

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Katlin Rikas

Toksiini-antitoksiini süsteemide ja neid kontrollivate geenide mõju
Escherichia coli kasvule

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Niilo Kaldalu

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. BAKTERITE KASVU FENOTÜÜBILINE HETEROGEENSUS JA SELLE TÄHTSUS.....	6
1.1.1. Persisterid	6
1.1.2. Bakteri kultuuri kasvu heterogeensuse määramine	7
1.2. TOKSIINI-ANTITOKSIINI SÜSTEEMID	8
1.2.1. Toksiini-antitoksiini süsteemide töömehhanism	8
1.2.2. Toksiini-antitoksiini süsteemide funktsioon.....	8
1.2.3. Toksiini-antitoksiini süsteemid ja persisterid	9
1.3. BAKTERITE KASVU MÕÕTMINE	10
1.3.1. Bakterite kasvu mõõtmise meetodid	10
1.3.2. Bakterite kasvufaasid.....	11
1.3.3. Kasvukõver.....	12
1.4. LAG FAAS.....	13
1.4.1. Üldisloomustus	13
1.4.2. Lag faasi kestvust mõjutavad tegurid	13
1.4.3. Lag faasi mõõtmine ja modelleerimine	13
1.4.4. Spooride lag faas	15
1.5. KASVUTINGIMUSTE MÕJU BAKTERITE FÜSIOLOOGIALE, KASVULE JA FENOTÜÜBILISELE HETEROGEENSUSELE	16
1.5.1. LB sööde.....	16
1.5.2. Inokulumi vanus	17
1.5.3. Inkubatsioon.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1. TÖÖ EESMÄRGID	18
2.2. MATERJAL JA METOODIKA	18
2.2.1. Bakteritüved, söötmed	18
2.2.2. DMSO säilituskultuuri valmistamine	19
2.2.3. Kasvukiiruse ja lag faasi mõõtmine	20

2.2.4. Statistiline analüüs.....	20
2.3. TULEMUSED.....	20
2.3.1. Katsete ülesehitus ja bakterite kultiveeritavus.....	20
2.3.2. Suur varieeruvus lag faasi pikkuses.....	22
2.3.3. Kasvukiirus.....	26
2.3.4. Kas TA operonide viimine $\Delta 11$ tüvesse mõjutab kasvu?.....	29
2.4. ARUTELU	30
KOKKUVÕTE	32
THE EFFECT OF TOXIN-ANTITOXIN SYSTEMS AND THE GENES CONTROLLING THEIR ACTIVITY ON THE GROWTH OF <i>E. COLI</i>.....	33
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....	35
TÄNUAVALDUSED	39
LIHTLITSENTS.....	40

KASUTATUD LÜHENDID

CFU – kolooniat moodustavate bakterite arv (*colony forming unit*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

FACS – fluorestsents-signaali detekteeriv läbivoolu tsütomeeter (*fluorescence activated cell sorter*)

GFP – roheline fluorestseeruv valk (*green fluorescent protein*)

LB – *lysogeny broth*

OD₆₀₀ – optiline tihedus 600nanomeetri juures (*optical density*)

ppGpp – guanosiin tetrafosfaat

TA – toksiini-antitoksiini

SISSEJUHATUS

Toksiini-antitoksiini (TA) süsteemid on prokarüootide seas laialt levinud. TA süsteemid koosnevad stabiilsest toksiinist ja labiilsest antitoksiinist (Van Melder ja Savedra De Bast, 2009). Neid ekspresseeritakse kõrvuti asetsevatelt ja ühtsele regulatsioonile alluvatelt geenidelt (operonidelt) (Unterholzner jt., 2013). Toksiin on võimeline raku kasvu inhibeerima või põhjustama raku surma, mõjutades mõnda rakule kriitilise tähtsusega protsessi. Normaalselt kasvavates rakkudes neutraliseerib toksiini mõju temale vastav antitoksiin. TA süsteemid ei ole raku kasvuks hädavajalikud, olles siiski bakterite ja arhede hulgas laialt levinud. TA süsteemide laialdase esinemise tõttu spekulatsioonid, et nad soodustavad raku ellujäämist. Toksiinid võivad aidata rakul kohaneda pidevalt muutuvate keskkonnatingimustega aeglustades ja peatades raku kasvu (Yamaguchi jt., 2011).

Persistentsus ehk multitolerantsus on geneetiliselt homogeenne populatsiooni mõne raku võime üle elada erinevad stressifaktorid, nagu antibiootikumide või muude bakteritsiidsete ainete mõju. Persisterid ei ole mutandid, vaid tundlikest bakteritest fenotüübiliselt erinevad subpopulatsioonid. Suikeseisundist väljudes on need bakterid antibiootikumide suhtes sama tundlikud kui ülejäänud populatsioon (Wen jt., 2014).

Lähenemine statsionaarsele faasile suurendab persisterite arvu. Populatsioonis esinevad tundlikud rakud ja kahte tüüpi persistereid. I tüüpi persisterid pärinevad statsionaarsest faasist ning nende arvukus väheneb kultuuri vananedes. II tüüpi persisterid moodustuvad pidevalt kasvu ajal, nende arvukus suureneb kultuuri lähenemisel statsionaarsele faasile (Balaban jt., 2004). Persisterrakkude moodustumist võimendavad erinevad keskkonnatingimused nagu antibiootikumide olemasolu, toitainete puudus, oksüdatiivne stress, ekstreemne pH ja temperatuur ning peremeesorganismi immuunsüsteem (Wen jt., 2014). Võimalik, et persisterite moodustumine on bakteripopulatsiooni ellujäämisstrateegia muutuv keskkonnas (Balaban jt., 2004).

Käesoleva töö kirjanduse ülevaate osas tutvustatakse TA süsteemide ja persisterite olemust ning lag faasi ja bakterite kasvukiiruse mõõtmise üldpõhimõtteid. Praktilise töö eesmärgiks on iseloomustada TA süsteemide ja nende aktiivsust mõjutavate geenide mõju bakterite kasvule: kasvu kiirusele (*growth rate*) ja lag faasi pikkusele ehk kasvama hakkamise (kasvu taastumise) kiirusele. TA süsteemide töömehhanismide teadmine aitab mõista persistereid ja ravida paremini kroonilisi bakterinakkuseid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Bakterite kasvu fenotüübiline heterogeensus ja selle tähtsus

1.1.1. Persisterid

Bioloogid on aastakümnete jooksul uurinud kiiresti paljunevaid baktereid ja kasutanud neid mudelorganismina erinevate bioloogiliste protsesside uurimisel. Bakterid suudavad laboritingimustes kiiresti kasvada ja paljuneda, seetõttu on neid hea käsitleda kui kasvamise ja paljunemise masinaid. Bakterid on suhteliselt lihtsad organismid, mida on seetõttu ka lihtne uurida. (Fields ja Johnston, 2005). Ometi on looduses enamuses sellised bakterid, mis parasjagu ei paljune, kuna keskkonnatingimused pole soodsad (näiteks ebasobiv pH või temperatuur, toitainete puudus). Isegi kasvu ja paljunemise jaoks soodsates tingimustes leidub baktereid, mis ei jagune, vaid on uinunud olekus. Aja möödudes võivad sellised bakterid uuesti jagunema hakata. Mittejagunevas olekus on bakterid erinevate antibiootikumide suhtes tundetud. Bakteritsiidsed antibiootikumid tapavad aktiivselt paljunevaid rakke, kuid mittepaljunevaid rakke nad tappa ei suuda. Tänu ajutiselt „puhkavatele“, laiskadele bakteritele suudab bakteripopulatsioon ebasoodsad tingimused üle elada. Kirjeldatud mittejagunevaid, uinunud olekus baktereid, mida bakteritsiidsed antibiootikumid tappa ei suuda nimetatakse persisteriteks (või persistoriteks). Strateegia minna uinunud olekusse kaitseb rakke tundmatus keskkonnas (Lewis, 2007).

Persisterite puhul ei ole tegu mutantidega, vaid fenotüübi poolest erineva alampopulatsiooniga bakterikultuuris. Persisterid on multitolerantsed, mitte resistentid, kuna nende vastupanu antibiootikumidele on mööduv ning on tingitud mittepärilikust fenotüübilisest tolerantsusest (Dhar ja McKinney, 2007). Persisteritel on oluline roll meditsiinis. Usutavasti on seos persisterite olemasolu ja krooniliste ning ravile allumatute nakkuste vahel. Sellisteks tüüpilisteks haigusteks on tuberkuloos ja süüfilis. Paljudel juhtudel moodustavad patogeensed bakterid enda ümber biokile, et end immuunsüsteemi eest täiendavalt kaitsta. Biokile sees võivad moodustuda omakorda persisterid. Biokile nakkused on üldjuhul väga raskesti antibiootikumidega ravitavad. Siiski on biofilmist eraldunud rakud enamasti antibiootikumidele tundlikud ning ka biofilmid ise üldiselt antibiootikumi juuresolekul ei kasva, seega ei ole persisterid tavaliste rakkudega võrreldes suurenenud resistentusega. Antibiootilise ravi lõppedes avaldub infektsioon uuesti, kuna väike rakkude alampopulatsioon (persisterid) jääb ellu, olenemata antibiootikumi kontsentratsioonist.

Persisterite molekulaarsete mehhanismide mõistmine avaks tõenäoliselt võimaluse krooniliste bakterhaigustega võitlemiseks. (Lewis, 2007).

Persisterite teke võib olla põhjustatud loomulikust varieeruvusest isegi geneetiliselt identsete organismide vahel (Dhar ja McKinney, 2007). Bakteripopulatsioonis on kõik rakud identse genoomiga, kuid siiski võivad kindlate valkude kontsentratsioonid erineda. Need kontsentratsiooni kõikumised võivad määrata, millisest rakust moodustub persister (Lewis, 2007). Olulisel kohal on ilmselt ka rakutsükli faas, kuna tsükkel ei ole bakteripopulatsiooni siseselt sünkroniseeritud. Rakutsükli erinevates faasides võib bakteri tundlikkus antibiootikumi suhtes varieeruda. Antibiootikumitundlikkust võib määrata kasvukiirus. Rakud, mis kasvavad aeglaselt või ei kasva üldse, tunduvad olevat antibiootikumide suhtes vähem tundlikud (Dhar ja McKinney, 2007). Persisterite sagedus on konstantne lag ja varajases eksponentsiaalses faasis, suureneb hilises eksponentsiaalses faasis, maksimum saavutatakse statsionaarses faasis (Lewis, 2007). Selle võimalikuks seletuseks võib olla teatud geenide transkriptsiooni käivitamine statsionaarsesse faasi sisenemisel, need geenid võivad vastutada persisterite tekke eest (Dhar ja McKinney, 2007). Üheks selliseks regulaatorgeeniks on näiteks *relA* (Maisonneuve jt., 2013). Stohhastiliste protsesside esinemine toob kaasa varieeruvuse, mis suurendab ellujäämise tõenäosust (Lewis, 2007).

1.1.2. Bakteri kultuuri kasvu heterogeensuse määramine

Klassikalised mikroobikultuuri kasvu mõõtmise meetodid ei arvesta sellega, et kasv võib olla heterogeenne. On leitud mitmeid viise, kuidas tuvastada populatsioonis eri kasvufaasis olevaid rakke.

Bakterikultuuri kasvu heterogeensuse määramise üheks võimaluseks on jälgida GFP (roheline fluorestseeruva valguga) hulga muutust ajas. Rakud, mis sisaldavad fluorestseerivat valku kodeerivat plasmidi, kasvatatakse indutseerija juuresolekul statsionaarse faasini. Tulemusena moodustuvad erkrohelised rakud (Jöers jt., 2010). Värskesse söötmesse inokuleerimisel jagunevad rakud kahte alampopulatsiooni. Ainult murdosa algsest rakupopulatsioonist hakkab jagunema, iga pooldumise järel lahjeneb GFP sisaldus neis kahekordselt. Teine osa rakkudest ei pooldu, säilitades kõrge GFP sisalduse. Fluorestsentsi hulka on võimalik ühe raku tasemel määrata läbivoolu tsütomeetria meetodit rakendades (Roostalu jt., 2008).

