

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Henri Ingelman

Katsetingimuste mõju persistorite esinemissagedusele *Escherichia coli*'s

Bakalaureusetöö

Juhendaja vanemteadur Niilo Kaldalu

TARTU 2014

## SISUKORD

1	Kasutatud lühendid.....	3
2	Sissejuhatus .....	4
3	Kirjanduse ülevaade .....	5
3.1	Tüüp I ja tüüp II persistorid.....	8
3.2	Persistorite teke .....	9
3.3	Persistorite molekulaarsed mehhanismid .....	12
3.4	Persistorite uurimine ja ärkamiskineetika .....	16
3.5	Persistorite uurimise tähtsus.....	18
4	Eksperimentaalosa.....	20
4.1	Töö eesmärgid.....	20
4.2	Materjal ja meetodika.....	21
4.2.1	Bakteritüved .....	21
4.2.2	Kasutatud kasvusöötmed ning lahused.....	21
4.2.3	DMSO säilituskultuuride tegemine .....	22
4.2.4	Bakterikultuuri kasvatamine ja persistorite arvukuse määramine erinevatel tardsöötmetel .....	22
4.2.5	Persistorite arvukuse määramine kultuuri kasvades.....	22
4.3	Tulemused.....	24
4.3.1	Kasutatava tardsöötme mõju persistorite arvukusele .....	24
4.3.2	Persistorite teket mõjutavate geenide sõltuvus kultuuri kasvufaasist.....	25
4.4	Arutelu.....	27
5	Kokkuvõte .....	29
6	Summary .....	30
7	Kirjanduse loetelu .....	31
8	Lisad .....	36

## 1 Kasutatud lühendid

**Amp** – ampilitsiin

**Cip** – tsiprofloksatsiin

**DMSO** – dimetüül sulfoksiid

**g** – suhteline tsentrifugaaljõud

**Hip** – kõrgelt persistentne (*high persistence*)

**Lag faas** – tähistab bakterikultuuri kasvufaasi, mis eelneb logaritmilisele kasvufaasile. *Lag* faasis kohaneb kultuur keskkonnaga ning veel (ulatuslikku?) jagunemist ei toimu, kuid sünteesitakse erinevaid molekule (näiteks RNA-d ja ensüüme)

**Log faas** – ehk logaritmiline või eksponentsiaalne kasvufaas, kus bakterite jagunemiskiirust kasvukõveral iseloomustab võrdeline sõltuvus rakkude arvu logaritmi ja aja vahel.

**Lon** - ATP-sõltuv seriini endoproteaas, mis degradeerib nii ebanormaalseid kui ka spetsiifilisi regulaatorvalke

**Ofi** – ofloksatsiin

**PBS** – fosfaatpuhvriga soolalahus

**polüP** – polüfosfaat

**Ppk** – polüfosfaadi kinaas

**(p)ppGpp** – koondnimetus kahe regulaator molekuli, guanosiintertrafosfaadi ja guanosiinpentafosfaadi kohta

**relA** – (p)ppGpp sünetas, mis on oma nime saanud sõnast „relaxed

**T-AT** – toksiin-antitoksiinsüsteem.

## 2 Sissejuhatus

Bakterikolooniates esineb alati suur fenotüübiline varieeruvus (Smits *et al.*, 2006), mis aitab neil üle elada muutuvaid elutingimusi (Balaban *et al.*, 2004). Käesoleva töö uurimisobjekt, persistentsus, on ilus näide mittepärilikust omadusest, kus teatud hulk kolooniast läheb muuhulgas ka kasvu (ja paljunemist) toetavas keskkonnas üle soikeseisundisse (Balaban *et al.*, 2004; Keren *et al.*, 2004). Persistorid on võimelised üle elama kokkupuute bakteritsiidiga ning hiljem kasvamist jätkama (Bigger 1944). Persistorite mõistmine on vaevaline, sest nende uurimisega kaasneb alati suur kõikumine tulemustes, mis tuleneb nii eelmainitud varieeruvusest (Smits *et al.*, 2006), persistorite väikesest arvukusest kultuurides (Bigger 1944; Lewis 2007), katsetingimustest (Jöers *et al.*, 2010; Luidalepp *et al.*, 2011) ning nagu selgub selles töös - ka uuritava bakterikultuuri kasvufaasist. Vaatamata raskustele on persistorite uurimine väga tähtis, sest viimastel aastakümnetel on leitud, et persistorid on seotud paljude, kui mitte enamuste, krooniliste haigustega nagu näiteks tsüstiline fibroos (Mulcahy *et al.*, 2010) ning tuberkuloos (Barry *et al.*, 2009). Lisaks on persistentsust seostatud ka biofilmide ning nende elimineerimiskustega (Lewis *et al.*, 2005). Persistorite parem mõistmine on kahtlemata vajalik tulevikus uute antibiootikumide arendamiseks.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaates antakse ülevaade persistoreid iseloomustavatest omadustest ning selgitatakse erinevat tüüpi persistorite erinevust vastavalt tekkeajale ja -viisile. Kirjeldatakse ka põhilist persistorite teket käsitlevat teooriat, mis püüab seletada molekulaarseid mehhanisme persistorite taga. Lisaks on juttu persistorite uurimisest ja sellega kaasnevatest takistustest ning persistorite uurimise tähtsusest. Töö eksperimentaalses osas uuritakse, kuidas mõjutavad persistorite arvukust erinevad tardsöötmed ning kuidas sõltub persistentsust mõjutavate geenide mõju kultuuri kasvufaasist. Käesolev bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

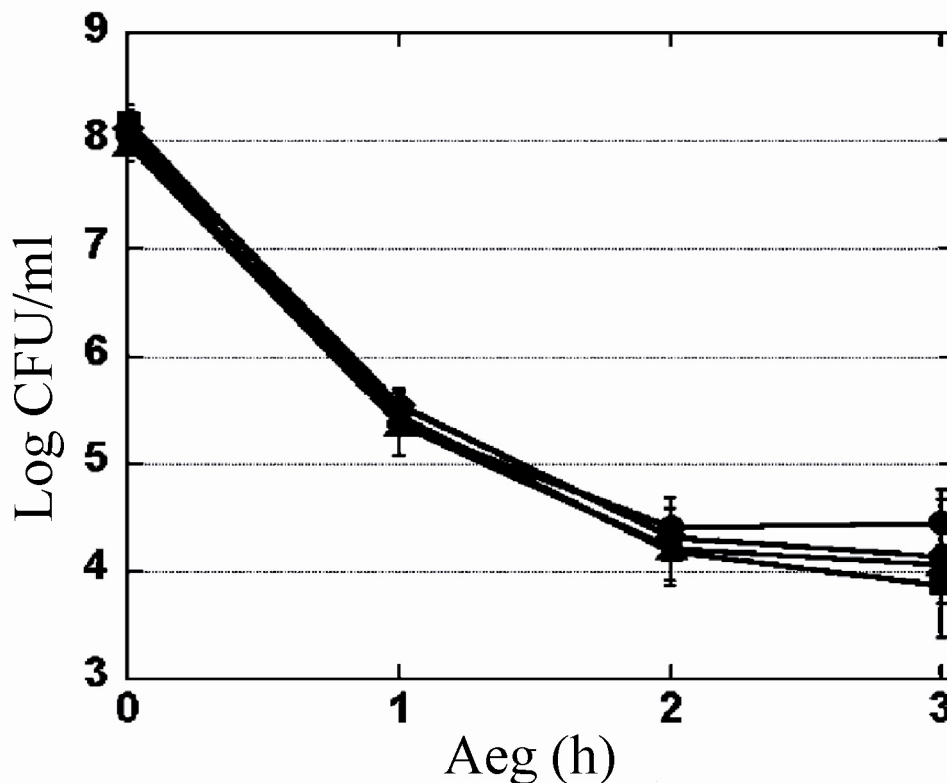
Märksõnad – *Escherichia coli*, persistentsus, antibiootikumitolerantsus, fenotüübiline varieeruvus

### 3 Kirjanduse ülevaade

“Kõige tähtsam küsimus seoses persistoritega on sama, mis tahes muu objekti puhul – mis on selle tähtsus? Persistentsus tundub olevat peamine põhjus, miks kroonilised infektsioonid ei allu antimikroobsetele ravimitele. Põhiprobleem on (nüüd) põhjuslikkuse määramine.”  
(Lewis, 2010)

Joseph Warwick Bigger näitas 1944 aastal, et antibiootikumile tundlikke bakterikultuure ei suudeta enamasti steriliseerida. Tema kui persistorite esmakirjeldaja pakkus ühe võimalusena välja, et see võib tuleneda väikestest mitte-kasvavatest (või aeglaselt kasvavatest) subpopulatsioonidest klonaalses bakterikultuuris (Bigger, 1944), mida tänapäeval tuntakse persistorite nime all. Kim Lewis defineeris persistorid kui rakud, mis on mitmete ravimite suhtes tolerantsetes soikeseisundis ning peale antibiootikumi eemaldamist suudavad jätkata kasvumist (Lewis, 2010). John D. McKinney persistorite operatsiooniline definitsioon on järgnev: rakud, mis elavad üle pikaajalise bakteritsiidi (näiteks antibiootikumi) toime, olles tegelikult konkreetse bakteritsiidse mõju suhtes tundlikud. See eristab selgelt persistorid resistentsetest bakteritest, kuna viimaste resistentsus tuleneb geneetilistest päritud muutustest (Balaban *et al.*, 2013). Nimelt, persistoritel on antimikroobne tolerantsetes soikeseisundis olevate rakkude omadus elada üle antibiootikumi töötlus ilma geneetiliselt päritud resistantsusmehhanismideta. Persistorite selekteerimisel antibiootikumumiga ilmneb tavaliselt bifaasiline tapmiskõver - enamus baktereid tapetakse kiirelt ära ning peale seda jääb alles osa rakke (persistoreid), mille arvukus on ajas üsna stabiilne (**joonis 1**). Mingi antibiootikumi suhtes resistantsedel bakteritel on aga antimikroobne resistantsus - rakkude omadus elada üle antibiootikum (ja ka kasvada selle juuresolekul!), takistades antibiootikumil sihtmärgiga (näiteks ribosoomi osad, DNA güraas) seondumast erinevate resistantsusmehhanismide abil (Lewis, 2010). Kõik resistantsusmehhanismid takistavad antibiootikumil märklauale seondumast. See võib toimuda mitmel eri viisil: 1) antibiootikum pumbatakse rakust välja 2) antibiootikumi märklaud on muteerunud 3) Antibiootikum modifitseeritakse keemiliselt ning muudetakse seeläbi kahjutuks. Persistentsus aga on põhjustatud antibiootikumi märklaua inaktiveerimise ja/või blokeerimise kaudu, takistades vigase produkti teket (Lewis, 2010). On näidatud, et persistorites on tavalise rakuga võrreldes madalam (kuid mitte välja lülitunud!) valgusüntees, metabolism ja membraantransport (Orman ja Brynildsen, 2013). Lihtsustatult võib oletada, et antibiootikum pääseb perstoritesse ja võib ka seonduda märklauaga, kuid sel ei ole tähtsust, sest persistorid on soikeseisundis rakud (Balaban *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2006). Tolerantsuse mehhanismid on täpselt teadmata ning persistorite uurimise üks

suuremaid küsimusi. Tolerantsuse ja resistantsuse eristamisel on ka oluline märkida, et antibiootikumi minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (MIK) on resistantses mutandis kõrgem kui metsiktüübil, suurenenud persistorite arvukusega *hip* mutandi puhul aga MIK ei muutu (Lewis, 2010).



Joonis 1 - Persistorid vs resistentsed bakterid: persistentsus ei ole pärilik. Joonisel on kujutatud bakterite arvukus peale antibiootikumi (ampilitsiini) töötlust. Langevad jooned kujutavad persistoreid, mida korduvalt reinkoleeriti. Resistentses mutandi puhul jätkaksid rakud antibiootikumi juuresolekul kasvamist ning bakterite arvukus kasvaks. Joonis reprodutseeritud Keren ja teiste 2004. aasta töö põhjal.

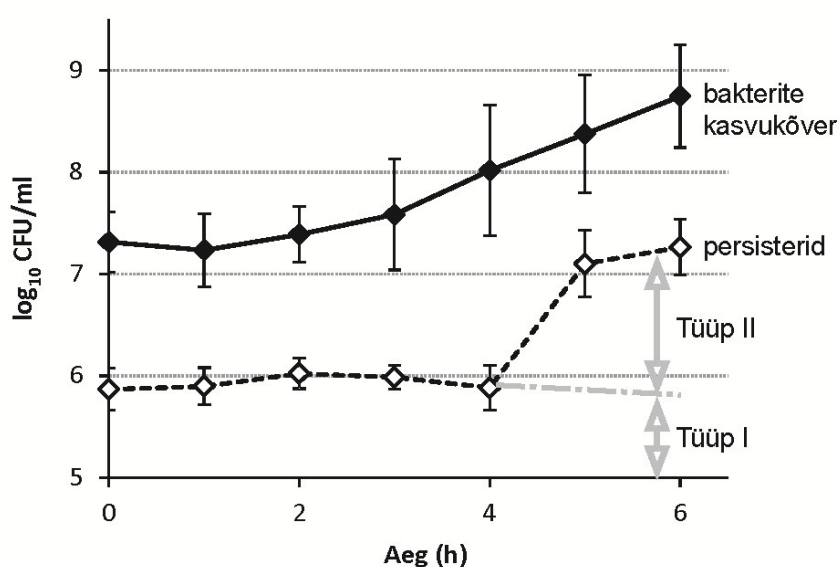
Bakteritsiidsed antibiootikumid tapavad rakke, sundides aktiivset märklauda produtseerima vigaseid saadusi. Tähtis on mainida, et enamus bakteritsiidseid antibiootikume suudab tappa ainult kasvavaid rakke (Tuomanen, 1986), kuid on mitmeid erandeid. Näiteks florokinoloonid seonduvad DNA güraasiga (topoisomeraas, mis aitab DNA-d replikatsioonil lahti kerida (Reece ja Maxwell, 1991) ning muudavad selle endonukleasiks, mis DNA katki lõikab (Hooper, 2001). See võimaldab florokinoonidel tappa ka mittekasvavaid rakke, kuna DNA güraas on antibiootikumile kättesaadav ka aktiivselt mittekasvavas rakus (Davey *et al.*, 1988). Tänu florokinoloonidele on lahendatud üks väga tähtis punkt persistorite mõistmisel. Nimelt arvati pikka aega, et persistorid on lihtsalt mittekasvavad rakud. Kuid fakt, et florokinoonid tapavad mittekasvavaid rakke, aga persistorid jäävad ellu, näitab et see ei saa olla tõsi. Arvatakse, et persistorid on sügavas uneseisundis, kuid mingisugused protsessid nendes siiski

toimuvad (Nyström, 2003). On ka näidatud, et persistorid ei ole võrdselt tolerantsed kõigi antibiootikumide suhtes - *E. coli* log faasi kultuur, mis on persistentne florokinoloonide ja rakukesta inhibiitorite (näiteks ampilitsiini) suhtes (Jöers *et al.*, 2010), on elimineeritav aminoglükosiidide poolt (Allison *et al.*, 2011). Aminoglükosiidid toimivad translatsioon lugemisraami nihke kaudu ning selline tapmine sõltub katses kasutatud süsinikuallikast. Nimelt sõltub aminoglükosiidide import rakku rakumembraani ioongradiendist, mida mõjutab erinevate suhkrute lagundamisel saadav erinev NADH hulk (Allison *et al.*, 2011). See uurimus kinnitab ja oli aluseks eelnevalt mainitud faktile, et persistorites on vähemalt mingil määral aktiveeritud metabolism (Orman ja Brynildsen, 2013).

