

Zaustavljanje staničnog ciklusa u oskudnim uvjetima u bakteriji *Escherichia coli*

Berečić, Branimir

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:389620>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

THE STRINGENT RESPONSE AND CELL CYCLE ARREST IN
Escherichia coli

ZAUSTAVLJANJE STANI NOG CIKLUSA U OSKUDNIM
UVJETIMA U BAKTERIJI *Escherichia coli*

SEMINARSKI RAD

Branimir Bere i
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivan i -Ba e

Zagreb, 2012.

Sadržaj

Uvod	2
Zaustavljanje staničnog ciklusa bakterija divljeg tipa u različitim uvjetima rasta	3
Sinteza ppGpp ovisna o RelA je potrebna i dosta na zaustavljanje staničnog ciklusa.....	4
Ovisnost zastoja ciklusa o SeqA i metilazi Dam	5
Razdvajanje specifičnih kromosomskih regija nakon zastoja zbog oskudnih uvjeta	7
Zastoj ciklusa u stanicama divljeg tipa se odvija sa jednim dekondenziranim nukleoidom	8
Završetak zastoja	10
Inhibicija formiranja kolonija uslijed nakupljanja ppGpp je olakšana u mutantima Δdam i $\Delta seqA$	11
Sojevi $\Delta seqA$ i Δdam imaju normalnu kontrolu nad ostalim značajkama stresnog odgovora	11
Zaključak	13
Literatura	14
Sažetak.....	15
Summary	15

Uvod

Tijekom svog života, bakterijske se stanice susre u sa razli itim stresnim doga ajima uslijed kojih zapo inju specifi ne prilagodbe kako bi osigurale svoj opstanak. Jedan od stresnih odgovora se naziva "odgovor u oskudnim uvjetima" (*stringent response*) koji zapo inje ukoliko se stanica na e u uvjetima nedostatka aminokiselina.

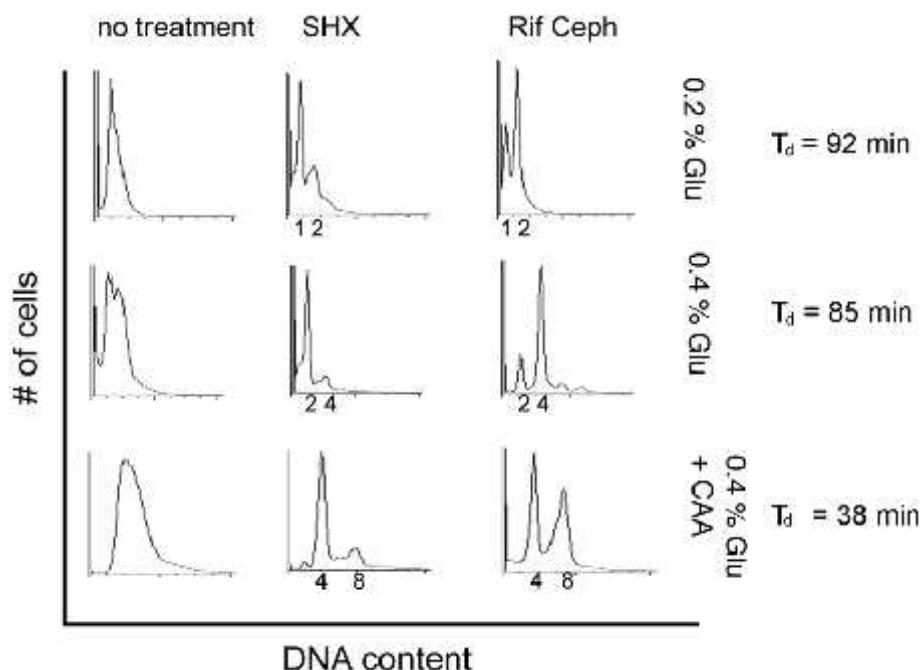
Signal za po etak oskudnog odgovora jest nakupljanje efektorskih nukleotida gvanozin tetrafosfat (ppGpp) i gvanozin pentafosfat (pppGpp) (*Potrykus, Cashel, 2008.*), pri emu je gvanozin tetrafosfat dominantniji i stabilniji. Enzimi RelA i SpoT kontroliraju njegovu razinu. Enzim RelA (ppGpp sintetaza I) sintetizira gvanozin tetrafosfat kada se u stanici nakupi odre ena koli ina nenabijene tRNA, što je samo po sebi posljedica nedostatka amino kiselina u stanici, dok enzim SpoT (ppGpp sintetaza II) ima slabu sintetiziraju u aktivnost te služi kao hidrolaza za razgradnju gvanozin tetrafosfata. Prema tome, oskudni odgovor ovisi o enzimu RelA kojemu je princip rada taj da se veže na ribosom i ukoliko se u akceptorskom mjestu nalazi tRNA bez pripadaju e aminokiseline zaustavlja se daljnja translacija mRNA i replikacija DNA, smanjuje se sinteza rRNA, no pove ava se transkripcija gena za biosintezu aminokiselina (*Barker, i sur., 2001.*).