Ühe raku tasemel on võimalik bakteri kasvu jälgida ja mõõta ka optilist mikroskoopiat kasutades. Näiteks kasvatakse bakterid läbipaistval mikrofluidika kiibil, mikroskoopilistes kanalites mikroskoobi all. Kindlate ajavahemike tagant bakterite pildistamise ja kolooniate

mõõtmise kaudu tuletatakse ühe raku järglaste kasvukiirused. Persisterite tuvastamiseks lisatakse söötmesse antibiootikumi, mis põhjustab tundlike bakterite lüüsi, ning asendatakse uue söötmega. Vähesed rakud ehk persisterid on jäänud lüüsimata ning on võimelised uuesti kasvama hakkama ja jagunema (Balaban jt., 2004).

ScanLag meetod võimaldab bakterite kasvu uurida ühest rakust pärineva koloonia tasemel. Automaatsed skännerid omandavad nende peale asetatud Petri tassidelt kindlate ajaintervallida tagant infot, mille põhjal saadakse iga koloonia kasvukiirus ja lag faas. Mitmedimensionaalse pildi saamiseks on võimalik lisada näiteks kolooniate kuju, tekstuur ja värvus. Samuti võimaldab meetod identifitseerida erinevaid kasvu fenotüüpe, näiteks pika lag faasiga rakud, mis võivad muutuda persisteriteks (Levin-Reisman jt., 2014).

1.2. Toksiini-antitoksiini süsteemid

1.2.1. Toksiini-antitoksiini süsteemide töömehhanism

Pole täpselt teada, millised mehhanismid muudavad mõned bakterid soodsates kasvutingimustes mittepeljunevaks. Üheks võimalikuks kandidaadiks on toksiini-antitoksiini süsteemid bakterites. TA süsteemid on mitmekesised ning laialdaselt levinud reguleerivad elemendid bakterite ja seente kromosoomidel ning plasmiididel. TA süsteemid koosnevad toksiinist, mis töötab toksiini tootva bakteri enda vastu ja antitoksiinist, mis neutraliseerib vastavat toksiini. Toksiinid on võimelised muutma või takistama erinevaid rakule enamasti kriitilise tähtsusega protsesse. Nende protsesside hulka kuuluvad näiteks translatsioon, DNA replikatsioon, tsütoskeleti moodustamine, ATP või rakuseina süntees. Sõltuvalt antitoksiini molekulaarsest ehitusest ning tema mõjust vastavale toksiinile on TA süsteemid jaotatud viide klassi. Represseerivaks antitoksiiniks võib olla valk või antisens-RNA. Antitoksiin on ebastabiilne ja ta lagundatakse stressitingimustes kiiresti proteaaside poolt. Stabiilsem toksiin saab aktiveeruda, mille tagajärjel rakk kas sureb või moodustab persisterraku (Unterholzner jt., 2013). Senini ei teata, kuidas uinunud olekus rakud lülituvad tagasi kasvamise faasi (Buddle jt., 2007).

1.2.2. Toksiini-antitoksiini süsteemide funktsioon

TA paaride peamiseks funktsiooniks rakus peeti algselt plasmiidide stabiliseerimist, kuid TA operonide laialdane levik erinevate bakterite kromosoomides ei soosinud seda hüpoteesi. (Schuster ja Bertram, 2013). Samuti võivad TA süsteemid olla olulised geneetilise

informatsiooni horisontaalse leviku tagamises ja evolutsiooni kiirendamises, kuna TA operonid asuvad sageli mobiilsetel geneetilistel elementidel, nagu plasmiidid ja transposoomid (Gerdes, 2000). Kauga aega arvati, et TA geenide eemaldamisel ei juhtu bakteriga midagi, kuna need ei mõjuta fenotüüpi. Erinevates stressitingimustes võrreldi *E. coli* (*Escherichia coli*) metsiktüüpi tüve ja $\Delta 5$ bakteritüve. Eelnevate katsete põhjal oletati, et deleteeritud *mazEF* ja *relBE* ning tõenäoliselt ka teised kromosomaalsed TA süsteemid on kasvu modulaatorid, mis indutseerivad aminohapete näljas pöörduva puhkeseisundi. Kõikide katsetingimuste korral inhibeerisid nii mutant kui metsiktüvi kasvu sarnaste mehhanismide teel. Mõlema tüve normaalne kasv taastus stressiallika eemaldamisel, viidates TA süsteemide rolli puudumisele kasvu inhibeerimises ja stressijärgses taastumises (Tsilibaris jt, 2007). Hiljutised katsed *E.coli*'ga on tõestanud, et TA paarid siiski osalevad stressivastuses ning aitavad bakteritel ellu jääda kasvu pärssivates keskkonnatingimustes (Maisonneuve jt., 2011, 2013). Samuti on leitud, et obligatoorsetel parasiitidel TA süsteemid puuduvad. Seega ei ole TA paarid vajalikud stabiilses keskkonnas elavatele bakteritele. Organismid, millel TA süsteemid esinevad, asustavad väga mitmekesiseid keskkondi (Pandey ja Gerdes, 2005).

1.2.3. Toksiini-antitoksiini süsteemid ja persisterid

Persisterite teket mõjutavate geenide tuvastamine on olnud keeruline protsess, samuti on persisterite tekkemehhanism endiselt ebaselge (Lewis, 2007). Esimene tõestatud persistergeen tundub olevat *hipBA* TA paari toksiini geen *hipA*. *hipBA* paari eemaldamine tõi kaasa persisterite taseme 10–100-kordse languse nii statsionaarses faasis kui biofilmi populatsioonides (Keren jt., 2004; Maisonneuve jt., 2013). Persistereid sisaldavas mittejagunevate bakterite fraktsioonis on TA geenide mRNA üleekspressseeritud. Kõrgel tasemel on ekspresseeritud näiteks mRNA endoribonukleasid *relE* ja *mazF*, mis inhibeerivad translatsiooni ja põhjustavad pöörduvat suikeseisundit (Shah jt., 2006; Keren jt., 2004). Mitmed uuringud on tõestanud, et fenotüübi nägemiseks tuleb ära lõhkuda suur hulk TA süsteeme, mitte ainult üksikuid. Näiteks *relBE* ja *mazEF* TA süsteemide lõhkumisega ei kaasnenud persisterite taseme langust, mis võib viidata sellele, et bakterite genoomis esineb mitu sama funktsiooniga geeni ja ühe geeni deleteerimine ei põhjusta uue fenotüübi teket. Loodi *E. coli* $\Delta 10$ bakteritüvi, millest oli eemaldatud 10 TA paari. Deleteerimine mõjutab peamiselt persisterite arvukust, tundlike rakkude kasv on samasugune nagu juhul, kui käsitletavad 10 TA süsteemi on olemas (Maisonneuve jt., 2011).

Persisterite tase langeb, kui deleteerida TA aktiveerimiseks olulised geenid *ppk*, *lon* või *relA* ja *spoT*. Kõiki teadaolevaid *E. coli* II tüüpi antitoksiine on võimeline lagundama Lon

proteas, vastava geeni *lon* deleteerimise tulemusena langeb persisterite arvukus oluliselt. TA lookuste poolt kodeeritud endonukleaasid on juhuslikult aktiveeritud, kui Lon proteaas lagundab väikses kasvavate rakkude subpopulatsioonis antitoksiine. Lon proteaasi ainuke teadaolev aktivaator on anorgaaniline polüfosfaat, mida sünteesib polüfosfaatkinaas (*ppk*) ja lagundab eksopolüfosfataas (*ppx*). Tüvel, milles *ppx* oli deleteeritud, esines polüfosfaadi akumulereerise tulemusena erakordselt kõrge persisterite arvukus ka kahe antibiootikumi juuresolekul. Seega, persisterite arvukus on positiivses sõltuvuses polüfosfaadi tasemega rakus. Polüfosfaadi kontsentratsiooni kontrollib guanosiin tetrafosfaat (*ppGpp*), mis inhibeerib eksopolüfosfataasi toimet. Valgud RelA ja SpoT on guanosiin tetrafosfaadi süntetaasideks (Maisonneuve jt., 2013). Tähelepanuväärselt on guanosiin tetrafosfaat ka ise RelA positiivseks stimulaatoriks, seega sünteesitakse guanosiin tetrafosfaati positiivse tagasiside printsiibil (Shyp jt., 2012).

1.3. Bakterite kasvu mõõtmine

1.3.1. Bakterite kasvu mõõtmise meetodid

Looduses esineb harva tingimusi, mis suudaksid tagada konstantse bakterikasvu. Oligotroopsed keskkonnad ning mikroobidevaheline konkurents sunnib baktereid kiiresti kohanema karmide ja muutuvate kasvutingimustega. Bakteritele on omane tsükliline eluviis on sobilik nii kasvuks kui nälgimiseks (Llorens jt., 2010).

Eelmise sajandi kuuekümnendatest kaheksakümnendateni oli bakterite kasvukiiruste mõõtmine oluliseks töövahendiks mikroobigeneetikas, biokeemias, molekulaarbioloogias ja mikroobifüsioloogias. Kasvukiiruse määramise klassikalised meetodid on aeganõudvad ja töömahukad. Bakterikultuuri kasvatati Erlenmeyeri kolbides konstantse temperatuuriga ruumis või veevannis spetsiaalsetel loksutitel, et tagada piisav aeratsioon. Teatud ajaintervallide tagant mõõdeti spektrofotomeetris valguse neeldumist kultuuris ehk optilist tihedust. Ajapunktide ja optilise tiheduse kaudu arvutati kasvukiirus. Selline meetod võimaldab parimal juhul mõõta samaaegselt umbes kahekümne kultuuri kasvukiirust, olles seega väheefektiivne ning töömahukas (Hall jt., 2013).

Bakterite kasvukiiruse määramist on hõlbustanud mikrotiiter plaadilugejad, mille abil on võimalik samaaegselt mõõta kuni 384 erineva kultuuri kasvu. Automaatsete mikrotiiter plaadilugejate kasutuselevõtu tulemusena on kasvukiirustega seotud andmeid hakatud taas laialdaselt kasutama eri valdkondades. Mikrotiiter plaadilugeja mõõdab optilist tihedust

kindlate ajaintervallide järel. Programmid nagu GrowthRates teevad automaatselt vajalikud teisendused, leiavad eksponentsiaalse kasvu piirkonna ning arvutavad kasvukiiruse. Samuti leiab programm maksimaalse kultuuritiheduse ja lag faasi pikkuse (Hall jt., 2013).