Nagu juba eelnevalt põgusalt mainitud, on persistentsus mittepärilik rakkude omadus, olles elegantne näide fenotüübilisest variatsioonist ehk olukorrast, kus geneetiliselt homogeense kultuuri järglased on varieeruva fenotüübiga (Smits *et al.*, 2006). Juba Bigger märkis 1944. aastal, et persistoritest kasvatatud uus koloonia on antibiootikumile täpselt sama tundlik, kui esialgne koloonia ning moodustab samuti väikese hulga persistorrakke (Bigger, 1944) (**joonis 1**). Sama tulemust on korranud ka Keren ja teised 2004. aastal (Keren *et al.*, 2004). See näitab, et persistentsus ei ole pärilik omadus, vaid epigeneetiline fenomen. Loomulikult ei välista see seda, et persistentsus võib olla (vaatamata mittepärikkule avaldumismehhanismile) geneetiliselt määratud ning evolutsiooniliselt kasulik omadus (Kussell ja Leibler, 2005).

### 3.1 Tüüp I ja tüüp II persistorid

Bigger märkis esimeses persistoreid kirjeldavas töös, et mõned persistorid on kultuuri külvamisel uude söötmesse eelnevalt uinunud ning mõned keskkonnatekkelised (Bigger, 1944). Balan ja teised kategoriseerisid persistorid kahte rühma sama liigituse põhjal: tüüp I persistorid, kes on uineseisundisse langenud statsionaarses (eelmises) kasvufaasis, ja tüüp II persistorid, kes saavutavad uineseisundi kasvu käigus (Balaban *et al.*, 2004). Nagu iga liigituse puhul, on see kunstlik ning loodud lihtsalt asjade paremaks mõistmiseks. Selle klassifikatsiooni eesmärk on persistorite päritolu parem selgitamine – kas uuritavad persistorid on pärit eelmisest statsionaarsest kasvufaasist või jälgitavas kasvufaasis tekkinud. Näiteks kui kultuurile lisatakse antibiootikum inokuleerimise hetkel, *lag* või varases logaritmilises kasvufaasis, siis on ellujääjate näol tegemist tüüp I persistoritega. Kui aga kultuurile lisada antibiootikum hilises *log* faasis, siis on suurem osa ellu jäänud rakkudest tüüp II persistorid (lisaks tüüp I persistoritele). Tüüp II persistorid hakkavad tekkima, kui kultuuris hakkavad toitained otsa saama ning kultuur hakkab lähenema statsionaarsele kasvufaasile (Keren *et al.*, 2004) (**joonis 2**). Selguse huvides on tähtis rõhutada, et nii tüüp I kui ka tüüp II persistorid saavad eksisteerida koos samas kultuuris ning mõlema tüübi puhul on tõenäoliselt tekkepõhjus sama – mingis subpopulatsioonis aktiveeruv stressivastus (Balaban *et al.*, 2013).



Joonis 2 - Tüüp I ja tüüp II persistorid. Näidistulemused persistorite arvukuse määramise katsest – pidevjoon tähistab (statsionaarsele kasvufaasile läheneva) kultuuri bakterite arvukust ning punktiirjoon märgib persistorite arvukust peale 5 h antibiootikumitöötlust. 0 h tähistab kultuuri inokuleerimist üleöökuultuurist. Tüüp II persistorite produktsioon algab järsult ning neid tekib kordades rohkem kui tüüp I persistoreid (Keren *et al.*, 2004).



### 3.2 Persistorite teke

Mis indutseerib persistorite teket? Hiljutised leiud paljastavad, et persistentsuse taga peituvad mitmed mehhanismid (Maisonneuve ja Gerdes, 2014), kuid üldise tekkemehhanismi alusel jagatakse persistentsus kahte lehte: kas stohhastiliselt tekkinud (Balaban *et al.*, 2004; Maisonneuve *et al.*, 2013) või keskkonnast indutseeritud persistentsus (Dörr *et al.*, 2010). Stohhastilisust defineerib Kim Lewis kui „ülejäanud kultuurist erinevate alampopulatsioonide teket, mis tuleneb suvalistest kõikumistest geeniekspressioonis” (Lewis, 2010), kuid väljendit „stohhastika” võib kasutada ka laiemalt fluktuatsioonidest põhjustatud juhuslike protsesside kirjeldamisel. Üllataval kombel on selgunud, et mõlemal persistoritüübil on kasutusel samad molekulaarsed rajad, milles olulisemaid rolle mängivad signaalmolekul (p)ppGpp ning toksiin-antitoksiin süsteemid (Maisonneuve ja Gerdes, 2014), millede põhjalikum kirjeldus tuleb järgmises peatükis. Käesolevas peatükis toon välja erinevad persistentsuse induktsiooni mõjutavad tahud ja näitan, kuidas kirju persistorite teke on.

Keren ja teised pakkusid 2004. aastal välja, et persistorid on spetsialiseerunud ellujäämisrakud, mille produktsioon sõltub kasvufaasist (Keren *et al.*, 2004). Nad näitasid, et (stohhastiliselt indutseeritud) persistoreid iseloomustavad järgnevad omadused:

- 1) Persistoreid *lag* ja varases eksponentsiaalses faasis ei produtseerita. Eksponentsiaalse kasvufaasi alguses on periood, kui kultuuris olevate bakterite arvukus küll kasvab, kui persistoreid ei teki;
- 2) Persistorite generatsioon algab üsna järsult/kiirelt ning nende produktsioon on 2-3 korda kiirem kui ülejäanud kultuuril;
- 3) Persistorite arvukus jõuab platoole hilises eksponentsiaalses kasvufaasis.

Neid tulemusi näitasid nad nii *E.coli*, *P. aeruginosa* kui ka *S. aureus*-e puhul – viidates, et selline peristerite tekke dünaamika võib olla bakterite seas laialt levinud (Keren *et al.*, 2004). Nad näitasid ka katseliselt, et varase eksponentsiaalse kultuuri korduval reinokuleerimisel antibiootikumi juuresolekul saab persistorid täielikult elimineerida. See näitab, et persistorid ei teki algselt vastusena antibiootikumi töötlusele – millest võib järeldada, et (vähemalt teatud) persistorite teke on välistest tingimustest mittesõltuv.

Praeguseks on selgunud, et Keren ja teised iseloomustasid stohhastiliselt indutseeritud persistoreid ning lisaks neile eksisteerivad ka keskkonnast indutseeritud persistorid. On näidatud, et näiteks florokinoloonid põhjustavad persistorite teket. See on hea näide keskkonnast indutseeritud (või tüüp II, kui eksperimentaalsest vaatepunktist jälgida)

persistentsuse kohta. Täpsemalt, florokinoloonide (sealhulgas ofloksatsiini ja tsiprofloksatsiini) poolt põhjustatud vigastused raku DNA-s indutseerivad SOS vastust (Phillips *et al.*, 1987), mis läbi TisAB toksiin-antitoksiin süsteemi viib raku persistentsesse uiniseisundisse (Dörr *et al.*, 2010). TisB on membraanseoseline valk, mis suudab vähendada ioongradienti ning ATP taset, kutsudes seeläbi esile raku uinumise ja persistentsuse mitmete antibiootikumide suhtes (Dörr *et al.*, 2010). Olukorra muudab keeruliseks see, et TisB kunstlikult esile kutsutud ekspressioon (*ectopic expression*) viib terve kultuuri uiniseisundisse, kuid SOS vastuse käigus muutub persistoriteks vaid väike arv baktereid. Sellest tulenevalt arvatakse, et TisB tase kõigub stohhastiliselt erinevates rakkudes SOS vastuse korral ning ainult nendest rakkudest, kus on mingisugune teatud lävi ületatud, saavad persistorid (Lewis, 2010). Florokinoloonide mõju persistentsusele pani teadlased mõtlema ka sellele, et sarnaselt DNA kahjustusel tekkivale SOS vastusele võivad väga erinevad (või isegi kõik!) rakulised vastused mitmetele stressifaktoritele (näiteks pH, temperatuur, raskemetallid) mõjutada persistorite teket (Lewis, 2010; Maisonneuve ja Gerdes, 2014). Lisaks antibiootikumidele indutseerib persistorite teket näiteks ka suboptimaalne temperatuur ja toitainete limitatsioon (Bigger, 1944). Keskkonnast indutseeritud persistentsuse juures on oluline ka ära märkida, et tihtipeale on ühe antibiootikumi suhtes rohkem persistoreid moodustav *hip* mutant samasuguse fenotüübiga ka teiste antibiootikumide suhtes. Seda on näidatud näiteks ampilitsiini ja florokinoloonide vahel (Wolfson *et al.*, 1990). Kuid teiselt poolt näitavad kvantitatiivsed analüüsid, et antibiootikumi valik mõjutab oluliselt persistorite arvukust ja kujunevat tapmiskõverat ning sellest tulenevalt arvatakse ka, et ühes bakterikultuuris eksisteerib palju omavahel kattuvaid (ja tõenäoliselt üksteist dubleerivaid) erinevaid persistentsusmehhanisme ning persistentseid subpopulatsioone (Hofsteenge *et al.*, 2013). Selline mitmekesus võib olla evolutsiooniliselt kasulik omadus (Kussell ja Leibler, 2005) - mudelite põhjal on näidatud, et stohhastiliselt heterogeenne populatsioon võib osutada varieeruvates keskkonnaoludes edukamaks kui homogeenne (Thattai ja van Oudenaarden, 2004). On pakutud, et võibolla on *E. coli* adapteerunud ebakindlatele oludele, hajutades stohhastiliste mehhanismide kaudu persistorite ärkamisaegu erinevate fenotüüpidega alampopulatsioonides (Jöers *et al.*, 2010). Selline strateegia on looduses laialt levinud – näiteks putukate küpsemine (maturation) ja taimede idanemine on samuti väga varieeruvad protsessid, mille eesmärk arvatakse samuti olevat ettenägematute keskkonnatingimuste üleelamine (Bradford ja Roff, 1993). Arvatakse, et juba ainult fenotüübiline mitmekesisus üksi võib olla liigile piisav, et muutuva keskkonnaga kohaneda ja ellu jääda (Jansen ja Stumpf, 2005). Suvaline kõikumine kajastub tihti ka näiliselt identsetes tingimustes

läbiviidavate eksperimentide tulemustes (Lewis, 2010) – niisiis, persistorite arvukus on äärmiselt varieeruv väga mitmetel põhjustel.

Stohhastika kontrastiks on pakutud, et persistorite tekkes kajastuv näiline juhuslikkus võib tuleneda hoopis mikronäljast kultuuri mõnes osas, mis siis persistorite teket indutseerib (Maisonneuve *et al.*, 2013). On pakutud ka, et persistorite tekkel ei ole mingit kindlat mehhanismi, vaid persistorid tulenevad vigastest valkudest raku (Vázquez-Laslop *et al.*, 2006). Selle vastu räägivad eelpool mainitud tulemused, et persistorite tekkedünaamika on väga tugevalt sõltuv kultuuri kasvufaasist – ei saa olla juhuslik, et varases eksponentsiaalses kasvufaasis põhimõtteliselt persistoreid ei moodustu ning persistorite arvukus tõuseb järsult kesk-eksponentsiaalses faasis. See näitab, et persistorid ei saa olla ajutised „vigased” rakud (näiteks peatunud replikatsioonikahvliga) – sest siis peaksid sellised defektid ilmnema üle terve eksponentsiaalse faasi, mitte ainult lõpuosas (Keren *et al.*, 2004). Pigem näitavad sellised tulemused vastupidist: et persistorite tekkel mängivad olulist rolli ka mitmesugused deterministlikud komponendid (Lewis, 2010). Näiteks antud juhul suurendab toidu limitatsioon ning kultuuri tiheduse kasv üksiku raku persistoriks saamise tõenäolisust, kuid üllatav on, et tüüp II persistorite tekkedünaamika on nii järsk. Võib eeldada, et selle taga peituvad kindlasti mingisugused selged põhjused, mida me veel mõista ei suuda. Kindel on see, et persistorite tekkel mängivad olulist rolli nii sisemised komponendid kui ka keskkonnatingimused, kuid õhku jääb küsimus - kui suur on näiteks osatähtsus raku juhuslikult mingites piirides kõikuvate molekulide tasemetel keskkonnast indutseeritud persistentsuse puhul? Kui suur on osakaal determinismil ja kui suur stohhastikal?

### 3.3 Persistorite molekulaarsed mehhanismid

*E. Coli* knockaudi raamatukogude läbi söelumisel ei ole leitud ühtegi kindlat geeni, mille puudumisel persistoreid antibiootikumi töötlusel ei teki (Hu ja Coates, 2005). Lisaks on samu tulemusi saadud ka *P. aeruginosa* puhul (De Groot *et al.*, 2009). Nagu eelmises peatükis kirjutatud, viitab see sellele, et persistorite tekkemehhanismid on kõrgelt kattuvad (ingl k. *redundant*) ja üksteist dubleerivad. Erinevalt paljudest muudest reguloorsetest radadest ei ole persistorite teket kontrolliv rada lineaarne. See annab organismile märkimisväärse adaptiivse eelise – nimelt hoiab selline ülesehitus ära selle, et üks konkreetne looduslik või inimese poolt loodud bakteritsiid, mis teatud molekuli mõju ära blokeerib, suudaks välistada persistorite tekke (Lewis, 2010). Siis hoolitseb persistorite tekke eest mõni teine molekul (ja signaalrada) ning kultuur elab kasvu mitte võimaldava keskkonna üle. Persistorite tekkemehhanism tundub olevat juba rohujuure tasandil selline, et neid oleks võimalikult raske teiste liikide poolt elimineerida. Olgugi, et persistentsusega leitud molekule ja regulatsiooniradu on palju, käsitlen ma selles peatükis põhiliselt ainult käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalses osas kasutatud geenideletsioonidega seonduvaid tulemusi.

Bakterikultuuridest eraldatud persistorite transkriptommi analüüsil on selgunud, et persistorirakkudel on (võrreldes teiste rakkudega):

- 1) suurenenud mitmete toksiin/antitoksiin (T-AT) süsteemide ekspressioon ning
- 2) maha surutud biosünteesi eest vastutavad geenid (Keren *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2006).

