

Replikasjonsmønstre og organisering av replikasjonsgafler i *Vibrio cholerae*

Masteroppgave i fysikk

Caroline Stokke



Biofysikk og medisinsk fysikk,

Fysisk Institutt,
Universitetet i Oslo

Avdeling for Cellebiologi,

Institutt for Kreftforskning,
Det Norske Radiumhospital

Januar 2009

Forord

Denne oppgaven ble utført på Avdeling for Cellebiologi, Institutt for kreftforskning, Det Norske Radiumhospital fra januar 2008 til januar 2009. Jeg vil først takke gruppeleder og veilederen min, Kirsten Skarstad, for en spennende problemstilling. Men hovedsaklig vil jeg takke henne for meget god veiledning og for alltid å finne tid til å diskutere med meg underveis. Av gruppemedlemmene har spesielt Ingvild Odsbu og ingeniør Anne Wahl hjulpet meg med den praktiske delen av forsøkene. Takk til Torsten Waldminghaus for hjelp med redigering av to-kromosom-programmet. Også takk til Kirsti Solberg Landsverk ved Avdeling for Strålingsbiologi for flowcytometri sorteringen.

Jeg vil dessuten få takke Ingerid og Marius for å ha lest oppgaven min og påpekt alt fra kommafeil til svake punkter. En ekstra takk går også til Marius for å ha holdt ut snakk om gafler til alle døgnets tider i et år nå. Til slutt vil jeg også få takke resten av familien min, spesielt mamma. Hun har ikke bidratt med noe som helst til denne oppgaven, men har støttet meg hele livet.

Oslo, januar 2009

Caroline Stokke

Sammendrag

Problemstillingen for denne oppgaven var å undersøke replikasjonsmønstre og organiseringen av replikasjonsgafler i *Vibrio cholerae*. Det ble også utført forsøk på hurtigvoksende kulturer av *Escherichia coli*.

V.cholerae er en bakterie med et delt genom, der kromosom I er nesten tre ganger så stort som kromosom II. Under gunstige vekstforhold kan cellenes replikasjonsrunder overlappe, altså starter C-fase i foregående generasjoner. Cellene vil da kunne inneholde kromosomer med flere enn to replikasjonsgafler. En gaffel betegner et område der ny syntese av datterkromosomet finner sted. Denne egenskapen bidrar til å senke populasjonenes doblingstid.

Her ble *V.cholerae* dyrket i tre forskjellige medier, de to første var ABB₁ minimal medium supplementert med 0,2% glyserol eller 0,2% fruktose, og det tredje var LB. Disse var valgt for å gi stadig økende doblingstider, og det siste ga så hurtig vekst at replikasjonsrundene overlappet. For å undersøke replikasjonsmønstrene ble cellene fiksert og tilsatt Hoechst 33258 for farging av DNA. Histogram over fordelingene ble så målt med flowcytometri. Deretter ble det simulert teoretiske DNA fordelinger for ulike modeller av replikasjonsmønstre, og samsvaret med de eksperimentelle histogrammene ble vurdert.

For cellene uten overlappende replikasjonsrunder ble det først forsøkt med to modeller for cellekinetikken i syklus som er tidligere foreslått i litteraturen. Disse er initieringssynkroni, der det store og lille kromosomet starter replikasjon samtidig, og termineringssynkroni, der kromosomene avslutter replikasjonen av DNA på likt. Den første modellen viste dårlig overensstemmelse med dataene og ble forkastet.

Termineringssynkroni-modellen virket ganske korrekt, men et alternativ ble også fremlagt og kalt hoppkant-modellen. Navnet kommer av at i det eksperimentelle histogrammet kan det tydelig sees et fall i antall celler i C-fase. Dette kan være forårsaket av en økning i den totale replikasjonsraten, og teorien er således at kromosom II initierer ved dette punktet. Eventuelt kan også raten av DNA replikasjon være forskjellig for de to kromosomene, med en lavere rate for kromosom II vil hoppkant-modellen være forenelig med termineringssynkroni.

Når kulturene ble dyrket i LB overlappet replikasjonsrundene. Her blir det vist at den beste tilpasningen gir en initiering av origin på kromosom I allerede to generasjoner før celledeling, i det som populært kalles bestemorgenerasjonen. Kromosom II ble funnet å starte replikasjon av DNA i foregående generasjon, og denne initieringen kan tenkes å være knyttet til replikasjonen av kromosom I.

Kulturene ble i tillegg immunmerket for proteinet SeqA og fluorescensmikroskopert for å kunne telle opp fordelinger av disse fokusene. SeqA fokus representerer lokalisasjoner i cellen der det finnes en eller flere replikasjongafler. Videre ble også saktevoksende *V.cholerae* fra fruktosemediet sortert etter DNA innhold og deretter immunmerket. Denne kombinasjonen av metoder er ny, og bekreftet termineringssynkroni/hoppkant-modellen.

For kulturene uten overlappende generasjoner så det ut til å være en stort sett parvis samlokalisering av replikasjongaflene. Andelen celler med to gafler passet bra med andelen med ett SeqA fokus, og prosentandelen med fire gafler var omtrent lik den med to eller tre fokus. At noen celler inneholdt tre fokus kan tyde på at samlokaliseringen av replikasjongaflene ikke er strikt, men heller en dynamisk prosess.

Når doblingstiden minket og replikasjonsrundene overlappet, ble det funnet et gjennomsnittlig antall gafler per fokus på nesten 5 i cellene. Ut fra cellenes størrelse og fordelingene av gafler og fokus, kan det se ut som det også her eksisterer en tilnærmet parvis samlokalisering når cellene kun inneholder fire replikasjongafler. Etter videre initiering øker graden av gafler per SeqA struktur kraftig, og det foreslås at de nye gaflene også kan rekrutteres til allerede eksisterende komplekser. Dette tilsvarer observasjonene som ble gjort for hurtigvoksende *E.coli* celler.

Innhold

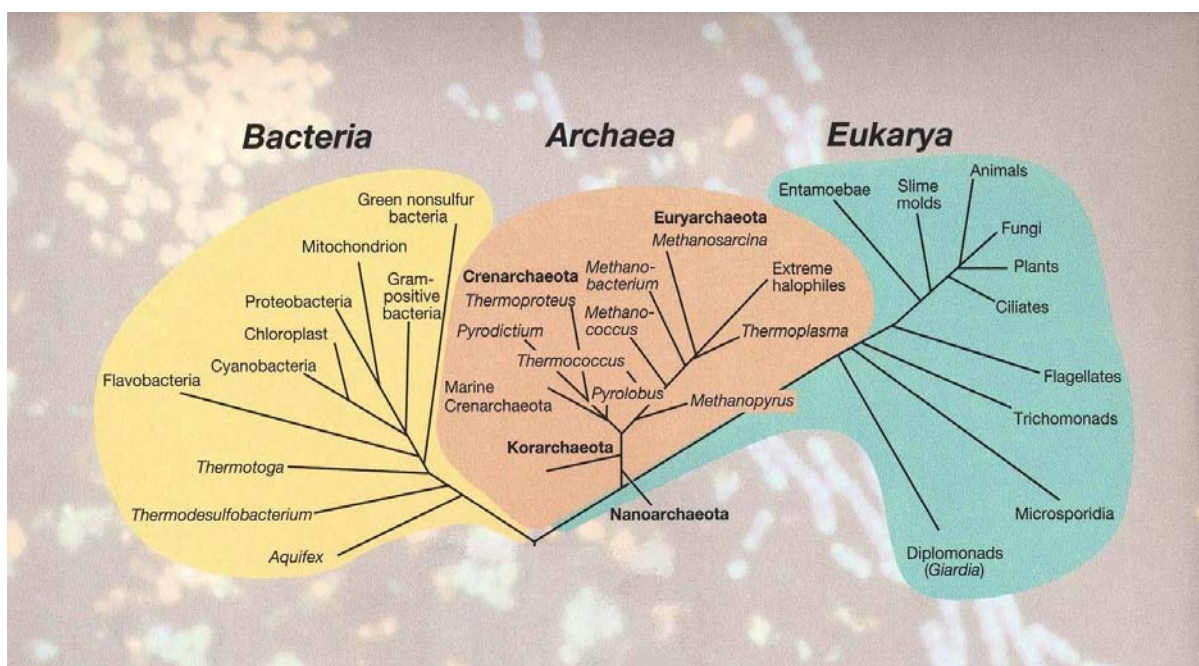
FORORD	3
SAMMENDRAG	5
INNHold	7
1. INNLEDNING	11
2. BAKGRUNNSSTOFF	15
2.1 PROKARYOTER	15
2.1.1 Cellestruktur	15
2.1.2 Celledeling	16
2.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	17
2.2.1 Cellesyklus.....	17
2.2.2 DNA replikasjon	19
2.3 <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	21
2.3.1 Cellesyklus.....	21
2.3.2 DNA replikasjon	22
2.4 SEQA PROTEINET	25
2.5 MIKROSKOPET	25
2.6 FLOWCYTOMETERET	28
3. MATERIALE OG METODER	31
3.1 BAKTERIESTAMMENE	31
3.2 DYRKING AV BAKTERIECELLER	31
3.3 PRØVETAKING	32
3.4 FLOWCYTOMETRI.....	32
3.4.1 Farging.....	33
3.4.2 Kjøring	33
3.4.3 Analyse	34
3.4.4 Sortering	35
3.5 MIKROSKOPI.....	35
3.5.1 Immunmerking for SeqA.....	36

3.5.2	<i>Immunmerking for SeqA for sorterte prøver</i>	37
3.5.3	<i>Visualisering</i>	37
3.5.4	<i>Analyse</i>	37
3.6	BREGNING AV REPLIKASJONSMØNSTER OG GAFFELFORDELING	39
3.6.1	<i>Escherichia coli</i>	39
3.6.2	<i>Vibrio cholerae</i>	41
	Celler uten overlappende replikasjonssykluser	41
	Celler med overlappende replikasjonssykluser	45
3.7	SDS-PAGE OG WESTERN BLOTTING	45
3.8	FORDELING AV GATC SETER	46
4.	RESULTATER OG ANALYSE	49
4.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	49
	Replikasjonsgaffelfordeling	49
	SeqA fokusfordeling	52
	Binding av antistoff	55
	Fordeling av GATC seter	56
4.2	<i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>	58
4.2.1	<i>Saktevoksende celler</i>	58
	Replikasjonsgaffelfordeling	58
	SeqA fokusfordeling	67
	SeqA fokusfordeling etter fase	69
4.2.2	<i>Svært saktevoksende celler</i>	74
	Replikasjonsgaffelfordeling	74
	SeqA fokusfordeling	81
4.2.3	<i>Hurtigvoksende celler</i>	83
	Replikasjonsgaffelfordeling	83
	SeqA fokusfordeling	88
4.2.4	<i>Binding av antistoff</i>	90
4.2.5	<i>GATC seter</i>	91
5.	DISKUSJON	95
5.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	95

5.1.1	<i>Samlokalisering av SeqA og replikasjongs-gafler</i>	95
5.1.2	<i>SeqA fokus fordeling</i>	96
5.1.3	<i>Cellesyklus og replikasjongs-gaffelfordeling</i>	97
5.1.4	<i>Samlokalisering av replikasjongs-gafler</i>	98
5.2	<i>VIBRIO CHOLERAE</i>	100
5.2.1	<i>Samlokalisering av SeqA og replikasjongs-gafler</i>	100
5.2.2	<i>SeqA fokus fordeling</i>	103
5.2.3	<i>Cellesyklus og replikasjongs-gaffelfordeling</i>	105
	Celler uten overlappende replikasjonsrunder	105
	Celler med overlappende replikasjonsrunder	108
5.2.4	<i>Samlokalisering av replikasjongs-gafler</i>	111
	Celler uten overlappende replikasjonsrunder	111
	Celler med overlappende replikasjonsrunder	113
5.2.5	<i>Avsluttende merknader</i>	113
	KILDELISTE	115
	APPENDIKS A	121
	APPENDIKS B	133
	APPENDIKS C	137
	APPENDIKS D	143

1. Innledning

For over 3,8 milliarder år siden utviklet den første cellen seg her på jorda. Man antar at alle artene som finnes i dag stammer fra denne. Basert på sammenlikning av disse artene kan det settes opp fylogenetiske trær som illustrerer slektskapet mellom dem. Det var tidligere vanlig å klassifisere arter på grunnlag av utseendemessige karakteristikk, men med utviklingen av bioinformatiske verktøy har analyse av cellenes arvemateriale, DNA, overtatt. I figur 1-1 vises et fylogenetisk tre over de tre domenene vi deler liv inn i, nemlig Bacteria, Archaea og Eukarya (Woese *et al*, 1990).



Figur 1-1. Fylogenetisk tre laget etter analyse av ribosomalt RNA i cellene. Figur tilpasset fra "Brock Biology of Microorganisms" (Madigan og Martinko, 2006).

Innenfor biologien er det en utstrakt bruk av modellorganismer i forskningen. En modellorganisme kan tjene som eksempel for mer komplekse arter, men er samtidig enklere å studere. Ideelle modellorganismer reproducerer hurtig og har mye avkom, de har lave krav, og kan ofte manipuleres genetisk. Noen av de mest benyttede artene er bakterien *Escherichia coli*, den encellede haploide gjærsoppen *Saccharomyces cerevisiae*, den flercellede nematoden *Caenorhabditis elegans*, bananfluen *Drosophila melanogaster* som er mye brukt i genetikk, og det vanlige pattedyret *Mus musculus*.

For undersøkelser av immunsystemet, utvikling i embryoer og større eksperimenter må det forskes på arter relativt nært beslektet med mennesket. Men nesten alt vi vet om de fundamentale prosessene som finner sted i levende celler stammer fra forsøk med enklere modellorganismer. Gjennom utviklingen av livet på jorda er disse mekanismene konserververt, og slike studier blir da best utført på arter som er mindre komplekse. Den tradisjonelt mest brukte modellorganismen her er *Escherichia coli* bakterien (i figur 1-1 vises den evolusjonære avstanden mellom denne proteobakterien og mennesket som kumulativ grenlengde). Ved forskning på ulike sykdommer er det også interessant å kunne styre kontrollen av gener i enkle organismer. Spesielt gjelder dette kreft, som forårsakes av genetiske endringer i cellene.

Escherichia coli er en godt karakterisert bakterie som inneholder ett sirkulært kromosom. Den er lett vint å oppbevare og dyrke, med en doblingstid på ned mot tjue minutter. Men de største fordelene ligger i mulighetene for effektiv biokjemisk og genetisk manipulering. Utover funksjonen som modellorganisme gir dette også anledning til å bruke *Escherichia coli*, og andre bakterier, til å lage større mengder protein. Et av de tidligste eksemplene på dette var produksjon av insulin. I rikt medium, som vil gi hurtig vekst, kan DNA replikasjon hos *Escherichia coli* starte opp mot to generasjoner før den tilhørende celledelingen (Cooper og Helmstetter, 1968). Replikasjonsrundene vil altså overlape (for en mer utfyllende forklaring, se kapittel 2.2.1). Det er vist at replikasjonsgafflene¹ til en viss grad vil være samlokalisert i disse cellene (Hiraga *et al*, 1998). Omfanget og organiseringen av denne samlokaliseringen er fremdeles debattert.

Vibrio cholerae er en annen bakterie som inneholder to separate sirkulære kromosomer, og er i den forstand et skritt videre fra *Escherichia coli*. Denne bakterien er lite studert utover sin rolle som patogen og opphav til sykdommen kolera. I denne oppgaven ønskes det blant annet å undersøke hvordan *Vibrio cholerae* koordinerer kontrollen mellom de to kromosomene. For å gjøre dette skal kulturer av bakterien dyrkes i ulike medier for å gi et bredt spenn av doblingstider. Etter fiksering av prøver skal DNA farges og et flowcytometer benyttes til å måle fordelingen i populasjonen. Ut fra disse histogrammene skal det lages simuleringer for å bestemme mønstrene i cellykluskinetikken.

¹ Når DNA replikeres vil den opprinnelige dobbeltråden splittes og ny komplementær DNA syntetiseres langs begge disse enkelttrådene. En replikasjonsgaffel er området der dette fortløpende finner sted. Navnet kommer av at DNA her tar form av en gaffel med to tagger.

Det skal også undersøkes om replikasjonsgaflene hos *Vibrio cholerae* samlokaliserer, slik tilfellet er for *Escherichia coli*. De fikserte prøvene skal da også immunmerkes for proteinet SeqA. Dette proteinet binder med nyreplisert DNA og kan benyttes som en markør for områder i cellene der en eller flere gafler er posisjonert. De resulterende fokusene skal studeres med et fluorescensmikroskop, og fordelingen i populasjonene telles. Ved å sammenlikne replikasjonsgaffelfordelingen med fordelingen av SeqA fokus, kan en eventuell samlokalisering finnes. Metodene skal kontrolleres ved først å utføre identiske forsøk på *Escherichia coli*.

2. Bakgrunnsstoff

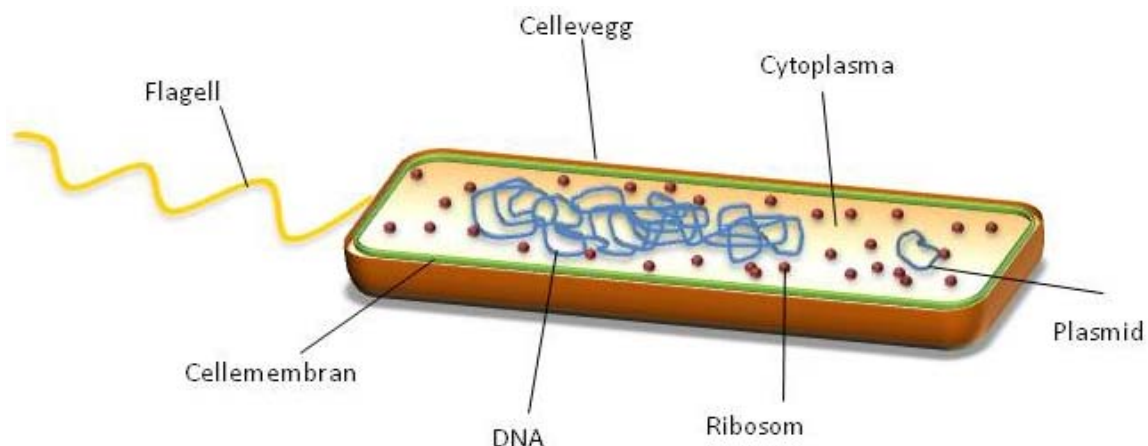
2.1 Prokaryoter

Teorien i dette kapittelet er hentet fra lærebøkene "Brock Biology of Microorganisms" (Madigan og Martinko, 2006) og "Molecular Biology of the Cell" (Alberts *et al*, 2002).

I figur 1-1 kan man se at domenene Archaea og Eucarya er nærmere beslektet med hverandre enn de er med Bacteria. Det er likevel vanlig å benytte en fellesbetegnelse på artene i de to domenene Bacteria og Archaea, nemlig prokaryoter. Dette betyr direkte oversatt "før-kjerne". Disse cellene kjennetegnes ved at de, i motsetning til eukaryoter, mangler en membranomgitt kjerne og organeller. Selv om prokaryoter kan vokse i kolonier, danner de ikke multicellulære organismer.

2.1.1 Cellestruktur

Størrelsen på prokaryoter kan variere svært, fra 0,2-750 μm , men de fleste har en diameter på noen mikrometer. Dette er langt mindre enn de fleste eukaryoter. Cellene kan være av mange ulike former, hvor de vanligste er staver, kuler eller spiraler. I figur 2-1 er en typisk stavformet bakterie illustrert. Man kan se at den har visse fellestrekk med en eukaryot, blant annet ribosomer og plasmamembranen som skiller cytoplasmaet fra omgivelsene. Mammalske celler har et indre cytoskjelett for støtte og struktur. Bakterieceller vil i stedet, i likhet med planteceller, ha en ytre cellevegg. Hos noen arter eller på noen stadier har cellene en til flere flageller som for eksempel gir mobilitet eller virker som festeordninger.

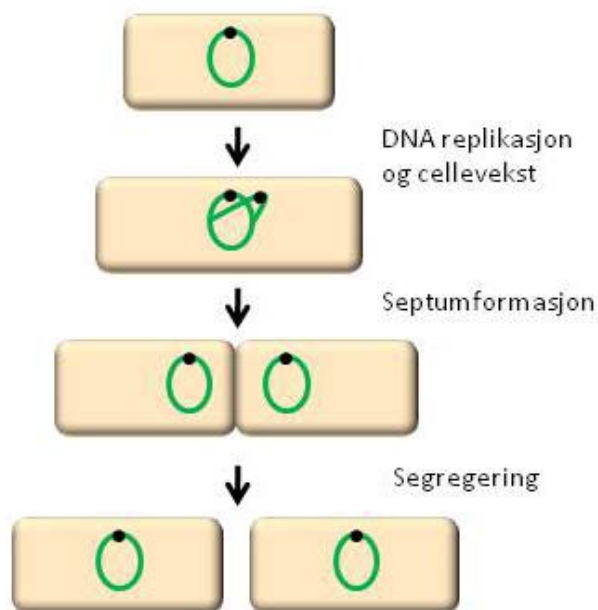


Figur 2-1. Cellestrukturen hos en stavformet prokaryot.

Prokaryoter er haploide, og DNA vil stort sett foreligge i form av ett sirkulært kromosom. Alle essensielle gener, som altså er livsnødvendige for cellen, er lokalisert på kromosomer. Cellene kan også inneholde såkalte plasmider, dette er sirkulære biter med DNA som koder for spesielle egenskaper, som for eksempel antibiotikaresistens.

2.1.2 Celledeling

Prokaryoter reproducerer seg aseksuelt ved binær fisjon (se figur 2-2) eller knoppskyting. Det siste er mindre vanlig og vil ikke bli omtalt i denne oppgaven.



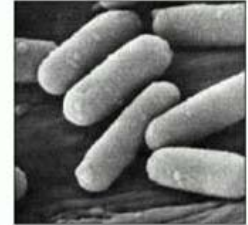
Figur 2-2. Celledeling ved binær fisjon hos prokaryoter. Denne syklusen strekker seg over en generasjon. De grønne ringene representerer kromosomet, og de sorte prikkene origin, setet på DNA hvor replikasjon starter.

Før celledeling kan foregå må DNA replikeres. Dette er en prosess som kan deles inn i de tre trinnene initiering, elongering og terminering. Replikasjonen starter i et bestemt område på kromosomet, origin, og ender tvers overfor i regionen kalt terminus. Samtidig vil cellen vokse til den er tilnærmet dobbelt så stor. Når den er klar til å dele seg dannes det en innsnevring i midten, septum, og de to dattercellene skiller lag.

2.2 *Escherichia coli*

Teorien er hentet fra “*Escherichia coli* and *Salmonella*” (Neidhardt F.C. *et al*, 1996) hvor ikke annet er oppgitt.

Escherichia coli, ofte forkortet *E.coli*, er en stavformet bakterie i familien *Enterobacteriaceae* (bilde i figur 2-3). Den er fakultativt anaerob, gram-negativ og danner ikke sporer. De fleste stammer av *E.coli* er harmløse, og bakterien finnes naturlig i det menneskelige fordøyelsessystemet. I tillegg er det noen patogene stammer som kan forårsake enterisk sykdom, den mest kjente stammen er O157:H7. Ved utskillelse av exotoksiner forårsaker disse bakteriene at de humane cellene mister store mengder salt og vann. *E.coli* bakterier kan også føre til urinveisinfeksjon og hjernehinnebetennelse (Kaper *et al*, 2004).

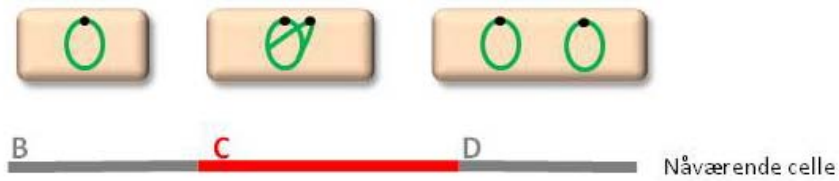


Figur 2-3. *E.coli* celler av stammen K-12. Hentet fra “*Molecular biology of the Cell*”.

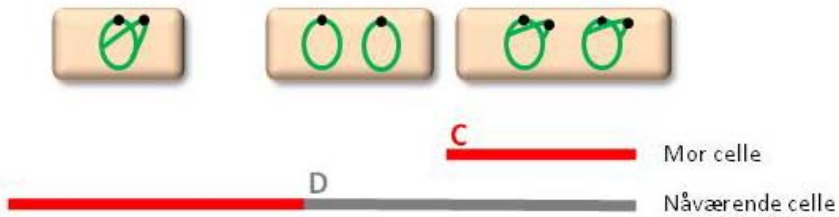
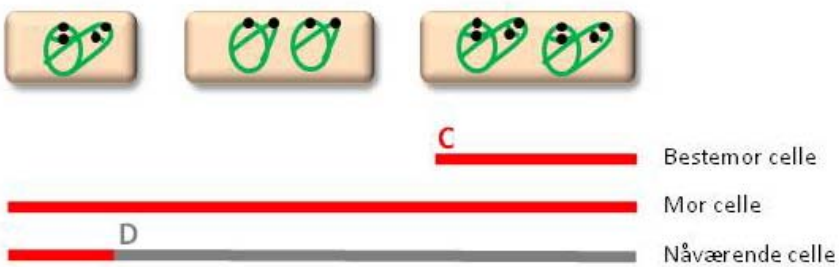
2.2.1 Cellesyklus

E.colis celsesyklus består av periodene B, som går fra cellen blir født til DNA replikasjon starter, C, som er tidsrommet replikasjon pågår, og D, som er fra terminering av replikasjon og til cellen deler seg. Hos saktevoksende celler vil disse periodene tilsvare de eukaryote fasene G_1 , S og G_2/M (Boye *et al*, 1996).

a) Doblingstid over C+D



b) Doblingstid under C+D

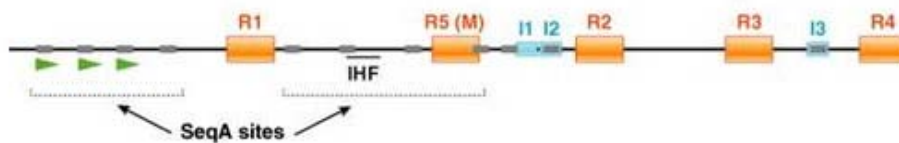
c) Doblingstid under $\frac{1}{2}(C+D)$ 

Figur 2-4. *E.coli* celler er ved rask vekst i stand til å starte syklus i foregående generasjoner. I a) er det for saktevoksende celler vist inndeling av celledyklus gjennom en generasjon, representert av en linje. Like over er kromosomfordeling i cellen i de ulike fasene illustrert. Tilsvarende er illustrert i b) for en hurtigvoksende celle. Initiering av DNA replikasjon skjer i forrige generasjon, altså i morcellen, og nyfødte celler har to origin og to gaffer. I c) er det gitt et eksempel på en syklus startet i bestemorcellen, nyfødte celler vil nå ha fire origin og seks replikasjons-gaffer.

Hos cellekulturer med doblingstid τ på under en time er periodene C og D gjerne konstante innenfor hver stamme (ofte henholdsvis rundt 40 og 20 minutter), men disse periodene øker under saktere vekst (Skarstad *et al*, 1985). Likevel er populasjoner av *E.coli* bakterien under gunstige forhold i stand til å ha en doblingstid på ned mot tjue minutter ved å starte syklus i foregående generasjoner (Cooper og Helmstetter, 1968). I figur 2-4 er dette illustrert, ved hurtigere vekst vil DNA replikasjon skje ved mange replikasjons-gaffer på samme kromosom.

2.2.2 DNA replikasjon

E.colis genom består av et sirkulært kromosom på litt over $4,6 \times 10^6$ basepar (Blattner *et al.*, 1997). Fra initieringssetet, *oriC*, blir DNA semikonservativt replikert i begge retninger til det motsatte punktet på kromosomet nåes. Dette området kalles *terC*. En replikasjonsgaffel er et område på kromosomet der replikasjon av DNA finner sted til enhver tid, man får altså to gaffler som starter fra origin etter initiering.

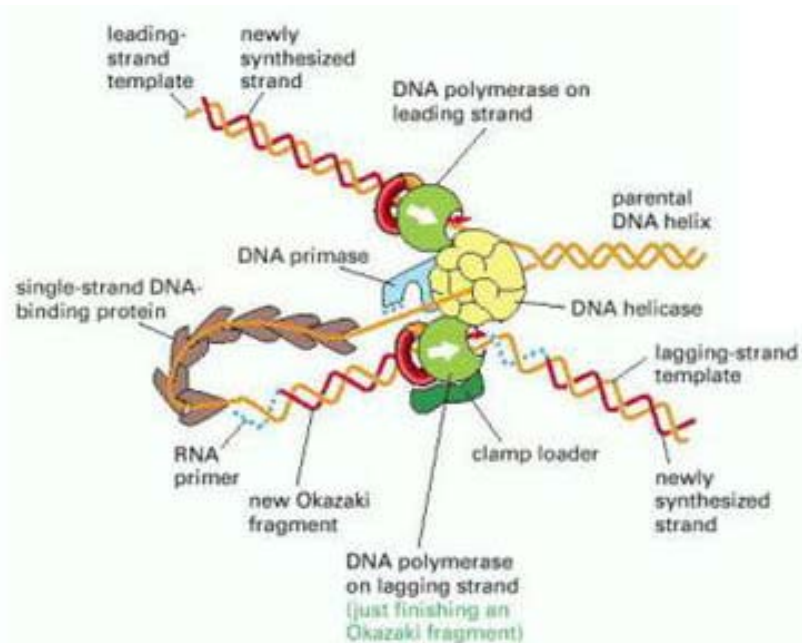


Figur 2-5. Området *oriC* hos *E.coli* består av 245 basepar og inneholder flere bindingssteder for ulike initieringsproteiner. De grå boksene er GATC sekvenser som gjenkjennes av SeqA og Dam metylase. DnaA bindes til ulike typer DnaA bokser, markert i oransje, grønt og blått på figuren. (Kaguni, 2006)

Initiering starter ved at proteinet DnaA bindes til spesielle sekvenser kalt DnaA bokser i *oriC* (se figur 2-5). Når ATP bindes til DnaA vil dette komplekset kunne åpne dobbelheliksen i det venstre området av *oriC*, som er rikt på A-T basepar. Proteinene HU og IHF stimulerer denne hendelsen, og er essensielle ved lave temperaturer. DnaA dirigerer helikasen DnaB til å bli lastet på i to hexamerer ved hjelp av sin inhibitor, DnaC. DnaC forlater komplekset umiddelbart og helikasen aktiveres. Primasen DnaG kommer til og danner sammen med DnaB ringene to primosomer (ett til hver retning langs DNA tråden). Syntese av en primer fører til at en ring av to DNA polymerase III β -subenheter (en sliding clamp) lastes på og kan holde DNA polymerase III holoenzym på plass under dennes replikasjon av kromosomet.

Elongering av DNA skjer med en rate på ned mot 1000 nukleotider per sekund. Samlingene av proteiner som replikerer DNA kalles replisomer. Et replisom består som nevnt over av en helikase, en primase og to komplekser av polymerase med sliding clamp, men inkluderer også DNA gyrase som hindrer problemer med topologien forut for gaffelen, og flere SSBer (singel-stranded DNA binding proteins). Se figur 2-6 for en illustrasjon av komplekset. Fra de to opprinnelige DNA trådene vil polymerasene syntetisere hver sin komplementære tråd og man ender opp med to kopier av kromosomet. Nye nukleotider

hektes kun på en tråd i 3' enden (reagerer altså med hydroksylgruppa bundet til sukkerets tredje karbon), og syntese foregår dermed i 5' til 3' retning. Dette gjør at dobbelheliksen splittes i en ledende (3'→5') og en haltende (5'→3') templattråd. Langs den sistnevnte dannes biter av DNA, kalt Okazaki fragmenter, som senere føyes sammen.



Figur 2-6. Skjematisk oversikt av en replikasjonsgaffel. Denne strukturen er felles for eukaryoter og prokaryoter, det er enzymene involvert som avviker. Figuren er hentet fra "Molecular Biology of the Cell" (Alberts et al, 2002).

Initiering av replikasjon fra origin skjer bare en gang per celledyklus, og under hurtig vekst når cellen inneholder flere origin initierer disse på likt (Skarstad *et al*, 1986). Det er hittil oppdaget tre kontrollmekanismer som hindrer *E.coli* i å re-initiere fra en nydannet *oriC*, disse er sekvestrering og regulering av aktivitet og nivå av DnaA (Boye *et al*, 2000). Den viktigste er sekvestreringen (sequestration) av *oriC* og *dnaA* genet som er lokalisert like ved. Adeniner i GATC sekvensene i *E.coli* blir metylert av Dam metyltransferase etter at den semikonservative replikasjonen gir hemimetylert DNA. Dette skjer vanligvis like i kjølvannet av gaflene, men *oriC* og *dnaA* kan forbli hemimetylert opp mot en tredjedel av syklus (Campbell og Kleckner, 1990). Imens er faktoren SeqA bundet til det hemimetylerte DNAet og ny initiering av origin forhindret. Nivået av fritt DnaA synker like etter initiering, når *datA* lokuset blir duplisert. Dette er en region med høy affinitet for DnaA, så cellen vil få mindre tilgjengelig DnaA til å starte en ny replikasjonsrunde på. Aktiviteten til DnaA er avhengig av om det har bundet ATP eller ADP, og andelen ATP-DnaA synker etter initiering.

2.3 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae er en rundt 3µm lang kommaformet (se figur 2-7), gram-negativ bakterie i familien *Vibrionaceae*. Genomet til *Vibrio cholerae* er delt mellom to kromosomer (Trucksis *et al*, 1998). Det største, kalt *chrI*, er på 2,96Mb (millioner basepar) og det minste, *chrII*, er på 1,07Mb (Heidelberg *et al*, 2000).

Bakterien er naturlig forekommende som plankton i salt- og ferskvann, og de fleste stammene er harmløse. Men den kan også være patogen og forårsake den diaretiske sykdommen kolera, som uten behandling er dødelig for mennesker. De patogene stammene virker å ha oppstått relativt nylig etter horisontal genoverføring og inneholder tre særegne lokus. Blant disse er CTXφ som koder for kolera enterotoksinet og har opprinnelse i en fag (Waldor og Mekalanos, 1996).

V. cholerae er karakterisert i langt mindre grad enn *E.coli* bakterien. Det er først de siste årene den har begynt å bli studert som en mulig modellorganisme, og det er fremdeles mye som er uvisst om den.

2.3.1 Cellesyklus

Det har blitt foreslått at kromosom II hos *Vibrio cholerae* for lenge siden startet som et megaplasmid, og senere overførsel av essensielle gener fra kromosom I ga det kromosomstatus (Heidelberg *et al*, 2000). Det skiller seg også fra plasmider som replikeres uavhengig av cellesyklus (del Solar *et al*, 1998), ved å initiere replikasjon nøyaktig en gang per syklus. Interinitieringstiden er ved et Meselson-Stahl tetthetsskift forsøk vist å være lik doblingstiden til cellene (Egan *et al*, 2004).

Siden kromosom II er mindre enn kromosom I vil replikasjonen av førstnevnte ta kortere tid, forutsatt at raten er lik hos de to kromosomene. To ulike replikasjonsmodeller er lansert for *Vibrio cholerae* bakterien, den første foreslår initieringssynkroni for de to kromosomene (Egan *et al*, 2004), den andre beskriver termineringssynkroni (Rasmussen *et al*, 2007). Disse modellene er illustrert i henholdsvis a) og b) i figur 2-8. Begge tar kun saktevoksende celler i betraktning, hvor altså $(C+D) < \tau$.

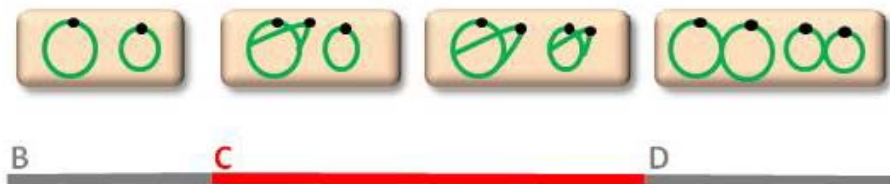


Figur 2-7. Celle fra stammen O395 av *Vibrio cholerae*. Bildet er tatt med elektronmikroskop (Dartmouth Electron Microscope Facility).

a) Initieringssynkroni



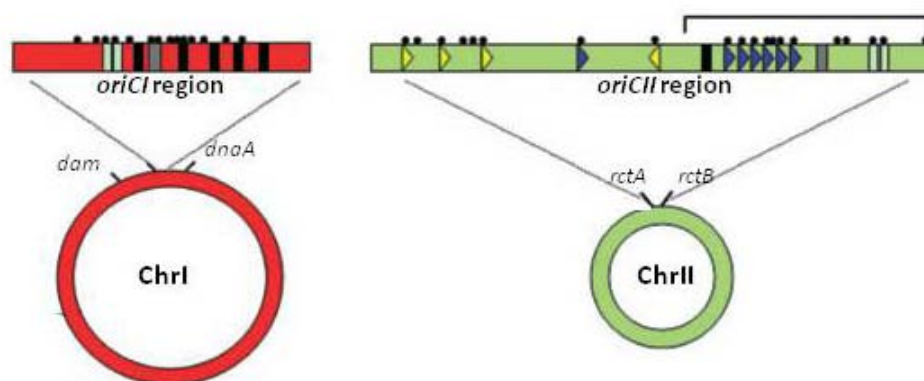
b) Termineringssynkroni



Figur 2-8. Skjematisk framstilling av to ulike modeller for koordinering av replikasjon i saktevoksende *V.cholerae* celler. I a) skjer initiering av DNA replikasjon i de to kromosomene samtidig, mens de i b) avslutter replikasjonen på likt.

2.3.2 DNA replikasjon

Originene på de to kromosomene til *V.cholerae*, *oriCI* og *oriCII*, er funnet ved fremstilling av minikromosomer (Egan og Waldor, 2003). I figur 2-9 er disse områdene uthevet, *oriCI* har sterke likheter med *oriC* hos *E.coli*, mens *oriCII* har mer plasmidliknende trekk.

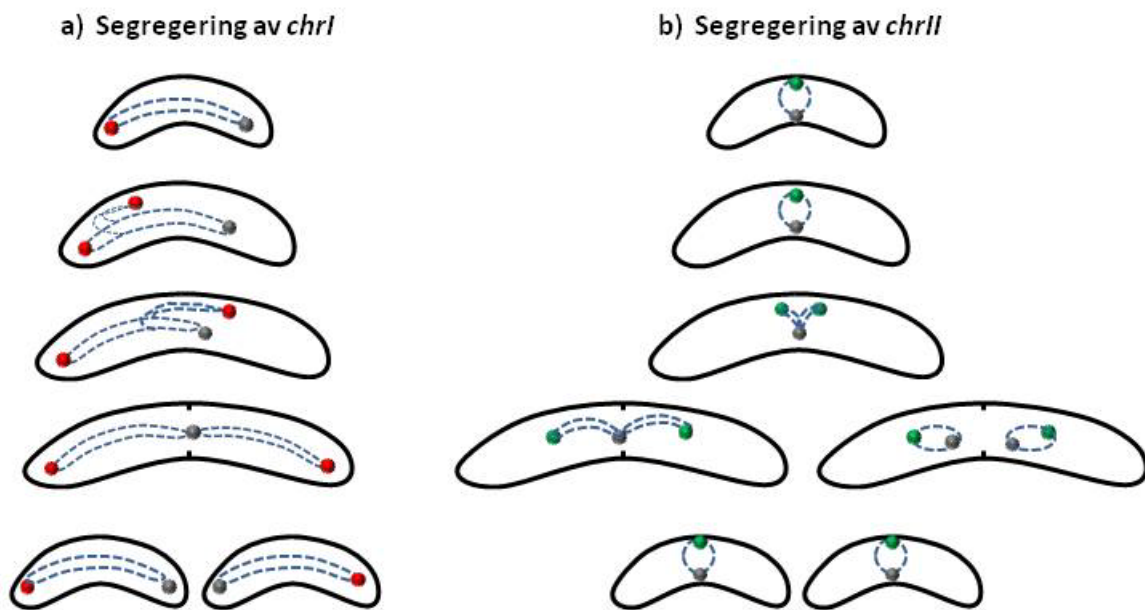


Figur 2-9. Origin på kromosom I og II i *V.cholerae*. De sorte firkantene er DnaA bokser og trekantene i *oriCII* repeterte sekvenser. Regionene deler lyseblå bokser som er AT-rike områder der separasjon av DNA trådene startes, og GATC seter som er vist som sorte prikker. Dessuten har begge bindings seter for IHF, framstilt som grå bokser. Figur tilpasset (Egan *et al*, 2005).

Initiatorproteinene for de to kromosomene er da også forskjellige, mens DnaA starter replikasjonen i *oriCI*, gjør RctB tilsvarende ved *oriCII* (Duigou *et al*, 2006). Produktet av genet *rctA*, en RNA, er også nødvendig ved initiering av *oriCII*. I tillegg til å fungere som initiator for kromosom II, kontrollerer RctB også transkripsjonen ved autoregulering og som repressor av *rctA* (Egan *et al*, 2006; Pal *et al*, 2005). Aktiviteten til RctB blir igjen regulert ved binding (titrasjon) til seter i *rctA* (Venkova-Canova *et al*, 2006). Det har også blitt vist at replikasjon av kromosom II er avhengig av DnaA og Dam (Egan og Waldor, 2003).

Ved å merke ulike regioner på de to kromosomene og følge disse gjennom cellyklus ved sakte vekst med fluorescensmikroskopi, kan segregasjonsmønsteret til kromosomene observeres. Se figur 2-10 for en illustrert oversikt av den følgende teorien. Før replikasjon er posisjonen til *oriCI* begrenset til et domene nær cellens ene pol, mens *oriCII* ligger innenfor et annet domene omtrent midt i cellen (Fiebig *et al*, 2006). Etter initiering forblir et *oriCI* fokus stasjonært mens det andre beveger seg gjennom hele cellen til den motsatte polen. I kontrast til dette vil de to nye *oriCII* fokusene starte segregering senere, og begge bevege seg fra det opprinnelige domenet inntil de stopper i midtcelleposisjonene til de framtidige dattercellene (Fogel og Waldor, 2005). Kromosom II hos *V.cholerae* segregerer altså tilsvarende som kromosomet til *E.coli* (Bates og Kleckner, 2005). Mekanismen som beveger kromosom I består blant annet av ParBI som festes til et område nær *oriCI*, og ParAI som drar dette komplekset mot en pol og forankrer det der (Fogel og Waldor, 2006).

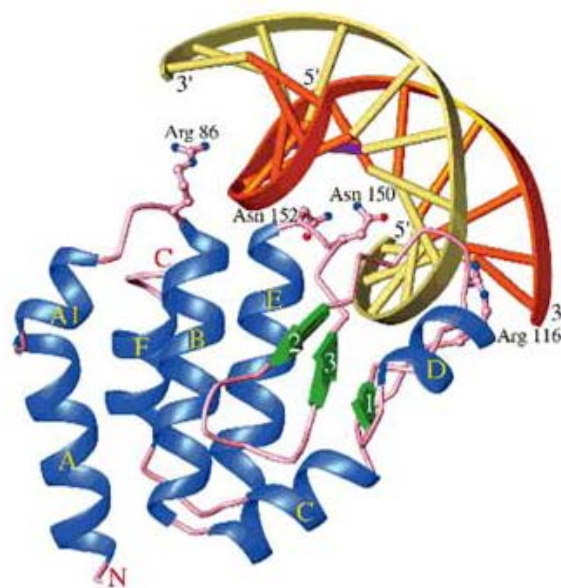
Tilsvarende merking ved terminus regionene til de to kromosomene, *terCI* og *terCII*, har blitt gjort (Srivastava *et al*, 2006). Det ble da sett ett fokus for *terCI* som beveget seg fra nær en pol i nyfødte celler og til midt i cellen hvor det forble helt til septumformasjon, og gjort en antagelse om at segregering fant sted umiddelbart før deling. Resultatene for kromosom II viste to eventualiteter. Enten kun et *terCII* som forble i midten av cellen under hele syklus uten å segregere og mot slutten var samlokalisert med *terCI*, eller en splittelse av *terCII* godt før septumformasjon.



Figur 2-10. Skjematisk oppsummering av dynamikken til kromosomene hos *Vibrio cholerae*, laget fra litteraturen referert i teksten. Forløpet for *chrI* og *chrII* gjennom en syklus er for oversiktens skyld vist separat i henholdsvis a) og b). De røde prikkene representerer *oriCI* og de grønne *oriCII*. De grå prikkene viser i a) området *terCI* og i b) *terCII*. Blå stiplede linjer viser antatt mellomliggende DNA tråd. For *chrII* vises begge observerte lokaliseringer av *terCII* rundt septumformasjon.