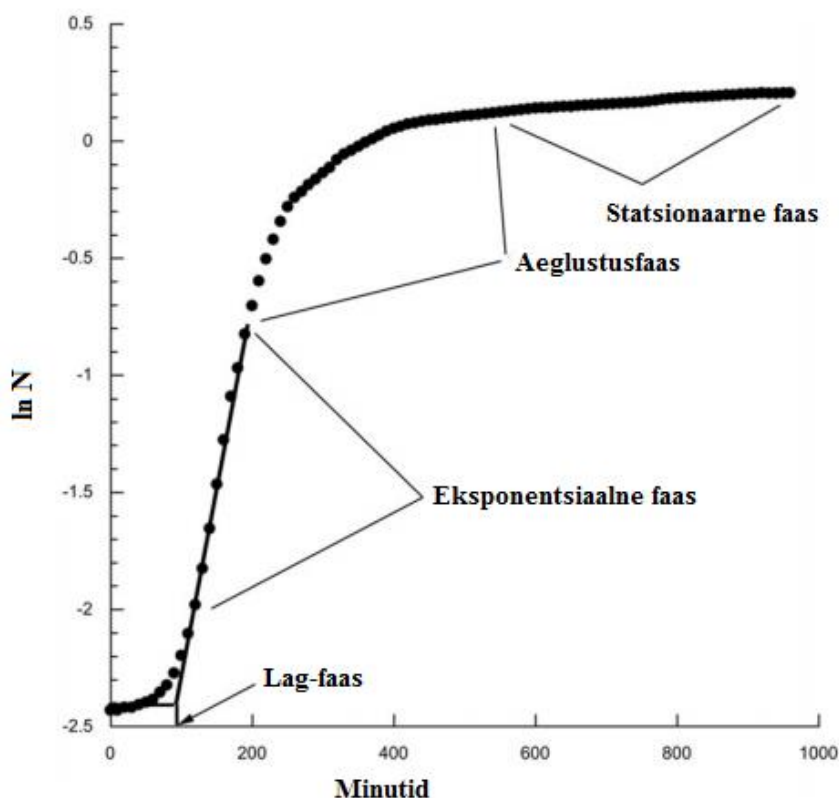
1.3.2. Bakterite kasvufaasid

Kasvukiiruse mõõtmise eesmärk on määrata rakkude arvu muutust kultuuris ajaühiku kohta (Hall jt., 2013). Suletud süsteemis kasvatades ei ole kasvukiirus ajas konstantne tänu kasvukeskkonnas toimuvatele muutustele. Kultuuri kasvuga kaasneb toitainete kontsentratsiooni alanemine, aeroobsetel bakteritel hapniku defitsiit ning jääkproduktide kogunemine söötmes, mis põhjustavad kasvukiiruse langust. Nii iseloomustab mikroobset kasvu neli kasvufaasi: lag-faas, log-faas ehk eksponentsiaalne, statsionaarne ja suremise faas. Lag-faasis toimub mikroobiraku kohanemine uute keskkonnatingimustega, raku metaboolse aparadi ettevalmistamine kasvuks, ensüümide indutseerimine, vajalike kasvufaktorite ja ribosoomide süntees. Selliste ümberkorralduste käigus hakkab suurenema raku biomass, ilma et toimuks rakkude jagunemist. Lag-faasi pikkus sõltub inokuleeritavate rakkude kasvufaasist ja hulgast, sealhulgas ka elusrakkude hulgast aga ka uue ja vana söötme keemilise koostise erinevusest (Heinaru ja Vedler, 2011). Lag-faasile järgneb kiirendusfaas, mille jooksul kasvukiirus suureneb, kuni jõutakse eksponentsiaalsesse faasi, kus rakud jagunevad aktiivselt ja konstantse intervalli järel. Sellises olukorras on kasvavate rakkude arvust võetud logaritmi graafikuks sirge. Log-faasi optilise tiheduse naturaalllogaritmi kasutataksegi kultuuri kasvukiiruse määramiseks. Kasvukiiruseks on rakkude arvu muutus minutis mõõdetuna optilise tiheduse muutusena minutis (Hall jt., 2013). Eksponentsiaalse kasvu kiirus sõltub keskkonnatingimustest, olles aeglasem toitainetevasel söötmel ja kiirem toitainerikkal (Llorens jt., 2010). Eksponentsiaalse faasi järel hakkab kasvukiirus vähenema ning lõpuks seiskub statsionaarses faasis, kus juurdetulevaid rakke on sama palju kui hävivaid rakke ja elus rakkude arv ajas ei muutu. (Heinaru ja Vedler, 2011). Gramnegatiivsetel bakteritel on statsionaarsesse faasi minek rangelt reguleeritud sigmafaktori RpoS poolt, mille tulemusena hakatakse tootma stressifaktorite suhtes resistentsemaid rakke. Toitainete puudus ja karmid keskkonnatingimused sunnivad rakke jääma statsionaarsesse faasi. Hinnanguliselt 60% Maa biomassist moodustavad puhkavad mikroorganismid. Statsionaarne faas on strateegia raskete olude üleelamiseks. Paljud grampositiivsed bakteriliigid elavad näljaperioodi üle suikunud spooridena. Gramnegatiivsed liigid võivad moodustada resistentseid rakke, mis pole suikeseisundis. Mõlemal juhul taastatakse toitainete kättesaadavusel kasv ning statsionaarsesse faasi minnakse uuesti toiduallika lõppedes (Llorens jt. 2010).

Statsionaarse faasi füsioloogia tundmine on oluline nii meditsiinis kui biotehnoloogias, kuna just selles faasis toodetakse sekundaarseid metaboliite nagu antibiootikumid. Toitainete ammendumisel kuhjuvad bakteriaalse metabolismi tulemusena jääkained ning kultuur läheb surmafaasi. Surmafaasis väheneb elusrakkude arv, 90-99% populatsioonist sureb. Surnud rakud vabastavad keskkonda toitaineid, mida saavad tarbida vähesed ellujääjad. Elujõulisus võib püsida konstantsena kuid või isegi aastaid. Viiendat kasvuperioodi nimetatakse pikaajaliseks statsionaarseks faasiks. Iga faasi kestvus looduslikes tingimustes pole teada, sõltudes bakteriliigist ning ökosüsteemist (Llorens jt., 2010).

1.3.3. Kasvukõver

Ideaalse kasvukõvera korral on elavate rakkude arv väljendatud graafikuna, mis vastab teatud ajapunktidele. Tegelikult arvestatakse populatsiooni loetavaid rakke kindlate ajaintervallide tagant. Populatsiooni suurust väljendavaks ühikuks on tihti kolooniaid moodustavad ühikud (CFU). Rakke, mis on vigastatud või ei suuda mõnel muul põhjusel kolooniat moodustada, ei arvestata. Samas loetakse üheks kaks rakku, mis moodustavad ühe koloonia (Peleg ja Corradini, 2011).



Joonis 1. Tüüpiline bakterikultuuri kasvukõver. Optilise tiheduse naturaallõgaritm *versus* aeg. Punktid, mis langevad sirgele tähistavad eksponentsiaalset kasvufaasi, selle sirge tõus on kasvukiirus ehk k . Lag faas on aeg inkubeerimise algusest punktini, kus eksponentsiaalse kasvu sirge lõikub algse optilise tiheduse väärtusega (Hall jt., 2013).

1.4. Lag faas

1.4.1. Üldisloomustus

Ennustamiseks mikroorganismi kasvu on vaja teada uuritava organismi lag faasi kestvust ja kasvukiirust kindlates tingimustes. Praeguseni on lag faas nendest kahest palju vähem uuritud, kuna kasvukiirust on lihtsam mõõta. Lag faasi pikkus on raskemini korratav, sõltudes lisaks bakteri omadustele ja valitseva keskkonna tingimustele ka kultuuri ajaloost. Väga oluline on mõista ja ennustada lag faasi pikkust ja varieeruvust, eriti ohtlike patogeenide puhul (Stringer jt., 2011).

Lag faas võib aset leida nii kasvu kui ka inaktivatsiooni protsessides. Kasvu tingimustes on lag faas bakteri kohanemise periood. Rakud modifitseerivad ennast vastavalt uuele keskkonnale ning algatavad eksponentsiaalset kasvu (Swinnen jt., 2004).

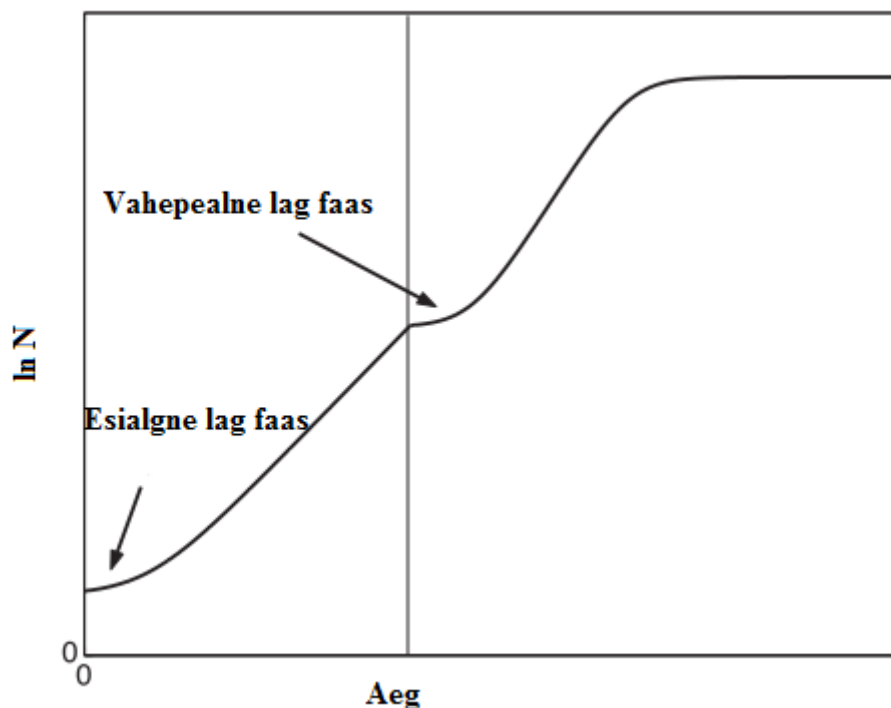
1.4.2. Lag faasi kestvust mõjutavad tegurid

Lag faasi kestvust mõjutavad paljud erinevad faktorid. Olulist rolli mängivad uued keskkonnatingimused, kuid suur efekt on ka kultiveerimise eelsetel kasvutingimustel. Tähtsal kohal on üleminekuaeg vanast keskkonnast uude ja erinevuste ulatus tingimuste vahel. Sarnased keskkonnatingimused, nagu pH ja temperatuur, võimaldavad bakteritel kiiresti kohaneda. Järsud kasvukeskkonna muutused pikendavad lag faasi. Uute tingimustega kohanemine sõltub bakteri kasvufaasist ja füsioloogilisest seisundist. Aktiivselt jagunevad rakud kohanevad kiiremini võrreldes lag faasi või statsionaarse faasi rakkudega. Kuivatatud rakkude lag faas on kõige pikem. Lag faasi kestvus pikeneb väikese inokulumi ja nälja poolt põhjustatud stressi korral. Väikese inokulumi korral võib lag faasi pikenemine olla seletatud individuaalsete rakkude lag faasi suurenenud varieeruvusest. Stress pikendab keskmist lag faasi kestvust ja variatsiooni (Swinnen jt., 2004).

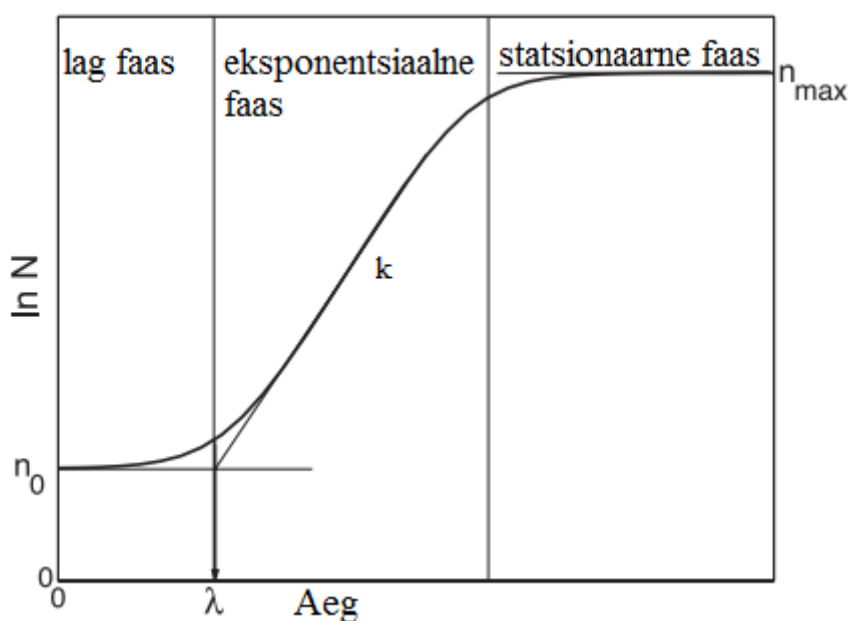
1.4.3. Lag faasi mõõtmine ja modelleerimine

Laboratoorses tingimustes inokuleerimisele järgnevat lühiajalist faasi konstantsetel keskkonnatingimustel nimetatakse esialgseks lag faasiks. Kasvu jooksul võib (järsu) keskkonnamuutuse tulemusena esineda viivitatud kasv või vahepealne lag faas. Vaatamata söötme muutusele ja lahjendusfaktori efektile, on esialgse ja vahepealse lag faasi põhiline mehhanism samasugune, kuna mõlemal juhul kohanevad rakud uute keskkonnatingimustega. Valdav enamus tänapäevasest modelleerimistehnikast suunab tähelepanu populatsiooni esialgsele lag faasile. Inokulatsioon on sel juhul läbi viidud peamiselt statsionaarse faasi

rakkudega optimaalsetes tingimustes. Modelleerimisel arvestatakse uusi keskkonningimusi ja üsna häguselt kirjeldatud rakkude füsioloogilist seisundit lag faasis (Swinnen jt., 2004).



Joonis 2. Mikroobide kasvukõver. Kasvutingimuste, nt temperatuuri, muutus on joonisel kujutatud sirgena. Näidatud esialgne ja vahepealne lag faas (Swinnen jt., 2004).



Joonis 3. Mikroobide kasvukõver konstantsetel temperatuuritingimustel. Kujutatud algne optiline tihedus n_0 , maksimaalne optiline tihedus n_{max} , maksimaalne kasvukiirus k ja lag faasi pikkus λ (Swinnen jt., 2004).