Tüüpiliselt (T-AT II näitel) on toksiin valk, mis inhibeerib mingisugust tähtsat funktsiooni rakus (näiteks replikatsioon või translatsioon). Täpsemalt - antitoksiini seondumisel toksiiniga moodustub kompleks, mis seondub mõnda mRNAaas-i kodeeriva geeni promootorjärjestusse, inhibeerides selle transkriptsiooni. Kui vaba toksiooni (s.o ilma antitoksiinita) tase on rakus kõrge, derepresseeritakse transkriptsioon ning sünteesitakse kiirelt hulk mRNA-d, mis põhjustab suure hulga toksiooni tootmise ja selle tagajärjel halvab translatsiooni mRNA-de lagundamise kaudu (Maisonneuve ja Gerdes, 2014). Antitoksiinid on rakus kiiresti lagundatavad, mis võimaldab sellise protsessi kiiret kulgu (Lewis, 2010). On katseliselt näidatud, et paljude tüüp II toksiinide kunstlik üleekspressioon indutseerib persistorite teket (Vázquez-Laslop *et al.*, 2006), mida on võimalik vastavate antitoksiinide mõjul uuesti tühistada. *E. Coli*-s on kirjeldatud 15 T-AT moodulit (Mulcahy *et al.*, 2010) *M. tuberculosis*-es üle 80 (Ramage *et al.*, 2009). On tähelepanuväärne, et katsed T-AT deletsioonidega mutantidega on paljastanud, et T-AT lookuste panus persistentsusesse on kumulatiivne (ja tõenäoliselt kattuv!). Nimelt on näidatud, et üheteistkümmene erineva tüüp II T-AT lookuse

üksikutel deletsioonidel on väike mõju perstorite sagedusele, kuid kui deleteeriti 10 erinevat T-AT lookust, siis langes persistorite arvukus dramaatiliselt (Maisonneuve *et al.*, 2011). See tulemus näitab ilmekalt, et riskide hajutamine on levinud ka molekulaarsetes mehhanismides (Maisonneuve ja Gerdes, 2014). Arvatakse, et tuberkuloosi ravimatus inimese kehas võibki tugineda rohketele, homoloogiliste funktsioonidega T-AT süsteemidele (Ramage *et al.*, 2009). Niisiis, *E. Coli*-s on persistorite tekkes suur roll toksiin-antitoksiin süsteemidel, mis töötavad valgusünteesi inhibeerimise kaudu. Samuti on näidatud raku deaktiivatsiooni rakumembraani ioongradiendi vähendamise kaudu (mis on samuti sõltuv T-AT süsteemidest) (Lewis, 2010).

Esimene persistoriga seostatud geenilookus on samuti toksiin (Correia *et al.*, 2006) – hipA7 (sõnapaarist *high persistence*), mille avastas Harris Moyed, selekteerides kõrgema persistentsusega mutante. Ta selekteeris mutante ampitsiliini abil, saades mitu tüve, mille ainukene fenotüübiline efekt oli kõrgem persistorite arvukus (Moyed ja Bertrand, 1983). Mitmed uurimisrühmad on näitanud, et hipA7 mutandid moodustavad 10-10 000 korda rohkem persistoreid, kui metsiktüüp. (Keren *et al.*, 2004). Samuti, on leitud, et hipA7 MIK ei ole muutunud, välistades resistentsuse võimaluse (Moyed ja Bertrand, 1983). Katsed hip mutantidega on andnud palju persistorite uurimisse. Näiteks, et persistentsusmehhanismid saavad olla kattuvad erinevate antibiootikumigruppide vahel (Wolfson *et al.*, 1990). Samuti on kinnitanud hip mutandiga läbi viidud uuringud teooriat, et persistorite teke indutseeritakse kultuuris teatud molekulide stohhastilise kõikumise kaudu üksikutes rakkudes (Balaban *et al.*, 2004). HipA on toksiin, täpsemalt kinaas (Correia *et al.*, 2006), mis fosforüülib glutamüül-tRNA süntetaasi (GltX) ATP seondumissaidis (Ser239). GltX katalüüsib reaktsiooni glutamiinhappe (Glu) ning vastava tRNA vahel, mis on vajalik glutamiinhapet sisaldava valgu sünteesiks ribosoomis. HipA fosforüleerib ainult tRNA-ga seotud GltX-i, see fosforülatsioon viib vastava GltX-i inaktiveerumiseni, mis omakorda põhjustab raku ilma vastava aminohappeta tRNA<sup>Glu</sup> akumulatsioonist. Laadimata tRNA-de peale aktiveerub (p)ppGpp-indukteeritud stressivastus (millest tuleb täpsemalt juttu järgmises lõigus), põhjustades seeläbi bakteris uiniseisundi teket (Kaspy *et al.*, 2013; Germain *et al.*, 2013). HipA-d suudab inaktiveerida antitoksiin HipB (Schumacher *et al.*, 2009).

On näidatud, et persistorite tekkes mängib olulist rolli bakterite stressimolekul (p)ppGpp temale järgneva regulaatorse kaskaadiga (Maisonneuve *et al.*, 2013). (p)ppGpp all tähistatakse kahte sarnast nukleotiidi: guanosiinpentafosfaati (pppGpp) ning guanosiintetrafosfaati (ppGpp) (Srivatsan ja Wang, 2008). Nende kahe regulaatormolekuli mõju on palju uuritud (Wagner, 2002). (p)ppGpp on bakterite stressivastuse võtmelement,

mõjutades DNA replikatsiooni, transkriptsiooni, translatsiooni, bakterite kasvu ning kaitsemehhanisme, aidates seeläbi bakteritel muutuvate keskkonnatingimustega kiirelt ja edukalt adapteeruda. Toitainete stressi korral sünteesitakse *E. coli*-s kiirelt (p)ppGpp-d kahe ensüümi – RelA ja SpoT – poolt. Aminohapete nälja korral akumulerevad rakus laadimata tRNA-d, mis seonduvad ribosoomi A saiti, aktiveerides RelA-vahendatud (p)ppGpp sünteesi ATP-st, GTP-st või GDP-st. SpoT-vahendatud (p)ppGpp sünteesi indutseerib rasvhapete, fosfaadi ning ka raua nälg (Srivatsan ja Wang, 2008). RelA ja SpoT on mõlemad (p)ppGpp süntetaasid, kuid SpoT-il on ka hüdrolaasne aktiivus (Gentry ja Cashel, 1996). On tähtis märkida, et RelA on positiivselt reguleeritud (p)ppGpp poolt, tekitades positiivse tagasiside mehhanismi (p)ppGpp sünteesiks aminohapete nälja korral. Selline mehhanism võimaldab kiiret signaali võimendumist rakus (Maisonneuve *et al.*, 2013).

(p)ppGpp paneb alguse mitmeastmelisele molekulaarsele mehhanismile, mille esimene samm on polüP hulga tõstmine rakus ekso-polüfosfataasi (PPX) inhibitsiooni kaudu (Kuroda *et al.*, 1997). PolüP on lineaarne mitmesajast ortofosfaadi jäägist koosnev polümeer (Kuroda *et al.*, 2001), mille taset rakus mõjutavad kaks ensüümi – PPX ja polüfosfosaadi kinaas (ppk). PolüP produktsiooni eest vastutab *ppk* ja PPX lagundab PolüP tagasi inorgaaniliseks fosfaadiks (Pi) (Akiyama *et al.*, 1992; Akiyama *et al.*, 1993). On näidatud, et PPX deletsiooniga mutant moodustab suurusjärgu võrra rohkem persistoreid kui metsiktüüp (Maisonneuve *et al.*, 2013). Niisiis, polüP kontsentratsioon rakus on kontrollitud (p)ppGpp poolt läbi PPX täieliku inhibeerimise (Kuroda *et al.*, 1997).

Maisonneuve ja teised (2013) näitasid, et polüP on *E. Coli*-s vajalik *lon* proteaasi aktiveerimiseks antitoksiinide lagundamiseks. PolüP käitub kui signaalmolekul, mis seondues *lon* proteaasiga aktiveerib viimase proteolüütilise aktiivsuse aminohapete nälja korral (Akiyama *et al.*, 1992). *In vitro* on ka näidatud, et *lon* proteaasi aktiivsus sõltub polüP monomeeride arvust – mida pikem on polüP, seda rohkem ta *lon* proteaasi stimuleerib. Tähtis on mainida, et PolüP on ainuke siiani teadaolev *lon* proteaasi aktivaator ning *lon* proteaas osaleb väga mitmete valkude, sealhulgas ka näiteks vabade ribosoomi valkude lagundamisel (Kuroda *et al.*, 2001). On näidatud, et *lon* proteaasi kodeeriva geeni deletsioon vähendab dramaatiliselt persistorite hulka kultuuris (Maisonneuve *et al.*, 2013). *Lon* proteaas lagundab kõiki siiani avastatud tüüp II antitoksiine *E. Coli*-s, indutseerides persistentsust (Maisonneuve *et al.*, 2011).

Kokkuvõttes - maisonneuve ja teised demonstreerisid, et persistorite taset mõjutavad olulisel määral (p)ppGpp ja eelmise süntetaasid (RelA, SpoT), polüP, polüP fosfataas (PPX) ja kinaas (ppk), lon proteaas ning tüüp II toksiin-antitoksiin süsteemid nii tavatingimustes kui ka süsinikunälja korral. Eelnev molekulaarse kaskaadi kirjeldus võib jätta mulje, et tegemist on väga täpselt reguleeritud mehhanismiga. Tegelikult aga on olukord palju kirjum – nimelt on näidatud, et juba (p)ppGpp tase varieerub üksikutes rakkudes stohhastiliselt, põhjustades seeläbi ükskute persistorite teket. (p)ppGpp stohhastilise kõikumise põhjust ei ole teada, kuid spekuleeritakse, et see võib tuleneda mikronäljast üksikutes rakkudes (Maisonneuve *et al.*, 2013). Samuti on tähtis märkida, et (p)ppGpp-l on mitmeid sihtmärke (Kanjee *et al.*, 2012) ning PPX ei pruugi olla neist ainuke, mis persistorite teket indutseerib (Maisonneuve *et al.* 2013).

### 3.4 Persistorite uurimine ja ärkamiskineetika

Persistorite uurimiseks on vajalik nad ülejäänud kultuurist eraldada. Levinuim meetod on antibiootikumiga bakterite lüüsimine, hiljuti on pakutud välja ka „lüütilise kokteili” protokolle, kus bakteritsiidina kasutatakse ainete segusid (Cañas-Duarte *et al.*, 2014). Küll aga on tähtis märkida, et sellise eraldusviisiga kaasneb probleem, mida ei ole siiani suudetud täielikult lahendada – nimelt on antibiootikumi suhtes tolerantsed nii persistorid kui ka “elujõulised, kuid mittekuultiveeritavad” bakterid (Oliver, 2005). Katsed näitavad, et persistorid moodustavad alla 20% lüüsimata rakkudest (Luidalepp *et al.*, 2011). Nagu paljude muude eelnevalt mainitud omaduste puhul, iseloomustab ka persistorite ärkamist suur varieeruvus. Näiteks keskkonnast võetud proovidel on dokumenteeritud rakkude ärkamist isegi mitmete kuude pärast (Buerger *et al.*, 2012), ning paljud neist ei hakkagi kunagi (laboris) kasvama. On ka näidatud, et persistorite arvukust mõjutab inokuleerimiseks kasutatud kultuuri vanus (statsionaarses kasvufaasis oldud aeg), ning lisaks - mida vanem on inokuleerimiseks kasutatud kultuur, seda kauem läheb persistoritel aega soikeseisundist välja tulemisega (Luidalepp *et al.*, 2011). See on kooskõlas persistorite teket käsitlevas peatükis mainitud „bet-hedging” strateegia teooriaga - ajaliselt heterogeenne ärkamine tagab samuti kultuurile suurema ellujäämuse. Jöers ja teised pakkusid 2010. aastal välja, et kuna persistorid jätkavad ajas „ärkamist”, siis on nendele sobilik iseloomustamisviis ajast sõltuv tapmiskõver, nagu näiteks Joonis 1. Nad näitasid ka, et persistorite ärkamiskiirus on persistorite tapmiskõveral limiteeriv faktor. Näiteks ampilitsiini puhul kajastab tapmiskõver mitte antibiootikumi aeglast tapmist vaid persistorite uuesti haavatavaks muutumist, s.o ärkamist (Jöers *et al.*, 2010). On näidatud, et persistorite sageduse erinevus metsiktüve ja deletsiooniga tüvede vahel oleneb väga suurel määral kultuuri vanusest – näiteks hipA7 mutandi võime moodustada rohkem persistoreid ilmnes ainult siis, kui inokulum oli võetud statsionaarse kasvufaasi alguses, hilises statsionaarses kasvufaasis inoulumi puhul seda erinevust sisuliselt polnud (Luidalepp *et al.*, 2011). Niisiis, persistorite ärkamine on ajas väga heterogeenne (Jöers *et al.*, 2010) ning enamasti mõõdetakse persistoreid antibiootikumitöötuse järgse kasvama hakkamise kaudu. Lisaks, mõõtes bakterite arvukust enne ja peale antibiootikumitöötlust, on võimalik arvutada ka vahepeal ärganud persistorid, sest kõik persistorid, mis ärkavad töötuse ajal, lüüsuivad. Jöers ja teised leidsid seoseid ka persistorite ärkamise kineetika (ja sellest tuleneva tapmiskõvera) ning kasutatud vedelsöötmete vahel, milles bakterid antibiootikumitöötuse ajal viibisid. Nad näitasid ka, et värske sööde enne antibiootikumitöötlust ergutab persistorite ärkamist (Jöers *et al.*, 2010). On ka märgitud, et LB lahuse autoklaavimine võib tuua sisse kõikumisi tulemustes (Luidalepp *et al.*, 2011).



Kõik käesolevas peatükis mainitud faktorid võivad põhjustada katsevigu ning segadusi tulemuste tõlgendamisel, mispärast tuleks kasutada väga täpseid protokolle. Persistorite uurimiseks sobib lisaks käesolevas töös kasutatud meetodikale (antibiootikumitöötlusele järgnev plaatimine ning moodustuvate kolooniate loendamine) ka fluorestseeruvate valkude kasutamine koos läbivoolutsüstomeetriaga (Jöers *et al.*, 2010; Luidalepp *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2006). Näiteks on võimalik niimoodi uurida bakterite jagunemist (Luidalepp *et al.*, 2011) või füsioloogilist aktiivsust (Shah *et al.*, 2006). Raku jagunemist on võimalik jälgida ka otse mikoskoobi all, kasvatades baktereid mikrofluidika (mikroopiliste kanalite) süsteemis (Balaban *et al.*, 2004).

### 3.5 Persistorite uurimise tähtsus

Krooniliste haiguste paradoks on, et need on ravimatud, kuigi haigust põhjustav patogeen ei ole ravimile resistentne (del Pozo ja Patel, 2007). Paljusid kroonilisi haigusi seostatakse biofilmidega. Biofilmid on äärmiselt vastupidavad antibiootikumitötlusele, omamata selgeid resistentsusmehhanisme (Costerton *et al.*, 1999) On näidatud, et see vastupidavus on paljuski sõltuv persistorite olemasolust biofilmis (Spoering ja Lewis, 2001). Broon, Siu ja Lewis näitasid 2000 aastal, et *P. aeruginosa* biofilmis leidub väike populatsioon rakke, kes on antibiootikumi tötlusele täiesti tolerantsed (Brooun *et al.*, 2000). See uurimus tõi persistorite uurimise antibiootikumide ja infektsioonide valguses jälle päevakorda (Lewis, 2010). Biofilmis olevad rakud ei ole tihtipeale immuunsüsteemi komponentidele ligipääsetavad. Seda on näidatud mitmete bakteriliikide puhul (Jesaitis *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2004). Küll aga on biofilm enamasti läbitav antibiootikumidele (Walters *et al.*, 2003). Lisaks on leitud, et biofilmis oleva bakterikoloonia tapmine antibiootikumiga viib üsna sarnase tulemuseni, mis planktonilise kultuuri puhul – enamus rakke sureb ning väike osa rakke (persistoreid) säilib (Spoering ja Lewis, 2001). See tähendab, et antibiootikumid on hetkel parim võimalus biofilme moodustavate infektsioonide raviks ning selle raviviisi täiendamiseks on tähtis mõista persistoreid.