2.4 SeqA proteinet

SeqA proteinet, som illustrert i figur 2-11, består av to funksjonelle domener ved N og C terminalene (Guarne *et al*, 2002). Det sistnevnte har DNA bindende egenskaper og vekselvirker med hemimetylerte GATC sekvenser ved hydrogenbindinger og van der Waals kontakt til A-T baseparet og området rundt. N-terminalene hos to SeqA monomerer kan feste seg sammen slik at proteinene inngår en dimer. Dannelsen av denne dimeren krever to hemimetylerte GATC sekvenser innenfor et område på 31bp (Brendler og Austin, 1999). Nærliggende SeqA dimere vil også danne multimerer og gi folder av DNA i kjølvannet av en replikasjonsgaffel (Brendler *et al*, 2000; Hiraga *et al*, 2000; Guarne *et al*, 2005; Odsbu *et al*, 2005).



Figur 2-11. Ribbediagram over C-terminalen i SeqA proteinet hos *E.coli*, bundet til hemimetylert DNA. Den gule tråden er umetylert, og den røde metylert. (Guarne *et al*, 2002)

Som beskrevet i kapittel 2.2.2 fungerer SeqA som en negativ regulator av replikasjonsinitiering hos *E.coli* bakterien (Lu *et al*, 1994). Dette skyldes sekvestreringen, altså at DNA blir gjort utilgjengelig for Dam metylase og replikasjonsproteinene. I tillegg vil SeqA også bindes med lavere affinitet til fullmetylerte områder i *oriC* og dermed hindre initiering av et DnaA kompleks (Slater *et al*, 1995; Skarstad *et al*, 2000).

SeqA proteinet i *V.cholerae* er 54% identisk og har 69% likhet SeqA i *E.coli* cellen. Det har nylig blitt vist at proteinet også i *V.cholerae* sekvestrerer hemimetylert DNA i både *oriCI* og *oriCII*, dessuten at overskudd av proteinet påvirker replikasjonen negativt (Saint-Dic *et al*, 2008).

2.5 Mikroskopet

Teori hentet fra boken “Molecular Biology of the Cell” (Alberts *et al*, 2002) og et review om fluorescens mikroskopi (Lichtman og Conchello, 2005).

Med et lysmikroskop kan strukturer ned mot 200nm skilles fra hverandre, dette er rundt tusen ganger bedre oppløsning enn man har med det blotte øye. Forstørrelsen skjer tradisjonelt ved at en første linse, kalt objektivet, danner et reelt bilde av prøven like foran et sett av linser, til sammen kalt okularet. Dette bildet tjener igjen som et objekt for okularet og man ser et forstørret virtuelt bilde når man ser ned i dette. Bak prøven sitter det en lampe som belyser denne. En skjematisk oversikt av komponentene i et lysmikroskop er gitt i figur 2-12, der det også er tegnet inn et eksempel på strålegang. I moderne mikroskop dannes bildet fra objektivet uendelig langt unna, og en ny linse med mer vilkårlig plassering samler lyset til et objekt for okularet.

Oppløsningen til et mikroskop er gitt i formel 2-1 og begrenses av visse faktorer. λ er bølgelengden til lyset, n den refraktive indeksen til materialet som skiller prøven fra linsene, og 2θ vidden av belsningskjeglen. Den refraktive indeksen til luft er på 1, mens tilsvarende for olje er på opptil 1,4. Oljeimmersjonsmikroskop vil dermed bedre oppløsningen ytterligere. Som mål på oppløsningen gis for hvert objektiv ofte bare den numeriske aperturen, NA (gitt i formel 2-2).

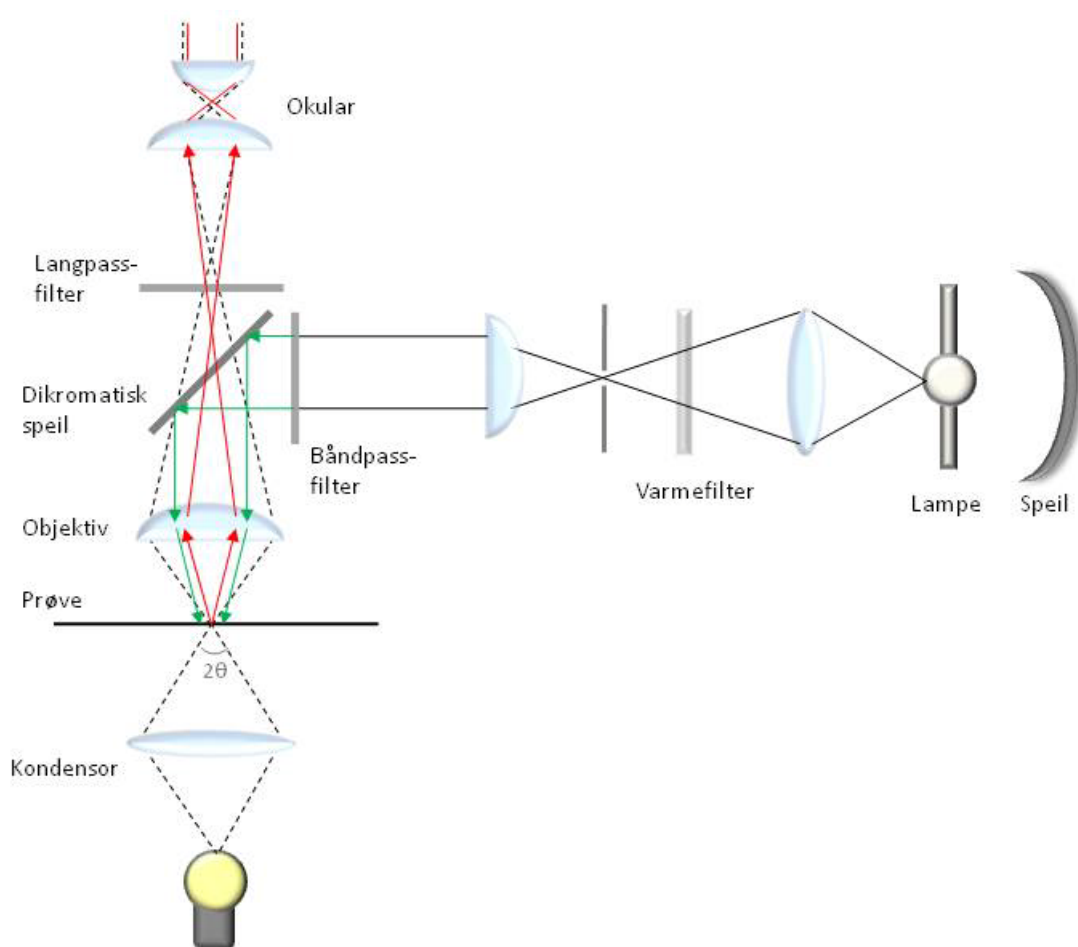
$$\text{oppløsning} = \frac{0,61\lambda}{n * \sin\theta} \quad \text{Formel 2-1}$$

$$NA = n * \sin\theta \quad \text{Formel 2-2}$$

Lysbølgene fra lampen vil skifte fase når de treffer materiale med ulik tetthet i prøven. I et fasekontrastmikroskop utnyttes dette, og i synsplanet vises interferensmønsteret mellom bølgene.

Fluorescens er lys utstrålt fra et molekyl umiddelbart etter det har blitt eksitert ved absorpsjon av innkommende lys. Det emitterte fotonet, altså fluorescensen, får lavere energi og dermed lengre bølgelengde enn det innkommende fordi en del av energien tilført ved eksitasjonen forsvinner i varme- og vibrasjonsprosesser. Denne forskjellen kalles et Stokes skift. Ulike deler av celler kan merkes med fluorescerende stoff (fluorokromer), enten direkte eller via et konjugert antistoff, og studeres i et fluorescensmikroskop. Hele prøven bestråles med lys innenfor bølgelengdespekteret som gir eksitasjon av fluorokromet. Ved å blokkere utgående lys med bølgelengde under en viss terskel, observeres kun fluorescensen.

Oppsettet for et fluorescensmikroskop er vist i figur 2-12 sammen med komponentene i lysmikroskopet. Lampen kan for eksempel være en kvikksølvbuelampe som gir stråling ved flere bølgelengder. Det brukes derfor et båndpassfilter som kun slipper gjennom et begrenset spekter av bølgelengder for å gi eksitasjon av ønsket fluorokrom. Etter dette sitter et langpass dikromatisk speil som reflekterer lys under en viss bølgelengde og slipper det andre gjennom. Lyset som emitteres tilbake fra prøven treffer også dette speilet, og kun fluorescensen slipper nå gjennom mot okularet. I en kube sammen med båndpassfilteret og det dikromatiske speilet sitter det gjerne også et langpassfilter. Dette slipper bare gjennom lys over en viss bølgelengde.



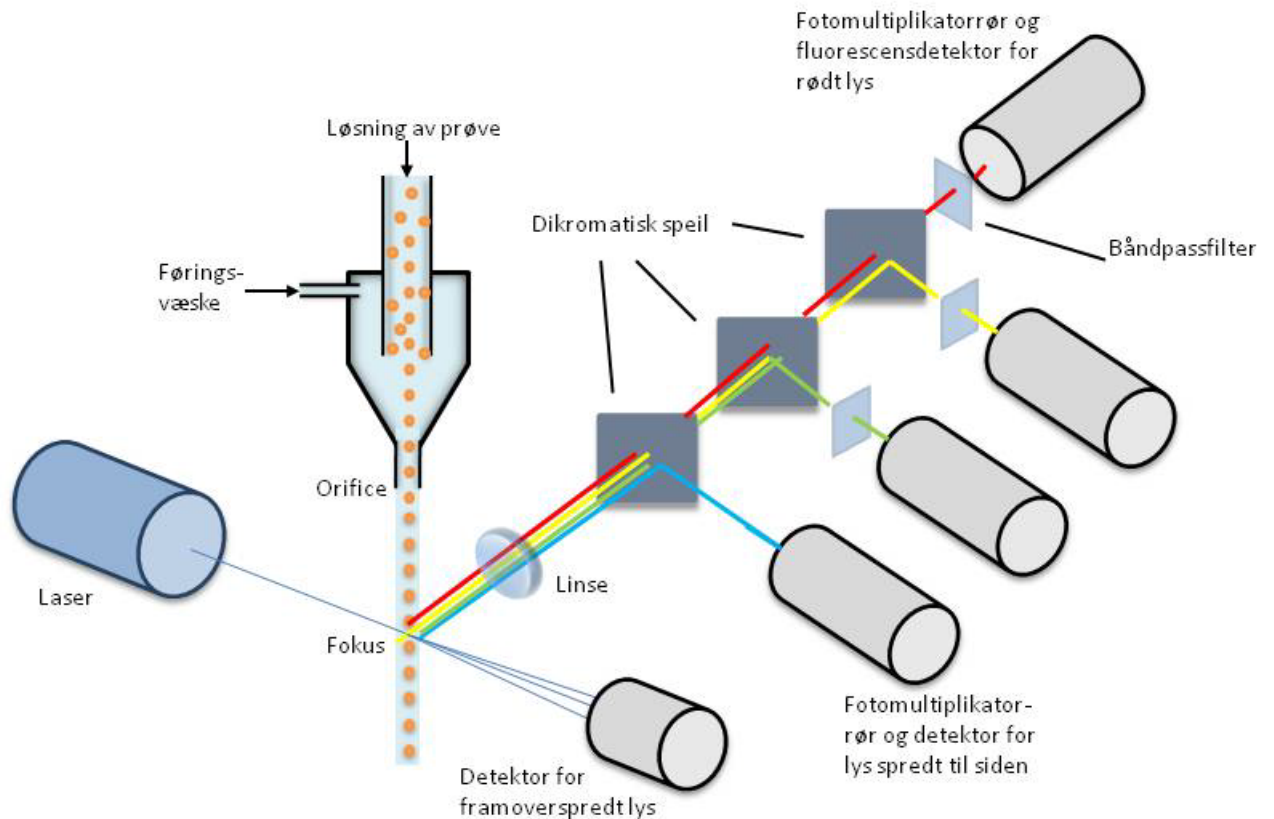
Figur 2-12. Kombinasjon av et lysmikroskop og et fluorescensmikroskop. Lyset fra lampen vist til høyre i figuren blir filtrert til korrekt eksitasjonsbølgelengde (her grønt lys) av et båndpassfilter før det reflekteres ned i prøven av et langpass dikromatisk speil. Objektiv fungerer her også som en kondensorlinse. Emisjonslyset, altså fluorescensen, med lengre bølgelengde (vist som rødt) slippes gjennom speilet. Strålegangen i lysmikroskopet er vist i stiplede svarte linjer fra lyspæren nederst til okularet øverst. Kuben bestående av filtre og det dikromatiske speilet må da roteres bort.

Det finnes flere typer mikroskop som ikke blir beskrevet nærmere her. For eksempel kan tredimensjonale bilder dannes ved konfokal mikroskopi, dette er fluorescensmikroskopi der ute-av-fokus bidragene elimineres. Relasjonen (formel 2-1) for oppløsningen til et mikroskop gjelder for all elektromagnetisk stråling. Elektronmikroskop kan dermed avbilde mye mindre strukturer enn et vanlig lysmikroskop.

2.6 Flowcytometeret

Teorien i dette kapitlet er hentet fra kurset ”Flowcytometri i medisinsk forskning og diagnostikk” med Trond Stokke og Harald Steen.

Flowcytometere fungerer som verktøy for å kunne måle en eller flere parametre hos mange celler på kort tid. Dette kan være cellestørrelse, DNA fordeling eller innhold av et bestemt protein eller ion. I tillegg kan parametre som proliferasjonsrate, enzymatisk eller metabolsk aktivitet beregnes. I et flowcytometer tvinges cellene, ved tilførsel av føringsvæske under trykk, enkeltvis forbi et fokus hvor de blir bestrålt med lys fra en laser (se figur 2-13). Responsen fra cellene blir registrert og kan så analyseres.



Figur 2-13. Skjematisk framstilling av et flowcytometer. Cellene vil spre lys framover og til siden når de passerer fokus. Eventuelle fluorescerende stoffer vil emittere lys uniformt. Det er kun satt merkelapp på fluorescensdetektoren for rødt lys, med tilhørende fotomultiplikatorrør og båndpassfilter, men man kan som illustrert ha tilsvarende for andre grupper av bølgelengder også.

Når en celle i den kontinuerlige væskestrømmen passerer fokus blir lyset fra laseren spredt, desto mer jo større cellen er. Tvers overfor laseren sitter det en detektor for foroverspredt lys, med en sperre mot det direkte lyset, som kan gi et grovt estimat på størrelsen av cellene. Lys vil også bli spredt til siden etter både størrelsen på cellene og graden av intracellulær kompleksitet, dette lyset måles med en såkalt sidescatterdetektor. Hver detektor er et fotomultiplikatorrør der det innkommende lyset blir omdannet til en målbar elektrisk puls. Dette foregår ved at fotonene treffer en fotokatode og gir emisjon av et elektron som i en kaskadereaksjon av vekselvirkninger med dynoder frigjør nye elektroner før anoden nåes.

Som ved fluorescensmikroskopi kan visse egenskaper ved cellene studeres etter merking med fluorokromer. Bølgelengden på laserlyset må være innenfor det gitte

eksitasjonsspekteret til stoffet/ene. For å skille ut ønsket emisjonslys brukes langpass dikromatiske speil, og foran detektoren settes i tillegg et båndpassfilter. Hvis det er farget med flere fluorescerende stoffer med ulike emisjonsspektre kan en serie av dikromatiske speil settes opp for å registrere cellenes respektive innhold av hvert (som vist i figur 2-13). Eventuelt kan cellene nedover i strømmen passere flere fokus der de treffes av laserlys med ulike bølgelengder. Utenfor hvert sitter det da et båndpassfilter og en detektor. Det målte pulsarealet er proporsjonal med mengden utstrålt fluorescens.

Flowcytometri kan også benyttes til å sortere celler slik definerte subpopulasjoner kan studeres. Sorteringen kan også gjøres sterilt så cellene i etterkant kan dyrkes videre. Den vanligste måten å foreta sortering på er ved dråpegenerering i luft. Vibrasjon i munnstykket sørger for at væskestrømmen brytes opp i dråper litt etter fokuset, dette er tilpasset så ingen dråper skal inneholde mer enn en celle. Hvis cellen ved fokus ble observert til å inneha en karakteristikk man er interessert i, kan dråpen gis en bestemt ladning. Nedenfor passerer dråpene mellom to plater med en høy potensialforskjell, og avhengig av ladningen vil de så kunne avbøyes ned i ulike brønner.

3. Materiale og metoder

Der ikke annet er nevnt er teorien hentet fra bøkene ”Molecular cloning” (Sambrook og Russell, 2001) og ”Molecular Biology of the Cell” (Alberts *et al*, 2002). Protokollene for laboratoriearbeidet er de gjeldende ved Avdeling for Cellebiologi på Det Norske Radiumhospital.

I appendiks A er det vedlagt lister over benyttede kjemikalier og instrumenter. Alle protokoller er også gitt i appendiks A. Programvaren benyttet i arbeidet med denne oppgaven er listet i appendiks A.

3.1 Bakteriestammene

I tabell 3-1 er det gitt en oversikt over bakteriestammene som er blitt benyttet i denne oppgaven. Forsøkene beskrevet er utført på de to førstnevnte.

Tabell 3-1. Bakteriestammer benyttet i oppgaven.

Stamme	Beskrivelse	Kilde/referanse
MG1655	<i>E.coli</i> villtype	Guyer <i>et al</i> , 1980; Jensen, 1993
2740-80	<i>V.cholerae</i> , CTX ϕ ⁻	Isolat fra den amerikanske gulfkysten 1980 (Pearson <i>et al</i> , 1993)
EBO193	<i>E.coli</i> Δ seqA	Torheim <i>et al</i> , 2000
CM735	<i>E.coli</i> villtype	Hansen og von Meyenburg, 1979

3.2 Dyrking av bakterieceller

Stammene oppbevares ved -80°C i vekstmedium tilsatt 20% glyserol. Før forsøk ble cellene inokulert i LB medium og dyrket over natten ved 37°C, mens de var under kraftig risting. Det ble så tynnet ut celsuspensjon 1:1000 i ønsket medium (se tabell 3-2 for oversikt og appendiks A for oppskrifter) i Erlenmeyerflasker. Disse sto i vannbad ved 37°C og risting på 200rpm (rotasjoner per minutt) til veksten var eksponentiell.

Tabell 3-2. Oversikt over de benyttede mediene.

<i>E.coli</i>	<i>V.cholerae</i>
ABB ₁ + 0,5% CAA + 0,2% glukose + 20µg/ml uracil	ABB ₁ + 0,2% glyserol
	ABB ₁ + 0,2% fruktose
	LB

Doblingstiden til kulturen ble funnet ved å bestemme den optiske tettheten (OD) til celleduspensjonen i forhold til mediet uten cellevekst. Denne tettheten ble målt med et spektrofotometer ved 450nm for minimal medium og 600nm for LB. OD ble plottet på en logaritmisk skala mot en lineær tidsakse, hvor doblingstiden til cellene ble lest av. Når denne doblingstiden hadde vært konstant i flere generasjoner, ved en OD lik 0,15, ble det fiksert prøver av kulturene. Dette er viktig for å sikre at alle cellene er i balansert vekst.

3.3 Prøvetaking

Fra bakteriekulturer i eksponentiell vekst ble det tatt prøver som ble fiksert i etanol. På samme tidspunkt ble en del av kulturen tilsatt antibiotikaene rifampicin (Rif) og cephalixin (Cpx) og inkubert videre. Se appendiks A for detaljerte protokoller.

Rifampicin er et antibiotikum som hindrer bakterieceller i å initiere ny DNA replikasjon ved å binde seg til β -enheten av RNA polymerase. Denne polymerasen er nødvendig for initiering. Pågående elongering vil derimot kunne fullføres. Cephalixin er et annet antibiotikum som hemmer produksjon av ny cellevegg og dermed stopper celledeling. Cellene vil da ende opp med et helt antall kromosomer som tilsvarer antall origin ved eksponentiell vekst (Skarstad *et al*, 1986; Boye og Løbner-Olesen, 1991). Disse blir ofte omtalt som replikasjons run-out prøver.

3.4 Flowcytometri

Det var ønskelig å observere DNA fordelingen i cellekulturene under eksponentiell vekst. Ved å bruke et fluorokrom som binder seg til DNA og kjøre celleprøver i et flowcytometer ble det funnet histogrammer av fordelingene. For å finne antall origin hos de samme cellene ble tilsvarende gjort for prøvene tilsatt rifampicin og cephalixin (som

beskrevet i kapittel 3.3). Ut fra histogrammene kan man beregne replikasjonsmønsteret og replikasjongsaffordelingen for kulturene.

3.4.1 Farging

For å kunne bestemme DNA innholdet i cellekulturene ble det tilsatt en standard med kjent DNA histogram internt i prøvene. Under *E.coli* forsøkene var standarden celler fra stammen CM735, dyrket med svært lang doblingstid. Den inneholdt da flest celler med ett kromosom, altså et DNA innhold på rundt $4,6 \times 10^6$ bp, og noen med to kromosomer. For *V.cholerae* prøvene ble det brukt svært saktevoksende celler fra stammen 2740-80 som standard. Dette er den samme stammen som ble brukt i forsøkene. Disse standardcellene inneholdt da hovedsaklig enten en kopi av *chrI* og en kopi av *chrII*, eller to kopier av begge, altså en DNA mengde fra $4,03 \times 10^6$ bp til $8,06 \times 10^6$ bp. For å skille standarden fra prøvene ble kun sistnevnte farget med FITC (fluorescein-isothiocyanate) som binder seg kovalent til protein. Hoechst 33258, som inngår en likevektsbinding med DNA, ble tilsatt både prøvene og standarden. Se appendiks A for protokoll for fargingen.

Ved farging kun med Hoechst 33258, ble bare punktene 5-9 av protokollen utført.

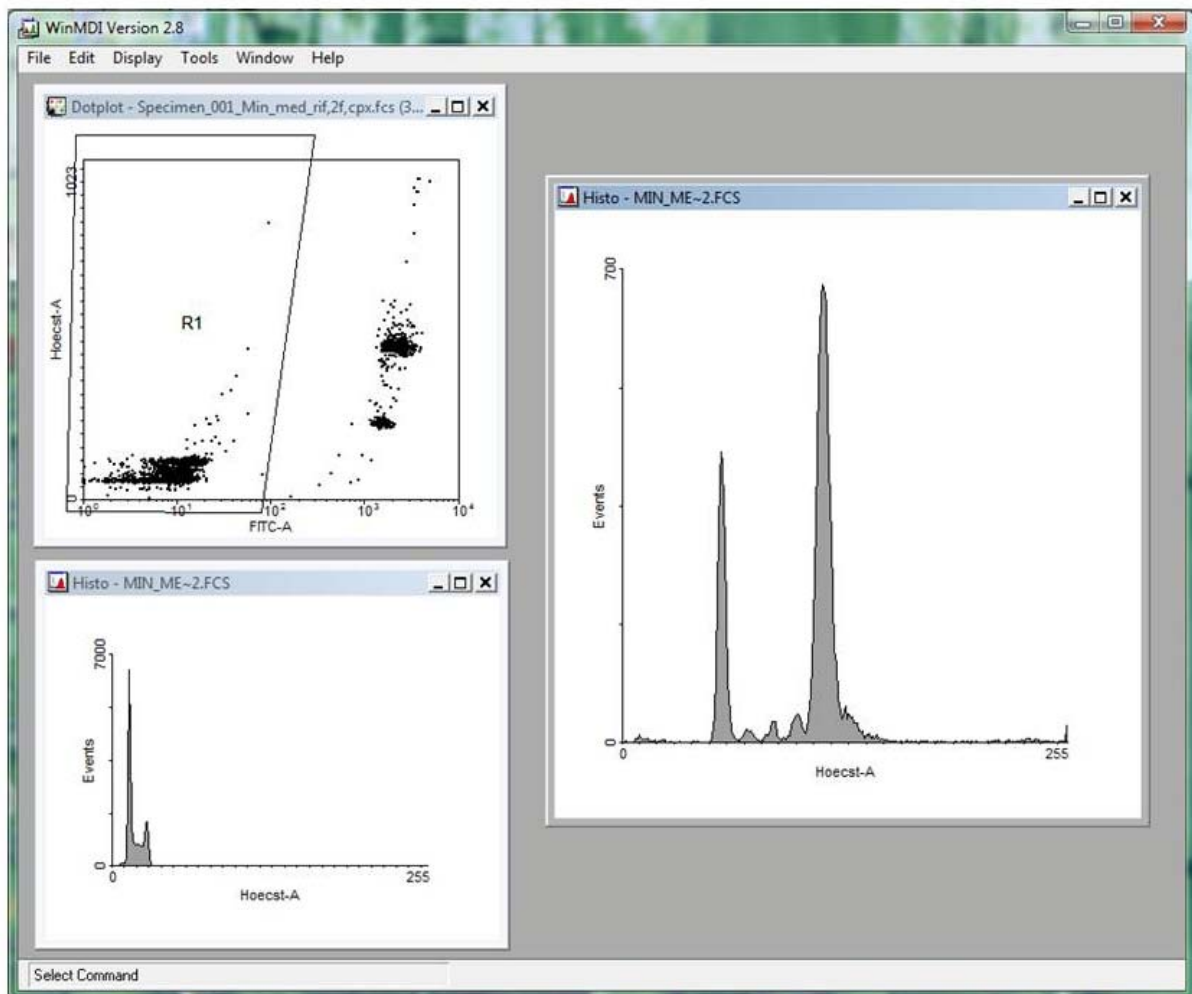
3.4.2 Kjøring

Prøvene ble kjørt på et LSR II flowcytometer fra Becton Dickinson. Hoechst 33258 eksiteres av lys på 355 nanometer fra en UV laser, og emitterer fluorescens med et intensitetsmaksimum ved 461nm, altså blått lys. Foran detektoren er det plassert et båndpassfilter på 450/50, dette vil si at bredden på spekteret som slipper gjennom er 50nm og midtpunktet er ved 450nm. Detektoren mottar altså lys med bølgelengder fra 425nm til 475nm. FITC blir eksitert av laserlys ved 488nm, og har et emitteringsspekter med en topp ved 518nm. Her er det tilhørende båndpassfilteret på 530/30.

Først ble standard prøven (1xstd) kjørt for å justere spenningen på UV laseren slik at cellene avgir ønsket mengde fluorescens i forhold til DNA innhold. Forsinkelsen mellom laserfokusene stilles også siden disse sitter under hverandre i LSR II. Prøvene kjøres så ved en rate på rundt 1000 celler/sekund inntil det er detektert fra 10000 til 100000 celler avhengig av prøven. For å utelate fremmedlegemer og fragmenter av celler ignoreres hendelser med DNA innhold under en gitt grenseverdi.

3.4.3 Analyse

Til analyse av data fra prøvene har programmet WinMDI 2.8 blitt benyttet. I figur 3-1 er det vist et skjermbilde fra dette programmet. I dotplottet øverst til venstre kan man se at de interne standardcellene, i regionen R1, er negative for FITC fargingen. Selve cellene i prøven er positive. Regionen med intern-standard blir gatet bort når histogrammet til høyre skal tegnes. Dette viser antall celler innenfor 256 kanaler som hver tilsvarer et visst Hoechst innhold, altså DNA mengde.



Figur 3-1. Skjermbilde tatt ved bruk av programmet WinMDI 2.8 for en prøve av *E.coli* etter replikasjons run-out. I det venstre øverste vinduet vises et dotplott med Hoechst innhold på den lineære y-aksen og FITC innhold på den logaritmiske x-aksen. Det høyre vinduet viser et histogram over DNA innhold hos prøven etter at standarden er blitt gatet bort. Det venstre nederste vinduet viser fordelingen av DNA i standarden.

Først kjøres det en prøve av intern-standard farget med FITC for å finne DNA innholdet til toppene med ett og to kromosomer. Den FITC negative intern-standard må da legges på samme sted for hver prøve. Ved å kalibrere med de kjente kanalene finnes skalaen for prøven senere. Antallet celler i en topp kan også finnes ved å sette et vindu over denne.

3.4.4 Sortering

Sorteringen ble foretatt med et FACS DiVa flowcytometer fra Becton Dickinson. Prøvene var farget med Hoechst 33258 (kapittel 3.4.1), og det ble valgt ut fire intervaller med DNA innhold (disse intervallene tilsvarer ulike faser, se figur 4-20). Eksitasjon ble gjort med en Krypton laser som ga UV stråling på 351nm. Foran detektoren satt det et båndpassfilter på 440/40.

Celler fra to og to av intervallene ble sortert ut samtidig. Som forklart i kapittel 2.6 foregår dette ved at celler man vil sortere ut blir ladet og deretter avbøyd i potensialfeltet mellom to plater (se figur 3-2 for bilde av flowkammeret). I stedet for å bli sortert ned i brønner ble dråpene sendt ned på preparerte objektglass. Den videre prosessen med immunmerking av SeqA er forklart i kapittel 3.5.2.

I det første forsøket ble det sortert ut 10000 celler fra hvert intervall. Senere ble dette tallet oppjustert til 25000 celler for å øke tettheten av celler på objektglassene. Det lå en øvre begrensende faktor i væskemengden som det var plass til på et glass. Renheten av de sorterte cellene lå på rundt 96%, men øker med andelen celler i det opprinnelige intervallet. Dette vil si at ca hver tjuedefemte celle som sorteres ut på objektglassene ikke vil inneholde den ønskede DNA mengden.

3.5 Mikroskopi

Hos de eksponentielt voksende cellene skulle antallet gafler per celle og deres lokalisasjon studeres. Dette var for å finne ut om replikasjonskompleksene ved gaflene



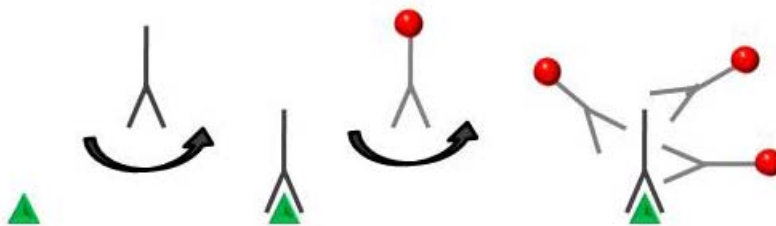
Figur 3-2. Et FACS DiVa flowkammer. (Flow Cytometry Core Facility, Radiumhospitalet)

samlokalisererte. Siden SeqA binder seg til nytt DNA like bak replikasjons-gafler (se kapittel 2.4) kan immunmerking av dette proteinet fungere som en markør for posisjonen til gaflene (Hiraga *et al*, 1998). Et fluorescensmikroskop ble brukt til å studere cellene og fordelingen av SeqA fokus ble talt opp.

3.5.1 Immunmerking for SeqA

For hver av de fikserte prøvene har en del av cellene blitt farget og kjørt i flowcytometeret for å gi et histogram av DNA innholdet. Fra de resterende mengdene prøve ble det videre tatt ut celler som ble festet til et objektglass og lysert til bruk for immunmerking og mikroskopering.

Ved immunmerking blir først objektglasset dekket med et serum som inneholder primært antistoff som binder seg til antigenet (se figur 3-3). I dette tilfellet er antigenet SeqA, og det er brukt rensset kanin anti-SeqA serum. At dette er rensset betyr at det er inkubert med celleekstrakt fra stammen EBO193 som mangler SeqA. Hvis serumet også inneholder enkelte antistoffer som fester seg til andre proteiner vil disse nå fjernes ved sentrifugering. Det primære antistoffet skylles så bort fra objektglasset, og et sekundært antistoff settes til i stedet. Dette binder seg til det primære antistoffet, og er for eksempel konjugert med fluorescerende stoff, et enzym eller stoff med høy elektrontetthet. Her er det brukt anti-kanin antistoff merket med Cy3, et fluorescerende cyanin som har eksitasjons- og emisjonsmaksimum ved henholdsvis 550nm og 570nm. Detaljert protokoll er gitt i appendiks A. Prøvene ble også tilsatt Hoechst 33258.



Figur 3-3. Trinnavis framstilling av immunmerkingsprosessen. SeqA er vist som en grønn trekant. Først tilføres et primært antistoff, her en mørkegrå Y, som binder seg til antigenet. Så inkuberes det med et sekundært antistoff, konjugert med et fluorescerende stoff (rød prikk), som binder til det primære antistoffet.

3.5.2 Immunmerking for SeqA for sorterte prøver

Dette er en ny metode som har blitt utviklet i arbeidet med denne oppgaven. Den kombinerer ordinær immunmerking for SeqA med muligheten av å kunne sortere celler etter DNA innhold med et flowcytometer. Motivasjonen var å kunne finne fokusfordelingen for hver fase separat.

Celleprøvene ble først farget med Hoechst 33258 (se kapittel 3.4.1) mens fire objektglass ble preparert som forklart i protokoll for immunmerking pkt 1-2 (appendiks A). Så ble cellene sortert (se kapittel 3.4.4) direkte ned på objektglassene. Væsken fikk tørke og immunmerking ble foretatt (som beskrevet i pkt 4-17 i denne protokollen). Det ble valgt ut fire smale intervaller fra cellesyklus, disse var tidlig B-fase, tidlig C-fase, sen C-fase og sen D-fase. Fokus fordelingen for hver fase alene kan gi unik informasjon om ved hvilke aldre cellene inneholder de forskjellige andelene med SeqA kompleks.

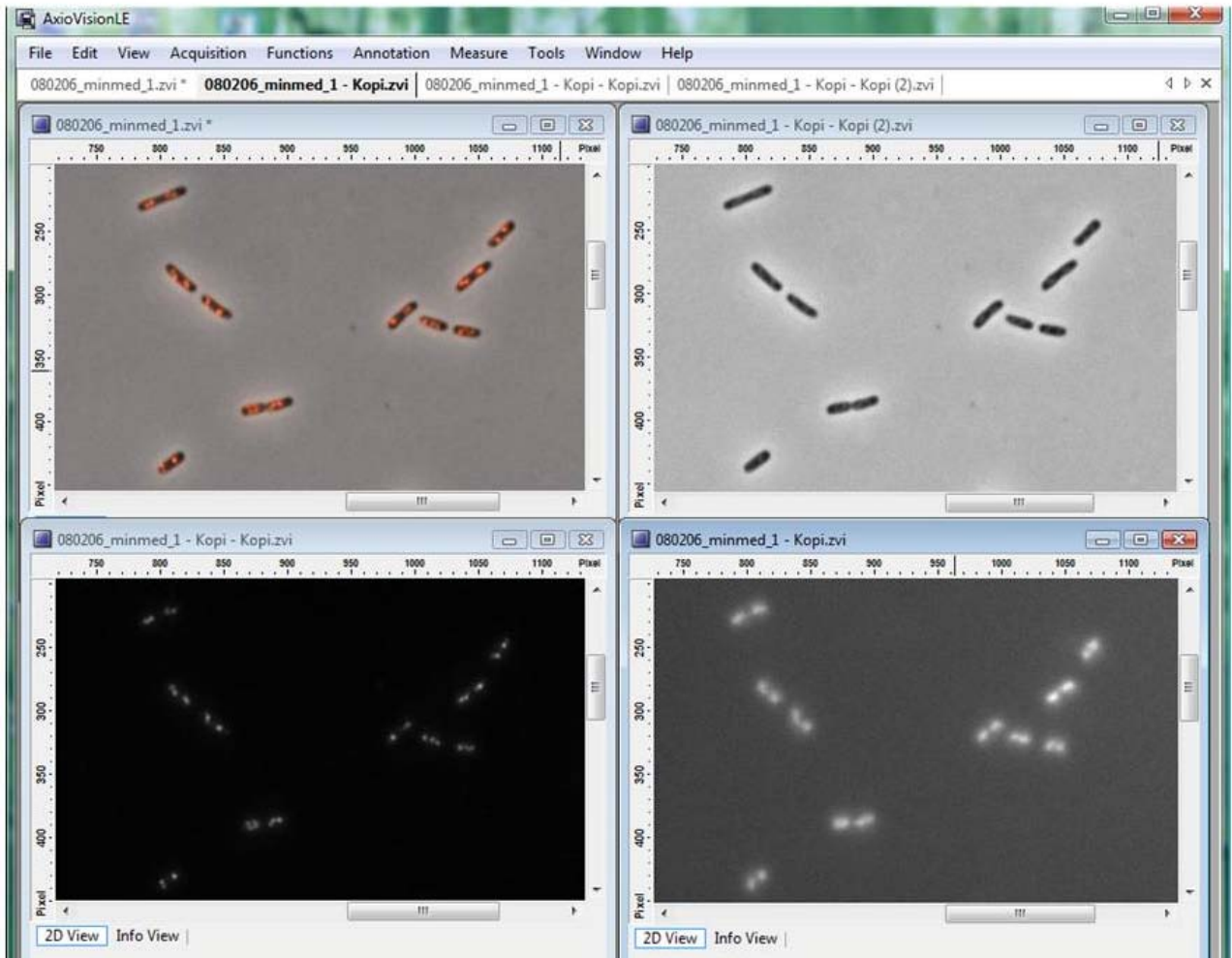
3.5.3 Visualisering

Mikroskopet som ble benyttet til å studere de preparerte prøvene var et AxioPlan2 fra Zeiss. Dette er et kombinert fasekontrast- og fluorescensmikroskop som det er montert et CCD kamera på. Et delvis refraktivt speil kan sende lyset fra prøven til dette i stedet for okularet. Objektivets numeriske apertur var på 1,4.

Etter fokusering ble det først tatt et bilde med fasekontrast av et område på objektglasset, dette viser altså omrisset av cellene. Neste bilde ble tatt av samme område, uten gjennomlysning og med et båndpassfilter på 365/12 foran kvikksølvlampen. Cellenes DNA blir da visualisert ved emisjon av fluorescens fra Hoechst 33258. Et tredje bilde ble tatt med et båndpassfilter på 546/12 som dermed ga eksitasjon av Cy3 og deteksjon av SeqA fokus.

3.5.4 Analyse

Ved å legge fasekontrastbilder og bilder med emittert fluorescens fra Cy3 oppå hverandre kan man finne fordelingen av SeqA fokus i cellene. Dette ble gjort i programmet AxioVision, se skjermbilde i figur 3-4. DNA fargingen blir gjort for å kunne kontrollere at fokusene som observeres faktisk sitter på genomet.



Figur 3-4. Skjermbilde fra programmet AxioVision etter mikroskopering av E.coli celler. Øverst til høyre er et bilde tatt med fasekontrast. De to nederste bildene er tatt med fluorescensmikroskopi, det til høyre viser cellenes DNA og det til venstre fordelingen av SeqA fokus. Øverst til venstre er fasekontrastbildet slått sammen med bildet av SeqA fokusene, fokusene er her valgt til å vises som røde.

Antallet fokus per celle ble for hvert forsøk talt for minst hundre celler fra flere forskjellige områder på objektglasset. Den prosentvise fordelingen av fokus per celle ble så funnet. Gjennomsnitt (formel 3-1) og standardavvik (formel 3-2) for alle forsøkene ble deretter beregnet.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Formel 3-1}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Formel 3-2}$$

3.6 Beregning av replikasjonsmønster og gaffelfordeling

Ut fra de eksperimentelle DNA histogrammene for en prøve (se kapittel 3.4) kan man beregne fordelingen av replikasjonsgaffler per celle. Disse histogrammene vil imidlertid gjenspeile den biologiske variabiliteten i populasjonene og forskjeller under målingene, noe som igjen gir en usikkerhet i beregningene.

3.6.1 *Escherichia coli*

Hos disse bakteriene antas det at cellepopulasjonen vokser eksponentielt og at ingen celler befinner seg i hvilefase. Doblings tiden τ ble funnet med bruk av OD-målingene, som forklart i kapittel 3.2. Fordelingen av celler mellom alderen 0 og alderen τ , altså fra de er nyfødte til punktet de deler seg, er da gitt ved formel 3-3. Denne fordelingen avtar med tiden, og det er halvparten så mange celler med alderen τ som det er med alderen 0. Dette er satt som betingelse siden man vet at disse cellene her deler seg og blir til to nyfødte.

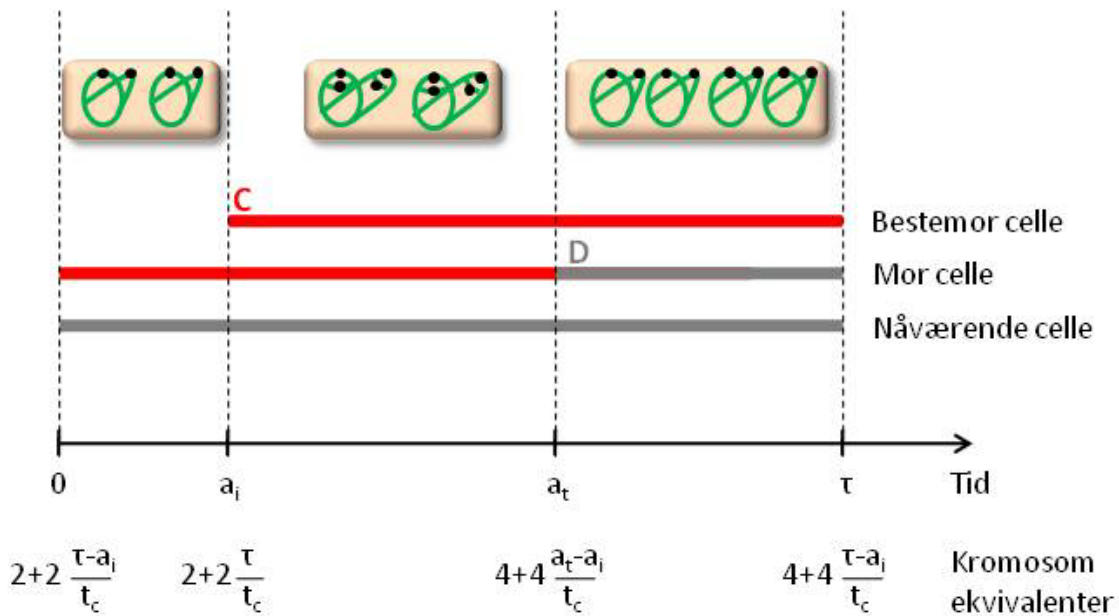
$$n(t) = n(0) 2^{-\frac{t}{\tau}} \quad \text{Formel 3-3}$$

Denne fordelingsfunksjonen gir antallet celler i kulturen, og for i stedet å operere med den relative fordelingen kan funksjonen normaliseres til 1. Resultatet blir en sannsynlighetsfunksjon over alderen til cellene (formel 3-4). Denne funksjonen kalles gjerne aldersfordelingen.

$$p(t) = \frac{2 \ln 2}{\tau} 2^{-\frac{t}{\tau}} \quad \text{Formel 3-4}$$

Fra DNA histogrammene for prøvene som ble tilsatt rifampicin og cephalixin (for å gi replikasjons run-out) ble det funnet en andel med 4 kromosomer og en andel med 8

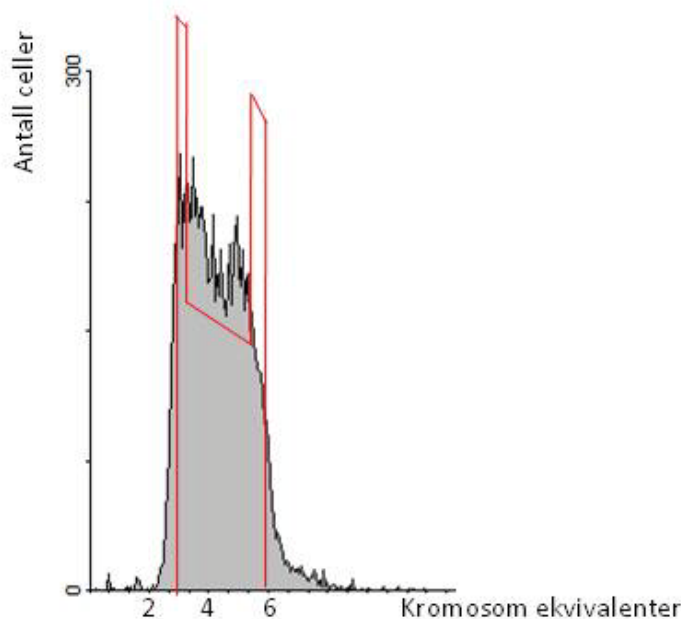
kromosomer. Dette innebærer at cellene må starte replikasjon i bestemorgenerasjonen. Tidspunktet der cellene initierer C perioden kalles a_i , og fra figur 3-5 kan man se at fram til dette punktet i syklus vil cellene inneholde fire origin. Ved å integrere aldersfordelingen over $t=0$ til $t=a_i$ og sette dette uttrykket lik andelen celler med 4 kromosomer fra run-out prøven ble punktet a_i funnet for hvert forsøk.



Figur 3-5. Mulig kinetikk for celler med overlappende generasjoner. På tidsaksen starter syklus i tiden $t=0$, C-fase ved a_i , D-fase ved a_t og cellene deler seg ved τ . DNA innholdet i kromosomekvivalenter ved hvert av disse punktene er gitt under den korresponderende tiden. τ er doblingstiden og t_c varigheten av DNA replikasjonen.