Bakteri populatsiooni kasvu jälgimiseks kasutatakse üldiselt kahte meetodit. Standardseks mõõtmistehnikaks on elusrakkude lugemine kasutades mikroskoopi, kuid see meetod on üsna kallis ja töömahukas. Teiseks variandiks on kultuuri optilise tiheduse mõõtmine. Erinevat meetodikat kasutades saadakse mitte kokkulangevad tulemused, kuna lag faasi jooksul rakk pikeneb, kuid ei jagune. Lag faasi määratlemine sõltub kasutatavast tehnikast, söötmest, organismidest, keskkonnatingimustest ja paljust muust. Individuaalse raku lag faasi mõõtmiseks on tarvis rakud isoleerida. Uurimaks individuaalsete rakkude lag faasi pikkuste varieeruvust on vajalik küllaldane algkogum, seega ei saa kasutada töömahukat rakkude lugemise tehnikat. Ühe raku tasandil on otstarbekam mõõta optilist tihedust mikrotiiter plaadilugejaga või kasutada läbivoolu tsütomeetriat (Swinnen jt., 2004).

1.4.4. Spooride lag faas

Endospor on vastupidev ja mittepeljunev struktuur, mida suudavad moodustada hõimkonda *Firmicutes* kuuluvad enamasti grampositiivsed bakterid ebasoodsate eluolude üleelamiseks (Cano ja Borucki, 1995). Spoori lag faas erineb vegetatiivse raku omast. Samade keskkonnatingimuste korral ei pea bakter kohanema ning kasv võib toimuda ilma lag faasita. Kasvutingimustest sõltumatusena esineb spooridel alati mitmeetapiline lag periood. Esimeseks etapiks on idanemine, mis leiab aset soodsates tingimustes. Idanemise käigus väljutakse suikeseisundist metabolismi kaasabita. Hilisemaid lag faasi staadiume kutsutakse väljakasvuks. Idanenud spoorides aktiveerub metabolism ning käivitub makromolekulide süntees ja kasvamine. Spoori kesta heitmisel ilmneb väljaarenemata rakk. Süntees jätkub täiskasvanud raku molekulide komplekti saavutamiseni. Valminud rakud jätkavad suurenemist jagunemiseni. Iga idanemise ja väljakasvu etapi pikkus varieerub, luues seega totaalse lag faasi pikkuse muutlikkuse. Spooride mõõdukas soojendamine kiirendab lag faasi ning vähendab varieeruvust. Seevastu kõrgemad temperatuurid suurendavad lag faasi pikkuse varieeruvust populatsioonis (Stringer jt., 2011).

Ühe spoori tasemel saab optilise tiheduse kaudu mõõta totaalset lag faasi, kuid mitte individuaalsete etappide pikkust. Erinevate staadiumite kestvuse ja suhete uurimiseks peab kombineerima mitmeid tehnikaid. Lag faasi uurituim etapp on idanemine. Kasutatakse Raman spektrofotomeetrilist lähenemist. Väljakasvu jälgimiseks peab mikroskoopiat kasutades ühte spoori/rakku korduvalt mõõtma pikema aja jooksul (Stringer jt., 2011).

1.5. Kasvutingimuste mõju bakterite füsioloogiale, kasvule ja fenotüübilisele heterogeensusele

1.5.1. LB sööde

LB (lysogeny broth) sööde on bakterioloogide hulgas populaarne, kuna võimaldab paljude bakteriliikide kiiret kasvu ja head tootlikkust. LB söödett tuntakse mitmete nimede all, näiteks kui Luria-Bertani sööde. *E. coli* füsioloogiat uurivad katsed viiakse enamasti läbi eksponentsiaalses kasvufaasis oleva kultuuriga. Hinnanguliselt lõppeb *E. coli* vastav kasvufaas LB söötmes kasvades kui optiline tihedus 600nanomeetri (OD_{600}) juures jääb 0.6 ja 1.0 vahele. Rakud selles optilise tiheduse vahemikus ei ole samas füsioloogilises seisundis. Üllatavalt on analüüsid näidanud, et *E. coli* tasakaaluline kasv lõppeb kui OD_{600} on 0.3. Keskmise raku mass hakkab järsult kahanema, viidates kasvukiiruse vähenemisele ja seega tasakaalulise kasvufaasi lõpule. Järgneb faas, mille jooksul keskmine raku mass ja kasvukiirus kahanevad järk-järgult. Kasv peatub korraks OD_{600} 0.7 juures, mille oletatavaks põhjuseks on mõne hädavajaliku toitaine, ilmselt süsinikuallika, ammendumine. Kasvu peatumise põhjuseks ei ole tõenäoliselt keskkonna mürgistumine ega ka tekkiv aluseline pH. Moodustub kahefaasiline kasvukõver ehk diauksia. Nii esimene järsk kasvukiiruse vähenemine OD_{600} 0.3 juures, kui ka lühiajaline diauksia lag faas on põhjustatud esmase suhkruallika lõppemisest. Oligopeptiididest kataboliseeritavad aminohapped *E. coli* permeaaside ning peptidaaside abil on põhiliseks süsinikuallikaks LB söötmes. Kõrge kataboliseeritavate amonihapete hulk võimaldab ilmselt eksponentsiaalse faasi järgset kasvu (Sezonov jt., 2007).

LB söötme koostis pole konstantne. Variatsioone võib põhjustada söötme vanus, autoklaavimise aeg ja palju muud (Sezonov jt., 2007). Autoklaavimise korral muutuvad söötme keemilised omadused, mis mõjutavad bakterite kasvu. Autoklaavimise keemiline efekt sõltub materjali ruumalast ja autoklaavi tüübist, seetõttu on raske saavutada korduvaid tulemusi. Tulenevad erisused on eriti olulised komplekssoötmete, nagu LB puhul. Korduvate kvantitatiivsete tulemuste saamiseks kasutatakse näiteks filtreeritud söödett (Luidalepp jt., 2011).

Rakkude kasvu taastumise kiirus pärast statsionaarset faasi sõltub söötme omadustest (Jõers jt., 2011). Rakkude kasv on nii statsionaarse faasi kultuuri kasvatamiseks kasutatud söötmetest kui ka uutest kasvutingimustest (Luidalepp jt., 2011). Samast statsionaarse faasi kultuurist eri söötmetesse kasvama pandud kultuuride töötlemisel ampitsilliiniga moodustub erinev persisterite arv. Suikeseisundist väljumise kineetika on seega tugevalt mõjutatud

värskest söötimest. Toiteaineterikkas LB söötmes taastus kasv kiiremini kui toitainetevaeses, seetõttu ollakse viimases antibiootikumide bakteritsiidsele toimele resistentsemad (Jõers jt., 2010).

1.5.2. Inokulumi vanus

Bakterite kasvama hakkamine ja ka persisterite sagedus on tugevalt mõjutatud inokulumi vanusest. *E. coli hipA7* tüvi on klassikaline mutant, mille korral on suurenenud persisterite arvukus. Varajase statsionaarse faasi kultuuri inokulumist moodustav *hipA7* mutandil 1000 korda rohkem persistereid kui metsiktüvel. Hilise statsionaarse faasi kultuuri puhul oli tekkivate persisterite arv ligikaudu võrdne. Mida kauem ollakse statsionaarses faasis, seda pikema aja jooksul taastub kasv. Suurem persisterite arvukus pärast pikka statsionaarset faasi võib peegeldada ootusi katastroofiks järgmises kasvufaasis. Kauga aega statsionaarses faasis olnud rakud võivad olla kaotanud kultiveeritavuse, kuna suikeseisund on bakteritele olnud kurnav (Luidalepp jt., 2011).

1.5.3. Inkubatsioon

E. coli rakkude pikaajalist ellujäämist mõjutab anuma kuju, kus kultuuri inkubeeritakse. Katsed on näidanud, et bakterite kasvutingimused kolbides ja katseklaasides erinevad tugevasti. Surmafaas on kolbides palju laiaulatuslikum kui katseklaasides, seega puutuvad rakud kolbides kokku rohkema stressiga. Samuti mängib rolli söötme kogus: rakud rohkemas söötmes jõuavad surmafaasi hiljem kui rakud vähemas ruumalas söötmes. Põhjuseks võib olla aeglasem leelistumine suurema ruumalaga söötmes. Oksüdatiivse stressi näitajad on suurimad väheses kultuuriga kolbides, kuna õhu-söötme kokkupuutepindala on suurim. Moodustuv transkriptsioonifaktor *oxyR* kaitseb väikesemahulisi kultuure oksüdatiivse stressi poolt põhjustatud kahjustuste eest. Inkubatsioon väheses söötmes toob kaasa madalama mutatsioonisageduse ja mitte-ensümaatilise glükosüleerimise taseme, vastupidised tulemused esinevad inkubatsioonil rohkem söötmes. Erinevused kultuuri ruumalas võivad mõjutada DNA superspiralisatsiooni, mis omakorda põhjustavad mutatsioonilisi ja transkriptsioonilisi muutusi. Lõpptulemusena võib tekkida evolutsiooniline kohastumus. Minimaalsed erinevused kasvutingimustes on seega katsetulemuste analüüsimisel olulisel kohal (Kram ja Finkel, 2014).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie labori varasematest katsetest ilmnes, et *Esherichia coli* tüvi, milles oli deleteeritud 11 toksiini-antitoksiini operoni ($\Delta 11$ tüvi) ja mis sisaldas toksiinide *mazF*, *relE* või *mqsR* ja ka vastavate antitoksiinide ekspressiooni plasmiide, ei hakanud statsionaarse faasi kultuurist minimaalsöötmesse lahjendades üldse kasvama või oli lag faas väga pikk. Samu plasmiide sisaldanud metsiktüüpi ja 10 TA operoni deletsiooniga ($\Delta 10$) tüve puhul taastus kasv normaalselt. Need tulemused andsid põhjuse oletada, et TA süsteemid võivad mõjutada kultuuri kasvama hakkamist statsionaarsest faasist ja lag faasi pikkust.

Praktilise töö eesmärkideks olid:

- Uurida TA süsteemide ja neid kontrollivate geenide mõju kasvukiirustele ja lag faasi pikkustele.
- Selgitada välja katsetingimused, mis oleks kõige optimaalsemad TA süsteemide mõju uurimiseks.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Bakteritüved, söötmed

Kasutatud bakteritüved on esitatud Tabelis 1. *E. coli* metsiktüüpi tüvena kasutati MG1655. Üheksat ülejäänud tüve olid mutantsed TA süsteemide või nende aktiivsust mõjutavate geenide suhtes.

Tabel 1. Kasutatud *Escherichia coli* tüved

Bakteritüvi	Genotüüp	Päritolu
MG1655	<i>F^λ ilvG rfb-50 rph-1</i>	CGSC* (Blattner jt., 1997)
MGJ5987 (Δ10TA)	MG1655 Δ <i>mazF</i> * Δ <i>chpB</i> Δ <i>relBE</i> Δ(<i>dinJ-yafQ</i>) Δ(<i>yefM-yoeB</i>) Δ <i>higBA</i> Δ(<i>prlF-yhaV</i>) Δ <i>yafNO</i> Δ <i>mqsRA</i> Δ <i>hicAB</i>	Kenn Gerdes, (Maisonneuve jt., 2011)
MG1655Δ11TA	Δ <i>mazF</i> * Δ <i>chpB</i> Δ <i>relBE</i> Δ(<i>dinJ-yafQ</i>) Δ(<i>yefM-yoeB</i>) Δ <i>higBA</i> Δ(<i>prlF-yhaV</i>) Δ <i>yafNO</i> Δ <i>mqsRA</i> Δ <i>hicAB</i> Δ <i>hipBA</i>	Toomas Mets
MG1655Δ <i>hipBA</i>	MG1655 Δ <i>hipBA</i>	Toomas Mets
MG1655Δ11- <i>relBEF</i>	MG1655Δ11TA <i>attTn7::relBEF</i>	Ülar Allas
MG1655Δ11- <i>mqsRA</i>	MG1655Δ11TA <i>attTn7::mqsRA</i>	Ülar Allas
MG1655Δ11- <i>hicAB</i>	MG1655Δ11TA <i>attTn7::hicAB</i>	Ülar Allas
MG1655Δ <i>relA</i>	Δ <i>relA</i>	Vallo Varik
MG1655 <i>lon</i>	<i>lon::Tn5</i>	CGSC (Blattner jt., 1997)
MG1655 <i>ppk</i>	<i>ppk::Tn5</i>	CGSC (Blattner jt., 1997)

*CGSC – The Coli Genetic Stock Center, Yale'i Ülikool

Deletsioonid tüvedes MGJ5987, MG1655Δ11TA, MG1655 Δ*hipBA*, MG1655Δ*relA* olid tehtud λ Red rekombinaasi meetodil (Datsenko ja Wanner, 2000). Tüved MG1655*lon* ja MG1655*ppk* olid konstrueeritud kasutades transposooni Tn5 insertioone (Goryshin ja Reznikoff, 1998). Tüvede MG1655Δ11-*relBEF*, MG1655Δ11-*mqsRA* ja MG1655Δ11-*hicAB* konstrueerimiseks olid MG1655Δ11 kromosoomi Tn7 sisenemiskohta viidud vastavad TA operonid koos promootorjärjestusega (McKenzie ja Craig, 2006).

