

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Regina Maruste

***Escherichia coli* äratussignaali olemasolu erinevates bakteritüvedes**

Bakalaureusetöö

Juhendaja vanemteadur Arvi Jõers

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Bakterite kasvufaasid	6
1.2 Väljumine statsionaarsest faasist	8
1.2.1 Spooride idanemine.....	8
1.2.2 <i>E.coli</i> väljumine statsionaarsest faasist	10
1.2.2.1 Persisterid ja nende aktivatsioon	10
1.2.2.2 VBNC seisund ja sellest väljumine	11
1.3 Rakkude-vaheline signalisatsioon	14
1.3.1 Kahekomponentne QS süsteem.....	14
1.3.2 LuxI/LuxR süsteem	16
1.3.3 QS süsteem <i>Vibrio harveyi</i> 's	18
1.4 Statsionaarsest faasist väljumise regulatsioon signaalmolekulidega.....	20
1.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	20
1.4.2 <i>Micrococcus luteus</i>	22
1.4.3 <i>Mycobacterium</i>	23
1.4.4 <i>Escherichia coli</i>	23
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	25
2.1 Töö eesmärgid	25
2.2 Materjalid ja meetodika.....	26
2.2.1 Materjalid	26
2.2.2 Bakterite kompetentseteks muutmine ja transformeerimine	27
2.2.2.1 BW25113 ja MG1655	27
2.2.2.2 BL21(DE3)	28
2.2.3 Söötmete konditsioneerimine	29
2.2.4 GFP signaali tugevuse mõõtmine	29
2.2.5 Katsete ülesehitus	29
2.3 Tulemused	31
2.3.1 Faktor X sisaldus kasvamahakkavas kultuuris muutub ajas.....	31
2.3.2 Faktor X-i toodavad erinevad <i>E.coli</i> tüved.....	32

2.3.2.1 Laboritüved BW25113, MG1655, BL21(DE3).....	32
2.3.2.2 Tüved CFT073 ja env76.....	33
2.3.3 Faktor X on erinevate tüvede vahel vastastikku äratuntav	35
2.4 Arutelu	40
KOKKUVÕTE.....	43
SUMMARY	44
KIRJANDUSE LOETELU.....	45
LIHTLITSENTS.....	49

KASUTATUD LÜHENDID

AI – autoinduktor (*autoinducer*)

CA domään – katalüütiline ja ATPaasne (*catalytic and ATPase*) domään

CSF – kompetentsuse ja sporulatsiooni faktor (*competence and sporulation factor*)

DHp domään – dimerisatsiooni ja histidiini fosfotransferaasne (*dimerization and histidine phosphotransferase*) domään

DPA – dipikoliinhape (*dipicolinic acid*)

EF-G – elongatsiooni faktor G (*elongation factor G*)

EHEC – enterohemorraagiline *E.coli* (*enterohaemorrhagic E.coli*)

g – suhteline tsentrifugaaljõud

GASP – kasvueelis statsionaarses faasis (*growth advantage in stationary phase*)

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

Glc – glükoos

Glt – glükonaat

Gly – glütserool

HSL – homoseriinlaktoon (*homoserine lactone*)

MIC – minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (*minimum inhibitory concentration*)

MOPS – 3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*)

PASTA – penitsilliini ja Ser/Thr kinaasiga seotud (*penicillin and Ser/Thr kinase associated*)

Rpf – kasvamahakkamist soodustav faktor (*Resuscitation promoting factor*)

rpm – pöördeid minuti kohta (*rotations per minute*)

TA – toksiin-antitoksiin (*toxin-antitoxin*)

VBNC – elus, kuid mittekultiveeritav (*viable but non-culturable*)