For å bestemme tidspunktet a_t der cellene terminerer replikasjonen og går over i D-fase ble DNA histogrammet for den eksponentielle prøven også studert. Ved å forsøke ulike verdier av a_t med tilsvarende beregnede antall kromosomekvivalenter ved bestemte punkter i syklus (se figur 3-5) ble teoretiske DNA histogram tegnet. Deretter ble det for disse kvalitativt vurdert overensstemmelsen med det eksperimentelle histogrammet. Et eksempel på beste tilpasning er vist i figur 3-6.

Hvis D-fasen av cellyklus ikke strekker seg inn i morgenerasjonen (som det for eksempel er vist i figur 2-4 c) modifiseres uttrykkene for antall kromosomekvivalenter ved punktet a_t og starten og slutten på syklus. Uttrykket ved a_i endres ikke.



Figur 3-6. Tilpasning av teoretisk og eksperimentell DNA fordeling. Histogrammet målt med flowcytometer fra en eksponentielt voksende *E.coli* prøve er vist i grått. Den beregnede fordelingen er lagt oppå med rødt. I denne er den første toppen kuttet siden. Dette skyldes bare plasshensyn siden den egentlig inneholder en middelvei på litt over 500 celler.

Replikasjonsgaffelfordelingen hos de eksponentielle celleprøvene ble så regnet ut med aldersfordelingen (formel 3-4). Integralet over denne fra a_i til a_t gir andelen celler med 12 gafler, og integralet fra a_t til τ gir andelen med 8 gafler. Fra replikasjons run-out prøven var andelen med 4 gafler allerede kjent. Av de prosentvise andelenene gafler for alle forsøkene som er utført ble det til slutt beregnet gjennomsnitt og standardavvik (formel 3-1 og 3-2).

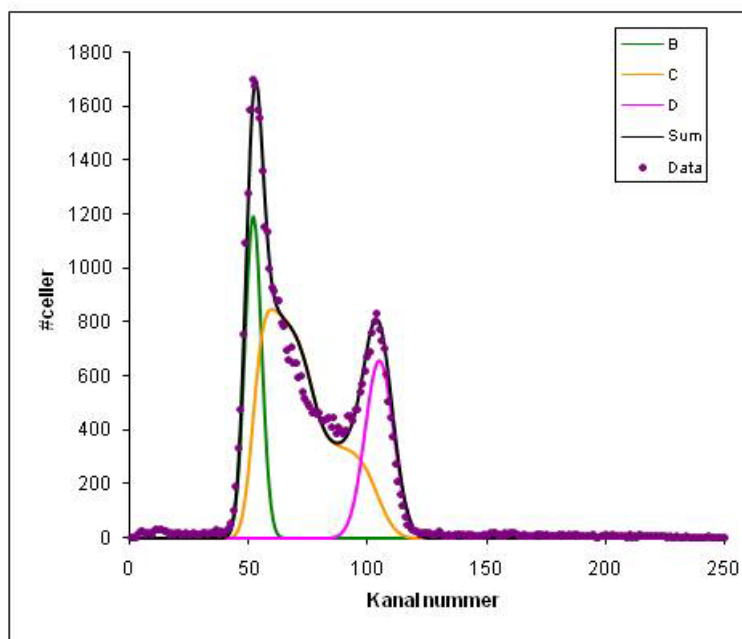
3.6.2 *Vibrio cholerae*

V.cholerae har to kromosomer av ulik størrelse. Det vil dermed være forskjell i varigheten på periodene med DNA replikasjon hos *chrI* og *chrII*, heretter kalt henholdsvis C_I og C_{II} . Det kan også være forskjell på lengden av B_I og B_{II} , eller D_I og D_{II} , eller begge. Under forutsetning av at perioden C_{II} finner sted samtidig som C_I vil cellesyklusfasene B, C og D være identiske med B_I , C_I og D_I .

Celler uten overlappende replikasjonsykluser

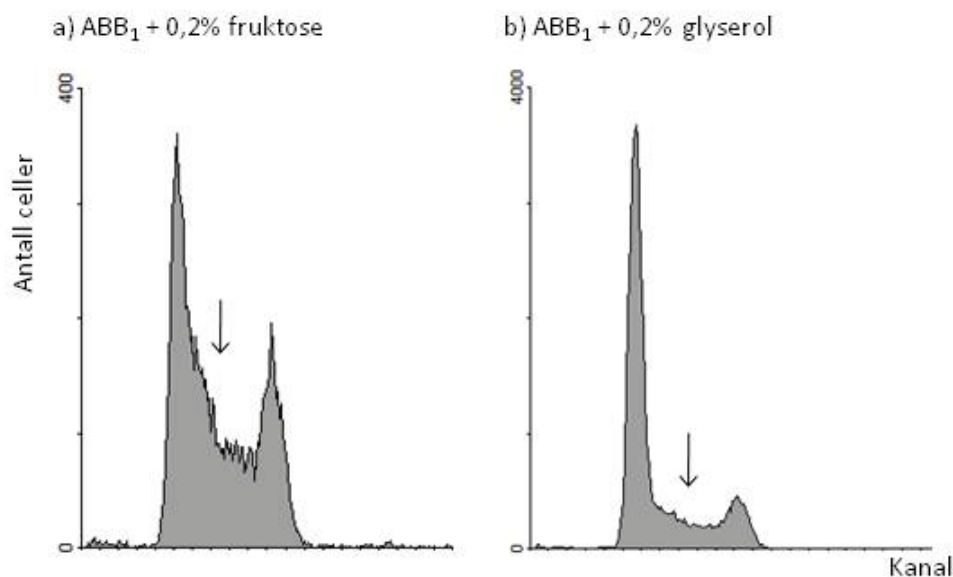
Hos kulturene av *V.cholerae* dyrket i ABB_1 medium supplementert med glyserol eller fruktose overlappet ikke generasjonene. Dette vil si at $(C+D) < \tau$. For disse cellene ble først fordelingen i syklus funnet for de eksponentielt voksende prøvene.

For ulike modeller av cellekinetikken ble det laget teoretiske histogram av DNA innholdet i kulturene. Dette ble gjort med et Excel-basert program som er laget for celler med to kromosomer av ulik størrelse (Rasmussen *et al*, 2007). Forskjellen i initieringstidspunkt mellom *chrI* og *chrII* kan velges, og ble her for eksempel satt lik null for modellen med initieringssynkroni. Dobblingstiden holdes fast, mens andelen celler i B, C og D fase kan itereres fram til avviket mellom dette teoretiske histogrammet og det eksperimentelle er minst mulig. Avviket gis kvantitativt, og er beregnet på grunnlag av avstanden mellom datapunktene og simuleringen. I figur 3-7 er det vist en simulering for en kultur, sammen med eksperimentelle verdier i de lilla punktene.



Figur 3-7. Tilpasning av eksperimentelt DNA histogram, vist med lilla punkter, og en teoretisk cellyklusfordeling. Prøven er *V.cholerae* dyrket i $ABB_1 + 0,2\%$ fruktose. Kromosomene er her satt til å terminere replikasjon samtidig.

Det ble sett på de to tidligere foreslåtte modellene for syklus, termineringssynkroni og initieringssynkroni (figur 2-8), men i tillegg også en ny modell. Ved bruk av denne nye modellen ble det startet med å anslå "hoppkanten" i C-fase på det eksperimentelle histogrammet (se figur 3-8 for illustrasjon på dette). Kanten indikerer at raten av DNA replikasjon øker, og at cellene går fra å inneholde to til fire gafler. Dette var vanskeligst å gjøre for cellene dyrket i mediet supplementert med glyserol siden disse vokste saktere, og andelen i C-fase dermed var mindre. Initiering av *chrII* ble satt til å skje ved denne kanten. Replikasjonen av dette kromosomet vil dermed avsluttes før replikasjonen av *chrI* er fullført.



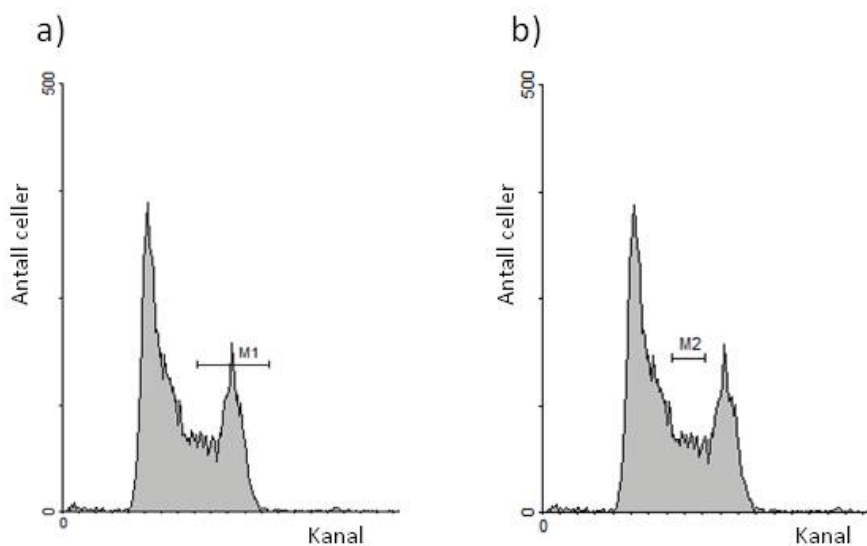
Figur 3-8. *V.cholerae* dyrket i minimal medium. Pilene indikerer "hoppkanten" der replikasjonsraten tilsynelatende øker.

Andelen celler i C-fase som replikerer kun det ene kromosomet (*chrI* er i C_I og *chrII* er i B_{II}) må så skilles fra den andelen som replikerer begge kromosomer (*chrI* er i C_I og *chrII* er i C_{II}). Fra programmet benyttet til simuleringene kan kun den totale andelen i C-fase leses direkte ut. For å skille andelene er det i denne oppgaven dermed laget tre alternative metoder som avhenger av sammenhengen mellom initieringen av replikasjon hos kromosomene.

Hvis man antar termineringssynkroni kan det regnes ut hvilken kanal i DNA histogrammet C_{II} starter i. Varigheten av C-fase målt i kanaler, altså avstanden mellom B-fase toppen og D-fase toppen, er videre betegnet $k(C_I)$. Med programmet WinMDI finner man $k(C_I)$, og fyller denne inn i formel 3-5. Her er $l(chrI)$ og $l(chrII)$ størrelsen av henholdsvis det store og lille kromosomet hos *V.cholerae*. Antall kanaler der begge kromosomene replikerer, $k(C_{II})$, trekkes så fra sluttkanalen av C. Andelen celler mellom den resulterende kanalen og høyre ytterkant finnes ved å sette en gate i WinMDI. Dette er vist i figur 3-9a som intervallet M1. Andelen celler i D-fase trekkes fra M1 for dermed å finne andelen som replikerer begge kromosomer.

$$k(C_{II}) = \frac{l(\text{chr}_{II})}{l(\text{chr}_I)} k(C_I) \approx 0,36k(C_I) \quad \text{Formel 3-5}$$

For modellen der initiering av *chrII* starter ved "hoppkanten" må andelen som replikerer begge kromosomer beregnes med en annen metode. Uavhengig av om det foreligger termineringssynkroni kan antallet kanaler C_{II} strekker seg over, $k(C_{II})$, beregnes ved formel 3-5. Dette er kun forutsatt at replikasjonsratene er like og at ikke C_{II} slutter etter C_I . Når man vet hvilken kanal hoppkanten ligger i, kan en finne andelen celler fra denne kanalen og $k(C_{II})$ kanaler videre med programmet WinMDI. Dette er illustrert som intervallet M2 i figur 3-9b.



Figur 3-9. Eksponentielt voksende *V.cholerae* celler dyrket i $ABB_1 + 0,2\%$ fruktose. Intervallene M1 og M2 starter der det antas at initiering av *chrII* finner sted. a) For termineringssynkroni scenarioet trekkes andelen D-fase celler fra M1 for å finne andelen celler der begge kromosomene replikeres. b) Her gir M2 denne andelen uavhengig av om *chrII* avslutter replikasjon samtidig med *chrI*.

Replikasjonsratene til kromosomene er satt til å være identiske i det hittil benyttede to-kromosom-programmet (Rasmussen *et al*, 2007). Dette programmet ble under arbeidet med denne oppgaven også redigert slik at disse ratene kunne endres. En simulering der replikasjonen av *chrII* både startet ved hoppkanten, og i tillegg terminerte samtidig med *chrI* kunne da foretas. Andelen celler som replikerer begge kromosomer ble funnet tilsvarende som for termineringssynkroni-modellen, bortsett fra at kanalen C_{II} starter i (venstre ende av intervallet M1 i figur 3-9a) nå ble satt lik hoppkanten.

Andelen celler med fire gafler er den samme som har replikasjon av begge kromosomene. Ved å trekke denne fra den totale C-fase andelen, får man de som kun replikerer ved to gafler. Cellene i B- fase og D-fase skal ikke inneholde gafler.

Celler med overlappende replikasjonszykluser

Når replikasjonszyklusene ikke overlappet ble det benyttet to programmer for å simulere cellyklusfordelingen. Disse kan ikke lenger brukes når prøvene blir dyrket i rikere medium og generasjonene overlapper, slik tilfellet er for *V.cholerae* kulturer som får vokse i LB (Luria Broth, se appendiks A for oppskrift).

Cellyklusfordelingen i populasjonene er anslått ved kvalitativt å tilpasse teoretiske fordelinger til DNA histogrammene funnet med flowcytometri. Det er her flere parametre som kan varieres, som varigheten på C_I og C_{II} periodene og D_I og D_{II} periodene. Man kan også se på ulike modeller for når *chrI* og *chrII* terminerer replikasjon av DNA i forhold til hverandre. Dobblingstiden er igjen beregnet ved OD-målingene.

For en modell av cellyklus kan det teoretiske DNA innholdet ved ulike punkter finnes, tilsvarende som for *E.coli* celler (se figur 3-5), bortsett fra at to kromosomer nå må tas med i beregningen. Dette må gjøres separat for hver nye modell ved å se på antallet hele kromosomer, og hvor langt de påbegynte er kommet i replikasjonen. Det kan derfor ikke gis en generell formel, men beregningene for hver modell som blir presentert finnes i appendiks C. Ved bruk av aldersfordelingen (formel 3-4) kan andelen celler i hvert intervall beregnes, og dermed får man også gaffelfordelingene.

3.7 SDS-Page og Western blotting

For å bestemme hvilke proteiner det primære antistoffet bindes til kan metodene SDS-Page (SDS-polyakrylamid-gel elektroforese) og Western blotting benyttes. Se appendiks A for protokoller.

Fra en cellekultur i eksponentiell vekst tas det prøver som tilsettes SDS (sodium dodecyl sulfate) og β -mercapto-ethanol og varmes opp. I sin naturlige tilstand har proteiner en tredimensjonal struktur og varierende ladning. SDS er kraftig elektronegativt og vil binde seg til og rette ut proteinene, hjulpet av β -mercapto-ethanol som bryter disulfid broer mellom ulike aminosyrer. Proteinprøvene helles deretter i brønner på en elektroforese-gel som

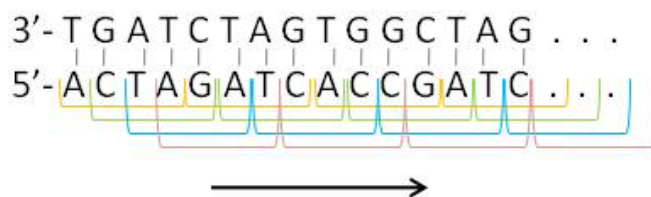
innholder en matrise av polyakrylamid. Så påføres det en spenning over gelen og de ikke-foldede proteinene vil da migrere gjennom gelen mot den positive polen. Selv om de lengste kjedene har størst ladning vil de hindres mer i polyakrylamidmatrisen, og de minste proteinene vil dermed vandre lengst fra startpunktet.

Proteinene i gelen kan så overføres til en membran og inkuberes med det primære antistoffet. Etterpå tilføres det et sekundært antistoff bundet med alkalisk-fosfatase. Membranen dekkes med et substrat som vil emittere fluorescens i nærvær av dette enzymet, og det blir tatt bilder med et CCD kamera. Det finnes også andre metoder for å visualisere hvor det primære antistoffet er bundet.

I en brønn tilsettes det kun en markør som inneholder proteiner av kjent størrelse. Ved å sammenlikne med denne kolonnen kan størrelsen på proteinene i prøven fastslås. Størrelsen vil for proteiner bety molekylvekten, og denne måles i dalton (Da).

3.8 Fordeling av GATC seter

Det ble under arbeidet med oppgaven skrevet et program som finner alle GATC sekvensbiter hos et vilkårlig kromosom. Programmet, kalt "gatcseter", laster inn en gitt tekstfil med DNA sekvensen til kromosomet og går gjennom alle leserammer i 5' til 3' retningen, som vist i figur 3-10. Posisjonen til eventuelle GATC seter lagres underveis. For et vindu på 10000 baser summeres så antallet seter opp, og disse summene skrives ut til fil. Størrelsen på dette vinduet kan lett endres.



Figur 3-10. Leserammene til programmet "gatcseter" som finner alle forekomster av basekombinasjonen GATC langs en DNA sekvens.

DNA sekvensene til *E.coli* og de to kromosomene til *V.cholerae* er hentet fra nettsiden til NCBI (National Center for Biotechnology Information). Accession numrene er AE003852

og AE003853 for henholdsvis *chrI* og *chrII* hos *V.cholerae* (Heidelberg *et al*, 2000). For stammen MG1655 av *E.coli* er det NC_000913 (Blattner *et al*, 1997).

For å identifisere par av GATC seter med en viss avstand mellom, ble det skrevet et program til, kalt ”gatcsetepar”. Dette er tidligere gjort for *E.coli* bakterier, og de godkjente avstandene mellom parene ble i samsvar med dette satt til 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 29, 30 eller 31 baser (Brendler *et al*, 2000). Avstanden måles fra G’en i det første paret, til og med G’en i det andre. For eksempel ville avstanden mellom de to setene i sekvensbiten i figur 3-10 blitt satt til 7.

Programmene ”gatcseter” og ”gatcsetepar” er skrevet i Java, og vedlagt i appendiks B.

4. Resultater og analyse

Målet med denne oppgaven var primært å undersøke samlokaliseringen av replikasjongsafiler i *V.cholerae*, og eventuelle endringer i denne under ulike vekstbetingelser. For å kunne bestemme dette ble det først beregnet mønstre for cellyklus, disse gir så gaffeldistribusjonene. Det ble også tatt opp fordelinger av SeqA fokus fra cellene. Disse metodene er godt etablert for kulturer av *E.coli*, noe som gjorde det naturlig å starte med tilsvarende forsøk på disse bakteriene. Resultatene kan da sammenlignes med tall fra tidligere artikler.

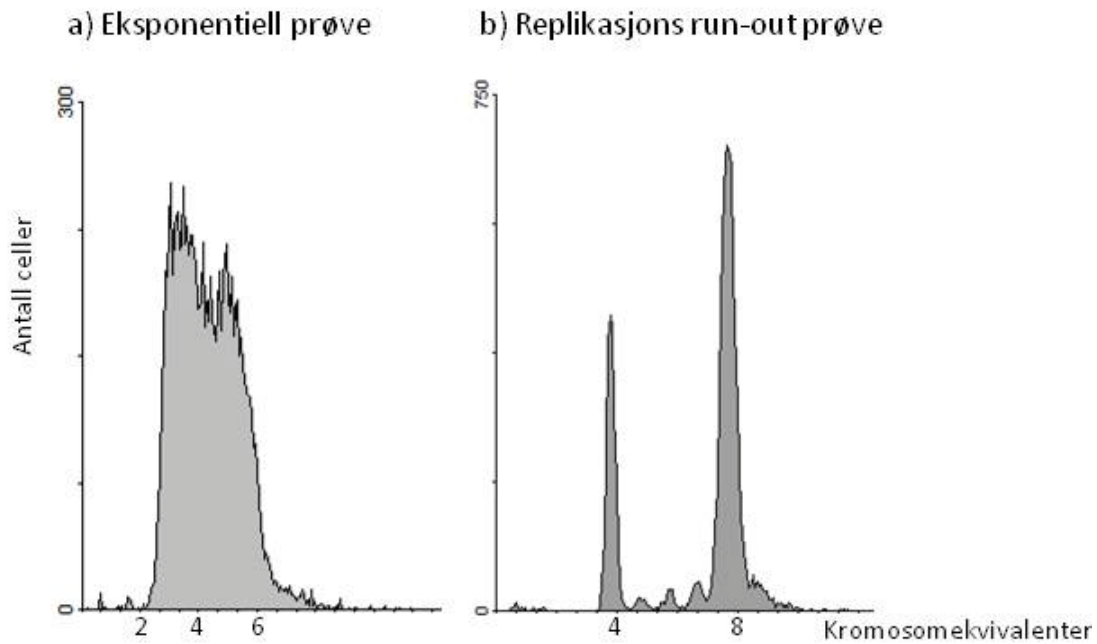
4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli bakterier av stammen MG1655 ble dyrket i mediet ABB₁ supplementert med 0,5% CAA, 0,2% glukose og 20µg/ml uracil (se kapittel 3.2). Når alle cellene var i eksponentiell vekst ble det fiksert prøver av kulturene. De ble da også tilsatt rifampicin og cephalixin som gir replikasjons run-out før ny prøvetaking. Detaljene rundt dette er beskrevet i kapittel 3.3. Doblingsiden for kulturene lå på rundt 27 minutter.

Det ble foretatt tre uavhengige forsøk hvor både veksten og videre prosedyrer ble utført separat for hvert enkelt.

Replikasjonsgaffelfordeling

For å finne gaffelfordelingen i cellene ble histogrammene av DNA innholdet, som er funnet med flowcytometri, analysert. Prøver fra både eksponentielle og replikasjons run-out kulturer ble farget med Hoechst 33258 (se kapittel 3.4.1). Dette er et fluorokrom som inngår i en likevektsbinding med DNA, hvis fordeling i prøvene dermed kan måles med et flowcytometer (kapittel 3.4.2, 3.4.3). I figur 4-1 er det som eksempel vist histogrammene denne metoden ga for forsøk nr 2. I appendiks D er det vist DNA-histogrammer for alle tre forsøk.



Figur 4-1. DNA fordeling hos E.coli celler dyrket i minimal medium supplementert med glukose og CAA. I a) er den eksponentielle prøven vist og i b) prøven etter replikasjons run-out. Histogrammene er tatt opp med et LSR II flowcytometer fra Becton Dickinson.

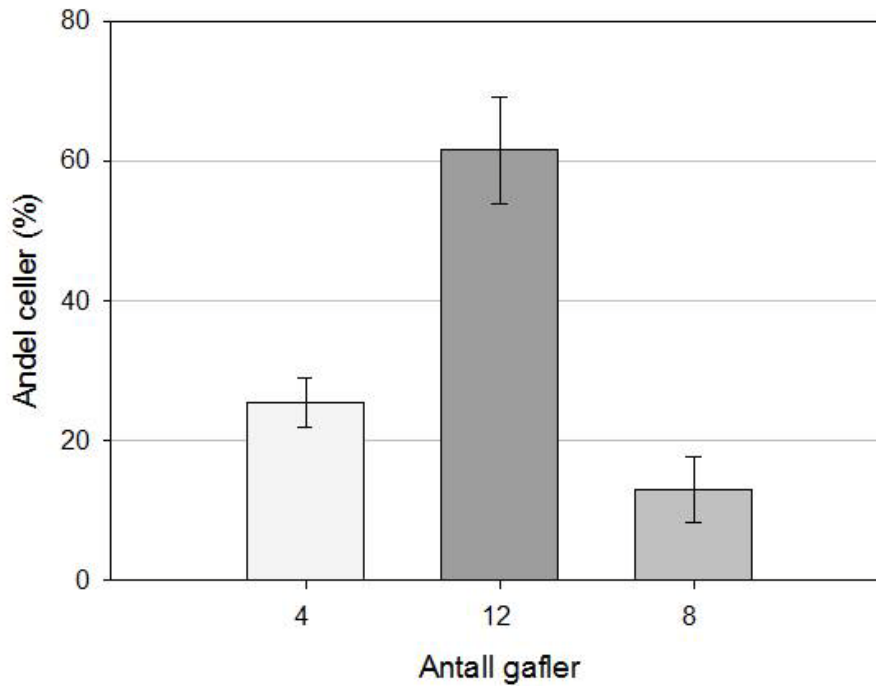
For hvert forsøk ble så den beste cellesyklustilpasningen beregnet som forklart i kapittel 3.6.1. Parametrene som ble funnet for hvert forsøk er gitt i tabell C-1 i appendiks C. På grunnlag av alle forsøkene ble det funnet en modell for replikasjonsmønsteret hos disse hurtigvoksende *E.coli* cellene. C-fase ble beregnet å strekke seg fra bestemor- til morgenerasjonen, en illustrasjon av modellen er vist i figur 4-2.



Figur 4-2. Modell for cellesyklus hos villtype *E.coli* celler dyrket i minimal medium tilsatt glukose og CAA. Man ser at C-fase startes i bestemorgenerasjonen og avsluttes i morgenerasjonen. Tidene der initiering og terminering finner sted, etter celledeling ved tid 0, er gitt ved henholdsvis a_i og a_t . Nederst er antallet gafler i de ulike intervallene talt opp.

På grunnlag av modellen for cellesyklus kan så fordelingen av gafler i cellene finnes. Andelen med fire gafler ble funnet fra replikasjons run-out prøven. Dette er de samme cellene som der ender opp med fire hele kromosomer siden de inneholder fire kopier av *oriC*. Cellene som inneholder 8 og 12 gafler har åtte *oriC* (se for eksempel figur 4-2) og finnes som celler med åtte hele kromosomer etter replikasjons run-out. For å skille andelene med 8 og 12 gafler ble det integrert over ulike intervaller av aldersfordelingen (formel 3-4) som beskrevet i kapittel 3.6.1.

Den gjennomsnittlige gaffelfordelingen er gitt i et stolpediagram i figur 4-3, og fordelingene for hvert enkelt forsøk er listet i tabell C-2. Det var totalt nesten 62% av cellene i kulturene som inneholdt 12 gafler. Andelen med 4 gafler lå på litt over 25%, og det var ca 13% av cellene som hadde 8 gafler. Totalt lå gjennomsnittet på 9,5 gafler per celle.



Figur 4-3. Gaffelfordeling hos villtype *E.coli* celler dyrket i minimal medium med glukose og CAA. Gjennomsnittet er tatt etter tre forsøk og det er indikert ett standardavvik i hver retning.

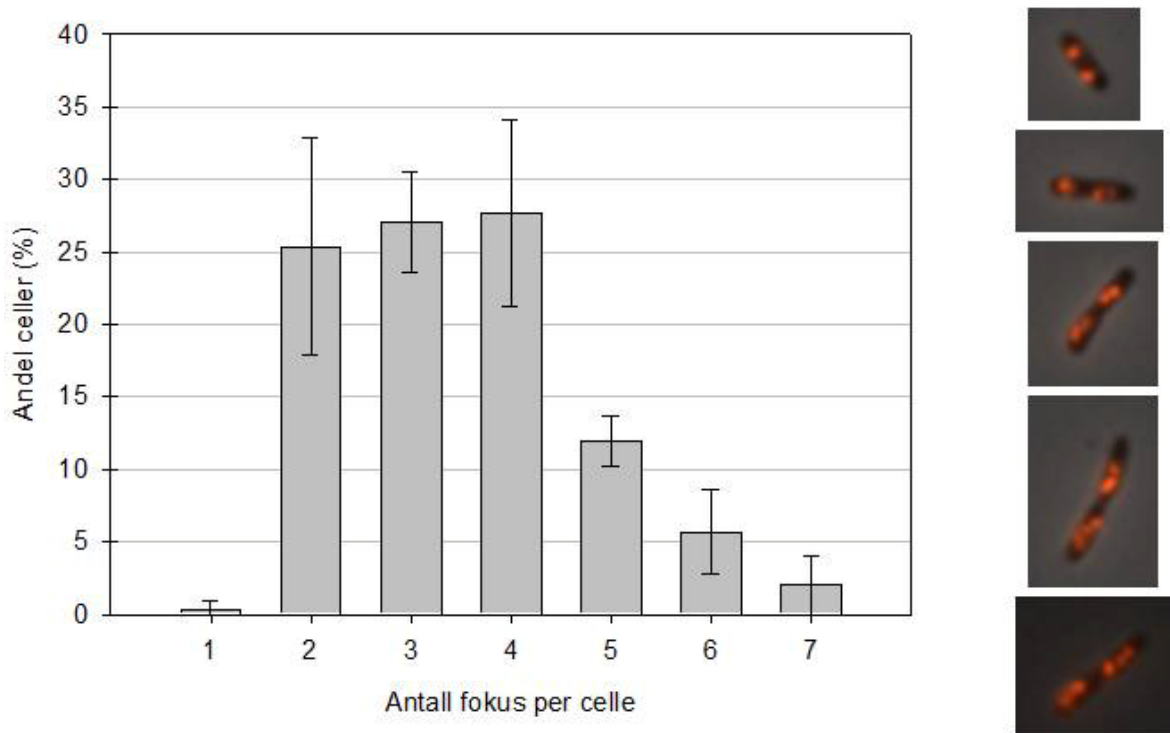
SeqA fokusfordeling

I henhold til metodene beskrevet i kapittel 3.5.1, 3.5.3 og 3.5.4 ble celler fra de eksponentielle prøvene immunmerket med anti-SeqA og studert i mikroskopet. Hvert fokus representerer en lokalisasjon i cellen der det finnes en eller flere replikasjongs-gafler (se kapittel 2.4).

Tabell 4-1. Fordeling av fokus hos *E.coli* dyrket i supplementert ABB_1 medium.

	Antall celler	Andel med indikert antall fokus per celle							Gjennomsnittlig antall fokus per celle
		1	2	3	4	5	6	7	
Forsøk nr 1	114	1%	18%	31%	23%	14%	9%	4%	3,74
Forsøk nr 2	223	0%	33%	25%	25%	11%	4%	2%	3,34
Forsøk nr 3	194	0%	25%	25%	35%	11%	4%	0%	3,44

I tabell 4-1 er fordelingen av SeqA fokus hos celler fra de ulike forsøkene gitt. I alle tre er det flest celler som inneholder to, tre eller fire fokus, men det er også små innbyrdes variasjoner i disse andelene. Siden doblingstidene var nesten identiske (27, 26 og 27 minutter) skyldes nok ikke variasjonene forskjeller i replikasjonsmønsteret. Det gjennomsnittlige antall fokus per celle er ganske likt. I figur 4-4a er det vist et stolpediagram med snittet av andelene fokus per celle i forsøkene.

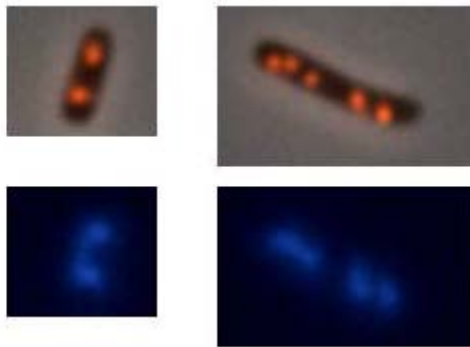


Figur 4-4. I a) vises et stolpediagram over fordelingen av antall fokus per celle for *E.coli* dyrket i supplementert ABB_1 medium. Det er tatt gjennomsnitt av forsøkene og standardavvikene er indikert med barer. I b) er det gjengitt bilder av celler talt til å ha fra 2 til 6 fokus.

Fra fordelingen ser man at rundt 80% av cellene inneholder fra to til fire fokus. De resterende er talt til å ha flere enn dette, helt opp til syv fokus. Det ble ikke funnet noen celler uten fokus, og kun en ikke-signifikant minimal andel med ett. Gjennomsnittlig antall fokus per celle var 3,5.

Det ble kvalitativt vurdert til at det var en røff sammenheng mellom antall fokus og lengden på cellene. Det ble kun observert to fokus hos celler i den nedre del av lengdeskalaen. Bredden var omtrent den samme for alle cellene.

Fokusene er hovedsakelig lokalisert rundt en av to posisjoner, en ved $\frac{1}{4}$ av cellens lengde og en ved $\frac{3}{4}$ av lengden. De av cellene som inneholder flere enn to fokus har disse jevnt fordelt mellom begge de to posisjonene. Fokusene i hver gruppe sitter tett samlet. Dette er i overensstemmelse med observasjoner i tidligere kvantitative forsøk der det er benyttet hurtigvoksende villtype *E.coli* celler (Hiraga *et al*, 1998; Onogi *et al*, 1999; Molina og Skarstad, 2004). Fra bilder tatt av DNA fordelingen i cellene ser man at DNA også hovedsakelig er konsentrert rundt midten av hver halvdel i cellene (se figur 4-5). Hos de lengste cellene kan DNA også tolkes å være fordelt på fire områder, to i hver halvdel.



Figur 4-5. Øverst er det vist to fasekontrastbilder av E.coli under hurtig vekst, der de fluorescerende SeqA fokusene er lagt på i rødt. Under er de tilhørende bildene av DNA i cellene.

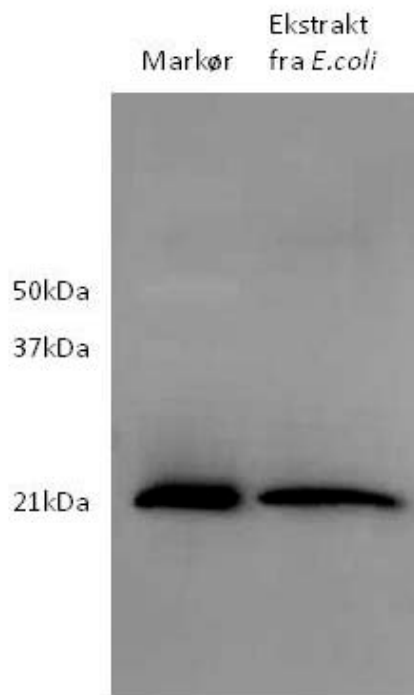
En viss andel av cellene ble vurdert til å ha for uklare fokus til at de kunne telles. Årsaken til dette kan være fargingen eller forstyrrelser når bildene ble tatt. Andelen sank utover i forsøksrekken, fra 16% i det første, til 5% i det siste forsøket. Dette indikerer at den avtar for en økende grad av trening på prosedyrene, og er altså metoderelatert. Gjennomsnittlig lå denne andelen på ca 8%. Celler hvor septumformasjonen var i gang ble ansett som en celle helt til de to dattercellene var tydelig separert.

Ut fra resultatene for antall replikasjons-gafler per celle (figur 4-3) og antall SeqA fokus per celle (figur 4-4), kan det se ut som det eksisterer en samlokalisering av gafler i disse cellene. Dette er i overensstemmelse med tilsvarende resultater funnet for hurtigvoksende *E.coli* (Molina og Skarstad, 2004).

Binding av antistoff

Det ble gjort forsøk for å undersøke hvilke proteiner i *E.coli* cellene det primære antistoffet bindes til. Celler i eksponentiell vekst ble lysert og proteinet de inneholdt ble deretter samlet opp. Dette ekstraktet ble separert etter størrelse med SDS-Page og overført til en membran. Membranen ble inkubert med antistoffet og bindingsstedene ble visualisert (se kapittel 3.7). I gelen ble det også lastet en annen brønn med en kjent standard for å kunne fastslå størrelsen på proteinene som antistoffet bandt til. I denne brønnen ble det i tillegg lastet rensed SeqA fra *E.coli*, dette proteinet har en molekylvekt på 21 kDa.

I figur 4-6 er resultatet fra et av Western blottene vist. Man kan se at antistoffet binder kraftig til det rensede SeqA proteinet i feltet fra brønnen med markøren. I feltet til høyre er det lastet 5µg med ekstrakt fra *E.coli* cellene forsøkene er utført på. Også her er det et kraftig bånd ved 21kDa, antistoffet binder altså til SeqA protein fra prøvene. Det er minimalt av binding til andre proteiner i cellene.



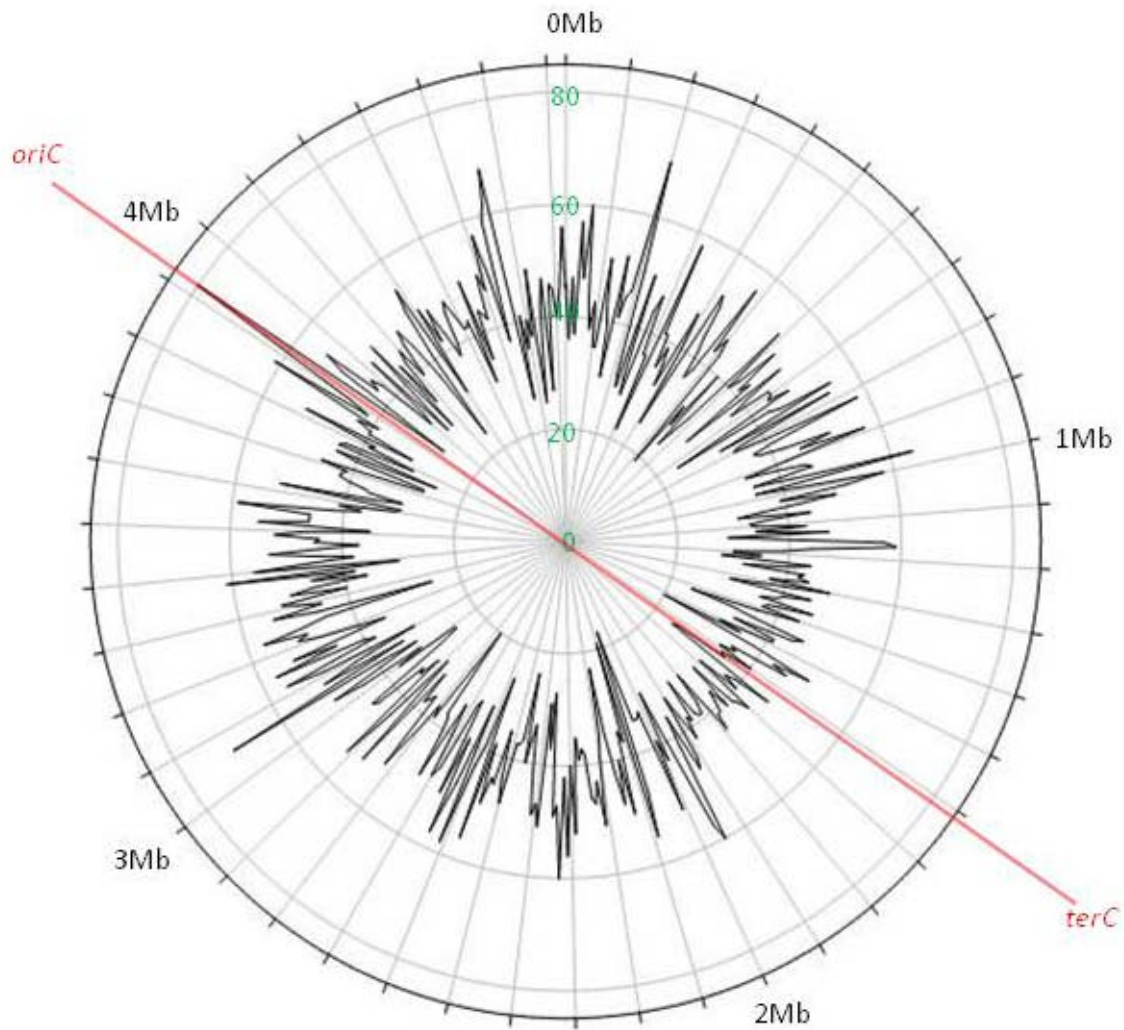
*Figur 4-6. Binding av antistoff. I den venstre brønnen er det lastet en markør og rensed SeqA protein. Båndet fra markøren ved 50kDa kan så vidt skimtes i hvitt. Den høyre brønnen er lastet med 5µg proteinekstrakt fra hurtigvoksende *E.coli* celler. Binding av antistoff vises som sorte bånd.*

Fordeling av GATC seter

Proteinet SeqA binder seg til GATC seter på hemimetylert, og til en viss grad fullt metylert, DNA. For at SeqA skal fungere som en merkelapp for replikasjonskompleksene i cellen må det være GATC sekvenser jevnt fordelt langs hele kromosomet.

Under arbeidet med denne oppgaven ble det skrevet et program som identifiserer alle GATC seter langs en DNA sekvens. Dessuten blir alle GATC seter innenfor fortløpende intervaller på 10000 baser lagret med tilhørende intervalls posisjon på kromosomet. Se kapittel 3.8 for detaljer. Sekvensen til genomet til *E.coli* stammen MG1655 ble funnet på nettsidene til NCBI (Blattner *et al*, 1997).

I figur 4-7 er det vist et sirkeldiagram over fordelingen av GATC seter per 10kb langs kromosomet. Vinduet som går fra posisjon $392 * 10kb$ til $393 * 10kb$ inneholder *oriC* og har hele 80 GATC seter. Ingen av de 464 vinduene inneholder mindre enn 18 GATC seter og det med nest flest har 70 seter. Totalt ble det funnet litt over 19000 GATC seter langs hele kromosomet. Fra figur 4-7 kan man se at det er litt færre seter i området rundt *terC*. Disse resultatene er i overensstemmelse med tilsvarende gjort for det ufullstendige genomet til *E.coli* (Henaut *et al*, 1996).



Figur 4-7. Sirkeldiagram over fordelingen av GATC-seter langs kromosomet til villtype *E.coli*, stamme MG1655. Her er først antallet GATC sekvenser innenfor intervaller på 10000 baser funnet med programmet "gatcseter". Den angulære aksene viser intervallenes posisjon på kromosomet, og den radielle aksene intervallets innhold av GATC seter. Antallet seter øker lineært ut fra sentrum, og på de radielle hovedaksene er tilhørende antall GATC seter gitt i grønt. Den røde streken, som deler kromosomet i to, krysser gjennom *oriC* og *terC*.

4.2 *Vibrio cholerae*

Den ikke-patogene stammen *Vibrio cholerae* 2740-80 ble i denne oppgaven dyrket i tre ulike vekstmedier (se kapittel 3.2). Minimal mediet ABB₁ med 0,2% fruktose eller glyserol, ga cellekulturer kalt henholdsvis ”saktevoksende” og ”svært saktevoksende” i de kommende delkapitlene. Kulturer dyrket i LB er kalt ”hurtigvoksende”. Forskjellen i næringsinnhold gjorde at doblingstiden til kulturene varierte fra nesten to timer til under tjue minutter. Tilsvarende som med *E.coli* ble også disse bakteriene dyrket til de var i balansert vekst, før prøver av cellene ble fiksert i etanol (se kapittel 3.3).

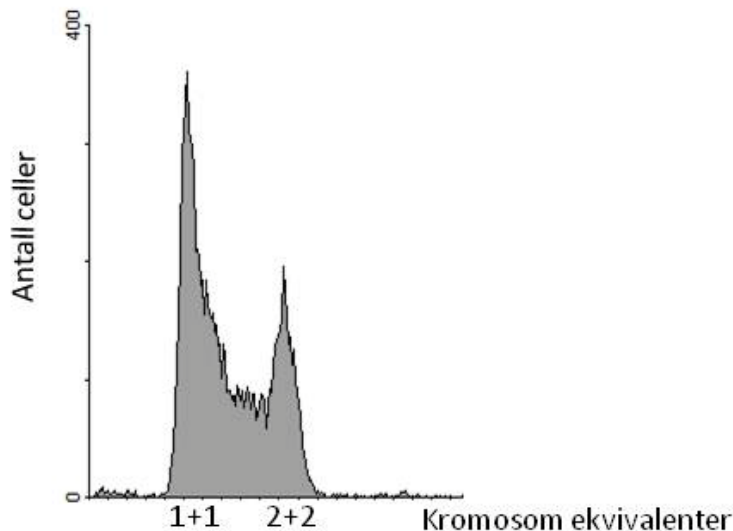
For hvert vekstmedium ble cellene dyrket uavhengig ved minst tre anledninger. For hvert av disse forsøkene ble også videre protokoller utført separat.

4.2.1 Saktevoksende celler

V.cholerae cellene ble først dyrket i ABB₁ + 0,2% fruktose ved fire uavhengige forsøk. Dette er et minimal-medium som er supplementert med karbonkilden fruktose. Doblingstiden for disse kulturene lå på 46 minutter.

Replikasjonsgaffelfordeling

For å finne fordelingen av replikasjonsgafler i populasjonen må først andelen celler i B-, C- og D-fase bestemmes. Dette ble gjort ved å simulere DNA histogram for ulike modeller for cellesyklus og vurdere overensstemmelsen med de eksperimentelle DNA histogrammene. De sistnevnte ble funnet ved flowcytometri i henhold til prosedyrene beskrevet i kapittel 3.4.1-3. I figur 4-8 er det vist et eksempel på celler i eksponentiell vekst fra ett av forsøkene. Histogram for hvert forsøk er gitt i appendiks D.