Me utim, akumulacija ppGpp možda nije jedini faktor koji dovodi do zaustavljanja replikacije DNA - inicijaciju replikacije kontrolira koncentracija proteina DnaA koji sudjeluje u stvaranju kompleksa *oriC/DnaA* i stvaranje petlje na koju se može vezati helikaza DnaB; nasuprot tome, protein SeqA se veže na hemimetilirane GATC sljedove u cijelom genomu, a ukoliko se veže unutar *oriC* sprije iti e vezanje DnaA i time onemogu iti inicijaciju replikacije.

Zaustavljanje staničnog ciklusa bakterija divljeg tipa u različitim uvjetima rasta

Koli ina DNA u bakterijama određena je u uvjetima kada su stanice tretirane sa serin hidroksamatom i bez (koji služi kao inhibitor seril-tRNA sintetaze koja omogućava prijenos serina na tRNA što bi trebalo dovesti do stresnog odgovora) (Tosa, Pizer, 1971.), te u stanicama kojima su u mediju dodani rifampicin i cefaleksin (antibiotici koji blokiraju inicijaciju replikacije).

U stanicama koje nisu bile tretirane, replikacija DNA je trajala bez inhibicije sukladno obogaćenosti medija u kojem su se nalazile. No nakon obrade s rifampicinom i cefaleksinom započeta replikacija se dovršavaju, daljnje diobe i replikacije DNA su onemogućene - opet sukladno obogaćenosti medija u kojem su se nalazile (u bogatijim medijima stanice su imale veću količinu replicirane DNA); stanice obrađene serin hidroksamatom su takođe zaustavljale daljnju replikaciju DNA, ali neke stanice su već obavile diobu što je doprinijelo manjem udjelu DNA po pojedinačnoj stanici nego u prethodnim slučajevima.



Slika 1. Analiza staničnog ciklusa i utjecaj odgovora na oskudne uvjete putem citometrijom

Neobrađene stanice regularno prolaze kroz replikaciju DNA i diobu stanica. (Slika 1, lijevi stupac)

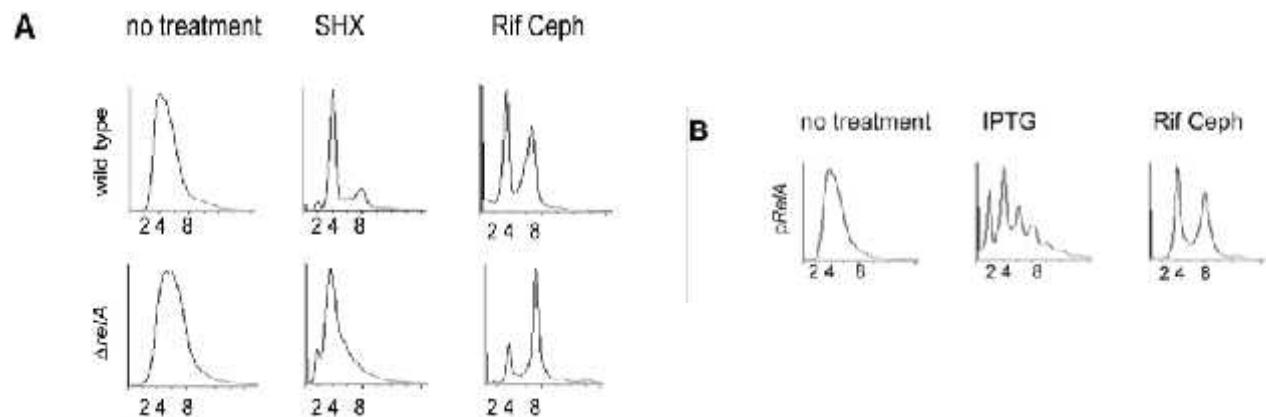
Stanice obrađene sa serin hidroksamatom sprječavaju daljnju replikaciju, no dovršavaju započetu. Stresni odgovor započinje nakon diobe. (Slika 1, srednji stupac)

Stanice obrađene antibioticima sprječavaju daljnju replikaciju i diobu, te u sebi sadrže veću količinu DNA. U ovom slučaju broj molekula DNA u stanici (1N i 2N; 2N i 4N) ukazuje na broj oriC (ishodišta replikacije) u kojima su se formirale replikacijske rašilje i imale priliku dovršiti replikaciju DNA. (Slika 1, desni stupac)

Sinteza ppGpp ovisna o RelA je potrebna i dostatna za zaustavljanje staničnog ciklusa

Stanice bez gena RelA nisu u mogu nasti proizvoditi ppGpp koji bi signalizirao po etak stresnog odgovora u oskudnim uvjetima, tako da u njima replikacija nije zaustavljena te je koli ina DNA u stanicama ve a od 1N (što bi zna ilo da su stanice nastavile replikaciju, te se nisu preusmjerile na biosintezu aminokiselina). Ako su takvim mutantima u podlogu dodani rifampicin i cefaleksin koli ina DNA u njima e poprimiti omjere sli ne kao u stanicama divljeg tipa. (Slika 2. A)