Sarnaselt hip mutandi selektsioonile *in vitro* (Moyed ja Bertrand, 1983), on näidatud, et sama toimub ka krooniliste haiguste ravimisel. Ravimatu tsüstilise fibroosi patsientidelt (kellele manustatakse perioodiliselt suures koguses antibiootikume sümptomite levendamiseks) võetud proovid näitasid, et mida hilisem *P. aeruginosa* isolaat, seda kõrgem on laboris testimisel ilmnev persistorite tase. Tähtis on rõhutada, et enamustel isolaatidel ei olnud MIK suurenenud (välistades resistentsuse) (Mulcahy *et al.*, 2010). Hip mutante ja nende looduslikku valikut inimeses on kirjeldatud ka eukarüoodi *C. albicans* põhjustatud kandidoosi puhul vähihaigetel. Nimelt, patsientidel, kellel ei suudetud seennakkust ravida, oli nakkuse põhjustajaks pea eranditult hip mutant (võrreldes patsientidega, kellel raviti põletik 3 nädala jooksul) (Lafleur *et al.*, 2010).

Eelnevast tulenevalt pakkus Kim Lewis välja, et persistorid ning hip mutandid võivad mängida väga suurt, kui mitte põhilist rolli erinevate akuutsete krooniliste (näiteks tuberkuloos), haiguste arengus ja ravimatuses ning seetõttu tuleks nende uurimisele rohkem tähelepanu pöörata (Lewis, 2010). Üks võimalik strateegia persistorite hävitamiseks oleks kasutada lisaks antibiootikumile ka teatud adjuvanti, mis muudab märklaud-rakud ravimi suhtes tundlikumaks (Allison *et al.*, 2011), kuid *in vitro* võib sarnase tulemuse saamine olla

erinevatel põhjustel väga keeruline (näiteks adjuvandi piisava kontsentratsiooni saavutamine infektsioonikoldes). Võib loota, et tulevikus leitakse selline antibiootikumi ja adjuvandi kooslus, mille puhul piisab ka viimase väga väikesest kontsentratsioonist. On välja pakutud ravimieellaste idee – ühendid, mis sisenevad bakterirakku ning konverteeritakse seal bakteri enda poolt antibiootikumiks (Lewis, 2007)

## 4 Eksperimentaalosa

### 4.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö kaks küsimust käsitlevad katsetingimuste mõju persistorite esinemissagedusele:

- Jöers jt (2010) töö põhjal püstitasime küsimuse, kas *E. Coli* persistorite arv sõltub sellest, millist tardsöödet plaatimisel kasutada?
- Teine küsimus uurib kasvufaasi ja tuntumate persistor-geenide omavahelist seost. Kuidas sõltub persistorite teket mõjutavate geenide (*relA*, *ppk* ning *lon*) mõju kultuuri kasvufaasist?

## 4.2 Materjal ja meetodika

### 4.2.1 Bakteritüved

Käesolevas töös kasutasin *E. Coli* K12 laboritüvesid MG1655 ja BW25113 wt, BW25113  $\Delta$ relA, BW25113  $\Delta$ ppk ning BW25113  $\Delta$ lon. Töö autor ei ole ise ühegi kasutatud tüve konstrueerija, deletsioonmutandid on pärit Keio kollektsioonist (Baba *et al.*, 2006).

### 4.2.2 Kasutatud kasvusöötmed ning lahused

Tardsöötmetena kasutasin LB agarit (Difco™ LB Agar, Lennox), R-2A agarit (Fluka™ R-2A Agar) ja MHB (BBL™ Mueller Hinton II Broth) ning M9 (Anon 2010) söötmeid.

Vedelsöötmena kasutasin Lennox LB söödet (Difco™ LB Broth, Lennox). LB vedelsööde steriliseerimiseks kasutasime filtreerimist, sest on näidatud, et autoklaavimine võib tuua sisse soovimatuid kõikumisi persistorite ja mittejagunevate rakkude arvukuses (Luidalepp *et al.*, 2011). Kasutatud söötmete koostised on toodud **Tabelis A**. Lahjenduste tegemiseks ja puhverlahusena kasutasin kas LB vedelsöödet või 1xPBS fosfaatpuhvit. Antibiootikumidest kasutasin järgnevaid lahuseid: ampitsiliini (kontsentratsiooniga 100 µg/ml), ofloksatsiini (kontsentratsiooniga 5 µg/ml) ning ciprofloksatsiini (kontsentratsiooniga 100 µg/ml).

Mainitud lahuste ja söötmete valmistusjuhendid on **Lisas B**.

Tabel 1- Töös kasutatud tardsöötmete koostised (1 liitri kohta). LB vedelsöötme koostis oli sama mis LB tardsöötmele, kuid ilma agarita. Söötmete tegemine on kirjeldatud lisa B

LB	MHB	R-2A	M9
10 g trüptoon	17.5 g kaseiini	0.5 g kaseiini	12.8 g
5 g pärmiekstrakt	hüdrolüsaat	hüdrolüsaat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5g NaCl	3 g lihaekstrakt	0.5 g pärmiekstrakt	3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
15g agar	1.5 g tärklis	0.5 g pepton	0.5 g NaCl
	15g agar	0.5 g tärklis	1 g NH <sub>4</sub> Cl
		0.5 g glükoos	2 g glükoos
		0.3 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 mM CaCl <sub>2</sub>
		0.024 g MgSO <sub>4</sub>	2 mM MgSO <sub>4</sub>
		0.3 g Na-püruvaat	15g agar
		15g agar	

### **4.2.3 DMSO säilituskultuuride tegemine**

Kultuuride inokuleerimiseks kasutasin 50 µl 8% DMSO säilituskultuure ( $A_{600} \sim 0.6$ ). Detailset DMSO stokkide tegemise protseduuri vaata lisas A

### **4.2.4 Bakterikultuuri kasvatamine ja persistorite arvukuse määramine erinevatel tardsöötmetel**

Katses kasutasin kahte erinevat antibiootikumi – ofloksatsiini ning ampitsilliini. Mõlema antibiootikumi töötluste puhul oli kasutusel olev katseskeem suures osas identne: Inokuleerisin 3ml LB vedelsöödet 50 µl DMSO stokiga ning seejärel panin need kultuurid 37°C loksutile (Sanyo, 180 rpm) 16 tunniks kasvama. Seejärel tegin kultuuridest 1000 kordsed lahjendused 10ml LB vedelsöötmesse ja panin need uuesti 37°C loksutile kasvama. Peale kolme tundi võtsin igast kultuurist 100 µl proovi, millest tegin 16 000 kordse lahjenduse ja plaatisin saadud lahjenduse neljale erinevale tardsöötmele (LB, MHB, RA, M9) – see hetk on kujutatud tulemuste osas joonisel 3 kui 0h. Peale proovi võtmist lisasin kultuuridele antibiootikumi: kas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml või ofloksatsiini lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml. 1h, 2h, 3h ja 5h peale antibiootikumitöötlust võtsin ampitsilliiniga töödeldud kultuuridest proove ning plaatisin need neljale erinevale tardsöötmele. Ofloksatsiini puhul tsentrifugeerisin proovi 5 minutit (5000 G, toatemperatuuril), eemaldasid supernatandi ning resuspendeerisin rakud võrdses koguses LB vedelsöötmes. Kordasin tsentrifugeerimist ja resuspendeerimist ning plaatisin proovid tardsöötmetele. Peale plaatimist inkubeerisin Petri tase 20h 37°C juures (M9 plaate 2 päeva). Seejärel loendasin kolooniad ning arvutasin nende arvu ja lahjenduste põhjal kolooniaid moodustavate bakterite arvu ühe milliliitri kohta (CFU/ml).

### **4.2.5 Persistorite arvukuse määramine kultuuri kasvades**

Inokuleerisin 3ml värskelt valmistatud LB vedelsöödet 50 µl DMSO stokiga ning seejärel panin need kultuurid 37°C loksutile (Sanyo, 180 rpm) 16 tunniks kasvama. Seejärel tegin kultuuridest 100 kordsed lahjendused 50ml LB vedelsöötmesse (kujutatud joonisel 4 kui 0 h) ja võtsin igast kultuurist 100 µl proovi lahjenduste tegemiseks, mille põhjal määrasin bakterite arvu enne antibiootikumi töötlust. 50 ml LB kolbidest võtsin lisaks igast ühest 3ml proovi, panin need steriilsetesse katseklaasidesse, lisasin CIP-i lõppkontsentratsiooniga 1 µg/ml ning

seejärel panin need 5 tunniks loksutile kasvama. 100 µl proovidest lahenduste tegemisel kasutasin mikrotiiterplaati ning lahjendamiseks 1x PBS-i. Lahjendatud proovid plaatisin LB tardsöötmega tassidele (Esimeses korduses plaatisime 4-5 rida 5 µl tilku 20-kordsete lahjenduste seeriast, mille põhjal sain teada sobivad lahjendused teiseks ja kolmandaks korduseks, kus plaatisin 50 µl sobivat lahjendust ühele LB tassile ning ajasin klaasspaatliga laiali). Niimoodi toimisin ka igas järgnevas ajapunktis (1h, 2h, 3h, 4h, 5h ja 6h). Peale 5h CIP töötlust võtsin 1ml proovi, tsentrifuugisin seda 5 minutit (5000 G, toatemperatuuril), eemaldasid supernatandi ning resuspendeerisin rakud samas koguses LB vedelsöötmes. Seejärel kordasin tsentrifuugimist ja resuspendeerisin bakterid 1x PBS-is ning plaatisin LB tardsöötmega tassidele (Esimeses korduses plaatisin 4-5 rida 5 µl tilku 20x lahjenduste seeriast, teises ja kolmandas plaatisime 50 µl sobivat lahjendust ühele LB tassile). Peale plaatimist inkubeerisin kõiki Petri tasse 24h 37°C juures. Seejärel loendasin kolooniad ning arvutasin nende ja lahjenduste põhjal CFU/ml.

### 4.3 Tulemused

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kahe faktori seoseid persistorite arvukusega bakterikultuuris:

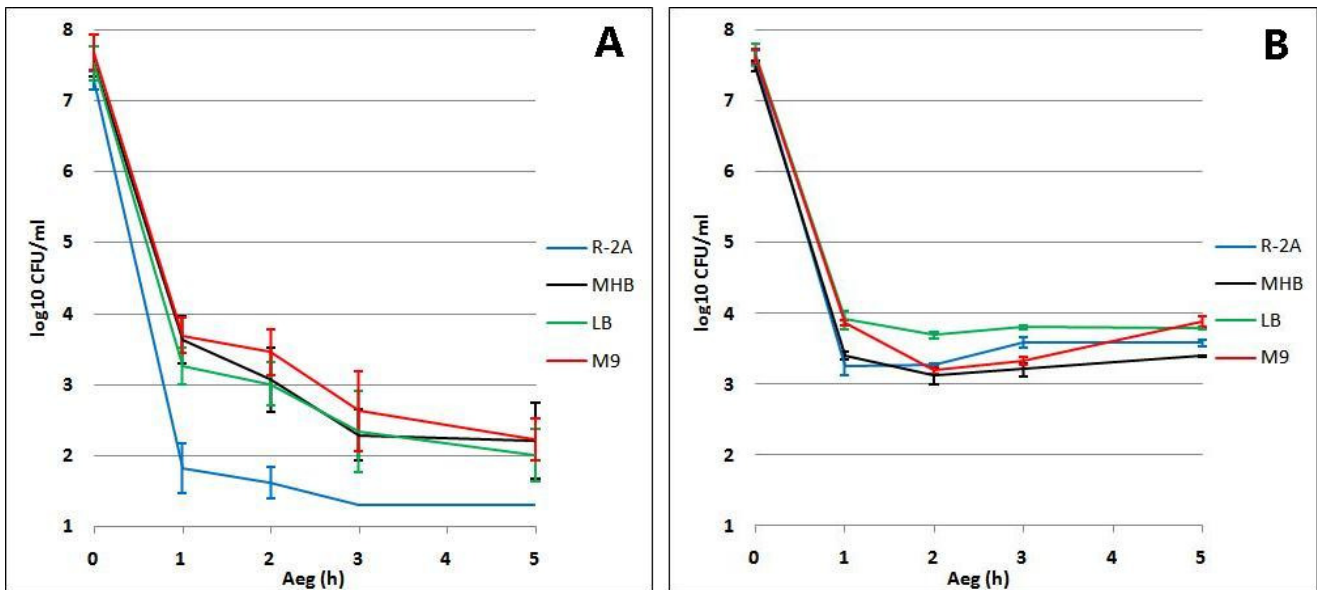
- 1) persistorite üles kasvatamiseks (e. ellu jäänud bakterite loendamiseks) kasutatav tardsööde (peale antibiootikumitöötlust) ja;
- 2) kultuuri kasvufaasi ja (p)ppGpp indutseeritud persistentsusega seotud deletsioontüvede ( $\Delta$  relA,  $\Delta$  ppk,  $\Delta$  lon) interaktsioon.

#### 4.3.1 Kasutatava tardsöötme mõju persistorite arvukusele

Selles katses mõõtsin persistorite arvukust külvates rakud ühest ja samast antibiootikumiga inkubeeritud kultuurist neljale erinevale tardsöötmele. Peale 16 h + 3 h (vahepeal tegin lahjenduse 1:1000) 37°C loksutil kasvatamist töötlesin kultuure viie tunni jooksul kas ampitsilliini või ofloksatsiiniga. Plaatisin proove enne (0h) ning neljal erineval ajapunktil peale antibiootikumi lisamist (1h, 2h, 3h, 5h), mille põhjal konstrueerisin vastavad tapmiskõverad. Saadud tulemused on kujutatud **Joonisel 3**.

Enamus kasutatud söötmete ja antibiootikumi kombinatsioonide puhul märkimisväärseid erinevusi polnud, kuid üllatav oli R-2A agari tulemus ampitsilliini töötluste puhul (Joonis 3, A). Võrreldes persistorite arvukust peale kahe erineva antibiootikumi töötlust, on näha, et ofloksatsiin suudab tappa kogu kultuurist vähem rakke kui ampitsilliin. Ofloksatsiin tappis kõik antibiootikumile tundlikud rakud ära esimese tunni jooksul, edaspidise ofloksatsiini inkubatsiooni jooksul ellu jäävate rakkude (persistorite) arv ei muutunud (joonis 3, B). Ampitsilliin tappis samuti enamuse rakke esimese tunni jooksul (4-6 suurusjärku), kuid kolooniate arv vähenes märgatavalt ka kahe järgmise tunni jooksul (joonis 3, A). Tähtsaim leid selles eksperimendis oli kolooniate arvu vähenemine R-2A söötme puhul, eriti üllatav oli, et selline erinevus tekkis ainult peale tapmist ampitsilliiniga.