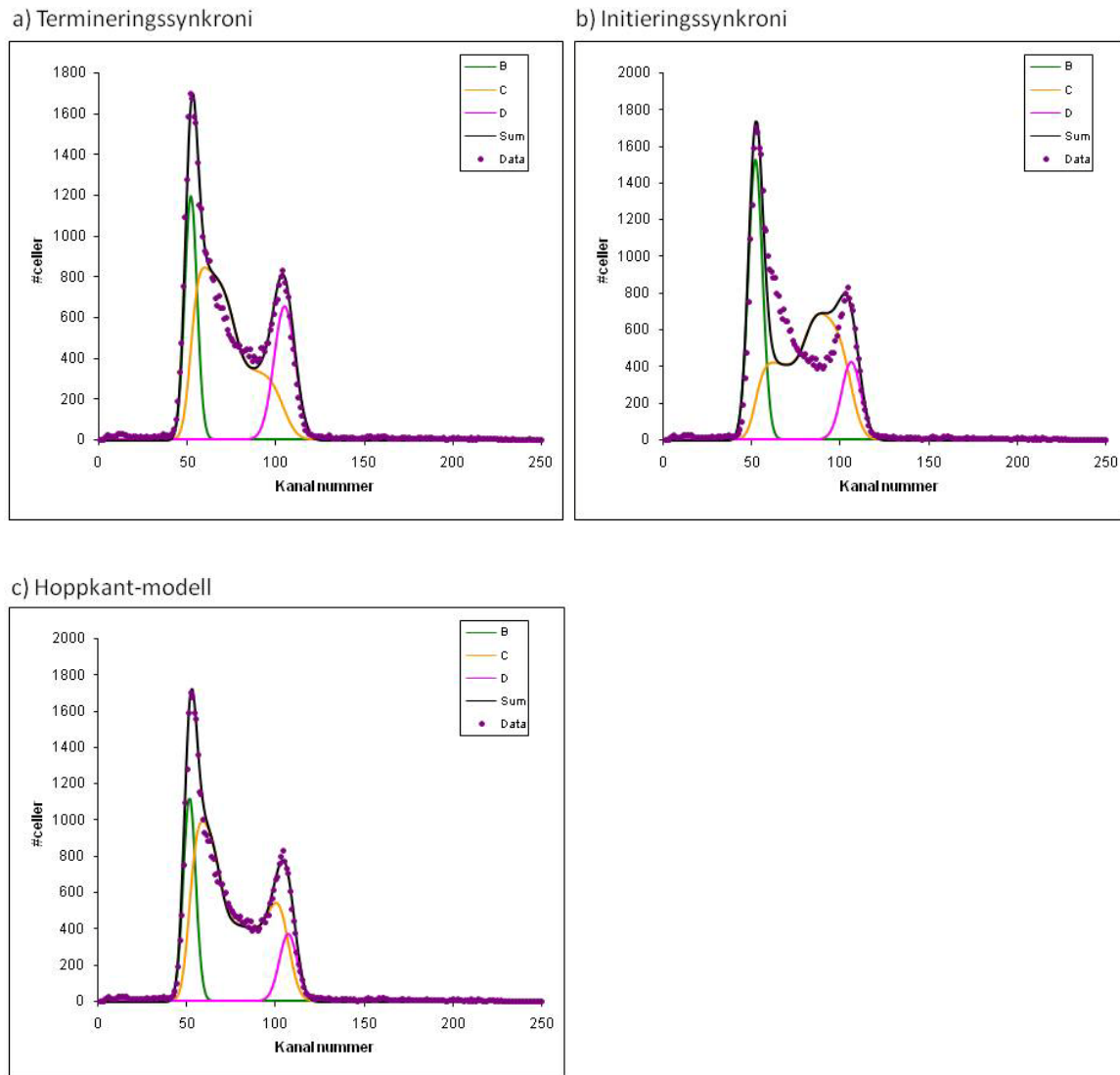


Figur 4-8. Eksponentielt voksende *V.cholerae* celler dyrket i $ABB_1 + 0,2\%$ fruktose. Kromosom ekvivalenter er gitt i antall *chrI* + antall *chrII*.

Modeller for cellyklus ble testet ved å gjøre simuleringer med to-kromosom-programmet som er beskrevet i kapittel 3.6.2 (avsnitt om celler uten overlappende generasjoner). De resulterende teoretiske histogrammene kunne så sammenlignes med de eksperimentelle DNA histogrammene. I programmet holdes doblingstiden, som er kjent fra OD-målingene, fast mens varigheten av fasene B, C og D kan endres innbyrdes. *V.cholerae* har et genom bestående av to kromosomer, *chrI* og *chrII*. For simuleringene kan det også velges når *chrII* skal initiere replikasjon i forhold til *chrI*. I litteraturen er det foreslått to modeller for cellyklus, termineringssynkroni (Rasmussen *et al*, 2007) og initieringssynkroni (Egan *et al*, 2004) av de to kromosomene. Disse er beskrevet i kapittel 2.3.1.

Hvis man studerer det eksperimentelle DNA histogrammet (figur 4-8), vil man se et punkt i C-fase der antallet celler synker brått. Dette er også indikert med en pil i figur 3-8a. Denne kanten skyldes at raten av DNA syntese i cellene stiger, altså må de gå fra å inneholde to replikasjionsgafler til fire. Dette gir grunnlag for å foreslå en tredje modell for cellyklus, hvor initiering ved *oriCII* antas å finne sted ved dette punktet. DNA mengden i punktet ble lest av fra histogrammet og ga startpunktet for *chrII* i en ny simulering med to-kromosom-programmet. Terminering av replikasjonen av *chrII* viste seg da å skje litt før *chrI*. Denne modellen for cellyklus er heretter kalt hoppkant-modellen.

I figur 4-9 er de eksperimentelle dataene fra et forsøk vist sammen med en modell for termineringssynkroni (a), en modell der cellene har initieringssynkroni (b) og hoppkant-modellen der *chrI* terminerer replikasjon litt senere enn *chrII* (c).

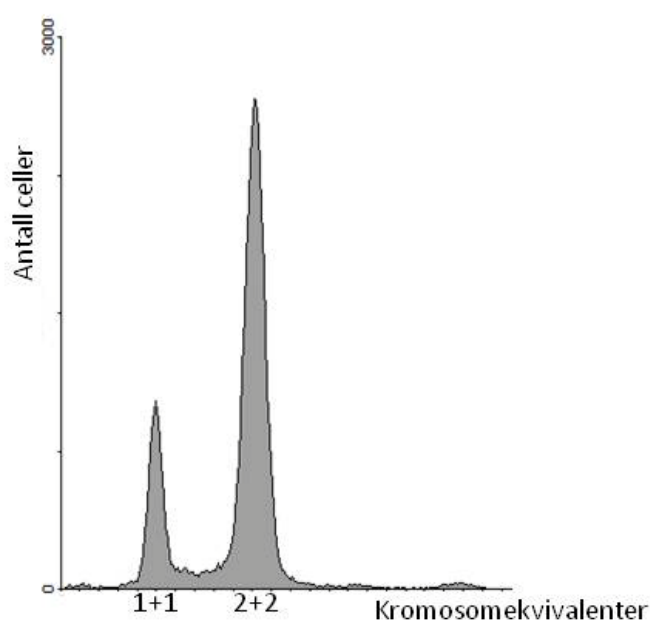


Figur 4-9. Tre ulike modeller for cellyklus hos *V.cholerae* dyrket i minimal medium supplementert med 0,2% fruktose (forsøk nr 3). I a) er det vist en tilpasning der *chrI* og *chrII* terminerer replikasjon samtidig, i b) en der de initierer samtidig, og i c) starter *chrII* replikasjon etter *chrI*, men fullfører den også før.

Ut fra tilpasningene er det tydelig at modellen med initieringssynkroni stemmer svært dårlig overens med histogrammet. Termineringssynkroni tilpasningen viser ikke store avvik fra den eksperimentelle grafen, men overensstemmelsen er like god for hoppkant-modellen der initiering av replikasjonen av *chrII* finner sted litt tidligere. Parametre for cellyklus for termineringssynkroni-modellen og hoppkant-modellen er gitt i henholdsvis tabell C-3 og

tabell C-4. Andelen i B-, C- og D-fase og varigheten av fasene for hvert forsøk kan leses ut fra programmet. Varigheten er der beregnet med bruk av aldersfordelingen (formel 3-4). Med termineringssynkroni lå andelene i B-, C- og D-fase på henholdsvis ca 21%, 59% og 20%. Tilsvarende tall er 17%, 73% og 10% med hoppkant-modellen. Økningen i C-fase andelen her skyldes at færre celler i 2+2 toppen tillegges faktisk å befinne seg i D-fase (se figur 4-9c).

I likhet med under forsøkene med *E.coli* bakterier, ble også *V.cholerae* kulturene tilsatt rifampicin og cephalaxin og dyrket videre etter at prøvene av celler i eksponentiell vekst var tatt. Dette skal gjøre at cellene ender opp med et heltallig antall kromosomer, som korresponderer til antall origin de hadde når antibiotikaene ble tilsatt (se også kapittel 3.3). Dette har vist seg å være en upålitelig metode for *V.cholerae* celler i hurtig vekst, der initiering av *oriCII* hindres senere enn *oriCI* (Rasmussen *et al*, 2007). I figur 4-10 er det vist et DNA histogram for en saktevoksende kultur tilsatt rifampicin og cephalaxin. Gjennomsnittlig var 19% av cellene i den rene 1+1 toppen, dette er omtrent likt som andelen celler i B-fase for både termineringssynkroni modellen (21%) og hoppkant-modellen (17%).

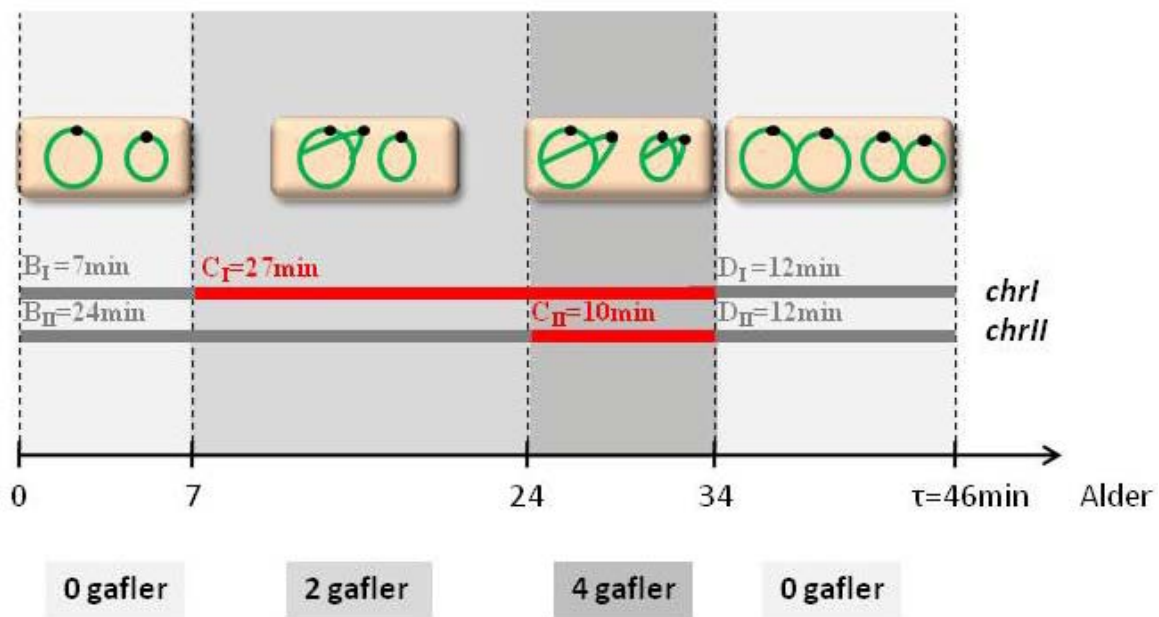


Figur 4-10. DNA histogram fra en replikasjons run-out prøve av *V.cholerae* dyrket i ABB_1 minimal medium med 0,2% fruktose.

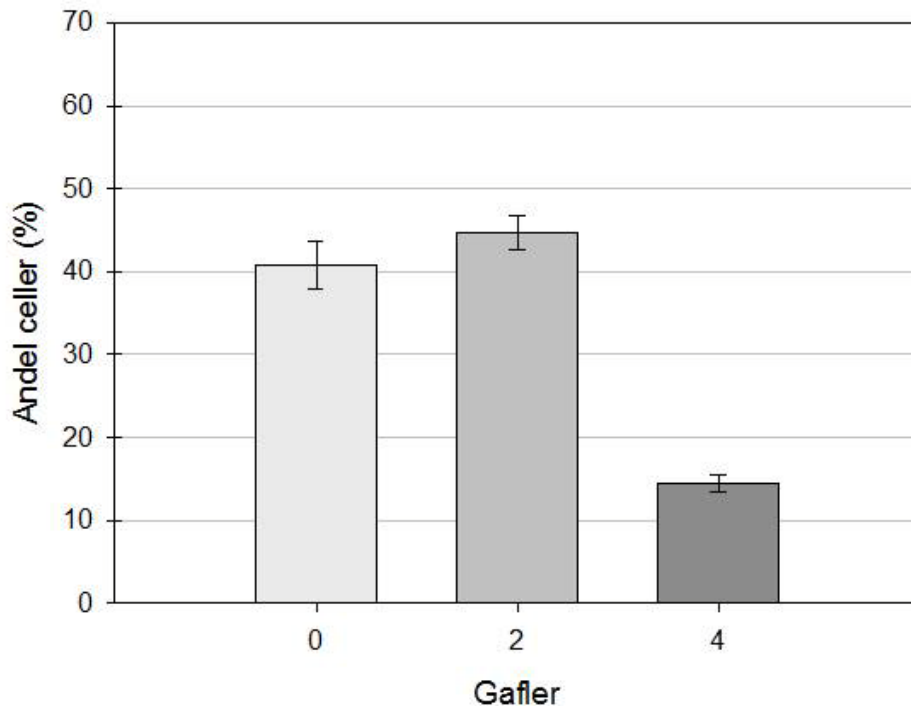
Andelen C-fase celler som inneholder to gafler (*chrI* i C_I , *chrII* i B_{II} eller D_{II}) ble så skilt fra den som inneholder fire gafler (*chrI* i C_I og *chrII* i C_{II}). Dette ble gjort forskjellig for de mest sannsynlige modellene. I samsvar med teorien om termineringssynkroni er det i

denne oppgaven utviklet en framgangsmåte for å skille andelene (se kapittel 3.6.2 om celler uten overlappende generasjoner). Resultatet ble for de fire forsøkene henholdsvis 14%, 14%, 14% og 16% med fire gafler. Ut fra dette og andelene i hver fase fra tabell C-3 er en rimelig cellesyklus for termineringssynkroni-modellen funnet. Cellesyklusen er illustrert i figur 4-11, og den tilhørende gaffelfordelingen er gitt i figur 4-12. Gjennomsnittlig antall gafler per celle er 1,5.

Termineringssynkroni



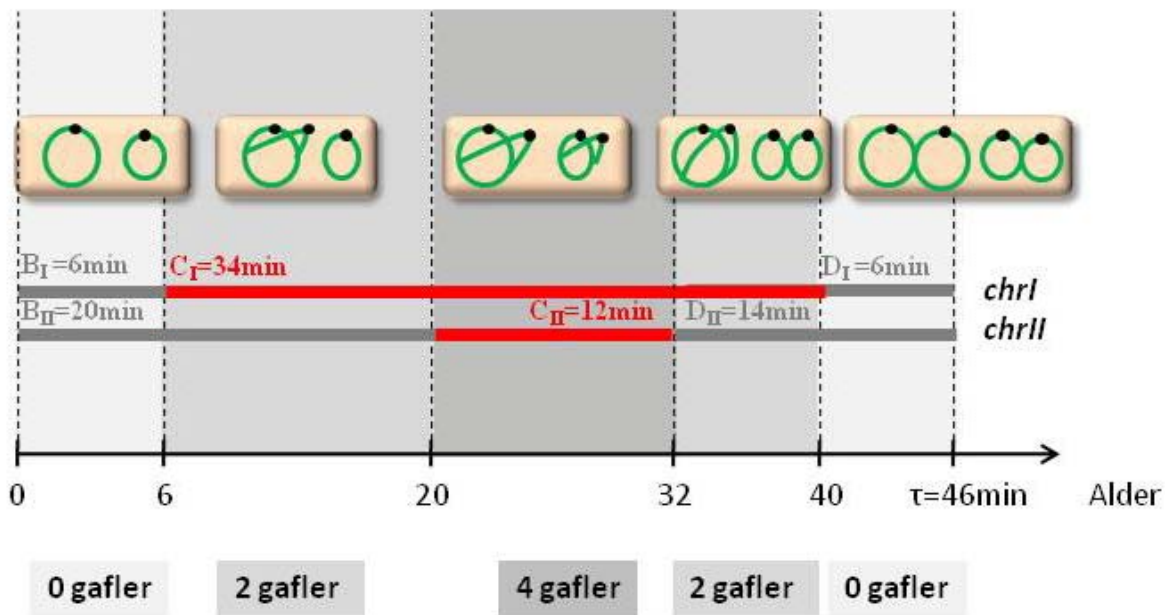
Figur 4-11. Modell for cellesyklus hos *V.cholerae* dyrket i minimal medium supplementert med 0,2% fruktose. Her er det antatt at *chrI* og *chrII* terminerer DNA replikasjon på likt. Periodene er beregnet fra gjennomsnittet av forsøkene totalt, se tabell C-3. Det er viktig å merke seg at faser er gitt for *chrI* og *chrII*, ikke for to generasjoner. Øverst er det vist kromosominnhold i representative celler for de indikerte intervallene og nederst gitt tilsvarende antall gafler.



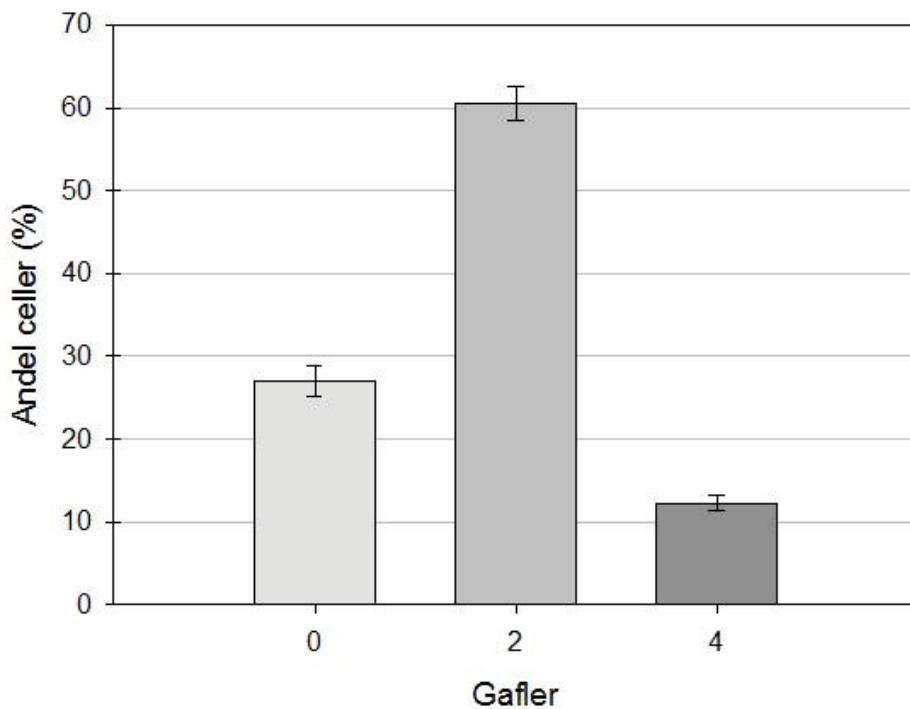
Figur 4-12. Fordeling av gafler for cellesyklus modellen vist i figur 4-11.

Det ble også gjort beregninger for å skille andelene med to og fire gafler for hoppkantmodellen hvor C_{II} sluttet før C_I . Perioden *chrI* fortsatte etter *chrII* var ferdig, ble funnet til å ha en varighet på 8 minutter. Med den andre framgangsmåten beskrevet i kapittel 3.6.2 ble andelen celler med fire gafler i de fire forsøkene funnet til å være henholdsvis 11%, 13%, 13% og 12%. Gjennomsnittlig ga dette 1,7 gafler per celle, og den totale fordelingen av gafler i kulturen er gitt i et stolpediagram i figur 4-14. Som for termineringssynkroni-modellen er det også her funnet den mest sannsynlige cellesyklusen ut fra de ulike forsøkene (tabell C-4). Denne cellesyklusen er illustrert i figur 4-13.

Hoppkant-modell



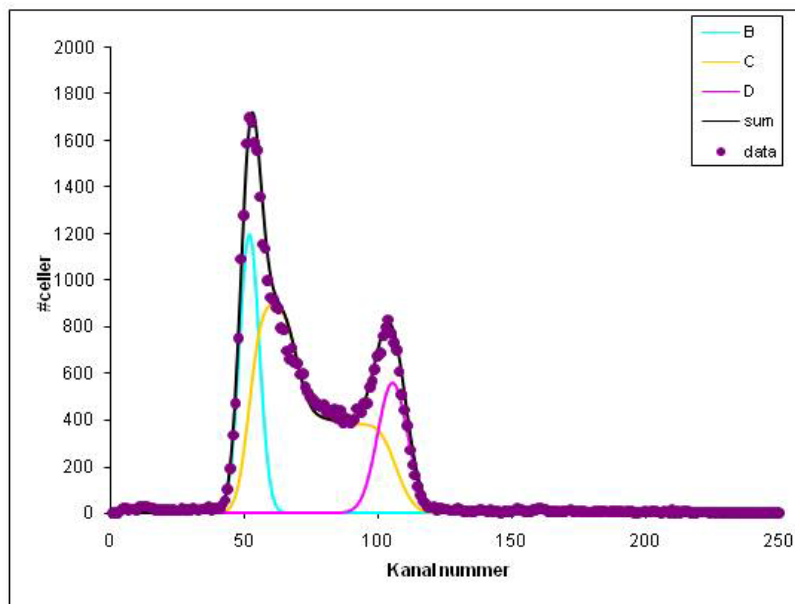
Figur 4-13. Hoppkant-modell for replikasjonsmønsteret hos *V.cholerae*, dyrket i minimal medium supplementert med 0,2% fruktose. Initiering av *chrII* i forhold til *chrI* er beregnet fra punktet der antall celler per DNA intervall faller. Terminering av replikasjon for *chrI* og *chrII* vil ikke finne sted samtidig. Varigheten av fasene er tilpasset gjennomsnittet av forsøkene totalt, se tabell C-4. Som før er det øverst vist kromosominnhold i celler gjennom syklus og nederst antall gafler for disse.



Figur 4-14. Gaffelfordeling for cellesyklus modellen illustrert i figur 4-13.

Hoppkant-modellen gir kun at 17% av cellene i C-fase er i både C_I og C_{II}, noe som er lite med tanke på at størrelsen på *chrII* er 36% av størrelsen til *chrI*. Med termineringssynkroni-modellen er tilsvarende tall ca 24%, noe som stemmer bedre siden andelene celler også minsker med alderen utover i syklus.

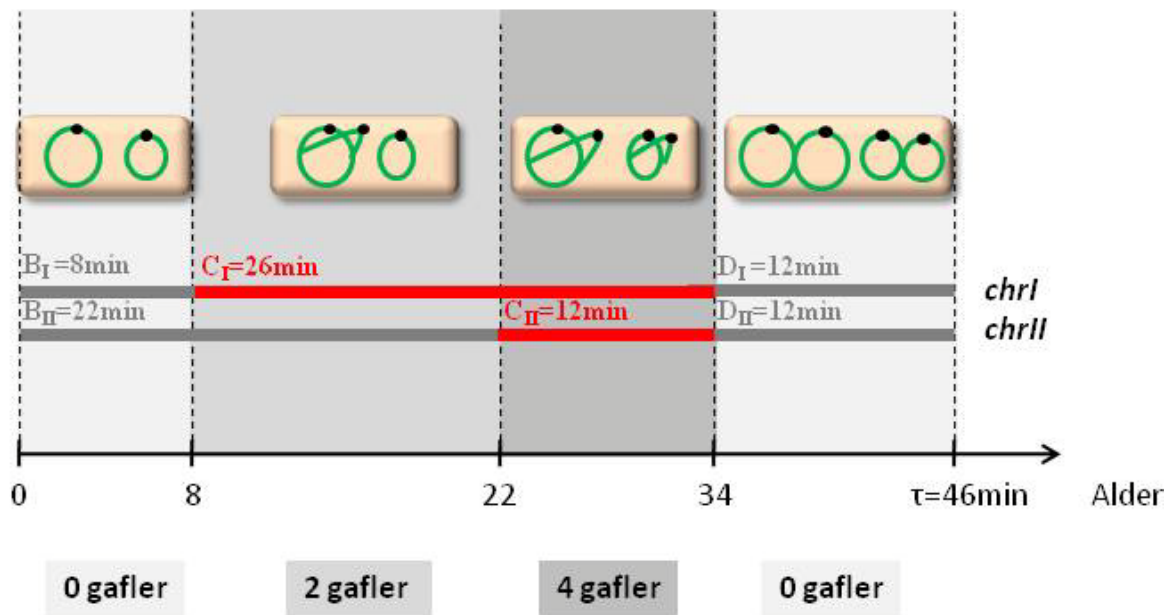
En kombinasjon av de to siste modellene ble forsøkt, der cellene både initierte fra *oriCII* ved hoppkanten og nådde *terCII* samtidig som *terCI*. For å simulere dette ble to-kromosom-programmet redigert, slik at replikasjonsraten hos *chrII* kunne settes lavere enn raten hos *chrI*. Avviket mellom de eksperimentelle dataene og det teoretiske histogrammet ble stort sett lavere for denne nye modellen enn de foregående. En simulering for denne hoppkant-modellen med termineringssynkroni er vist i figur 4-15.



Figur 4-15. Simulering for *V.cholerae* celler dyrket i minimal medium med 0,2% fruktose. Tilsvarende som i figur 4-9 er de eksperimentelle dataene vist i lilla. I modellen benyttet her initieres *chrII* ved hoppkanten, dessuten finner terminering av replikasjon sted samtidig for kromosomene.

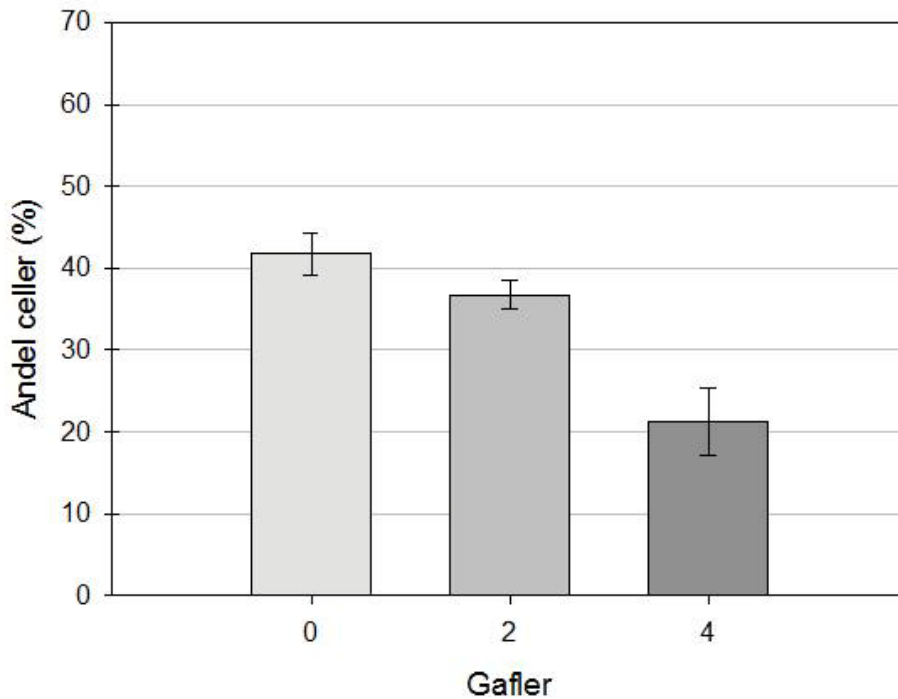
De gjennomsnittlige andelene i B- C- og D-fase ble funnet å være henholdsvis 21%, 58% og 21%. I tabell C-5 er tallene for hvert forsøk listet sammen med varigheten av fasene, som er beregnet med aldersfordelingen (formel 3-4). Andelen celler som replikerte begge kromosomene ble beregnet å ligge på gjennomsnittlig 21%. I de fire forsøkene var den 21%, 18%, 27% og 19%. Denne hoppkant-modellen med termineringssynkroni gir da at 36% av cellene i C-fase replikerer begge kromosomer. Ved å se på alle forsøkene ble det funnet en cellesyklustilpasning for denne modellen (figur 4-16).

Hoppkant-modell med termineringssynkroni



Figur 4-16. Replikasjonsmønster for *V. cholerae* celler dyrket i minimalmedium med 0,2% fruktose. Denne hoppkant-modellen med termineringssynkroni innebærer at replikasjonsraten for *chrII* blir lavere enn raten for *chrI*.

Den tilhørende gaffelfordelingen er vist i figur 4-17, og gir et gjennomsnitt på 1,6 gafler per celle. Dette tallet ligger mellom gjennomsnittene for de to andre modellene som er diskutert, noe som virker fornuftig siden C-fasen blir kortere enn for hoppkant-modellen og andelen med fire gafler større enn for termineringssynkroni-modellen.



Figur 4-17. Fordelingen av replikasjongs gafler i cellene med modellen illustrert i figur 4-16.

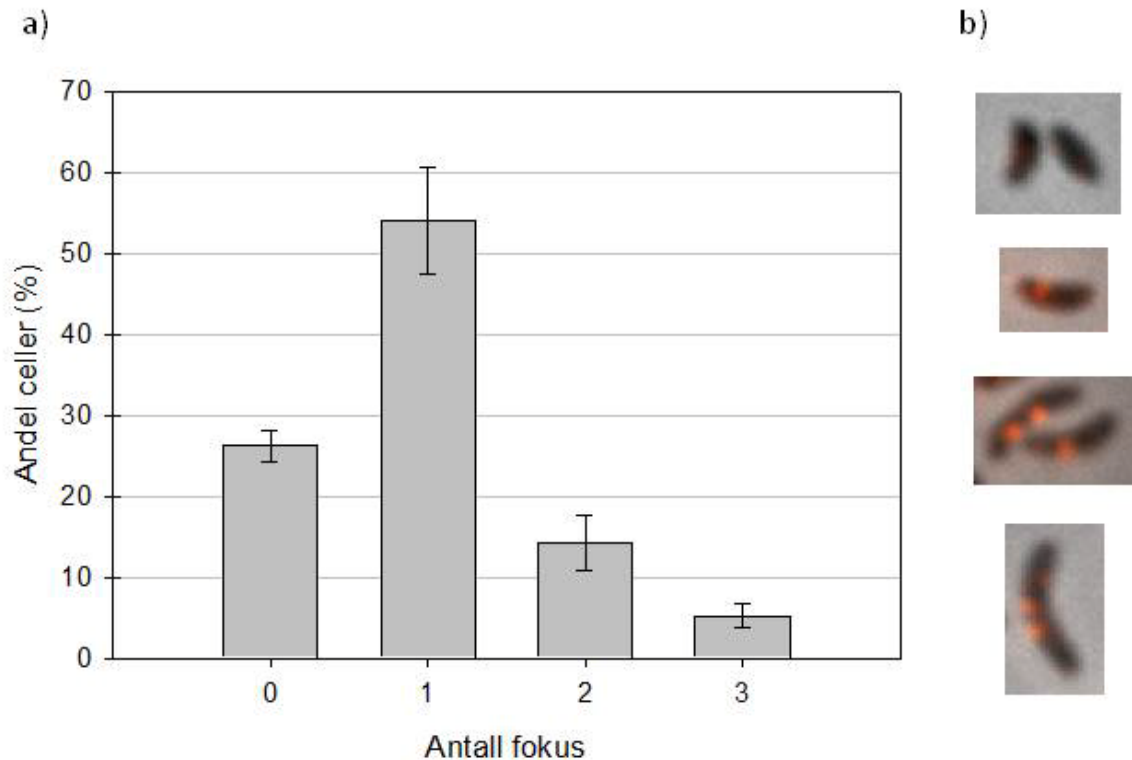
SeqA fokusfordeling

Fordelingen av SeqA fokus i cellene ble funnet etter immunmerking og visualisering av fluorescensen sammen med fasekontrastbilder av cellene (se kapittel 3.5.1, 3.5.3 og 3.5.4 for detaljer angående metodene). Resultatene for hvert forsøk er gitt i tabell 4-2.

Tabell 4-2. Fordelingen av SeqA fokus for *V.cholerae* dyrket i minimal medium supplementert med 0,2% fruktose.

	Antall celler	Andel med indikert antall fokus per celle				Gjennomsnittlig antall fokus per celle
		0	1	2	3	
Forsøk nr 1	174	26%	50%	18%	6%	1,05
Forsøk nr 2	119	29%	47%	16%	7%	1,01
Forsøk nr 3	150	25%	58%	13%	4%	0,97
Forsøk nr 4	198	25%	61%	10%	4%	0,92

Overensstemmelsen mellom forsøkene er god, og gjennomsnittlig antall fokus per celle ligger også på rundt ett for alle fire forsøkene. Doblingstidene var nesten identiske (henholdsvis 46, 46, 45 og 47 minutter). Gjennomsnittlig andel for hvert antall fokus per celle ble regnet ut, og er vist i et stolpediagram i figur 4-18a.



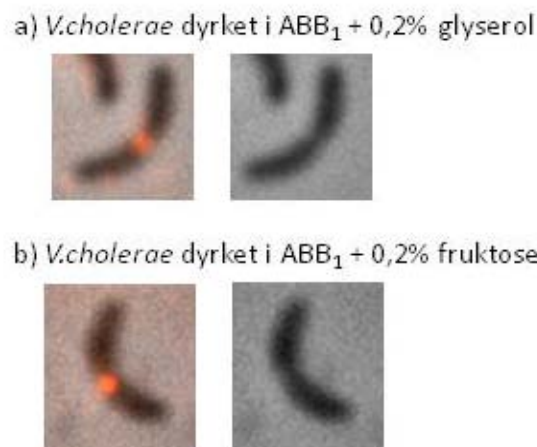
Figur 4-18. I a) er fordelingen over antall SeqA fokus hos V.cholerae celler dyrket i ABB₁ + 0,2% fruktose vist. Tallene er hentet fra tabell 4-2. I b) er det, fortløpende fra toppen, vist bilder av celler uten fokus, en celle med ett, av en celle med ett og en med to og til slutt et bilde av en celle med tre fokus.

Totalt ble det talt opp fokus i 641 celler. Fokusene var for uklare til å kunne telles i rundt 5% av cellene. Over halvparten, 54%, av cellene inneholdt ett SeqA fokus, mens rundt 15% hadde to fokus og 5% tre fokus. Det var også en andel på ca 26% av cellene som manglet fokus. Gjennomsnittlig var det 1,0 fokus per celle. Dette indikerer at det kan finnes en viss grad av samlokalisering av replikasjionsgafler i disse cellene (etter sammenligning med gjennomsnittlig antall gafler fra forrige delkapittel).

Antallet fokus ble kvalitativt vurdert til å avhenge av lengden på cellene. De minste cellene inneholdt sjelden fokus. Dette stemmer godt med at disse sannsynligvis er i B-fase, og dermed ikke har initiert DNA replikasjon ennå. Cellene med ett og to fokus var av

omtrent samme størrelse, og gjerne litt lengre enn cellene uten fokus. Utvalgte celler er vist i figur 4-18b. Man kan se at disse fokusene er litt svakere enn tilsvarende for *E.coli* cellene (se figur 4-4b). Dette skyldes antagelig at antistoffet er laget med SeqA protein fra *E.coli*, dette proteinet er imidlertid ikke identisk i *V.cholerae* selv om det har en stor grad av sekvenslikhet (se også kapittel 2.4).

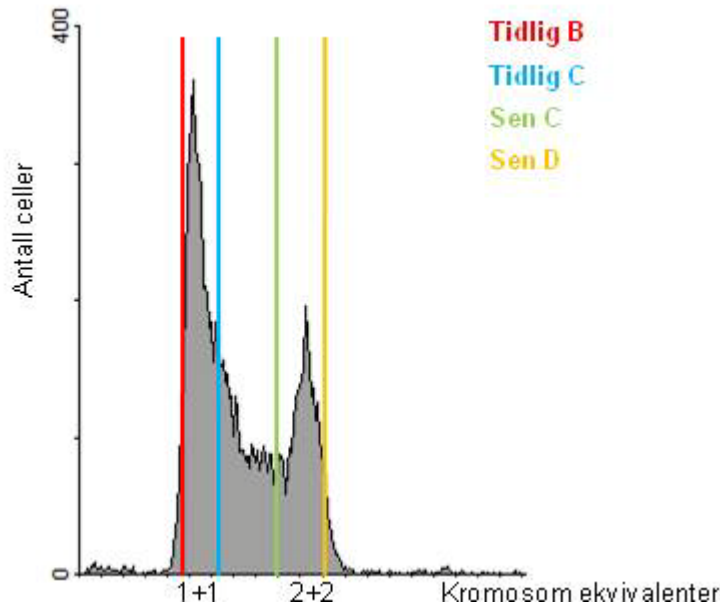
De lengste cellene, som hadde startet septumformasjon, inneholdt som regel heller ikke fokus. Men blant disse cellene som tydelig befant seg i D-fase, var det også noen med ett svært lyssterkt fokus midt i cellen. Et slikt tilfelle er vist i figur 4-19b. Denne andelen celler lå på ca 7%, noe som tilsvarer omtrent 13% av cellene med ett fokus. Ellers kunne cellene med ett eller to fokus ha disse fordelt langs hele lengden fra pol til pol.



Figur 4-19. Saktevoksende *V.cholerae* celler som i D-fase har et intenst fokus ved septum. Til venstre er avbildningen av Cy3 fluorescensen lagt oppå fasekontrastbildene, til høyre er den ikke det. Både cellene vist i a) og b) er dyrket i minimal medium, men de er tilsatt ulike karbonkilder.

SeqA fokusfordeling etter fase

Fordelingen av SeqA fokus ved forskjellige punkter i cellesyklus ble funnet for å undersøke sammenhengen mellom antall gafler og fokus nærmere. Bakteriecellene ble sortert i henhold til DNA innhold og videre immunmerket og mikroskopert (se kapittel 3.4.4 og 3.5.2-4 for metoder). Slik sortering av visse subpopulasjoner for videre immunmerking er ikke blitt utført tidligere, og er en metode utviklet i arbeidet med denne oppgaven. Det ble valgt et intervall i B-fase, to i C-fase og et i D-fase til å sortere ut celler for videre prosedyrer fra. Disse intervallene, som strekker seg over få kanaler, er vist i figur 4-20.



Figur 4-20. Histogram av DNA innholdet hos *V.cholerae* dyrket i minimal medium supplementert med 0,2% fruktose. Strekene indikerer de smale intervallene det ble sortert ut celler fra. For eksempel ble celler i såkalt sen D fase hentet fra et lite område, vist som en oransje strek i figuren.

I 1+1 toppen skal ha cellene én kopi av *chrI* og én av *chrII*, men det vil alltid være et visst overlapp mellom B-fase og C-fase (se for eksempel figur 4-9). B-fase celler ble da tatt fra den venstre delen av 1+1 toppen for å minimere risikoen for å få med celler som replikerte. Tilsvarende ble D-fase celler tatt fra den høyre delen av 2+2 toppen. For å skille såkalte tidlig C- fase og sen C-fase celler ble disse sortert fra intervaller med så stor avstand som mulig. Denne separasjonen går på bekostning av en høyere andel B-fase celler i tidlig C-fase intervallet, og en høyere andel D-fase celler i sen C-fase intervallet.

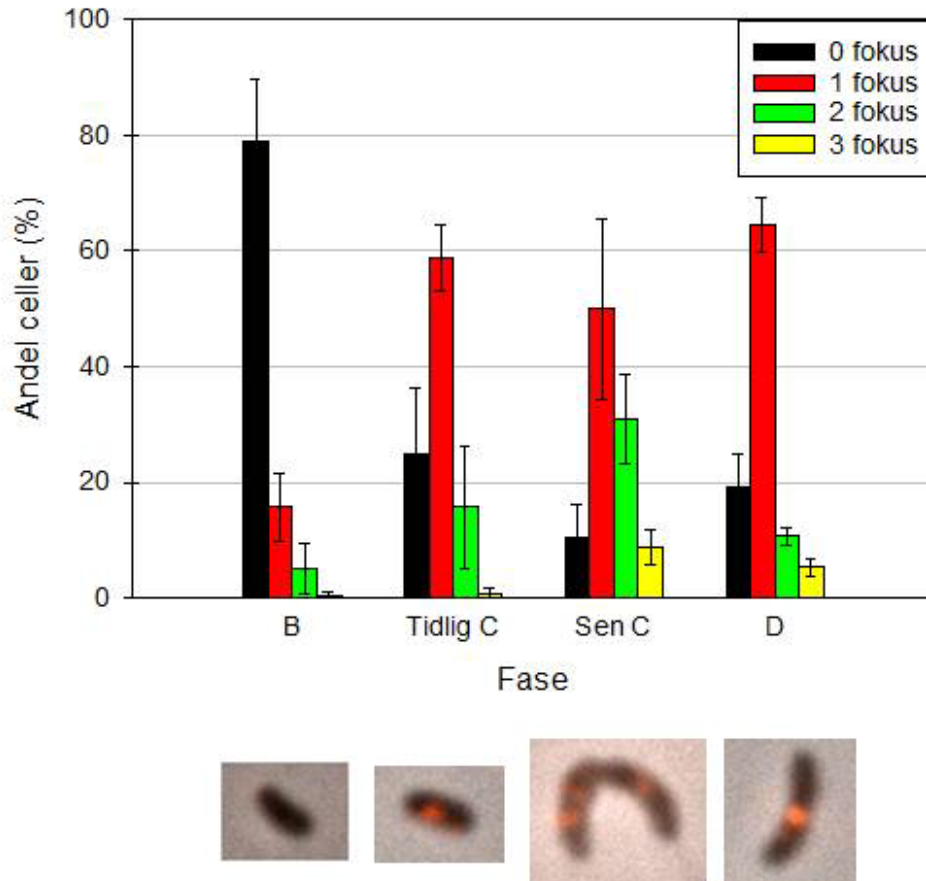
Etter sortering ble cellene merket med anti-SeqA og studert i mikroskopet. Fordelingene av SeqA fokus ble funnet ved tre uavhengige gjennomføringer av prosedyrene (prøver fra forsøk 1, 3 og 4, på grunn av mangel på mer prøve ble forsøk 2 utelatt). Resultatet er vist i tabell 4-3.

Tabell 4-3. SeqA fokus fordelingen etter faser for hvert forsøk.

	Celler sortert fra fase	Antall celler	Andel med indikert antall fokus per celle				Gjennomsnittlig antall fokus per celle
			0	1	2	3	
Forsøk nr 1	B	94	90%	10%	0%	0%	0,10
	Tidlig C	71	38%	57%	5%	0%	0,67
	Sen C	89	4%	68%	22%	6%	1,30
	D	106	14%	70%	12%	4%	1,06
Forsøk nr 3	B	76	78%	15%	7%	0%	0,29
	Tidlig C	123	18%	54%	26%	2%	1,12
	Sen C	113	12%	41%	35%	12%	1,47
	D	146	19%	63%	11%	7%	1,06
Forsøk nr 4	B	102	69%	22%	8%	1%	0,41
	Tidlig C	105	19%	65%	16%	0%	0,97
	Sen C	106	15%	41%	36%	8%	1,37
	D	114	25%	61%	9%	5%	0,94

Forskjellene mellom forsøkene er relativt små. De største variasjonene finnes i tidlig C-fase, sannsynligvis siden det er i denne og B-fase det er flest celler over minst vinduer. Det blir dermed vanskelig å separere disse intervallene. Kvaliteten på reproduserbarheten av sorteringene var også avhengig av at gatene ble plassert likt ved hvert forsøk. Det kan generelt se ut som det ble talt færre fokus for det første forsøket, noe som kan skyldes at det her gikk lang tid mellom fiksering og sortering. Siden DNA fordelingen i populasjonen var lik som hos de andre, ble resultatene fra dette forsøket likevel brukt.

I figur 4-21 er det gitt et stolpediagram av den gjennomsnittlige fordelingen av fokus for de ulike fasene. Totalt ble det talt 1245 celler. Andelen celler med diffuse fokus lå på rundt 6% i alle tre forsøkene.



Figur 4-21. Andel SeqA fokus hos celler i ulike faser av cellyklus. Fasene korresponderer med intervallene vist i figur 4-20. Gjennomsnittet er tatt fra tre uavhengige forsøk, og standardavviket er indikert. Under hver fase er det vist typiske celler for denne fasen. Fra B er det vist en celle uten fokus, og fra tidlig i C-fase en celle med ett. For sen C er det vist et bilde av to celler, en med ett fokus og en med to. Som det er vist et eksempel av på bildet for D-fase, ble det her hyppigst observert celler med ett sentralt fokus.

