigR orthologues in actinomycetes', *Molecular Microbiology*, 85(2), pp. 326–344.
- Kirkitaдзе, M. D., Henderson, C., Price, N. C., Kelly, S. M., Mullin, N. P., Parkinson, J., Dryden, D. T., Barlow, P. N. (1999) 'Central modules of the vaccinia virus complement control protein are not in extensive contact.', *The Biochemical journal*, 344(Pt 1), pp. 167–175.
- Kois-Ostrowska, A., Strzałka, A., Lipietta, N., Tilley, E., Zakrzewska-Czerwińska, J., Herron, P., Jakimowicz, D. (2016) 'Unique Function of the Bacterial Chromosome Segregation Machinery in Apically Growing Streptomyces - Targeting the Chromosome to New Hyphal Tubes and its Anchorage at the Tips', *PLoS Genetics*, 12(12), pp. 1–25.
- Kois, A., Świątek, M., Jakimowicz, D., Zakrzewska-Czerwińska, J. (2009) 'SMC protein-dependent chromosome condensation during aerial hyphal development in Streptomyces', *Journal of Bacteriology*, 91(1), pp. 310–319.
- Kozlov, A. G., Jezewska, M. J., Bujalowski, W., Lohman, T. M. (2010) 'Binding specificity of escherichia coli single-stranded DNA binding protein for the χ Subunit subunit of DNA pol III holoenzyme and PriA helicase', *Biochemistry*, 49(17), pp. 3555–3566.
- Kozlov, A. G. i Lohman, T. M. (2012) 'SSB Binding to ssDNA Using Isothermal Titration Calorimetry', *Methods Mol Biol.*, (922), pp. 37–54.
- Kumaran, S., Kozlov, A. G., Lohman, T. M. (2006) 'Saccharomyces cerevisiae replication protein A binds to single-stranded DNA in multiple salt-dependent modes', *Biochemistry*, 45(39), pp. 11958–11973.
- Kutzner, H. J. i Waksman, S. A. (1959) 'STREPTOMYCES COELICOLOR MÜLLER AND STREPTOMYCES VIOLACEORUBER WAKSMAN AND CURTIS, TWO DISTINCTLY DIFFERENT ORGANISMS', *Journal of Bacteriology*, 78(4), pp. 528–538.
- Leonard, T. A, Møller-Jensen, J., Löwe, J. (2005) 'Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1455), pp. 523–535.
- Lindner, C., Nijland, R., van Hartskamp, M., Bron, S., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P. (2004) 'Differential expression of two paralogous genes of Bacillus subtilis encoding single-stranded DNA binding protein', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 186(4), pp. 1097–1105.
- Liu, J. H., Chang, T. W., Huang, C. Y., Chen, S. U., Wu, H. N., Chang, M. C., Hsiao, C. D. (2004) 'Crystal structure of PriB, a primosomal DNA replication protein of Escherichia coli', *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), pp. 50465–50471.
- Lohman, T. M. i Overman, L. B. (1985) 'Two Binding Modes in Escherichia coli Single Strand Binding Protein-Single Stranded DNA Complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 260(25), pp. 3594–3603.

