

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
TEHNOLOOGIA INSTITUUT

Markus Lippus

Uropatogeense *Escherichia coli* tüve CFT073 tundlikkus  
vereseerumile

Bakalaureusetöö

Juhendaja teadur Marta Putrinš

TARTU 2014



# Sisukord

Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	5
1. Kirjanduse ülevaade .....	6
1.1. Krooniline ja persistentne infektsioon .....	6
1.2. Uropatogeenne <i>E. coli</i> .....	6
1.2.1. Uroinfektsiooni tekitamine ja mehhanismid .....	7
1.2.2. Sepsise tekitamine ja mehhanismid.....	9
1.2.3. CFT073 tüvi .....	9
1.3. Immuunsüsteem .....	10
1.3.1. Komplementisüsteem .....	11
1.4. Antibiootikumid.....	14
1.4.1. Antibiootikumide tolerantsuse mehhanismid.....	14
2. Eksperimentaalosa .....	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjalid ja meetodika .....	19
2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid .....	19
2.2.2. DMSO säilituskultuuri valmistamine.....	20
2.2.3. Söötmed ja rakkude kasvatamine .....	20
2.2.4. Seerumi eraldamine.....	20
2.2.5. Seerumiga tapmise katse .....	21
2.2.6. Elektroporatsioon ja kompetentsete rakkude valmistamine.....	21
2.2.7. Voolutsütomeetria .....	21
2.3. Tulemused.....	23
2.3.1. CFT073 tüvi seerumile tundlikum kui varasemalt arvatud .....	23
2.3.2. Seerumis jäävad suurema tõenäosusega ellu bakterirakud, mis ei jagune .....	26
2.3.3. Tundlikum rakujagunemise reportersüsteem näitab et seerumis võib ellu jääda ka väike kiiresti-jagunev bakterite subpopulatsioon .....	29
2.4. Arutelu .....	32
Kokkuvõte .....	37
The sensitivity of uropathogenic <i>E. coli</i> strain CFT073 to human blood serum.....	38
Kasutatud kirjandus .....	40
Lihtlitsents .....	46
Tänu sõnad.....	46

## Kasutatud lühendid

CFU – bakterikolooniat moodustavate rakkude arv (*colony forming unit*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid (*dimethyl sulfoxide*)

ExPEC – ekstraintestinaalne patogeenne *E. coli*. (*extraintestinal pathogenic E. coli*)

FACS – voolutsütomeetria (*fluorescence activated cell sorting*)

g – suhteline tsentrifugaaljõud

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

HIS – kuumusega inaktiveeritud seerum (*heat inactivated serum*)

LB – *lysogeny broth*

MHC – peamine koesobivuskompleks (*major histocompatibility complex*)

NLR – *nod like receptor*

NMEC – neonataalset meningiiti põhjustav *E. coli*. (*neonatal meningitis-causing E. coli*)

OD<sub>600</sub> – optiline tihedus 600nm juures (*optical density*)

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

PRR – *pattern recognition receptor*

TLR – *toll like receptor*

UPEC – uropatogeenne *E. coli*. (*uropathogenic E. coli*)

UTI – urotrakti infektsioon (*urinary tract infection*)

## Sissejuhatus

Urotrakti infektsioone (UTI) peetakse kõige levinumateks infektsioonideks maailmas. USA 1997 a. statistika järgi pöördui aastas UTI-ga arsti poole 8 miljonit korda ning selle käigus peeti 100 000 korral vajalikuks patsiendi haiglasse jätmise (Schappert, 1998). Oluline on siinkohal märkida, et tegemist on haigusega, millega ei pöördata alati arsti poole ning mille diagnoos eeldab ka positiivset kultuuriproovi uriinist, seega võib uskuda, et reaalsed numbrid on märkimisväärselt suuremad. Üldiselt on UTI võrdlemisi kahjutu haigus, mis tekitab peamiselt ebamugavusi, kuid see suurendab ägeda neerupõletiku riski, mis piisava ravi puudumisel võib viia sepsise ja isegi surmani (Smith, Hagan, Lane, & Mobley, 2010).

Valdaval enamikul UTI juhtudest on haiguse põhjustajaks uropatogeenne *Escherichia coli* (UPEC) ning suuremal osal juhtudest on haiguse kordumine põhjustatud sama bakteri tüve poolt ehk bakter on suutnud vältida nii antibiootikumide mõju kui ka immuunsüsteemi ning põhjustanud persistentse infektsiooni (Ejrnaes et al., 2006; Skjøt-Rasmussen et al., 2011).

Antibiootikumid mõjuvad enamasti bakteri jaoks eluliselt tähtsaid süsteeme inhibeerides ning seega mõjuvad peamiselt kasvavatele bakteritele. Seetõttu suudavad paljud bakterid elada üle ravi antibiootikumidega minnes soikeseisundisse, kus rakkude paljunemist ei toimu ning metabolism on aeglane (Keren, Shah, Spoering, Kaldalu, & Lewis, 2004; Kim Lewis, 2007). Seega kui esineb haigustekitaja, mis suudab elada üle nii ravi antibiootikumidega kui ka immuunsüsteemi toimet, tekib paratamatult küsimus, kas on ehk võimalik, et mehhanismid, mis võimaldavad seista vastu antibiootikumide toimele võimaldavad vältida ka tapmist immuunsüsteemi poolt?

Komplemendi süsteem on osa inimese immuunsüsteemist ning on oluline nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunkaitses. See koosneb umbes neljakümnest valgust ning on aktiveeritav läbi kolme erineva raja, mille lõpptulemusena mikroorganism kas opsoniseeritakse, mis indutseerib selle fagotsütoosi, või moodustub komplemendi valkudest raku seinaga kompleks, mille toimele bakter lüüsub (Murphy, 2011). Selles töös on otsustatud uurida inimese vereseerumi komplemendi süsteemi mõju uropatogeensele bakterile. Töökäivitati tüvi, mis on võimeline persistentseks infektsiooniks, et uurida sellise tüve planktooniliste rakkude resistentsust seerumile ning teha kindlaks, kas seerumis kasvamisel on võimalik tuvastada alampopulatsioone, mille resistentsus seerumile oleks erinev.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Krooniline ja persistentne infektsioon

Patogeensete bakterite põhjustatud infektsioone on uuritud nüüdseks juba üle saja aasta ja nende vastu võitlemiseks on arendatud välja erinevaid ravimeid ja vaktsiine. Tänapäevaks on aga akuutsete infektsioonide kõrvale oluliseks probleemiks muutunud ka kroonilised infektsioonid, mille puhul varasemalt välja töötatud meetodid ei pruugi enam soovitud tulemust anda. Kroonilisest infektsioonist rääkides on oluline teha vahet kroonilisel infektsioonil ja kroonilisel haigusel. Haiguse määratlemisel lähtutakse sümptomitest ja infektsiooni esinemine ei ole oluline. Kroonilise infektsiooni puhul aga sümptomeid ei pruugi alati esineda ja määravaks tingimuseks on mikroorganismi põhjustatud haiguse esinemine piisavalt väikeste vahedega. Näiteks uroinfektsiooni puhul loetakse infektsiooni krooniliseks kui 12 kuu jooksul esineb muidu tervel naisel kolm või rohkem haigusjuhtu (Albert et al., 2004; Skjøt-Rasmussen et al., 2011). Kui infektsioon esineb rohkem kui ühel korral nimetatakse seda korduvaks infektsiooniks.

Persistentne infektsioon on korduva (või kroonilise) infektsiooni alaliik ja neid eristab omavahel see kas haiguse põhjustaja päritolu on teada. Korduva infektsiooni puhul võib uue infektsiooni põhjustada nii vana kui ka uus haigustekitaja tüvi. Kui tegemist on uue haigustekitajaga siis sel juhul kutsutakse seda reinfektsiooniks. Persistentse infektsiooni puhul on aga uut haigusjuhtu põhjustav haigustekitajaks sama tüvi, mis esialgsel haigusel. Persistentset infektsiooni põhjustav haigustekitaja suudab püsida inimese organismis latentse faasis ilma sümptomitest põhjustamata ning aktiveeruda kui tingimused patogeeni jaoks soodsaiks muutuvad (Ejrnaes et al., 2006; Skjøt-Rasmussen et al., 2011).

## 1.2 Uropatogeenne *E. coli*

*E. coli* on imetaja seedetrakti üks harilikumaid asukaid. Tavaliselt on ta peremesloomaga sümbiootilises suhtes ning aitab hoida homöostaasi ja stabiilset soolestiku mikrofloorat (Yan & Polk, 2004). Sellistel tüvedel üldiselt puuduvad virulentsed omadused, ent *E. coli* hulgas esineb ka patogeenseid tüvesid, mis jaotatakse intestinaalseteks ja ekstraintestinaalseteks (ExPEC) patogeenseteks tüvedeks vastavalt sellele, kus need haigust põhjustavad (Russo & Johnson, 2000).

ExPEC tüvedest on kõige levinumad just uropatogeenne *E. coli* (UPEC) ja neonataalset meningiiti põhjustav *E. coli* (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004; Russo & Johnson, 2000). Kui intestinaalsed *E. coli* tüved põhjustavad väga harva probleeme väljaspool seedekulglat, siis ExPEC tüved on säilitanud võime eluneda soolestikus (kus nad haigust ei põhjusta), ent suudavad tungida ka mujale peremeesorganismi, nagu verre, kesknärvisüsteemi ja kuseteedesse (Wiles, Kulesus, & Mulvey, 2008).

ExPEC tüvedest on inimesel esinevate infektsioonidega enim seotud UPEC tüved, mis põhjustavad kuseteede infektsioone. Kuseteede infektsioone peetakse üheks levinumaks inimese infektsiooniks, sealjuures esineb seda naistel kaks korda suurema tõenäosusega kui meestel. Samuti on oluline märkida, et kuni 25% naistest, kes põevad *E. coli* põhjustatud uroinfektsiooni, kogevad kordusinfektsiooni kuue kuus jooksul alates selle ravist. See on üle kolme korra suurem tõenosus, kui mitte *E. coli* poolt põhjustatud esmase infektsiooni puhul (B. Foxman et al., 2000; Betsy Foxman, 2003; Wiles et al., 2008).

### 1.2.1. Uroinfektsiooni tekitamine ja mehhanismid

Enamik uropatogeene pärineb soolestiku floorast ning pääseb põide kusiti kaudu (M. Mulvey, 2002). Põis on üldiselt steriilne ja kuseteedesse sisenemisel peab patogeen vastu astuma tervele patarele antimikroobsetele toimetele ja ka uriini voolule põie tühjenemisel. Seetõttu on uropatogeeni jaoks esimese sammuna kriitiliselt oluline võime kinnituda uroepiteelile. Selleks otstarbeks on patogeensetel bakteritel arenenud välja erinevad adhesiinid. Adhesiinid on virulentsusfaktorite tüüp, mis kujutab endast molekulaarseid komponente raku pinnal, mis vahendavad seondumist teistele rakkudele või pindadele. UPEC tüvedel esinevad adhesiinidest muuhulgas ka S piilid, P piilid, tüüp 1 piilid ja Dr perekonna adhesiinid (JR R Johnson, 1991).

Tüüp 1 piilidel on aga ka teine oluline roll urotrakti infektsiooni (UTI) tekkimisel. Lisaks bakteri kinnitumisele, vahendab tüüp 1 piili adhesiin FimH ka bakteriraku invasiooni inimese põie epiteeli rakkudesse (Martinez, Mulvey, Schilling, Pinkner, & Hultgren, 2000). Bakterite sisenemine epiteeli rakkudesse vallandab põie epiteeli pealmise kihi rakkude koorumise, mis toimub läbi apoptoosi taolise mehhanismi ning on üpris efektiivne kaitsestrategia (M. a. Mulvey, 1998). Sellele vastu astumiseks on UPEC tüvedel välja arenenud võime paljuneda epiteeli rakkudes sees ning neist väljuda. Väljudes on neil võimalik siseneda külgnevatesse ja alumistesse rakkudesse, tekitades olukorra, kus reinfektsiooni tekitavad rakud ei pruugi pärineda soolestikust või mujalt kuseteedest, vaid paiknevad

püsivalt põie enda epiteeli rakkudes (M. A. Mulvey, Schilling, & Hultgren, 2001). Väike populatsioon rakke filamenteeruvad epiteeli rakkudes ning väljuvad ja kinnituvad taas epiteelile pikkade filamentidena. Usutakse, et see on kaitsemehhanism fagotsütoosi eest (Hunstad & Justice, 2010). Rakus sees moodustavad bakterid biokile laadsed moodustise, mille kriitilised komponendid on polüsahhariidne maatriks ja tüüp 1 piilid, ent on märgatud ka muude välismembraani valkude olulisust organiseeritud struktuuri loomisel (Anderson et al., 2003; Justice et al., 2005; Wright, Seed, & Hultgren, 2007). Selliseid reservuaare tuntakse IBC-dena (*intracellular bacterial community*) ning olles paremini kaitstud immuunsüsteemi eest, võivad põies märkamatusena püsida mitu kuud. Selline vorm pakub kaitset ka antibiootikumide eest ning IBC-d on tihti immuunsed kolme- ja kümnepäevastele antibiootikumi ravikuuridele (M. A. Mulvey et al., 2001). Omadus moodustada IBC-sid, on oluline persistentse infektsiooni tekkimisel.

*E. coli* elutegevuseks on kriitiliselt oluline raua olemasolu ja üks organismi viis infektsiooni vastu võitlemiseks on keskkonnast raua eemaldamine, sidudes seda valkudega ja transportides seda vereplasmast rakusiseseks talletamiseks. Keskkonnast raua omastamiseks kasutavad mikroorganismid siderofoore, mis kujutavad endast väikseid molekule, millel on suur afiinsus raua suhtes (Neilands, 1995). *E. coli* kasutab keskkonnast raua omandamiseks nelja erinevat siderofoori: aerobaktiin, enterobaktiin, yersiniabaktiin ja salmokeliin (Henderson et al., 2009). Neist rauavaeses keskkonnas hakkama saamiseks on kõige olulisemad enterobaktiin ja aerobaktiin (Watts et al., 2012). Sealjuures inimese organismis on tõenäoliselt efektiivsem aerobaktiin, sest selle afiinsus raua suhtes on neutraalse pH puhul suurem kui enterobaktiinil. Samuti seondub enterobaktiin komplemendivalkudele ning võib nii esile kutsuda immuunvastuse (JR R Johnson, 1991). Hilisemates töödes on avastatud ka piilide roll raua omastamises keskkonnast. P piilid on olulised patogeeni kinnitumisel epiteeli rakkudele, ent on leitud, et nende seandumisel käivitub bakteri rakus ka barA geeni transkriptsioon, mille kodeeritud retseptor on kriitiline raua vaegusest põhjustatud vastuse genereerimisel rakus (Zhang & Normak, 1996).