Av cellene fra B-fase intervallet inneholdt de fleste (79%) ikke fokus. Størsteparten var også små celler, se bilde i figur 4-21. Det ble også funnet mindre andeler med ett eller to fokus, som nok var celler fra C-fase. Denne antagelsen støttes også av at disse cellene generelt var litt lengre enn cellene uten fokus. Selv om cellene ble sortert ut fra delen av B-fase toppen med lavest DNA innhold, vil altså celle-til-celle variasjonen medføre at noen C-fase celler kommer med i dette intervallet.

Cellene i tidlig C-fase var ikke særlig lengre enn cellene i B-fase. Ca 59% inneholdt ett fokus, mens det var rundt 16% med to. En ikke-signifikant andel hadde tre fokus, disse kan for eksempel ha blitt feilsortert. En del celler manglet også fokus, og var muligens B-fase celler.

Cellene fra det tredje intervallet var betydelig lengre enn cellene i de to første, noe som er med på å bekrefte at de stammer fra sen C-fase. De inneholdt som

oftest ett eller to fokus, men det ble også funnet en andel på nesten 10% med tre fokus. I figur 4-22 er en celle med tre fokus vist. Disse cellene inneholder sannsynligvis mer enn to replikasjons-gafler. Det ble

også observert under 9% celler uten fokus, disse kan ha fullført replikasjon og gått over i D-fase. Vi husker også at det under sorteringen vil komme med rundt 4% celler fra utenfor det valgte intervallet (kapittel 3.4.4).



Figur 4-22. Celle fra sen C-fase med tre fokus. Til høyre er kun fluorescensen fra Cy3 vist.

Hos D-fase cellene ble det stort sett observert ett intenst fokus i midtcelleposisjonen. Slike celler ble under den vanlige fargingen antatt å være i D-fase, noe som nå viste seg å stemme. Noen celler inneholdt flere fokus, dette kan skyldes overlapp med C-fase. Det har tidligere blitt spekulert i om SeqA forblir festet til DNA en stund etter terminering av replikasjon hos *E.coli* (Molina og Skarstad, 2004). Det kan se ut som dette også er tilfellet for saktevoksende *V.cholerae*.

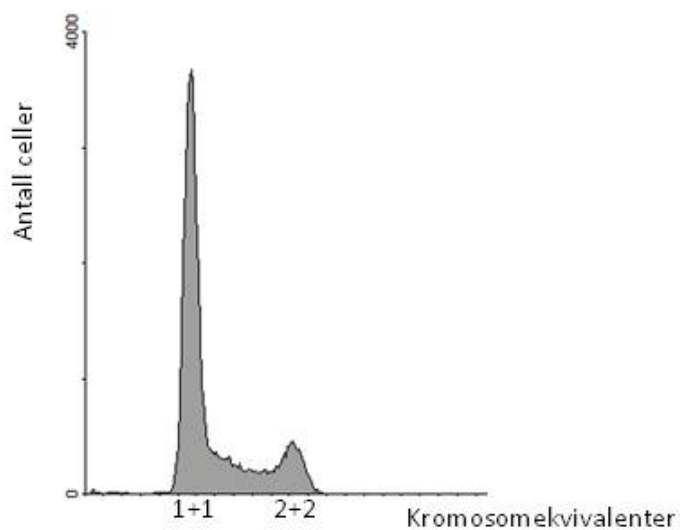
Hvis man for eksempel antar termineringssynkroni kan fordelingene av SeqA fokus totalt beregnes fra fordelingen hos de sorterte cellene (se tabell 4-3). Etter en vekting som oppveide at det ble talt ulike antall celler fra hver fase, ble fordelingen av SeqA fokus totalt beregnet for hvert forsøk. Det ble antatt at intervallene kalt tidlig C og sen C var representative for intervallene med to gafler og fire gafler, og videre også justert med andelene for fasene funnet fra cellesyklusstilpasningen (tabell C-3, tall for celler i C_I og C_{II} i tekst side 62). Resultatet er gitt i tabell C-6. Overensstemmelsen med fordelingene totalt for prøvene (tabell 4-2) er rimelig god, og gjennomsnittlig antall fokus er marginalt mindre enn for den totale populasjonen (0,9 mot 1,0). Dette kan skyldes at immunmerkingen blir litt dårligere etter sorteringen, eller tyde på at for eksempel perioden med fire gafler, altså sen C, underestimeres. Denne er høyere for hoppkant-modellen med termineringssynkroni.

4.2.2 Svært saktevoksende celler

Under forsøk med de ulike mediene vokste kulturene av *V.cholerae* saktest i $ABB_1 + 0,2\%$ glyserol. Doblingstiden lå på rundt 107 minutter.

Replikasjonsgaffelfordeling

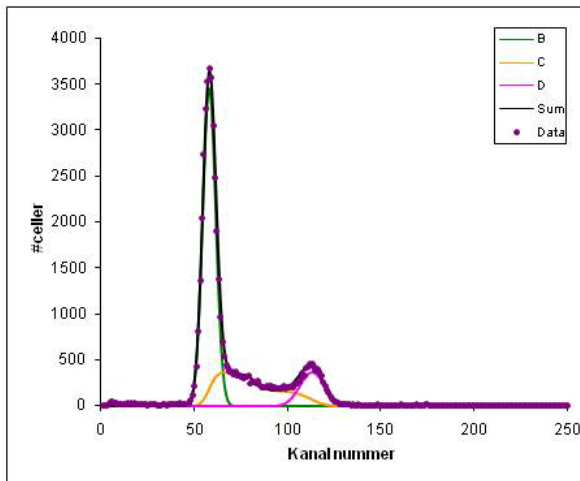
I henhold til prosedyrene beskrevet i kapittel 3.4.1-3 ble DNA hos de fikserte cellene farget og fordelingen for populasjonene funnet med bruk av flowcytometri. I figur 4-23 er DNA fordelingen for den eksponentielle prøven fra et av forsøkene vist. I appendiks D er fordelingene for hvert enkelt forsøk vist.



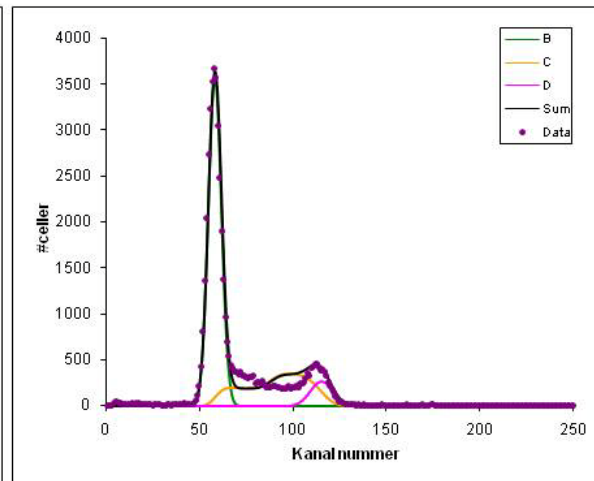
Figur 4-23. DNA histogram av *V.cholerae* celler i eksponentiell vekst. Mediet var $ABB_1 + 0,2\%$ glyserol. Prøve fra forsøk nr 3.

Replikasjonsgaffelfordelingen finnes fra andelene celler i de ulike fasene av cellesyklus. Tilsvarende som for kulturene dyrket i minimal medium supplementert med fruktose ble også cellesyklusfordelingene her simulert med et program tilpasset celler med to kromosomer. I figur 4-24 er det vist simuleringer både for terminerings- og initieringssynkroni mellom *chrI* og *chrII*. Punktene i lilla representerer de eksperimentelle dataene, og vi kan se at det teoretiske histogrammet for termineringssynkroni sammenfaller klart best med disse.

a) Termineringssynkroni



b) Initieringssynkroni

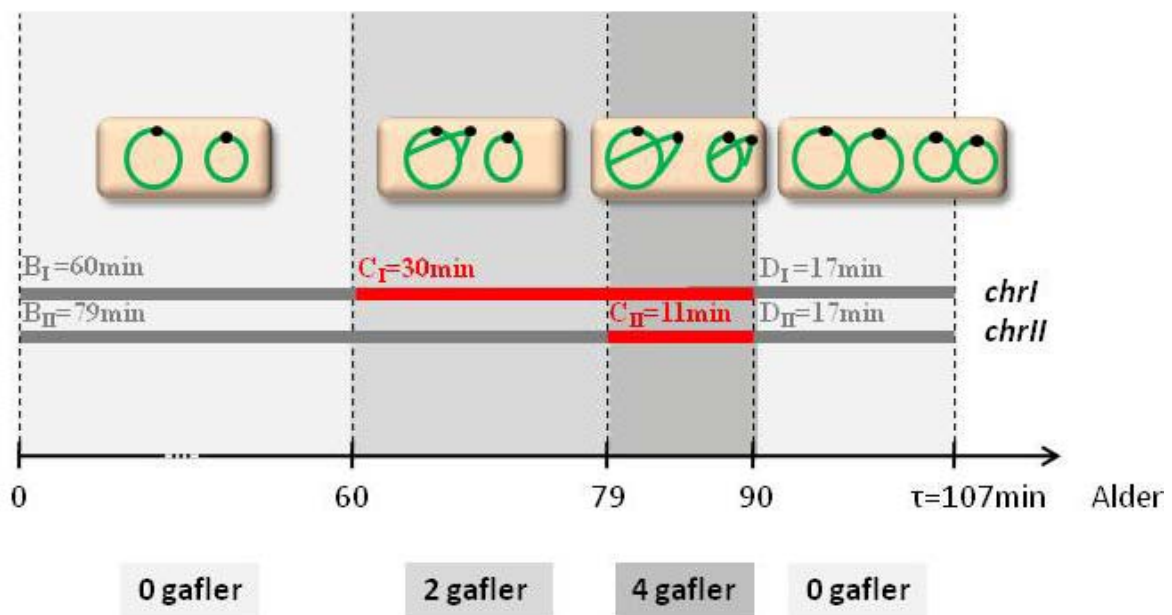


Figur 4-24. Cellesyklustilpasning for *V.cholerae* celler i eksponentiell vekst i minimal medium supplementert med glyserol (fra forsøk nr 3). De lilla punktene er de eksperimentelle dataene, og de sorte linjene det totale histogrammet for tilpasningene. I a) vises termineringssynkroni-modellen, og i b) initieringssynkroni-modellen.

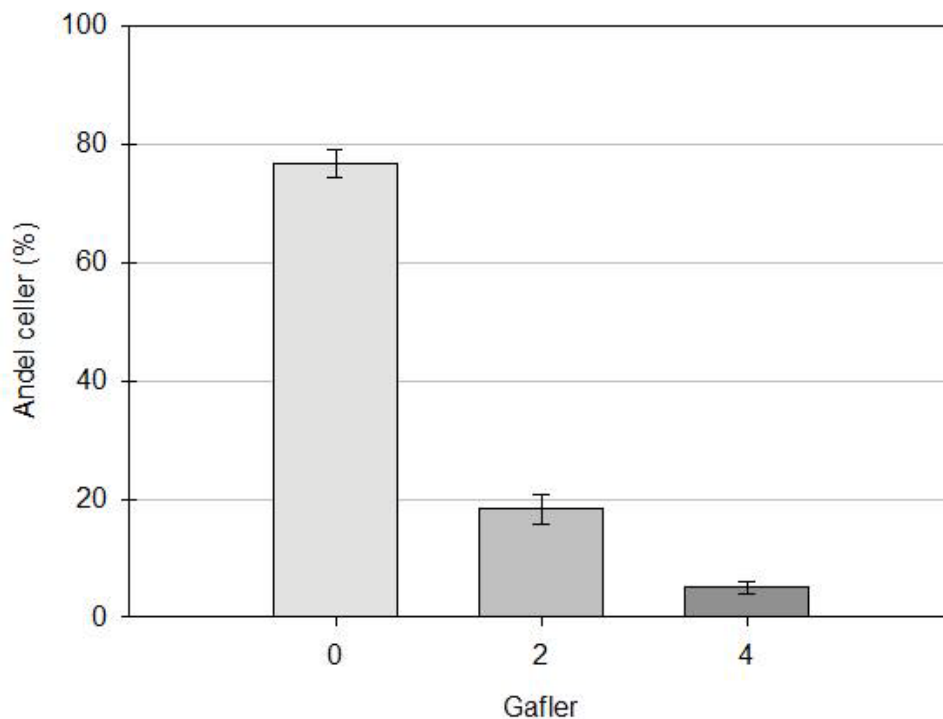
Den prosentvise andelen i fasene, antatt termineringssynkroni, er for hvert forsøk gitt i tabell C-7. Varigheten av fasene kan regnes ut ved å sette integraler over aldersfordelingen (formel 3-4) lik andelen i hver fase. Resultatene for hvert forsøk er relativt like. Gjennomsnittlig var ca 65% av cellene i B-fase, 23% i C-fase og 12% i D-fase.

Andelen celler med replikasjon av begge kromosomer ble separert fra resten av C-fase der kun *chrI* replikerer DNA (se kapittel 3.6.2). For termineringssynkroni modellen ble andelen med fire gafler (*chrI* i C_I og *chrII* i C_{II}) regnet til henholdsvis 6%, 4% og 5% i forsøkene. En modell for cellesyklus er illustrert i figur 4-25, og de gjennomsnittlige andelene gafler er gitt i figur 4-26.

Termineringssynkroni

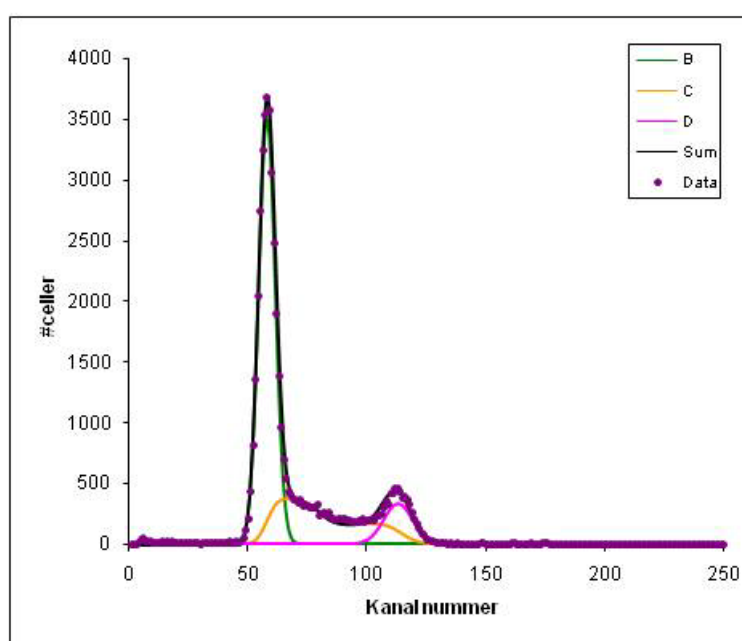


Figur 4-25. Modell for cellyklus hos *V.cholerae* dyrket i minimal medium supplementert med 0,2% glyserol. Her er det antatt at kromosomene terminerer replikasjon av DNA samtidig. Periodene er beregnet fra gjennomsnittet av forsøkene totalt, se tabell C-7. Faser er gitt for *chrI* og *chrII* gjennom én generasjon. Øverst er det vist eksempler på kromosominnhold gjennom syklus og nederst gitt antall gafler i de indikerte intervallene.



Figur 4-26. Gaffelfordeling for modellen i figur 4-25.

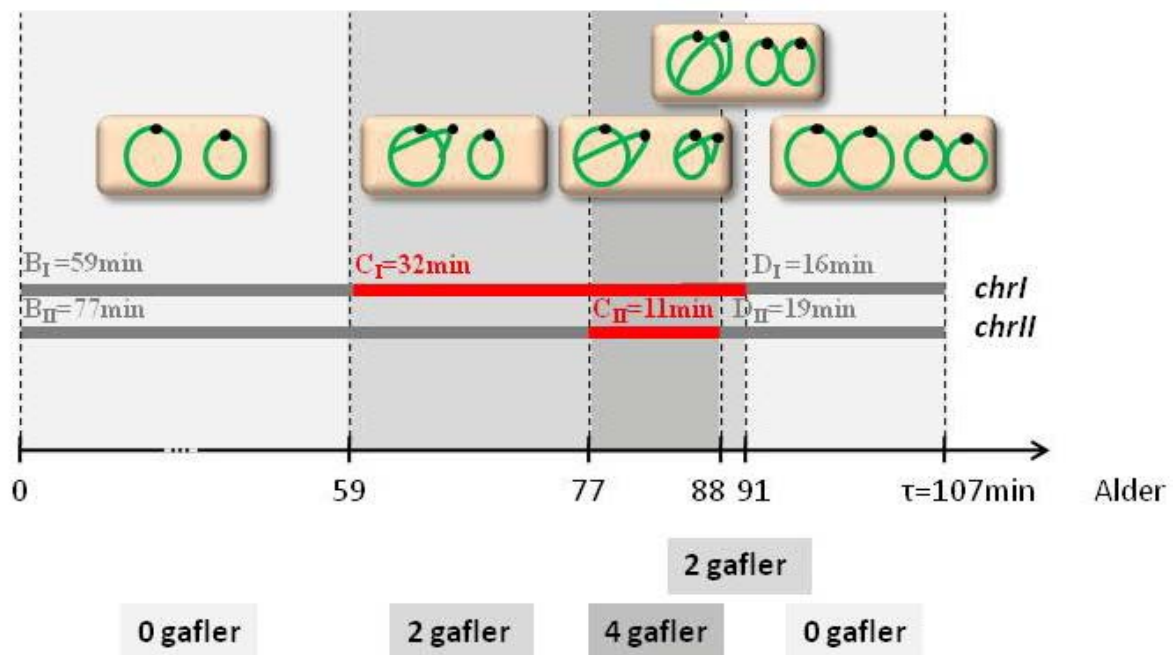
Som for cellene dyrket i minimal medium med fruktose, ble det også her observert at det beregnede punktet for initiering av replikasjon på *chrII* ikke sammenfalt med det eksperimentelle punktet der stigningskoeffisienten endret seg. For disse cellene dyrket i minimal medium med glyserol er det imidlertid mindre synlig, siden saktere vekst medfører færre celler i C-fase. Punktet kalt ”hoppkanten” i figur 3-8b ble brukt som utgangspunkt for en alternativ modell der kromosomene verken startet eller avsluttet replikasjon av DNA samtidig, men initieringen av *chrII* startet ved hoppkanten. En tilpasning med de eksperimentelle dataene (figur 4-27) viser at denne modellen passet omtrent like godt som termineringssynkroni.



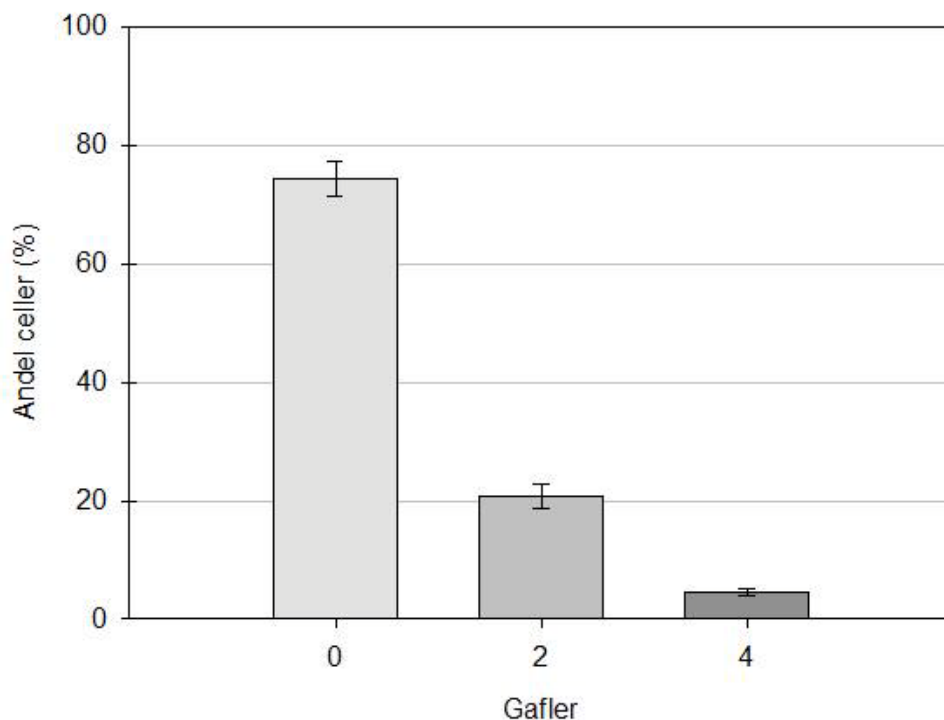
Figur 4-27. Cellesyklustilpasning med hoppkant-modellen. Prøven er eksponentielt voksende *V.cholerae* celler dyrket i minimal medium med 0,2% glyserol.

Med hoppkant-modellen ble terminering av C_{II} beregnet å finne sted rundt tre minutter før C_I . En illustrasjon av cellesyklus er vist i figur 4-28. En oversikt over andelen celler i hver fase er gitt i tabell C-8, totalt var det gjennomsnittlig 64% i B-fase, 25% i C-fase og 11% i D-fase. Med den alternative metoden beskrevet i kapittel 3.6.2 ble denne modellen for de tre forsøkene funnet til å gi henholdsvis 4%, 5% og 5% av populasjonen som replikerte begge kromosomene. Hos resten av cellene i C-fase var da *chrII* i B_{II} eller D_{II} . Gaffelfordelingen er gitt i figur 4-29.

Hoppkant-modell

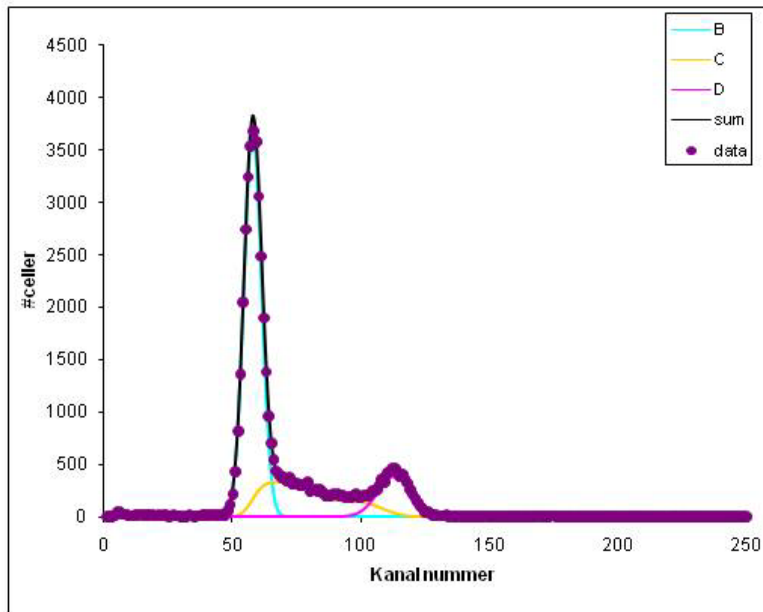


Figur 4-28. Hoppkant-modell for replikasjonsmønsteret hos *V. cholerae* dyrket i minimal medium supplementert med 0,2% glyserol. Terminering av replikasjon for *chrI* og *chrII* er ikke lenger satt til å finne sted samtidig. Periodene er beregnet fra gjennomsnittet av forsøkene totalt, se tabell C-8. Som før er det øverst vist kromosominnhold i celler gjennom syklus og nederst antall gafler i disse.



Figur 4-29. Gaffelfordeling for modellen i figur 4-28.

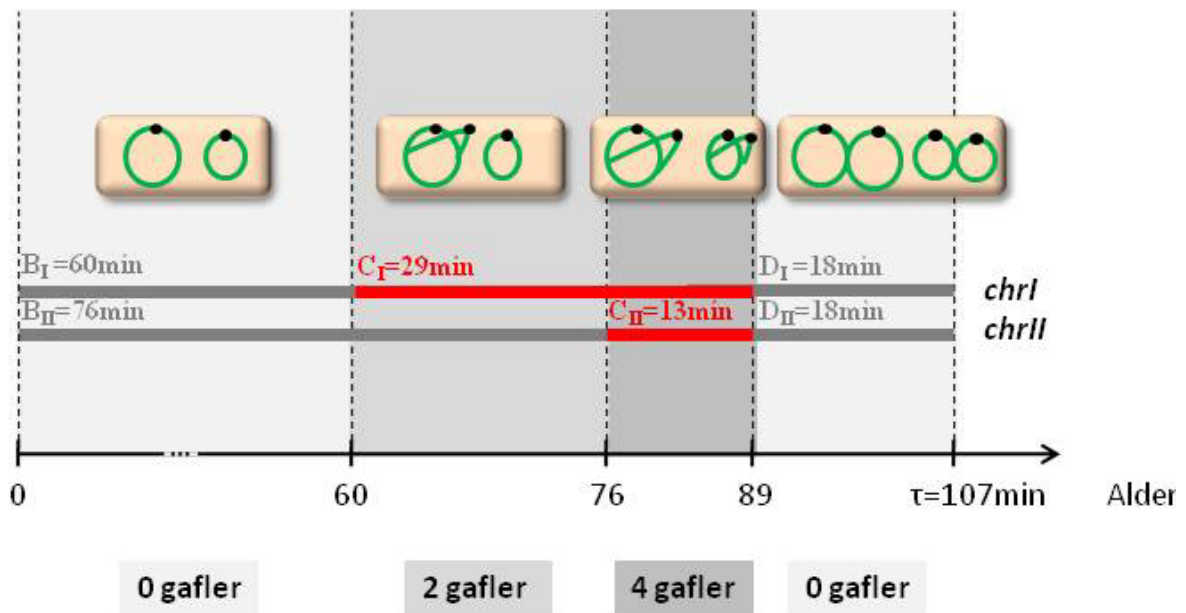
Det redigerte simuleringsprogrammet ble benyttet for disse svært saktevoksende cellene også. Som for kulturene dyrket i minimal medium med fruktose, ble *chrII* satt til å initiere ved hoppkanten og terminere samtidig som *chrI* (figur 4-30).



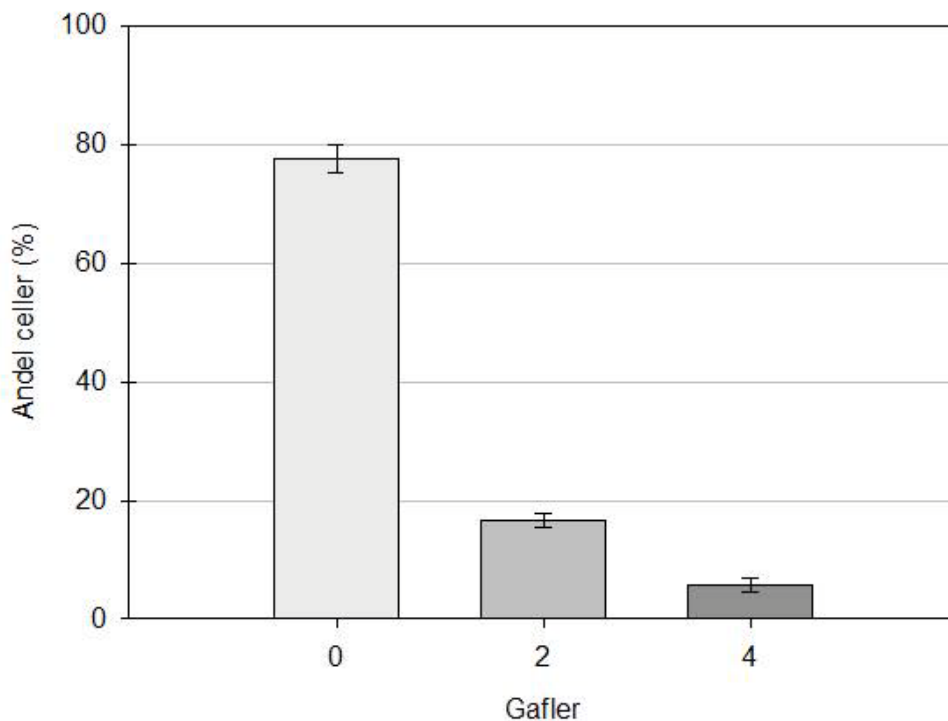
Figur 4-30. Simulering av hoppkant-modellen med termineringssynkroni for *V. cholerae* dyrket i ABB_1 + 0,2% glyserol. Punkter fra flowcytometrymålingen av prøven er vist i lilla.

Denne hoppkant-modellen med termineringssynkroni ga minst avvik fra de teoretiske histogrammene, dog ble forskjellen ikke stor fra de forrige modellene som også passet godt. Andelene i hver fase ble her gjennomsnittlig 65%, 22% og 13% for B-, C- og D-fase. Tallene for hvert forsøk er gitt i tabell C-9, sammen med varigheten av fasene. Andelen i både C_I og C_{II} var henholdsvis 5%, 5% og 7% for disse forsøkene. I figur 4-31 er det vist en oversikt av kinetikken i syklus, og den tilhørende gaffelfordelingen er gitt i figur 4-32.

Hoppkant-modell med termineringssynkroni



Figur 4-31. Tilpasning av cellyklus hos *V. cholerae* dyrket i minimal medium med 0,2% glyserol. Varigheten av fasene er beregnet med gjennomsnittene fra forsøkene som utgangspunkt (tabell C-9). Med denne modellen starter replikasjonen av *chlI* ved hoppkanten og slutter samtidig med replikasjonen av *chlI*.



Figur 4-32. Gaffelfordeling for hoppkant-modellen med termineringssynkroni (illustrert i figur 4-31).

Uavhengig av modellen for cellyklus blir andelene celler med forskjellige antall gafler ganske like. Initieringssynkroni-modellen er da unntatt. Det er omtrent 20% av cellene som inneholder to gafler, dette er de med *chrI* i C_I og *chrII* i B_{II} eller D_{II}. Rundt 5% av populasjonen har replikasjon av begge kromosomene, og disse inneholder altså fire gafler. Alle forslag for cellykluskinetikken, altså termineringssynkroni-modellen og hoppkant-modellen med og uten termineringssynkroni, ga ca 0,6 gafler per celle i gjennomsnitt.

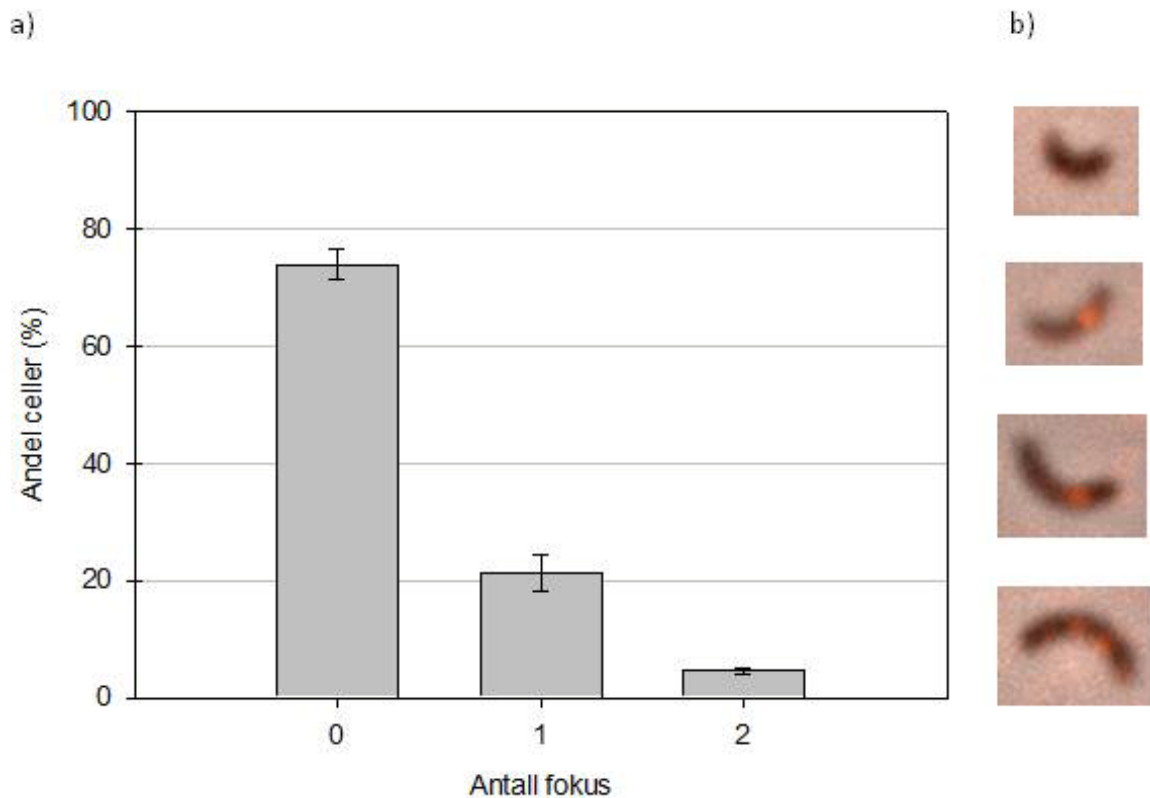
SeqA fokusfordeling

Fra de fikserte prøvene av kulturen under eksponentiell vekst ble det tatt ut celler for immunmerking og videre fluorescensmikroskopi (kapittel 3.5.1, 3.5.3 og 3.5.4). Det primære antistoffet er det samme som tidligere, og er altså opprinnelig dannet mot SeqA fra *E.coli* bakterier.

Tabell 4-4. Fokusfordeling hos *V.cholerae* dyrket i ABB₁ + 0,2% glyserol.

	Antall celler	Andel med indikert antall fokus per celle			Gjennomsnittlig antall fokus per celle
		0	1	2	
Forsøk nr 1	116	72%	24%	4%	0,32
Forsøk nr 2	115	77%	18%	5%	0,28
Forsøk nr 3	164	73%	22%	5%	0,32

I tabell 4-4 er fordelingen av SeqA fokus hos celler fra de tre forsøkene gitt separat. Disse fordelingene er svært like, og det er også det gjennomsnittlige antallet fokus per celle. Doblingstiden varierte litt, den var henholdsvis 109, 96 og 115 minutter, med et gjennomsnitt på 107 minutter. For så saktevoksende celler er likevel ikke dette store forskjeller. Gjennomsnittlig SeqA fokus fordeling for forsøkene er vist i et stolpediagram i figur 4-33a.



Figur 4-33. I a) er fordelingen av SeqA fokus per celle for *V.cholerae* dyrket i minimal medium tilsatt 0,2% glyserol. Gjennomsnittet for forsøkene er vist, med ett standardavvik i hver retning. I b) er det vist representative celler for de tre tilfellene. Den øverste er uten fokus, de to neste har ett hver, og den nederste to fokus.

Det ble talt 395 celler totalt, og av disse manglet 74% SeqA fokus. Litt over 21% hadde ett fokus og litt under 5% hadde to. Gjennomsnittlig antall fokus per celle var 0,3.

I figur 4-33b er det vist eksempler på celler med ulike antall fokus. Man kan se at disse fokusene er mindre klare enn for cellene dyrket med fruktose som karbonkilde (se figur 4-18b). En mulig årsak kan være at cellene her har lengre doblingstid, fra forsøk med *E.coli* har det vist seg at SeqA fokusene blir mindre klare hos saktevoksende celler (Skarstad, upubliserte data). Det ble observert få celler med uklare fokus, andelen lå på rundt 2%. Som hos kulturene dyrket i minimal medium supplementert med fruktose, ble fokusene observert langs nesten hele cellens lengde. En tendens var at hovedvekten av observasjonene lå rundt midtcelleposisjonen.

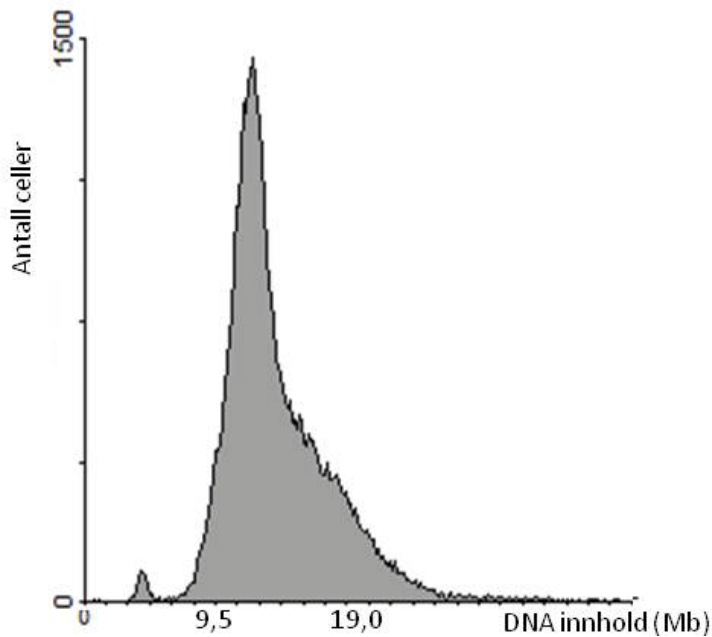
En annen likhet med de mindre saktevoksende cellene, var at det ble observert svært intense fokus like over septum i D-fase celler (se figur 4-19a). Andelen av disse celler lå på litt over 4%, altså var en av fem celler som ble talt med ett fokus egentlig i D-fase.

4.2.3 Hurtigvoksende celler

V.cholerae celler ble dyrket i LB medium til kulturene var i balansert vekst. Det ble utført fire forsøk med dette mediet, hvor doblingstiden for hvert lå på omtrent 19 minutter.

Replikasjonsgaffelfordeling

Til de fikserte prøvene av kulturen i eksponentiell vekst ble det tilsatt Hoechst 33258 (kapittel 3.4.1) for å ta opp histogram over fordelingen av DNA. I figur 4-34 er det vist et slikt histogram fra et av forsøkene, alle er vist i appendiks D. Skalaen på aksene med DNA innhold er her gitt i millioner baser (Mb) i stedet for kromosom ekvivalenter. Dette skyldes at siden størrelsen på *chrI* og *chrII* til sammen er 4,03Mb, er det tydelig at generasjonene her overlapper og kromosom innholdet er ikke lenger innlysende.



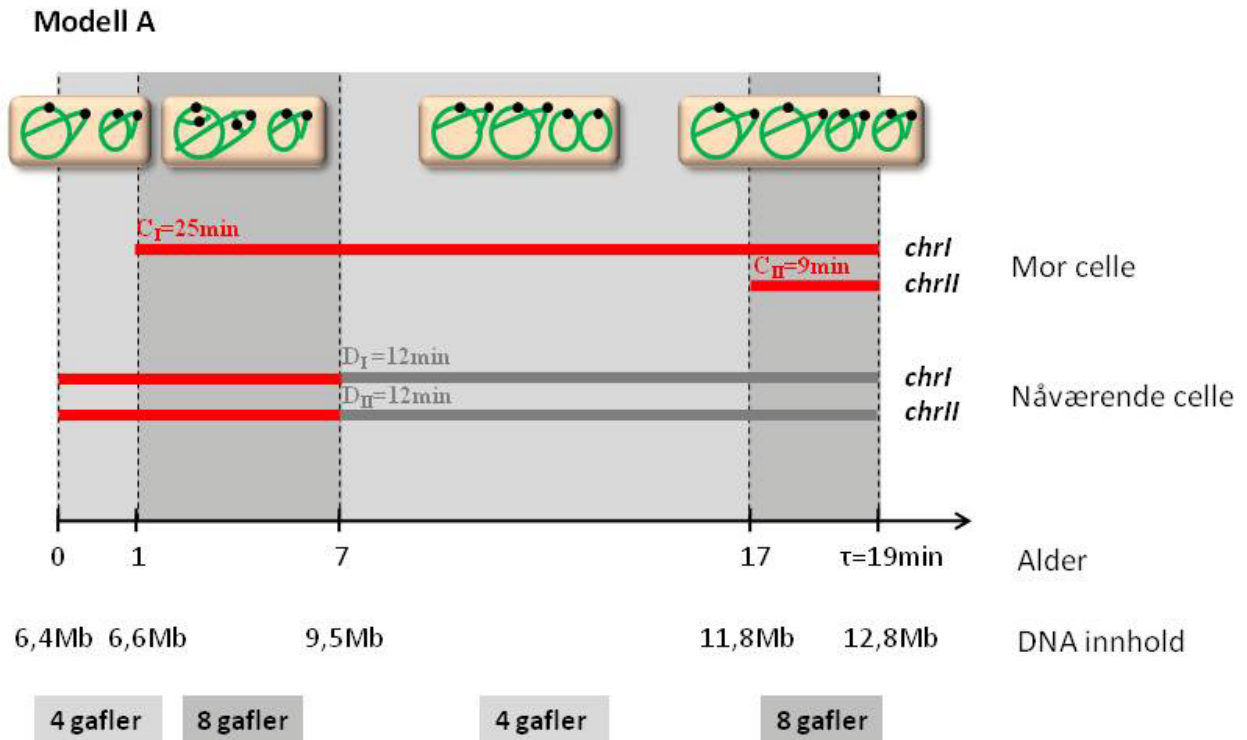
Figur 4-34. DNA histogram av eksponentielt voksende *V.cholerae* kultur dyrket i LB (forsøk nr 2).

Også her er cellene forsøkt dyrket videre med rifampicin og cephalixin tilsatt kulturen, som beskrevet i kapittel 3.3. Fra de resulterende DNA histogrammene kan man se at dette ikke gir de samme rene toppene som for *E.coli* bakterier (se figur C-1 for histogram fra et av forsøkene). For hurtigvoksende *V.cholerae* blir enten ny initierting ikke hindret, eller også pågående replikasjon ikke ferdigstilt. Chloramphenicol er et annet antibiotikum som også

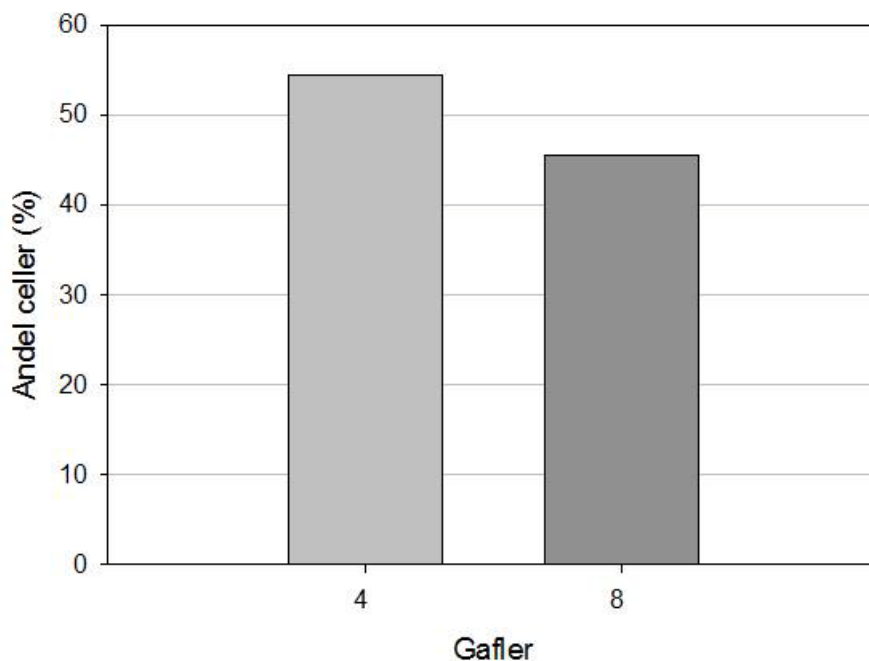
vist å inhibere ny initiering hos *E.coli* (Skarstad *et al*, 1986). Det ble forsøkt å skifte fra rifampicin til cephalixin, noe som ga enda dårligere resultater (data ikke vist).

For å finne en modell for cellyklus i disse kulturene er det flere parametre som kan varieres (se kapittel 3.6.2 om celler med overlappende generasjoner). Det er her valgt å starte med noen antagelser. En av disse er for enkelthets skyld termineringssynkroni mellom kromosomene, ut fra at dette var en modell som passet relativt godt for de saktevoksende cellene. Hvis *chrII* skulle terminere replikasjon litt før *chrI* vil ikke dette gi stort utslag på et DNA histogram, også siden det er en betydelig størrelsesforskjell mellom kromosomene.

For *V.cholerae* dyrket i LB medium, med på doblingstid på 20 minutter, er periodene $C_I=24,7\pm 1,8$ minutter og $C_{II}=8,5\pm 2,2$ minutter funnet i tidligere publikasjoner (Srivastava og Chattoraj, 2007). Disse er der utregnet ved forholdene *ori/ter* som er funnet ved Southern hybridisering. Det er derfor naturlig å ta utgangspunkt i $C_I = 25\text{min}$ og $C_{II} = 9\text{min}$. I tillegg kan man se på D-perioden, altså tiden det tar før cellene deler seg etter å ha terminert replikasjonen av genomet sitt. For de saktevoksende cellene diskutert i avsnitt 4.2.1 er D-fase beregnet til å vare i 12 minutter. Hvis man antar at denne ikke øker under hurtigere vekst, har man tilstrekkelig med informasjon til å konstruere en modell for kinetikken i syklus. Denne er kalt modell A, og er illustrert i figur 4-35. Formlene for DNA innholdet ved de indikerte punktene er gitt i tabell C-10. Gaffelfordelingen for modellen ble beregnet og er gitt i figur 4-36 (se kapittel 3.6.2 om celler med overlappende generasjoner).