- Lohman, T. M. T. i Ferrari, M. E. M. (1994) 'Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities.', *Annual review of biochemistry*, 63, pp. 527–70.
- MacNeil, D., Gewain, K., Ruby, C., Dezeny, G., Gibbons, P., MacNeil, T. (1992) 'Analysis of Streptomyces avermitilis genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector', *Gene*, 111(1), pp. 61–8.
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C., Sanchez, J. (2007) 'Aerial hyphae in surface cultures of Streptomyces lividans and Streptomyces coelicolor originate from viable segments surviving an early programmed cell death event', *FEMS Microbiology Letters*, 274(1), pp. 118–125.
- Manteca, A., Mäder, U., Connolly, B. A., Sanchez, J. (2006) 'A proteomic analysis of Streptomyces coelicolor programmed cell death', *Proteomics*, 6(22), pp. 6008–6022.
- Marintcheva, B., Marintchev, A., Wagner, G., Richardson, C. C. (2008) 'Acidic C-terminal tail of the ssDNA-binding protein of bacteriophage T7 and ssDNA compete for the same binding surface', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), pp. 1855–1860.
- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A. V., Graumann, P. L. (2002) 'Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in Bacillus subtilis that interact with SMC protein', *The EMBO journal*. Oxford University Press, 21(12), pp. 3108–3118.
- McCormick, J. R. i Flärdh, K. (2012) 'Signals and regulators that govern Streptomyces development', *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), pp. 206–231.
- McCormick, J. R., Su, E. P., Driks, A., Losick, R. (1994) 'Growth and viability of Streptomyces coelicolor mutant for the cell division gene ftsZ', *Molecular Microbiology*, 14(2), pp. 243–254.
- Mierzejewska, J. i Jagura-Burdzy, G. (2012) 'Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle', *Plasmid*, 67(1), pp. 1–14.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., Manzanal, M. B. (1999) 'Hyphal death during colony development in Streptomyces antibioticus: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote', *Journal of Cell Biology*, 145(3), pp. 515–525.
- Mijaković, I., Petranović, D., Maček, B., Čepo, T., Mann, M., Davies, J., Jensen, P. R., Vujaklija, D. (2006) 'Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine', *Nucleic Acids Research*, 34(5), pp. 1588–1596.
- Murzin, A. G. (1993) 'OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences', *The EMBO Journal*, 12(3), pp. 861–867.
- Nguyen, K. T., Willey, J. M., Nguyen, L. D., Nguyen, L. T., Viollier, P. H., Thompson, C. J. (2002) 'A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium Streptomyces coelicolor', *Molecular Microbiology*, 46(5), pp. 1223–1238.
- Noens, E. E., Mersinias, V., Willemse, J., Traag, B. A., Laing, E., Chater, K. F., Smith, C. P., Koerten, H. K., Wezel, G. P. Van (2007) 'Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall

- synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of *Streptomyces coelicolor*', 64, pp. 1244–1259.
- Paget, M. S. B. i Buttner, M. J. (2003) 'Thiol-Based Regulatory Switches', *Annual Review of Genetics*, 37(1), pp. 91–121.
- Paget, M. S. B., Kang, J.-G., Roe, J.-H., Buttner, M. J. (1998) 'Sig-R an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor*(A3(2))', *The EMBO Journal*, 17(19), pp. 5776–5782.
- Paget, M. S. B., Molle, V., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Buttner, M. J. (2001) 'Defining the disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Identification of the sigmaR regulon', *Molecular Microbiology*, 42(4), pp. 1007–1020.
- Paquet, N., Adams, M. N., Ashton, N. W., Touma, C., Gamsjaeger, R., Cubeddu, L., Leong, V., Beard, S., Bolderson, E., Botting, C. H., O'Byrne, K. J., Richard, D. J. (2016) 'HSSB1 (NABP2/OBFC2B) is regulated by oxidative stress', *Scientific Reports*, 6.
- Paradžik, T., Ivić, N., Filić, Z., Manjasetty, B. A., Herron, P., Luić, M., Vujaklija, D. (2013) 'Structure-function relationships of two paralogous single-stranded DNA-binding proteins from *Streptomyces coelicolor*: Implication of SsbB in chromosome segregation during sporulation', *Nucleic Acids Research*, 41(6), pp. 3659–3672.
- Paulus, C., Rebets, Y., Tokovenko, B., Nadmid, S., Terekhova, L. P., Myronovskyi, M., Zotchev, S. B., Rückert, C., Braig, S., Zahler, S., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A. (2017) 'New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18', *Scientific Reports*. The Author(s), 7, p. 42382.
- Pigac, J. i Schrepf, H. (1995) 'A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation', *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), pp. 352–356.
- Ponomarev, V. A., Makarova, K. S., Aravind, L., Koonin, E. V. (2003) 'Gene duplication with displacement and rearrangement: Origin of the bacterial replication protein PriB from the single-stranded DNA-binding protein Ssb', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 5(4), pp. 225–229.
- Rodríguez-García, A., Barreiro, C., Santos-Beneit, F., Sola-Landa, A., Martín, J. F. (2007) 'Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a DeltaphoP mutant.', *Proteomics*, 7(14), pp. 2410–29.
- Roy, R., Kozlov, A. G., Lohman, T. M., Ha, T. (2007) 'Dynamic Structural Rearrangements Between DNA Binding Modes of *E. coli* SSB Protein', *Journal of Molecular Biology*, 369(5), pp. 1244–1257.
- Ruban-Ośmiałowska, B., Jakimowicz, D., Smulczyk-Krawczyszyn, A., Chater, K. F., Zakrzewska-Czerwińska, J. (2006) 'Replisome localization in vegetative and aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*', *Journal of Bacteriology*, 188(20), pp. 7311–7316.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual.', in *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 931–957.