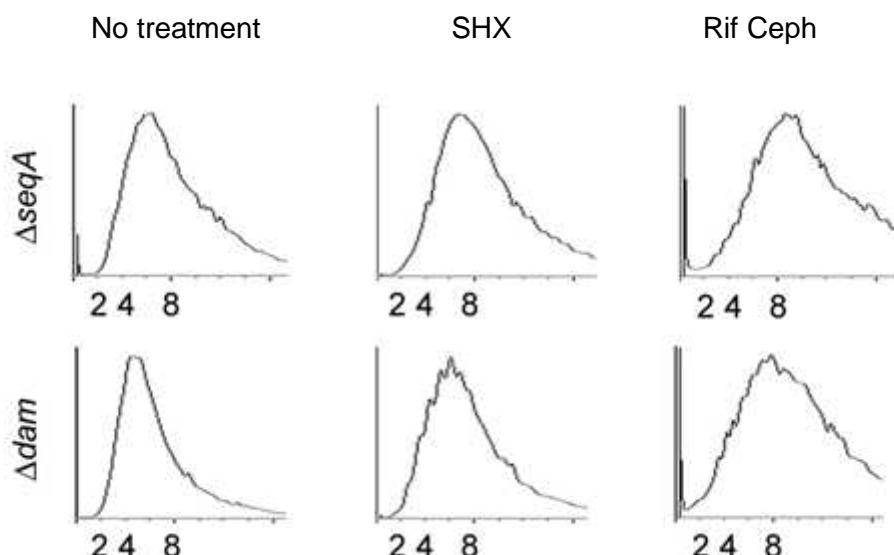
Osim *relA* mutanata promatrane su i stanice u kojima je potaknuta iznadprosje na ekspresija kataliti ki vrlo aktivnog RelA' fragmenta. Njegova ekspresija dovodi do proizvodnje ppGpp neovisne o ribosomima i uvjetima u stanci (odnosno neovisno o nedostatku aminokiselina) (Schreiber, i sur., 1991.). Budu i da nadprosje na sinteza ppGpp dovodi do zaustavljanja stani nog ciklusa možemo prepostaviti kako je baš to uzrok stresnog odgovora, a ne nedostatak aminokiselina ili gladovanje stanice. (Slika 2. B)



Slika 2. A, B Zaustavljanje stani nog ciklusa ovisi o RelA.

Ovisnost zastoja ciklusa o SeqA i metilazi Dam

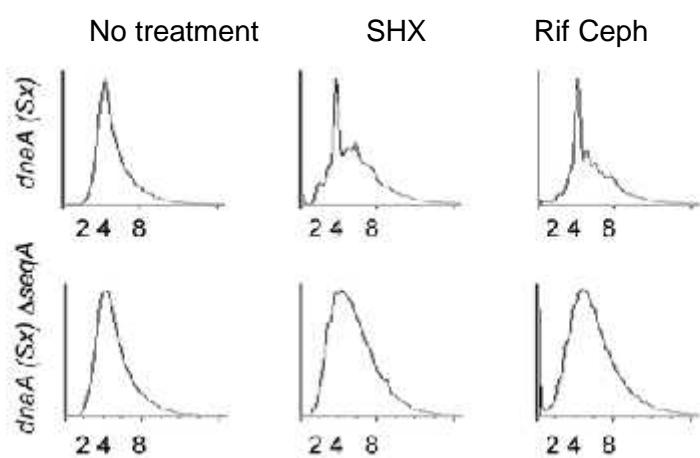
Protein SeqA ima sposobnost vezanja na DNA ime utje e na inicijaciju replikacije i razdvajanje kromosoma. Zbog svoje uloge u kontroli inicijacije replikacije testirani su mutanti *seqA* kako bi se prouila koli ina DNA u njihovim stanicama nakon izazivanja stresnog odgovora na oskudne uvjete. Taj se protein preferirano veže na hemi-metilirane GATC slijedove (Skarsta, i sur., 2000.), za što je zaslužna DNA adenin metilaza (Dam). Radi toga su testirani i mutanti *dam* iji bi rezultati trebali biti slični mutantima *seqA*. Rezultati oba mutanta su vrlo slični i mogli bi ukazivati na nastavak replikacije otporne na utjecaj rifampicina, budu i da u stanicama nema karakteristi ne raspodjele koli ina DNA molekula (Slika 3.).



Slika 3. Zaustavljanje staničnog ciklusa ovisno o SeqA i DNA hemi-metilaciji

U bakterijskim stanicama koje imaju povišenu aktivnost DNA metilaze smanjuje se sposobnost vezanja SeqA na DNA jer je se GATC slijedovi potpuno metilirati što konačno dovodi do poremećaja u prirodnom započinjanju stresnog odgovora na oskudne uvjete (von Freiesleben, i sur., 1994.). S obzirom na to, njihovi bi rezultati bili slični rezultatima mutantima *seqA* i *dam*.