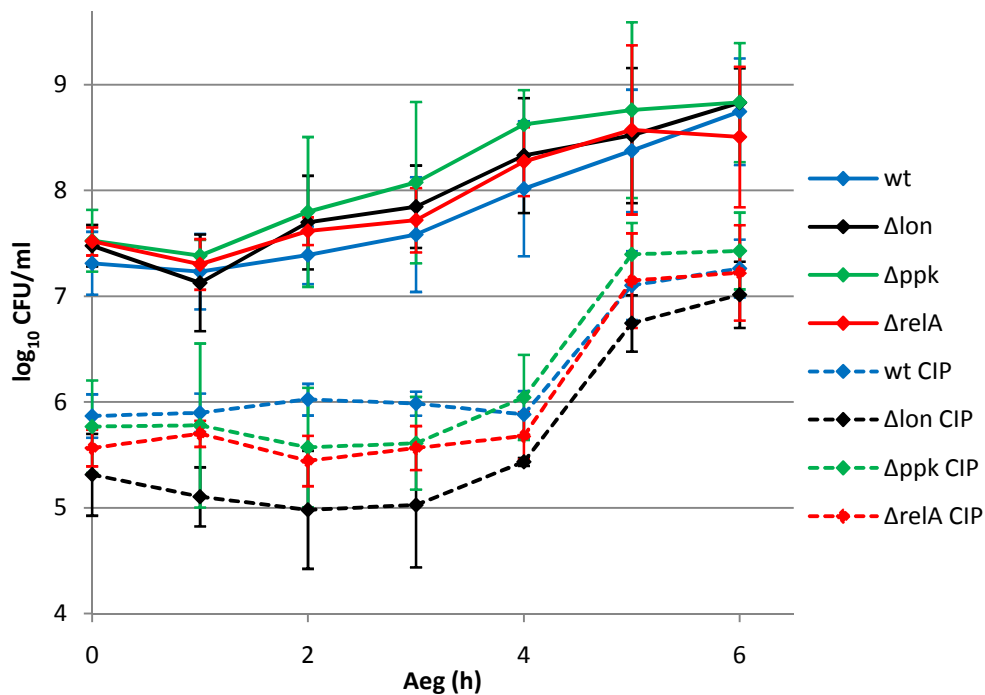
Joonis 3. Tardsöötme mõju persistorite arvukusele - persistorite tapmiskõverad peale ampilitsiini (A) ja ofloksatsiini (B) lisamist. Kasvavatele kultuuridele lisasin: A) ampilitsiini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml või; B) ofloksatsiini lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml. Hetk enne (0 h) ning 1, 2, 3 ja 5 h peale antibiootikumi lisamist võtsin proovi, mis plaatisin neljale erinevale söötmele – R-2A, MHB, LM ning M9. X-telg tähistab aega antibiootikumi lisamisest vedelsöötmesse, y-telg tähistab kolooniaid moodustavate bakterite arvukust ml kohta log-skaalal. Arvukused tähistavad ampilitsiini puhul nelja, ofloksatsiini puhul kolme korduse keskmisi (v.a ampilitsiini puhul : M9 5 h – 3; R-2A 3 h ja R-2A 5 h – 2 kordust), veajooned tähistavad standardhälbeid.

#### 4.3.2 Persistorite teket mõjutavate geenide sõltuvus kultuuri kasvufaasist

Selles katses uurisin kolme deletsioontüve ( $\Delta relA$ ,  $\Delta ppk$ ,  $\Delta lon$ ) ja metsiktüübi persistorite arvukuse muutust kultuuri kasvades. Selleks koostasid nende tüvede bakterite ja persistorite kasvukõverad, kasutades selleks kolooniate loendamise meetodit. Reinokuleerisin 16 h 37 °C loksutil kasvanud kultuurid värskes vedelsöötmes ning võtsin kaks proovi iga tunni tagant järgnevat seitse tundi. Esimese proovi plaatisin LB tardsöötmele (mille põhjal kalkuleerisin bakterite kasvukõvera) ning teisele proovile sai osaks 5 h CIP töötlus, peale mida plaatisin ka need LB tardsöötmele (nende põhjal konstrueerisin persistorite kõvera).

Katse tulemustest selgus, et bakterikultuuri kasvufaas mõjutab  $\Delta relA$ ,  $\Delta ppk$ ,  $\Delta lon$  persisterite arvukust. Kuni neljanda tunnini persistorite absoluutarv oluliselt ei muutunud, aga kuna kultuur kasvas ning antibiootikumitundlike rakkude arv suurenes, siis persistorite osakaal kogu bakteripopulatsioonis esimese nelja tunni jooksul vähenes. Peale neljandat tundi algas uute persistorite (tüüp II) moodustumine ja persistorite arvukuse tüvedevahelised erinevused vähenesid. Lisaks eristus teistest deletsiooniga tüvedest selgelt ka  $\Delta lon$  väiksema persistorite arvukusega. Joonisel 4 näidatud erinevate tüvede arvukused seitsme tunni lõikes näitavad, et erinevused persistorite arvukuses varieeruvad üsna suurel määral olenevalt kasvufaasist.

Lisaks eristusid tulemustes selgelt ka tüüp I ning tüüp II persistorid (**Joonis 4**).



Joonis 4. Persistorite teket mõjutavate geenide sõltuvus kultuuri kasvufaasist. Tegin 100 kordse lahjenduse statsionaarsetes kasvufaasides olevatest kultuuridest (inkubeeritud 16 h 37°C loksutil) ning jälgisin nende kasvu plaatimismeetodit kasutades. Punktiiriga jooned tähistavad kolooniad moodustavate bakterite arvu peale 5 h CIP töötlust. Ülemised jooned näitavad sama enne antibiootikumi töötlust (ehk tegemist on tavalise kasvukõveraga). X-telg tähistab aega kultuuri inokuleerimisest vedelsöötmesse, y-telg tähistab kolooniaid moodustavate bakterite arvukust ml kohta log-skaalal, wt – metsiktüüp. Arvukused tähistavad kolme korduse keskmisi (v.a persistorite puhul: Δlon 0 h, wt 0 h, ΔrelA 0 h, Δlon 1 h - 2 kordust), veajooned tähistavad standardhälbeid.

#### 4.4 Arutelu

Oma bakalaureusetöö uurisin keskkonnatingimuste mõju persistorite arvukusele. Katsete käigus kinnitasin mõndasid eelnevaid katseid ning nägin ka ootamatuid leide. Väga üllatav on esimese katse tulemustes persistorite arvukus R-2A tardsöötmele ampilitsiini töötamise puhul (**joonis 3**). Oluline on märkida, et kolooniate arvukus enne antibiootikumitöötlust ning persistorite arvukus ofloksatsiini puhul oli teiste söötmetega väga sarnane, näidates, et see leid iseloomustab: 1) ainult persistorite ärkamist; 2) ärkamist ja kolooniate moodustumist ainult ampilitsiini töötamise järel. Selline tulemus demonstreerib ilmekalt, et persistorite detekteerimisel kasutatud bakteritsiidi ja plaatimiseks kasutatud tardsöötme vahelised tundmatud interaktsioonid võivad mõjutada katsete tulemusi. Mingil põhjusel ärkas ampilitsiiniga töödeldud LB vedelsöötme kultuuride ümberkülvamisel tardsöötmetele R-2A puhul 1-2 suurusjärku vähem baktereid. See on vastuolus sellega, R-2A tardsööde loodi just spetsiaalselt „nõrgukeste” kultiveerimiseks. R-2A arendati nimelt selleks, et isoleerida joogiveest aeglaselt kasvavad baktereid, mis tavaliste kasvusöötmete peal jäävad kiiremini kasvavate liikide poolt represserituks (Reasoner ja Geldreich, 1985). See tulemus võib endas sisaldada kasulikke teadmisi persistorite ärkamismehhanismide või parema elimineerimise kohta ning vajaks mõistmiseks edasist uurimist. Esimeses katses dokumenteeritud erinevus ampilitsiini ja ofloksatsiini tapmise kineetikas näitab ka, et kõik persistorid ei ole universaalselt tolerantid kõigi bakteritsiidsete ravimite suhtes, ning tõenäoliselt eksisteerib bakterikolooniates mitu erinevat persistorite alampopulatsiooni.

Maisonneuve ja teised näitasid eelmisel aastal, et ppk, lon ja relA geenilookused on otsustava tähtsusega persistorite moodustamisel (Maisonneuve *et al.*, 2013). Käesoleva töö teises katses näitasin, et kui bakterikultuurid lähenevad statsionaarsele faasile, siis nende geenide olulisus väheneb oluliselt. Persistorite arvukuste erinevused on suuremad *log* kasvufaasis ning kultuuri lähenemisel statsionaarsele kasvufaasile erinevused vähenevad. Loomulikult kinnitasime seeläbi ka eelnevaid tulemusi mainitud valkude olulisusest persistentsuse tekkes, mida Maisonneuve ja teised 2011. aastal uurisid (Maisonneuve *et al.*, 2011).  $\Delta$ lon moodustas märgatavalt vähem persistoreid kui ülejäänud 3 tüve. Teise katse tulemused näitavad ka, et ppk, lon ning relA geenid mõjutavad rohkem eelmisest statsionaarsest faasist (tüüp I) pärit persistorite ning vähem tüüp II persistorite arvukust.

Samuti on märkimisväärne, et  $\Delta$ ppk üsna vähene erinevus metsiktüübist võib viidata et:

1) Lon proteaasi aktiivsus on polüP-st vähem sõltuv kui seni arvatud (sest polüP-d ei tohiks

$\Delta$ ppk tüves üldse moodustuda);

2) Lon proteaasil võib olla ka mõni teine aktivaator. Praegune konsensus selle kohta pealt et lon proteaasil on ainult üks aktivaator – polüP, põhineb ainult *in vitro* katsetele ning elusrakus on tingimused palju mitmekesisemad ja keerulisemad.

Kõik need tulemused toetavad praegu valdkonna levinuimat arvamust, mille kohaselt persistorite teket reguleerivad väga mitmed ja tõenäoliselt kattuvad molekulaarsed mehhanismid (Maisonneuve *et al.*, 2013; Maisonneuve ja Gerdes 2014; Balaban *et al.*, 2013). Ka evolutsiooniliselt on kasulik võimalikult mitmekesine olla - näiteks kui üks regulatsioonirada mingi geeni mutatsiooni tõttu ei tööta, siis mingi teine rada hoolitseb ikkagi persistorite produktsiooni eest ning kultuur elab rasked tingimused üle. Ppk puudulik tüvi ( $\Delta$ ppk) ei tohiks polüP-d moodustada ning vastavalt Maisonneuve ja teiste (p)ppGpp-indutseeritud persistentsuse mudelile ei tohiks siis persistoreid ju ka tekkida. Kuid (p)ppGpp-st sõltuv kaskaad ei saa olla üks ja ainus persistorite tekkimise mehhanism ning lon proteaas ei saa olla ainuke antitoksiinide lagundaja. Loomulikult jääb ka võimalus, et on ka täiesti teistsuguseid, toksiin-antitoksiinsüsteemidest erinevaid mehhanisme persistentsuse tekkeks. Käesoleva töö tulemused näitavad ka, et geenide mõju persistorite tekkele on varieeruv ning oleneb sellest, kuidas, ning mis vahenditega eksperimente läbi viia. Tulemuste olulisuse kinnitamiseks peaks kordama katseid ning tegema ka statistilise analüüsi. Kuna üksikute rakkude geenide avaldumises on näidatud suurt varieeruvust (stohhastikat), siis täpsemate tulemuste saamiseks peaks läbi viima teistsuguse ülesehitusega katseid, kasutades ka läbivoolutsütomeetrit, mis võimaldaks mõõta üksikuid rakke, mitte kolooniaid.

## 5 Kokkuvõte

Käesolevas töös uurisin katsetingimuste mõju prokariootse mudelorganismi *E. coli* persistorite esinemissagedusele. Katsete tulemustest selgus, et erinevused persistorite arvukuses  $\Delta relA$ ,  $\Delta ppk$ ,  $\Delta lon$  ja metsiktüve vahel on suuremad logaritmilises kasvufaasis ning vähenevad kultuuride jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi. Samuti leidsin huvitava tulemuse seoses persistorite üles kasvatamisega tardsöötmele – ampilitsiiniga töödeldud ning R-2A agarile plaaditud kultuur moodustas oluliselt vähem kolooniaid. Oluline on märkida, et efekt oli antibiootikumipõhine. Saadud tulemustest võib järeldada, et persistentsust määravate geenide mõju sõltub kultuuri kasvufaasist ja seeläbi ka katsetingimusest. Samuti kinnitasin arvamust, et (p)ppGpp-st sõltuv kaskaad ei saa olla ainuke persistorite tekkimise mehhanism.

## 6 Summary

### **The effect of growth conditions on the levels of persisters in *Escherichia coli***

Henri Ingelman

Persisters are multidrug tolerant bacteria, which resume growth after removal of antibiotic from environment. Understanding persister cells is important because they are correlated with biofilms and therefore influence courses and treatment of many chronic infections and diseases. Studying persisters is complicated because persister levels depend on many environmental and intrinsic factors, for example growth medium, carbon source, temperature, levels of antibiotics, growth phase of culture etc. This thesis focused on :

- 1) the effects of growth medium choice on the levels of persisters and;**
- 2) the effect of growth phase on persister levels in *relA*, *ppk* and *lon* deletion strains.**

The results showed that the differences between  $\Delta relA$ ,  $\Delta ppk$ ,  $\Delta lon$  and wild type strains are bigger in logarithmic growth phase and decrease when the culture starts reaching the stationary phase. We also examined an interesting result regarding persisters treated with ampicillin and plated on R-2A agar – the number of persisters was much lower than with other agars or with another antibiotic (ofloxacin). It was concluded that the effects of genes on the number of persisters depends on the growth phase of the culture and therefore, also on the experimental design. Also the results support the notion that (p)ppGpp dependent pathway can not be the only mechanism behind persisters.

## 7 Kirjanduse loetelu

- Akiyama, M., Crooke, E. & Kornberg, A., 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *The Journal of biological chemistry*, 268(1), pp.633–9.
- Akiyama, M., Crooke, E. & Kornberg, A., 1992. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *The Journal of biological chemistry*, 267(31), pp.22556–61.
- Allison, K.R., Brynildsen, M.P. & Collins, J.J., 2011. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473(7346), pp.216–20.
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48 Suppl 1, pp.5–16.
- Anon, 2010. M9 minimal medium (standard). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010 (8), p.pdb.rec12295.
- Anon, 2006. M9 Salts. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006 (1), p.pdb.rec614.
- Baba, T. et al., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2, p.2006.0008.
- Balaban, N.Q. et al., 2013. A problem of persistence: still more questions than answers? *Nature Reviews Microbiology*, 11(8), pp.587–591.
- Balaban, N.Q. et al., 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5690), pp.1622–5.
- Barry, C.E. et al., 2009. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature reviews. Microbiology*, 7(12), pp.845–55.
- Bigger, J.W., 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*, 224(6320), pp.497–500.
- Bradford, M.J. & Roff, D.A., 1993. Bet Hedging and the Diapause Strategies of the Cricket *Allonemobius Fasciatus*. *Ecology*, 74(4), p.1129.
- Brooun, A., Liu, S. & Lewis, K., 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(3), pp.640–6.
- Buerger, S. et al., 2012. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), pp.3221–8.
- Cañas-Duarte, S.J., Restrepo, S. & Pedraza, J.M., 2014. Novel protocol for persister cells isolation. E. Ben-Jacob, ed. *PloS one*, 9(2), p.e88660.