Katsetes kasutati LB söödet mida oli steriliseerimiseks kas mikrofiltrereeritud või autoklaavitud 121°C juures 15 minutit.

2.2.2. DMSO säilituskultuuri valmistamine

DMSO (dimetüülsulfoksiid) säilituskultuuri valmistamiseks külvati tüved LB-agar tassidele ning kasvatati 37°C juures 24 tundi. Bakterid külvati LB söötmesse ja kasvatati 37°C loksutil üleöö (15h). Üleöö kultuuridest tehti järgmine päev 100x lahjendus ning kasvatati kuni OD₆₀₀

~ 0,6. Viimasena lisati rakukultuurile DMSO-d lõppsisalduseni 0,8%, jagati 110µl kaupa tuubidesse ning säilitati -80°C juures.

2.2.3. Kasvukiiruse ja lag faasi mõõtmine

Statsionaarse faasi kultuuri saamiseks inokuleeriti 40µl DMSO säilituskultuuri mikrofiltreeritud või autoklaavitud LB söötmesse ning kasvatati ööpäev loksutil Sanyo Orbital Incubator kiirusel 220rpm ja temperatuuril 37°C. Eksperimendis kasutati kümme tüve, kõigist pandi kasvama 6 paralleelset kultuuri. 24 ja 72 tunni möödudes kanti mikrotiiter plaadile LB söötmesse statsionaarse faasi kultuuride 8000x lahjendus. Lahjenduste tegemiseks kasutati VP Scientific 96 pulgalist replikaatorit mahutavusega 5µl. BioTek Synergy Mx Microplate Reader mikrotiiter plaadilugeja mõõtis 10-12 tunni vältel ajaintervalliga 15 minutit kultuuride optilist tihedust (OD_{600}). Inkubaatori temperatuuriks oli 37°C ning mikrotiiter plaati pidevloksutati keskmisel kiirusel. Saadud andmeid vaadeldi Gen5 tarkvara kasutades.

2.2.4. Statistiline analüüs

Kasvukõverate analüüs viidi läbi programmiga GrowthRates. Statistilise analüüsi jaoks kasutati programmi GraphPad Prism 6. Dunnett'i testi abil võrreldi kõiki mutanttüvesid metsiktüübiga. Dunett'i test on mõeldud mitme andmegrupi võrdlemiseks ühe kontrollgrupiga. Student'i t-testi kasutades võrreldi $\Delta 11$ tüve $\Delta 11-relBEF$, $\Delta 11-mqsR$, $\Delta 11-hicAB$ tüvede suhtes. Student'i t-testi näitab, kas kahe andmegrupi keskmised tulemused erinevad teineteisest oluliselt. Mõlemas testis olid nullhüpooteesi kohaselt võrreldavad tüved ühesugused. Tüved loeti statistiliselt erinevaks kui $P < 0.05$. P tähistab nullhüpooteesi kehtivuse tõenäosust.

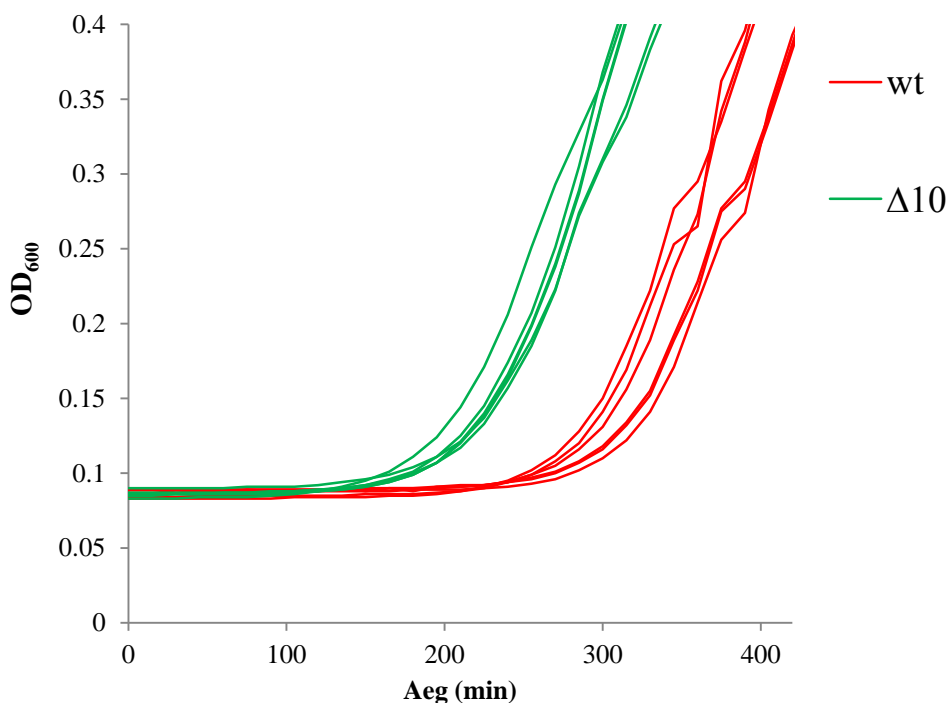
2.3. Tulemused

2.3.1. Katsete ülesehitus ja bakterite kultiveeritavus

Töö eesmärgiks oli uurida TA süsteemide ja neid kontrollivate geenide mõju kasvukiirustele ja lag faasi pikkustele. Selleks kasvatati metsiktüüpi tüvi ja üheksa TA süsteemide või neid reguleerivate geenide suhtes mutantset tüve kas autoklaavitud või mikrofiltreeritud LB söötmes. Eri vanusega inokulum (24 ja 72 tundi) pandi kasvama mikrotiiter plaadile. Mikrotiiter plaadilugeja mõõtis kultuuride optilist tihedust, mille põhjal saadi kasvukõverad. Kasvukõverate baasil leiti kultuuride kasvukiirused ja lag faasi pikkused. Katse viidi

esimesena läbi mikrofiltritud LB söötmes, kuna üksikute bakterite kasvu ja persisterite arvukust jälgides oli meie laboris varasemates töodes leitud, et LB söötme autoklaavimine mõjutab bakterite kasvama hakkamist (Roostalu jt., 2008, Jõers jt., 2010, Luidalepp jt., 2011). Tulemuste statistiliseks võrdlemiseks kasvatati igast tüvest kuus iseseisvat kultuuri s.o. bioloogilist paralleeli. Nii autoklaavitud kui filtreeritud LB söötmes tehtud katset korrati kaks korda. Seega korrati iga katset kokku 12 korda: 6 paralleeli korruga, kahel erineval ajal. Tulemuste põhjal sai vaadelda kultuuridevahelisi erinevusi samal ajal ja eri ajal tehtud katsetes.

Eksperimendi järelduksi on tavaline teha kolme korduskatse põhjal, kuid samas on teada, et kasvukatsed annavad väga erinevaid tulemusi. Seda tõestab ka minu eksperimentaalne töö. Metsiktüüpi tüve ja $\Delta 10$ tüve kuue paralleeli kasvukõverad 24 tunni vanusest inokulumist näitavad selgelt, et $\Delta 10$ tüvi alustab kasvu palju varem kui metsiktüüpi tüvi (Joonis 4). Tulemuste põhjal võiks oletada, et TA süsteemid on bakterite kasvama hakkamisel olulised. Uued katsekordused samadel tingimustel ei andnud aga reprodutseerivad tulemusi (Joonis 5A ja B). Usaldusväärsete tulemuste saamiseks tuleb läbi viia rohkem iseseisvaid katseid.



Joonis 4. Metsiktüüpi tüve (märgitud punasega) ja $\Delta 10$ tüve (märgitud rohelisega) kuue paralleeli kasvukõverad 24 tunni vanusest filtreeritud LB söötmes kasvanud inokulumist (sama katse tulemused joonisel 5A).

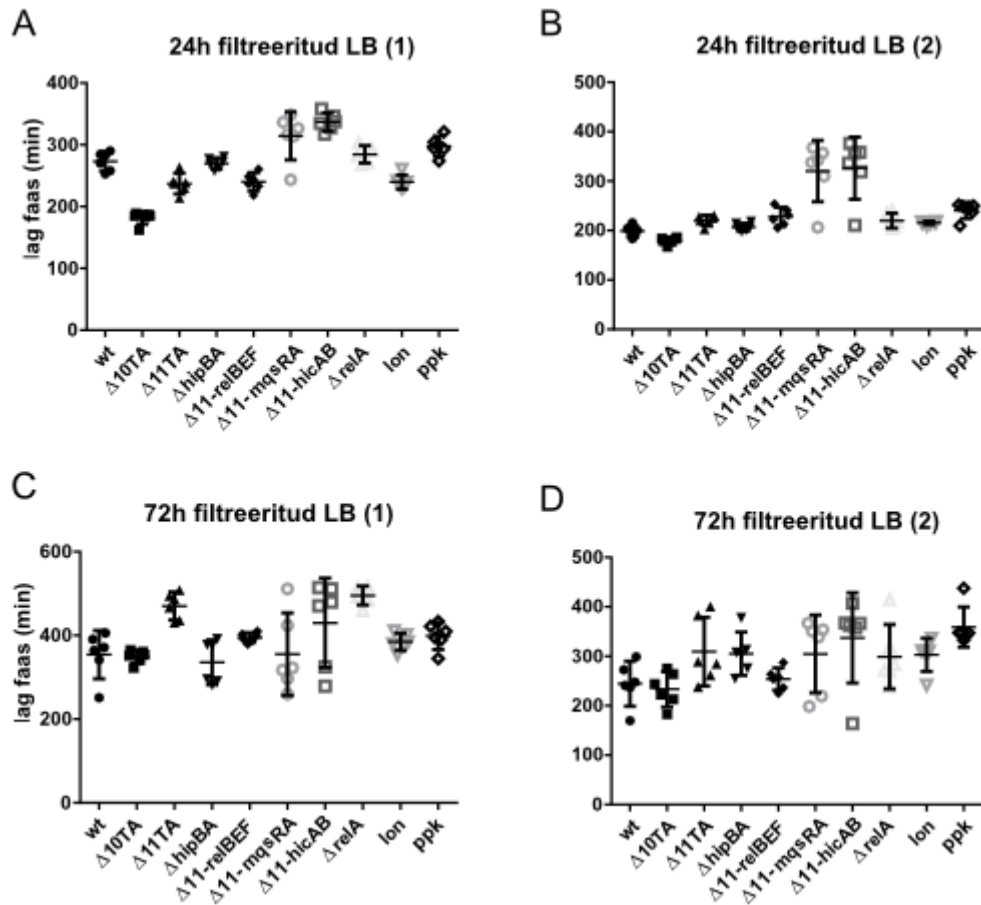
Kõikide tüvede paralleelid läksid alati kasvama, kui inokulum oli 24 tunni vanune. Kui inokulum oli 72 tunni vanune ja üles kasvanud filtreeritud LB-s kasvasid mõlemas korduskatses üles kõikide tüvede kõik koos bioloogilist paralleeli. Bakterite kultiveeritavus hakkas kaduma autoklaavitud LB söötmes 72 tunni vanuste inokulumide kasvama hakkamisel. Osad tüved ei läinud üldse kasvama või alustas kasvu vaid mõni paralleel (Tabel 2). Kahes eri ajal tehtud katses esines teatavaid sarnasusi. Kummalgi juhul ei läinud kasvama $\Delta relA$ ja $\Delta 11$ tüved, ka $\Delta 10$ tüve kasvama hakkamise võib lugeda vähetõenäoliseks. Mõlemal korral alustasid kasvu kõik *lon* tüve paralleelid.

Tabel 2. Kasvuvõimaliste kultuuride arv (kuuest inokuleeritud kultuurist).