Razlog za povećanu količinu molekula DNA u mutantima *seqA* jest njihov nedostatak kontrole inicijacije replikacije (divlji tip bi onemogućavao stalnu replikaciju) (Lu M, i sur., 1994.). Kako bi se provjerilo utječe li prekomjerna inicijacija replikacije na neki način faktor u odgovoru na oskudne uvjete, konstruiran je hipomorfni (propusni) *dnaA(Sx)* alel koji pri niskim temperaturama snižava frekvenciju inicijacije, a pri odgovarajućoj temperaturi potiskuje prekomjernu inicijaciju (vidljivo u mutantima *seqA*) (Boye, i sur., 2001.). Samostalno taj alel ne utječe na stresni odgovor, no prilikom obrade sa serin hidroksamatom dolazi do karakteristične promjene u količini DNA molekula (Slika 4.). Ako se *dnaA(Sx)* alel nalazi u *seqA* bakteriji, količina DNA će biti slična onoj u stanicama divljeg tipa, no nakon obrade sa serin hidroksamatom ne pokazuju aktiviranje stresnog odgovora. Taj nedostatak aktivacije bi mogao ukazivati na to da SeqA posjeduje aktivnost značajnu za stresni odgovor, a ne da je nedostatak stresnog odgovora posljedica prekomjerne inicijacije.

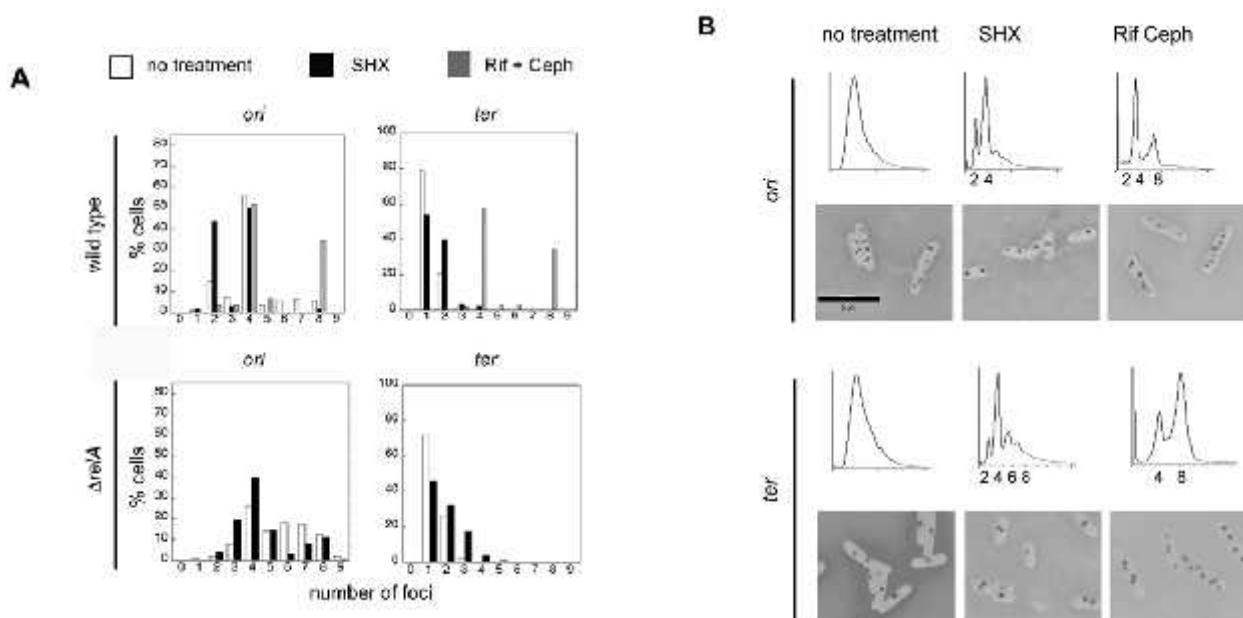


Slika 4. Ovisnost zaustavljanja stani nog ciklusa o SeqA

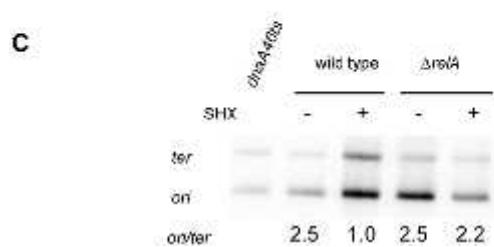
Razdvajanje specifičnih kromosomskih regija nakon zastoja zbog oskudnih uvjeta

Kako bi se provjerio na in razdvajanja specifičnih sparenih kromosomskih regija korišteni su bakterijski sojevi u kojima je slijed *parS* dodan u blizini ishodišta ili terminacijskog slijeda replikacije. Slijed *parS* služi kao mjesto za vezanje proteina GFP-ParB (nastao ekspresijom plazmidnog gena). Taj protein omogućava vizualizaciju slijeda koji želimo promatrati (*Li, i sur.*, 2002.). Divlji tip bakterijskih stanica je imao obilježena dva ili etiri zasebna *oriC* lokusa (*Slika 6.*), dok je broj vidljivih *ter* lokusa bio samo jedan ili dva. Ali nakon induciranja stresnog odgovora omjer vidljivih *oriC/ter* slijedova je 1.0 što ukazuje na završetak replikacije. Nasuprot tome, mutanti *relA* zadržavaju omjer *oriC/ter* iznad 2 (*Slika 5.*), ak i nakon tretiranja sa serin hidroksamatom koji bi trebao inducirati stresni odgovor nakon što replikacija i dioba stanice završe. Slično mutantu *relA*, omjer *oriC/ter* u mutantima *dnaA(Sx)* *seqA* je iznosio 2.8 prije obrade sa serin hidroksamatom, odnosno 2.7 nakon obrade - to ukazuje da u tim sojevima replikacija traje ak i nakon izazivanja stresnog odgovora.