Uropatogeensele *E. colile* on iseloomulik ka polüsahhariidse kapsli olemasolu. Selge on see, et kapsel on oluline bakteri virulentsuses ent täpsed mehhanismid vajavad veel uurimist. Kapslitüüpidest levinuim on K1 kapsel, aga esineb ka teisi K antigeeni tüüpe, näiteks K2, mida ekspresseerib käesolevas töös uuritav tüvi (J R Johnson, 1991). K1 kapsel koosneb omavahel seotud N-atsetüülneuramiinhappejääkidest ja pakub bakterile kaitset faagide ja komplemendi eest ning samuti on oluline IBC moodustamisel (Allen, Roberts, Boulnois, Saunders, & Hart, 1987; Anderson, Goller, Justice, Hultgren, & Seed, 2010; Scholl,

Adhya, & Merril, 2005). K2 kapsel koosneb teihhoiinhape laadsest polümeerist ning selle puhul on demonstreeritud selle rolli *E. coli* kaitses komplemendi süsteemi vastu ja ka eelist, mida see annab urotrakti koloniseerimisel võrreldes tüvega, millel see kapsel puudub (Buckles et al., 2009).

### 1.2.2. Sepsise tekitamine ja mehhanismid

Enamik UTI-dest põhjustavad probleeme põies ja madalamas urotraktis, aga mõnedel juhtudel on võimalik, et infektsioon liigub põiest edasi neerudeni. On selge, et UTI põhjustavad bakterid pärinevad soolestikust ning liiguvad kuseteede kaudu põide, aga mehhanism, kuidas infektsioon neerudeni jõuab ja millised virulentsusfaktorid selles rolli mängivad ei ole lõpuni selged. Kindel on, et motiilsuse ja kemotaksise langus vähendab oluliselt mikroorganismi virulentsust ning takistab hiirte puhul tungimist neerudeni (Haugen et al., 2007; Lane et al., 2005; Schwan, 2008). Samuti on ka demonstreeritud, et neerupõletiku tekkimiseks on vajalik uriini äravoolu takistus (D. E. Johnson, Russell, Lockett, Zulty, & Warren, 1993). Neerudes kinnitub *E. coli* P-fimbriate abil neeru epiteelile ning eritab hemolüsiini ja Sat-d (*secreted autotransporter toxin*), mis vigastab proksimaalseid tuubuleid ning võimaldab bakteril tungida käbi epiteeli ning pääseda vereringesse, põhjustades nii baktereemiat (Donnenberg, 2002). Kliiniliste uuringute kohaselt on umbes 15% UTI-dest avastamise ajaks baktereemilised (Bahagon, Raveh, Schlesinger, Rudensky, & Yinnon, 2007). Katsed hiirtega on näidanud, et verre sattudes on *E. coli* võimeline süsteemseks levikuks ning pärast inokulatsiooni verre on seda suurtes kogustes leitud neerudes, pimesooles, niudesooles, kopsudes, südames, ajus ning eriti suurel määral põrnas ja maksas. Samuti on näidatud, et UPEC on kudede koloniseerimisel palju edukam ja püsivam kui mittepatogeenne *E. coli*, mis tuleneb mõnedest samadest virulentsusfaktoritest, nagu polüsahhariidne kapsel, P- ja tüüp 1 piilid, raua omastamise süsteemid ja siaalhape metabolism, mis aitavad UPECil koloniseerida urotrakti (Smith et al., 2010). Selline süsteemne kolonisatsioon võib viia süsteemse põletikulise reaktsioonini ehk sepsiseni inimese organismis (Bone, 1992).

### 1.2.3. CFT073 tüvi

Selles töös on mudelorganismiks UPEC tüvi CFT073, mis on laborites laialt kasutatav kui virulentne uropatogeen. See tüvi on eraldatud akuutse neerupõletikuga patsiendi verest ja uriinist, mis demonstreerib, et CFT073 on võimeline tekitama nii bakteriuriat kui ka baktereemiat (Moblely et al., 1990). CFT073 serotüüp on O6:K2:H1, tähistades võimet

moodustada K2 kapslit, mis on tähtis eeldus IBC moodustamiseks ning samuti kaitseb bakterit immuunsüsteemi eest. Seda tüve iseloomustab suur hulk geene, mis kodeerivad piili adhesiini, raua omandamise süsteeme, ja autotransportereid. Samuti ekspresseerib CFT073 hemolüsiini ning on võimeline hävitama inimese neeru proksimaalsete tuubulite epiteeli, mis on vajalik vereringesse tungimiseks (Mobley et al., 1990; Welch et al., 2002).

### 1.3. Immuunsüsteem

Immuunsüsteemi ülesanne on kaitsta organismi patogeenide eest. Inimese immuunsüsteem jagatakse laias laastus kaheks osaks: kaasasündinud- ja adaptiivseks immuunsüsteemiks ning kummagi puudumisel organism kõrvalise abita ellu jääda ei suuda (Murphy, 2011).

Immuunsüsteem tunneb patogeene ära antigeenide järgi, mis kujutavad endast organismile võõraid valke, süsivesinike komplekse või lipiide. Antigeeni sattumine kehasse kutsub esile spetsiifilise immuunvastuse, mis viib ideaalis patogeeni tõrjumiseni organismist (Murphy, 2011)

Adaptiivne immuunsüsteem on võimas relv patogeenide vastu, ent see on väga spetsiifiline ning selle aktiveerimiseks ja vastuse formuleerimiseks kulub aega. Seni on patogeeni tõrjumine kaasasündinud immuunsüsteemi ülesanne. Selle süsteemi peamised efektorid on makrofaagid, NK-rakud, fagotsüüdid, neutrofiilid, basofiilid, eosinofiilid, nuumrakud ja komplementsüsteem, millest on edaspidi rohkem juttu. Kaasasündinud immuunvastuse kutsuvad esile PRR (*pattern recognition receptors*) retseptorid nagu TLR (*toll-like receptors*) ja NLR (*nod like receptors*) mis tunnevad ära konserveerunud järjestusi bakteri ehituses. Need retseptorid asuvad igas koes asetsevates makrofaagides, granulotsüütides ja dendriitrakkudes ning tundes ära mingi patogeeni kuuluva järjestuse kutsuvad rakkudes esile erinevaid muutusi, viies patogeeni fagotsütoosini, põletiku tekkeni ning makrofaagide ja neutrofiilide infektsioonipaika toomiseni. Kaasasündinud immuunsüsteemi eelis on, et see käivitub kohe patogeeni kokkupuutel, ent samas ei ole see spetsiifiline haigustekitajale ning samuti ei ole sellel immunoloogilist mälu, mis aitaks korduval kokkupuutel sama haigustekitajaga pakkuda efektiivsemat kaitset (Murphy, 2011).

Kaasasündinud immuunsüsteemi üks funktsioone on aga ka adaptiivse immuunsüsteemi aktiveerimine. Enamik immunogeene vajab nimelt töötlemist enne kui muutub immuunsüsteemile äratuntavaks. Selleks on vaja neid eelnevalt töödelda rakkudes, mis on selleks võimelised. Peamiselt on nendeks dendriitrakud, makrofaagid, mõned B-rakud

ja langerhansi rakud. Sellised rakud lagundavad bakteri väikesteks tükkideks, mis sisaldavad endas nii immuunrakkudele äratuntavat epitoopi kui ka ala, mis seondub MHC tüüp II (*Major histocompatibility complex*) molekulidele. Epitoobiga seotud MHC II molekulid viiakse raku pinnale ning nende abil toimub epitoobi esitamine T-helper rakkudele. T-helper rakud võivad seejärel kas diferentseeruda mälorakkudeks või efektorrakkudeks. B-rakud suudavad ise seonduda keskkonnas leiduvate antigeenidega, neid raku sisse transportida, lagundada ja epitoopi raku pinnal MHC II külge seotult eksponeerida. Aktiveeritud T-abistajarakud aitavad sama patogeeni kokku puutunud B-rakke aktiveerida, mis võivad siis samuti diferentseeruda efektor- või mälorakkudeks. Efektorrakud toodavad suurtes kogustes antikehi, mis aitavad takistada patogeene, kuni makrofaagid või komplementsüsteem need organismist kõrvaldab. Mõned immunogeensed on võimelised aktiveerima B-rakke ka ilma T-rakkude abita. See protsess on kokkuvõttes küll märksa kiirem, ent toodetud antikehade spetsiifilisus ja variatsioon on väiksem. (Murphy, 2011; Ryan & Ray, 2004).

Omaette probleemi esitavad immuunsüsteemile aga rakusisesed patogeensed, kes, olles võimelised peremeesorganismi rakkudes elutsema, on veres ringlevatele antikehadele ja komplementdivalkudele kättesaamatud. See teeb nendest vabanemise organismile märkimisväärselt raskemaks ning võimaldab tekkida persistentsetel nakkustel (Anderson et al., 2003).

### 1.3.1. Komplementisüsteem

Komplementsüsteemi avastas juba 1896. aastal Jules Bordet, kes näitas, et inimese vereseerum on jaotatav kaheks osaks. Kuumutades seerumit kaotas üks osa oma bakteritsiidse efekti, teisel aga jäi see alles. Kuumuse suhtes stabiilsele osale oli spetsiifiline võime tappa kindlaid mikroorganisme, kuumusetundlik oli aga mittespetsiifilise mõjuga. Ta uskus, et see mittespetsiifiline osa toetab kuumuse suhtes stabiilset osa ehk antikehade efekti ja sellest ka nimi (ingl. k. *to complement* – täiendama) (Murphy, 2011; Walport, 2001).

Komplementsüsteem koosneb rohkem kui kolmekümnest erinevast valgust, mis reageerivad üksteisega kutsudes esile erinevaid füsioloogilisi protsesse, aidates nii patogeene tõrjuda. Algselt usuti, et see on lihtsalt osa kaasasündinud immuunkaitsest ja komplementil on tõesti suur roll kiire ja efektiivses kaitses patogeeni vastu. Hilisemate uuringute käigus on aga selgeks saanud selle olulisus ka adaptiivses immuunkaitsest ning seotus T- ja B-lümfotsüütidega ning seda vaadeldakse üldiselt kui silda adaptiivse ja kaasasündinud

immuunkaitse vahel (Dunkelberger & Song, 2010). Samuti on avastatud komplemendi seotus koe regeneratsiooniga ja kasvajate induktsiooniga (Markiewski et al., 2008; Murphy, 2011).

Komplementsüsteemi aktivatsioon põhineb seda moodustavatel valkude omavahelistel interaktsioonidel. Selle vahendamiseks on kolm peamist rada, mis igati on indutseeritud erinevalt ning mis käivitavad erinevaid kaskaade, kuid mis viivad lõpuks samasuguste efektormolekulide tekkeni. Need rajad on: klassikaline rada, lektiini rada ja alternatiivne rada (Joonis 1) (Murphy, 2011).

### **Klassikaline rada**

Klassikaline rada on seotud nii kaasasündinud kui ka adaptiivse immuunkaitsega. See põhineb komplemendi koosseisu kuuluva C1 kompleksi ühe osa, C1q seondumisega kas juba patogeeni seondunud antikehade Fc (Fc – antikeha raskete ahelate konstantsetest domeenidest koosnev osa, mis seondub immuunrakkude Fc retseptorite ja komplemendiga) osale või otse patogeeni pinnale. Selle tagajärjel aktiveeruvad C1 kompleksi kuuluvad C1s ja C1r valgud. C1s lagundab C4 ja C2, moodustades C3 konvertaasi – C4b2a, mis omakorda lagundab C3 tekitades C3a ja C3b.

### **Lektiini rada**

Lektiini raja aktivatsioon põhineb patogeensete bakterite äratundmisel nende rakuseina kuuluvate iseloomulike molekulaarsete struktuuride järgi. Üldiselt on mikroorganismide pinnal struktuure, mida inimeses ei esine, nagu näiteks lipoteihhoiin happed gram-positiivsetes bakterites, ning need võimaldavad vahet teha inimesele omaste ja mitteomaste rakkude vahel (Murphy, 2011; Sarma & Ward, 2011).

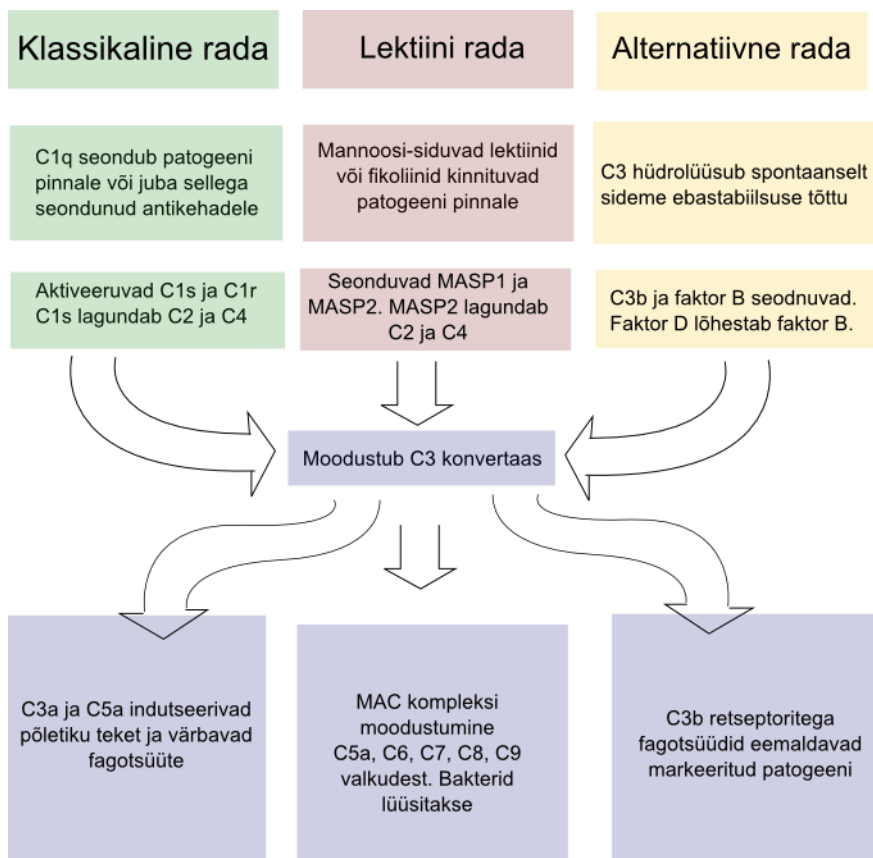
Rada algab mannoosi-siduvate lektiinide (MBL – *mannose-binding lectine*) või fikoliinide seondumisega spetsiifilistele suhkrupolümeeridele patogeeni pinnal, mis omakorda seovad enda külge MASP1 (mannoosi siduv lektiinseotud seriinproteas) ja MASP2 molekule, mis on proteaasi eelkäijad. MBL-iga seondudes MASP1 ja MASP2 aktiveeruvad, ning MASP2 lagundab C2 ja C4 andes vastavalt C2a, C2b, C4a ja C4b. C2a ja C4b annavad kombineerudes C3 konvertaasi C4b2a (Murphy, 2011; Sarma & Ward, 2011).

### **Alternatiivne rada**

Alternatiivse raja eriline omadus tuleb sellest, et see ei ole otseselt aktiveeritud mingi patogeeni tunnuse poolt, vaid põhineb C3 iseeneslikul hüdrolyüsil, mis toimub pidevalt tänu C3 tioestersideme ebastabiilsusele veekeskkonnas, kuid väga väiksel tasemel. Tekkiv C3b seondub faktor B külge, mille omakorda lõhestab faktor D, jättes alles moodustunud

kompleksi C3bBb, mis on alternatiivse raja tulemusel tekkinud C3 konverteas (Murphy, 2011; Sarma & Ward, 2011). Selle raja piiramatut eneseaktiveerimist takistab asjaolu, et vaba C3b inaktiveeritakse kiirelt faktorite H ja I poolt ja C3bBb on ebastabiilne kompleks ning laguneb ruttu pärast moodustumist. Patogeeni pinnale seondunud C3b on aga nende faktorite poolt kaitstud. Samuti stabiliseerib nii C3b-d kui ka tekkinud kompleksi C3bBb properdiin, mida eritavad aktiveeritud neutrofiilid (Kemper, Atkinson, & Hourcade, 2010; Murphy, 2011; Sarma & Ward, 2011).