SISSEJUHATUS

Paljud bakterid elavad ebasoodsad elutingimused üle soikeseisundisse jäädes. Soikeseisundis bakterid ei kasva ega paljune ning nende metabolism on aeglustunud (Dworkin *et al.*, 2010). Soikeseisundi esinemine bakterite populatsioonis võib seletada, miks osad haigused pidevalt tagasi tulevad peale antibiootikumidega ravimist, nagu seda juhtub tuberkuloosi puhul. Kui väike hulk soikeseisundis olevaid rakke pääseb nii peremehe immuunsüsteemi kui ka antibiootikumide ravi eest, võib hiljem osa neist uuesti kasvama hakata ning ilmnevad haiguse sümptomid. Peale ravimist haiguse sümptomid kaovad, kuid haigustekitaja ei pruugi olla kadunud ning mõne aja pärast võivad uuesti osad uinunud rakud üles ärgata ning haigus lööb uuesti välja. Mõnedes bakteriliikides sekreteerivad aktiivseks muutunud rakud keskkonda ühendeid, mis indutseerivad soikeseisundist väljumist ka teistes rakkudes (Epstein, 2009). *Escherichia coli* BW25113 tüvi on üks neist, kes selliseid äratussignaale sekreteerib (Tüür, 2013). Kui äratussignaale toodavad ka teised *E.coli* tüved, kaasaarvatud patogeensed tüved, saab *E.coli* põhjustatud haiguse puhul välja töötada ravikuuri, kus äratussignaalide abil indutseeritakse võimalikult palju rakke soikeseisundist väljuma ja seeläbi muudetakse antibiootikumide ravi efektiivsemaks (Epstein, 2009).

Käesoleva töö teoreetilises osas käsitletakse bakterite kasvufaase, väljumist statsionaarsest faasist, bakterite vahelisi signaliseerimise viise ning tuuakse näiteid erinevatest bakteritüvedest, kus reguleeritakse signaalmolekulide abil rakkude statsionaarsest faasist väljumist.

Käesoleva töö praktilises osas uuritakse, kas lisaks *E.coli* BW25113 tüvele sekreteerivad ka teised *E.coli* MG1655, BL21(DE3), CFT073 ja env76 tüved äratussignaale ning kas äratussignaalid on erinevate tüvede vahel vastastikku äratuntavad. Töö praktiline osa teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Märksõnad: *Escherichia coli*, äratussignaal, signaalmolekul, *bet-hedging*

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Bakterite kasvufaasid

Bakterite kasvufaasid ei iseloomusta mitte üksiku bakteriraku suurust või massi, vaid terve populatsiooni kasvu. Sõltuvalt bakterite pooldumise kiirusest ja füsioloogilisest seisundist saab kasvufaase jaotada neljaks: lag-faas, eksponentsiaalne faas, aeglustuv faas ja statsionaarne faas (Taylor, 2001).

Lag-faas on periood, mil rakud on sattunud uude keskkonda ning toimub kohanemine uute keskkonnatingimustega. Lag-faasis muutuvad bakterid aktiivseks ning hakkavad tegema ettevalmistusi eksponentsiaalsesse kasvufaasi minekuks. Esiteks hakatakse ümbritsevast keskkonnast toitaineid rakku transportima, peamiselt süsiniku- ja lämmastikuallikaid ning fosfaate. Lisaks toitainete transpordile toimub ka veesisalduse tõus raku, erinevate ensüümide aktiveerimine, statsionaarses faasis toimunud DNA ja valkude oksüdatiivsete kahjustuste parandamine, ribosoomide süntees, translatsioon, transkriptsioon ning metallioonide kontsentratsiooni reguleerimine raku sees (Rolfe *et al.*, 2012). Lag-faasi pikkus sõltub sellest, millises keskkonnas bakterid varasemalt kasvasid. Juhul kui bakterid kasvasid eelmises keskkonnas kiiresti ning uus keskkond on sarnane eelmisele, on lag-faas lühike. Kui uues keskkonnas on teistsugune süsinikuallikas, peab bakter oma metabolismi ümber korraldama, sünteesima uues ensüümid ning lag-faas on pikem (Taylor, 2001). Lag-faasi vältel muutuvad bakterid mõõtmetelt suuremaks ja lag-faasi lõpuks on bakterirakk saavutanud oma maksimaalse suuruse kõikide kasvufaaside vältel (Taylor, 2001; Koch, 2001).

Lag-faasile järgneb eksponentsiaalne faas. Selles faasis on bakterite metabolism väga aktiivne ning generatsiooniaeg kõige lühem võrreldes teiste kasvufaasidega. Minimaalne generatsiooniaeg varieerub liigiti. Näiteks *E.coli* minimaalne generatsiooniaeg on selles faasis 21 minutit, kuid *Bacillus stearothermophilus* generatsiooniaeg on 9 minutit. Bakterirakkude arv populatsioonis kasvab eksponentsiaalselt ajaga ning kasvukiirus püsib konstantsena (Taylor, 2001).