- Cashel, M., Gentry D.R., Hernandez V.J. , and Vinella, D., 1996. The stringent response. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. F.C. Neidhardt (Editor-in- Chief). ASM Press, Washington D.C. p. 1458-1496
- Correia, F.F. et al., 2006. Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 188(24), pp.8360–7.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), pp.1318–22.
- Davey, P., Barza, M. & Stuart, M., 1988. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to killing by ciprofloxacin, gentamicin and imipenem in vitro and in vivo. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 21(4), pp.395–404.
- Dörr, T., Vulić, M. & Lewis, K., 2010. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. M. K. Waldor, ed. *PLoS biology*, 8(2), p.e1000317.
- Germain, E. et al., 2013. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Molecular cell*, 52(2), pp.248–54.
- De Groote, V.N. et al., 2009. Novel persistence genes in *Pseudomonas aeruginosa* identified by high-throughput screening. *FEMS microbiology letters*, 297(1), pp.73–9.
- Hofsteenge, N., van Nimwegen, E. & Silander, O.K., 2013. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC microbiology*, 13(1), p.25.
- Hooper, D.C., 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases* □: *an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32 Suppl 1, pp.S9–S15.
- Hu, Y. & Coates, A.R.M., 2005. Transposon mutagenesis identifies genes which control antimicrobial drug tolerance in stationary-phase *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 243(1), pp.117–24.
- Jansen, V.A.A. & Stumpf, M.P.H., 2005. Ecology. Making sense of evolution in an uncertain world. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5743), pp.2005–7.
- Jesaitis, A.J. et al., 2003. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*, 171(8), pp.4329–39.
- Jōers, A., Kaldalu, N. & Tenson, T., 2010. The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *Journal of bacteriology*, 192(13), pp.3379–84.
- Kanjee, U., Ogata, K. & Houry, W.A., 2012. Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Molecular microbiology*, 85(6), pp.1029–43.
- Kaspy, I. et al., 2013. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nature communications*, 4, p.3001.



- Keren, I., Kaldalu, N., et al., 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), pp.13–18.
- Keren, I., Shah, D., et al., 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 186(24), pp.8172–80.
- Kuroda, A. et al., 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 272(34), pp.21240–3.
- Kuroda, A. et al., 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5530), pp.705–8.
- Kussell, E. & Leibler, S., 2005. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5743), pp.2075–8.
- Lafleur, M.D., Qi, Q. & Lewis, K., 2010. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), pp.39–44.
- Lewis, K.; Spoering, A.; Kaldalu, N.; Keren, I.; Shah, D., 2005. Persisters: Specialized Cells Responsible For Biofilm Tolerance To Antimicrobial Agents. Pace, J.; Rupp, M.E.; Finch, R.G. (Toim.). *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy* (241 - 256). Boca Raton, London, New York, Singapore: Taylor & Francis
- Lewis, K., 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology*, 5(1), pp.48–56.
- Lewis, K., 2010. Persister cells. *Annual review of microbiology*, 64, pp.357–72.
- Luidalepp, H. et al., 2011. Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. *Journal of bacteriology*, 193(14), pp.3598–605.
- Maisonneuve, E. et al., 2011. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), pp.13206–13211.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. & Gerdes, K., 2013. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*, 154(5), pp.1140–50.
- Maisonneuve, E. & Gerdes, K., 2014. Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell*, 157(3), pp.539–548.
- Moyed, H.S. & Bertrand, K.P., 1983. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of bacteriology*, 155(2), pp.768–75.
- Mulcahy, L.R. et al., 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *Journal of bacteriology*, 192(23), pp.6191–9.

- Nyström, T., 2003. Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Molecular microbiology*, 48(1), pp.17–23.
- Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 43 Spec No, pp.93–100.
- Orman, M.A. & Brynildsen, M.P., 2013. Establishment of a method to rapidly assay bacterial persister metabolism. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(9), pp.4398–409.
- Phillips, I. et al., 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 20(5), pp.631–8.
- Del Pozo, J.L. & Patel, R., 2007. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 82(2), pp.204–9.
- Ramage, H.R., Connolly, L.E. & Cox, J.S., 2009. Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. S. M. Rosenberg, ed. *PLoS genetics*, 5(12), p.e1000767.
- Reasoner, D.J. & Geldreich, E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*, 49(1), pp.1–7.
- Reece, R.J. & Maxwell, A., 1991. DNA gyrase: structure and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 26(3-4), pp.335–75.
- Schumacher, M.A. et al., 2009. Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5912), pp.396–401.
- Shah, D. et al., 2006. Persisters: a distinct physiological state of E. coli. *BMC microbiology*, 6(1), p.53.
- Smits, W.K., Kuipers, O.P. & Veening, J.-W., 2006. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nature reviews. Microbiology*, 4(4), pp.259–71.
- Spoering, A.L. & Lewis, K., 2001. Biofilms and planktonic cells of Pseudomonas aeruginosa have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of bacteriology*, 183(23), pp.6746–51.
- Srivatsan, A. & Wang, J.D., 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current opinion in microbiology*, 11(2), pp.100–5.
- Thattai, M. & van Oudenaarden, A., 2004. Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics*, 167(1), pp.523–30.
- Tuomanen, E., 1986. Phenotypic tolerance: the search for beta-lactam antibiotics that kill nongrowing bacteria. *Reviews of infectious diseases*, 8 Suppl 3, pp.S279–91.
- Wagner, R., 2002. Regulation of ribosomal RNA synthesis in E. coli: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 4(3), pp.331–40.

- Walters, M.C. et al., 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(1), pp.317–23.
- Vázquez-Laslop, N., Lee, H. & Neyfakh, A.A., 2006. Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *Journal of bacteriology*, 188(10), pp.3494–7.
- Wolfson, J.S. et al., 1990. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(10), pp.1938–43.
- Vuong, C. et al., 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular microbiology*, 6(3), pp.269–75.

## 8 Lisad

### Lisa A – Protokollid

#### LB vedelsöötme valmistamine

1. Lahusta 1 ml Difco™ LB Broth, Lennox dehüdreeritud söödet 50 ml destilleeritud vees (lõppkontsentratsioon 20g/l).
2. Filter-steriliseeri, kasutades 0.2 µm poori suurusega membraanfiltrit.
3. Kasuta ühe nädala jooksul

#### LB tardsöötme tasside valmistamine

1. Lisa 7 g Difco™ LB Agar, Lennox dehüdreeritud söödet 200 ml destilleeritud veele (lõppkontsentratsioon 35g/l). Välti suuri klompe, sega magnetsegajal.
2. Kuumuta mikrolaineahjus aegajalt segades kuni keemiseni. Keeda üks minut aegajalt segades, et lahustada agar.
3. Autoklaavi 121°C juures 15 minutit.
4. Vala 20 ml kaupa 10 cm läbimõõduga Petri tassidele, kui lahus on jahtunud umbes 55°C peale.

#### MHB (Mueller Hinton II Broth) tardsöötme tasside valmistamine

1. Lisa 4.4 g BBL™ Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted) dehüdreeritud söödet 200 ml destilleeritud veele (lõppkontsentratsioon 22g/l), sega magnetsegajal.
2. Kuumuta mikrolaineahjus aegajalt segades kuni keemiseni. Välti ülekuumutamist!
3. Lisa 3 g Bacto™ agarit (agari lõppkontsentratsioon 15g/l)(Difco™). Välti suuri klompe – sega magnetsegajal. Keeda üks minut aegajalt segades, et lahustada agar. Välti ülekuumutamist!
4. Autoklaavi 121°C juures 15 minutit.
5. Vala 20 ml kaupa 10 cm läbimõõduga Petri tassidele, kui lahus on jahtunud umbes 55°C peale.

#### R-2A tardsöötme tasside valmistamine

1. Lisa 3.624 g Fluka™ R-2A Agar dehüdreeritud söödet 200 ml destilleeritud veele (lõppkontsentratsioon 18.12g/l). Välti suuri klompe, sega magnetsegajal.
2. Kuumuta mikrolaineahjus aegajalt segades kuni keemiseni. Keeda üks minut aegajalt segades, et lahustada agar.

3. Autoklaavi 121°C juures 15 minutit.
4. Vala 20 ml kaupa 10 cm läbimõõduga Petri tassidele, kui lahus on jahtunud umbes 55°C peale.

#### **M9 tardsöötmege tasside valmistamine (Anon, 2010)**

1. Lisa 3 g Bacto™ agarit (agari lõppkontsentratsioon M9 söötmes 15g/l)(Difco™) 150 ml destilleeritud veele. Välti suuri klompe – sega magnetsegajal.
2. Kuumuta mikrolaineahjus kuni keemiseni ning keeda üks minut aegajalt segades, et lahustada agar.
3. Autoklaavi 121°C juures 15 minutit.
4. Lisa 200 µl CaCl<sub>2</sub> lahust (100mM, autoklaavitud) 150 ml soojale agari ja vee segule, sega hoolikalt.
5. Lisa 400 µl MgSO<sub>4</sub> lahust (1M, autoklaavitud), sega hoolikalt.
6. Lisa 40 ml 5xM9 filter-steriliseeritud lahust(Anon 2006), sega hoolikalt.
7. Lisa 2 ml glükoosi lahust (20%, filter-steriliseeritud), sega hoolikalt
8. Vala 20 ml kaupa 10 cm läbimõõduga Petri tassidele, kui lahus on jahtunud umbes 55°C peale.

#### **Fosfaatpuhvriga soolalahuse (PBS) valmistamine**

1. 10x PBS lahuse valmistamiseks lahusta 2 g KCl, 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl ja 11.45 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 800 ml destilleeritud vees, täida kuni ühe liitrini(viide - PBS 10x).
2. Lahjenda 1:10 destilleeritud vees, et saada 1x PBS.
3. Autoklaavi 121°C juures 15 minutit ning säilita toatemperatuuril.

#### **Ampilitsiini lahuse valmistamine (Andrews, 2001)**

1. Lahusta ampilitsiini naatriumisool destilleeritud vees kontsentratsioonil 100 mg/ml.
2. Säilita 4°C peal ning kasuta ühe nädala jooksul.

#### **Florokinolonide (ofloksatsiin ja ciprofloksatsiin) lahuse valmistamine (Andrews, 2001)**

1. Lahusta antibiootikum 0.1 M NaOH lahuses kontsentratsioonil 5 mg/ml (ofloksatsiin) ja 0.1 mg/ml (ciprofloksatsiin).
2. Säilita -20°C juures ning kasuta kolme kuu jooksul.

### **Bakteristokkide tegemise protseduur**

1. Inokuleeri 20 ml LB söödet bakteritega värskest plaadilt 100 ml kolvi.
2. Pane kultuur kasvama 37°C loksutile. Mõõda aeg-ajalt optilist tihedust ( 600 nm juures).
3. Kui optiline tihedus on umbes 0.6, siis sega steriilses 15 ml anumast 9,2 ml kultuuri ja 0.8 ml DMSO-d (dimetüül sulfoksiidi).
4. Jaga 100 µl kaupa PCR-topsidesse. Külmuta ja säilita -80°C juures.

**Lisa B**

Käesoleva töö katsetulemusi kasutati järgneva artikli koostamisel:

## Measuring persister levels in *Escherichia coli* cultures

---

**Niilo Kaldalu, Arvi Jõers, Henri Ingelman and Tanel Tenson\***

Institute of Technology, University of Tartu,

Nooruse 1

Tartu 50411

Estonia

\*Corresponding author:

[Tanel.Tenson@ut.ee](mailto:Tanel.Tenson@ut.ee)

Phone: (372) 5344 5202

## **Summary**

Genetically homogenous bacterial cultures contain persisters, cells that are not killed by bactericidal antibiotics. These cells are suggested to be involved in establishment of chronic infections. The persister levels depend on growth conditions. Here we discuss the parameters that have to be considered when measuring persister frequencies and provide a sample protocol to do it.

Key words: Antibiotic; Persister; Antibiotic tolerance; Ampicillin; Fluoroquinolones



## 1. Introduction

In 1944, Joseph Bigger studied bactericidal action of penicillin on staphylococcal cultures. He found that some bacteria are able to evade killing and regrow after the treatment. Dr. Bigger called these cells persisters and either described or predicted several basic features that define such surviving minority. Besides, he concluded that persisters must be in part responsible for the limited success of antibiotic treatment against infections(1). Seventy years later, the main conclusions of his research have been confirmed and elaborated by many laboratories using several different bacterial species. It is amazing, how many Bigger's early observations hold true, including the complaint that "irregularities and inconsistencies occurred in almost all experiments of this type" (1). Below, we review principal concepts of persister research and try to look how much some of the researchers' findings depend on experimental setup.

### 7.1 Phenotypic tolerance vs phenotypic resistance

Persisters are defined as bacteria that are tolerant to bactericidal antibiotics; they are able to survive the drug treatment but are not able to grow in the presence of the drug(1,2). If bacteria grow in the presence of the drug, they are called resistant. The phenomenon of persistence is phenotypic; a culture that was started from clonal descendants of a persister cell contains persisters at the same frequency as the original parental culture(1,3). Over several years, persister cells have been considered as non-replicating cells(2). According to a central concept of the field, the non-growing, i.e. non-dividing state is crucial to persistence. Bacterial cultures contain individual cells that stay non-replicating in conditions enabling growth(4-6). These cells can survive treatment with antibiotics and, if they resume growth after the removal of the drug, these bacteria are called persisters (Fig. 1A). It is a matter of debate if such heterogeneity of the population is a survival strategy(7-9) or reflects different extent of unavoidable damage to the cells (10).

Recently, it has been reported that some persisters might be actively proliferating: in *Mycobacterium*, the surviving subset of bacteria can have highly active efflux pumps(11) or express catalase-peroxidase, which is necessary for killing by isoniazid, in stochastic pulses(12). In these instances, surviving cells are replicating, not quiescent. It has been also suggested that some of the persisters in *E.coli* are actively dividing (6). The concept of actively growing persisters raises terminological discrepancies. Resistance is usually determined genetically but still, the genetic component is not part of the definition. Mechanisms of phenotypic antibiotic resistance have been described recently(13,14) and occurrence of non-canonical, phenotypic resistance due to the growth conditions and metabolic state of bacteria is well-known to the microbiological community (15). The mycobacterial "dynamic persistence" (11,12) would fall under phenotypic resistance as well.

Replicative dormancy of persisters does not necessarily mean the lack of metabolic activity. It is intuitively reasonable to suggest, that “shutdown of a target function” (i.e., cell wall synthesis, protein synthesis or DNA replication) “will prevent the lethal action” of the drug (16). However in dormant cells not all the targets are equally inactive. For example, the same persister cells of *E. coli* log phase cultures that are tolerant to fluoroquinolones and cell-wall synthesis inhibitors are killed effectively by aminoglycosides, a group of antibiotics that targets protein synthesis and causes mistranslation(17,5,18). Such killing is dependent on the membrane potential of these cells, which is required for the uptake of aminoglycosides. Membrane potential is created due to the active metabolism and depends on the nutrients provided. Therefore, whether the nongrowing subset of bacteria is killed by aminoglycosides, depends on the carbon source of the growth medium(17). Consequently, persisters may have at least limited activity of protein synthesis, metabolism and membrane transport (19).