Klassikaline, lektiini ja alternatiivne rada on aktiveeritud erineval viisil, ent viivad kõik lõpuks C3 konverteasi tekkeni ja C3 lagundamiseni C3a-ks ja C3b-ks. C3a, koos C5a-ga kutsub infektsioonisaidile fagotsüüte ja indutseerib põletikku. C3b aitab kaasa nii komplemendi aktiveerimisele kui ka seondub C4-ga, moodustades C5 konverteasi, mis lagundab C5 valgu, moodustades C5a ja C5b. Membraaniründekompleks (MAC – *membrane attack complex*) moodustubki C6, C7, C5b, C8 ja C9 valkudest. MAC lülitub patogeense raku membraani, moodustab poori ja rakk lüüsub (Janeway et al., n.d.; Sarma & Ward, 2011). MAC moodustub küll vaid gramm-negatiivsete rakkude membraani. Gram – positiivsed on komplemendi poolt lüüsimise eest kaitstud paksu peptidoglükaan kihiga (Laarman, Milder, van Strijp, & Rooijackers, 2010).



**Joonis 1. Komplemendi süsteemi skeem.**

## 1.4. Antibiootikumid

Antibiootikumid on tööstuslikult toodetud või mikroorganismi poolt sünteesitud ained, mis väikses koguses suudavad tappa või pidurdada mikroorganismi kasvu, omades väikest kahjulikku mõju peremeesorganismile. Neid jaotatakse nii bioloogilise aktiivsuse, antimikroobse spektri, toimemehhanismi kui keemilise struktuuri järgi (Mikelsaar & Türi, 1998).

Bioloogilise aktiivsuse alusel jaotuvad antibiootikumid bakteritsiidseteks ja bakteriostaatilisteks. Bakteriotsiidne antibiootikum tapab baktereid, bakteriostaatiline pidurdab nende paljunemist, ilma et peaks seejuures neile muud kahju tegema (Mikelsaar & Türi, 1998).

Antimikroobse spektri alusel jaotatakse antibiootikumid laia- ja kitsaspektrilisteks. Laiaspektrilised, erinevalt kitsaspektrilistest antibiootikumidest, omavad efekti nii gram negatiivsete kui ka positiivsete mikroobide suhtes. Laiaspektrilised antibiootikumid on kasulikud kui haigust tekitav organism ei ole tuvastatud, haigust põhjustab mitu mikroorganismi, kui bakter on kitsaspektrilistele antibiootikumidele resistentne või profülaktikana pärast operatsiooni, aga samas kannavad ka suuremat riski tervisele, sest hävitavad valimatult ka patsiendi mikrofloorat (Mikelsaar & Türi, 1998; Scott, 1989).

Toimemehhanismi alusel jaotatakse antibiootikumid viide gruppi (Scott, 1989):

1. Võistlevad antagonistid – nt. sulfonamiidid
2. Rakuseina sünteesi inhibiitorid – nt.  $\beta$ -laktaamid
3. Rakumembraani läbilaskvuse modifikaatorid – nt. amfoteritsiin B
4. Valgusünteesi inhibiitorid – nt. tetratsükliinid
5. Nukleiinhappe sünteesi inhibiitorid – nt. atsükloviir

Suurem osa antibiootikume mõjuvad kasvavale bakterirakule, omades efekti rakukesta või valkude sünteesile. Seega persistentsele rakule, kelle kasv ja metabolism on tugevalt aeglustunud, ei oma need tähelepanuväärset mõju (Herbert et al., 1996; Paramasivan, Sulochana, Kubendiran, Venkatesan, & Mitchison, 2005).

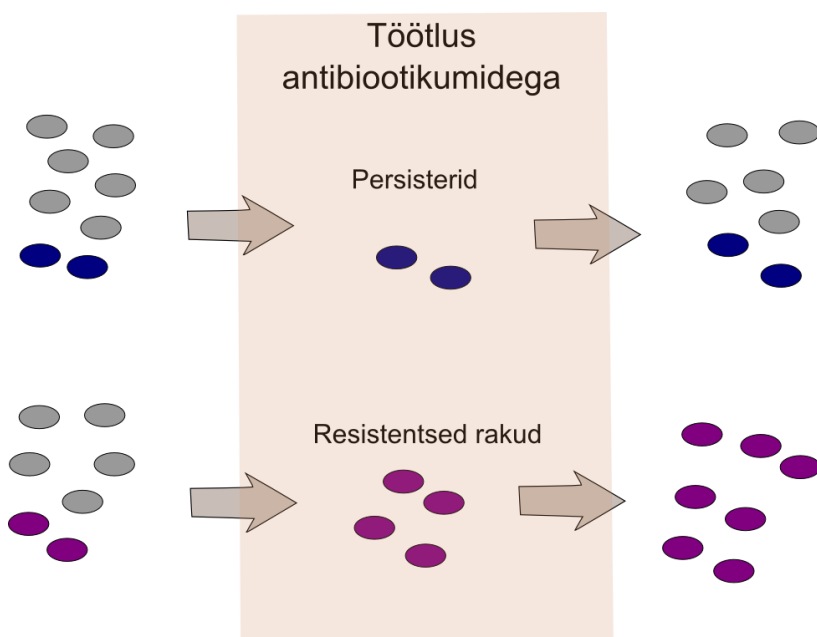
### 1.4.1. Antibiootikumide tolerantsuse mehhanismid

Mikroobide tolerantsust antibiootikumide suhtes on seletatud läbi mitmete erinevate mehhanismide. Persistentsus, ühtlasi tuntud ka kui multitolerantsus või fenotüübiline tolerantsus, on mikroorganismi võime elada üle bakteritsiidsete ainete (antibiootikumide) mõju. Siinkohal on oluline teha vahet resistentsusel ja persistentssusel (joonis 2). Resistentsus

tekib bakteritel mutatsioonide või horisontaalse geeniülekanne tulemusel, seega mehhanismid, mis neid bakteritsiidsete toimeainete juuresolekul elus hoiavad, on geneetiliselt määratud ning kanduvad üle nii järglastele kui ka on võimelised horisontaalsel geeniülekanandel levima.

Persisterrakud aga ei ole üldisest populatsioonist geneetiliselt erinevad, vaid moodustavad fenotüübiliselt erineva subpopulatsiooni geneetiliselt sarnases bakterikultuuris. Persistentensus on mööduv ja mittepäranduv fenotüüp ning ilmneb iseeneslikult (Balaban, Merrin, Chait, Kowalik, & Leibler, 2004; Bigger, 1944; Kim Lewis, 2007). *Escherichia coli* puhul eristab multitolerantseid baktereid multiresistentsetest ka asjaolu, et kui resistentsed bakterid on võimelised bakteritsiidse toimeaine juuresolekul kasvama, kui muud olud seda võimaldavad, siis multitolerantsus piirdub aga bakterite elus püsimisega (Kim Lewis, 2007).

Esimene kirjeldus persistentensusest pärineb J. W. Biggerilt, kes avastas, et mitte kõik stafülokoki rakud ei sure töötlemisel penitsilliiniga ning ellu jääv populatsioon on võimeline uuesti paljunema ning populatsiooni taastama, kui antibiootikum on keskkonnast kõrvaldatud (Bigger, 1944). Nähtuse uurimisel katseid läbi viies avastas ta, et tegemist ei ole mutatsioonist tuleneva resistentsusega, sest ellu jäänud rakkude järglased olid antibiootikumi suhtes taas sama tundlikud kui algne populatsioon. Hilisemalt on persisterite uurimise käigus selgeks saanud, et selline heterogeensus ei teki bakterikultuuris mitte kokkupuutel bakteritsiidse faktoriga, vaid vastav subpopulatsioon on kujunenud juba varem iseenesliku fenotüübilise ümberlülituse kaudu. Selle käigus võivad aeglasemalt poolduvad persisterrakud hakata loomuliku kiirusega jagunema ning samas hariliku fenotüübiga rakud võivad laskuda soikeseisundisse (Balaban et al., 2004).



Joonis 2. Resistentsuse ja persistentensus erinevus

Sinisega on markeeritud persisterrakud populatsioonis. Antibiootikumidega töötlemisel surevad kõik rakud peale persisterite, kes elavad üle antibiootikumide mõju ning seejärel hakkavad paljunema, taastades algsele fenotüübiliselt sarnase, antibiootikumidele tundliku populatsiooni. Lillaga on markeeritud resistentsed rakud. Antibiootikumidega töötlemisel surevad kõik rakud peale resistentsete ning need võivad paljuneda ka juba antibiootikumide juuresolekul, tekitades bakteripopulatsiooni, mille kõik rakud on antibiootikumile resistentsed.

Kasutades *E. coli* hipA7 ja hipQ mutante on suudetud eristada tüüp I ja tüüp II persistentsus kasvukiiruse alusel. Tüüp I persistentsus kirjeldab persisterid kui statsionaarses faasis rakusiseste ja keskkonnas esinevate stressorite mõjul tekkivat subpopulatsiooni, mille kasvukiirus on võrdne nulliga. Sellised persisterid hakkavad soodsate tingimuste puhul uuesti kasvama, ent neile on omane väga pikk lag faas (rakkude kasvama hakkamisele eelnev periood), mis kaitseb neid antibiootikumide, nagu penitsilliin, eest, mis on efektiivsed kasvavate rakkude vastu (Balaban et al., 2004). Tüüp II persistentsus kirjeldab persisterid, kelle tekkeks ei ole vajalik stressorite olemasolu keskkonnas. Selliste persisterite tekkimiseks ei ole vajalik statsionaarne faas ja nende hulk sõltub üldisest rakkude hulgast (Balaban et al., 2004). Selline jaotus on hea persisterite iseloomustamiseks, ent reaalsuses on persisterid oluliselt heterogeensemad. Mehhanismid sellise persistentsuse taga on suuresti teadmata, kuid usutakse, et see on tingitud toksiin-antitoksiin süsteemidest (Gerdes & Maisonneuve, 2012; Kim Lewis, 2010; Wang & Wood, 2011). Sellistel süsteemidel, kus bakteris toodetakse nii toksiini kui antitoksiini on kindel tasakaal. Kui toksiini tase selle tasakaalu ületab, läheb bakter soikeseisundisse ning see, kui kaua bakter soikeseisundis on, sõltub toksiini ülekaalust organismis (Rotem et al., 2010).

Sellist ravimitolerantsust, mis on tingitud mikroobi aeglasest või olematust kasvukiirusest, ei esine küll mitte ainult penitsilliini, vaid kõikide suuremate antibiootikumide klasside puhul, sest enamik neist mõjutavad kasvavaid rakke (Herbert et al., 1996; McDermott, 1958; Paramasivan et al., 2005).

Tolerantsuse üks põhjusi on kindlasti ka see, et paljud bakterid ei praktiseeri alati planktoonilist eluviisi. Mikroorganismide seas levinud ja meditsiiniliselt väga oluline virulentsusfaktor on biokilede moodustamine. Biokile kujutab endast rakupopulatsiooni, mis on kinnitunud bioloogilisele või mittebioloogilisele pinnale ning on ümbritsetud maatriksiga (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). Selline eluviis pakub kaitset antibiootikumide eest mitmel põhjusel.

Biokiled moodustavad bakterite ja väliskeskkonna vahele barjääri, mis takistab molekulide jõudmist bakteriteni ning kaitsevad neid seetõttu nii antibiootikumide, vesinikperoksiidi kui ka komplemendi süsteemi eest (Hall-Stoodley et al., 2004). Selline difusiooni aeglustumine võib ka anda sünergistilist efekti bakterite puhul, kelle kaitsemehhanismid antud antibiootikumi suhtes on ebapiisavad, ent tulevad toime kontsentratsiooniga, mis jõuab nendeni läbi biokile. Samuti on biokiledes paiknevate populatsioonide kasvukiirus aeglustunud, ja seda eriti selle alumistes kihtides, kuhu toitainetel on halvem ligipääs, mis viib jällegi antud populatsioonis tolerantsi kasvuni suure osa antibiootikumide suhtes, nagu eelnevalt mainitud (K Lewis, 2001; Kim Lewis, 2010).

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärgid

On näidatud, et bakteripopulatsiooni heterogeensus võib viia nende tolerantsini antibiootikumide suhtes ning see võib olla põhjuseks, miks persistented infektsioonid ei allu sageli ravile antibiootikumidega. Miks aga immuunsüsteem sellist suhteliselt väikest populatsiooni ei kõrvalda ei ole päris selge.

Meie hüpotees on, et mikroobide seerumresistentsus võib olla seotud ka raku kasvamisaktiivsusega ning sel juhul peaks olema leitav subpopulatsioon rakke, kes ei jagune ning ühtlasi ka ei sure seerumi juuresolekul.

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- Uurida CFT073 tüve seerumitaluvust üksikraku tasemel.
- Selgitada välja kas bakterite kasvamisel seerumis esineb erineva seerumitundlikkusega alampopulatsioone

## 2.2. Materjalid ja meetodika

### 2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Katsete läbiviimiseks kasutati *Escherichia coli* tüve CFT073 (Welch et al., 2002), mis sisaldas kahte erinevat plasmidi. Esiteks oli sisse viidud plasmid pGEN-GFP, millelt ekspresseeritakse konstitutiivselt rohelist fluorestsentsvalku GFP, mis võimaldas rakkude eristamist voolutsütomeetris. Teiseks oli rakkudesse viidud plasmid pET-crimson, millelt on IPTG lisamisega võimalik indutseerida punane fluorestsentsvalgu crimson ekspressiooni, mille abil saab jälgida rakkude jagunemist. Alternatiivselt on hiljem kasutatud ka CFT073 tüve, mis sisaldab ainult ühte plasmidi pET-GFP mut2-AGGAGG. See plasmid kodeerib GFP valku induktori IPTG kontrolli all. Nii töös kasutatud plasmiidid kui ka tüved on selgemaks ülevaateks toodud ära vastavalt tabelites 1 ja 2.

**Tabel 1.** Käesolevas töös kasutatud plasmiidid

Nimetus	Iseloomustus	Resistentsus	Allikas
pGEN-GFP	Sisaldab rohelist fluorestsentsproteiini konstitutiivselt avalduva promootori kontrolli all.	Ampitsilliin	Marta Putrinš
pET-crimson	Sisaldab punast fluorestsentsproteiini IPTG-ga indutseeritava tac promootori kontrolli all.	Kanamütsiin	Arvi Jõers
pET-GFP mut2-AGGAGG	Sisaldab rohelist fluorestsentsproteiini IPTG-ga indutseeritava tac promootori kontrolli all.	Kanamütsiin	Vimberg 2007

**Tabel 2.** Käesolevas töös kasutatud tüved

Nimetus	Fluorestsents
<i>E. coli</i> CFT073 pGEN-gfp pET- crimson	Konstitutiivselt roheline fluorestsents, induksiooni all punane
<i>E. coli</i> CFT073 pET-GFP mut2-AGGAGG	Induksiooni all roheline fluorestsents, konstitutiivne puudub.