- Schwedock, J., McCormick, J. R., Angert, E. R., Nodwell, J. R., Losick, R. (1997) 'Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*', *Molecular Microbiology*, 25(5), pp. 847–858.
- Shamoo, Y., Friedman, A. M., Parsons, M. R., Konigsberg, W. H., Steitz, T. A. (1995) 'Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA', *Nature*, 376(6538), pp. 362–366.
- Shereda, Robert D, Kozlov, A. G., Lohman, T. M., Cox, M. M., Keck, J. L. (2008) 'SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 43(5), pp. 289–318.
- Shereda, R. D., Kozlov, A. G., Lohman, T. M., Cox, M. M., Keck, J. L., Shereda, Robert D, Kozlov, A. G., Lohman, T. M., Cox, M. M., Keck, J. L. (2008) 'SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 43(5), pp. 289–318.
- Soppa, J., Kobayashi, K., Oesterhelt, D., Ehrlich, S. D., Dervyn, E., Ogasawara, N., Moriya, S. (2002) 'Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB', 45, pp. 59–71.
- Sreerama, N. i Woody, R. W. (2000) 'Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set', *Analytical Biochemistry*, 287(2), pp. 252–260.
- Srivastava, O. P., Kirk, M. C., Srivastava, K. (2004) 'Characterization of Covalent Multimers of Crystallins in Aging Human Lenses', *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), pp. 10901–10909.
- Stefanić, Z., Vujaklija, D., Luić, M. (2009) 'Structure of the single-stranded DNA-binding protein from *Streptomyces coelicolor*.' , *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 65(Pt 9), pp. 974–9.
- Szczepankowska, A. K., Prestel, E., Mariadassou, M., Bardowski, J. K., Bidnenko, E. (2011) 'Phylogenetic and complementation analysis of a single-stranded DNA binding protein family from lactococcal phages indicates a non-bacterial origin', *PLoS ONE*, 6(11).
- Touma, C., Adams, M. N., Ashton, N. W., Mizzi, M., El-Kamand, S., Richard, D. J., Cubeddu, L., Gamsjaeger, R. (2017) 'A data-driven structural model of hSSB1 (NABP2/OBFC2B) self-oligomerization', *Nucleic Acids Research*, 45(14), pp. 8609–8620.
- Tschowri, N., Schumacher, M. A., Schlimpert, S., Chinnam, N. B., Findlay, K. C., Brennan, R. G., Buttner, M. J. (2014) 'Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control streptomyces development', *Cell*, 158(5), pp. 1136–1147.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. (2007) 'Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), pp. 495–548.
- Volff, J. N. i Altenbuchner, J. (2000) 'A new beginning with new ends: Linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution', *FEMS Microbiology Letters*, pp. 143–150.