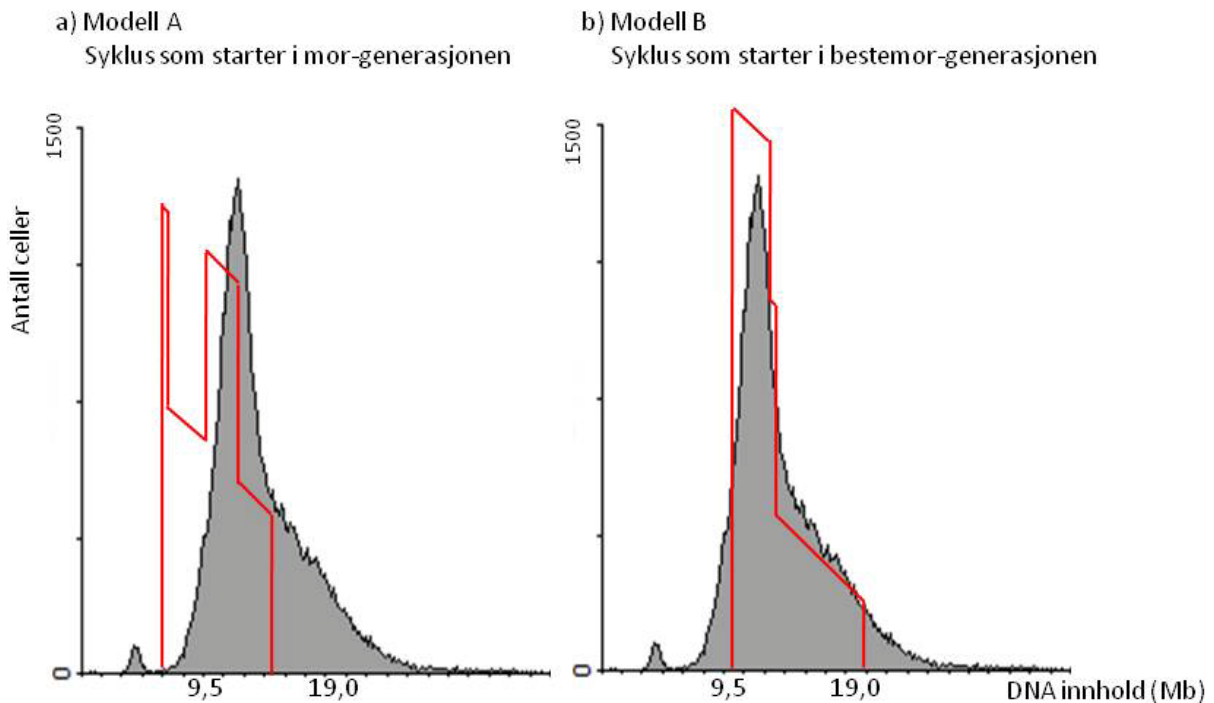


Figur 4-35. Modell A for cellykluskinetikken hos *V.cholerae* celler dyrket i LB medium. Her finner man overlappende replikasjonsrunder, som vist ved at C_I og C_{II} periodene (tegnet i rødt) starter i mor cellen og strekker seg over en celledeling. Øverst er det vist illustrasjoner av celler for visse intervaller, og nederst er tilhørende antall gafles indikert. I overgangen mellom intervallene kan DNA innholdet beregnes, og her er disse mengdene også gitt.



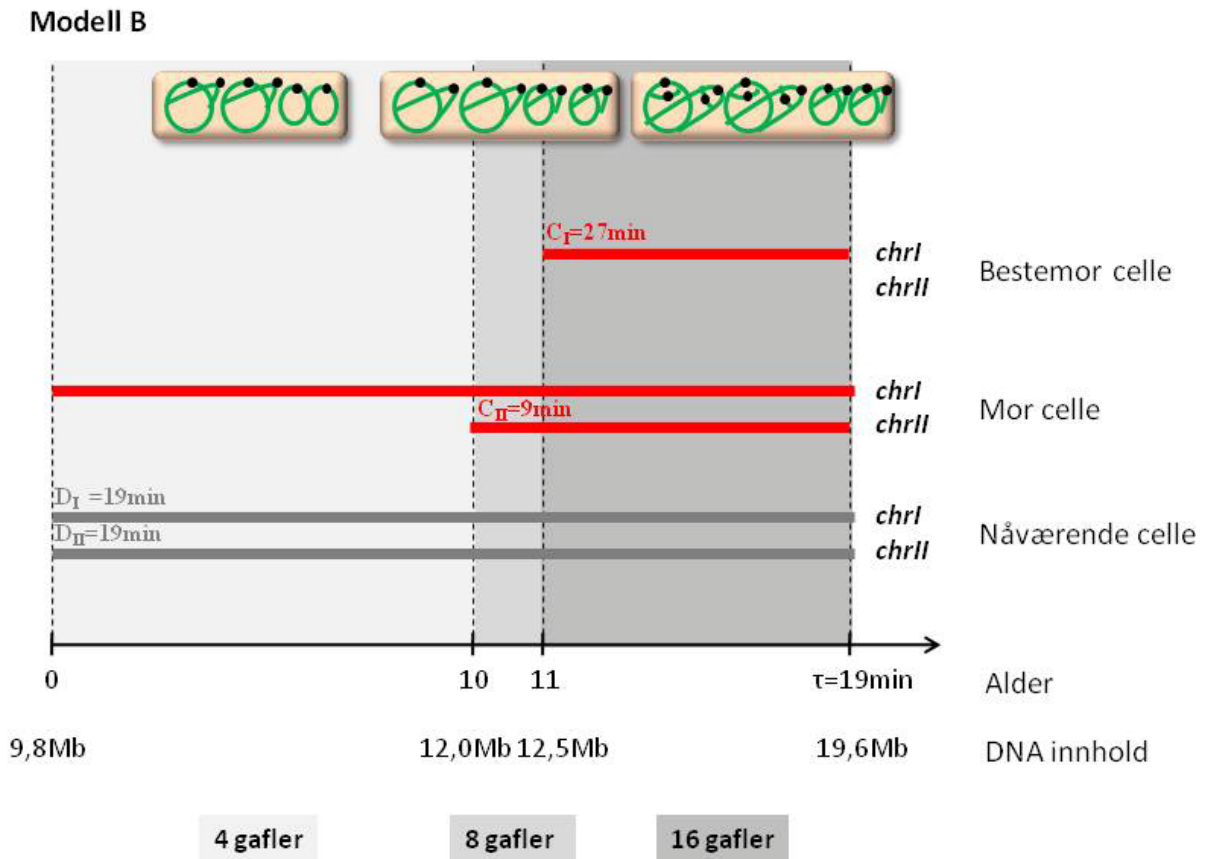
Figur 4-36. Gaffelfordeling for modell A, vist i figur 4-35.

Modell A (figur 4-35), der cellenes DNA innhold går fra 6,4 til 12,8Mb, stemmer dårlig overens med det eksperimentelle DNA histogrammet (figur 4-34). I figur 4-37a er dette histogrammet vist sammen med den teoretiske fordelingen til modellen.

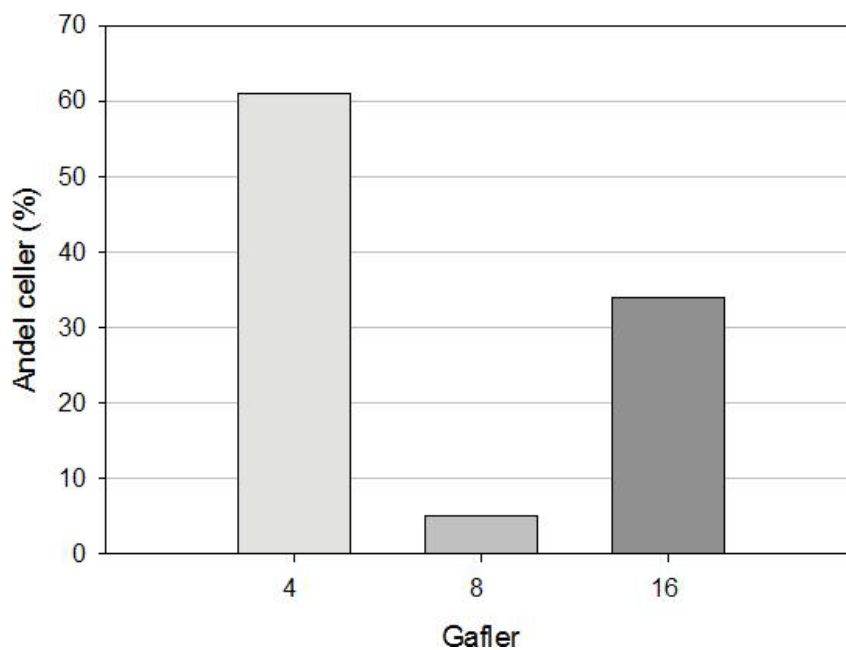


Figur 4-37. DNA fordelingen tatt opp eksperimentelt for *V.cholerae* dyrket i LB, sammen med to teoretiske histogrammer for cellesyklus. I a) er dette funnet for modell A vist i figur 4-35, i b) for modell B vist i figur 4-38. Begge de teoretiske tilpasningene er tegnet i rødt.

Når det teoretiske og eksperimentelle histogrammet er vist sammen ser man at modell A ikke gir et tilstrekkelig DNA innhold i cellene. Dette oppnås først hvis man lar *chrI* initiere replikasjon en generasjon tidligere, altså i ”bestemorgenerasjonen”. Varigheten av C- eller D- fasen må da bli lengre. Det er her simulert en slik teoretisk fordeling, der replikasjonsperiodene er beholdt omtrent som før. Ved å iterere varigheten av fasene til fordelingen passer DNA histogrammet fra cellene i eksponentiell vekst (se figur 4-37b), ble en modell B funnet. Cellesyklus for denne modellen er illustrert i figur 4-38, verdiene for DNA innhold ved de gitte punktene er beregnet med formlene listet i tabell C-11.



Figur 4-38. Cellesykluskinetikk med utgangspunkt i det eksperimentelle DNA histogrammet for *V. cholerae* dyrket i LB. Med denne modellen startes C_I allerede i bestemorcellen. Som tidligere er cellens kromosominnhold illustrert øverst og utregnet ved visse punkter nederst. Antall gaffer i hvert intervall er også indikert.



Figur 4-39. Gaffelfordeling for modell B, vist i figur 4-38.

Modell B, der initiering av DNA replikasjon skjer i bestemorgenerasjon, gir et gjennomsnittlig antall gafler per celle på ca 11,8 (se fordelingen i figur 4-39). Tilsvarende tall for modell A, der syklusen ble satt til å starte en generasjon senere, er rundt 5,8 (fra figur 4-36).

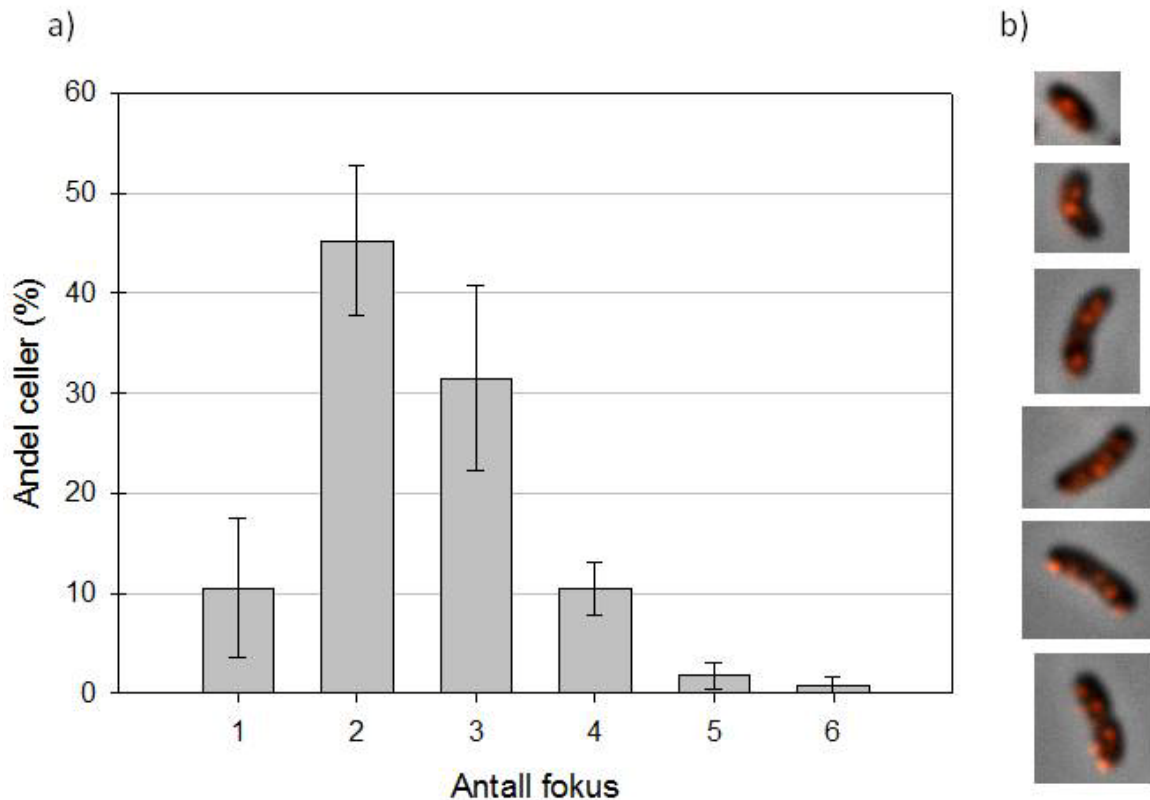
SeqA fokusfordeling

Celler fra kulturene ble fiksert i EtOH ved $OD_{600} \approx 0,15$. Etter immunmerking og mikroskopi ble SeqA fokus fordelingen talt opp som tidligere (se også kapittel 3.5.1, 3.5.3 og 3.5.4). De ulike fordelingene er gitt i tabell 4-5.

Tabell 4-5. SeqA fokusfordeling hos V.cholerae dyrket i LB.

	Antall celler	Andel med indikert antall fokus per celle						Gjennomsnittlig antall fokus per celle
		1	2	3	4	5	6	
Forsøk nr 1	155	20%	50%	22%	8%	0%	0%	2,18
Forsøk nr 2	139	7%	48%	32%	9%	3%	1%	2,56
Forsøk nr 3	134	4%	34%	44%	14%	2%	2%	2,82
Forsøk nr 4	141	11%	49%	28%	11%	2%	0%	2,47

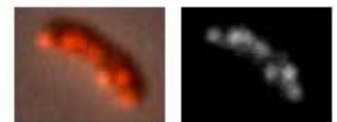
Man kan se at fordelingene spriker litt, spesielt er det i det første forsøket talt færre fokus enn ved senere forsøk. Årsaken kan være manglende rutine under immunmerkingen eller når mikroskopibildene ble tatt. Forskjellen mellom dette første forsøket og resten var likevel ikke så utpreget at resultatene fra forsøket ble utelatt. Den gjennomsnittlige fordelingen for alle forsøkene er vist i figur 4-40.



Figur 4-40. Fordelingen av fokus per celle for *V.cholerae* dyrket i LB. Gjennomsnittene av forsøkene er gitt som stolper i a), med ett standardavvik i hver retning (rådata i tabell 4-5). I b) er celler med fra ett til seks fokus vist fortløpende².

Totalt ble fokusfordelingen talt opp for 569 celler. En andel på 15% ble anslått å være for diffuse til at innholdet av fokus kunne bestemmes. Generelt ble det observert fra ett til seks fokus per celle, med klar overvekt av to og tre fokus. Cellene med fem og seks fokus kunne til tider være vanskelig å skille fra hverandre, noen få kunne også blitt tillagt å inneholde syv fokus (se eksempel i figur 4-41). Det ble ikke funnet noen celler uten fokus. Gjennomsnittet var totalt 2,5 fokus per celle.

For begge cellesyklusfordelingene i forrige delkapittel (modell A og B) vil det altså finnes samlokalisering mellom replikasjonsgaflene.



Figur 4-41. Celle som ser ut til å inneholde syv fokus. Til høyre er kun fluorescensen fra Cy3 vist.

² Noen av fokusene er tilsynelatende lokalisert utenfor cellene grunnet posisjonsendringer ved bytte av filter under mikroskopering.

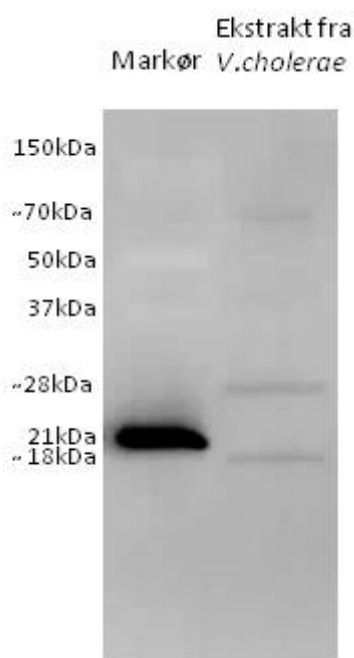
Disse resultatene er i overensstemmelse med tidligere forsøk hvor *V.cholerae* med mCherry-SeqA har blitt dyrket i LB (Srivastava og Chattoraj, 2007). Dobblingstiden var 20 minutter. Det ble da observert fra ett til seks fokus, og den største gruppen var celler med tre fokus (40%).

Fokus ble observert langs hele cellens lengde. Det var nesten alltid fokus på begge sider av midtcelleposisjonen. Det var klart at antall fokus økte med størrelsen på cellene, i figur 4-40b er det vist representative celler for ulike antall fokus hvor dette også er tydelig. Cellene med fem eller seks fokus hadde ofte begynt innsnevring til septum, og fokusene var jevnt fordelt mellom de to halvdelene av cellen. Det ble ikke funnet celler med fokus ved septum.

4.2.4 Binding av antistoff

Fra de eksponentielle kulturene av *V.cholerae* dyrket i ABB₁ + 0,2% fruktose og LB ble det også tatt prøver til SDS-Page og påfølgende Western blotting (se kapittel 3.7). Membranen ble inkubert med det samme antiserumet mot SeqA som ble benyttet under immunmerkingen. Eventuelle reaksjoner med andre proteiner i cellene kan da fastslå.

Bildene viste at binding først og fremst fant sted til et bånd ved ca 18kDa, noe som tilsvarer størrelsen på SeqA i *V.cholerae*. Dette kan sees i figur 4-42, her er det i tillegg et tydelig bånd på litt under 30kDa. Det sistnevnte forsvant nesten, for å bli erstattet av et sterkere bånd på 18kDa, ved senere forsøk når mengden med SDS ble doblet. Med vanlig mengde SDS ble SeqA tydeligvis ikke rettet fullstendig ut, dette var også tilfellet for *E.coli* cellene. Det ble også observert et svakt bånd for protein med en vekt på rundt 70kDa, tilsvarende bånd kan såvidt også skimtes for *E.coli* (figur 4-6).



Figur 4-42. Det venstre feltet stammer fra en brønn lastet med en markør og rensed SeqA protein. Den høyre brønnen er lastet med 20 μ g ekstrakt fra *V.cholerae* dyrket i AB minimal medium supplementert med 0,2% fruktose. Bindingen av antistoffet vises som sorte bånd.

Sammenligning mellom blott av ekstrakt fra kulturene dyrket i LB og minimal medium viste at for samme mengde applisert ekstrakt, ble båndene ble omtrent like lyssterke for begge. Konsentrasjonen av SeqA i cellene kan dermed anslås å være uavhengig av veksthastigheten. Derimot ble båndene mye kraftigere (rundt ti-fold) for prøver fra *E.coli* enn *V.cholerae*, noe som også var å forvente siden antistoffet er laget mot SeqA fra denne bakterien.

4.2.5 GATC seter

Akkurat som for *E.coli* (kapittel 4.1) ble det også for *V.cholerae* funnet en fordeling av GATC seter langs genomet. SeqAs muligheter for binding gjennom C-fase kan vurderes fra GATC fordelingen. Programmet "gatcseter" ble benyttet til å gå gjennom kromosomene og finne posisjonen til alle GATC biter i DNA (se kapittel 3.8).

DNA sekvensene til de to kromosomene til *V.cholerae* er hentet fra nettsiden til NCBI (Heidelberg *et al*, 2000). Disse sekvensene er hentet fra stammen O1, siden ikke hele genomet til 2740-80 er sekvensert.

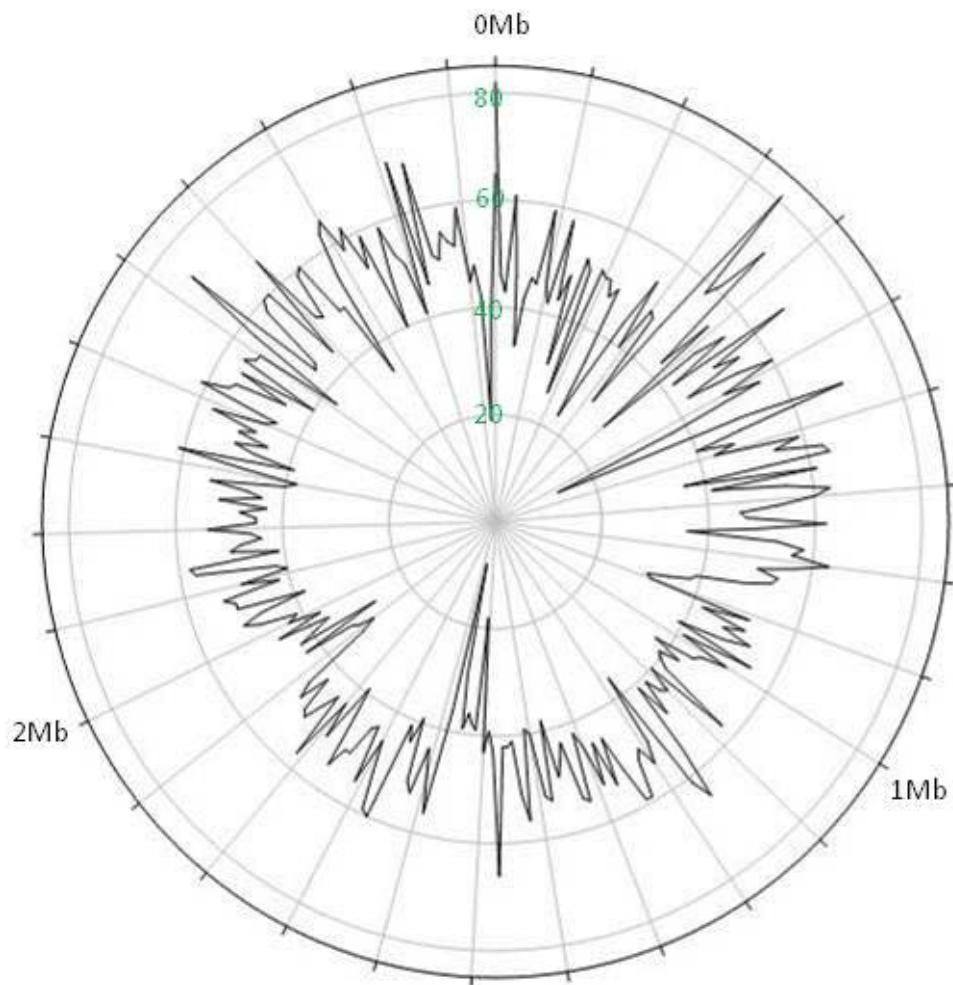
Resultatene for *chrI* og *chrII* er vist som sirkeldiagram i figur 4-43. Hvert av disse skal representere et sirkulært kromosom. Den angulære akse er delt opp i intervaller på 10kb. Antall GATC seter per intervall er plottet langs den radielle akse. Størrelsen på intervallet er valgt lik som for *E.coli* bakterien for å lette sammenlikningen. Verdiene langs den angulære akse er også identisk hos GATC fordelingene for *V.cholerae* (figur 4-43) og *E.coli* (figur 4-7).

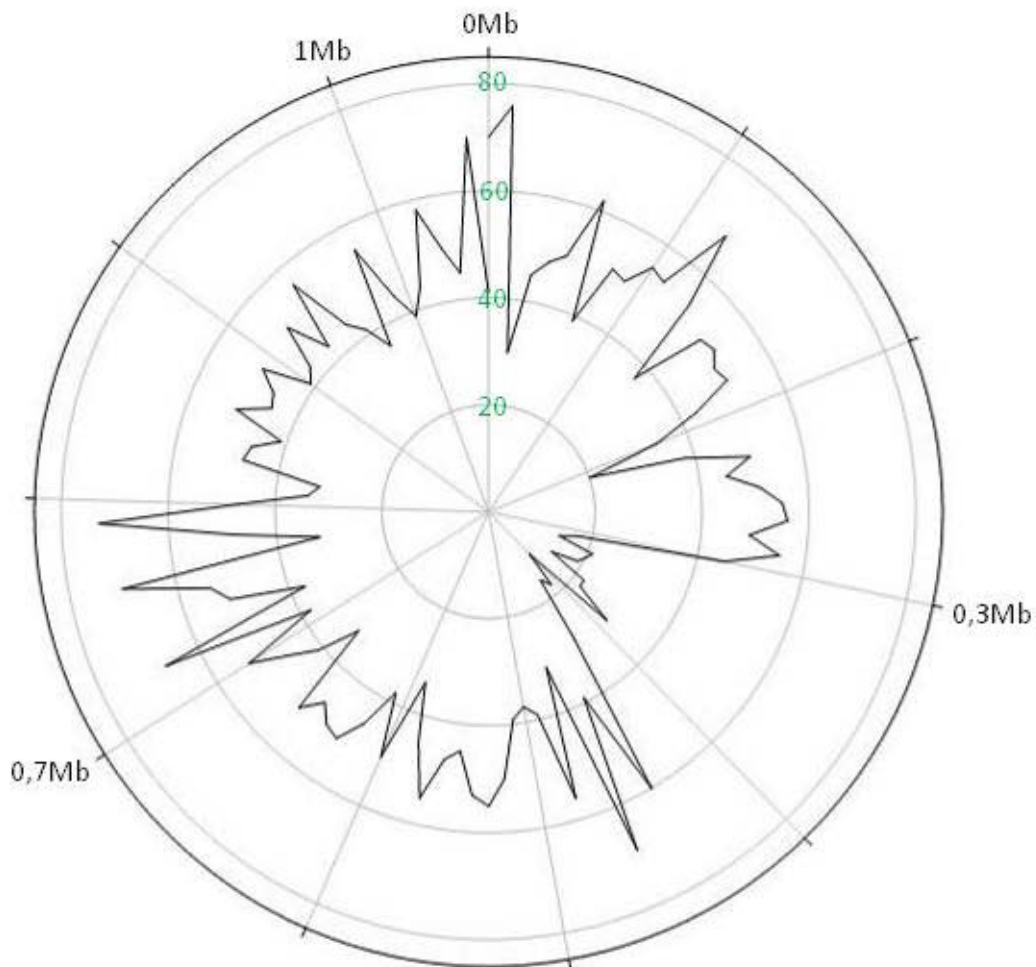
Originene *oriCI* og *oriCII* ligger i det første intervallet på hvert sitt respektive kromosom (Heidelberg *et al*, 2000; Egan og Waldor, 2003). På *chrI* er det også dette intervallet som inneholder flest GATC seter. Fordelingen for *chrI* strekker seg fra 82 til 8 seter, størsteparten av de 296 intervallene har imidlertid jevnt ca 40-50 seter. På *chrII* er det stort sett et liknende antall GATC seter per intervall i DNA sekvensen. Imidlertid inneholder dette kromosomet også, fra rundt posisjon 0,3Mb, et område med lite GATC seter. Her er det ca 130kb DNA med en gjennomsnittlig avstand på over 500 nukleotider mellom hvert slikt sete.

Hvis man sammenligner fordelingen av GATC seter på kromosomet til *E.coli* (figur 4-7) med tilsvarende for *chrI* og *chrII* for *V.cholerae* ser man at de stort sett er i samme størrelsesorden. Finregning viser at andelen seter per base er høyere for *V.cholerae* enn *E.coli*.³

³ Gjennomsnittlig antall GATC seter per 10kb er 41,2 for *E.coli* mot henholdsvis 47,9 og 44,6 for *chrI* og *chrII* hos *V. cholerae*.

a) Fordeling av GATC seter på *chl*.



b) Fordeling av GATC seter på *chrII*.

Figur 4-43. Sirkeldiagram over fordelingen av GATC seter langs genomet til *V.cholerae*. I a) gis resultatet for *chrI* og i b) for *chrII*. Angulært vises posisjonen langs kromosomene fra starten i 0 til slutten i 2,96Mb eller 1,07Mb. Langs den radielle aksen er antallet GATC seter per 10kb plottet lineært som avstanden fra sentrum. Skalaen er indikert i grønt. Originene *oriCI* og *oriCII* er lokalisert ved starten på hvert sitt kromosom.

5. Diskusjon

5.1 *Escherichia coli*

I denne oppgaven ble *E.coli* bakterier dyrket i et rikt medium som ga en doblingstid på omtrent 27 minutter. Med den hensikt å bestemme eventuell samlokalisering av replikasjongs-gafler, ble det utført forsøk for å finne posisjonen til og antallet av disse i cellene.

5.1.1 Samlokalisering av SeqA og replikasjongs-gafler

Til å bestemme posisjonene i cellen der det finnes replikasjongs-gafler ble det valgt å benytte proteinet SeqA som markør. Dette er et protein som binder hemimetylerede GATC seter, noe som finnes i nyreplikerte dobbeltråder av DNA (se også kapittel 2.4 og 2.2.2). SeqA vil da følge i kjølvannet av gaflene så lenge kromosomet inneholder stadig nye GATC seter som det kan bindes til.

For å se på fordelingen av GATC seter langs kromosomet til *E.coli* ble det skrevet et program som fortløpende finner disse setene. Slik at hele kromosomet på 4,6 Mb kunne studeres under ett, ble antallet seter innenfor intervaller på 10000 summert opp. Resultatet er vist i figur 4-7, og fordelingen framstår som jevn. Men jo større vinduer som brukes, desto mer vil forskjellene viskes ut. Innenfor et intervall med en skjev GATC fordeling kan det teoretisk finnes DNA sekvenser på mange tusen basepar uten et GATC sete. SeqA kompleksene kan dermed halte til dels langt etter gaflene.

Det er vist at et SeqA protein krever to GATC seter innenfor et område på 31bp for å binde seg til DNA, setene bør dessuten være lokalisert med et slikt mellomrom at de vender ut mot samme side av dobbelheliksen (Brendler og Austin, 1999). På kromosomet til *E.coli* er det funnet 1750 par med seter som oppfyller disse kravene, fordelt ganske likt langs hele genomet (Brendler *et al*, 2000). Perioden det tar før DNA remetyleres av Dam er i hurtigvoksende celler funnet å være på rundt ett minutt (Campbell og Kleckner, 1990). For celler dyrket under arbeidet med denne oppgaven, med en doblingstid på 27 minutter, gir dette til en hver tid gjennomsnittlig 65 potensielle bindingsseter for SeqA.

På grunnlag av dette er det trolig at SeqA fungerer som en god markør for områder der replikasjonen foregår. Immunmerking mot SeqA er også en etablert metode for å detektere hvor i cellen nyreplikkert DNA er lokalisert. Ved å pulsmerke med BrdU har fokusfordelingen for dette nukleosidet og SeqA tidligere blitt funnet å stemme overens (Molina og Skarstad, 2004). Dette bekrefter ytterligere at SeqA generelt binder til nyreplikkert DNA.

5.1.2 SeqA fokus fordeling

Deteksjon av SeqA protein i cellene ble gjort ved å immunmerke for dette proteinet og studere fluorescensen i et mikroskop. Denne metoden er veletablert i litteraturen, sammen med lokalisering av SeqA-Gfp. Sistnevnte ble valgt bort siden resultatet vil bli mer usikkert når større endringer gjøres i cellene.

Fordelingen av fokus som ble talt opp er gitt i figur 4-4. Denne antas å være representativ for populasjonen, siden bildene den baserer seg på er tatt fra tilfeldige områder og alle cellene per bilde ble talt. Andelen celler som ble utelatt på grunn av uklare fokus vil sannsynligvis først og fremst stamme fra øvre del av fordelingen. Dette kan gi en viss underestimering av antallet fokus i cellene. Hvis noen fokus ligger på ulike plan i cellen vil dette også bidra til underestimeringen. For å undersøke denne muligheten ble det utført forsøk med konfokalmikroskop, men resultatet ble ikke tydeligere siden disse cellene er så små av størrelse. Hittil kan man si at en eventuell forskyvning av fordelingen i forhold til den reelle vil være mot lavere verdier. Det er imidlertid også to muligheter for å overestimere antallet fokus som følger replikasjonsgafler.

Som beskrevet i kapittel 2.2.2 forblir *oriC* sekvestrert i opp mot en tredjedel av syklus (Campbell og Kleckner, 1990). Det er påvist at SeqA proteinene bundet til *oriC* likevel ikke vises som separate fokus under immunmikroskopering (Hiraga *et al.*, 1998). Grunnen kan være at så få proteiner er bundet til *oriC* at de ikke gir et synlig utslag, eventuelt at de inngår i komplekset som følger gaflene.

En annen faktor som kunne gitt for høye antall fokus er at antistoffene binder til andre proteiner i prøven. Det primære antiserumet er laget mot SeqA fra *E.coli* bakterier og er rensert før bruk (se kapittel 3.5.1). Binding av antiserum er undersøkt med SDS-Page og Western blotting, og viste at det nesten utelukkende ga signal for SeqA (se figur 4-6). Proteinene er her rettet helt ut, men denne konfigurasjonsendringen fra den opprinnelige

formen vil nok ikke forårsake at noen bindinger ikke vises. Det er derfor grunn til å anta at den observerte fluorescensen kun stammer fra SeqA fokus.

Gjennomsnittlig antall fokus per celle ble funnet å være ca 3,5. Dette er forenelig med tidligere resultater hvor *E.coli* celler har blitt funnet å inneha ca 2,6 SeqA fokus når doblingstiden var 34 minutter (Hiraga *et al*, 1998; Brendler *et al*, 2000) Med en doblingstid på 42 minutter er antall BrdU fokus talt til 2,7 (Fossum *et al*, 2007). Det er naturlig å anta at disse tallene kan øke under raskere vekst. Med en tilsvarende doblingstid på 44 minutter har gjennomsnittet også blitt regnet til 4,4 fokus per celle (Molina og Skarstad, 2004). I senere forsøk med litt lavere doblingstid, 26 minutter, har blitt observert et gjennomsnitt på rundt fire fokus per celle (Morigen *et al*, innsendt manuskript). Dette snittet er ganske likt som for populasjonene dyrket under arbeidet med denne oppgaven.

5.1.3 Cellesyklus og replikasjongs-gaffelfordeling

Ut fra de eksperimentelle DNA histogrammene for hurtigvoksende *E.coli* celler har det her blitt tilpasset en teoretisk fordeling med tilhørende cellesyklus (se figur 4-2). Syklus starter med initiering i det som populært er kalt bestemorcellen. En korrekt gaffelfordeling avhenger av at denne modellen stemmer.

Det er tatt utgangspunkt i prøver tilsatt rifampicin og cephalexin som skal stoppe ny initiering og celledeling, og forutsatt at dette skjer umiddelbart (se kapittel 3.3). En forsinkelse i virkningen av det førstnevnte antibiotikumet i forhold til det siste, ville medført en for lav andel celler med fire origin, og motsatt. Med mindre forskjellen ble svært stor ville den imidlertid ikke endre hvilke antall hele kromosomer som ble observert, kun fordelingen innbyrdes mellom dem.

Antallene hele kromosomer i denne run-out prøven er beregnet med kalibrering mot en kjent intern-standard. Denne standarden inneholder celler med ett eller to kromosomer og disse tallene multipliseres bare opp for en prøve med antatt langt høyere DNA innhold. For kulturene av *E.coli* dyrket i denne oppgaven ble det beregnet at toppene inneholdt litt over fire og åtte hele kromosomer. Årsaken til dette avviket kan være at den forholdsvis påvirkningen fra FITC på Hoechst 33258 avtar for større celler. En medvirkende årsak kan også være at mengden Hoechst som binder til DNA ikke er lineær over et større intervall av sistnevnte. Det er rimelig å anta at antall kromosomekvivalenter er fire og åtte, alternativet på åtte og seksten ga en mye større differanse.

Etter å ha bestemt tidspunktet for initiering, er den resterende tilpasningen gjort til histogrammet fra de eksponentielle prøvene. En sammenstilling er vist i figur 3-6, og man kan se at overensstemmelsen mellom det teoretiske og eksperimentelle histogrammet er god. De fleste sammenlignbare kulturer har blitt dyrket med lengre doblingstid, men resultatene er forenelige med syklusfordelingen funnet her (Molina og Skarstad, 2004; Odsbu *et al*, 2005; Fossum *et al*, 2007). Det er også flere publikasjoner der varigheten av periodene er antatt å være identiske som i den første modellen for overlappende generasjoner (Copper og Helmstetter, 1968). Slike antagelser kan ha ført til feil i beregningene fordi det er stor variabilitet i varigheten av periodene avhengig av stamme og vekstbetingelser.

Hvis man studerer hvordan kromosomene er fordelt i cellene for ulike aldre (figur 4-2), vil man se at det er godt samsvar med observasjonene av DNA under mikroskoperingen. Som avbildet i figur 4-5 er DNA stort sett konsentrert til de to halvdelene av cellen, bortsett fra hos de lengste cellene der det er separert i fire områder. I den teoretiske fordelingen er de replikerende kromosomene skilt i to fram til litt før deling, når de igjen splittes og gir opphav til fire separate replikerende kromosomer.

For denne modellen vil antallet gafler per celle variere mellom 4 og 12 og 8, med et gjennomsnitt på ca 9,5 (se figur 4-3 for fordelingen).

5.1.4 Samlokalisering av replikasjonsgafler

Flere teorier har blitt drøftet angående organiseringen av replikasjonsgafler hos bakterieceller generelt, og *E.coli* spesielt. De eksperimentelle resultatene har også avveket en del for kulturer som burde være sammenlignbare.

Den enkleste teorien er at gaflene ikke er samlokalisert gjennom syklus. Dette ville gi et 1:1 forhold av gafler og SeqA fokus, noe som er funnet for *E.coli* under ulike vekstforhold (Brendler *et al*, 2000). I arbeidet dette 1:1 forholdet ble funnet var imidlertid varighetene av fasene ikke beregnet, men antatt å tilsvare tidligere funn. Replikasjonsfabrikk-modellen tar utgangspunkt i en kontinuerlig samlokalisering av de to replikasjonskompleksene fra samme origin. Denne ble originalt foreslått for *Bacillus subtilis*, en annen bakterie med overlappende generasjoner (Lemon og Grossman, 1998). Dette gir da et 2:1 forhold mellom gafler og fokus, som er funnet ved flere anledninger (Hiraga *et al*, 1998; Bach *et al*, 2003; Fossum *et al*, 2003; Molina og Skarstad, 2004; Fossum *et al*, 2007). En variant av sistnevnte

modell er at kompleksene kan skille lag etter en viss andel av elongeringen har funnet sted (Hiraga *et al*, 2000). Det vil da være mellom en og to gafler per SeqA fokus.

I denne oppgaven ble det funnet gjennomsnittlig 2,7 gafler per fokus. Dette er klart flere enn i noen av modellene drøftet over. For den som kommer nærmest, replikasjonsfabrikk-modellen, er det dessuten tydelig at fokusfordelingen (vist i figur 4-4) ikke passer. Med denne modellen burde det kun observeres celler med fokus tilsvarende halvparten av gaffelfordelingen (gitt i figur 4-3), altså to, seks eller fire. Det som imidlertid passer godt er andelen celler med to fokus. Denne ligger på så vidt over 25%, noe som er nøyaktig likt andelen celler med fire gafler fra syklusfordelingen. Cellene med to fokus var dessuten de eneste som tydelig skilte seg fra resten ved å være mindre av størrelse. Dette passer med at de er yngst i populasjonen. Ellers var det ingen klar korrelasjon mellom antall fokus og cellenes lengde.

Det blir altså her foreslått at det for cellene med fire gafler eksisterer en parvis samlokalisering. Når cellene etter den neste initieringen så går over til å inneholde tolv gafler blir strukturen mindre klar og graden av samlokalisering øker. Tidligere artikler har også foreslått tidvise strukturer der flere enn to gafler er samlet (Molina og Skarstad, 2004; Fossum *et al*, 2007). Det kan tenkes at det finnes en øvre grense for nydanning av SeqA kompleks, og at gaflene deretter bare blir rekruttert til eksisterende replikasjonskompleks. Doblingstiden under forsøkene utført i denne oppgaven er kortere enn i noen av de ovennevnte publikasjonene, dermed har sannsynligvis det maksimale antallet gafler ikke nådd et tilsvarende nivå før. Hvis det har blitt benyttet tidligere estimerte varigheter av periodene i syklus, kan blant annet også D-fase være satt for kort, og dette medføre et for lavt antall gafler.

For å få forholdet gafler til fokus ned på 2:1 må cellyklusjusteringen endres til at ingen av cellene inneholder 12 gafler, men kun 8. Dette vil, foruten å gi et DNA innhold i cellene som er godt under det eksperimentelle histogrammet, medføre en mye kortere C-fase enn noen gang tidligere observert hos *E.coli*. Alternativt måtte antallet fokus være grovt underestimert, i den grad at ett av fire fokus aldri ble talt. Dette er drøftet i kapittel 5.1.2 og virker lite trolig.

Resultatene i denne oppgaven er konsistente med forsøk gjort det siste året der *E.coli* er dyrket med tilsvarende lave doblingstider. Her er det også funnet flere enn to gafler per

fokus (Adachi *et al*, 2008; Morigen *et al*, innsendt manuskript). I det sistnevnte er det også foreslått at nye replikasjongs-gafler bindes til eksisterende SeqA strukturer.

5.2 *Vibrio cholerae*

I forsøkene utført i denne oppgaven ble kulturer av *V.cholerae* dyrket i tre ulike medier, nemlig minimal medium supplementert med fruktose eller glyserol, eller LB (se kapittel 3.2). Disse ble valgt for å gi et bredt spekter av veksthastigheter for cellene, og doblingstiden varierte da også fra henholdsvis 46 til 107 til 19 minutter. Veksthastigheten var omtrent konstant for hver reproduksjon med samme medium.

Målet var å undersøke replikasjonsmønstrene, og om replikasjongs-gaflene samlokaliserte. Som for *E.coli* ble det for hver kultur utført forsøk for å finne posisjonen til og antallet av disse gaflene.

5.2.1 Samlokalisering av SeqA og replikasjongs-gafler

Tilsvarende som for *E.coli* cellene, ble det også for *V.cholerae* benyttet SeqA som markør for posisjonene til replikasjongs-gafler i cellene. Som tidligere beskrevet binder dette proteinet seg til hemimetylerete GATC seter i DNA (se også kapittel 2.4).

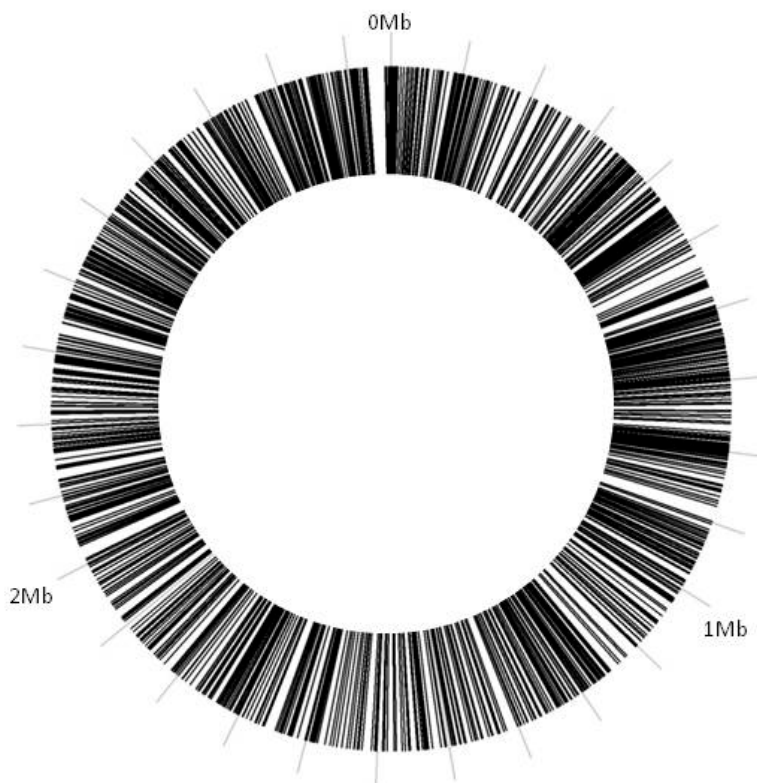
Det første kravet for at SeqA skal samlokalisere med nyreplikert DNA blir dermed at det finnes forekomster av sekvensen GATC gjennom hele genomet. I denne oppgaven er det skrevet et Java-basert program som identifiserer posisjonen til hvert av disse setene for et vilkårlig kromosom (kapittel 3.8, kode i appendiks B). Resultatene for *chrI* og *chrII* hos *V.cholerae* er vist i figur 4-43. Som man kan se er det en noenlunde jevn fordeling av setene rundt hvert kromosom, men særlig på *chrII* finnes det ett område med færre seter. Sammenligning med tilsvarende fordeling for *E.coli* (figur 4-7) viser at det hos *V.cholerae* er flere GATC seter.