Radi sega je tada omjer *oriC/ter* slijedova u divljem tipu iznosio 2:1 ak i nakon obrade sa serin hidroksamatom? Mogući razlog jest to da ter slijedovi kromosoma ostaju spareni (što nije slučaj ako se divlji tip nalazi na mediju sa rifampicinom i cefaleksinom).



Slika 6. Broj označenih slijedova oriC i ter u stanicama divljeg tipa i mutantima *relA*

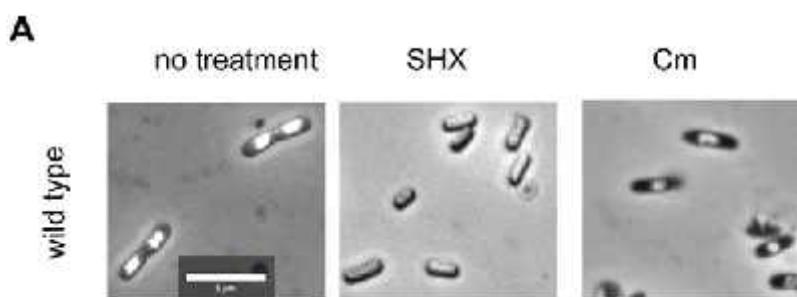


Slika 5. Slike dobivene fluorescentnim mikroskopom sa prikazom obilježenih slijedova oriC i ter, i njihov omjer

Zastoj ciklusa u stanicama divljeg tipa se odvija sa jednim dekondenziranim nukleoidom

Prije induciranja zastoja, u stanicama divljeg tipa vidljiva su 1 ili 2 nukleoida (korištena DAPI boja) na kojima se mogu uočiti razdvajanje kromosoma (*Slika 7.*); ali nakon obrade sa serin hidroksamatom što inducira stresni odgovor i zastoj staničnog ciklusa, stanice sadrže samo jedan dekondenzirani nukleoid koji zauzima veliki volumen stanice. Ukoliko bi se stanice divljeg tipa tretirale kloramfenikolom (inhibitor translacije) bio bi vidljiv samo jedan kondenzirani nukleoid u središtu stanice.

Osim stanica divljeg tipa, promatrana je i morfologija nukleoida u sojevima *relA* (*slika 8.*) i *dnaA(Sx)* *seqA* (*slika 9.*).

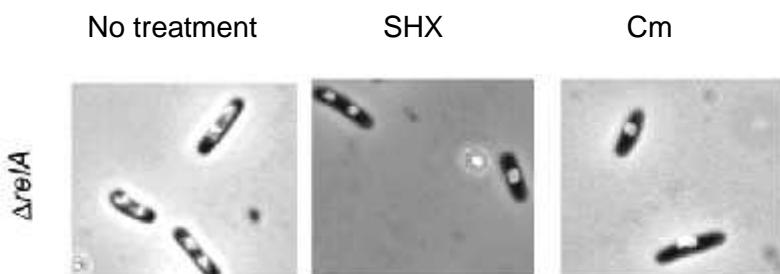


Slika 7. Nukleoidi u stanicama divljeg tipa

Slika s lijeve strane prikazuje neobraćene stanice divljeg tipa, u kojima se mogu uočiti 2 nukleoida.

Slika u sredini prikazuje stanice tretirane sa serin hidroksamatom, nukleoid zauzima većinu stanice i citoplazma nije vidljiva.

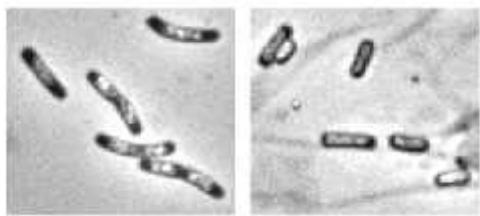
Slika s desne strane prikazuje stanice tretirane kloramfenikolom, u kojima je jedan kondenzirani nukleoid.



Slika 8. Nukleoidi u *relA* stanicama

Vidljivo je kako nukleoid u stanicama tretiranim serin hidroksamatom izgleda kao u stanicama divljeg tipa tretiranim kloramfenikolom. Moguće je kako ppGpp (koji *relA* soj ne može sintetizirati) ima neku ulogu u procesu dekondenzacije nukleoida, te uslijed njegova nedostatka nukleoid ostaje kondenziran.