Bakteritüvi	72h autoklaavitud LB	
	kordus 1	kordus 2
<i>wt</i>	4	3
$\Delta 10$	0	1
$\Delta 11$	0	0
$\Delta hipBA$	2	4
$\Delta 11-relBEF$	0	3
$\Delta 11-mqsRA$	3	2
$\Delta 11-hicAB$	0	3
$\Delta relA$	0	0
<i>lon</i>	6	6
<i>ppk</i>	4	4

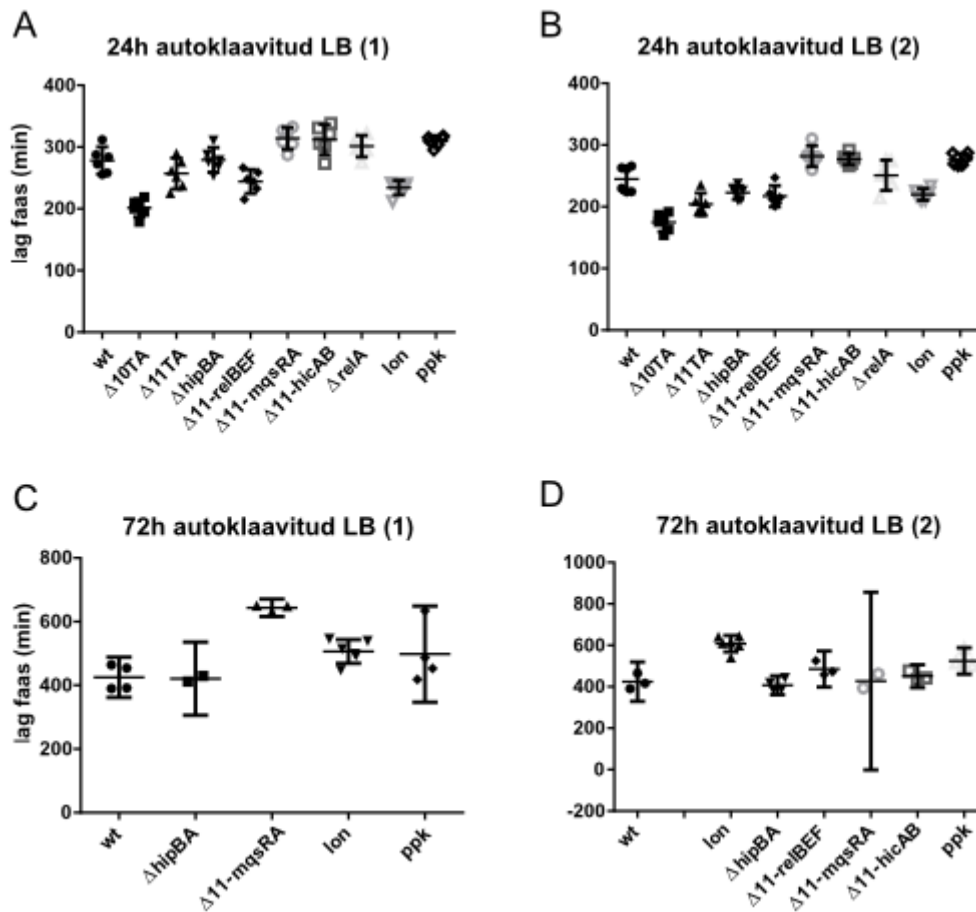
2.3.2. Suur varieeruvus lag faasi pikkuses

Filtreeritud LB söötmes läbi viidud katsed ei andnud lag faasi kestuste kohta korduvaid tulemusi. Juba pealiskaudne pilk algandmetele näitab, et eri ajal tehtud katsed andsid erineva tulemuse (Joonis 5) ja seda kinnitab ka statistiline analüüs (Tabel 3). Mõlemas korduskatses oli lag faas pikem 72 tunni vanuste inokulumide puhul, ka paralleelide vaheline varieeruvus oli neil suurem kui 24 tunni vanuste inokulumide korral (Joonis 5C ja D). 24 tunni vanuste inokulumide puhul oli pikim lag faas $\Delta 11-mqsRA$ ja $\Delta 11-hicAB$ tüvedel (Joonis 5A ja B). Samade tüvede paralleelide lag faasi pikkused varieerusid tugevalt kõiki 12 katse vahel (Joonis 5).



Joonis 5. Bakterite kasvama hakkamine 24 ja 72 tunni vanusest inokulumist filtreeritud LB söötmes. Erinevate sümbolitega on märgitud kuue kultuuri lag faas kahes eri ajal tehtud korduskatses. Veajooned näitavad standardhälvet, horisontaalne joon tähistab kuue korduse keskmist.

Autoklaavitud LB söötmes kasvanud 24 tunni vanuste inokulumide lag faasi pikkused olid mõlemas katsekorduses küllalt sarnased (Joonis 6A ja B, Tabel 4). 72 tunni vanusest inokulumist ei hakanud mitmed tüved kasvama või alustas kasvu vaid mõni bioloogiline paralleel (Tabel 2). Mõlemas katsekorduses kõikides paralleelides kasvama läinud *lon* tüve lag faasi pikkused on eri ajal tehtud katsete vahel sarnased (Joonis 6C ja D). Nendes katsetes, kus bakterid hakkasid kasvama, on ka autoklaavitud söötmes lag faas 72 tunni vanuse inokulumi korral pikem kui 24 tunni vanuse inokulumi puhul (Joonis 6).



Joonis 6. Bakterite kasvama hakkamine 24 ja 72 tunni vanusest inokulumist autoklaavitud LB söötmes. Erinevate sümbolitega on märgitud kuue kultuuri lag faas kahes eri ajal tehtud korduskatses. Veajooned näitavad standardhälvet, horisontaalne joon tähistab kuue korduse keskmist.

Dunnett'i testi abil sai määrati, kas uuritavate mutanttüvede lag faasi pikkused erinevad statistiliselt võrreldes metsiktüübiga. Nullhüpooteesi kohaselt olid kõik tüved ühesugused. Tüved loeti statistiliselt erinevaks, kui P väärtus oli uuritava ja kontrollgrupi vahel väiksem kui 0.05.

Filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuride puhul olid lag faasi pikkused sarnasemad, kui kasv oli kestnud 24 tundi. Mõlemas korduses oli suur statistiline erinevus metsiktüübi tüve ja $\Delta 11-hicAB$ tüve vahel, erinesid ka $\Delta 11-relBEF$ ja $\Delta 11-mqsRA$ tüved. Vanemast inokulumist kasvama läinud kultuuride lag faasid erinesid metsiktüübi tüvest vähem (Tabel 3).

Autoklaavitud LB söötmes kasvanud kultuuride P väärtusi sai võrrelda vaid 24 tunni vanuste inokulumide puhul, kuna pärast 72 tundi ei läinud kõik tüved kasvama (Tabel 4). Esineb statistiline erinevus metsiktüübi tüve ja $\Delta 10$ lag faaside vahel (Tabel 4, Joonis 6A ja B).

Tabel 3. Filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuride lag faasi Dunnett'i testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses.

Bakteritüvi	24h filtreeritud LB		72h filtreeritud LB	
	kordus 1	kordus 2	kordus 1	kordus 2
$\Delta 10$	< 0,0001 (+)	0,8121 (-)	0,9988 (-)	0,9995 (-)
$\Delta 11$	0,0057 (+)	0,7183 (-)	0,0031 (+)	0,2313 (-)
$\Delta hipBA$	0,9995 (-)	0,9975 (-)	0,9936 (-)	0,2967 (-)
$\Delta 11-relBEF$	0,013 (+)	0,3975 (-)	0,7005 (-)	0,9996 (-)
$\Delta 11-mqsRA$	0,0011 (+)	< 0,0001 (+)	> 0,9999 (-)	0,3055 (-)
$\Delta 11-hicAB$	< 0,0001 (+)	< 0,0001 (+)	0,1015 (-)	0,0315 (+)
$\Delta relA$	0,8176 (-)	0,7376 (-)	0,0002 (+)	0,4075 (-)
<i>lon</i>	0,0114 (+)	0,9026 (-)	0,9059 (-)	0,334 (-)
<i>ppk</i>	0,1019 (-)	0,0933 (-)	0,5991 (-)	0,0046 (+)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus metsiktüüpi tüve ja mutanttüve lag faasi pikkuste vahel

„-“ - metsiktüüpi tüve ja mutanttüve lag faasi pikkused statistiliselt ei erine.

Tabel 4. Autoklaavitud LB söötmes kasvanud kultuuride lag faasi Dunnett'i testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses.

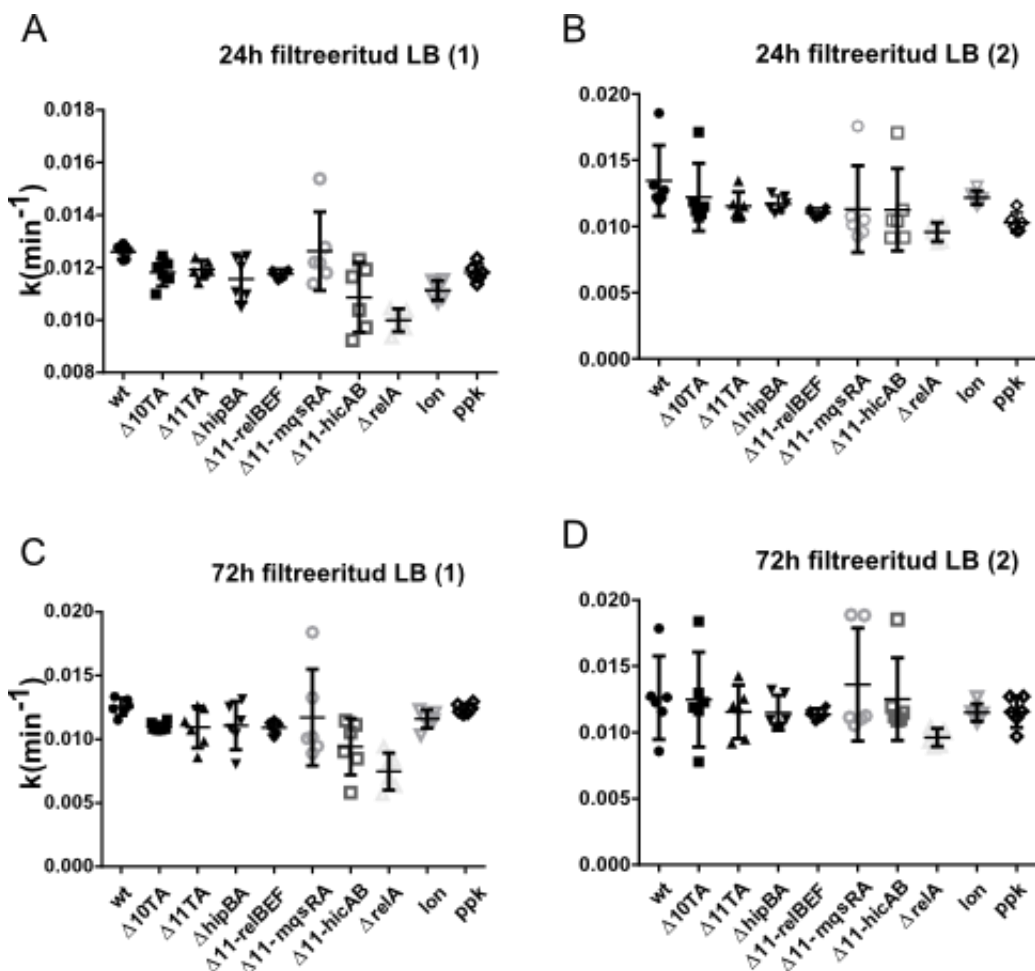
Bakteritüvi	24h autoklaavitud LB	
	kordus 1	kordus 2
$\Delta 10$	< 0,0001 (+)	< 0,0001 (+)
$\Delta 11$	0,3449 (-)	0,0003 (+)
$\Delta hipBA$	> 0,9999 (-)	0,1065 (-)
$\Delta 11-relBEF$	0,0167 (+)	0,0215 (+)
$\Delta 11-mqsRA$	0,01 (+)	0,0001 (+)
$\Delta 11-hicAB$	0,0179 (+)	0,0049(+)
$\Delta relA$	0,2406 (-)	0,9891 (-)
<i>lon</i>	0,0008 (+)	0,0489 (+)
<i>ppk</i>	0,0369 (+)	0,0066 (+)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus metsiktüüpi tüve ja mutanttüve lag faasi pikkuste vahel

„-“ - metsiktüüpi tüve ja mutanttüve lag faasi pikkused statistiliselt ei erine.