Eksponentsiaalse kasvu tõttu jääb ümbritsevas keskkonnas toitaineid järjest vähemaks ning bakterite elutegevuse tagajärjel tekkinud jääkained akumuluvad keskkonda. Bakterite kasvuks tähtsad ühendid, mida ise toota ei suudeta, on näiteks erinevad süsinikuallikad, vitamiinid ja mõned anorgaanilised ühendid (Schaetcher, 2012). Kui nende ühendite hulk langeb ja jääkainete hulk tõuseb teatud piirini, toimub bakterirakkude metabolismi aeglustumine ning

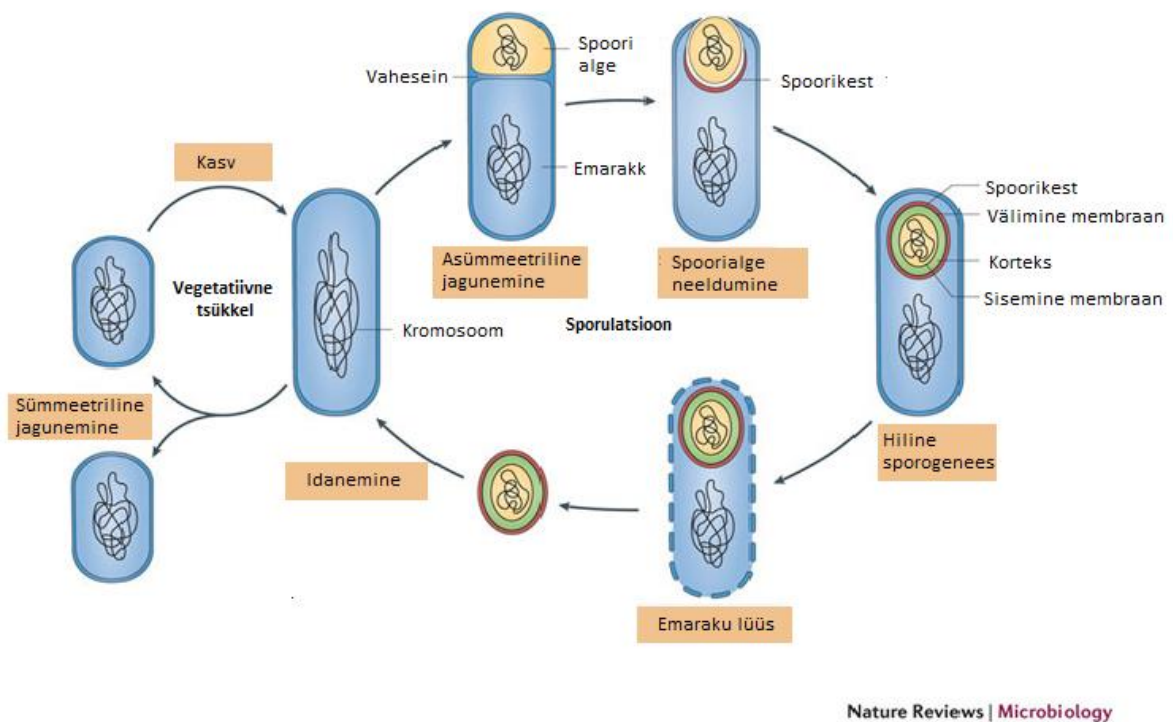
generatsiooniaeg pikeneb. Faas, kus sellised protsessid toimuvad, nimetatakse aeglustuvaks kasvufaasiks (Taylor, 2001).

Faas, kus bakterite populatsiooni kasv on lõppenud, nimetatakse statsionaarseks faasiks (Schaetcher, 2012). Enamasti statsionaarses faasis rakud ei sure ega jagune, vaid nad jäävad püsima ehk nende metabolismis ei toimu enam mingeid ulatuslikke muutusi. Vahel võib tekkida tasakaal surevate ja uute moodustuvate rakkude vahel: osa rakke sureb, osad rakud jagunevad. Selline olukord on pigem erandlik (Taylor, 2001). Kuna statsionaarses faasis on enamik toitaineid keskkonnast ammendatud, siis ei saa bakterid enam edasi kasvada ning nende ainevahetuses toimuvad muutused ebasoodsate aegade üleelamiseks. Sporuleeruvad bakterid hakkavad moodustama spoore, mittesporuleeruvad jäävad muul moel soikeseisundisse. Pikema aja jooksul võib osades mitte-sporuleeruvate bakterite (sh. *E.coli*) populatsioonides tekkida GASP mutandid. GASP (*growth advantage stationary phase*) kujutab endast nähtust, kus statsionaarses faasis tekivad mõnedes bakterites mutatsioonid ning tänu nendele mutatsioonidele saavutatakse eelis samas populatsioonis olevate bakterite ees. Bakterid, kes ei suuda kohaneda uute tingimustega, surevad ja GASP mutandid kasutavad ära surnud bakteritest vabanenud toitained. Ellujääv populatsioon muutub GASP-i fenomeni tõttu väga dünaamiliseks ja geneetiliselt mitmekesiseks. Mida kauem statsionaarne faas kestab, seda rohkem mutante tekib ning samal ajal konkureerib iga uus mutantide generatsioon vanaga (Bacun-Družina *et al.*, 2011).