dnaA(Sx)ΔseqA

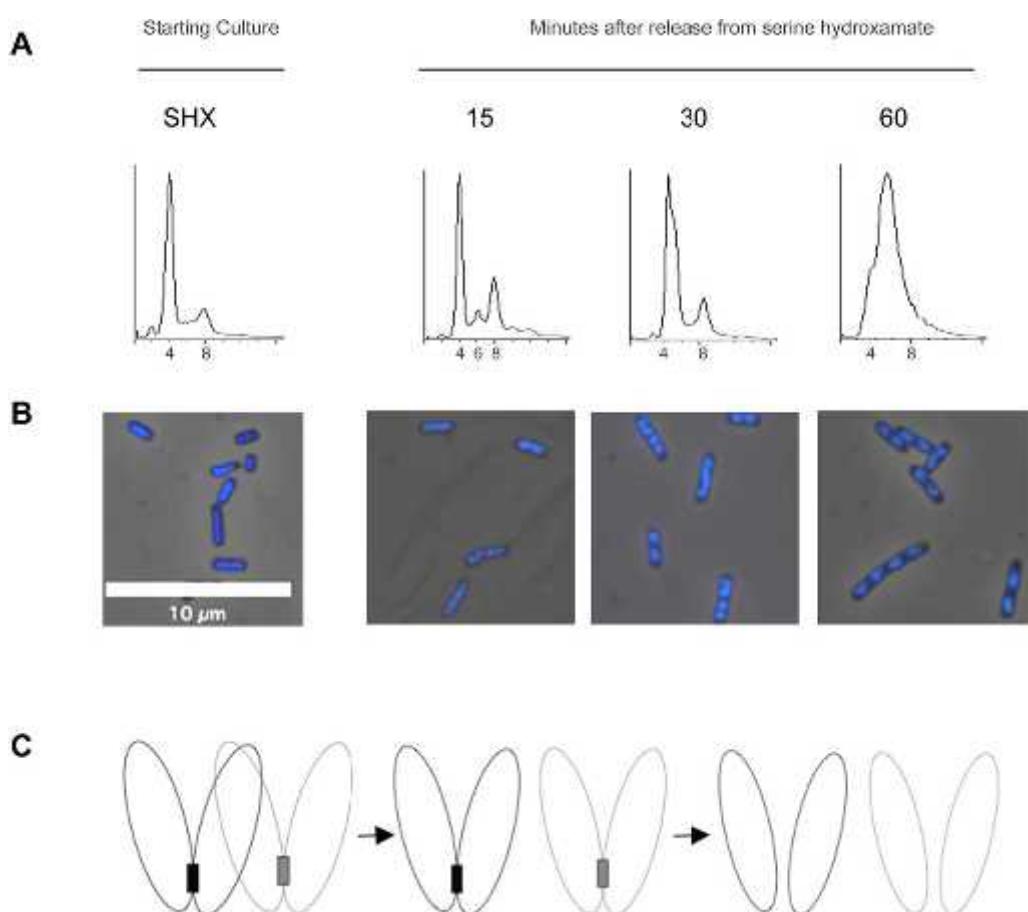


Slika 9. Morfologija nukleoida u soju dnaA(Sx) seqA

U stanicama tretiranim serin hidroksamatom, nukleoid je dekondenziran i zauzima veliki volumen stanice, dok u netretiranim stanicama ostaje kondenziran.

Završetak zastoja

Nakon što su stanice provele 90 minuta u zastoju stani nog ciklusa, oprane su i stavljene u medij u kojem mogu nastaviti rasti. Koli ina DNA u njima je prena protom citometrijom i DAPI bojanjem (*slika 10.*), i već 15 minuta nakon završetka zastoja vidljivo je razdvajanje nukleoida. Razdvajanje slijedi uzorak po kojem se prvo razdvajaju sestrinski kromosomi koji su spareni preko svojih ter slijedova, a nakon njih se razdvajaju preostala 2 par. Prema tome, replikacija i dioba se normalno nastavljaju prema planu koji je stanica započela prije stresnog odgovora.



Slika 10. Završetak zastoja stani nog ciklusa

Slika A prikazuje kolичinu DNA u stanicama dok traje zastoj - većina stanica ima 4N jer su im u replikaciji i diobi onemogućene; zatim u intervalima nakon završetka zastoja vidljivo je kako se u stanicama koliciina DNA mijenja radi segregacije i diobe stanica.

Na slika B vidljive su stanice obojane DAPI bojom i promatrane protom citometrijom (plavom bojom je vidljiva DNA jer se DAPI veže na A-T bogate slijedove).

Slika C ilustrira pretpostavljeni način razdvajanja kromosoma.

Inhibicija formiranja kolonija uslijed nakupljanja ppGpp je olakšana u mutantima Δdam i $\Delta seqA$

Divlji tip bakterija nije u mogu nosti formirati kolonije kada sadrže pove ane koncentracije ppGpp, ali nije poznato je li nemogu nosti formiranja kolonija posljedica stresnog odgovora i mogu li *dam* i *seqA* mutanti formirati kolonije ak i pod poja anom proizvodnjom ppGpp. Kako bi se provjerila hipoteza, u divlji tip i mutante je unesen pALS13 plazmid induciran IPTG-om koji je u stanju kodirati za djelomi ni protein RelA'. Kao kontrola je poslužio drugi plazmid pALS14 ijom ekspresijom stanica proizvodi neaktivni RelA fragment.

Za razliku od divljege tipa, koji nije mogao formirati kolonije, mutanti *seqA* i *dam* su zadržali sposobnost formiranja kolonija, vrlo vjerojatno zbog njihove nemogu nosti da samostalno izazovu sva obilježja zastoja stani nog ciklusa.