## 7.2 Type I and type II persisters

Joseph Bigger acknowledged that some bacteria “are in the persister phase when inoculated into fresh medium, but the condition is induced in others by their new environment” (1). Such distinction defines two groups of persisters that either retain dormancy acquired in the stationary phase (Type I) or fall into dormancy during growth (Type II)(4). If antibiotic is supplied at the very moment of inoculation of the culture(5), in the lag phase, or in the early logarithmic phase then the surviving persisters belong to type I. At early stages of growth, the number of persisters does not increase(Fig. 1B). Type I persisters are lost in the course of repeated cycles of dilution and growth into early log phase (3).

Type II persisters are formed when a growing culture starts approaching to the stationary phase. When nutrients are depleting and growth conditions deteriorate, their number is progressively increasing and they make up a great majority of the persister fraction (3) (Fig. 1B). In this state, functional stress response circuits (e.g. ppGpp synthesis) are important for type II persister formation but lack of these stress responses still does not fully stop formation of new persister cells (20,21). In addition to the nutrient depletion, new persister cells are generated in response to many different stress conditions (see below), including low concentrations of antibiotics (22-24).

## 7.3 Visualizing and isolating persisters

The cells with different growth rates can be labeled with various fluorescent reporters. The reporter can either manifest the physiological activity of the cell (25) or cell division rate that dilutes the fluorescent protein(26,27). Cell division and potential dormancy can be observed directly in a microfluidics system under the microscope(4,28). Alternatively, the cell population can be analyzed either by flow cytometry(5,29,27,25) or by monitoring growth of plated cells (30). For

*Mycobacterium* it has been reported that cell divisions can be followed from the loss of a very unstable plasmid(11,31).

For analyzing the macromolecular content of persisters it is important to physically isolate this fraction of the population. Lysis with antibiotics(3,32,16)or with alternative agents (33) has been suggested in the literature as a method to eliminate growing cells. However, it has to be noted that these methods pool the cells fulfilling the persister definition with the cells that will never be able to grow again (see next subsection). The nonrecovering population can be considerably higher than the persister population(5,6,27). Alternatively, cell sorting can be used for isolating bacteria in different physiological states (6,25). Here three complications arise. Firstly, the amount of material that can be isolated is much smaller compared to the methods based on cell lysis. Secondly, and more importantly, the physiological state of the bacteria might be altered by the sorting procedure. Bacteria are exposed to high pressure during sorting and carefully planned experiments are needed to control for dormancy induction by the sorting procedure. Finally, separation of persisters from permanently nondividing cells remains unresolved. Density gradient centrifugation has been used for fractionating an *E. coli* culture into subpopulations(34,35). Although more than 15 fractions have been described, the connection with the phenomenon of persisters has not been demonstrated (35).

#### **7.4 Persisters and VBNC**

It has to be noted that not all nondividing cells resume growth in the usual detection window of one or two days. In many cases, the cells preserve membrane integrity and are called viable but non-culturable (VBNC)(36,27). It is currently not clear how many of these cells might finally resume growth as slow wake-up over several months has been described(37).

#### **7.5 Stationary phase persisters**

Most of the bactericidal antibiotics are not effective against stationary phase cultures. Certain fluoroquinolones, e.g. ofloxacin, ciprofloxacin, and gatifloxacin against *E. coli*, are an exception. If the stationary phase cells are diluted into the fresh growth medium and antibiotic is supplied at the same moment, it must be noted, that most of the cells resume growth and become antibiotic sensitive soon after dilution. Type I persisters, not stationary phase persisters are assayed in such experiments (5). For counting stationary phase persisters, antibiotics have to be supplied directly to undiluted non-growing (i.e. stationary phase) cultures, which are in fact much less sensitive to antibiotic treatment(24,38).

#### **7.6 Are persisters tolerant to different antibiotics?**

High persistence (*hip*) mutants were isolated from the original screens for *E. coli* mutants with altered persister frequency(39). Later, it was found that although the screens were made with ampicillin, increased persister frequency was observed also against fluoroquinolone antibiotics and vice versa(40). This suggested that persisters are equally tolerant to many or all antibiotics. Current

results suggest that the mechanism of antibiotic action considerably influences the persister levels and different (but probably overlapping) populations survive different antibiotics(24,41,42).

### **7.7 Growth inhibition induces persistence**

Bigger already showed that growth inhibition, either by suboptimal temperature, nutrient limitation or bacteriostatic agents, induces persister formation (1). In the pioneering work for finding out the molecular mechanisms of persister formation Moyed was looking for mutants with altered persister levels. For avoiding indirect effects, attempts were made to find mutants with no changes in MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and growth parameters (39). Indeed, it was demonstrated later that overexpression of various toxic proteins can induce increased persister level (43). This calls for cautious interpretation of several results where the growth of bacteria is inhibited or the culture is stressed, as these might not reveal the biologically relevant mechanisms of persister formation. The examples include screening for mutants with altered persister levels, expression of toxins from toxin-anti-toxin systems(11,44-47), manipulations with ppGpp levels (44), treating the bacteria with sub MIC antibiotic concentrations (24) etc. In addition, all strains and mutants with increased MIC values should be compared with care (38). Even cell sorting by flow cytometry(6,27,25) might induce persisters from actively growing cells.

### **7.8 Introduction to the current protocol**

As discussed above, different labs often use different protocols for the measurement of persister levels. Because the measurement output is sensitive to conditions there are several parameters that are important to control. Here we have assembled a protocol that contains the most commonly used steps and have highlighted the essential parameters.

## **2. Materials**

Prepare all media using deionized water. Store liquid media at room temperature and agar plates at 4°C, agar side uppermost, in closed bags.

5. LB medium. Dissolve Difco™ LB broth, Lennox (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) in water according to the manufacturer's instructions (dissolve 20g of the powder in 1 L of water; see Note 1). Filter-sterilize (see Note 2). Prepare fresh and use within one week.
6. LB agar plates. Prepare Difco™ LB agar, Lennox (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Pour powder on the top of water in a beaker, stir to dissolve the soluble components, bring to boil in a microwave oven and boil for 1 min to dissolve agar. Transfer by 200 mL into 250 mL flasks; autoclave at 121°C for 15 min. Allow to cool to ~55°C and pour plates. Pour ~20mL of LB agar per 10 cm polystyrene Petri dish (see Note 3)
7. Phosphate buffered saline (PBS). For making 1 L of 10 x PBS dissolve 2 g KCl, 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl and 11.45 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (see Note 4) in 800 ml water, fill up to 1000 mL. Dilute 10 x in water to prepare 1 x PBS. Autoclave and store at room temperature.
8. Stock solutions of antibiotics (see Note 5)

- a. Ampicillin: dissolve Ampicillin Sodium salt in water at a concentration of 100 mg/ml. Do not freeze and melt. Store at 4°C up to 1 week (see Note 5).
- b. Ciprofloxacin, Norfloxacin, Gatifloxacin, Ofloxacin: all these fluoroquinolone antibiotics are soluble in 0.1 M NaOH. Dissolve, dilute with water to a concentration of 5 mg/ml, aliquot and freeze. Store at -20°C up to 3 months.

### 3.Methods

We provide an exemplary procedure for characterization of persistence of *E. coli*, which is suitable for comparison of different isolates and strains. Altering incubation times and temperatures, media for growth of the inoculum and the test culture, aeration regimens and other experimental details has an impact on persister formation and must be made known while publishing results.

#### 9.1 Preparation of *E. coli* culture DMSO stocks

We recommend starting overnight cultures from frozen DMSO stocks. That helps to standardize cultures and reduce variability between individual experiments (see Note 6).

1. Inoculate a test tube containing 3 mL LB medium with cells from a freshly grown colony on LB agar plate. Grow on a shaker at 37°C overnight (see Note 8).
2. Make a 100 x dilution of the overnight culture into 20 ml of LB medium. Incubate on a shaker at 37°C. Sample over time to measure the optical density at  $\lambda = 600$  nm.
3. When the  $A_{600}$  of the culture has reached to  $\sim 0.6$ , add DMSO to 8% (vol/vol) mixing 9.2 ml of the culture with 0.8 ml DMSO. Dispense in 100  $\mu$ l aliquots in cluster tubes and store frozen at -80 °C. DMSO stocks can be stored for up to 3 months.

#### 9.2 Growing overnight cultures for inoculum

Standardized procedure of preparation of inocula makes experiments comparable and is required for consistent results (see Note 9).

1. Transfer 3 mL of filter-sterilized LB medium into a sterile test tube
2. Melt an aliquot of the DMSO stock and use 50  $\mu$ L for starting a culture. DMSO stocks should not be refrozen and reused.
3. Grow on a shaker at 220 rpm and 37°C for 16h.

#### 9.3 Growing experimental cultures and performing antibiotic treatments

1. Transfer 20 mL of filter-sterilized LB medium into a sterile 100 mL Erlenmeyer flask.
2. Inoculate with 20  $\mu$ L of overnight culture (1000 x dilution). Put on a shaker at 220 rpm and 37°C
3. Incubate for 3 hours, then take a 100  $\mu$ L pre-treatment sample of the culture to determine the number of cultivable bacteria at the start of the antibiotic treatment.
4. Add antibiotic solution to the culture. Use ampicillin at a concentration of 100  $\mu$ g/mL, ciprofloxacin, gatifloxacin, norfloxacin, and ofloxacin at concentrations of 5  $\mu$ g/mL (see Note 10). If using antibiotic stock solutions listed in *Materials*, add 20  $\mu$ L of an antibiotic solution. Continue incubation on a shaker at 220 rpm and 37°C (see Note 11)
5. Make serial dilutions of the pretreatment sample. Use LB medium for dilution. Alternatively, serial dilutions can be made using sterile PBS or 0.9% solution of NaCl (see Note 12).

6. Plate dilutions onto LB agar plates (see Note 13). Bacteria can be either spot plated or spread plated (see Note 14).
7. Set plates at 37°C for overnight incubation (see Note 15)
8. If you treat your cultures with ampicillin (Amp) or any other cell-wall synthesis inhibitor, take 100 µL samples 1, 2, 3 and 5 hours after addition of the drug. Make serial dilutions just like you did of the pretreatment sample and plate. Incubate at 37°C for 24 h (see Note 15) and count colonies.
9. If you treat your cultures with fluoroquinolones (ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, gatifloxacin), take 1 ml samples 1, 2, 3 and 5 hours after addition of the drug. Spin down the cells in a 1.5 ml test tube for 5 min at 5000 g and room temperature. Remove supernatant and resuspend bacteria in 1 mL LB medium. Repeat centrifugation, remove supernatant, and resuspend cells in 1 mL of fresh PBS. Continue with serial dilutions and plating as in the case of the non-treated and Amp-treated samples (see Note 16). Sample results of the persister measurement are shown in Fig. 1. Alternatively, the results of antibiotic treatment and growth resumption can be analyzed by flow cytometry (see Note 17).

## 10 Notes

4. Let the powdered medium hydrate by pouring it slowly on the surface of water. That avoids clumping.
5. We strongly recommend using filter sterilized rich media or defined minimal media. Autoclaving causes degradation of the components of rich media and alters the content in an unpredictable way. All it adds up to inconsistency of results (29,48). If you use autoclaved media, minimizing experimental error would require using always the same model of autoclave, aliquoting identical volumes, loading the same amount of material to autoclave, and sterilizing your media for the same time at the same temperature.
6. LB agar can be allowed to solidify and stored at room temperature. It can be remelted in a microwave oven, allowed to cool to ~55°C, and used for pouring plates. The autoclaved, melted LB agar should not be stored at 55°C for more than a few hours.
7. If using Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), take 21.6 g; if Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(12H<sub>2</sub>O), use 28.8 g.
8. Comprehensive guidelines for preparation and storage of antibiotic solutions are provided in (49).
9. Ampicillin solution can be routinely frozen and thawed without any bad consequences if this drug is used for selection of resistant organisms. However, we have seen that repeated freezing and thawing cycles of ampicillin solution can change bactericidal activity (50).
10. Typically, a clonal culture is started from a single fresh colony. That routine is fully acceptable in study of persisters. However, it is practically inevitable that such cultures are started from an uncertain number of bacteria of uncertain age. If grown overnight, these cultures may have different physiology at the moment when they are used for inoculation of the test cultures. We have seen that persister frequency depends considerably on exact physiological parameters of inoculum (29). DMSO stocks allow starting all overnight cultures from a similar number of bacteria, which are in a controlled physiological condition and decrease inconsistency.
11. Regular, autoclaved LB medium may be used for preparation of DMSO stocks.
12. Besides the strain's genotype, persister frequency depends on the growth medium and temperature, aeration, the fold of dilution of the inoculum, the growth phase of both the test culture and the culture that was the source of inoculum (51,5,29). Even minor details of

the procedure such as the volume of the culture, shape of the culture vessel, angle of the test tube and the *radius of gyration of the rotary shaker have an effect on bacterial physiology (52) and may affect the outcome. We recommend to record and publish these details to enable reproducibility of experiments.*

13. Bactericidal activity of antibiotics is concentration-dependent, which is manifested by MBC (minimum bactericidal activity) values and concentration-dependent killing curves. By definition, persisters can survive high concentrations of antibiotics for prolonged times. Therefore, high concentrations of antibiotics, at least 10x above MIC, must be used to quantify the persister fraction (18). Applying antibiotics at low concentrations, those close to MIC, characterizes antibiotic tolerance of the bulk of sensitive cells in a population, which should not be confused with the high-level antibiotic tolerance of persisters (53). The antibiotic concentrations listed in this protocol have been routinely used in numerous papers in the field.
14. Aeration has a strong effect on bacterial physiology and survival of bacterial cells (52). In this protocol, cultures are shaken during the antibiotic treatment, while typical MBC measurements are carried out in standing liquid cultures. If antibiotics are added to smaller aliquots taken from a culture, it is important, whether these samples are further aerated or not.
15. Serial dilutions can be made into individual test tubes but it is convenient and common to use 96-well microtiter plates. 96-well plates allow dilution of cultures using either a multichannel pipette or a slot pin replicator. In our lab, we routinely use a 5  $\mu$ L-slot 12-pin replicator strip (VP 451S5; V&P Scientific, Inc., San Diego, CA, USA) for making serial dilutions in a following setup.
  - a. 100  $\mu$ L samples of culture are transferred to the wells of the first (A) row of a microtiter plate
  - b. All wells of the other rows are filled with 95  $\mu$ L of the culture medium
  - c. Samples of 5  $\mu$ L are transferred from wells of row A to row B using the replicator strip.
  - d. Pins of the replicator strip are decontaminated by immersing into bleach and rinsed twice with water. Between each step, the excess liquid is absorbed into paper towels. Finally, the pins are immersed into ethanol and flame sterilized.
  - e. Transfer of 5  $\mu$ L aliquots from the wells of the previous row to the next row is repeated. The replicator is bleached/flame sterilized between each round of dilution.

If using a multichannel pipette for making serial dilutions, we recommend 10x dilutions instead of the 20x to reduce error.

16. Colony formation after bactericidal treatment is a result of regrowth of individual persister cells. We know that the rate and efficiency of such regrowth depend on the growth medium (5) and that many dormant cells remain non-dividing and do not form colonies after plating (27,6,5). Thus, the solid medium used for plating and the time of incubation before colony counting might supposedly affect persister count. Plating of the samples from the same antibiotic-treated culture onto several different solid media shows that unexpected effects are possible but generally, choice of the plating medium did not produce significant differences in persister count (see Fig. 2).
17. The exact number of viable cells in a sample is often hard to predict and, therefore, it is easier to spot plate all serial dilutions using a multichannel pipette. Colonies are counted from the largest dilution. If this spot contains only 1-2 colonies, counting colonies from the

previous dilution may reduce error. The experimental error of this method is significant and we recommend plating serial dilutions of one sample in several repetitions. 5  $\mu$ L volumes are suitable for spot plating and the agar surface must be dry to avoid merging of spots. To achieve better accuracy, results of spot plating can be used as preliminary data for spread plating an appropriate amount of a suitable dilution.