1.2 Väljumine statsionaarsest faasist

1.2.1 Spooride idanemine

Elutingimuste halvenedes jäävad bakterid soikeseisundisse, kus tema metabolism on aeglustunud. Mõned bakterid moodustavad spoores. Seda protsessi nimetatakse sporogeneesiks (joonis 1) (Heritage et al., 1996). Sporogenees algab raku asümmeetrilise jagunemisega, mille tulemusena tekib spoori alge ja emarakk, mis on eraldatud vaheseinaga. Seejärel neelab emarakk spoori alge, mille tõttu tekib ümber spoori alge kahekordne membraan. Spoorikest moodustub vahetult peale spoori alge neeldumise algust ja jätkub terve sporogeneesi vältel. Hilise sporogeneesi etapil tekib kahekordse membraani vahele peptidoglükaani korteks, kuhu sünteesitakse kaltsiumdipikoliinhapet. Osad bakterid sünteesivad spoori ümber ka eksosporiumi. Viimasel sporogeneesi etapil lüüsitakse spoori sisaldav emarakk ning spoor vabaneb (McKenney *et al.*, 2013). Vabanenud spoorid on väga vastupidavad struktuurid: nad taluvad kõrgeid temperatuure, toitainete nappust, kuivust, desinfitseerijate keemilist mõju ning UV-kiirgust (Heritage et al., 1996).



Joonis 1. Bakteri *Bacillus subtilis* spooride idanemine (McKenney *et al.*, 2013).

Soikeseisundis olevad bakterid peavad pidevalt jälgima, kas neid ümbritsevas keskkonnas on piisavalt toitaineid, et taaskäivitada kasv ja jagunemine. Keskkonnas olevad toitained seotakse vastavate retseptoritega spoori plasmamembraanil. Spooride idanemise mehhanismi on kõige enam uuritud *Bacillus subtilis*'el (joonis 1), kellel on kolme tüüpi toitaineid siduvaid retseptoreid: GerA, GerB ja GerK. GerA retseptor tunneb ära ja seondub L-alaniiniga ning GerB seondub D-alaniiniga. GerK retseptor moodustab asparagiini, glükoosi, fruktoosi ja kaaliumi katioonide abil GerB retseptoriga kompleksi. Kui mõni nendest retseptoritest on seondunud kas aminohappe, suhkru, puriini nukleosiidi või mõnda teist toitaineid äratundva retseptoriga, avatakseioon/DPA kanalid. Kõigepealt vabanevad spoori tuumikust (*core*) H^+ , Zn^{2+} ja monovalentsed katioonid. H^+ väljavoolu tõttu tõuseb spoori sisemuses pH 6,5-lt 7,7-le. Selline pH muutus on vajalik ensüümide aktiveerimiseks. Lisaks katioonide väljavoolule vabaneb spoorist suurel hulgal dipikoliinhapet (DPA). Samal ajal algab vee sissevool spoori läbi akvaporiinide. Veehulga tõusuga hakkab spoor järk-järgult kaotama oma vastupanuvõimet ebasoodsatele keskkonnatingimustele. Alguses toimub osaline spoori tuumiku hüdratiseerimine. Nii aktiveeritakse tuumikus olevad ensüümid, mis hakkavad lüüsima peptidoglükaanist koosnevat korteksit. Korteksi lüüsimisel suureneb vee osakaal veelgi ning spoori tuumik paisub. Kui veehulk spooris on piisavalt tõusnud, siis käivitub raku metabolism ning hakatakse tootma erinevaid makromolekule. Idanemise viimasel etapil spoori pealmised kihid lüüsitakse ning vabaneb vegetatiivne rakk, mis on jälle võimeline poolduma ja panema aluse uuele populatsioonile (Setlow, 2003).