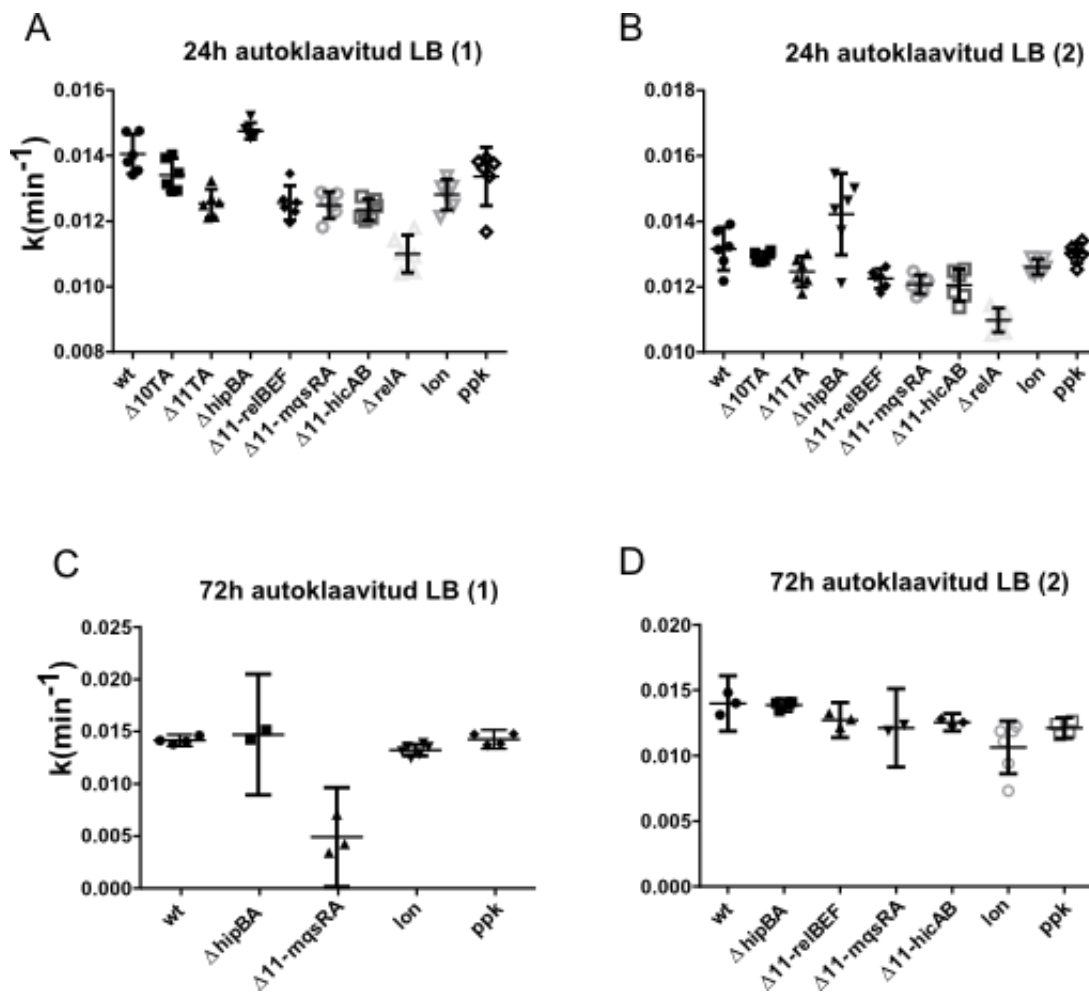
2.3.3. Kasvukiirus

Kasvukiirus mikrofiltreeritud LB korral varieerus paralleelide vahel tugevamalt 72 tunni vanuste inokulumide puhul, kuid varieerusid ka noorema inokulumi kasvukiirused. Tulemused ei olnud eri ajal tehtud katsete vahel korduvad (Joonis 7).



Joonis 7. Bakterite kasvukiirused 24 ja 72 tunni vanusest inokulumist alustatud kultuurides, filtreeritud LB söötmes. Erinevate sümbolitega on märgitud kuue kultuuri kasvukiirus kahes eri ajal tehtud korduskatses. Veajooned näitavad standardhälvet, horisontaalne joon tähistab kuue korduse keskmist.

Autoklaavitud LB söötmes kasvanud kultuuride kasvukiirused olid paralleelide vahel vähem hajusad filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuridega võrreldes (Joonis 7 ja 8). 24 tunni vanuste inokulumide tulemused olid vähesel määral eri ajal tehtud katsete vahel sarnased (Joonis 8A ja B). 72 tunni vanuste inokulumide kasvukiirused varieerusid rohkem ning ei olnud korduvad (Joonis 8C ja D).



Joonis 8. Bakterite kasvukiirused 24 ja 72 tunni vanusest inokulumist alustatud kultuurides, autoklaavitud LB söötmes. Erinevate sümbolitega on märgitud kuue kultuuri kasvukiirus kahes eri ajal tehtud korduskatses. Veajooned näitavad standardhälvet, horisontaalne joon tähistab kuue korduse keskmist.

Mikrofiltrereitud LB söötmes kasvanud kultuuride puhul olid TA süsteemide suhtes mutantsete tüvede kasvukiirused võrreldes metsiktüübi tüvega statistiliselt suhteliselt sarnased (Tabel 5).

Kultuurid, mis kasvasid autoklaavitud LB söötmes, olid oma kasvukiiruste poolest metsiktüvega suhteliselt sarnased (Tabel 6). Mõlemas katsekorduses oli $\Delta 11-reIBEF$, $\Delta 11-mqsRA$ ja $\Delta 11-hicAB$ tüvede kasvukiirus statistiliselt sarnane metsiktüve kasvukiirusega, näidates TA süsteemide mõju kasvukiirusele.

Tabel 5. Filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuride kasvukiiruste Dunnett'i testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses.

Bakteritüvi	24h filtreeritud LB		72h filtreeritud LB	
	kordus 1	kordus 2	kordus 1	kordus 2
$\Delta 10$	0,3316 (-)	0,8107 (-)	0,4722 (-)	0,9999 (-)
$\Delta 11$	0,5007 (-)	0,3709 (-)	0,439 (-)	0,9725 (-)
$\Delta hipBA$	0,102 (-)	0,4663 (-)	0,5337 (-)	0,9615 (-)
$\Delta 11-relBEF$	0,2579 (-)	0,1555 (-)	0,4182 (-)	0,9329 (-)
$\Delta 11-mqsRA$	> 0,9999 (-)	0,2554 (-)	0,9482 (-)	0,9803 (-)
$\Delta 11-hicAB$	0,0011 (+)	0,2327 (-)	0,012 (+)	> 0,9999 (-)
$\Delta relA$	< 0,0001 (+)	0,0046 (+)	< 0,0001 (+)	0,1671 (-)
<i>lon</i>	0,0073 (+)	0,7851 (-)	0,8995 (-)	0,9625 (-)
<i>ppk</i>	0,3206 (-)	0,0302 (+)	0,9997 (-)	0,9733 (-)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus metsiktüüpi tüve ja mutanttüve kasvukiiruste vahel

„-“ - metsiktüüpi tüve ja mutanttüve kasvukiirused statistiliselt ei erine.

Tabel 6. Autoklaavitud LB söötmes kasvanud kultuuride kasvukiiruste Dunnett'i testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses.

Bakteritüvi	24h autoklaavitud LB	
	kordus 1	kordus 2
$\Delta 10$	0,1743 (-)	0,9687 (-)
$\Delta 11$	< 0,0001 (+)	0,1381 (-)
$\Delta hipBA$	0,1162 (-)	0,0065 (+)
$\Delta 11-relBEF$	< 0,0001 (+)	0,0254 (+)
$\Delta 11-mqsRA$	< 0,0001 (+)	0,0049 (+)
$\Delta 11-hicAB$	< 0,0001 (+)	0,0039 (+)
$\Delta relA$	< 0,0001 (+)	< 0,0001 (+)
<i>lon</i>	0,0007 (+)	0,3418 (-)
<i>ppk</i>	0,1297 (-)	0,9994 (-)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus metsiktüüpi tüve ja mutanttüve kasvukiiruste vahel

„-“ - metsiktüüpi tüve ja mutanttüve kasvukiirused statistiliselt ei erine.

2.3.4. Kas TA operonide viimine $\Delta 11$ tüvesse mõjutab kasvu?

$\Delta 11$ tüvest on deleteeritud 11 TA süsteemi kontrollivat geeni. Eksperimentides kasutati kolme mutanttüve ($\Delta 11$ -relBEF, $\Delta 11$ -mqsRA ja $\Delta 11$ -hicAB), mille puhul oli $\Delta 11$ tüve kromosoomi viidud üks TA operon. Student'i t-testiga võrreldi $\Delta 11$ tüve kasvukiirust ja lag faasi kestust $\Delta 11$ -relBEF, $\Delta 11$ -mqsRA ja $\Delta 11$ -hicAB tulemustega. 0 hüpoteesi järgi olid kõik tüved ühesugused. Tüved loeti statistiliselt erinevaks kui $P < 0.05$

24 tunni vanuste inokulumide puhul olid $\Delta 11$ -mqsRA ja $\Delta 11$ -hicAB tüvede lag faasi pikkused $\Delta 11$ tüve lag faasi pikkusest statistiliselt erinevad. Statistiline erinevus esines nii filtreeritud kui autoklaavitud LB söötmes kasvatamisel (Tabel 7 ja 8). 72 tunni vanuste inokulumide puhul saadi eri ajal tehtud katsetes erinevad tulemused (Tabel 7).

Tabel 7. Filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuride lag faasi Student'i t-testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses.

Bakteritüvi	24h filtreeritud LB		72h filtreeritud LB	
	kordus 1	kordus 2	kordus 1	kordus 2
$\Delta 11$ -relBEF	0,7483 (-)	0,3885 (-)	0,0003 (+)	0,0802 (-)
$\Delta 11$ -mqsRA	0,0009 (+)	0,0022 (+)	0,0175 (+)	0,9082 (-)
$\Delta 11$ -hicAB	< 0,0001 (+)	0,0017 (+)	0,375 (-)	0,5459 (-)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve lag faasi pikkuste vahel

„-“ - $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve lag faasi pikkused statistiliselt ei erine.

Tabel 8. Autoklaavitud LB söötmes kasvanud kultuuride lag faasi Student'i t-testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses.

Bakteritüvi	24h autoklaavitud LB	
	kordus 1	kordus 2
$\Delta 11$ -relBEF	0,3229 (-)	0,2153 (-)
$\Delta 11$ -mqsRA	0,0008 (+)	< 0,0001 (+)
$\Delta 11$ -hicAB	0,0024 (+)	< 0,0001 (+)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve lag faasi pikkuste vahel

„-“ - $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve lag faasi pikkused statistiliselt ei erine.

$\Delta 11$ -relBEF, $\Delta 11$ -mqsRA ja $\Delta 11$ -hicAB tüvede kasvukiirused ei erinenud statistiliselt $\Delta 11$ kasvukiirusest kõikide katsetingimuste ja korduste korral (Tabel 9 ja 10).

Tabel 9. Filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuride kasvukiiruste Student'i t-testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses

Bakteritüvi	24h filtreeritud LB		72h filtreeritud LB	
	kordus 1	kordus 2	kordus 1	kordus 2
$\Delta 11$ - <i>relBEF</i>	0,2866 (-)	0,2774 (-)	0,9651 (-)	0,8222 (-)
$\Delta 11$ - <i>mqsRA</i>	0,2732 (-)	0,8671 (-)	0,6446 (-)	0,2873 (-)
$\Delta 11$ - <i>hicAB</i>	0,0761 (-)	0,8291 (-)	0,1815 (-)	0,5188 (-)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve kasvukiiruste vahel

„-“ - $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve kasvukiirused statistiliselt ei erine.

Tabel 10. Autoklaavitud LB söötmes kasvanud kultuuride kasvukiiruste Student'i t-testi P väärtused kahes eri ajal sooritatud katses.