- Vujaklija, D. i Bielen, A. (2007) 'Priprema i transformacija protoplasta', *Metode u molekularnoj biologiji*, U:, pp. 923–926.
- Wang, L., Yu, Y., He, X., Zhou, X., Deng, Z., Chater, K. F., Tao, M. (2007) 'Role of an FtsK-Like Protein in Genetic Stability in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Journal of Bacteriology*, 189(6), p. 2310 LP-2318.
- Wang, X. J., Yan, Y. J., Zhang, B., An, J., Wang, J. J., Tian, J., Jiang, L., Chen, Y. H., Huang, S. X., Yin, M., Zhang, J., Gao, A. L., Liu, C. X., Zhu, Z. X., Xiang, W. S. (2010) 'Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*', *Journal of Bacteriology*, 192(17), pp. 4526–4527.
- van Wezel, G. P., Krabben, P., Traag, B. A., Keijser, B. J. F., Kerste, R., Vijgenboom, E., Heijnen, J. J., Kraal, B. (2006) 'Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 72(8), pp. 5283–5288.
- Van Wezel, G. P., Van der Meulen, J., Kawamoto, S., Luiten, R. G. M., Koerten, H. K., Kraal, B. (2000) 'ssgA is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating septum formation', *Journal of Bacteriology*, 182(20), pp. 5653–5662.
- Willemse, J., Borst, J. W., de Waal, E., Bisseling, T., van Wezel, G. P. (2011) 'Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 25(1), pp. 89–99.
- Willey, J., Schwedock, J., Losick, R. (1993) 'Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*', *Genes and Development*, 7(5), pp. 895–903.
- Wolanski, M., Wali, R., Tilley, E., Jakimowicz, D., Zakrzewska-Czerwińska, J., Herron, P. (2011) 'Replisome trafficking in growing vegetative hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Journal of Bacteriology*, 193(5), pp. 1273–1275.
- Wold, M. S. (1997) 'Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism', *Annual Review of Biochemistry* 66, p.p. 61-92
- Xiao, Y. H., Yin, M. H., Hou, L., Luo, M., Pei, Y. (2007) 'Asymmetric overlap extension PCR method bypassing intermediate purification and the amplification of wild-type template in site-directed mutagenesis', *Biotechnology Letters*, 29(6), pp. 925–930.
- Yadav, T., Carrasco, B., Myers, A. R., George, N. P., Keck, J. L., Alonso, J. C. (2012) 'Genetic recombination in *Bacillus subtilis*: A division of labor between two single-strand DNA-binding proteins', *Nucleic Acids Research*, 40(12), pp. 5546–5559.
- Yagüe, P., Rodríguez-García, A., López-García, M. T., Martín, J. F., Rioseras, B., Sánchez, J., Manteca, A. (2013) 'Transcriptomic Analysis of *Streptomyces coelicolor* Differentiation in Solid Sporulating Cultures: First Compartmentalized and Second Multinucleated Mycelia Have Different and Distinctive Transcriptomes', *PLoS ONE*, 8(3).

Yagüe, P., Willemse, J., Koning, R. I., Rioseras, B., López-García, M. T., Gonzalez-Quiñonez, N., Lopez-Iglesias, C., Shliaha, P. V., Rogowska-Wrzesinska, A., Koster, A. J., Jensen, O. N., Van Wezel, G. P., Manteca, Á. (2016) 'Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces hyphae*', *Nature Communications*, 7, pp. 1–11.

Zhang, L., Willemse, J., Claessen, D., van Wezel, G. P. (2016) 'SepG coordinates sporulation-specific cell division and nucleoid organization in *Streptomyces coelicolor*', *Open Biology*, 6(4), p. 150164.

Zuber, P. (2009) 'Management of oxidative stress in *Bacillus*.' , *Annual review of microbiology*, 63, pp. 575–597.

Ostali izvori:

www.pdbj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A3BEP

<http://strepdb.streptomyces.org.uk/cgi-bin/dc3.pl?accession=AL645882&start=4291472&end=4302043&iorm=map&width=900>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genomes-maps/>

7 Sažetak

Proteini SSB (*engl. single-stranded DNA binding proteins*) vežu j1DNA s velikim afinitetom i štite je od razgradnje ili stvaranja neproduktivnih sekundarnih struktura. Ovi proteini ostvaruju interakcije s brojnim staničnim proteinima uključenim u metabolizam DNA i moduliraju njihove aktivnosti. Bakterija *Streptomyces coelicolor* ima dva paralogna proteina koja su se tijekom evolucije specijalizirala za obavljanje različitih bioloških funkcija. Za razliku od proteina SsbA, protein SsbB bakterije *S. coelicolor* nije esencijalan za stanično preživljenje, ali ima važnu ulogu u segregaciji kromosoma tijekom reproduktivne faze rasta. Ovaj mehanizam nije bio detaljno istražen. Osim toga, jedinstvene strukturne varijacije proteina SsbB pokazale su kako u strukturi proteina SsbB postoje dva disulfidna mosta koji pridonose stabilizaciji dimerne podjedinice homotetramera. Stoga je glavni cilj ovog rada bio pobliže istražiti biološku ulogu i strukturne karakteristike proteina SsbB te pojasniti stanični mehanizam u kojem sudjeluje ovaj protein, a koji je važan za razdvajanje bakterijskog kromosoma u presporogene odjeljke tijekom reproduktivne faze rasta bakterije *S. coelicolor*.