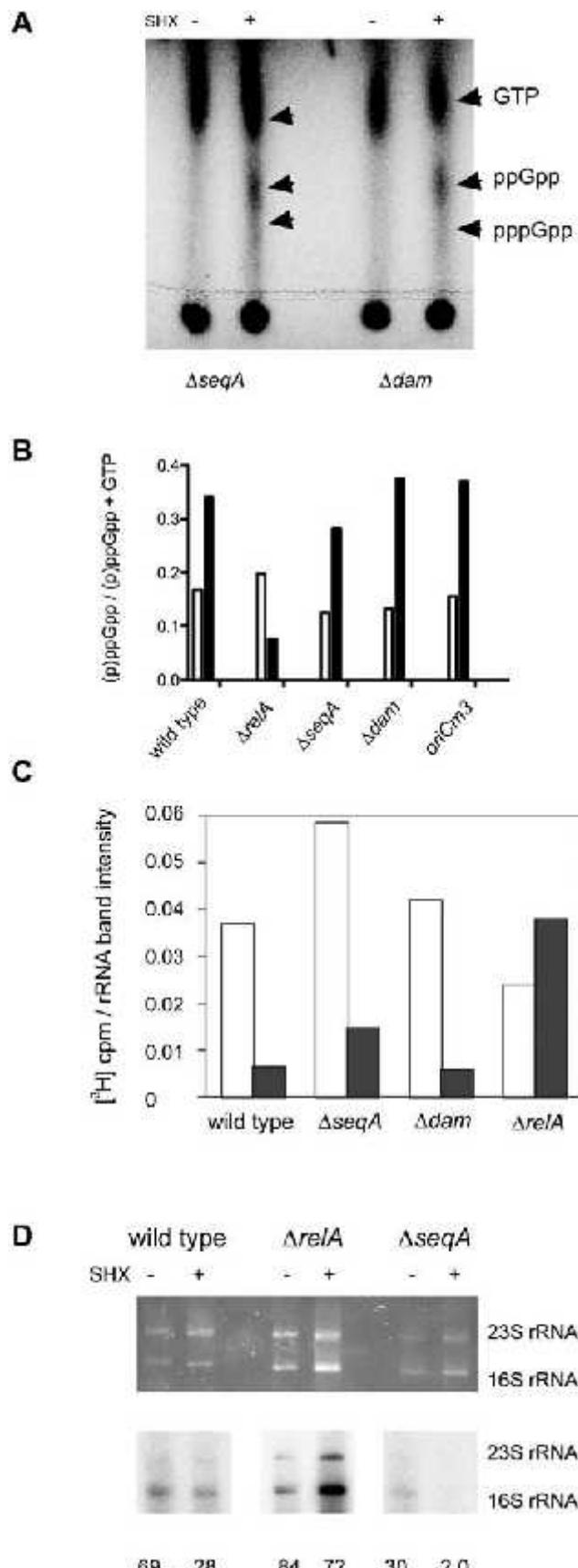
Sojevi $\Delta seqA$ i Δdam imaju normalnu kontrolu nad ostalim značajkama stresnog odgovora

Objašnjenje zašto *seqA* i *dam* nisu u mogu nosti zaustaviti stani ni ciklus se nalazi u molekuli ppGpp - ili je proizvodnja ppGpp ili njena interakcija sa RNA polimerazom onesposobljena.

Tijekom stresnog odgovora, reduciraju se sinteza RNA i transport uridina. Kako bi se provjerila situacija u mutantima *seqA* i *dam*, u stanicama su korišteni ^{32}P koji se ugra uje u ppGpp i $[^3H]$ -uridin koji se prenosi u stanicu. Stanice divljege tipa u kojima je induciran stresni odgovor pokazuju smanjenje radioaktivno obilježene rRNA (zbog manjka $[^3H]$ -uridina), i pove anu proizvodnju ppGpp karakteristi nu za iniciranje zastoja stani nog ciklusa. Iste rezultate su pokazivali mutanti *seqA* i *dam* što ukazuje da nemaju ograni enja u proizvodnji ppGpp niti regulaciji rRNA sinteze, nego specifi no nisu u stanju pravilno odgovoriti na pove anu prisutnost ppGpp.

Kao kontrola, poslužio je mutant *relA* koji nije u stanju proizvoditi ppGpp i samim time neosjetljiv je na stresni odgovor u uvjetima oskudice.

Slika 11. Sinteza ppGpp i ozna avanje rRNA



Slika A: nakon indukcije stresnog odgovora dodatkom serin hidroksamata u oba mutanta možemo uoiti nastanak ppGpp.

Slika B: koncentracija ppGpp u odnosu na po etnu koncentraciju GTP-a u stanicama, prije tretiranja sa serin hidroksamatom i 10 minuta nakon tretiranja. Dolazi do porasta u divljem tipu i svim mutantima, osim *relA* koji nije u mogunosti sintetizirati ppGpp.

Slika C: koliko puta je ostanao [³H] u molekulama rRNA (izolirane elektroforezom) prije i nakon tretmana sa serin hidroksamatom. Zbog smanjenog unosa i redukcije u sintezi rRNA manje puta je ostalo nakon što započeo stresni odgovor.

Slika D: ugradnja ³²P_i u rRNA prije i nakon tretmana sa serin hidroksamatom. Jedino u mutantu *relA* razina prije i poslije tretmana je ostala slična, jer ostala dva soja reduciraju sintezu rRNA u uvjetima oskudice.