### 2.2.2. DMSO säilituskultuuri valmistamine

DMSO säilituskultuuri valmistamiseks kasvatati rakke LB söötmes üleöö ning tehti sellest järgmine päev lahjendus kuni  $OD_{600} \sim 0,04$ . Rakke kasvatati umbes kolm tundi kuni  $OD_{600} \sim 0,8$ . Seejärel lisati rakukultuurile DMSO-d lõppsisalduseni 8%, jagati 120 $\mu$ l kaupa tuubidesse ning jäeti -81°C juurde seisma.

### 2.2.3. Söötmed ja rakkude kasvatamine

Rakud kasvatati ette LB (*Lysogeny broth*) Difco™ söötmes, mis oli tehtud deioniseeritud vees ning mikrofiltritud. Sellele oli lisatud 1mM kontsentratsioonis IPTG ja 25 $\mu$ g/ml kanamütsiini. Statsionaarse faasi rakud on enne iga katset kasvatatud ette 20 tundi.

### 2.2.4. Seerumi eraldamine

Veeniveri võeti kahelt vabatahtlikult ja hea tervise juures olevalt doonorilt. Verel lasti seista 37°C juures 30 minutit ja tsentrifuugiti 1700g ja 20°C juures 10 minutit. Seerum eraldati, jaotati osadesse ning jäeti -80°C juurde seisma.

Katseks valiti sobiv kogus seerumit ning sulatati üles ja kasutati ainult korra. Seerumi komplement inaktiveeriti vahetult enne katset, hoides seda 56°C juures 30 minutit.

### 2.2.5. Seerumiga tapmise katse

DMSO säilituskultuurist tehti 100x lahjendus LBsse, lisati 1mM IPTG ja 25µg/ml kanamütsiini ning kasvatati üleöö (20h) Sanyo OrbiSafe TS loksutil kiirusel 220rpm ja temperatuuril 37°C. Bakterid pesti ja võeti üles kas LB söötmes või 1x PBSis, katse jaoks tehti lahjendused kuni OD<sub>600</sub> – 0,1. LBs suspendeeritud rakkudele lisati suhtes 1:1 kas LBd, inaktiveeritud seerumit (HIS – *heat inactivated serum*) või seerumit. PBS puhvris suspendeeritud rakkudele lisati suhtes 1:1 kas PBSi, HISi või seerumit.

Serumiga tapmise katse ajal inkubeeriti rakke staatiliselt 37°C juures. FACS-i (voolutsütomeetria – *fluorescence activated cell sorting*) proove võeti 0min ja järgnevalt iga 30min tagant. FACS-i jaoks võeti igast paralleelist 10µl rakke, pandi juurde 10µl jääkülma 30% glütserooli, pandi jääle ning hoiustati kuni analüüsimiseni –81°C juures. CFU määramiseks võeti proove 0 min, 90min ja 150 või 180min ajapunktides. Selleks võeti igast paralleelist 10µl rakke, mida kasutati kümnekordsete lahjenduste seeria tegemiseks 1x PBS-is kuni 10<sup>6</sup> lahjendusteni. Igast lahjendusest kanti 5µl 25µg/ml kanamütsiini sisaldusega LB-agar plaadile ning inkubeeriti 37°C juures üleöö.

### 2.2.6. Elektroporatsioon ja kompetentsete rakkude valmistamine

Üleöö LB-s kasvanud rakkudest tehti 20ml LB söötmesse 100x lahjendus ning kasvatati kuni OD<sub>600</sub> ~ 0,5. Rakud jahutati jääl, valati 50ml tuubi ning tsentrifuugiti viis minutit 5000g ja 4°C juures. Rakke pesti kaks korda jääkülmas deioniseeritud vees ning korra 10% glütseroolis ning tsentrifuugiti 5000g ja 4°C juures. Seejärel võeti rakud üles 400µl 10% glütseroolis ning jaotati 100µl kaupa 1,5ml eeljahutatud tuubidesse, mida hoiti jääl.

Nii valmistatud elektroporatsiooni kompetentidele lisati 2µl plasmidi, mida sooviti transformeerida ja pipeteeriti bakterid 2mm elektroporatsiooni küvetti. Bakterite transformatsioon töös kasutatud plasmiididega viidi läbi Gene Pulser Xcell Microbial System elektroporatsiooni süsteemiga kasutades eelseadistatud režiimi *E. coli* transformeerimiseks 2,5 kV juures.

### 2.2.7. Voolutsütomeetria

Katses võetud proovide analüüsimiseks kasutati voolutsütomeetrit BD LSRII. Proovid sulatati jääl ning tehti PBS-is sobivad lahjendused vastavalt rakutihedusele antud proovis. 10µl proovi lahjendati 100-1000µl PBSis ja analüüsiti 10-80µl segust. Igast proovist

analüüsiti tuhat kuni mõnikümmend tuhat rakku. Proovide analüüsimiseks kasutati plaadilt lugemist 96-kaevuga U-kujulise põhja ristlõikega mikrotiiterplaadilt. GFP ergastati 488nm laseriga ja emissiooni mõõdeti 530/30 ribafiltriga. Crimson ergastati 639nm laseriga ja emissioon mõõdeti 660/20 ribafiltriga. Fotokordistite torudes kasutatud pinge suurused on ära toodud tabelis 3. Saadud andmeid analüüsiti kasutades vabavaralist tarkvara Flowing Software (Perttu Terho, Turku biotehnoloogia keskus).

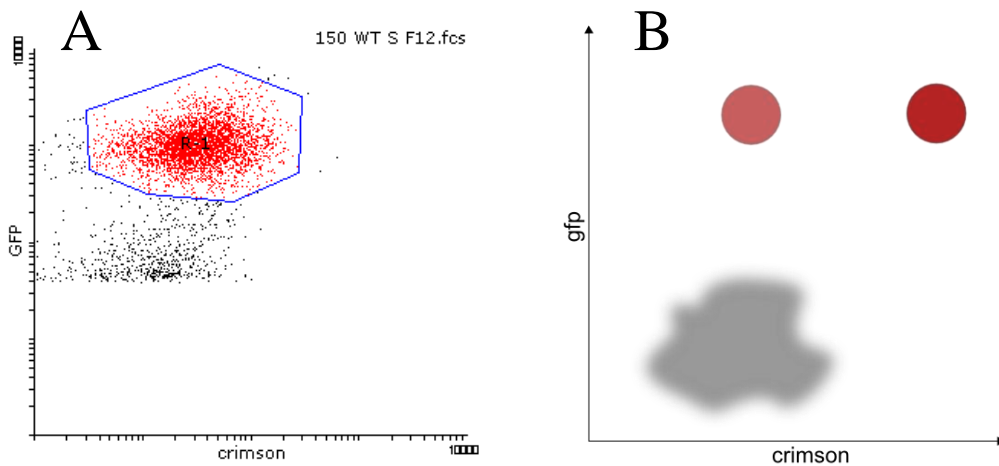
**Tabel 3.** Käesolevas töös voolutsütomeetrias kasutatud ja fotokordistite pinged.

Mõõdetav parameeter	Pinge
FSC	430V
SSC	400V
GFP	600V
APC	750V

## 2.3. Tulemused

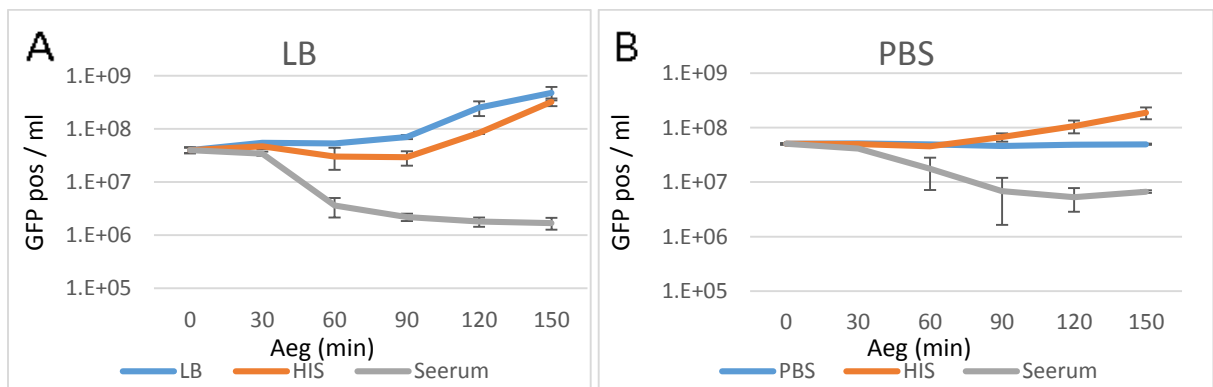
### 2.3.1. CFT073 tüvi seerumile tundlikum kui varasemalt arvatud

Töö eesmärgiks oli uurida, kas soikeseisund, mis on üks persistentuse põhjuseks antibiootikumide puhul, võib põhjustada ka tolerantsust seerumi suhtes. Sel juhul peaks leiduma väike subpopulatsioon, mis seerumi juuresolekul ei sure ega ka kasva. Selleks et jälgida jagunevate või mittejagunevate rakkude ellujäämist seerumi juuresolekul viidi tüvesse CFT073 kaks plasmidi: pGEN-GFP ja pET-crimson. pGEN-GFP plasmid kodeerib fluorestsentsvalku GFP ning on näidatud, et GFP sobib hästi elusate rakkude jälgimiseks ning rakkude lüüsumisel ampitsilliiniga läheb GFP rakkudest välja (Roostalu, Jõers, Luidalepp, Kaldalu, & Tenson, 2008). pET-crimson plasmiidilt toimub tac promotori alt crimson fluorestsentsvalgu IPTG-ga indutseeritav transkriptsioon, mis induktori puudumisel lakkab ning Crimson valgu lahjenemise järgi on võimalik tuvastada rakkude jagunemist katse jooksul. Statsionaarse faasi rakud olid kasvatatud ette 20 tundi LB-s, mis sisaldas kanamütsiini kontsentratsioonil 25 µg/ml, et vältida kontaminatsiooni ja kindlustada plasmidi säilumist, ja 1mM kontsentratsioonil IPTG-d selleks, et indutseerida crimsoni ekspressiooni pET-crimson plasmiidilt. Rakud lahjendati OD<sub>600</sub> – 0,01-ni kas LBs või PBSis ning segati suhtes 1:1 kas LB + LB, LB + HIS, LB + seerum või PBS + PBS, PBS + HIS ja PBS + seerum. Seega on katsetes on kasutati 50% seerumit ning rakke kontsentratsioonil OD<sub>600</sub> – 0,05 ehk umbkaudu 4 x 10<sup>7</sup> rakku/ml. Seejärel inkubeeriti rakke 37C juures 150 minutit, ning iga 30 min tagant võeti proove. Saadud proovid analüüsiti voolutsütomeetris ning vastavalt GFP signaali tugevusele eraldati taustast rakud (joonis 3). Kõigepealt hinnati voolutsütomeetriga lüüsimata rakkude (sisaldavad GFP valku) hulka. Katsete tulemustest on näha, et seerumis hoitud rakkude hulk ei vähene esimese pool tunni jooksul, hakkab siis järsult langema ning seejärel jälle aeglustub (Joonis 4). Sellised tulemused langevad hästi kokku ootusega, et seerum ei tapa mittekasvavaid rakke, sest rakkude hulk püsib sama *lag*-faasi vältel. Seerumi tapmisaktiivsus langeb aga kokku rakkude kasvamisega – pärast poole tunni inkubatsiooni on LB-s ja HIS-is inkubeeritud rakkude kasvukõveralt näha, et rakud hakkavad kasvama ning seerumiga inkubeeritud rakkude hulk langeb peagu suurusjärgu võrra (joonis 4). Pärast 90 minuti ajapunkti rakkude surm seerumis aeglustub ning jõuab platoole 150ndaks minutiks. See võib olla tingitud kas alles jäänud rakkude tolerantsist seerumi suhtes või on seerum küllastunud/inaktiveerunud ja seda lihtsalt ei jagu sellisele hulgale rakkudele.



**Joonis 3. Bakterirakkude tuvastamine katseproovist kasutades läbivoolu tsütomeetrit.**

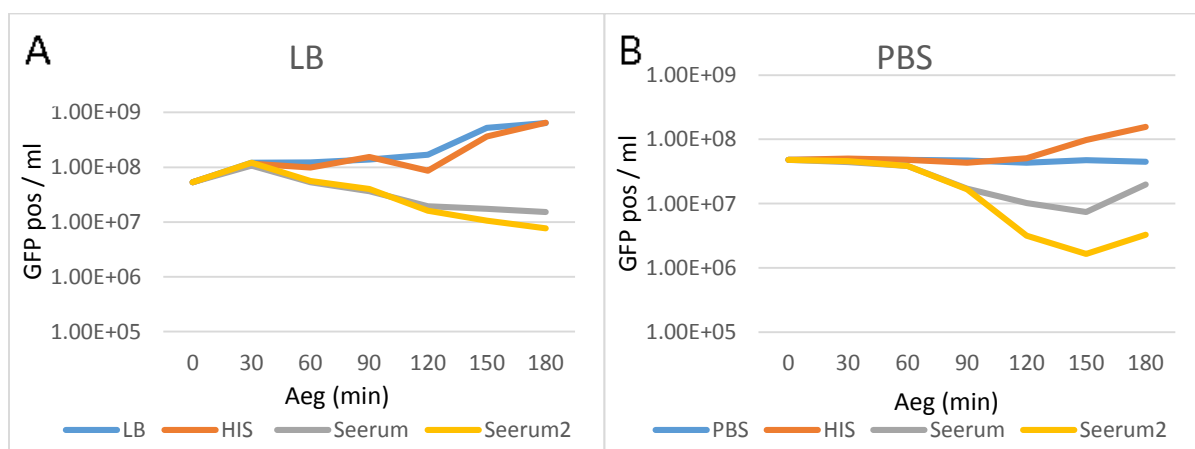
Joonisel A on kujutatud piirkonna määramine, milles asuvaid sündmusi analüüsitakse. X-teljel jookseb GFP signaali intensiivsus, y-teljel crimsoni signaali intensiivsus. Mõlemad teljed on logaritmilises skaalas. Sinise joonega on piiritletud ala, milles olevad sündmused on GFP järgi nii tugeva signaaliga, et neid saaks rakkudeks pidada. Madala GFP signaali allikaks on tõenäoliselt puhver ja surnud rakkude osad. Joonisel B on kujutatud nägemus sellest, kuidas loodeti, et rakud eristuvad taustast ja jagunemisel. Heledama punasega on markeeritud jagunenud rakud, kellel on madalam crimsoni fluorestsentsi tase ning tumedama punasega kõrge crimsoni fluorestsentsi tasemega mittejagunevad rakud.