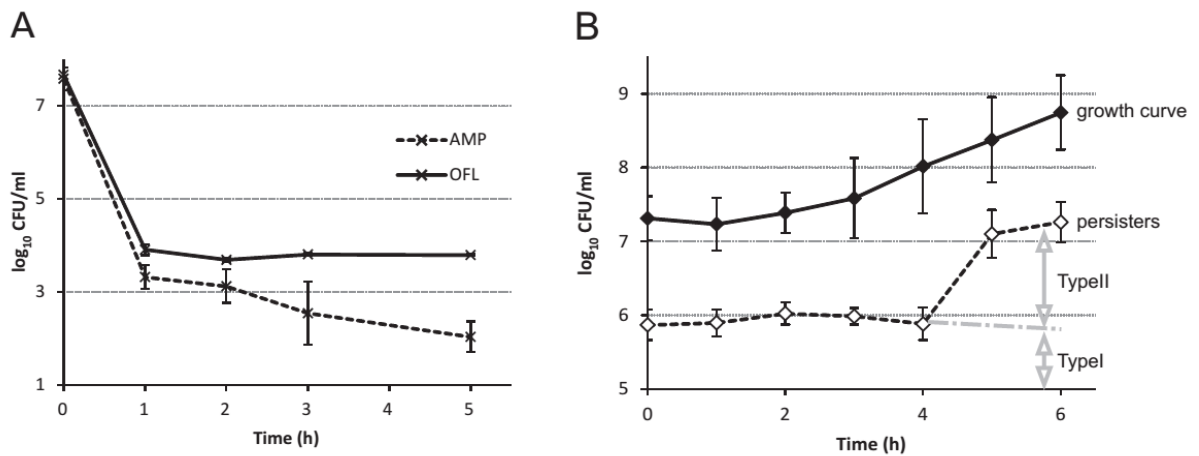
18. Individual persister cells resume growth over time (5). That is equally true when regrowth happens on plates and colonies appear during a time period of several hours (4,30). Moreover, antibiotic treatment causes the delay of regrowth called post-antibiotic effect (54). Thus, longer incubation of plates is expected to increase persister count. However, tests in our lab have shown that keeping LB agar plates at 37°C for additional 24 h did never increase the number of colonies more than 10% and usually had much smaller effect (Hannes Luidalepp, unpublished).
19. Washing fluoroquinolone-treated bacteria before plating is required to avoid the carry-over of the drug. Fluoroquinolones bind to the bacterial outer surface and would interfere with accurate counting of viable bacteria. Bulk of the drug is removed with the culture medium and washing with PBS allows to get rid of the growth-inhibiting residue. Spinning down and washing the bacteria is not necessary nor recommend after incubation with Amp and other cell wall synthesis inhibitors, which promote bacterial lysis because the remaining tiny cell pellet could be easily lost. The residual Amp is diluted below MIC upon plating and has no effect on regrowth of colonies.
20. Flow cytometry is a powerful method for identification of different sub-populations of bacteria that coexist in the same culture. It can be used to discriminate between the nongrowing subpopulation, including persisters, and the growing cells. That is possible using inducible expression and subsequent dilution of GFP (or some other fluorescent protein). Cells are grown in the presence of inducer so that GFP accumulates in the cells. At the desired time, cells are transferred into a growth medium lacking the inducer. GFP content of dividing cells decreases twofold by dilution at every cell division. Nondividing cells will keep their initial (high) GFP content and can be distinguished from dividing cells using flow cytometer (27). Persisters belong to this nondividing, label retaining subpopulation of cells. However, also dead and viable but non-cultivable (VBNC) cells fall into this category and it is impossible to distinguish between these groups using flow cytometry alone. For example, after a relatively long stationary phase in LB medium only a small fraction of cells resume growth following the transfer into fresh medium (29). Most of the label retaining cells never produce a colony on agar plate and thus are not fulfilling the definition of persisters.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the European Regional Development Fund through the Center of Excellence in Chemical Biology and Estonian Science Foundation grant 8822.

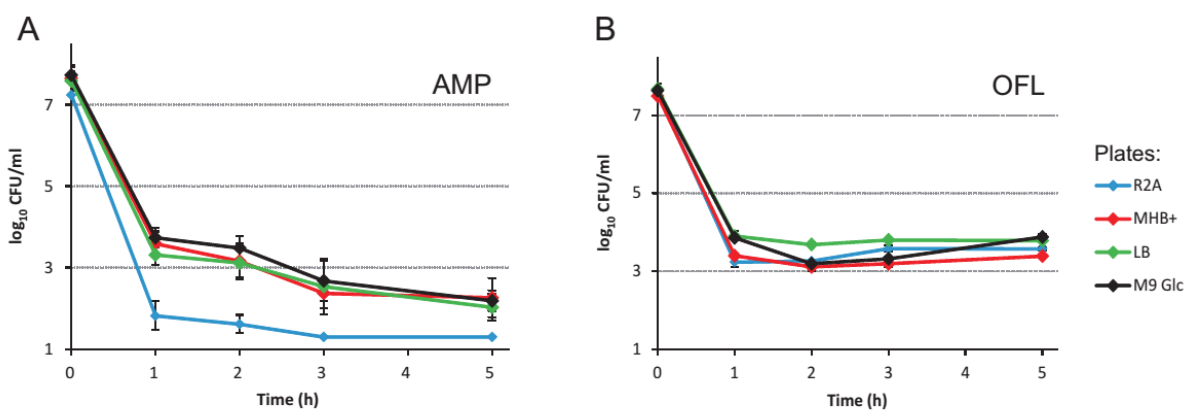
### **Figures**





**Figure 1. Graphical presentation of the results of the persister experiments.**

- A. **Typical killing curves of cultures treated with antibiotics.** Killing curves represent kinetics of killing of bacteria during a bactericidal treatment. Cultures of *E. coli* MG1655 were grown and treated as described in the sample protocol. Briefly, both the overnight culture and the test culture were grown in filter sterilized LB broth. At the beginning of the experiment, overnight culture was diluted 1000 x and incubated on a shaker at 37°C for 3 hours. Then, ampicillin, 100 µg/mL (AMP; dashed line) or ofloxacin, 5 µg/mL (OFL; solid line) were added and incubation was continued. Killing curves show that the number of living microbes decreased more than 1000x during the first hour of antibiotic treatment. That drop is caused by killing of the bulk of phenotypically sensitive bacteria. Starting from the 1 h time point, the CFU numbers are decreasing slowly and indicate the number of persisters in the culture. The values represent the means of five independent AMP treatments and three independent OFL treatments. The error bars indicate the standard deviation.
- B. **The number of persisters increases when a growing culture approaches to the stationary phase.** An overnight culture of *E. coli* BW 25113 was diluted 1:100 and cultured with aeration at 37°C. At the designated time points samples were taken and treated with ciprofloxacin (1 µg/mL) for 5 h. Closed symbols, cell count before the treatment (growth curve); open symbols, cell count after the ciprofloxacin treatment (persister count). During the first four hours, the number of persisters does not increase. In this stage, persisters are the cells that have been in non-proliferating state since inoculation (Type I persisters). After the 4h time point, the number of persister increases rapidly and newly formed (Type II) persisters make up the majority of surviving cells. The values are averages of three replicates and the error bars indicate the standard deviation.



**Figure 2. Effect of the plating medium on persister count.**

Cultures of *E. coli* BW25113 were grown on a shaker at 37°C. After 3 hours of growth (time point 0h), ampicillin, 100 µg/mL (AMP; A) or ofloxacin, 5 µg/mL (OFL; B) were added and incubation was continued. Samples of the same culture were plated on different solid media: LB agar (green), MHB+ agar (red), M9 agar supplemented with 0.2 % glucose (black) and R2A agar (55)(blue). Lower CFU counts on R2A agar after the treatment with ampicillin indicate less efficient cell recovery after plating compared to the other media. The values are averages of five AMP treatments and three OFL treatments. The error bars indicate the standard deviation.

## References

1. Bigger JW (1944) Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *The Lancet* 244 (6320):497-500
2. Lewis K (2010) Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 64:357-372
3. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230 (1):13-18
4. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305 (5690):1622-1625
5. Joers A, Kaldalu N, Tenson T (2010) The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J Bacteriol* 192 (13):3379-3384
6. Orman MA, Brynildsen MP (2013) Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (7):3230-3239
7. Epstein SS (2009) Microbial awakening. *Nature* 457 (457):1083
8. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S (2005) Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* 169 (4):1807-1814
9. Ratcliff WC, Denison RF (2011) Bacterial persistence and bet hedging in *Sinorhizobium meliloti*. *Commun Integr Biol* 4 (1):98-100
10. Fredriksson A, Nystrom T (2006) Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 9 (6):612-618
11. Adams KN, Takaki K, Connolly LE, Wiedenhoft H, Winglee K, Humbert O, Edelstein PH, Cosma CL, Ramakrishnan L (2011) Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* 145 (1):39-53
12. Wakamoto Y, Dhar N, Chait R, Schneider K, Signorino-Gelo F, Leibler S, McKinney JD (2013) Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science* 339 (6115):91-95
13. Ezraty B, Vergnes A, Banzhaf M, Duverger Y, Huguenot A, Brochado AR, Su SY, Espinosa L, Loiseau L, Py B, Typas A, Barras F (2013) Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science* 340 (6140):1583-1587
14. Javid B, Sorrentino F, Toosky M, Zheng W, Pinkham JT, Jain N, Pan M, Deighan P, Rubin EJ (2014) Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (3):1132-1137
15. Martinez JL, Blazquez J, Baquero F (1994) Non-canonical mechanisms of antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 (12):1015-1022
16. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K (2004) Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186 (24):8172-8180
17. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ (2011) Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 473 (7346):216-220
18. Spoering AL, Lewis K (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183 (23):6746-6751

19. Orman MA, Brynildsen MP (2013) Establishment of a method to rapidly assay bacterial persister metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (9):4398-4409
20. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K (2013) (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* 154 (5):1140-1150
21. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, McKay G, Siehnel R, Schafhauser J, Wang Y, Britigan BE, Singh PK (2011) Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* 334 (6058):982-986
22. Dorr T, Lewis K, Vulic M (2009) SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5 (12):e1000760
23. Dorr T, Vulic M, Lewis K (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8 (2):e1000317
24. Goneau LW, Yeoh NS, Macdonald KW, Cadieux PA, Burton JP, Razvi H, Reid G (2014) Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother*
25. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K (2006) Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol* 6:53
26. Helaine S, Thompson JA, Watson KG, Liu M, Boyle C, Holden DW (2010) Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (8):3746-3751
27. Roostalu J, Joers A, Luidalepp H, Kaldalu N, Tenson T (2008) Cell division in *Escherichia coli* cultures monitored at single cell resolution. *BMC Microbiol* 8:68
28. Gefen O, Gabay C, Mumcuoglu M, Engel G, Balaban NQ (2008) Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (16):6145-6149
29. Luidalepp H, Joers A, Kaldalu N, Tenson T (2011) Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. *J Bacteriol* 193 (14):3598-3605
30. Levin-Reisman I, Gefen O, Fridman O, Ronin I, Shwa D, Sheftel H, Balaban NQ (2010) Automated imaging with ScanLag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes. *Nat Methods* 7 (9):737-739
31. Gill WP, Harik NS, Whiddon MR, Liao RP, Mittler JE, Sherman DR (2009) A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 15 (2):211-214
32. Keren I, Minami S, Rubin E, Lewis K (2011) Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *MBio* 2 (3):e00100-00111
33. Canas-Duarte SJ, Restrepo S, Pedraza JM (2014) Novel protocol for persister cells isolation. *PLoS One* 9 (2):e88660
34. Cuny C, Dukan L, Fraysse L, Ballesteros M, Dukan S (2005) Investigation of the first events leading to loss of culturability during *Escherichia coli* starvation: future nonculturable bacteria form a subpopulation. *J Bacteriol* 187 (7):2244-2248
35. Makinoshima H, Nishimura A, Ishihama A (2002) Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol Microbiol* 43 (2):269-279
36. Oliver JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43 Spec No:93-100
37. Buerger S, Spoering A, Gavrish E, Leslin C, Ling L, Epstein SS (2012) Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. *Appl Environ Microbiol* 78 (9):3221-3228
38. Ma C, Sim S, Shi W, Du L, Xing D, Zhang Y (2010) Energy production genes *sucB* and *ubiF* are involved in persister survival and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 303 (1):33-40
39. Moyed HS, Bertrand KP (1983) *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155 (2):768-775
40. Wolfson JS, Hooper DC, McHugh GL, Bozza MA, Swartz MN (1990) Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 34 (10):1938-1943

41. Hofsteenge N, van Nimwegen E, Silander OK (2013) Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC Microbiol* 13:25
42. Wiuff C, Andersson DI (2007) Antibiotic treatment in vitro of phenotypically tolerant bacterial populations. *J Antimicrob Chemother* 59 (2):254-263
43. Vazquez-Laslop N, Lee H, Neyfakh AA (2006) Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *J Bacteriol* 188 (10):3494-3497
44. Lioy VS, Machon C, Tabone M, Gonzalez-Pastor JE, Daugelavicius R, Ayora S, Alonso JC (2012) The zeta toxin induces a set of protective responses and dormancy. *PLoS One* 7 (1):e30282
45. Tabone M, Lioy VS, Ayora S, Machon C, Alonso JC (2014) Role of Toxin zeta and Starvation Responses in the Sensitivity to Antimicrobials. *PLoS One* 9 (1):e86615
46. Tripathi A, Dewan PC, Barua B, Varadarajan R (2012) Additional role for the *ccd* operon of F-plasmid as a transmissible persistence factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (31):12497-12502
47. Tripathi A, Dewan PC, Siddique SA, Varadarajan R (2014) MazF-induced Growth Inhibition and Persister Generation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 289 (7):4191-4205
48. Madar D, Dekel E, Bren A, Zimmer A, Porat Z, Alon U (2013) Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol* 7 (1):136
49. Andrews JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1:5-16
50. Luidalepp H, Hallier M, Felden B, Tenson T (2005) tmRNA decreases the bactericidal activity of aminoglycosides and the susceptibility to inhibitors of cell wall synthesis. *RNA Biol* 2 (2):70-74
51. Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR (2009) Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 63 (4):745-757
52. Kram KE, Finkel SE (2014) Culture Volume and Vessel Affect Long-Term Survival, Mutation Frequency, and Oxidative Stress of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 80 (5):1732-1738
53. Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K (2013) Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* 339 (6124):1213-1216
54. MacKenzie FM, Gould IM (1993) The post-antibiotic effect. *J Antimicrob Chemother* 32 (4):519-537
55. Reasoner DJ, Geldreich EE (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49 (1):1-7

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Henri Ingelman, (sünnikuupäev: 19. detsember 1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:

**Katsetingimuste mõju persistorite esinemissagedusele *Escherichia coli*'s**

mille juhendaja on Niilo Kaldalu,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **12.29.2015** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26. mail 2014