U ovom radu ciljanom mutagenезom zamijenjena je aminokiselina cistein (Cys7, koja sudjeluje u formiranju disulfidnih mostova), u alanin odnosno serin. Biofizikalnim metodama (ITC, DSC i CD) pokazana je važnost prisustva aminokiseline Cys7 za stabilizaciju kvartarne strukture proteina SsbB, dok je metodom EMSA utvrđena i važnost prisustva Cys7 na sposobnost vezanja kružne j1DNA. Nemogućnost komplementacije mutanta $\Delta ssbB$ s mutiranim genima koji nisu mogli ostvarivati disulfidne mostove (*ssbBcys7/ala* i *ssbBcys7/ser*) potvrđuje da su stabilne forme tetramera proteina SsbB važne za pravilnu funkciju proteina SsbB u sazrijevanju spora te završetku sporulacijskog ciklusa. Analizom dvostrukih i trostrukih mutanata, gena *ssbB* s genima važnim za pravilnu segregaciju kromosoma (*smc*, *parB*), pokazano je da dolazi do dodatnih defekata tijekom sazrijevanja spora, posebno u rasapu veličina spora, te u visokoj frekvenciji natprosječno dugačkih spora kod trostrukog mutanta $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB$. Pretraživanjem biblioteke gena bakterije *S. coelicolor* primjenjenom BACTH susatava ustanovljeno je kako protein SsbB ostvaruje interakcije s proteinima iz različitih staničnih procesa. Pokazano je kako ove interakcije nisu ovisne o prisustvu C-kraja proteina SsbB. Detaljno je analizirana interakcija proteina SsbB s proteinom DevA koji ima važnu ulogu u procesu sporulacije kroz regulaciju vlastite transkripcije. Imunološkim analizama, metodom EMSA i analizom CD spektara proteinskih kompleksa, potvrđena je interakcija proteina DevA i SsbB, koja se dodatkom promotorske regije gena *devA* dodatno stabilizira. Zbog toga se pretpostavlja da proteini SsbB i DevA sudjeluju u jednom novom do sada neopisanom regulatornom mehanizmu u kojem interakcija između ovih proteina pojačava represiju transkripcije gena *devA*. Također je pokazano kako delecija gena *ssbB* u mutantu $\Delta devA$ smanjuje defekt u razvojnom stadiju bakterije *S. coelicolor* i deregulira sintezu aktinorodina što ukazuje kako proteini SsbB/DevA kontroliraju sintezu aktinorodina.

8 Summary

Single-stranded DNA binding proteins (SSB) bind ssDNA with high affinity to protect it from degradation and prevent unproductive secondary structures formation. SSBs interact with a large number of cellular proteins involved in DNA metabolism and modulate their activities. *Streptomyces coelicolor* has two paralogous *ssb* genes that had specialized in exerting diverse biological functions. In contrast to SsbA, SsbB protein from *S. coelicolor* is not essential for cellular survival, but it plays an important role in chromosomal segregation during the reproductive stage of growth. Details of this mechanism have not been investigated so far. In addition, the unique structural variations of SsbB protein showed the presence of two disulphide bridges that contribute to the overall stability of its quaternary structure. Thus, the main goal of this thesis was to investigate in detail the biological role and structural characteristics of SsbB protein in order to clarify the cellular mechanism in which SsbB is involved in during chromosomal segregation in the reproductive phase of *S. coelicolor* growth.