**Joonis 4. GFP positiivsete rakkude arvukus seerumiga tapmise katse vältel.**

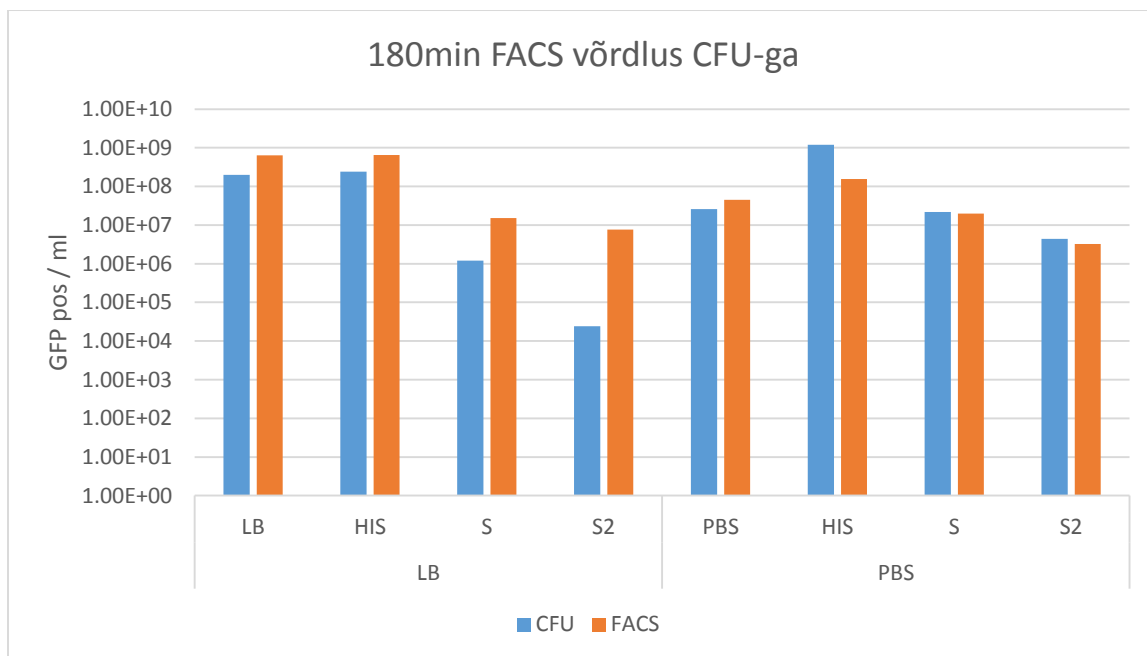
Katsed on läbi viidud CFT073 [pGEN-gfp; pET-crimson ] tüvega. Statsionaarse faasi rakkude lahjendati  $OD_{600} = 0,1$  rakutiheduse juurde kas LB söötmesse või PBS puhvrise. LBs olevatele rakkudele lisati suhtes 1:1 kas LB, HIS või seerum (A paneel) ning PBS-is olevatele rakkudele PBS, HIS või seerum (B paneel). Rakke inkubeeriti 37°C juures ja iga 30 minuti tagant võeti proov, mida analüüsiti voolutsütomeetriga. Graafikul on esitatud lüüsumata bakterirakkude hulka 1 ml proovis, milleks on nende analüüsitud osakeste hulk, mis ületas teatava GFP signaalitugevuse piirmäära (vastav piirkond on esitatud joonisel 3). Mõlemaid katseid on läbi viidud kahes korduses ja joonisele on märgitud standardhälve kahe katse põhjal.

Testimaks viimati mainitud võimalust, viidi läbi katse, milles tehti lisaparalleel, mida inkubeeriti seerumis ning millele lisati katse 90nda minuti juures veelkord 1:1 suhtes seerumit. Katse aeg viidi 180 minutile, et lisatud seerumi efekti oleks lõpuni võimalik jälgida (joonis 5). Antud katse tulemuste järgi võib öelda, et seerumi lisamisel on küll efekt nii PBSis kui ka LBs tehtud katsete puhul ent sellegi poolest jõuab tapmisaktiivsus veel katse jooksul platoole ja suur hulk rakke on siiski immuunsed seerumi mõjule. Seega ei saa seerumi küllastumus või inaktiveerumine olla ellujäämise põhjuseks. Lisaks analüüsile läbivoolu tsütomeetriga määrati proovidest ja ka elusrakkude arv (CFU) et vaadati kui kas tsütomeetriga nähtud rakud on ka elus ja võimelised moodustama kolooniat (joonis 6). Jooniselt on näha, et seerumiproovides, mis on tehtud LB juuresolekul on suured erinevused CFUde ja tsütomeetria abil saadud tulemustes, mis tähendab, et suur osa tsütomeetriga nähtavatest rakkudest neis proovides, ei ole tegelikult eluvõimelised.



**Joonis 5. Värske seerumi lisamise mõju seerumiga tapmise katsele.**

CFT073 [pGEN-GFP, pET-crimson] tüve statsionaarse faasi rakud lahjendati  $OD_{600} = 0,1$  rakutiheduse juurde LB söötmesse või PBS puhvrise LBs olevatele rakkudele lisati suhtes 1:1 kas LB, HIS või seerum (A paneel) ning PBS-is olevatele rakkudele PBS, HIS või seerum (B paneel). Rakke inkubeeriti 37°C juures ja lga 30 minuti tagant võeti proov, mis analüüsiti hiljem voolutsütomeetris. Graafik on nende analüüsitud osakeste hulk 1 ml kohta, mis ületas teatava GFP signaalitugevuse piirmäära (vastav piirkond on esitatud joonisel 3). Paralleelile, mis on markeeritud „Seerum2“, lisati 90ndal minutil seerumit suhtes 1:1 katseseguga. Katset on viidud läbi ühe korra.

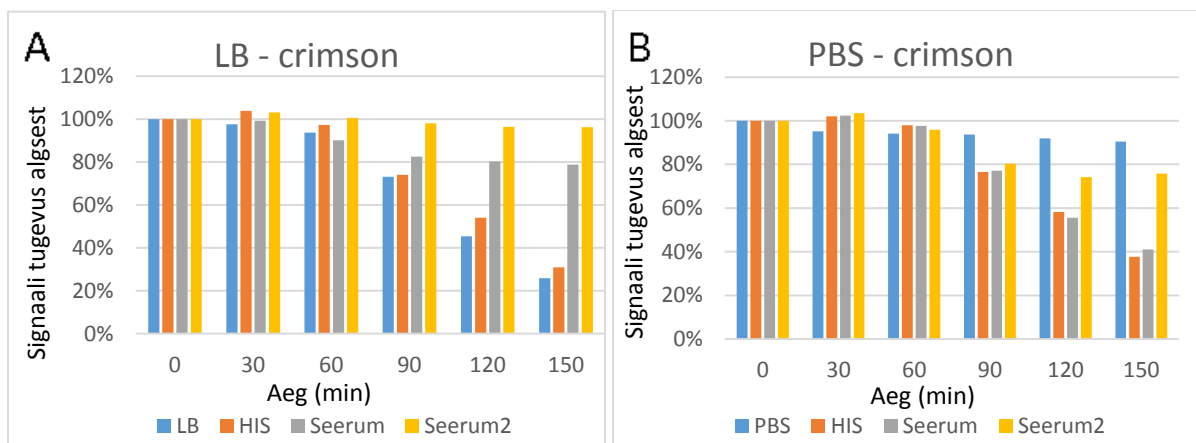


**Joonis 6. Võrdlus rakkude hulgas tsütomeetria (FACS) ja CFUde loendamise abil saadud andmetest.**

Statsionaarse faasi rakud lahjendati  $OD_{600} = 0,1$  rakutiheduse juurde LB söötmesse või PBS puhvrise LBs olevatele rakkudele lisati suhtes 1:1 kas LB, HIS või seerum ning PBS-is olevatele rakkudele PBS, HIS või seerum ning inkubeeriti 3h 37°C juures. 180min ajapunktis võeti proovid nii tsütomeetria kui CFUde määramise jaoks. CFUd määrati tehes proovidest kuni  $10^6$  lahjendused, mis kanti tardsöötmele. Esitatud on üks esinduslik katse.

### 2.3.2. Seerumis jäävad suurema tõenäosusega ellu bakterirakud, mis ei jagune

Järgmisena püüti uurida rakkude jagunemist crimsoni lahjenemise järgi. Esmalt prooviti seda hinnata populatsiooni keskmise crimsoni fluorestsentsi taseme järgi. LBs tehtud katsete puhul on selgelt näha, et LB + seerumis inkubeeritud rakud on jagunenud vähem kui rakud, mis on inkubeeritud LB + HIS või LB + LB katsesegudes, sest nende rakkude keskmine crimsoni fluorestsentsi tase on kõrgem (joonis 7A). Seerumi lisamine 90ndal minutil suurendab seda efekti veelgi ja ellujäänud rakkude crimsoni fluorestsentsi tase on võrreldav algsete rakkude fluorestsentsiga (joonis 7A). PBSis tehtud katsete puhul seda efekti PBS + seerumis inkubeerimisel näha ei ole ja neil rakkudel on sarnane crimsoni tase PBS + HIS inkubeeritutega (joonis 7B). Kui aga PBS + seerumi rakkudele lisati 90ndal minutil seerumit juurde, siis rakkude keskmise crimsoni fluorestsentsi taseme langus aeglustus (Joonis 7B). Selgesti on näha, et mõlemal PBS + seerum proovil langeb crimson ühtlase kiirusega kuni seerumi lisamise punktini ning siis aeglustub proovis, millele seerumit lisati.



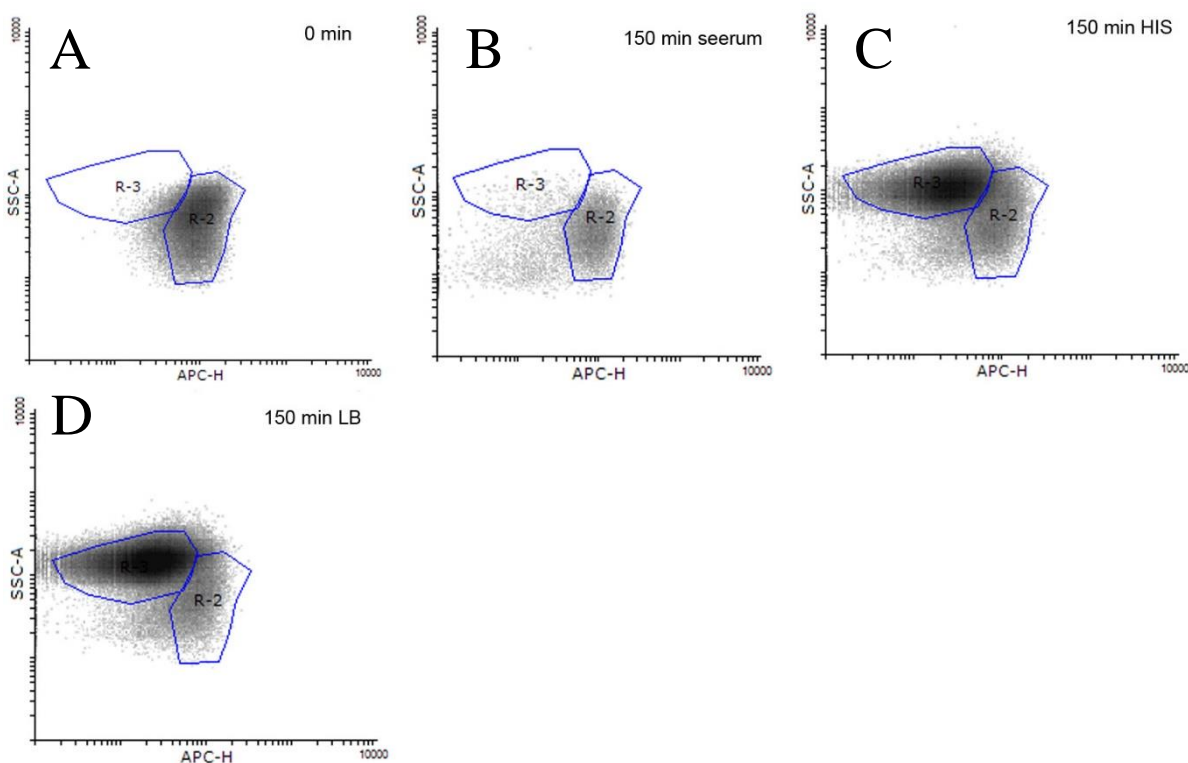
**Joonis 7 Rakupopulatsiooni keskmise crimson valgu fluorestsentsi muutus ajas.**

Crimsoni taseme muutused on esitatud protsentides võrreldes 0 minuti prooviga. Katsed on läbi viidud CFT073 [pGEN-GFP pET-crimson] tüvega. Statsionaarse faasi rakud lahjendati OD<sub>600</sub> – 0,1 rakutiheduse juurde LB söötmesse või PBS puhvrissse LBs olevatele rakkudele lisati suhtes 1:1 kas LB, HIS või seerum (A paneel) ning PBS-is olevatele rakkudele PBS, HIS või seerum (B paneel). Rakke inkubeeriti 37°C juures 2,5h. Proove võeti iga 30min tagant. Fluorestsentsi andmed on saadud voolutsütomeetria analüüsist, kus mõõdeti iga üksiku raku crimson fluorestsentsi, mille põhjal arvutati populatsiooni keskmine fluorestsents. „Seerum2“ tähistab katseseguga, millele on 90ndal katseminutil lisatud seerumit suhtes 1:1 katseseguga. X-teljel on näidatud ajapunktide minutid, millal proov võeti ja y-teljel protsentides crimson valgult saadud signaali tugevus algsest. Kujutatud on kolme katse tulemuste keskmised.

Samuti uuriti tsütomeetria abil saadud signaalide jaotust, et täpsemalt iseloomustada nähtust, mis on keskmise crimsoni taseme taga (joonis 8). Selleks vaadeldi iga GFP positiivse raku crimson fluorestsentsi ja külghajuvust (SSC). Katse 0 punkti proovis määrati ala R-2, kuhu kuuluvad algsete crimsoni fluorestsentsi ja SSC parameetritega rakud ja LB + LB proovis ala R-3, kuhu kuuluvad aktiivselt jagunevad rakud. On näha, et katse 150ndaks minutiks on seerumiga proovis (Joonis 8B) ellu jäänud peamiselt rakud, millel on algsed parameetrid, ehk mitte jagunenud rakud. Alas R-3, kuhu on liikunud valdav osa HISis ja LBs inkubeeritud rakkudest (joonis 8C ja D), on seerumi proovis väga vähesed rakud. Igal juhul on selge, et LB juuresolekul seerumis inkubeeritud rakud on erinevad neist, mis on inkubeeritud LB või HIS-i juuresolekul. Suurem keskmine crimsoni tase, madalam rakkude hulk ja rakkude jaotus crimsoni signaali tugevuse alusel viitab sellele, et seerumis jäävad ellu rakud, mis ei jagune ning need, mis jagunevad, ehk kelle crimsoni tase langeb, lüüsitakse komplemendi poolt.