DNA sekvensene benyttet i programmet "gatcseter" er hentet fra en annen stamme enn den som ble dyrket i denne oppgaven. Men siden sistnevnte er avledet fra den sekvenserte ved kun å fjerne noen få gener, er sirkeldiagrammet i verste fall bare for omfattende (Mohapatra *et al*, 2008).

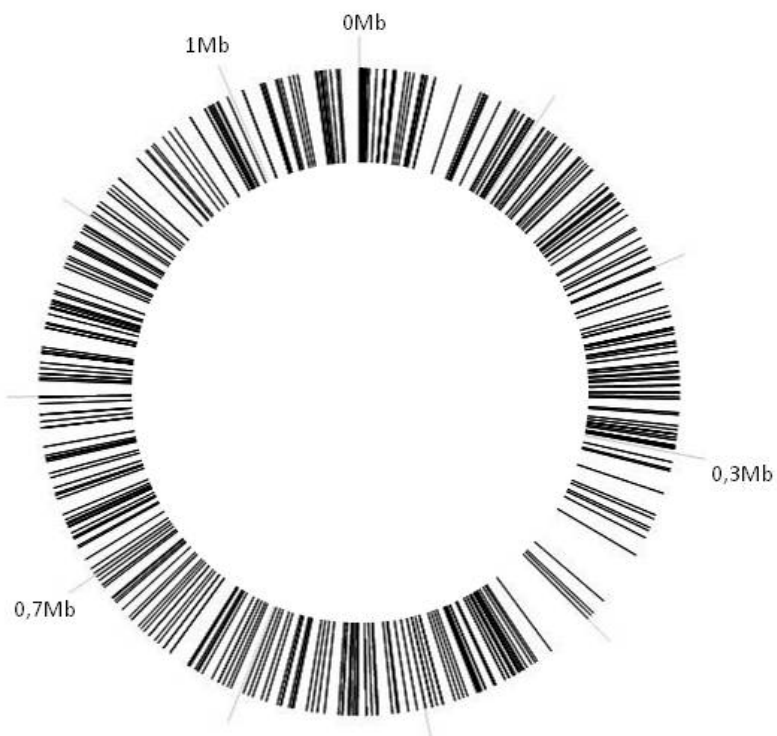
Som diskutert for *E.coli* er det ikke tilstrekkelig med mange bindings seter for SeqA, de må også være rett posisjonert innbyrdes (kapittel 5.1.1). Proteinet binder til to og to GATC seter lokalisert på den samme siden av DNA dobbelheliksen (Brendler og Austin, 1999). Ved å se på slike forekomster, der avstanden mellom setene ikke overstiger 31 baser, ble en jevn fordeling funnet for *E.coli* (Brendler *et al*, 2000). Med utgangspunkt i disse kriteriene ble det i denne oppgaven skrevet ytterligere et program, ”gatcsetepar”, slik at tilsvarende fordelinger kunne lages for kromosomene til *V.cholerae* (se også kapittel 3.8). Dette programmet ble testet på kromosomet til *E.coli*, og ga en lik fordeling som den tidligere publiserte (data ikke vist). Resultatet for kromosomene til *V.cholerae* er framstilt i figur 5-1.

Disse fordelingene gjenspeiler til en viss grad plottene der alle GATC setene på kromosomene er tegnet inn (figur 4-43). Imidlertid er forskjellen rundt på kromosomene nå mindre, og området på *chrII* med litt færre seter skiller seg ikke vesentlig ut. I disse fordelingene er hvert par med passende avstand plottet som funksjon av sin posisjon på kromosomet, og usikkerheten knyttet til å operere med vinduer for setene forsvinner. De godkjente avstandene fra G'en i det første til det andre setet er valgt til 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 29, 30 og 31 (Brendler *et al*, 2000). Frekvensen av slike GATC par på genomet til *V.cholerae* var omtrent identisk som for *E.coli*. På grunnlag av oppbygningen av kromosomene, burde dermed immunmerking av SeqA gi et minst like godt resultat for disse bakteriene.

a) Par av GATC seter med passende avstander på *chrI*.



b) Par av GATC seter med passende avstander på *chrII*.



Figur 5-1. Fordeling av par av GATC seter på chrI og chrII. Kun par der avstanden mellom setene er 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 29, 30 eller 31 baser er godtatt. Hver strek representerer et par.

5.2.2 SeqA fokus fordeling

Deteksjonen av SeqA ble gjort ved å immunmerke cellene for dette proteinet og deretter studere fluorescensfokusene i mikroskopet. Denne metoden har ikke tidligere blitt benyttet for prøver av *V.cholerae*. I en tidligere publikasjon har det blitt studert celler med et plasmid som inneholder genet mcherry-seqA (Srivastava og Chattoraj, 2007). Fluorescensen fra dette genproduktet ble registrert som SeqA fokus. MCherry er et stort protein man ikke kan utelukke at påvirker SeqA og cellene, dessuten vil det også bli produsert umerket kromosomalt SeqA som ikke detekteres. Andre prosedyrer, som pulsmerking med BrdU, er ikke funnet utført i litteraturen.

Det primære antiserumet er det samme som tidligere og er opprinnelig laget mot SeqA fra *E.coli* bakterier. Bindingen av rensset antiserum til protein fra *V.cholerae* er undersøkt med SDS-Page og Western blotting (se kapittel 4.2.4). Resultatet viser helt klart at antiserumet også binder til SeqA i disse cellene, videre at det er til dette proteinet den største mengden bindes. Se også figur 4-42 (vi husker at båndet ved 28kDa vandret ned til 18kDa når mengden SDS ble doblet ved senere forsøk). Innholdet av SeqA synes å være konstant for celler med ulik veksthastighet. Av annen binding er det kun synlig et bånd for et protein med en molekylvekt på rundt 70kDa. Dette ble også observert for *E.coli* prøven (se figur 4-6), og det er muligens det samme proteinet for begge bakteriene. I *E.coli* var dette båndet forholdsvis mye svakere sammenlignet med fluorescensen fra SeqA, dette kan skyldes at antiserumet binder mye kraftigere til SeqA i *E.coli* enn *V.cholerae*.

Også for disse cellene blir det et spørsmål om sekvestrering av *oriCI* og *oriCII* vil medføre ekstra SeqA fokus som ikke skyldes replikasjongsafler. Begge origin inneholder flere GATC seter (Egan *et al*, 2005), og det er nylig vist at DNA forblir hemimetylert en lengre periode i både *oriCI* og *oriCII* etter initiering (Saint-Dic *et al*, 2008). Dette kan ikke avkrefte direkte uten å merke celler for både SeqA og et protein i replisomet, for eksempel DnaB, og undersøke om disse samlokaliserer. Men hvis originene skulle vises som fokus, ville dette medført opp mot fire ekstra fokus for cellene dyrket i minimal medium, noe som er flere enn det maksimale antallet observert totalt (se figur 4-18 og 4-33).

De to fattigste mediene, supplementert med henholdsvis fruktose og glyserol, ga gjennomsnittlig 1,0 og 0,3 fokus per celle for kulturene som ble dyrket (se figur 4-18a og 4-33a for fordelingene). At dette tallet avhenger av veksthastigheten er fornuftig. De

førstnevnte cellene inneholdt opp til tre fokus, men de mer saktevoksende maksimalt to. I og med at begge disse populasjonene vokser uten overlappende replikasjonsrunder, ville det vært rimelig å tro at man skulle se de samme antallene fokus, bare med ulik innbyrdes fordeling. At det ikke blir observert celler med tre fokus hos populasjonen dyrket med glyserol kan være et tegn på at antallet fokus her blir underestimert. Dette er også celler som er svært små, og med svakere fokus. På den andre siden er det kun 5% av cellene fra fruktosemediet som har tre fokus, for en lavere andel av C-fase celler kan det hende at slike tilfeldigvis ikke telles.

De saktevoksende cellene som er studert har noen ganger hatt ett sterkt fokus sentralt i cellen (se figur 4-19). I og med at observasjonen oftest ble gjort for celler med septumformasjon, er cellene antatt å være i D-fase. Dette har dessuten blitt bekreftet ved sortering av cellene dyrket i fruktosemediet. Fenomenet forklares lettest ved å vise til oversikten som er laget for segregasjonsmønsteret til *oriCI* og *terCI* i figur 2-10a. Når *terCI* ikke blir observert å splitte seg før deling (Srivastava *et al*, 2006), er det også mulig at et SeqA kompleks kan holde stand gjennom denne perioden. For eventualiteten av at *terCII* oppfører seg likt, vil kanskje dette forsterke intensiteten til fokuset (figur 2-10b). Det er nettopp den høye lysstyrken på fluorescensen, som indikerer en stor mengde SeqA, som gjør at disse fokusene skiller seg ut. Man kunne også tenke seg at SeqA har en annen oppgave i cellene ved deling, eller bare lagres i denne posisjonen fram til adskillelsen. At det ikke er registrert tilsvarende fokus hos de hurtigvoksende cellene (se figur 4-40b) motstrider teorien om at SeqA har andre oppgaver ved deling. De hurtigvoksende cellene har overlappende sykluser og har konstant replikasjongsafler gående. Det vil da ikke eksistere et lagringsbehov for SeqA ved delingen. En siste eventualitet er at fokuset forårsakes av det kryssreagerende 70kDa store proteinet som ble observert med Western blot (figur 4-42).

Kulturene dyrket i LB har, som nevnt i forrige avsnitt, overlappende replikasjonsrunder. Fordelingen av SeqA fokus spenner fra ett til seks per celle, med et gjennomsnittlig antall på 2,5 (se figur 4-40a for fordelingen). At det ikke ble observert noen celler uten fokus er et tegn på at metoden og antiserumet fungerer tilfredsstillende også for *V.cholerae*. Dette er konsistent med tidligere forsøk, med likt medium og nesten lik doblingstid, der det er funnet flest celler med tre fokus og en fordeling som strekker seg mellom ett og seks fokus (Srivastava og Chattoraj, 2007). Hvis man ser på forsøkene utført i denne oppgaven er det hos disse hurtigvoksende celler det er størst risiko for å underestimere

antallet SeqA fokus. Det ble observert ca 15% celler med uklare fokus, og disse vil sannsynligvis stort sett være blant cellene med flest fokus i fordelingen.

5.2.3 Cellesyklus og replikasjongsaffordeling

Cellessyklus er for populasjonene av *V.cholerae* i denne oppgaven beregnet fra de eksperimentelle DNA histogrammene for eksponentielt voksende kulturer. Fikserte prøver er farget med Hoechst 33258, og målt fluorescens fra med et flowcytometer.

Celler uten overlappende replikasjonsrunder

Kulturene uten overlappende generasjoner har DNA histogram som likner på tilsvarende for eukaryoter, der det er klart at de inneholder celler med fra ett til to kopier av genomet (figur 4-8 og 4-23). Dette er tilsvarende som for saktevoksende *E.coli* bakterier (Boye *et al*, 1996). Den første toppen inneholder B-fase celler med en kopi av *chrI* og en kopi av *chrII*. Den andre består av celler i D-fase, med to kopier av hvert kromosom.

Under forsøk med *E.coli* celler kan man tilsette rifampicin og cephalexin til den eksponentielt voksende prøven, som forklart i kapittel 3.3 hindrer dette ny initiering og celledeling (Skarstad *et al*, 1986; Boye og Løbner-Olesen, 1991). Teoretisk ville dette for *V.cholerae* cellene gitt andelen celler i B-fase, eventuelt også en andel celler som kun hadde startet replikasjon av *chrI*. Imidlertid er det vist at initiering fra *oriCII* stoppes med en forsinkelse i forhold til initiering fra *oriCI* (Rasmussen *et al*, 2007). Dette kan tyde på at initiering av replikasjon for *chrII* er en begivenhet som er koblet til replikasjonen av *chrI*. Det kan for eksempel tenkes at det finnes et visst punkt på *chrI* som, etter det ble replikert, igangsetter replikasjon av *chrII*. Men selv om det finnes en slik forsinkelse burde andelen celler i B-fase toppen hos saktevoksende kulturer tilsatt antibiotika bli korrekt, så lenge *chrII* ikke starter replikasjon før *chrI*. For cellene i fruktosemediet er et slikt DNA histogram vist i figur 4-10. De mer saktevoksende cellene i glyserolmediet sto med antibiotikaene over natten, noe som fikk så mange celler til å gå i oppløsning at histogrammene ikke kan regnes som pålitelige (data ikke vist).

For å finne andelene i B-, C- og D-fase ble det i stedet benyttet et simuleringsprogram, detaljene er gitt i kapittel 3.6.2 (Rasmussen *et al*, 2007). Dette programmet gir ikke automatisk den beste tilpasningen til det eksperimentelle DNA histogrammet, men er avhengig av at det utføres mange iterasjoner for å gi et godt resultat. Det ble diskutert flere modeller for når *chrII* initierte replikasjon (se ”Replikasjonsgaffelfordeling” i kapittel 4.2.1

for celler dyrket i fruktosemedium og 4.2.2 for glyserolmedium). I figur 2-8 er det laget en illustrasjon av to modeller som er foreslått i tidligere publikasjoner, termineringssynkroni og initieringssynkroni mellom kromosomene (Rasmussen *et al*, 2007; Egan *et al*, 2004). Det ble dessuten fremlagt en ny modell der initiering av *chrII* finner sted ved et gitt punkt i syklus (se "hoppkanten" i figur 3-8). Etter å ha redigert simuleringsprogrammet, slik at forholdet mellom replikasjonsratene til kromosomene kunne endres, ble det også sett på en kombinert modell der *chrII* både initierte ved denne hoppkanten og terminerte synkront med *chrI*.

De teoretiske DNA histogrammene for initieringssynkroni-modellen stemte svært dårlig overens med de eksperimentelle (figur 4-9b og 4-24b). For cellene dyrket i fruktosemediet ble det dessuten, som nevnt over, funnet en andel celler i B-toppen ved å se på replikasjons run-out prøven. Denne andelen lå på nesten 10 prosentpoeng under den beregnede med bruk av denne modellen. Årsaken til at denne modellen ble foreslått var nettopp en replikasjons run-out prøve hvor det bare ble observert to topper i DNA histogrammet. I lys av at initiering hindres med en forsinkelse ved *oriCII* i forhold til *oriCI* (Rasmussen *et al*, 2007), er det nå klart at et slikt histogram ikke indikerer at replikasjon starter samtidig hos begge kromosomer. Vi konkluderer at det er svært usannsynlig at *chrI* og *chrII* hos *V.cholerae* er regulert slik at de initierer samtidig.

Hvis man ser på termineringssynkroni- og hoppkant-modellene, der initiering av *chrII* skjer senere i C_I perioden, passer simuleringene av begge to godt overens med DNA histogrammet for celler i fruktosemediet (illustrasjoner av modellene i figur 4-11 og 4-13). Man ser imidlertid at det for termineringssynkroni-modellen blir et avvik omtrent halvveis i C-fase (figur 4-9a). I denne oppgaven er det på grunnlag av dette foreslått en ny modell, som tar høyde for observasjonen av at antallet celler per intervall brått faller. Fallet skyldes at raten av DNA replikasjon i cellene øker, og det er rimelig å anta at initieringen av *chrII* finner sted ved dette punktet. Simuleringen av DNA fordelingen i populasjonen for denne hoppkant-modellen stemmer svært godt med den eksperimentelle fordelingen (figur 4-9c). Men med hoppkant-modellen vil man få at C-fase varer lengre for cellene i fruktosemediet enn i glyserolmediet (sammenlikning av figur 4-13 og figur 4-28). For saktevoksende *E.coli* bakterier er det motsatte tilfellet, C-fase minker med doblingstiden (Skarstad *et al*, 1985). Hos kulturer med denne doblingstiden vil en så lang C-fase gi en D-fase på kun 6 minutter,

noe som er en urealistisk kort periode⁴. Andelen celler i C_{II} blir her også liten i forhold til andelen i C_I . Begge modellene gir andeler B-fase celler som stemmer bra med run-out prøven, termineringssynkroni gir et par prosent over og hoppkant-modellen et par prosent under.

Den mest sannsynlige muligheten er en mellomting av de to siste modellene. Siden et delt genom også muliggjør en kortere doblingstid for *V.cholerae* celler, ville en synkron terminering av to kromosomer med ulik størrelse, fremstå som unødvendig presist. Ved å la *chrII* terminere litt før, sikres det at deling i alle fall ikke vil forsinkes av det minste kromosomet. Men alt er til nå regnet ut fra at replikasjonsraten er konstant for de to kromosomene, noe som ikke er bevist for saktevoksende *V.cholerae*. Hvis *chrII* bruker lengre tid på å duplisere DNA enn antatt, kan godt initiering av *oriCII* finne sted ved det antatte punktet, i tillegg til at *terCI* og *terCII* nåes samtidig. Simulering av dette tilfellet ble foretatt etter redigering av to-kromosom-programmet, siden replikasjonsratene der var satt like. Denne simuleringen ga det beste samsvaret med eksperimentelle data hittil (figur 4-15). En illustrert oversikt av den beregnede cellyklusen for hoppkant-modellen med termineringssynkroni er gitt i figur 4-16, hvor vi også ser at varigheten av fasene virker rimelig. For å undersøke replikasjonsratene nærmere er det mulig å utføre forsøk, for eksempel Southern blotting eller kvantitativ PCR, for å finne *ori/ter* ratioene. Fra disse kan så C_I og C_{II} beregnes. Men siden doblingstiden under disse vekstforholdene er ganske lang, vil dette muligens heller ikke gi enstydige resultater.

For cellene dyrket i glyserolmediet har det også blitt laget simuleringer av termineringssynkroni-modellen og hoppkant-modellene der replikasjonen av *chrII* avsluttes litt før eller på likt med *chrI* (se illustrasjon av modellene i henholdsvis figur 4-25, 4-28 og 4-31). Overensstemmelsen mellom det teoretiske og eksperimentelle DNA histogrammet ble omtrent like god for alle tre (figur 4-24a, 4-27 og 4-30). Når disse kulturene har så lav doblingstid og dermed få celler i C-fase, vil fine forskjeller i replikasjonsmønsteret bli vanskelige å vurdere. Det er imidlertid klart at det også her kan observeres et punkt der

⁴ Dette kan i alle fall delvis forklares med egenskaper ved simuleringsprogrammet. En medvirkende årsak til at D-fase blir så kort er at to-kromosom-programmet (Rasmussen *et al*, 2007) ikke gir anledning til å redigere standardavviket til C-fase intervallet. Et lavt standardavvik for en skarp D-fase topp vil medføre at en for stor andel av cellene fra denne toppen beregnes til å være i C-fase. Dette blir mest tydelig for hoppkantmodellen, der det er flere celler i siste del av C-fase enn med termineringssynkroni-modellen.

stigningskoeffisienten i C-fase endres, og at dette ligger for tidlig i forhold til termineringssynkroni-modellen.

En ytterligere undersøkelse av kinetikken i syklus ble foretatt ved bruk av en metode utviklet i denne oppgaven. Celler dyrket i fruktosemediet ble sortert på grunnlag av DNA innhold og deretter immunmerket. Det ble valgt celler fra B-, tidlig C-, sen C- og D-fase (se intervaller i figur 4-20). Det viste seg at ingen celler fra tidlig i C-fasen inneholdt over to SeqA fokus, blant cellene i sen C-fase ble det derimot observert en signifikant andel med tre fokus (se figur 4-21). For å kunne observere tre fokus må cellene inneholde flere enn to replikasjongsafkler. Vi kan altså konkludere med at replikasjon av *chrII* finner sted samtidig som den siste delen av replikasjonen av *chrI*.

Replikasjonsgaffelfordelingen endres logisk nok ikke stort selv om initieringen av replikasjon for *chrII* flyttes med noen minutter. For de mest saktevoksende kulturene, dyrket i minimal medium og supplementert med glyserol, ligger gjennomsnittlig antall gafler per celle på ca 0,6 for de tre mulige modellene (figur 4-26, 4-29 og 4-32). Når karbonkilden endres til fruktose, og doblingstiden minker, lå gjennomsnittet på rundt 1,6 gafler per celle⁵.

Celler med overlappende replikasjonsrunder

V.cholerae kulturene som ble dyrket i LB medium hadde en doblingstid på rundt 19 minutter. DNA fordelingen på histogramform for et av forsøkene er vist i figur 4-34. For denne spenner mengden DNA i cellene fra minst 9,5Mb til det dobbelte. Det er dermed klart at disse cellene, i likhet med *E.coli*, kan ha overlappende replikasjonsrunder.

DNA histogrammet for den eksponentielle prøven er avgjørende for diskusjonen av modeller for cellyklus. Det er dermed viktig at skalaen på DNA akse er helt korrekt. For histogrammet vist i figur 4-34 er DNA mengden beregnet ved hjelp av en standard med saktevoksende *V.cholerae* (se kapittel 3.4.3). Vi husker at dette ikke ble absolutt korrekt for hurtigvoksende kulturer av *E.coli*, ved høye verdier av DNA i cellene ble disse overestimert (kapittel 5.1.3). For å kontrollere skalaen, ble det derfor målt histogrammer for eksponentielle prøver av *V.cholerae* dyrket i LB vekselvis med run-out prøver av *E.coli* (figur 4-1b) og prøver av standarden av *V.cholerae*. Ingen av prøvene ble farget med FITC,

⁵ Gafler per celle var gjennomsnittlig 1,5 for termineringssynkroni-modellen (fordelingen er gitt i figur 4-12) og 1,7 med hoppkant-modellen der replikasjonsratene for kromosomene var identiske (figur 4-14). For hoppkant-modellen med termineringssynkroni var det gjennomsnittlig 1,6 gafler per celle (figur 4-17).

og de inneholdt da heller ingen intern-standard. Når disse målingene er konstante ble det, ved å kalibrere mot hver av de to kjente prøvene, i begge tilfeller beregnet et DNA innhold fra 9,3Mb til 18,6Mb for *V.cholerae* dyrket i LB. Poenget med denne fremgangsmåten var å fjerne usikkerheten knyttet til eventuell varierende påvirkning mellom FITC og Hoechst 33258 i cellene. Vi så altså at denne også for *V.cholerae* avtok litt for høyere DNA verdier. Det eneste som nå ikke kan utelukkes er at bindingen mellom Hoechst og DNA ikke er lineær. Selv om DNA aksene ble kalibrert mot tilsvarende hos *E.coli* celler med like høye verdier, kan dette være annerledes for *V.cholerae*. Det er imidlertid lite trolig siden DNA sannsynligvis er ganske likt pakket hos disse bakteriene.

I denne oppgaven er det først funnet en modell A for cellesyklus ved å anslå ulike parametre for fasene. Siden termineringssynkroni mellom *chrI* og *chrII* ga gode resultater for saktevoksende celler, er det tatt utgangspunkt i at dette også kan antas for mer hurtigvoksende. Varigheten av C-periodene, $C_I = 25\text{min}$ og $C_{II} = 9\text{min}$, er tatt fra en tidligere publikasjon hvor de er beregnet med data fra Southern blotting (Srivastava og Chattoraj, 2007). Dette er ikke en metode som nødvendigvis gir eksakte resultater, men her stemmer også tallene godt overens med resultater fra de saktevoksende kulturrene. I denne oppgaven ble kulturer med doblingstider på 107 minutter og 46 minutter funnet å ha perioder på henholdsvis $C_I=29\text{min}$, $C_{II}=13\text{min}$, og $C_I=26\text{min}$, $C_{II}=12\text{min}$ (figur 4-31 og 4-16)⁶. For stadig rikere medium og hurtigere vekst vil sannsynligvis replikasjonsperiodene i alle fall ikke øke, og her ble da også C_I og C_{II} beregnet å synke. At varigheten av C_{II} synker forholdsvis mest virker å være fornuftig siden replikasjonsraten til *chrII* sannsynligvis vil være så høy som mulig under hurtig vekst. Vi husker den var satt litt lavere enn raten til *chrI* i cellene uten overlappende generasjoner. Varigheten av D-fase er satt lik den for celler dyrket i fruktosemedium. Modell A er illustrert i figur 4-35.

Med modell A får man initiering av replikasjon i foregående generasjon for begge kromosomene. Det har tidligere blitt observert opp til fire fokus av både *oriCI* og *oriCII* med FISH for *V.cholerae* kulturer i LB medium med en doblingstid på 25 minutter (Saint-Dic *et al*, 2008). Dette virker å være i samsvar med modell A. I nevnte artikkel var det også foretatt

⁶ Tallene er for hoppkant-modellen med termineringssynkroni. Tilsvarende tall for termineringssynkroni-modellen er henholdsvis $C_I=30\text{min}$, $C_{II}=11\text{min}$, og $C_I=27\text{min}$, $C_{II}=10\text{min}$ for de svært saktevoksende i glyserolmediet og de saktevoksende i fruktosemediet (figur 4-25 og 4-11). Hoppkant-modellen uten termineringssynkroni ga ikke varigheter av fasene som virket troverdige.

replikasjons run-out forsøk som viste topper ved 2+2 og 4+4 kromosomekvivalenter. Disse histogrammene står i kontrast til resultater i denne oppgaven og tidligere forsøk (figur C-1; Srivastava og Chatteraj, 2007), men stemmer med modell A i figur 4-35 hvis *oriCII* hindres i å initiere senere enn *oriCI*. Som tidligere foreslått vil da replikasjon av *chrII* initieres når replikasjonen av *chrI* har nådd et visst punkt, uavhengig av de tilsatte antibiotikaene (se forrige delkapittel).

Hvis man ser på en sammenstilling av det teoretiske og det eksperimentelle DNA histogrammet, blir det klart at modell A har alvorlig svakheter (figur 4-37a). Fasongen stemmer dårlig med DNA histogrammet for prøven, dessuten vil cellene ikke inneholde tilstrekkelige mengder DNA til at det er forenelig med prøven. Selv om man redigerer histogrammet ned til å starte i 9,3Mb og slutte i 18,6Mb, er forskjellen fremdeles svært stor.

For å bedre samsvaret med den eksperimentelle fordelingen hos cellene i eksponentiell vekst, ble varigheten av C- og D-fasene i syklus økt. D-fase var tidligere satt til å være på nivå med mer saktevoksende celler, uten overlappende replikasjonsrunder. Den nye modellen, B, er illustrert i figur 4-38, og man ser at her startes replikasjon av *chrI* alt i bestemorgenerasjonen. Tilsvarende var tilfellet for hurtigvoksende *E.coli* celler (se figur 4-2). Det tilhørende teoretiske DNA histogrammet passer svært godt med det eksperimentelle (se figur 4-37b).

Ratioen *oriCI/oriCII* i celler dyrket i LB er tidligere blitt målt til omtrent eller såvidt over to (Rasmussen *et al*, 2007; Srivastava og Chatteraj, 2007). I den sistnevnte artikkelen ble det hevdet at *chrII* ikke initierte i foregående generasjoner, noe som, ut fra å se på ratioen og DNA innholdet i cellene under ett, virker feil. At dette var feil kunne egentlig allerede blitt påstått etter observasjoner av fire *oriCII* fokus i tilsvarende celler (Saint-Dic *et al*, 2008). En ratio av *oriCI/oriCII* på rundt to støtter opp om modell B der *chrI* initierer i bestemorgenerasjon (figur 4-38).

Antallet kopier av *oriCI* med modell B blir opp mot det dobbelte av tidligere observasjoner av antall *oriCI* fokus for tilsvarende celler (Srivastava og Chatteraj, 2007; Saint-Dic *et al*, 2008). Dette behøver imidlertid ikke å ha noen betydning siden det er store likheter mellom *chrI* og kromosomet til *E.coli*, og det for sistnevnte er funnet en langvarig samlokalisering av søster origin (Fossum *et al*, 2007). At perioden med D-fase blir lengre når doblingstiden minker kan virke lite logisk. Men dette kan skyldes at nå overlapper flere

replikasjonsrunder i cellene, og at en økende grad av påbegynte kromosomer kan bruke lengre tid på å bli organisert før deling. Det har nylig blitt vist at varigheten av D-fase i *E.coli* celler kan øke for minkende doblingstider (Morigen *et al*, innsendt manuskript). Dette var når cellene gikk fra å initiere i morgenerasjonen til å initiere i bestemorgenerasjonen.

Alt i alt er det modell B som virker mest sannsynlig. For denne vil det finnes fra fire til seksten replikasjongs-gafler per celle, med et gjennomsnitt på ca 11,8 (se fordeling i figur 4-39).

5.2.4 Samlokalisering av replikasjongs-gafler

Celler uten overlappende replikasjongsrunder

Hvis vi starter med å se på de mest saktevoksende kulturene dyrket i glyserolmediet, er det her ca 17% celler med to replikasjongs-gafler og 6% med fire (figur 4-32). Disse tallene er hentet fra simuleringer av hoppkant-modellen med termineringssynkroni, men forskjellen mellom denne og de andre sannsynlige modellene er liten. Man kan så sammenligne disse resultatene for replikasjongs-gaflene med fordelingen av SeqA fokus i prøvene, der 21% av cellene er talt til å inneholde ett fokus og 5% til å ha to (figur 4-33). Andelene med fire gafler og to fokus er omtrent like, noe som innbyr til å anta en parvis samlokalisering av gafler. Andelen som har ett fokus er litt høyere enn tilsvarende med to gafler. Men fra kvalitative iakttagelser av cellene, ble rundt 4% av totalen vurdert å være celler som befant seg i D-fase og likevel inneholdt ett fokus (figur 4-19a). Disse vil da ha avsluttet replikasjon av DNA og dermed ikke inneholde gafler lenger. Andelene i populasjonen med fire og to replikasjongs-gafler stemmer nå svært godt med andelene med to og ett fokus. Ut fra dette er det mest rimelig å anta at hvert par med gafler er samlokalisert i disse saktevoksende cellene.

Kulturene dyrket i fruktosemediet er også saktevoksende celler, i den forstand at replikasjongsrundene ikke overlapper mellom generasjonene. De doblet seg likevel på under halve tiden av populasjonene dyrket i glyserolmediet. Med den beregnede inndelingen mellom fasene til hoppkant-modellen med termineringssynkroni, vil andelene celler med to og fire replikasjongs-gafler her ligge på henholdsvis 37% og 21% til en hver tid (figur 4-17). Fordelingen av SeqA fokus i populasjonen viser at det er 54% av cellene som har ett fokus, 15% har to og 5% har tre fokus (figur 4-18). Tilsvarende som for kulturer dyrket i glyserolmediet, kan man nå trekke fra andelen celler som ble observert med ett fokus til tross for at de var i D-fase (se figur 4-19b). Denne lå her på rundt 7% av cellene totalt. Likevel er

andelen celler uten replikasjongs-gafler høy i forhold til andelen som antas ikke å inneholde SeqA fokus der det pågår gafler (42% uten gafler mot $26\%+7\%=33\%$ "uten" fokus).

Under sorteringen av kulturene viste det seg imidlertid at mange av cellene i D-fase inneholdt fokus. Dette er celler som med stor sannsynlighet ikke har replikasjongs-gafler gående, siden området de ble sortert fra er godt separert fra C-fase (jevnfør oransje intervall i figur 4-20). Rundt 18% av disse cellene som har to til tre fokus (se figur 4-21), noe som medfører at en total andel på rundt 4% bør trekkes fra flerfokus cellene. En tilsvarende utregning av den totale andelen av D-fase celler med ett fokus gir ca 14%, noe som avviker litt fra den observerte andelen på 7% under immunmerkingen av hele populasjonen. Dette kan ha flere grunner, og det er i alle fall trolig at den første bidrar. Anslaget under den totale tellingen kan ha vært forsiktig siden bare de lengste cellene ble medregnet. Andelen D-fase celler kan være for høy, noe som støtter en modell der *chrII* terminerer litt tidligere (se figur 4-13). En annen forklaring kan være at disse cellene er sortert fra den siste delen av D-fase, og den høye andelen celler med ett fokus skyldes at dette fokuset ikke "henger igjen" etter fullført replikasjon, men derimot oppstår fram mot septumformasjon. Hvis fokuset ikke forårsakes av et annet protein, kan dermed SeqA ha flere ukjente funksjoner i *V.cholerae*, dette er en mulig oppgave til senere granskning.

Når andelene celler i D-fase med fokus fjernes fra betraktningen, står man igjen med en andel celler med ett fokus på 40% (eventuelt litt høyere, som diskutert over) og en andel med to og tre fokus på ca 16%. Dette er i overensstemmelse med at det også her finnes en parvis samlokalisering av replikasjongs-gaflene. Ved å tenke seg at *chrII* terminerer så vidt før *chrI*, vil andelen med to gafler stige og fire gafler synke, og samsvaret blir enda bedre. Noen få prosent av flerfokus cellene inneholdt tre SeqA fokus, dette kan tyde på at denne samlokaliseringen ikke er rigid, men at replikasjongs-gaflene er splittet i deler av syklus. Dette kan også være en dynamisk prosess. Fra at andelen celler med to gafler og ett fokus passer godt overens, kan det i tillegg være fristende å tro at gaflene på *chrI* sitter sammen og at det er gaflene på *chrII* som tidvis beveger seg fra hverandre. Men dette er en hypotese som ikke kan bekreftes, i og med at det ikke kan skilles mellom gaflene på de to kromosomene. Det måtte i så fall vært hvis det er ulike proteiner tilstede i de to replisomene, men det er ikke funnet noe i litteraturen som tyder på dette.

Cellene dyrket i glyserolmediet har en mye mindre andel C-fase celler, noe som kan forklare fraværet av talte celler med tre fokus.

Celler med overlappende replikasjonsrunder

Med en antagelse om at modell B, hvor replikasjon av *chrI* startet i bestemorgenerasjonen (figur 4-38), stemmer, vil cellene ha et gjennomsnitt på 11,8 replikasjongafler. I populasjonen vil omtrent 61% inneholde fire gafler, 5% åtte gafler og 34% seksten gafler (fra fordelingen i figur 4-39). SeqA fokus fordelingen spenner fra ett fokus til iallefall seks (se figur 4-40 og figur 4-41), med et gjennomsnitt på 2,5. Dette gir et gjennomsnittlig antall gafler per fokus på 4,7, og klart samlokalisering.

Andelen celler med ett og to fokus er til sammen på rundt 56% og omfatter de minste cellene i populasjonen (se figur 4-40). På grunnlag av størrelsen kan dette godt tilsvare de yngste cellene med fire replikasjongafler (se figur 4-38 for modellen). Replikasjongaflene vil dermed samlokalisere tilnærmet parvis når det ikke er mange pågående gafler samtidig. Dette blir som situasjonen for de mer saktevoksende cellene (se forrige avsnitt). Når antallet gafler så dobles og, nesten umiddelbart etter, dobles igjen, virker mønsteret å bryte sammen. Antallet SeqA fokus øker, men dette skjer ikke i takt med replikasjongaflene og vi får en mye høyere grad av samlokalisering. Dette er tilsvarende prosesser som finner sted hos hurtigvoksende *E.coli* celler, se kapittel 5.1.4.

5.2.5 Avsluttende merknader

For begge bakteriene benyttet i denne oppgaven ble det funnet en samlokalisering av replikasjongafler. Hos *E.coli* celler er dette blitt påvist flere ganger tidligere (blant annet Hiraga *et al*, 1998; Onogi *et al*, 1999; Fossum *et al*, 2003; Molina og Skarstad, 2004), selv om det også finnes motstridende observasjoner (Brendler *et al*, 2000). Tilsvarende forsøk er derimot nye for *V.cholerae*, og disse cellene viste en enda høyere grad av samlokalisering mellom gaflene under replikasjonen. Det ser ut som at dette er en viktigere mekanisme her enn i *E.coli* celler, noe som kan skyldes det delte genomet. Samlokaliseringen økte også under hurtigere vekst av kulturene. Sett under ett kan dette tyde på at når antallet samtidige replikasjongafler i celler øker, gir dette behov for en stadig større grad av organisering.

Det minste kromosomet hos *V.cholerae* har et plasmid-liknende origin (Egan og Waldor, 2003). Plasmider er normalt inkompatible og initierer mer tilfeldig gjennom syklus, selv om en viss synkroni kan oppnås ved sekvestrering, som hos plasmid P1 i *E.coli* (Brendler *et al*, 1995). For saktevoksende *V. cholerae* er det tidligere vist at både kromosom I og kromosom II har en interinitieringstid som tilsvarer doblingstiden av kulturene (Egan *et*

al, 2004). I denne oppgaven er det videre funnet at kromosomet II kan initiere replikasjon i tidligere generasjoner, noe som er en ny observasjon for denne gruppen av origin. Det kan virke rimelig å tro at initiering av *oriCII* er koplet til replikasjonen av kromosom I.

Det er blitt vist at under sakte vekst vil kromosom II i *V. cholerae* celler replikere i den siste delen av C_I perioden. Et naturlig videre arbeid vil være å måle *ori/ter* ratioene med kvantitativ PCR, for eventuelt å bestemme forholdet mellom replikasjonsratene. Annet interessant videre arbeid ville vært å undersøke de intense fokusene ved septum nærmere (figur 4-19). En mulig start ville vært å merke celler for både SeqA og et protein i replisomet, dette kunne i tillegg gi informasjon om avstanden mellom replisomene og SeqA strukturene. Andre prosedyrer for rensingen av anti-SeqA serumet, som søylekromatografi, kunne også forsøkes før immunmerkingen.

Kildeliste

- Adachi, S., T. Fukushima, and S. Hiraga (2008). *Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of Escherichia coli*. *Genes to Cells*. **13**(2): p. 181-197.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, Garland Science.
- Bach, T., M.A. Krekling, and K. Skarstad (2003). *Excess SeqA prolongs sequestration of oriC and delays nucleoid segregation and cell division*. *Embo Journal*. **22**(2): p. 315-323.
- Bates, D. and N. Kleckner (2005). *Chromosome and replisome dynamics in E. coli: Loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation*. *Cell*. **121**(6): p. 899-911.
- Blattner, F.R., et al. (1997). *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. *Science*. **277**(5331): p. 1453-1462.
- Boye, E. and A. Lobnerolesen (1991). *Bacterial-Growth Control Studied by Flow-Cytometry*. *Research in Microbiology*. **142**(2-3): p. 131-135.
- Boye, E., A. Lobner-Olesen, and K. Skarstad (2000). *Limiting DNA replication to once and only once*. *Embo Reports*. **1**(6): p. 479-483.
- Boye, E., T. Stokke, N. Kleckner, and K. Skarstad (1996). *Coordinating DNA replication initiation with cell growth: Differential roles for DnaA and SeqA proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**(22): p. 12206-12211.
- Brendler, T., A. Abeles, and S. Austin (1995). *A Protein That Binds to the P1 Origin Core and the Oric 13mer Region in a Methylation-Specific Fashion Is the Product of the Host SeqA Gene*. *Embo Journal*. **14**(16): p. 4083-4089.
- Brendler, T. and S. Austin (1999). *Binding of SeqA protein to DNA requires interaction between two or more complexes bound to separate hemimethylated GATC sequences*. *Embo Journal*. **18**(8): p. 2304-2310.
- Brendler, T., J. Sawitzke, K. Sergueev, and S. Austin, (2000). *A case for sliding SeqA tracts at anchored replication forks during Escherichia coli chromosome replication and segregation*. *Embo Journal*. **19**(22): p. 6249-6258.
- Campbell, J.L. and N. Kleckner (1990). *Escherichia-Coli Oric and the Dnaa Gene Promoter Are Sequestered from Dam Methyltransferase Following the Passage of the Chromosomal Replication Fork*. *Cell*. **62**(5): p. 967-979.
- Cooper, S. and C.E. Helmstetter (1968). *Chromosome Replication and Division Cycle of Escherichia Coli B/R*. *Journal of Molecular Biology*. **31**(3): p. 519-540.

-
- del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarria, M. Espinosa, and R. Diaz-Orejas (1998). *Replication and control of circular bacterial plasmids*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**(2): p. 434-464.
- Duigou, S., K. G. Knudsen, O. Skovgaard, E. S. Egan, A. Lobner-Olesen, and M. K. Waldor (2006). *Independent control of replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes by *DnaA* and *RctB**. *Journal of Bacteriology*. **188**(17): p. 6419-6424.
- Egan, E.S., S. Duigou, and M.K. Waldor (2006). *Autorepression of *RctB*, an initiator of *Vibrio cholerae* chromosome II replication*. *Journal of Bacteriology*. **188**(2): p. 789-793.
- Egan, E.S., M.A. Fogel, and M.K. Waldor (2005). *Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes*. *Molecular Microbiology*. **56**(5): p. 1129-1138.
- Egan, E.S., A. Lobner-Olesen, and M.K. Waldor (2004). *Synchronous replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes*. *Current Biology*. **14**(13): p. R501-R502.
- Egan, E.S. and M.K. Waldor (2003). *Distinct replication requirements for the two *vibrio cholerae* chromosomes*. *Cell*. **114**(4): p. 521-530.
- Fiebig, A., K. Keren, and J.A. Theriot (2006). *Fine-scale time-lapse analysis of the biphasic, dynamic behaviour of the two *Vibrio cholerae* chromosomes*. *Molecular Microbiology*. **60**(5): p. 1164-1178.
- Fogel, M.A. and M.K. Waldor (2005). *Distinct segregation dynamics of the two *Vibrio cholerae* chromosomes*. *Molecular Microbiology*. **55**(1): p. 125-136.
- Fogel, M.A. and M.K. Waldor, *A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation*. *Genes & Development*, 2006. **20**(23): p. 3269-3282.
- Fossum, S., E. Crooke, and K. Skarstad (2007). *Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli**. *Embo Journal*. **26**(21): p. 4514-4522.
- Fossum, S., S. Soreide, and K. Skarstad (2003). *Lack of *SeqA* focus formation, specific DNA binding and proper protein multimerization in the *Escherichia coli* sequestration mutant *seqA2**. *Molecular Microbiology*. **47**(3): p. 619-632.
- Guarne, A., Q. H. Zhao, R. Ghirlando, and W. Yang (2002). *Insights into negative modulation of *E-coli* replication initiation from the structure of *SeqA*-hemimethylated DNA complex*. *Nature Structural Biology*. **9**(11): p. 839-843.
- Guarne, A., T. Brendler, Q. H. Zhao, R. Ghirlando, S. Austin, and W. Yang (2005). *Crystal structure of a *SeqA-N* filament: implications for DNA replication and chromosome organization*. *Embo Journal*. **24**(8): p. 1502-1511.
- Guyer, M.S., R. R. Reed, J. A. Steitz, and K. B. Low (1980). *Identification of a Sex-Factor-Affinity Site in *Escherichia-Coli* as *Gamma-Delta**. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **45**: p. 135-140.

-
- Hansen, F.G. and K. Vonmeyenburg (1979). *Characterization of the Dnaa, Gyrb and Other Genes in the Dnaa Region of the Escherichia-Coli Chromosome on Specialized Transducing Phages Lambda-Tna*. *Molecular & General Genetics*. **175**(2): p. 135-144.
- Heidelberg, J.F., et al. (2000). *DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae*. *Nature*. **406**(6795): p. 477-483.
- Henaut, A., T. Rouxel, A. Gleizes, I. Moszer, and A. Danchin (1996). *Uneven distribution of GATC motifs in the Escherichia coli chromosome, its plasmids and its phages*. *Journal of Molecular Biology*. **257**(3): p. 574-585.
- Hiraga, S., C. Ichinose, H. Niki, and M. Yamazoe (1998). *Cell cycle-dependent duplication and bidirectional migration of SeqA-associated DNA-protein complexes in E-coli*. *Molecular Cell*. **1**(3): p. 381-387.
- Hiraga, S., T. Onogi, C. Ichinose, H. Niki, and M. Yamazoe (2000). *Bidirectional migration of SeqA-bound hemimethylated DNA clusters and pairing of oriC copies in Escherichia coli*. *Genes to Cells*. **5**(5): p. 327-341.
- Jensen, K.F. (1993). *The Escherichia-Coli K-12 Wild Types W3110 and Mg1655 Have and Rph Frameshift Mutation That Leads to Pyrimidine Starvation Due to Low Pyre Expression Levels*. *Journal of Bacteriology*. **175**(11): p. 3401-3407.
- Kaguni, J.M. (2006). *DnaA: Controlling the initiation of bacterial DNA replication and more*. *Annual Review of Microbiology*. **60**: p. 351-371.
- Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L.T. Mobley (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. **2**(2): p. 123-140.
- Lemon, K.P. and A.D. Grossman (1998). *Localization of bacterial DNA polymerase: Evidence for a factory model of replication*. *Science*. **282**(5393): p. 1516-1519.
- Lichtman, J.W. and J.A. Conchello (2005). *Fluorescence microscopy*. *Nature Methods*. **2**(12): p. 910-919.
- Lu, M., J. L. Campbell, E. Boye, and N. Kleckner (1994). *Seqa - a Negative Modulator of Replication Initiation in Escherichia-Coli*. *Cell*. **77**(3): p. 413-426.
- Madigan, M. T. and J. M. Martinko. *Brock Biology of Microorganisms*, 2006, Pearson Prentice Hall
- Molina, F. and K. Skarstad (2004). *Replication fork and SeqA focus distributions in Escherichia coli suggest a replication hyperstructure dependent on nucleotide metabolism*. *Molecular Microbiology*. **52**(6): p. 1597-1612.
- Neidhardt F.C. et al. *Escherichia Coli and Salmonella*, 1996, American Society for Microbiology.
- Odsbu, I., H. K. Klungsoyr, S. Fossum, and K. Skarstad (2005). *Specific N-terminal interactions of the Escherichia coli SeqA protein are required to form multimers that restrain negative supercoils and form foci*. *Genes to Cells*. **10**(11): p. 1039-1049.