In this thesis, site-directed mutagenesis was used to substitute the amino acid cysteine (Cys7, crucial for the formation of disulfide bridges), with alanine or serine. Biophysical methods (ITC, DSC and CD) showed the importance of Cys7 in the stabilization of the quaternary structure of the SsbB protein, while EMSA indicated the importance of a stable quaternary structure for its binding affinity to the long ssDNA. The inability to complement $\Delta ssbB$ mutant with genes that could not form disulfide bridges (*ssbBcys7/ala* and *ssbBcys7/ser*) confirmed that stable SsbB tetramers are important for the proper function of SsbB protein in the process of spore maturation. Analysis of double and triple *ssbB* mutants with genes known to be important for proper chromosomal segregation (*smc*, *parB*) showed additional defects during sporulation, particularly in terms of spore size distribution. High frequency of excessively long spores was present in the triple mutant $\Delta parB\Delta smc\Delta ssbB$. Screening of *S. coelicolor* genome library, using the BACTH system, revealed that SsbB protein interacts with various proteins performing different cellular functions. These interactions were obtained even after deletion of 37 last a.a. in the C-terminus. Interaction between SsbB and DevA protein is examined in detail. DevA is also known to play an important role in the sporulation process by regulating its own transcription. Immunoassay, EMSA and CD spectra analysis of protein complexes confirmed the interaction of DevA and SsbB proteins. This interaction was significantly stabilized by the addition of *devA* promoter region. For this reason it is assumed that SsbB and DevA proteins participate in novel and so far undescribed regulatory mechanism. By binding to DevA, SsbB contributes to the repression of *devA* gene transcription. It has also been shown that the deletion of *ssbB* gene in the $\Delta devA$ background reduces the defect in the developmental stage of *S. coelicolor* growth and deregulates the actinorodin production, suggesting that these proteins also participate in controlling actinorhodin synthesis.

9 *Kratice*

a.a.	aminokiselina (engl. amino acids)
Ala	aminokiselina alanin (engl. Alanine)
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin trifosfat (engl. Adenosine triphosphate)
CRM	medij za regeneraciju (engl. Complete Regeneration Medium)
Ct	C - kraj proteina (engl. C-terminus)
CyaA	adenilat ciklaza A iz bakterije <i>Bordetella pertussis</i> (engl. Adenylate Cyclase A)
Cys	aminokiselina cistein (engl. Cysteine)
DMSO	dimetil sulfoksid
dIDNA	dvolančana DNA
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
Ser	aminokiselina serin (engl. Serine)
IPTG	Izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
jIDNA	jednolančana DNA
kDa	kilodaltona
LB	Luria-Bertani hranjivi medij
Mpb	Mega parova baza
MM	minimalni hranjivi medij
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	nukleotid
OB	oligosaharidno / oligonukleotidni način smatanja proteina (engl. oligosaccharide / oligonucleotide - binding fold)
OD	optička gustoća (engl. optical density)
ORF	otvoreni okvir čitanja (engl. open reading frame)
Ori	početak replikacije (engl. origin of replication)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)
RBS	ribosomsko mjesto vezanja (engl. Ribosome binding site)
SB	pufer za uzorkovanje (engl. Sample Buffer)
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. Sodium dodecyl sulfate)
ssDNA	jednolančana DNA (engl. single stranded DNA)
TAE	tris acetat EDTA pufer (engl. Tris Acetate EDTA buffer)
TBST	tris acetat EDTA pufer uz dodatak tween-a (engl. Tris-buffered saline with Tween)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamin

10 Životopis

Rođena sam 1. lipnja 1981. godine u Puli. Opću gimnaziju „Zvane Črnja” završila sam u Rovinju 1999. godine, nakon čega sam upisala studij biologije, smjer profesor biologije, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija zainteresirala sam se za područje molekularne biologije pa sam započela studentsko istraživanje pod mentorstvom doc.dr.sc. Srećka Jelenića i 2005 godine primila Rektorovu nagradu za rad „Intramolekularna homologna rekombinacija u bakteriji *Agrobacterium tumefaciens*”. Nakon završetka studija 2008. godine, radila sam kraće vrijeme u Agenciji za zaštitu okoliša, na poslovima vezanim uz prikupljanje i izradu baze podataka dokumenata vezanih uz zaštitu okoliša u Republici Hrvatskoj; nakon toga sam volontirala u Laboratoriju za molekularnu biologiju na Prirodoslovno–matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Mirjane Pavlice u akademskoj godini 2008/2009, a zatim sam radila kao profesor biologije u osnovnim školama „Mladost” i „Dragutin Domjanić” u Zagrebu. U siječnju 2011. godine zaposlila sam se na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu genetiku kao znanstveni novak i asistent na projektu „Temeljna molekularno-biološka istraživanja streptomiceta” pod vodstvom dr.sc. Dušice Vujaklija, a iduće godine upisala sam Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti (Modul: Biologija).