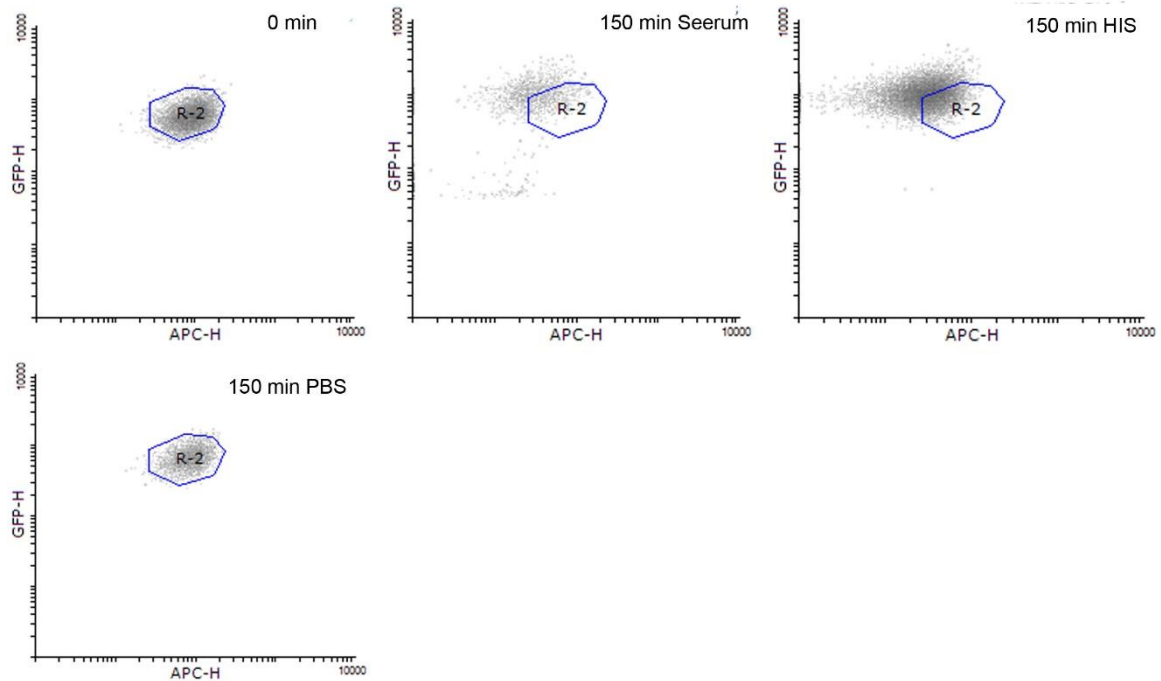
Analüüsides samal viisil PBSis läbi viidud katset, oli lahutuvus halvem (Joonis 9). Katse 0 punktis määrati ala R-2, kuhu kuulusid algsete parameetritega rakud. 2,5h möödudes

oli ootuspäraselt näha, et PBSis inkubeeritud proovis ei olnud rakud kasvama hakanud ning enamikul rakkudest olid algsed parameetrid. Seerumis ja HISis inkubeeritud proovide jaotus on suhteliselt sarnane ja umbes sama palju rakke mõlemast proovist kuulus regiooni R-2.



**Joonis 8. Rakkude jaotuse võrdlus crimsoni fluorestsentsi alusel 0h ja 2,5h ajapunktis.**

Katse on läbi viidud CFT073 [pGEN-GFP, pET-crimson] tüvega. Statsionaarse faasi rakud lahjendati  $OD_{600} = 0,1$  rakutiheduse juurde LBsse ja lisati suhtes 1:1 kas LB, HIS või seerum. Rakke inkubeeriti  $37^{\circ}\text{C}$  juures 2,5h. Proove võeti iga 30min tagant. Iga punkt väljendab osakest, millelt on saadud signaal. X-teljel on kujutatud crimson (APC-H) signaal ja y-teljel *sidescatter* ehk külghajuvus (SSC-A), mis iseloomustab valgustatava objekti granulaarsust. Mõlemad teljed on logaritmilises skaalas. Jagunenud rakkudel on kõrgem külghajuvus ja madalam crimsoni tase. Joonis näitab punktide esinemise tihedust – mida tumedam ala, seda rohkem on esinenud sarnaste parameetritega signaali. Joonis A kujutab 0 minuti proovi ning joonised B-D kujutavad vastavalt LB + seerum, LB + HIS ja LB + LB katsesegudest 2,5h ajapunktis võetud proove. Nendes on eraldatud regioonid R-2, kuhu kuuluvad algsete parameetritega rakud, ja R-3, kuhu kuuluvad madalama crimsoni ja kõrgema külghajuvuse tasemega rakud. Esitatud on ühe katse tulemused.

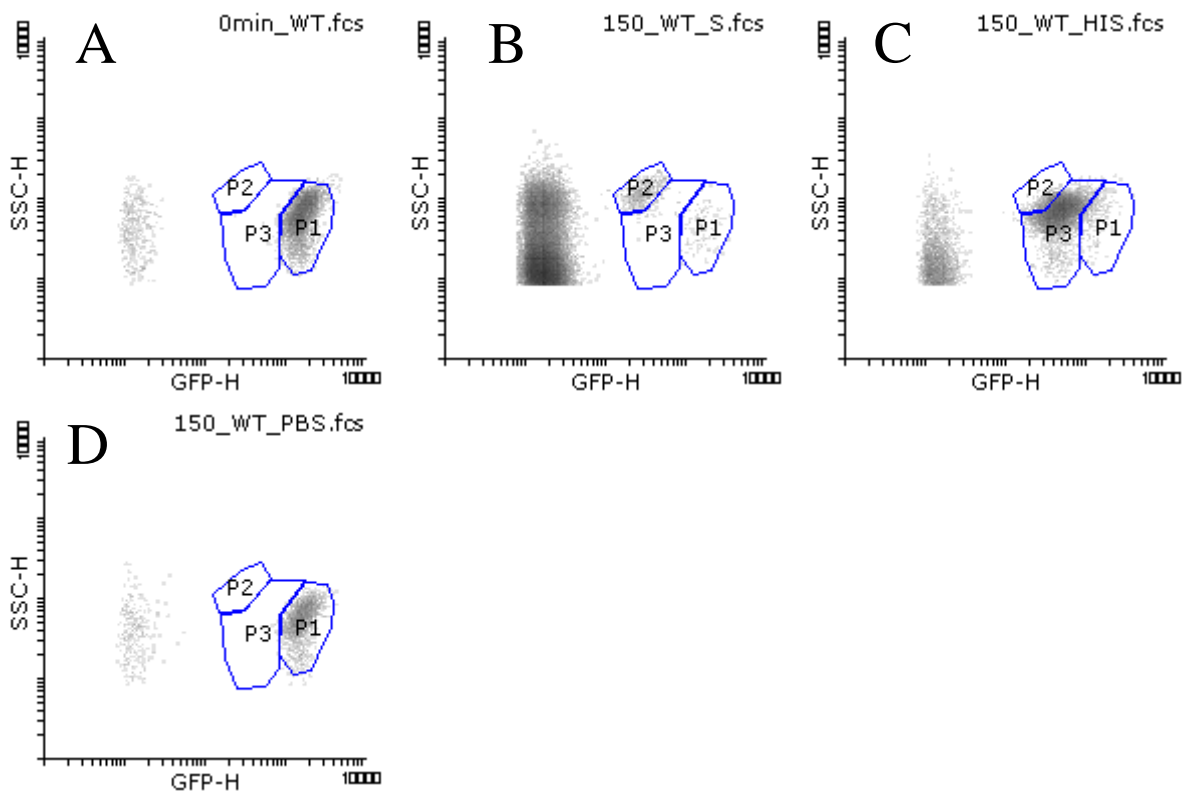


**Joonis 9**

Katse on läbi viidud CFT073 [pGEN-GFP, pET-crimson] tüvega. Statsionaarse faasi rakud lahjendati  $OD_{600} = 0,1$  rakutiheduse juurde PBSi ja lisati suhtes 1:1 kas PBS, HIS või seerum. Rakke inkubeeriti  $37^{\circ}\text{C}$  juures 2,5h. Proove võeti iga 30min tagant. Iga punkt väljendab osakest, millelt on saadud signaal. X-teljel on kujutatud crimson (APC-H) signaal ja y-teljel *sidescatter* ehk külghajuvus (SSC-A), mis iseloomustab valgustatava objekti granulaarsust. Mõlemad teljed on logaritmilises skaalas. Jagunenud rakkudel on kõrgem külghajuvus ja madalam crimsoni tase. Joonis näitab punktide esinemise tihedust – mida tumedam ala, seda rohkem on esinenud sarnaste parameetritega signaali. Joonis A kujutab 0 minuti proovi ning joonised B-D kujutavad vastavalt PBS + seerum, PBS + HIS ja PBS + PBS katsesegudest 2,5h ajapunktis võetud proove. Nendes on eraldatud regioon R-2, kuhu kuuluvad algsete parameetritega rakud. Esitatud on ühe katse tulemused.

### 2.3.3. Tundlikum rakujagunemise reportersüsteem näitab et seerumis võib ellu jääda ka väike kiiresti-jagunev bakterite subpopulatsioon

Tehtud katsetest crimsoni ja GFP-ga on näha, et GFP on hea marker eristamiseks elusrakke taustast ja lüüsunud rakkudest. Crimsoni signaal on aga liiga nõrk, et oleks võimalik selgelt eristada rakke, kes jäävad ellu kuna ei jagune (joonis 9). Kuna eelnevatest katsetest oli näha, et GFP signaal on väga tugev, otsustati teha uus CFT073 tüvi, millesse oleks viidud pET-GFP mut2-AGGAGG plasmiid, milles GFP on tac promootori all IPTG poolt indutseeritav. Sellise tüve puhul käib küll nii elusrakkude kui ka rakujagunemise tuvastamine sama markeri järgi, ent kuna GFP signaal on nii tugev, on see antud katse puhul täiesti võimalik.



**Joonis 10. Rakkude jaotuse võrdlus GFP fluorestsentsi alusel 0h ja 2,5h ajapunktis.**

Katse on läbi viidud [CFT073 pET-GFP mut2-AGGAGG] tüvega. Statsionaarse faasi rakud lahjendati OD<sub>600</sub> – 0,1 rakutiheduse juurde PBS puhvrise ja lisati suhtes 1:1 kas PBS, HIS või seerum. Rakke inkubeeriti 37°C juures 2,5h. Proove võeti iga 30min tagant. Iga punkt väljendab osakest, millelt on saadud signaal. X-teljel on kujutatud GFP (GFP-H) signaal ja y-teljel *sidescatter* ehk külghajuvus (SSC-H), mis iseloomustab valgustatava objekti granulaarsust. Mõlemad teljed on logaritmilises skaalas. Jagunenud rakkudel on kõrgem külghajuvus ja madalam GFP tase. Joonis näitab punktide esinemise tihedust – mida tumedam ala, seda rohkem on esinenud sarnaste parameetritega signaali. Joonis A kujutab 0 minuti proovi ning joonised B-D kujutavad vastavalt PBS + Seerum, PBS + HIS ja PBS + PBS katsesegudest 2,5h ajapunktis võetud proove. Nendes on eraldatud regioonid P1, kuhu kuuluvad algsete parameetritega rakud, P2, kuhu kuuluvad madalama GFP ja kõrgema külghajuvusega rakud ning P3, kuhu kuuluvad madalama GFP tasemega rakud. Esitatud on ühe katse tulemused.

CFT073 pET-GFP mut2-AGGAGG tüvega läbi viidud katses oli võimalik saada jagunemisel populatsioonide suurem lahtuvus ning seerumiga proovis on selgelt näha kaks erinevat subpopulatsiooni (joonis 10). 0 minuti ajapunktis markeeriti populatsioon P1, milles olevatel rakkudel on algne GFP signaalitugevus. On näha, et PBSi proovis ei ole rakkude toitaine puudusel kasvama läinud ning 2,5h proovis on need endiselt samas piirkonnas, kus katse alguses. P2 regioonis on eriti aktiivselt paljunevad rakud ja P3 regioonis on keskmise

aktiivsusega kasvavad rakud, mis on tekkinud HIS-is mõõduka toitainete sisalduse juures. Seerumi juuresolekul on 2,5h möödudes ellu jäänud ainult väga aktiivselt paljunevad ning üldse mittepaljunevad bakterid. Mõõdukalt jagunev populatsioon, mis esineb HISis, mille ainus erinevus aktiivsest seerumist on letaalse toime puudumine, seerumiga proovis puudub (Joonis 10B). Nendest tulemustest võib järeldada, et seerumi juuresolekul suudavad ellu jääda mittejagunevad ning väga kiiresti jagunevad rakud.

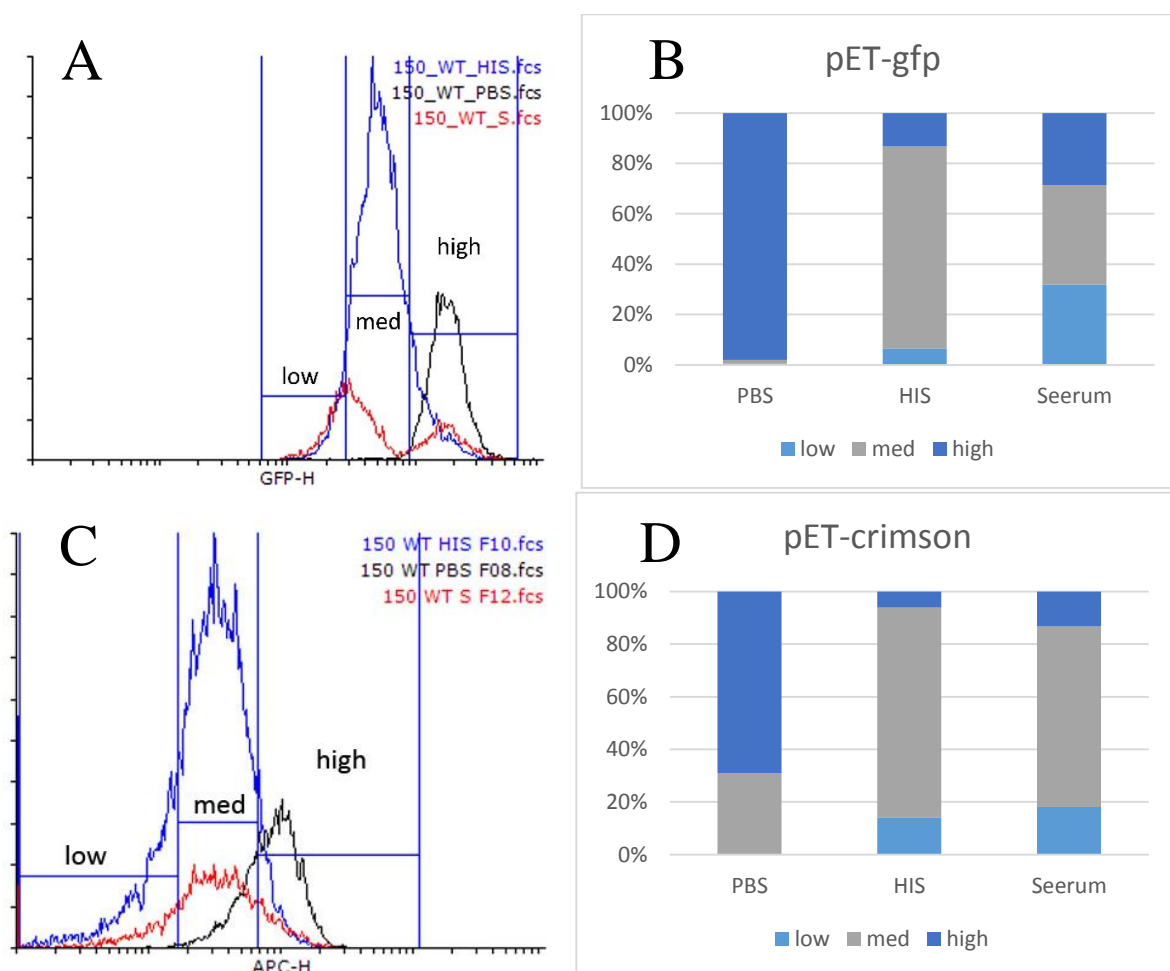
## 2.4. Arutelu

Antud töös on kirjeldatud *E. coli* Uropatogeense tüve CFT073 statsionaarse faasi rakkude resistentsust inimese vereseerumile. Töö käigus näidati, et seerumi tapmisaktiivsus jõuab 2,5h jooksul platoole, sõltumata sellest, kas seerumit lisatakse katsesegule või ei (joonis 5). Sellest võib järeldada, et esineb mingi hulk baktereid, kellel on võime vastu pidada seerumi mõjule sõltumata selle hulgest. Katset viidi läbi kahes erinevas tingimuses. Ühel juhul sisaldas katse keskkond lisaks seerumile ka LBD, mis tähendab, et bakterid olid toitainete ja rauarikkas keskkonnas. Teisel juhul olid rakud seerumis, millele oli lisatud PBS puhvrit, milles puuduvad mõlemad.