Zaključak

Za iniciranje stresnog odgovora koji bi doveo do kona nog zastoja stani nog ciklusa potreban je protein RelA, zaslužan za sintezu ppGpp. Nakon po etka zastoja blokira se inicijacija replikacije, no elongacija dovršava ukoliko je prethodno zapoela. Po završetku replikacije kromosomi ostaju spareni pri svojim ter slijedovima, a razdvajaju se tek nakon što se stani ni ciklus može nastaviti.

Većina stanica ulazi u zastoj prije inicijacije replikacije te sadrže cijeli broj kromosoma, koji ovisi o mediju u kojem su stanice rasle; no postoje izuzeci kada stanice ulaze u zastoj nakon replikacije, ali prije razdvajanja kromosoma i diobe stanice.

Mutanti *seqA* i *dam* nisu u stanju kontrolirati zaustavljanje replikacije, unatoč povećanoj koncentraciji ppGpp, te stoga nastavljaju sa rastom. Dakle i stanice divljeg tipa mogu suzbiti utjecaj stresnog odgovora na zaustavljanje stani nog ciklusa ako dođe do prekomjerne sinteze Dam metilaze što ukazuje na regulaciju pomoći u proteina SeqA koji se veže na hemi-metilirane GATC slijedove. Smatra se kako SeqA i Dam isključivo kontroliraju stani ni ciklus, ali ne i ostale dijelove stresnog odgovora poput koncentracije ppGpp.

Literatura

- Barker MM, Gaal T, Josaitis CA, Gourse RL (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J Mol Biol* 305: 673–688.
- Boye E, Blinkova A, Walker JR (2001) Defective initiation in an *Escherichia coli dnaA(Cs,Sx)* mutant. *Biochimie* 83: 25–32.
- Ferullo DJ, Lovett ST (2008) The Stringent Response and Cell Cycle Arrest in *Escherichia coli*
- Li Y, Sergueev K, Austin S (2002) The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol Microbiol* 46: 985–996.
- Lu M, Campbell JL, Boye E, Kleckner N (1994) SeqA: A negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* 77: 413–426.
- Potrykus K, Cashel M (2008) (p)ppGpp: Still Magical? *Annu Rev Microbiol* 62: 35–51.
- Schreiber G, Metzger S, Aizenman E, Roza S, Cashel M, et al. (1991) Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 3760–3767.
- Tosa T, Pizer LI (1971) Biochemical bases for the antimetabolite action of Lserine hydroxamate. *J Bacteriol* 106: 972–982.
- von Freiesleben U, Rasmussen KV, Schaechter M (1994) SeqA limits DnaA activity in replication from oriC in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 14: 763–772.

Sažetak

Bakterijski "stringent response", uzrokovani nedostatkom hranjivih tvari, potiče gomilanje signalnih nukleotida ppGpp i pppGpp. Stanice divljeg tipa prolaze kroz zastoj ovisan o proteinu RelA nakon što ih se tretira serin hidroksamatom kako bi imale cijeli broj kromosoma u sebi i omjer ishodišta/terminacijskih slijedova 1. Stanje rasta prije nestošice hranjivih tvari određuje broj kromosoma u stanici nakon zastoja staničnog ciklusa; regije kromosoma u kojima se nalaze ishodišta replikacije su razdvojene, ali regije sa terminacijskim slijedovima su sparenе.

Nukleoidi u takvim "zaustavljenim" bakterijama su nekondenzirani. Ukoliko se stanice tretiraju kloramfenikolom nukleoidi postaju vrlo kondenzirani, a tretiranjem rifampicinom i cefaleksinom kromosomi više nisu spareni kod terminacijskih slijedova. Stvaranje kolonija je inhibirano zbog nakupljanja ppGpp, osim u mutantima *seqA* i *dam*.

Završetak gladovanja dovodi do vrlo brze reorganizacije nukleoida, razdvajanja kromosoma i dovršavanja replikacije.

Osim nakupljanja ppGpp, metilacija DNA i vezanje SeqA su imbenici potrebni za pokretanje potpunog zastoja u stanici,ime se utjecalo na inicijaciju replikacije i segregaciju kromosoma.

Summary

The bacterial stringent response, triggered by nutritional deprivation, causes an accumulation of the signaling nucleotides ppGpp and pppGpp. Wild type cells undergo a RelA-dependent arrest after treatment with serin hydroxamate in order to contain an integer number of chromosomes and a replication origin/terminus ratio of 1. The growth rate prior to starvation determines the number of chromosomes after arrest; chromosomal regions corresponding to the origins of replication are segregated, while the termination regions remain colocalized.

Nucleoids of these arrested cells are decondensed. If treated with chloramphenicol, they become highly condensed, and treatment with rifampicin and cephalexin causes the chromosomes to segregate at their termination regions. Colony formation is inhibited due to ppGpp accumulation, except in *seqA* and *dam* mutants.

Release from starvation causes rapid nucleoid reorganization, chromosome segregation and replication resumption.

Accumulation of nucleotide ppGpp, DNA methylation and SeqA binding are all factors which contribute to initiating complete cell cycle arrest, which in turn affects replication initiation and chromosome segregation.