Tijekom poslijediplomskog studija pohađala sam radionice iz bioinformatike (EMBL-EBI Bioinformatics Roadshow, 2011., PMF, Zagreb, Hrvatska), fluorescencijske mikroskopije (InnoMol Bioimaging Workshop, 2014., Zagreb, Hrvatska), mikro-termoforeze (Symposium & Workshop on Microscale Thermophoresis; Zavod za biokemiju PMF-a u suradnji s tvrtkom Nanotemper Technologies GmbH, 2015), te ljetnu školu primjenjene molekularne mikrobiologije „John Innes/Ruđer Bošković Summer School in Applied Molecular Microbiology” 2012. u Dubrovniku.

Sudjelujelovala sam na nekoliko znanstveno - istraživačkih projekata kao istraživač:

1. 2018. - “Identifying interactome of paralogous SSB proteins in the multicellular prokaryote, *Streptomyces coelicolor*” PI: D. Vujaklija HRZZ-a [IP2018-01-1754]
2. 2015. - 2017. UKF projekt (27/15) “Comparative phosphoproteome analysis of *S. rimosus* oxytetracycline producers strains”, voditeljica D. Vujaklija
3. 2014. - 2018. HRZZ projekt „DNA recombination, repair i maintenance of genome integrity: new pathways“, voditelj D. Zahradka
4. 2011. - 2013. MZOŠ. “Temeljna molekularno-biološka istraživanja streptomiceta“, Šifra projekta: 098-0982913-2877, voditeljica projekta D. Vujaklija

Osim toga sudjelovala sam i u projektima popularizacije znanosti kroz aktivnost u organizacijskom odboru znanstvenog skupa „Znanstveni susreti 3. vrste” 2011, Institut Ruđer Bošković,

Zagreb, Hrvatska, te kroz članstvo u „Mladim istraživačima”, sekciji Hrvatskog prirodoslovnog društva gdje sam bila suvoditeljica od 2011. - 2013. godine. Osim toga članica sam Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog genetičkog društva. Temeljem FEMS-ove stipendije za mlade znanstvenike 2013. godine boravila sam tri mjeseca Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju na Biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Wrocławu, Poljska, u laboratoriju prof. dr. sc. Dagmare Jakimowicz.

Popis publikacija (izvor:CROSB):

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Paradžik, Tina; Ivić, Nives; Filić, Želimira; Manjasetty, Babbu A.; Herron, Paul; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. Structure–function relationships of two paralogous single-stranded DNA-binding proteins from *Streptomyces coelicolor*: implication of SsbB in chromosome segregation during sporulation. // Nucleic acids research. 41 (2013), 6; 3659-3672 (članak, znanstveni)

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. Paradžik, Tina; Filić, Želimira; Vujaklija, Dušica. Variations in amino acid composition in bacterial single stranded DNA–binding proteins correlate with GC content. // Periodicum biologorum. 118 (2016) , 4; 385-397 (članak, znanstveni).

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Filić, Želimira; Paradžik, Tina; Jakimowicz, Dagmara; Vujaklija, Dušica. Complex regulatory network controls chromosome segregation in streptomycetes. // FEMS 2017, 7th Congress of European Microbiologists, 9. – 13. srpnja 2017., Valencija, Španjolska (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Paradžik Tina; Hlevnjak Ana; Kazazić Saša; Filić Želimira; Zahradka Davor; Vujaklija Dušica. Tyrosine phosphorylation of the proteins essential for the bacterial growth: the case of SSB protein // Power of microbes in industry i environment 2016, Krk, Hrvatska, 28.9.-1.10.2016. (poster, sažetak, znanstveni).

3. Paradžik, Tina; Filić, Želimira; Paradžik, Mladen; Bielen, Ana; Vujaklija, Dušica. What will they do if there are two? // 6th Croatian Congress of Microbiology with international participation

/ Roberto Antolović (ur.) Zagreb : Croatian Microbiological Society, 2016. 23-23 (D. Vujaklija, pozvano predavanje, domaća recenzija, sažetak).