Viies katset läbi LB juuresolekul oli ilmne raku jagunemise reporterina kasutatud crimsoni valguga kõrgem keskmise tase seerumiga inkubeeritud proovides võrreldes HISis inkubeeritud rakkudega, mis näitab et seerumis jäid ellu mittejagunevad rakud. Sama katset PBSiga tehes ei ilmnenud aga seerumiga ja HISiga proovides crimsoni tasemes erinevust enne kui seerumit katsesegule lisati. Kuna mõõdetud on crimsoni keskmist taset, siis see ei tähendaks tingimata, et rakud PBS + HIS ja PBS + seerum katsesegudes oleksid identsed. On võimalik, et väike mittejagunev populatsioon on seerumis olemas ent jagunevaid rakke on nii palju rohkem, või jagunevad nad nii palju kiiremini, et keskmine crimsoni tase püsib sarnane HISis inkubeeritud rakkudega. Keskmise crimsoni taseme tõus (joonis 7) ja samas GFP järgi positiivsete rakkude hulga vähenemine (joonis 5) seerumi lisamisel võib tuleneda sellest, et ka need rakud, mis jagunesid, kõrvaldati seerumi lisamisel. Crimsoni nõrga signaali tõttu ei ole aga selle järgi võimalik eristada erineva kiirusega jagunevaid rakke.

Seepärast otsustasime uurida rakkude jagunemist ka teist reportersüsteemi kasutades. Erinevate raku jagunemise reportervalkude crimsoni ja GFP kasutamisel saadud tulemuste võrdlus on esitatud joonisel 11. CFT073 [pGEN-GFP; pET-crimson] tüvega tehtud katses on seerumiga inkubeeritud proovi erinevate crimsoni fluorestsentsi tasemetega rakkude esinemissageduste jaotuse tipp tasane, mis võib olla põhjustatud sellest, et kahe erineva kiirusega jaguneva populatsiooni tipud on üksteisele nii ligidal, et neid ei ole võimalik üksteisest eristada (joonisel 11D). CFT073 [pET-GFP mut2-AGGAGG] tüvega läbi viidud eksperimendi histogrammid joonisel 11B näitavad, et see oletus vastab tõe: katsed on läbi viidud samadel tingimustel ja GFP tugevama signaali tõttu on selgesti eristatavad kaks populatsiooni rakke seerumiga inkubeeritud proovis: üks mittejagunev, mille rakkude crimsoni fluorestsentsi tugevus on sarnane PBSis inkubeeritud mittejagunevate rakkude omaga, ja teine, eriti aktiivselt jagunev populatsioon, mis suudab vältida komplemendi mõju.

Samuti on joonistel 11B ja 11D eristatud kolm regiooni reportervalgu signaalitugevuse alusel ning esitatud igas proovis analüüsitud rakkude protsentuaalne jaotus nendesse aladesse (Joonis 11A ja C).



**Joonis 11. Rakkude protsentuaalne jaotus jagunemiskiiruse järgi.**

Katse on läbi viidud CFT073 [pET-GFP mut2-AGGAGG] tüvega. Statsionaarse faasi rakud lahjendati OD<sub>600</sub> – 0,1 rakutiheduse juurde, ning lisati 50% kas PBSi, HISi või seerumit. Rakke inkubeeriti 37°C juures 2,5h. Joonistel A ja C on kujutatud erineva fluorestsentsi tasemega rakkude suhteline esinemissagedus populatsioonis. X-telgedel on märgitud vastavalt GFP (A) ja crimson (C). Y teljel on vastava fluorestsentsi tasemega rakkude suhteline esinemissagedus populatsioonis. Joonisel on kujutatud 2,5h ajapunkti proovid PBS (must joon), PBS + HIS (sinine joon) ja PBS + seerum (punane joon) katsesegudest. Jaotusel on eraldatud kolm ala signaali intensiivsuse järgi kusjuures keskmise intensiivsusega ala on määratud PBS + HIS proovi jaotuse järgi. Joonistel B ja D on kujutatud igas proovis analüüsitud rakkude protsentuaalne jaotus nendesse aladesse, mis on signaali tugevuse kasvu järgi vasakult paremale nimetatud vastavalt „low“, „med“ ja „high“. X-teljele on märgitud proovid ja y-teljel on märgitud mitu protsenti tervikust antud proovis kindlasse alasse kuulub.

Protsentuaalselt jaotuselt on nii crimsoni kui GFP-ga tehtud katsetes näha sarnast tendentsi, mis on küll GFP puhul on paremini esile toodud parema lahutuvuse abil: seerumi manulusel jääb võrreldes HIS-i inkubeeritud rakkudega rohkem rakke regioonidesse, kus fluoressentsisignaali on kas kõrge või madal, ehk bakterirakud kas siis vastavalt ei jagune või jagunevad väga kiiresti (Joonis 11). Vahepealses alas, kus asuvad rakud, kelle jagunemiskiirus on keskmine, on rakke proportsionaalselt vähem ehk keskmise kiirusega rakud lüüsitakse seerumi poolt suurema efektiivsusega.

Käesolevas töös viidi katseid läbi kahes väga erinevas keskkonnas: LB ja PBS. LB on komplekssoode, milles on palju toitaineid ja mille keemiline koostis pole täpselt teada samas kui PBS on fosfaatpuhver, mille koostis on täpselt teada ja milles rakkudel ei ole võimalik kasvada. PBSis tehtud katsetes oli toitainete allikaks aktiivne või inaktiveeritud seerum. Toitainete rikkus keskkonnas võiks viia bakterite kiirema jagunemiseni LBs, mida on ka näha joonisel 5, kus LBs tehtud katse 30ndal minutil on rakkude hulgas väike tõus, mida ei ole näha PBSis läbi viidud katses samal joonisel. See selgitab ka, miks LBs tehtud katsetes algas rakkude suremine varem ja toimus kiiremini. Lisaks suuremale toitainete hulgale on LBs ka rohkem rauda. Raua puudumine on oluline, sest raua vaegus on oluline signaal mitmete patogeensuseks vajalike geenide avaldamiseks (Litwin & Calderwood, 1993). Kuna ka seerum on rauavaene keskkond, siis peaksid ka rakud, mis on inkubeeritud seerumi ja PBSi juuresolekul, olema fenotüübilt erinevad neist, mis on inkubeeritud LB ja seerumi juuresolekul, mis võib tingida erinevat vastupidavust seerumi suhtes. Varasemates töödes on samuti näidatud, et seerumiga inkubeerimisel muutub CFT073 geeniekspressioon. Rohkem ekspresseeritakse gene, mis on seotud peptidoglükaani ja kolaanhappe sünteesiga (Miajlovic, Cooke, Moran, Rogers, & Smith, 2014). Peptidoglükaan on rakule vajalik katkise rakuseina taastamiseks ning on leitud, et kolaanhappe kapsel kaitseb bakterirakku keskkonna eest (Li, Laturnus, Ewers, & Wieler, 2005) Samuti on alla on surutud mõnede membraani poriinide, nagu OmpC, süntees, mis võib rakku seerumi mõjude eest kaitsta (Liu et al., 2012; Miajlovic et al., 2014). On ka võimalik, et komplekssoode, nagu LB, võib mõjutada raku vastust seerumile. Selline söötmest sõltuv erinevus metaboolses reaktsioonis seerumile, võiks vihjata põhjustele, miks käesolevas töös tehtud katsetes PBSi ja seerumi juuresolekul jäi ellu nii populatsioon, mis ei jagune, kui ka populatsioon, mis jagunes väga aktiivselt (joonis 10).

Käesolevas töös saadud tulemused, mis näitavad et suur osa kasvavaid CFT073 tüve rakke on seerumile tundlikud on näilises vastuolus varem avaldatud artiklitega kui CFT073 tüvi on kirjeldatud kui seerumiresistentne. Eelnevates töödes on küll demonstreeritud selle tüve suhteliselt kõrget resistentsust seerumile, aga katsete meetodika ei

ole päris sarnane (Buckles et al., 2009; Debnath et al., 2013; Miajlovic et al., 2014; Sarkar, Ulett, Totsika, Phan, & Schembri, 2014).

Esimeses viidatud artiklis (Buckles et al., 2009) on tehtud katseid CFT073 tüve, sama tüve kapslimutandi CFT73 ksl(k2)ABCDE ja kapslimutandi komplementeeritud vormiga. Nende saadud tulemuste kohaselt ei ole 10% inimese vereseerumil CFT073 tüvele tähelepanuväärset mõju. Käesoleva ja viidatud töö katse metoodikas on aga olulised erinevused. Viidatud töös on viidud katsed läbi viis korda madalama seerumi kontsentratsiooniga, mis, eeldades sama tihedusega rakususpensiooni kasutamist, tähendaks, et seerumi suhe rakkudele on 1:9, mitte 1:1 nagu käesolevas töös. Sellistel tingimustel kus seerumis sisalduvate toitainete konts. on madal, nagu näitab ka puuduv kasv HISiga inkubeeritud proovis, ei hakka bakterirakud kasvama ning sel juhul sobib see hästi käesolevas töös saadud tulemustega, et mittejagunevad rakud jäävad seerumi juuresolekul ellu.

Teises viidatud töös (Miajlovic, Cooke, Moran, Rogers, & Smith, 2014) tehti seerumkatseid CFT073 tüve eksponentsiaalse faasi rakkudega 50% seerumi manulusel ning ei nähtud mingit tähelepanuväärset efekti 3h jooksul. Nende katses kasutati aga umbes 10 korda rohkem rakke kui käesolevas töös. Sellise rakkude hulga jooksul võib seerumi suhteline nappus piiravaks muutuda. Käesoleva töö käigus on korratud katset sama rakutihedusega nagu viidatud töös ning saadud sarnaseid tulemusi – seerumil ei olnud tähelepanuväärset efekti.

Kolmandas viidatud töös (Sarkar, Ulett, Totsika, Phan, & Schembri, 2014) tehti CFT073 tüvega statsionaarse faasi rakkudega seerumkatseid 90 minuti jooksul 50% seerumi juuresolekul ja leiti, et see tüvi on suhteliselt resistentne seerumi mõjule. Selles katses kasutati küll 50% seerumit nagu käesolevas töös, kuid rakke tihedusel  $4 \times 10^8$  ml, mis on kümme korda suurem hulk kui kasutati käesoleva töö katsetes. Põhjus, miks katsete tulemused näiliselt vastukäivad on võib olla selles, et kuigi mõlemas töös on kasutatud statsionaarse faasi rakke, siis on võimalik, et viidatud töö katsete rakke on väga pikalt ette kasvatatud. Käesoleva töö puhul on täpselt määratletud, et rakke peab olema ette kasvatatud 20h, sest kui seda aega mõne tunni võrra ületada, siis jõuavad rakud nii sügavale statsionaarsesse faasi, et need ei lähe 90 minuti jooksul kasvama ning on seega ka immuunsed seerumi tapmisaktiivsuse suhtes. Käesoleva töö tegemise käigus on juhtunud, et rakke on kasvatatud ette näiteks 23h ning sel juhul pole rakud hakanud kasvama ka 150min katse jooksul. Samuti kehtib see ettekasvatamise aeg ainult konkreetse kasutatud loksuti puhul. Kasutades mõnd muud loksutit aeg, millega bakterirakud jõuavad sügavasse statsionaarse faasi, võib muutuda.

Neljandas viidatud töös (Debnath et al., 2013) tehti CFT073 tüve statsionaarse faasi rakkudega seerumkatseid 2,5h jooksul 20% seerumi juuresolekul ning leiti, et seerumil ei ole erilist efekti. Vastuolud käesolevas töödes tehtud katsetega võivad tuleneda jällegi sellest, et viidatud töö katsetes võivad olla rakud kasvatatud sügavasse statsionaarsesse faasi või sellest, et 20% seerumis ei ole piisavalt toitaineid. Mõlemal juhul ei läheks rakud korralikult kasvama ning see selgitaks nende resistentsust seerumile. Seda võimalust toetab asjaolu, et nende katses ei ole ka HIS-inkubeeritud rakkude puhul olulist kasvu näha. Erinevus käesolevas töös läbi viidud katsetest on ka see, et rakke on ka ette kasvatatud modifitseeritud M9 söötmes, mis võib samuti põhjustada erinevusi antud töö käigus LBs ette kasvatatud rakkudest.

Selle töö tulemustena on näidatud CFT073 väiksem resistentsus seerumile, kui varasemalt usutud ning on demonstreeritud subpopulatsiooni esinemine, mis ei jagune ning suudab elus püsida ka seerumi juuresolekul. Selle heterogeensuse tähtsus on selles, et paljud antibiootikumid mõjutavad rakke, mis kasvavad, ning seega rakud, mis on vastupidavad seerumile kuna ei paljune, oleksid samal põhjusel ka resistentsed paljudele antibiootikumidele (Kim Lewis, 2010). Samuti on see relevantne ka bakteriostaatiliste antibiootikumide puhul, mis peatavad rakkude kasvu ning selle töö tulemuste kohaselt parandaks nende võimet vastu pidada immuunsüsteemi rünnakule.

## Kokkuvõte

Töö eesmärkideks olid uurida *E. coli* tüve CFT073 seerumresistentsust üksikraku tasemel ja selgitada välja kas esineb erineva seerumitundlikkusega alampopulatsioone. Nende eesmärkide saavutamiseks inkubeeriti statsionaarse faasi rakke inimese vereseerumis ning jälgiti rakkude suremist ning jagunemist nii kahe kui ühe fluorestsentsmarkeri abil. Tulemusena on selge, et CFT073 tüvi ei ole seerumile täiesti resistentne, nagu varasemates töödes on väidetud vaid suur osa kasvavates rakkudest lüüsib seerumi juuresolekul. Rakujagunemise markerite kasutamisel on näha selge eristumine erineva resistentsusega populatsioonide vahel. LB juuresolekul jäävad seerumiga inkubeerides ellu ainult mittejagunevad rakud. Kui seerum lisatakse rakkudele, mis on PBS puhvril, siis on kõige vähem resistentsed rakud, mis jagunevad keskmise aktiivsusega ning ellu jäävad kaks populatsiooni, mis kas ei jagune või jagunevad väga aktiivselt.