- Onogi, T., H. Niki, M. Yamazoe, and S. Hiraga (1999). *The assembly and migration of SeqA-Gfp fusion in living cells of Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. **31**(6): p. 1775-1782.
- Pal, D., T. Venkova-Canova, P. Srivastava, and D. K. Chattoraj (2005). *Multipartite regulation of rctB, the replication initiator gene of Vibrio cholerae chromosome II*. *Journal of Bacteriology*. **187**(21): p. 7167-7175.
- Pearson, G.D.N., A. Woods, S. L. Chiang, and J. J. Mekalanos (1993). *Ctx Genetic Element Encodes a Site-Specific Recombination System and an Intestinal Colonization Factor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**(8): p. 3750-3754.
- Rasmussen, T., R.B. Jensen, and O. Skovgaard (2007). *The two chromosomes of Vibrio cholerae are initiated at different time points in the cell cycle*. *Embo Journal*. **26**(13): p. 3124-3131.
- Saint-Dic, D., J. H. Kehrl, B. P. Frushour, and L. S. Kahng (2008). *Excess seqA leads to replication arrest and a cell division defect in Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*. **190**(17): p. 5870-5878.
- Sambrook, J. and D. Russell. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2001, CSHL Press.
- Skarstad, K., E. Boye, and H.B. Steen (1986). *Timing of Initiation of Chromosome-Replication in Individual Escherichia-Coli-Cells*. *Embo Journal*. **5**(7): p. 1711-1717.
- Skarstad, K., G. Lueder, R. Lurz, C. Speck, and W. Messer (2000). *The Escherichia coli SeqA protein binds specifically and co-operatively to two sites in hemimethylated and fully methylated oriC*. *Molecular Microbiology*. **36**(6): p. 1319-1326.
- Skarstad, K., H.B. Steen, and E. Boye (1985). *Escherichia-Coli DNA Distributions Measured by Flow-Cytometry and Compared with Theoretical Computer-Simulations*. *Journal of Bacteriology*. **163**(2): p. 661-668.
- Slater, S., S. Wold, M. Lu, E. Boye, K. Skarstad, and N. Kleckner (1995). *Escherichia-Coli SeqA Protein Binds Oric in 2 Different Methyl-Modulated Reactions Appropriate to Its Roles in DNA-Replication Initiation and Origin Sequestration*. *Cell*. **82**(6): p. 927-936.
- Srivastava, P. and D.K. Chattoraj (2007). *Selective chromosome amplification in Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*. **66**(4): p. 1016-1028.
- Srivastava, P., R.A. Fekete, and D.K. Chattoraj (2006). *Segregation of the replication terminus of the two Vibrio cholerae chromosomes*. *Journal of Bacteriology*. **188**(3): p. 1060-1070.
- Torheim, N.K., E. Boye, A. Lobner-Olesen, T. Stokke, and K. Skarstad (2000). *The Escherichia coli SeqA protein destabilizes mutant DnaA204 protein*. *Molecular Microbiology*. **37**(3): p. 629-638.

- Trucksis, M., J. Michalski, Y. K. Deng, and J. B. Kaper (1998). *The Vibrio cholerae genome contains two unique circular chromosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **95**(24): p. 14464-14469.
- Venkova-Canova, T., P. Srivastava, and D.K. Chattoraj (2006). *Transcriptional inactivation of a regulatory site for replication of Vibrio cholerae chromosome II*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **103**(32): p. 12051-12056.
- Waldor, M.K. and J.J. Mekalanos (1996). *Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin*. Science. **272**(5270): p. 1910-1914.
- Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis (1990). *Towards a Natural System of Organisms - Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **87**(12): p. 4576-4579.

Appendiks A

I dette appendikset er det gitt detaljerte oversikter over materiale og protokoller for metoder benyttet i oppgaven.

Programvare

Instrumenter

Kjemikalier

Medier

Fiksring av eksponentielle prøver

Behandling med Rifampicin og Cephalexin

Farging med FITC og Hoechst 33258

Immunmerking

SDS-Page og Western blotting

Programvare

Program	Produsent
Adobe Reader 8	Adobe Systems
AxioVision 4.6	Carl Zeiss
Emacs	FreeSoftware Foundation
EndNote XI	Thomson ResearchSoft
GeneSnap	Synoptics Ltd
Java	Sun Microsystems
Notisblokk 6.0	Microsoft
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft
Microsoft Office PowerPoint 2007	Microsoft
Microsoft Office Word 2007	Microsoft
SigmaPlot 8.0	SPSS Inc
WinMDI 2.8	Joseph Trotter

Instrumenter

Instrument	Modell	Produsent
Bordsentrifuge	GalaxyMini	VWR
Elektroforesekammer	MiniProtean™ 3 Cell	Biorad
m. Kraftforsyning	PowerPac 3000	Biorad
Flowcytometer	FacsDiVa	Becton Dickinson
Flowcytometer	LSR II	Becton Dickinson
Fluorescens-scanner	ChemiGenius	Syngene
Inkubator	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Inkubator	Orbital Incubator	Gallenkamp
Mikrobrønnplateleser	Orginal Multiscan EX	Labsystems
Mikroskop	Axioplan 2	Zeiss
m. CCD kamera	MicroMax	Princeton Instruments
Mikroskop	Axioskop	Zeiss
pH-meter	Mettler Toledo	InLab Routine Pro
Semi-dry blotter	TransBlot® SD	Biorad
m. Kraftforsyning	PowerPac 300	Biorad
Sentrifuge	Biofuge 13	Heraeus Instruments

Sentrifuge	KUBOTA 5900	Kubota
Sentrifuge	Mikro200R	Hettich
Sentrifuge	Sorvall RC-5C	Dupont Institute
Spektrofotometer	UV-160A	Shimadzu
Vannbad	Innova 3100	New Brunswick Scientific
Vannbad	MaxiShake SBD 50 bio	Heto
Varmeblokk	QBT1	Grant
Vipper	Platform shaker str 6	Stuart Scientific
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA

Kjemikalier

Kjemikalie/protein	Produsent
Akrylamid/Bis løsnings (30%)	BioRad
alkalisk-fosfatase-anti-kanin antistoff	GE Healthcare
6-amino-n-hexanoic acid	Sigma
anti-SeqA, kanin	Avd for Cellebiologi, DNR
APS (ammonium persulfat)	Sigma
β -mercapto-ethanol	Koch-Light Laboratories Ltd
Bromphenol blue	Oxoid
BSA (bovine serum albumin)	New England Biolabs Inc
CAA (casamino acid)	Difco
CaCl ₂	Sigma
Cephalexin	Eli Lilly
Chloramphenicol	Sigma
Cy3-anti-kanin antistoff	Amersham Pharmacia Biotech
DualColor	BioRad
ECF	GE Healthcare
EDTA (ethylen-diamine-tetra-acetate)	Sigma
EtOH	Arcus
FeCl ₃	Sigma
FITC (fluorescein-isothiocyanate)	Sigma
Fruktose	Sigma
Gjærekstrakt	Difco
Glukose	Sigma

Glycerol	Sigma
Glycine	Sigma
HCl	Merck
Hoechst 33258	Sigma
KCl	Sigma
KH ₂ PO ₄	Sigma
K ₂ HPO ₄	Sigma
Lysozym	Sigma
MgCl ₂	Sigma
NaCl	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma
N ₂	Aga
Poly-L-lysine	Sigma
PVDF (polyvinylidene difluoride) membran	Millipore
Rifampicin	Fluka
SDS	Serva
TEMED (tetrametyletylendiamin)	BioRad
Thiamine	Fluka
Tris base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Tryptone	Difco
Tween	KEBO
Tørrmelk	Nestle
Uracil	Sigma
Whatman 3MM papir	Whatman International Ltd

Medier

ABB₁

5xA:

2 g (NH₄)₂SO₄

6 g Na₂HPO₄

3 g KH₂PO₄

3 g NaCl

H₂O til totalt 200 ml

B:

1 ml 0.1 M CaCl₂

1 ml 1.0 M MgCl₂

1 ml 0.003 M FeCl₃

H₂O til totalt 800 ml

1ml 1mg/ml thiamine

5xA og B blandes til AB, thiamine tilsettes og gir ABB₁.

Supplementeres med en av følgende:

0,5% CAA + 0,2% glucose + 20µg/ml uracil

0,2% fruktose

0,2% glyserol

LB

10 g Tryptone

5 g gjærekstrakt

10 g NaCl

H₂O til totalt 1 l

Fiksering av eksponentielle prøver

1. To ganger 1ml cellekultur overføres til eppendorfrør
2. Sentrifugeres 14000rpm/4min/4°C og supernatanten suges av
3. Resuspander i 1ml TE buffer (for *E.coli* celler) eller TBSE buffer (for *V.cholerae* celler)
4. Spinn ned igjen, etterlat 100µl supernatant og resuspander pellet
5. Tilsett 1ml 77% EtOH (gir totalt 70% EtOH)
6. Prøver settes i kjøleskap og kan lagres flere måneder

TE

5 ml 1M Tris-HCl pH 7.5
1 ml 0.5M EDTA (ethylen-diamine-tetra-acetate)
H₂O til totalt 500 ml

TBSE

5 ml 1M Tris-HCl pH 7.5
1 ml 0.5M EDTA
13 ml 5M NaCl
H₂O til totalt 500 ml

Behandling med Rifampicin og Cephalexin

1. Tre ml av cellekulturen overføres til glassrør
2. Tilsett 150µg/ml (for *V.cholerae* celler) eller 300µg/ml (for *E.coli*) rifampicin og 10µg/ml cephalexin
3. Inkuber videre ved 37°C med risting i rundt 2 timer (til pågående replikasjonsrunder er avsluttet)
4. Fiksering som beskrevet for eksponentielle prøver

Farging med FITC og Hoechst 33258

Fra prøver fiksert i etanol. Alle prosedyrer foretas på is.

1. Spinn ned prøver (14000rpm/4min/4°C), inkluder et rør med 10xstandard per 40 prøve
2. Vask med 1 ml PB (tilsett, vortex og spinn ned igjen) og resuspander i 500 µl PB
3. Splitt 10xstd, 1/10 fortynnes i PB til 1xstd og skal behandles som prøvene
4. Tilsett 500 µl nylaget FITC løsning (3µg/ml i PB), unntatt til 10xstd, la stå over natt ved 4°C
5. Spinn ned og fjern FITC, vask i TBS
6. Resuspander prøver i 500 µl TBS og 10xstd i 100 µl TBS
7. 10xstd tilsettes 100 µl Hoechst løsning (3µg/ml Hoechst 33258 i TBS)
8. 200 µl av prøvene overføres til flowrør, tilsett 5 µl av 10xstd og 200 µl Hoechst løsning til hvert rør
9. La prøvene stå mørkt i minst 30min

PB (0.1M pH 9.0)

49 ml 1M K₂HPO₄
1 ml 1M KH₂PO₄
H₂O til totalt 500 ml

TBS (0.02M pH 7.5)

10 ml 1M Tris-HCl pH 7.5
13 ml 5M NaCl
H₂O til totalt 500 ml

Immunmerking

Preparering av celleekstrakt

1. Overnattkultur av EBO193 fortynnes 1:1000 i 1 l LB og dyrkes ved 37°C med risting til OD≈0,5
2. Spinn ned (6000rpm/10min/4°C)
3. Resuspander i 50mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer (pH 7.4) til et totalvolum på 10ml
4. Spinn ned (9000rpm/10min/4°C)
5. Resuspander i 1,5 ml K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer, og overfør til eppendorfrør
6. Lyser ved å tilsette 250 µg/ml lysozym og la stå 30min på is
7. Frys i N₂ og tin
8. Spinn ned (14000rpm/30min/4°C), og samle opp supernatanten i rør
9. Frys i N₂ og oppbevar ved -80°C

Rensing av antistoff

1. Fortynn kanin anti-SeqA 1:100 i celleekstrakt fra EBO193 til et totalvolum på 60 µl (gir to slides)
2. Tilsett 3,83 µl PBST med 10mM EDTA og inkuber en time på is
3. Spinn ned (14000rpm/15min/4°C) og samle supernatanten til bruk som antistoff

Immunmerking av fikserte celler

1. Rens et objektglass med EtOH og drypp 20 µl 1 mg/ml poly-L-lysine på det, inkuber 5min
2. Skyll med dH₂O og la lufttørke
3. Tilsett 10 µl celleprøve fiksert i EtOH (fra bunnen av eppendorfrøret) og la lufttørke
4. Skyll med dH₂O og la lufttørke
5. Inkuber med 100 µl fersk lysozymløsning i 10min ved romtemperatur
6. Hell 1 ml PBST på glasset og la ligge 30sekunder før vippes bort, gjenta 5 ganger
7. Hell 1 ml MeOH på glasset og la ligge 1min før vippes bort, lufttørk
8. Blokker med 100 µl PBST med 2% BSA (bovine serum albumin) i 15min, vipp av og lufttørk
9. Tilsett 25 µl kanin anti-SeqA (fra Rensing av antistoff, pkt 3)
10. Legg på dekkglass og inkuber 1t i romtemperert fuktammer
11. Fjern dekkglass og vask 15 ganger med PBST (som i pkt 6)
12. Blokker med 100 µl PBST med 2% BSA (bovine serum albumin) i 15min, vipp av og lufttørk
13. Tilsett 20 µl Cy3-anti-kanin antistoff (1:500 fortynnet i PBST)
14. Legg på dekkglass og inkuber 1t i romtemperert mørkt fuktammer
15. Fjern dekkglass og vask 15 ganger med PBST
16. Tilsett 10 µl mounting medium og legg på et dekkglass
17. Kan oppbevares mørkt ved 4°C, begrenset holdbarhet

PBST

140mM NaCl
2mM KCl
8mM Na₂HPO₄
1.5mM KH₂PO₄
0.05% Tween

Lysozymløsning

2 mg/ml lysozym
25mM Tris-HCl pH 7.5
50mM glukose
10mM EDTA

Mounting medium

5 µg/ml Hoechst 33258
0.02M PBS (PBST uten Tween)
40% glyserol

SDS-Page og Western blotting

Prøvetaking

1. Cellekulturer dyrkes til $OD \approx 0,15$
2. To ganger 1,5ml celleduspansjon overføres til eppendorfrør
3. Spinnes ned ved 14000rpm/4min/4°C og supernatanten suges av
4. Resuspender i 60µl resuspansjonsbuffer til hvert rør
5. Kokes 98°C/5min og samles i et rør
6. Prøver kan så lagres ved -20°C

Måling av proteininnhold

Bruker BCA Protein Assay Kit fra PIERCE

1. Bland standarder av BSA stockløsning (2mg/ml) og resusp.buffer (med halve innholdet glyserol) på 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 og 2mg/ml
2. Tilsett 10µl av hver til separate brønner på en mikrobrønnplate
3. Bland 5µl prøve med 5 µl resusp.buffer uten glyserol og ha i brønn
4. Tilsett 200µl ReagentA/B til hver brønn, inkuber 37°C/30min
5. Absorbansen ved 570nm måles med mikrobrønnplateleser
6. Lag standardkurve og les av konsentrasjonen av protein i prøvebrønnen, denne er altså halvparten av konsentrasjonen i prøven

SDS-Page

Oppskrift for minigeler

1. Glassplater vaskes med etanol, festes med klemmer og monteres i stativ
2. Bland separasjonsgel og hell mellom platene til indikert strek
3. Fyll på 1ml dH₂O øverst og la stivne minst 30min, rist bort vannet
4. Bland stackinggel og hell mellom plater til fullt
5. Sett ned kam (f.eks 10 brønner med 1mm avstand)
6. La stivne 30min, fjern kam og skyl med dH₂O
7. Fest i elektroforesekammer og fyll opp med running buffer
8. Last prøver, f.eks med 10µg protein i 85% resusp.buffer og 15% loadingbuffer til et totalvolum 40µl
9. Kan også laste en brønn som inneholder en markør, 2µl DualColor, og renses SeqA, 1ng
10. Koble til kraftforsyning og kjør på 150V i rundt 1t

Western blotting

1. Kutt en PVDF membran til passende størrelse (6cmx8,5cm) og dynk i dH₂O minst 15min
2. Kutt seks biter Whatman 3MM papir i passende størrelse (7cmx9cm)
3. Mellom platene i en semi-dry blotter plasseres følgende sandwich:
 - Katodeplate
 - Whatman papir dynket i katodebuffer
 - Whatman papir dynket i katodebuffer
 - Whatman papir dynket i katodebuffer
 - Gel
 - Membran
 - Whatman papir dynket i anodebuffer nr II
 - Whatman papir dynket i anodebuffer nr I
 - Whatman papir dynket i anodebuffer nr I

Anodeplate

4. Kobles til kraftforsyning og kjøres på 15V i 30min
5. Membranen blokkeres så minst 1t i TBS-T med 5% tørrmelk
6. Fortynn rensset kanin anti-SeqA (se immunmerkingsprotokoll) 1:100 i 15ml TBS-T med 5% tørrmelk. Dette gir altså en total fortytning av antistoff serum på 1:10000
7. Inkuber membran i blandingen i 1t på vipper med 20rpm
8. Vask 3x10min i TBS-T
9. Bland sekundært antistoff alkaline-fosfatase-anti-kanin 1:10000 i 15ml TBS-T med 5% tørrmelk
10. Inkuber membran i blandingen i 1t på vipper med 20rpm
11. Vask 3x10min i TBS-T
12. Legg membran på glassplate, hell på 1ml ECF, la stå mørkt til det fremtrer gule bånd (5-20min)
13. Flytt membran til et Whatman papir og la tørke mørkt ca 30min
14. Scannes med fluorescens scanner

Resuspansjonsbuffer

20ml TE
5ml Stackinggel buffer
3,5ml 10% SDS
3ml 87% glyserol
dH₂O til totalt 34ml

Loadingbuffer

1ml 14.7M β-mercapto-ethanol
80μl 10% bromphenol blue
2,5ml 10% SDS
dH₂O til totalt 6ml

Separasjonsgel buffer 1.5M

182g Tris base
HCl til pH≈8.8
dH₂O til totalt 1l

Stackinggel buffer 0.5M

61g Tris base
HCl til pH≈6.8
dH₂O til totalt 1l

Separasjonsgel 15%

1,2ml dH₂O
1,25ml separasjonsgel buffer
2,5ml Akrylamid/Bis løsning (30%)
50μl 10% SDS
25μl APS
2,5μl TEMED

Stackinggel 4%

875µl dH₂O
400µl separasjonsjel buffer
200µl Akrylamid/Bis løsning (30%)
16µl 10% SDS
8µl APS
1,6µl TEMED

Running buffer

3,02 g Tris base
14,4g glysine
10ml 10% SDS
dH₂O til totalt 1l

Katodebuffer

5.2 g 6-amino-n-hexanoic acid
200 ml metanol
dH₂O til totalt 1l

Anodebuffer nr II

3.03 g Tris base
200 ml methanol
dH₂O til totalt 1l

Anodebuffer nr I

36.3 g Tris base
200 ml methanol
dH₂O til totalt 1l

TBS-T

TBS
0.05% Tween

Appendiks B

I dette appendikset er programmene laget under arbeidet med oppgaven listet. De er begge skrevet i Java, og resultatfilene er plottet med SigmaPlot for å gi figurene som er vist i teksten.

Programmet "gadcseter"

```
// Programmet startes ved å kalle på gadcseter og filnavnet til sekvensen man
// vil analysere, f.eks: java gadcseter chr1.txt

import easyIO.*;
import java.util.ArrayList;

class gadcseter {

    public static void main(String[]args) {

        String sekvens;
        int lengde;
        int total = 0;
        ArrayList<Integer> liste = new ArrayList<Integer>();

        In innfil = new In(args[0]);
        sekvens = innfil.inWord();

        Out utfil = new Out("resultat.txt");

        lengde = sekvens.length();

        // Tar ut bit for bit av sekvensen og sender den til metoden sjekk.
        for( int i=0; i<=lengde-4; i++) {
            String sekvensbit = sekvens.substring(i,i+4);
            liste.add(sjekk(sekvensbit));
            total += sjekk(sekvensbit);
        }
    }
}
```

```
// Summerer opp antall GATC seter for sekvensbiter på 10000 baser
// (dette baseintervallet kan lett endres i if-løkken), og sender
// dataene til filen resultat.txt.
int sum = 0;
for (int j=0; j<liste.size(); j++) {
    if( (j%10000)==0 && j != 0 ) {
        utfil.outln(sum);
        sum = 0;
    }
    sum += liste.get(j);
}
utfil.out(sum);

utfil.close();

System.out.println(total + " GATC seter totalt i sekvensen på " + lengde + " baser.");
}

// Metode som tester en gitt bit for å være lik "GATC".
static int sjekk(String s) {
    if(s.equalsIgnoreCase("GATC")) {
        return 1;
    } else {
        return 0;
    }
}
}
```

Programmet "gadcsetepar"

```
// Programmet startes ved å kalle på gadcsetepar og filnavnet til sekvensen man
// vil analysere, f.eks: java gadcsetepar chr1.txt

import easyIO.*;
import java.util.ArrayList;

class gadcsetepar {

    public static void main(String[]args) {

        String sekvens;
        int lengde;
        int total = 0;
        ArrayList<Integer> liste = new ArrayList<Integer>();

        In innfil = new In(args[0]);
        sekvens = innfil.inWord();

        Out utfil = new Out("avstandresultat.txt");

        lengde = sekvens.length();

        // Tar ut bit for bit av sekvensen og sender den til metoden sjekk.
        for( int i=0; i<=lengde-4; i++) {
            String sekvensbit = sekvens.substring(i,i+4);
            liste.add(sjekk(sekvensbit));
            total += sjekk(sekvensbit);
        }

        // Definerer tillatte avstander.
        int[] checklist = {6,7,8,10,11,12,13,14,18,19,20,21,22,23,29,30,31};

        ArrayList<Integer> liste2 = avstand(liste);

        // Går gjennom hver posisjon og skriver ut 1 for et godkjent par, ellers null.
        for(int i = liste2.size() - 1; i > -1; i--) {
            if(inlist(liste2.get(i), checklist)) {
                utfil.outln(1);
            } else {
                utfil.outln(0);
            }
        }

        utfil.close();
    }
}
```

```
// Lager en ny liste med der "1" for GATC erstattes med avstanden til neste.
static ArrayList<Integer> avstand(ArrayList<Integer> liste) {
    ArrayList<Integer> liste2 = new ArrayList<Integer>();
    int count = 1;

    for(int i = liste.size() - 1; i > -1; i--) {
        if(liste.get(i) == 1) {
            liste2.add(count);
            count = 1;
        } else {
            liste2.add(0);
            count++;
        }
    }

    return liste2;
}

static boolean inlist(int numb, int[] checklist) {
    for(int i = 0; i < checklist.length; i++) {
        if(numb == checklist[i]) {
            return true;
        }
    }
    return false;
}

// Metode som tester en gitt bit for å være lik "GATC".
static int sjekk(String s) {
    if(s.equalsIgnoreCase("GATC")) {
        return 1;
    } else {
        return 0;
    }
}
}
```


Appendiks C

I dette appendikset er det gitt supplementære data for forsøkene utført under arbeidet med oppgaven.

Tabell C-1. Cellesyklus parametre beregnet for hvert enkelt forsøk med hurtigvoksende E.coli celler.

	Doblingstid, τ	Punkt for initiering av C-fase, a_i	Punkt for initiering av D-fase, a_t	Varighet av C-fase, t_C	Varighet av D-fase, t_D
Forsøk nr 1	27 min	6,0 min	22 min	43,0 min	32 min
Forsøk nr 2	26 min	5,3 min	22 min	42,7 min	30 min
Forsøk nr 3	27 min	4,5 min	24 min	46,5 min	30 min

Tabell C-2. Gaffelfordelingen for hvert forsøk med hurtigvoksende E.coli.

	Antall gafler		
	4	12	8
Forsøk nr 1	28,5%	57,8%	13,7%
Forsøk nr 2	26,3%	56,4%	17,3%
Forsøk nr 3	21,6%	70,4%	8,0%

Tabell C-3. Cellesyklusparametre for *V.cholerae* i $ABB_1 + 0,2\%$ fruktose, antatt termineringssynkroni.

	Doblings tid, τ	Andel i B-fase	Andel i C-fase	Andel i D-fase	Varighet av B-fase, t_B	Varighet av C-fase, t_C	Varighet av D-fase, t_D
Forsøk nr 1	46min	25%	56%	19%	8,7min	25,8min	11,5min
Forsøk nr 2	46min	22%	59%	19%	7,8min	26,7min	11,5min
Forsøk nr 3	45min	21%	59%	20%	7,2min	26,1min	11,7min
Forsøk nr 4	47min	16%	63%	21%	5,6min	28,7min	12,7min

Tabell C-4. Cellesyklusparametre for *V.cholerae* i $ABB_1 + 0,2\%$ fruktose, med hoppkant-modellen.

	Doblings tid, τ	Andel i B-fase	Andel i C-fase	Andel i D-fase	Varighet av B-fase, t_B	Varighet av C-fase, t_C	Varighet av D-fase, t_D
Forsøk nr 1	46min	18%	71%	10%	6,4min	33,1min	6,5min
Forsøk nr 2	46min	17%	74%	9%	6,0min	34,5min	5,5min
Forsøk nr 3	45min	20%	71%	9%	6,7min	32,4min	5,9min
Forsøk nr 4	47min	13%	75%	12%	4,7min	34,8min	7,5min

Tabell C-5. Cellesyklusparametre for *V.cholerae* i $ABB_1 + 0,2\%$ fruktose, antatt termineringssynkroni hos hoppkant-modellen.

	Doblings tid, τ	Andel i B-fase	Andel i C-fase	Andel i D-fase	Varighet av B-fase, t_B	Varighet av C-fase, t_C	Varighet av D-fase, t_D
Forsøk nr 1	46min	22%	57%	21%	7,8min	25,8min	12,4min
Forsøk nr 2	46min	23%	55%	21%	8,3min	24,8min	12,9min
Forsøk nr 3	45min	22%	62%	16%	7,6min	27,9min	9,5min
Forsøk nr 4	47min	18%	58%	24%	6,4min	25,3min	14,3min

Tabell C-6. *SeqA* fokus fordeling totalt for hvert forsøk med *V.cholerae* dyrket i $ABB_1 + 0,2\%$ fruktose. Beregnet fra fordeling etter sortering ved justering for antall og andel i hver fase.

	Antall celler	Andel med indikert antall fokus per celle				Gjennomsnittlig antall fokus per celle
		0	1	2	3	
Forsøk nr 1	309	42%	49%	7%	2%	0,69
Forsøk nr 3	458	30%	46%	20%	4%	0,98
Forsøk nr 4	466	28%	54%	16%	2%	0,92
Totalt		33%	50%	14%	3%	0,86

Tabell C-7. Cellesyklusparametre for *V.cholerae* i ABB_1 + 0,2% glyserol, antatt termineringssynkroni.

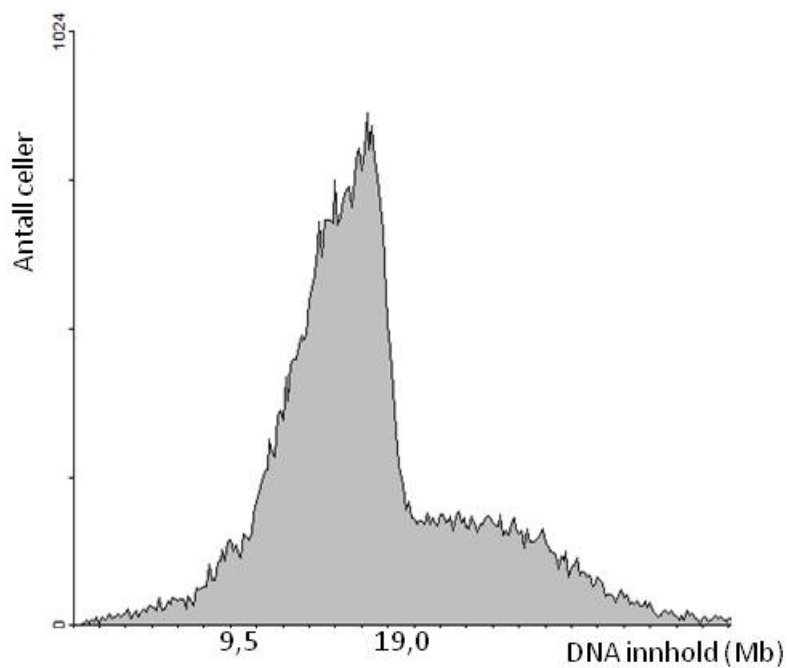
	Doblings tid, τ	Andel i B-fase	Andel i C-fase	Andel i D-fase	Varighet av B-fase, t_B	Varighet av C-fase, t_C	Varighet av D-fase, t_D
Forsøk nr 1	109min	66%	22%	12%	63,2min	28,4min	17,4min
Forsøk nr 2	96min	67%	22%	11%	56,6min	25,0min	14,4min
Forsøk nr 3	115min	61%	26%	13%	59,8min	35,6min	19,6min

Tabell C-8. Cellesyklusparametre for *V.cholerae* i ABB_1 + 0,2% glyserol, med hoppkant-modell.

	Doblings tid, τ	Andel i B-fase	Andel i C-fase	Andel i D-fase	Varighet av B-fase, t_B	Varighet av C-fase, t_C	Varighet av D-fase, t_D
Forsøk nr 1	109min	66%	23%	11%	63,2min	29,4min	16,4min
Forsøk nr 2	96min	64%	25%	11%	53,8min	27,8min	14,4min
Forsøk nr 3	115min	61%	28%	10%	61,0min	37,9min	16,1min

Tabell C-9. Cellesyklusparametre for *V.cholerae* i $ABB_1 + 0,2\%$ glyserol, antatt hoppkant-modell med termineringssynkroni.

	Doblings tid, τ	Andel i B-fase	Andel i C-fase	Andel i D-fase	Varighet av B-fase, t_B	Varighet av C-fase, t_C	Varighet av D-fase, t_D
Forsøk nr 1	109min	66%	21%	13%	63,2min	27,3min	18,5min
Forsøk nr 2	96min	66%	21%	13%	55,7min	24,0min	16,3min
Forsøk nr 3	115min	62%	25%	13%	62,1min	33,5min	19,6min



Figur C-1. *V.cholerae* dyrket i LB til $OD \approx 0,15$ og så tilsatt rif/cpx.

Tabell C-10. DNA innhold ved utvalgte punkter i modellen for hurtigvoksende *V.cholerae* i figur 4-35.

Nyfødt celle (t=0):	$\left(1 + \frac{18\text{min}}{25\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + \left(1 + \frac{2\text{min}}{9\text{min}}\right)l(\text{chrII})$	Formel B-1
Ved initiering av C _I (t=1):	$\left(1 + \frac{19\text{min}}{25\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + \left(1 + \frac{3\text{min}}{9\text{min}}\right)l(\text{chrII})$	Formel B-2
Ved terminering av C (t=7):	$\left(2 + 2\frac{6\text{min}}{25\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + 2l(\text{chrII})$	Formel B-3
Ved initiering av C _{II} (t=17):	$\left(2 + 2\frac{16\text{min}}{25\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + 2l(\text{chrII})$	Formel B-4
Ved celledeling (t=19):	$\left(2 + 2\frac{18\text{min}}{25\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + \left(2 + 2\frac{2\text{min}}{9\text{min}}\right)l(\text{chrII})$	Formel B-5

Tabell C-11. DNA innhold ved utvalgte punkter i modellen for hurtigvoksende *V.cholerae* i figur 4-38.

Nyfødt celle (t=0):	$\left(2 + 2\frac{8\text{min}}{27\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + 2l(\text{chrII})$	Formel B-6
Ved initiering av C _{II} (t=10):	$\left(2 + 2\frac{18\text{min}}{27\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + 2l(\text{chrII})$	Formel B-7
Ved initiering av C _I (t=11):	$\left(2 + 2\frac{19\text{min}}{27\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + \left(2 + 2\frac{1\text{min}}{9\text{min}}\right)l(\text{chrII})$	Formel B-8
Ved celledeling (t=19):	$\left(4 + 4\frac{8\text{min}}{27\text{min}}\right)l(\text{chrI}) + 4l(\text{chrII})$	Formel B-9

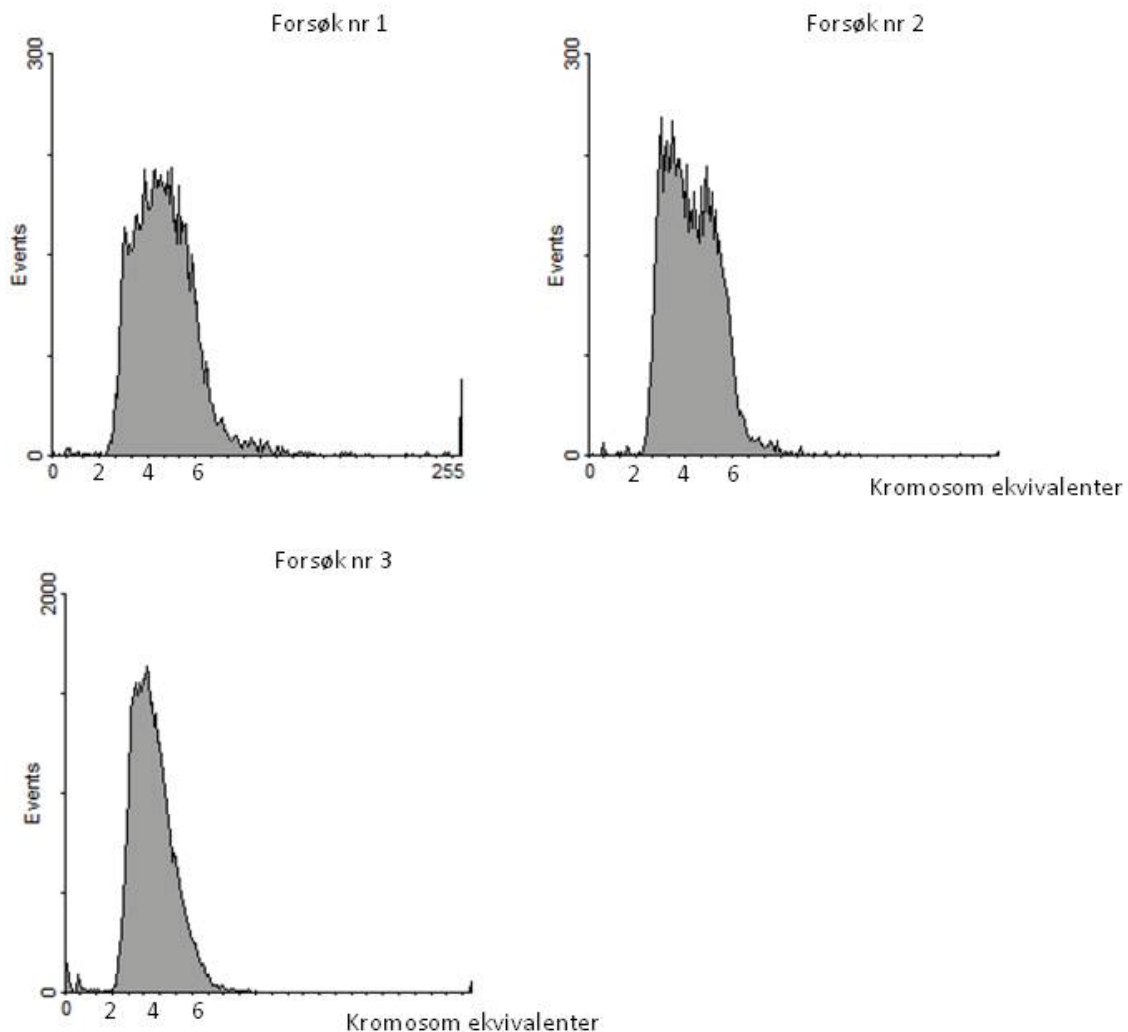
Appendiks D

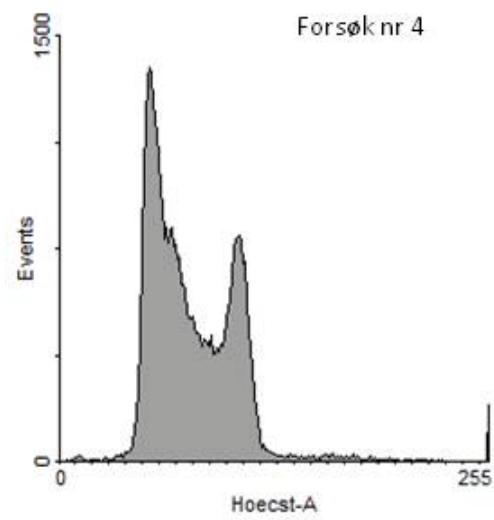
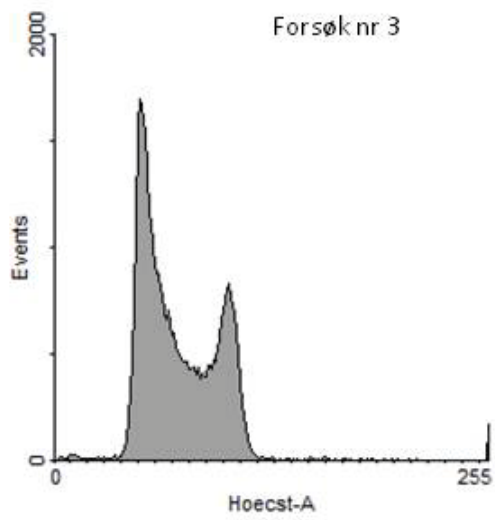
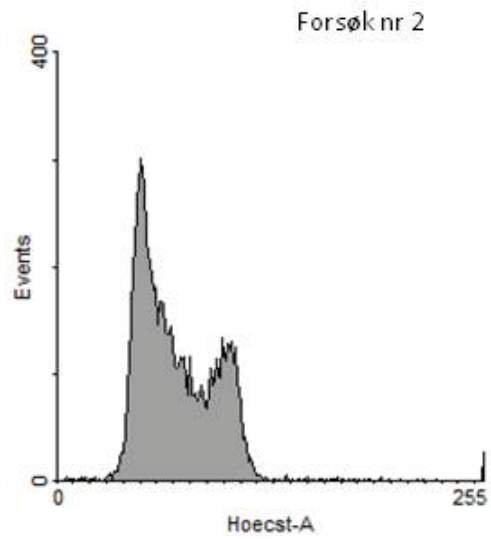
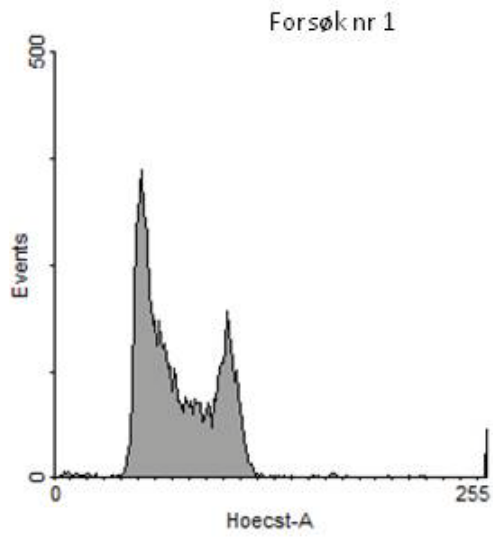
Histogrammene av DNA innholdet i de eksponentielle prøvene fra alle forsøkene er gitt i dette appendikset. For de saktevoksende *V.cholerae* kulturene er det ikke indikert DNA innhold siden disse har klare 1+1 og 2+2 toppe.

I de to siste forsøkene med hurtigvoksende *V.cholerae* ble det funnet en liten andel celler med et DNA innhold som tilsvarer 1+1 kromosom. Sannsynligvis har noen celler ikke startet på vekstfasen ennå, prøver ved høyere OD viste også at andelen avtok (data ikke vist). Muligens kan *V.cholerae* være ekstra følsom for endringer i dette LB mediet. Fasongen og DNA innholdet hos fordelingen virker ikke å være påvirket i særlig grad.

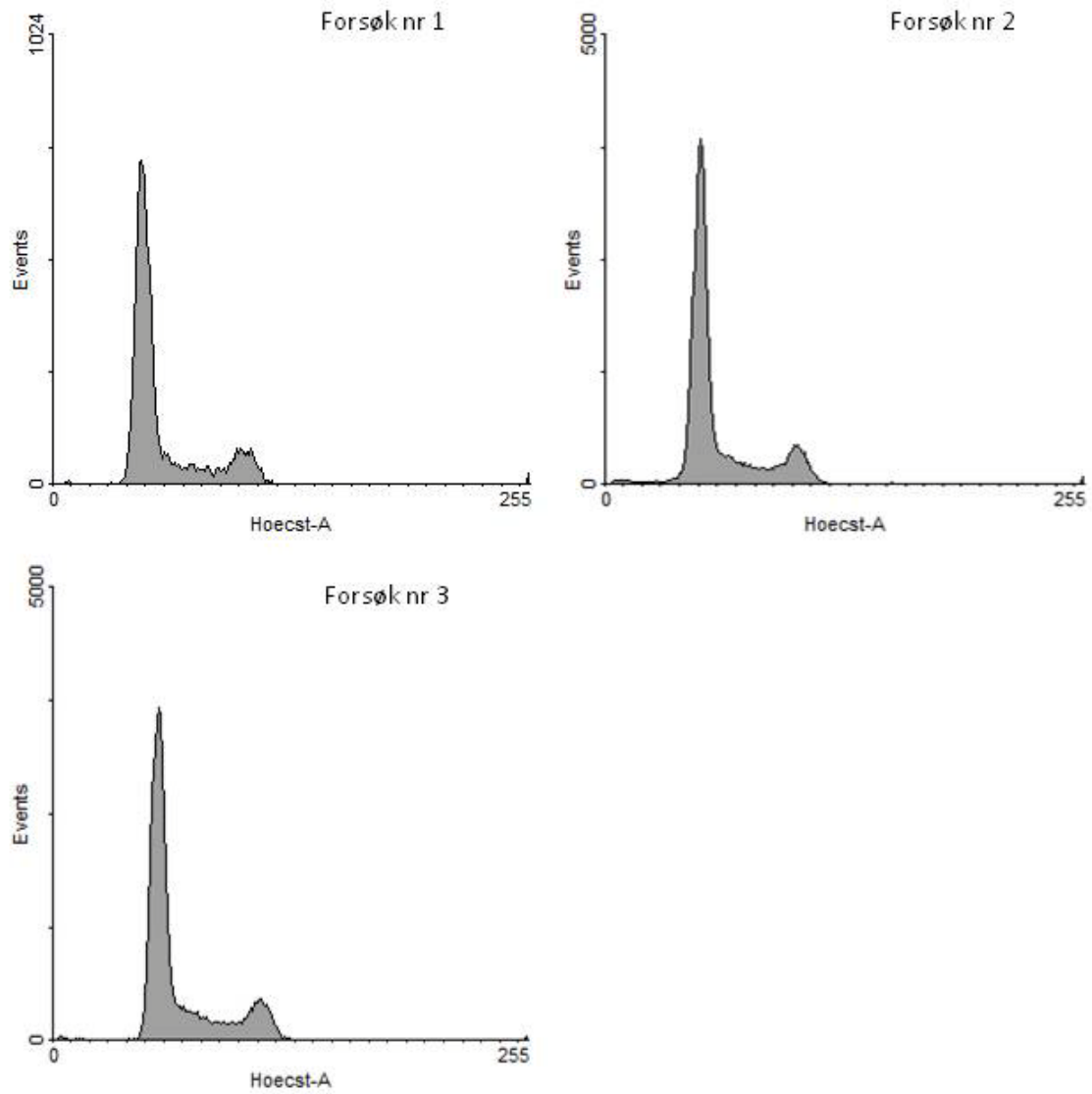
Hurtigvoksende *E.coli*,

dyrket i ABB₁ + 0,5% CAA, 0,2% glukose og 20µg/ml uracil.



Saktevoksende *V.cholerae*,dyrket i ABB₁ + 0,2% fruktose.

Svært saktevoksende *V.cholerae*,
dyrket i ABB₁ + 0,2% glyserol.



Hurtigvoksende *V.cholerae*,
dyrket i LB.