4. Paradžik, Tina; Filić, Želimira; Ivić, Nives; Bielen, Ana; Manjasetty, Babu; Herron, Paul; Jakimowicz, Dagmara; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. Single-stranded DNA binding protein has a key role in chromosome segregation during sporulation of *Streptomyces coelicolor* // PROCEEDINGS of 3rd CROATIAN MICROSCOPY CONGRESS with International Participation / Ambriović Ristov, Andreja; Gajović, Andreja; Weber, Igor; Vidoš, Ana (ur.) Zadar: Ruđer Bošković Institute i Croatian Microscopy Society, 2015. 94-94 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Paradžik, Tina; Filić, Želimira; Ivić, Nives; Bielen, Ana; Manjasetty, Babu; Herron, Paul; Jakimowicz, Dagmara; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. SsbB plays an important role in chromosome segregation during reproductive growth of *Streptomyces coelicolor* // ISBA '17 Book of Abstract. Izmir, 2014. 102-102 (D. Vujaklija, predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

6. Filić, Želimira; Paradžik, Tina; Ivić, Nives; Bielen, Ana; Manjasetty, Babu A; Herron, Paul; Jakimowicz, Dagmara; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. Functional characterisation of paralogous SSBs in *Streptomyces coelicolor* // Book of Abstracts of HDBMB2014 "Congress of the Croatian Society of Biochemistry i Molecular Biology" / Katalinić, Maja; Kovarik, Zrinka (ur.). 2014. 90-90 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. Paradžik, Tina; Ivić, Nives; Filić, Želimira; Manjasetty, Babu A; Heron, Paul; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. Implication of Single Stranded DNA Binding Protein in Chromosome Segregation during Reproductive Growth of *Streptomyces coelicolor* // Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (Volume 60, Supplement) / Nagy, K ; Marialigeti, K. (ur.). Budapest: Akademiai Kiado, 2013. str. 212-212 (D. Vujaklija, pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

8. Paradžik, Tina; Ivić, Nives; Filić, Želimira; Heron, Paul; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. How SSB protein ensures sporulation in dominant soil bacteria // Power of Microbes in Industry i Environment 2013 / Teparić, Renata; Frece, Jadranka; Mrša Vladimir (ur.). Zagreb : Croatian Microbiological Society, 2013. 20-20 (D. Vujaklija, pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

9. Vujčić, Valerija; Radić Brkanac, Sandra; Filić, Želimira; Pevalek-Kozlina, Branka. Utjecaj osmotskog stresa na biljnu vrstu *Fibigia triquetra* (DC.) Boiss. // Knjiga sažetaka - 4. Hrvatski Botanički

Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem, Split 2013 / Alegro, Antun; Boršić, Igor (ur.). Zagreb : MTG - Topograf Velika Gorica, 2013. 95-95 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

10. Paradžik, Tina; Ivić, Nives; Filić, Želimira; Manjasetty, B.A; Heron, Paul; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. Distinct properties of two paralogous SSB proteins from *Streptomyces coelicolor* // 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation / Černi, Silvija; Šeruga Musić Martina; Škorić Dijana (ur.). Zagreb: Croatian Microbiological Society, 2012. 23-23 (D. Vujaklija, pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

11. Paradžik, Tina; Ivić, Nives; Filić, Želimira; Heron, Paul; Luić, Marija; Vujaklija, Dušica. Structure-function relationship of two paralogous SSB proteins from *Streptomyces coelicolor* // Croatian Genetic Society ; 3rd Congress of Croatian Geneticists with international participation / Franekić, Jasna; Garaj-Vrhovac, Verica (ur.). Zagreb: Croatian Genetic Society, 2012. str. 26-26 (T. Paradžik, predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

12. Paradžik, Tina, Ivić, Nives, Filić, Želimira, Herron, Paul,. Manjasetty, Babu A, Luić, Marija, Vujaklija, Dušica. A new look at SSB proteins // Actinobacteria within soils, Capacities for mutualism symbiosis pathogenesis / Schrempf, Hilde; Ortiz de Orue Lucana, Dario (ur.). Osnabrueck, Njemačka : Sveučilište Osnabrueck, Osnabrueck, Njemačka, 2012. 49-49 (D. Vujaklija, pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak).

13. Filić, Želimira; Paradžik, Tina; Ivić, Nives; Vujaklija, Dušica. Study of paralogous SSB proteins from *Streptomyces coelicolor* // John Innes/Rudjer/Bošković Summer School in Applied Molecular Microbiology: Microbial Metabolites in Nature i Medicine, IUC Dubrovnik, Hrvatska, August 25 - September 2, 2012. (poster, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad, znanstveni).