Samuti avastati selle töö käigus, et rakujagunemise jälgimiseks ei ole soovitatav kasutada fluorestsentsvalku crimson, sest selle signaali tugevus on liiga madal, et oleks võimalik jagunevate ja mittejagunevate rakkude populatsioone eristada. Edaspidistes töödes on selleks otsustatavaks eesmärgipärasem kasutada kas GFP-d või mõnd muud tugeva signaaliga fluorestsentsvalku.

# The sensitivity of uropathogenic *E. coli* strain CFT073 to human blood serum

Markus Lippus

## Summary

Urinary tract infections are considered one of the most common infections in the world. Although benign in most cases, when untreated it can cause acute pyelonephritis and sepsis (Smith et al., 2010). The infection is predominantly caused by *Escherichia coli* and reoccurrences of this infection are in most cases even caused by the same strain. That means that the bacteria have evaded the immune system and survived treatment with antibiotics (Ejrnaes et al., 2006; Skjøt-Rasmussen et al., 2011). It is known that bacteria are able to survive treatment with antibiotics when in a dormant state. So if there is a population of bacteria that persist in spite of antibiotics and the immune system the question arises, whether the state of dormancy contributes to the immune evasion? For this thesis the complement system, a system of about 40 proteins that has an important part in both innate and adaptive immune system, was chosen for investigating tolerance towards the immune system (Murphy, 2011).

In this thesis the sensitivity of a uropathogenic *E. coli* strain CFT073 (Welch et al., 2002) to human blood serum was under investigation. It was decided to test the sensitivity on the single cell level and to verify whether there might be a variation in sensitivity to blood serum in the larger population. For flow cytometry two fluorescence markers were used: GFP for differentiating between cells and debris and crimson to observe proliferation through dilution of fluorescence protein. Stationary phase cells were tested in 50% normal human serum, 50% heat inactivated serum (HIS), LB medium or PBS and measurements for flow cytometry were taken every half an hour. It was found that the CFT073 strain is in fact much less resistant to the effects of human blood serum than previously believed (Buckles et al., 2009; Miajlovic et al., 2014) and the results gave reason to suspect that there might be populations with variable resistance to serum. These subpopulations, however, were undetectable with the original model because the signal from crimson was too low to differentiate populations with different proliferation speeds.

A new strain with a single fluorescence marker – GFP, was constructed to better differentiate between populations of different proliferation speeds. This model made it possible to separate two surviving subpopulations in the sample that was incubated in 50%

human serum: one population of very actively proliferating cells and another that did not proliferate at all. All cells with average speed of proliferation had been effectively lysed. This allows us to further hypothesize that cell dormancy may indeed protect cells from lysis by complement just as it protects them from several antibiotics.

## Kasutatud kirjandus

- Albert, X., Huertas, I., Pereiró, I. I., Sanfélix, J., Gosalbes, V., & Perrota, C. (2004). Antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in non-pregnant women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), CD001209. doi:10.1002/14651858.CD001209.pub2
- Allen, P. M., Roberts, I., Boulnois, G. J., Saunders, J. R., & Hart, C. A. (1987). Contribution of capsular polysaccharide and surface properties to virulence of *Escherichia coli* K1. *Infection and Immunity*, 55(11), 2662–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=259958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Anderson, G. G., Goller, C. C., Justice, S., Hultgren, S. J., & Seed, P. C. (2010). Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infection and Immunity*, 78(3), 963–75. doi:10.1128/IAI.00925-09
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5629), 105–7. doi:10.1126/science.1084550
- Bahagon, Y., Raveh, D., Schlesinger, Y., Rudensky, B., & Yinnon, A. M. (2007). Prevalence and predictive features of bacteremic urinary tract infection in emergency department patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 26(5), 349–52. doi:10.1007/s10096-007-0287-3
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5690), 1622–5. doi:10.1126/science.1099390
- Bigger, J. (1944). Treatment Of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation. *The Lancet*, 244(6320), 497–500. doi:10.1016/S0140-6736(00)74210-3
- Bone, R. C. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *CHEST Journal*, 101(6), 1644. doi:10.1378/chest.101.6.1644
- Buckles, E. L., Wang, X., Lane, M. C., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Rasko, D. A., ...  
Donnenberg, M. S. (2009). Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(11), 1689–97. doi:10.1086/598524
- Debnath, I., Norton, J. P., Barber, A. E., Ott, E. M., Dhakal, B. K., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2013). The Cpx stress response system potentiates the fitness and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 81(5), 1450–9. doi:10.1128/IAI.01213-12
- Donnenberg, M. (2002). *E. coli: Genomics, Evolution and Pathogenesis* (1st ed.). Elsevier Science. Retrieved from <http://books.google.ee/books?id=G0pshtCYhJEC>

- Dunkelberger, J. R., & Song, W. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34–50. doi:10.1038/cr.2009.139
- Ejrnaes, K., Sandvang, D., Lundgren, B., Ferry, S., Holm, S., Monsen, T., ... Frimodt-Moller, N. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis typing of Escherichia coli strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1776–81. doi:10.1128/JCM.44.5.1776-1781.2006
- Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month : DM*, 49(2), 53–70. doi:10.1067/mda.2003.7
- Foxman, B., Gillespie, B., Koopman, J., Zhang, L., Palin, K., Tallman, P., ... Marrs, C. F. (2000). Risk Factors for Second Urinary Tract Infection among College Women. *American Journal of Epidemiology*, 151(12), 1194–1205. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a010170
- Gerdes, K., & Maisonneuve, E. (2012). Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annual Review of Microbiology*, 66, 103–23. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150159
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108. doi:10.1038/nrmicro821
- Haugen, B. J., Pellett, S., Redford, P., Hamilton, H. L., Roesch, P. L., & Welch, R. A. (2007). In vivo gene expression analysis identifies genes required for enhanced colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic Escherichia coli strain CFT073 dsdA. *Infection and Immunity*, 75(1), 278–89. doi:10.1128/IAI.01319-06
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E., ... Hultgren, S. J. (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic Escherichia coli. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000305. doi:10.1371/journal.ppat.1000305
- Herbert, D., Paramasivan, C. N., Venkatesan, P., Kubendiran, G., Prabhakar, R., & Mitchison, D. A. (1996). Bactericidal action of ofloxacin, sulbactam-ampicillin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(10), 2296–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hunstad, D. A., & Justice, S. S. (2010). Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic Escherichia coli. *Annual Review of Microbiology*, 64, 203–21. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134258
- Johnson, D. E., Russell, R. G., Lockett, C. V, Zulty, J. C., & Warren, J. W. (1993). Urethral obstruction of 6 hours or less causes bacteriuria, bacteremia, and pyelonephritis in mice challenged with “nonuropathogenic” Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 61(8), 3422–3428. Retrieved from [http://iai.asm.org/content/61/8/3422.abstract?ijkey=478e83c514d054c476fad9da43f55581439f8d54&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://iai.asm.org/content/61/8/3422.abstract?ijkey=478e83c514d054c476fad9da43f55581439f8d54&keytype2=tf_ipsecsha)
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80–128. doi:10.1128/CMR.4.1.80.Updated

- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80–128. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358180&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Harper, J. R., Duguay, A. R., Pinkner, J. S., Bann, J., ... Hultgren, S. J. (2005). Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7680–6. doi:10.1128/JB.187.22.7680-7686.2005
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 123–40. doi:10.1038/nrmicro818
- Kemper, C., Atkinson, J. P., & Hourcade, D. E. (2010). Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annual Review of Immunology*, 28, 131–55. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101250
- 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*, 186(24), 8172–80. doi:10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004
- Laarman, A., Milder, F., van Strijp, J., & Rooijackers, S. (2010). Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 88(2), 115–20. doi:10.1007/s00109-009-0572-y
- Lane, M. C., Lockatell, V., Monterosso, G., Lamphier, D., Weinert, J., Hebel, J. R., ... Mobley, H. L. T. (2005). Role of motility in the colonization of uropathogenic Escherichia coli in the urinary tract. *Infection and Immunity*, 73(11), 7644–56. doi:10.1128/IAI.73.11.7644-7656.2005
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999–1007. doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(1), 48–56. doi:10.1038/nrmicro1557
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357–72. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Li, G., Laturnus, C., Ewers, C., & Wieler, L. H. (2005). Identification of genes required for avian Escherichia coli septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity*, 73(5), 2818–27. doi:10.1128/IAI.73.5.2818-2827.2005
- Litwin, C. M., & Calderwood, S. B. (1993). Role of Iron in Regulation of Virulence Genes, 6(2). doi:10.1128/CMR.6.2.137.Updated
- Liu, Y.-F., Yan, J.-J., Lei, H.-Y., Teng, C.-H., Wang, M.-C., Tseng, C.-C., & Wu, J.-J. (2012). Loss of outer membrane protein C in Escherichia coli contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. *Infection and Immunity*, 80(5), 1815–22. doi:10.1128/IAI.06395-11
- Markiewski, M. M., DeAngelis, R. A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S. K., Koutoulaki, A., Gerard, C., ... Lambris, J. D. (2008). Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nature Immunology*, 9(11), 1225–35. doi:10.1038/ni.1655

- Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S., & Hultgren, S. J. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, *19*(12), 2803–12. doi:10.1093/emboj/19.12.2803
- McDermott, W. (1958). Microbial persistence. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *30*(4), 257–91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2603844&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Miajlovic, H., Cooke, N. M., Moran, G. P., Rogers, T. R. F., & Smith, S. G. (2014). Response of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* to human serum reveals a protective role for Rcs-regulated exopolysaccharide colanic acid. *Infection and Immunity*, *82*(1), 298–305. doi:10.1128/IAI.00800-13
- Mikelsaar, M., & Türi, E. (1998). *Kliinilise mikrobioloogia käsiraamat* (pp. 43–65).
- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockett, C. V., ... Warren, J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infection and Immunity*, *58*(5), 1281–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=258621&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mulvey, M. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, *4*(5), 257–271. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x
- Mulvey, M. a. (1998). Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, *282*(5393), 1494–1497. doi:10.1126/science.282.5393.1494
- Mulvey, M. A., Schilling, J. D., & Hultgren, S. J. (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infection and Immunity*, *69*(7), 4572–9. doi:10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001
- Murphy, K. (2011). *Janeway's immunobiology* (8th Editio., pp. 48–72). New York: Garland Science.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(45), 26723–26726. doi:10.1074/jbc.270.45.26723
- Paramasivan, C. N., Sulochana, S., Kubendiran, G., Venkatesan, P., & Mitchison, D. A. (2005). Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(2), 627–31. doi:10.1128/AAC.49.2.627-631.2005
- Roostalu, J., Jöers, A., Luidalepp, H., Kaldalu, N., & Tenson, T. (2008). Cell division in *Escherichia coli* cultures monitored at single cell resolution. *BMC Microbiology*, *8*, 68. doi:10.1186/1471-2180-8-68
- Rotem, E., Loinger, A., Ronin, I., Levin-Reisman, I., Gabay, C., Shores, N., ... Balaban, N. Q. (2010). Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(28), 12541–6. doi:10.1073/pnas.1004333107

- Russo, T. a, & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(5), 1753–4. doi:10.1086/315418
- Ryan, K., & Ray, C. (2004). *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases* (4th ed., pp. 48–71). McGraw Hill. doi:10.1036/0838585299
- Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M.-D., & Schembri, M. A. (2014). Role of Capsule and O Antigen in the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *PloS One*, *9*(4), e94786. doi:10.1371/journal.pone.0094786
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and Tissue Research*, *343*(1), 227–35. doi:10.1007/s00441-010-1034-0
- Schappert, S. (1998). Vital and Health Statistics, Ambulatory Care Visits to Physician Offices, Hospital Outpatient Departments, and Emergency Departments: United States,. *National Center for Health Statistics*, *13*(143). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Vital+and+Health+Statistics+Ambulatory+Care+Visits+to+Physician+Offices+,+Hospital+Outpatient+Departments+,+and+Emergency+Departments+:#0>
- Scholl, D., Adhya, S., & Merrill, C. (2005). *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(8), 4872–4. doi:10.1128/AEM.71.8.4872-4874.2005
- Schwan, W. R. (2008). Flagella allow uropathogenic *Escherichia coli* ascension into murine kidneys. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, *298*(5-6), 441–7. doi:10.1016/j.ijmm.2007.05.009
- Scott, K. R. (1989). *Goth's medical pharmacology*. 12th edition. By W. G. Clark, D. C. Brater, and A. R. Johnson. Mosby: St. Louis. 1988. 835 p. 19 × 24 cm. ISBN 0-8016-1167-9. \$36.95. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *78*(1), 628–714. doi:10.1002/jps.2600780121
- Skjøt-Rasmussen, L., Hammerum, A. M., Jakobsen, L., Lester, C. H., Larsen, P., & Frimodt-Møller, N. (2011). Persisting clones of *Escherichia coli* isolates from recurrent urinary tract infection in men and women. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(Pt 4), 550–4. doi:10.1099/jmm.0.026963-0
- Smith, S. N., Hagan, E. C., Lane, M. C., & Mobley, H. L. T. (2010). Dissemination and systemic colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in a murine model of bacteremia. *mBio*, *1*(5), e00262–10–. doi:10.1128/mBio.00262-10
- Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*, *344*(14), 1058–66. doi:10.1056/NEJM200104053441406
- Wang, X., & Wood, T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(16), 5577–83. doi:10.1128/AEM.05068-11
- Watts, R. E., Totsika, M., Challinor, V. L., Mabbett, A. N., Ulett, G. C., De Voss, J. J., & Schembri, M. A. (2012). Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *80*(1), 333–44. doi:10.1128/IAI.05594-11

- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., ... Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17020–4. doi:10.1073/pnas.252529799
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11–9. doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.007
- Wright, K. J., Seed, P. C., & Hultgren, S. J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cellular Microbiology*, 9(9), 2230–41. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x
- Yan, F., & Polk, D. B. (2004). Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current Opinion in Gastroenterology*, 20(6), 565–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703684>
- Zhang, J. P., & Normak, S. (1996). Induction of Gene Expression in *Escherichia coli* After Pilus-Mediated Adherence. *Science*, 273, 1234–1236. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/273/5279/1234.full.pdf>

## Tänu sõnad

Selle töö tegemise juures abistamise eest peaksin kindlasti tänama Vallo Varikut, kes õpetas mind automaatpipetti õiget pidi käes hoidma ja Marta Putrinšit, kes hoidis mu kätt voolutsütomeetria ja muude keeruliste meetodite õppimisel ning selgitas korduvalt ja aeglaselt, mida ja miks ma valesti teen ning kuidas tegelikult tehakse. Samuti olen tänu võlgu ka Niilo Kaldalule, Toomas Metsale, Arvi Jõersile ja kõigile teistele antibiootikumide töögrupi liikmetele, kes kahe aasta jooksul on kannatlikult ja järjekindlalt mu küsimustele vastanud, töömeetodeid selgitanud ja näidanud, millisest karbist mida leiab ja millisel masinal milliseid nuppe vajutama peab. Ning kindlasti kuulub tänunimekirja ka Tanel Tenson, kes mu esmakursuslasena oma laborisse võttis ja mulle juhendaja ja uurimisobjekti leidis.

# **Lihtlitsents**

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

Mina, Markus Lippus,

(sünnikuupäev: 11.05.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Uropatogeense E. coli, CFT073, tundlikus vereseerumile“, mille juhendaja on Marta Putrinš,
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace 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, 26.05.2014