Bakteritüvi	24h autoklaavitud LB	
	kordus 1	kordus 2
$\Delta 11$ - <i>relBEF</i>	0,9466 (-)	0,3491 (-)
$\Delta 11$ - <i>mqsRA</i>	0,8297 (-)	0,1004 (-)
$\Delta 11$ - <i>hicAB</i>	0,3968 (-)	0,1499 (-)

„+“ - statistiliselt oluline erinevus $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve lag kasvukiiruste vahel

„-“ - $\Delta 11$ tüve ja võrreldava tüve kasvukiirused statistiliselt ei erine.

2.4. Arutelu

Antud töös oli vaatluse all TA süsteemide ja neid kontrollivate geenide mõju bakterite kasvule. Selleks mõõdeti TA süsteemide ja neid kontrollivate geenide suhtes mutantsete tüvede kasvama hakkamise kiirust ja võimet, mida iseloomustab lag faasi pikkus. Taheti näha, kas lahjendatud kultuur hakkab kasvama või kaotavad rakud kasvuvõime. Samuti on võimalik, et lag faas on liiga pikk, et seda katse jooksul jälgida. Eesmärgiks oli katsetingimuste leidmine, mis võimaldaks kõige optimaalsemat TA süsteemide mõju uurimist.

Katsetulemuste põhjal ei saa väita, kas TA geenid ja teised geenid mõjutavad *E. coli* kasvama hakkamist ja kasvukiirust. Tulemused ei reprodutseeru eri ajal tehtud katsete vahel.

Tulemuste põhjal tundub, et TA geenide deleteerimine mõjutas rohkem lag faasi. Erinevused lag faaside vahel olid suuremad kui kasvukiiruste vahel (Tabel 3 ja 4 vs Tabel 5 ja 6). Suurim mõju oli 72 tunni vanuse inokulumi lag faasile. Nii mikrofiltreritud kui autoklaavitud LB

söötmes kasvanud kultuuride puhul oli lag faas pikem, kui inokulum oli 72 tundi vana. Samuti ei läinud vanast inokulumist autoklaavitud LB söötmes kõik tüved ega paralleelid kasvama (Tabel 2).

Saadud tulemuste põhjal on tõenäoliselt TA geenide mõju paremini vaadeldav, kui katset korrata 72 tunni vanuse inokulumiga. Vanema inokulumi lag faas pikeneb või kaob rakkude kasvama hakkamise võime. Filtreeritud LB söötmes ei kaota bakterid kasvama hakkamise võimet, seega tuleks katse läbi viia autoklaavitud LB söötmes. Lisaks on filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuride lag faasi pikkused ja kasvukiirused palju hajuvamad võrreldes autoklaavitud LB söötmes kasvanud kultuuridega. Lag faasi pikkused on 24 tunni vanusest inokulumist autoklaavitud LB söötmes kahe katsekorduse vahel peaaegu reprodutseerivad (Joonis 6A ja B).

72 tunni vanuses inokulumis autoklaavitud LB söötmes ei hakanud $\Delta 11$ tüvi üheski paralleelis kasvama. $\Delta 10$ tüvel alustas kasvu vaid üks paralleel. Võib oletada, et TA süsteemid mõjutavad vanast kultuurist kasvama hakkamist, kuid antud tulemused ei anna statistilist usaldusväärset. Katset peab kordama rohkemate korduste ja paralleelidega.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärkideks oli uurida TA süsteemide ja neid kontrollivate geenide mõju *E. coli* kasvama hakkamise võimele ja kiirusele. Lisaks sooviti leida kõige soodsamad katsetingimused TA süsteemide mõju uurimiseks. Selleks mõõdeti metsiktüüpi tüve ja üheksa mutantse tüve optilist tihedust pärast 24 ja 72 tunnist kasvu mikrotiiter plaadilugejas. Kasvukõvera põhjal leiti kultuuride lag faasi kestvus ja kasvukiirus. Katset viidi läbi nii mikrofiltreritud kui autoklaavitud LB söötmes kuues bioloogilises korduses ning korrati kaks korda.

Tulemused ei reprodutseerunud eri ajal tehtud katsete vahel, seega ei saa väita, kas TA geenid ja teised geenid mõjutavad bakterite kasvama hakkamist ja kasvukiirust. Siiski ei läinud 72 tunni vanusest inokulumist autoklaavitud LB söötmes kasvama tüved, millest oli deleteeritud 10 ja 11 TA süsteeme kontrollivat geeni. Tulemused võivad viidata TA süsteemide mõjule kasvama minekule, kuid antud katse ei anna statistiliselt usaldusväärseid tulemusi. Katset tuleks korrata rohkemates kordustes suurema paralleelide arvuga. Üldiselt tundus, et TA süsteemid mõjutasid rohkem lag faasi kestvust kui kasvukiirust.

Tulemuste põhjal on parim TA süsteemide mõju uurida vanema inokulumiga autoklaavitud LB söötmes. Vanemast inokulumist hakkavad bakterid autoklaavitud LB söötmes aeglasemini kasvama, mõne tüve puhul ei toimu kasvama hakkamist üldse. Mikrofiltreritud LB söötmes ei kaota rakud kasvama hakkamise võimet. Lisaks olid filtreeritud LB söötmes kasvanud kultuuride katsetulemused palju rohkem varieeruvad.

The effect of toxin-antitoxin systems and the genes controlling their activity on the growth of *Escherichia coli*

Katlin Rikas

Summary

Operons that encode a toxin and a cognate antitoxin are widely prevalent among bacterial genomes and plasmids. The stable toxin may cause cell growth inhibition or cell death by affecting cellular processes, usually of critical importance. Under growth inducing conditions the antitoxin neutralizes the poisonous effect of the toxin and acts as a repressor for the toxin-antitoxin (TA) operon. These TA pairs have an important role in bacterial stress physiology. TA systems may be accountable for the generation of persisters and multidrug resistance (Maisonneuve et al., 2011, 2013)

Persisters are multidrug tolerant cells. Persisters are not mutants, but rather phenotypic subpopulations of the wild-type (Shah et al., 2006). Their insensitivity to antibiotics is nonheritable. After resuming growth the cells are as sensitive to the drug as the original population (Kussel et al., 2005). Persistence might be a strategy to insure bacterial populations in fluctuating environments (Magnuson, 2007). Multidrug tolerance of biofilms is responsible for many infectious diseases in the developed world. Understanding the mechanisms underlying TA systems and persisters would benefit fighting infectious diseases (Maisonneuve, Gerdes, 2014).

In the experimental part of this work it was tested how TA systems affect the lag phase and growth rate of *Escherichia coli*. The experiments compared a wild-type strain to nine different mutant strains with deletions of multiple TA systems or alterations made to the genes controlling the activity of TA systems. Each of the strains was grown twice in six biological parallels in microfiltered and autoclaved LB broth. On the basis of the optical densities from 24h and 72h old inoculums lag phases and growth rates were evaluated and then compared.

The results were not reproducible, therefore it cannot be alleged that TA encoding genes affect bacterial growth. The reason may lay in the dependence of the gene effect on the experiment conditions. The biggest effect was on the lag time of the culture grown from the 72h old inoculum in autoclaved LB broth. Some of the strains could not resume growth after a long stationary phase or their lag phase increased, including the strains where 10 and 11 TA

encoding genes were deleted. These results may indicate the effect of TA systems on bacterial growth, but they are not statistically reliable.

The results propose optimal conditions for studying the effects of TA systems. Lag phase and growth rate should be measured starting from using older inoculum, since lag phase increases and some of the strains lose the ability to resume growth. Using autoclaved LB broth would be preferable, because the effect of TA encoding genes was best evident under these conditions. Furthermore, the results from the cultures grown in autoclaved LB broth were more comparable between the twelve biological parallels. For reliable results the experiment should be repeated under the optimal conditions several times with more biological parallels.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004 Sep 10;305(5690):1622-5.

Blattner, F. R., Plunkett G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-74

Buddle, P.P., Davis, B.M., Yuan, J., Waldor, M.K. (2007) Characterization of a *higBA* Toxin-Antitoxin Locus in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 189(2): 491-500

Cano, R.J., Borucki, M.K. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268: 1060–1064

Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6640-5.

Dhar, N., McKinney, J.D. (2007). Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Current Opinion in Microbiology* 10: 1-9

Fields, S., Johnston, M., (2005). Cell biology. Whither model organism research? *Science* 307 (5717): 1885–6

Gerdes, K. (2000). Toxin-Antitoxin Modules May Regulate Synthesis of Macromolecules during Nutritional Stress. *J Bacteriol* 182(3): 561-572

Goryshin, I.Y., Reznikoff, W.S. (1998). Tn5 in Vitro Transposition. *J Biol Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7367-74.

Hall, B.G., Acar, H., Nandipati, A., Barlow, M. (2013). Growth Rates Made Easy. *Mol Biol Evol.* 2014 Jan;31(1):232-8

Heinaru, E., Vedler, E. 2011. Praktilisi töid mikroobibioloogiast. (lk 56-58). Tartu: Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut

Jöers, A., Kaldalu, N., Tenson, T. (2010). The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J Bacteriol.* 2010 Jul;192(13):3379-84

Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., Lewis, K. (2004). Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Dec (2004), p 8172-8180

Kram, K. E., Finkel, S. E. (2014). Culture Volume and Vessel Affect Long-Term Survival, Mutation Frequency, and Oxidative Stress of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Mar; 80(5): 1732–1738

Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q., Leibler, S. (2005). Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments. *Genetics* April 1, 2005 vol. 169 no. 4 1807-1814.

Levin-Reisman, I., Fridman, O., Balaban, N. Q. (2014). ScanLag: High-throughput Quantification of Colony Growth and Lag Time. *J. Vis. Exp.* (89).

Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology* 5(1): 48-56.

Llorens, J. M. N., Tormo, A., Martinez-Garcia, E. (2010). Stationary phase in gram - negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34 (2010) 476–495

Luidalepp, H., Jöers, 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.* July 2011, p. 3598-3605

Magnuson, R.D. (2007). Hypothetical Functions of Toxin-Antitoxin Systems. *J Bacteriol.* 2007 Sep; 189(17): 6089–6092.

Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., Gerdes, K. (2013). (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* 154, 1140–1150

Maisonneuve, E., Gerdes, K. (2014). Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell*. 2014 Apr 24;157(3):539-48.

Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jorgensen, M.G., Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32):13206-11

McKenzie, G.J., Craig, N.L. (2006). Fast, easy and efficient: site-specific insertion of transgenes into Enterobacterial chromosomes using Tn7 without need for selection of the insertion event. *BMC Microbiology* 2006, 6:39

Pandey, P., Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host associated prokaryotes. *Nucleic acid research* 33(3), p 966-976

Peleg, M., Corradini, M. G. (2011). Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:10, 917-945

Roostalu, J., Jõers, A., Luidalepp, H., Kaldalu, N., Tenson, T. (2008). Cell division in *Escherichia coli* cultures monitored at single cell resolution. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 68.

Schuster, C.,F., Bertram, R. (2013). Toxin–antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol Lett* 340(2): 73-85

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* December 2007 vol. 189 no. 23 8746-8749

Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A.B., Kaldalu, N., Kurg, K., Lewis, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiology* 2006, 6:53

Shyp, V., Tankov, S., Ermakov, A., Kudrin, P., English, B.P., Ehrenberg, M., Tenson, T., Elf, J., Hauryliuka, V. (2012). Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its produkt. *EMBO Rep.* 2012 Sep; 13(9): 835–839.

Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W. (2011). Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology* 28 (2011) 228e235

Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004) 137 – 159

Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Melderen, V.L. (2007). What Is the Benefit to *Escherichia coli* of Having Multiple Toxin-Antitoxin Systems in Its Genome? *J Bacteriol.* 2007 Sep; 189(17): 6101–6108

Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements* 3(5): e26219

Van Melderen L., Saavedra De Bast M. (2009). Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? PLoS Genet 5(3): e1000437.

Wen, Y., Behiels, E., Devreese, B. (2014). Toxin–Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. Pathogens and Disease (2014), 70, 240–249.

Yamaguchi, Y., Park, J.H., Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. Annu Rev Genet. 2011;45:61-79.

TÄNUAVALDUSED

Töö valmimise eest sooviksin eelkõige tänada oma juhendajat vanemteadur Niilo Kaldalu abi ja moraalse toe eest. Tänan ka Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi antibiootikumide töögrupi liikmeid edasiviivate nõuannete ja abi eest. Suured tänusõnad Ülo Maiväljale tulemuste statistiliste analüüsi seletamise eest.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katlin Rikas

(sünnikuupäev: 28.04.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Toksiini-antitoksiini süsteemide ja neid kontrollivate geenide mõju *Escherichia coli* kasvule“, 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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015