Lisaks toitainetele võivad spooride idanemist indutseerida ka lüesosüümid, soolad, kõrge rõhk, Ca^{2+} -DPA ja katioonsed pindaktiivsed ained nagu näiteks dodetsüülamiin. Lüesosüümid on võimelised lagundama spooride korteksit, mille tagajärjel vabaneb DPA ning kui panna sellised spoorid hüpertoonilisse lahusesse, hakkab vee osakaal spooris tõusma ning toimub idanemine. Kui spooril puuduvad retseptorid, mis seonduvad toitainetega, on tal võimalik idaneda ka Ca^{2+} -DPA lisamisel keskkonda või välisrõhu tõstmisel. Ca^{2+} -DPA aktiveerib spoorides olevaid korteksi lüüsivaid ensüüme. Rõhu tõstmisel üle 200 MPa avanevadioon/DPA kanalid. Soolade mõjul suudavad vaid vähesed bakteriliikide spoorid idaneda. Näiteks *B. megaterium*'i spoorid suudavad idaneda KBr mõjul (Setlow, 2003).

1.2.2 *E.coli* väljumine statsionaarsest faasist

Bakterikultuuris, kus on geneetiliselt identsed bakterid, võivad esineda subpopulatsioonid, mis on füsioloogiliselt üksteisest erinevad. Selline heterogeenne fenotüüp esineb sporuleeruvate kui ka mitte-sporuleeruvate bakterite kultuurides. *E.coli* populatsioonides esinevad lisaks kasvavatele rakkudele veel persisterid ja VBNC (*viable but non-culturable*) seisundis olevad rakud (Jöers *et al.*, 2010). Arvatakse, et persisterite ja VBNC seisundi esinemine on mitte-sporuleeruvate bakterite viis ebasoodsate aegade üleelamiseks (Kussell *et al.*, 2005; Fakruddin *et al.*, 2013).

1.2.2.1 Persisterid ja nende aktivatsioon

Persisterid on bakterite populatsioonis olevad rakud, mis ei kasva ega sure antibiootikumide juuresolekul (Keren *et al.*, 2004). Nad on geneetiliselt identsed samas populatsioonis olevate aktiivsete bakterirakkudega. Neil ei ole geneetilist resistentsust antibiootikumide suhtes – nad küll taluvad kõrgeid antibiootikumide kontsentratsioone, kuid nad ei kasva antibiootikumide juuresolekul. On leitud erinevaid mehhanisme, kuidas bakter muutub tolerantseks antibiootikumide suhtes, kuid neil kõigil on ühine joon. Kõikide mehhanismide eesmärk on takistada antibiootikumi seondumast oma sihtmärgiga. Persisterid taluvad kõrgeid antibiootikumide kontsentratsioone, kuna nad on blokeerinud antibiootikumide sihtmärgid (Lewis, 2007). Ilmekaks näiteks on beeta-laktaamidele tolerantseid persisterid. Bakterid peavad pooldumisel lagundama rakukesta koostises olevaid peptidoglükaane, et rakukest muutuks pooldumise kohas piisavalt elastseks kahe raku eraldumiseks. Kui pooldumine on lõppemas, sünteesitakse peptidoglükaanid tütarakkude rakukesta koostisesse tagasi (Waterbury, 1979). Beetalaktaam-antibiootikumid, sh ka näiteks penitsilliin, inhibeerivad peptidoglükaanide sünteesi bakterite pooldumisel. Selle tagajärjel aktiveeruvad raku seinas olevad autolüsiinid, mis hakkavad lagundama peptidoglükaani ning mille tulemusena rakk sureb. Kuna persisterid on soikeseisundis ega pooldu, ei toimu ka peptidoglükaanide lagundamist ja uuesti sünteesi. See tähendab, et beeta-laktaamid on kaotanud oma sihtmärk-molekuli ega saa bakterile enam mõju avaldada (Lewis, 2007).

Täpsed mehhanismid, kuidas persisterid moodustuvad, ei ole siiani teada, kuid esimesed edusammud on selles suunas tehtud. 1983. aastal avastasid Moyed ja Bertrand *E.coli* K-12 tüvest

geeni *hipA* (*high persistence*), mis määrab ära persisterite esinemise sageduse populatsioonis (Moyed *et al.*, 1983). *HipA* alleelid paiknevad *HipBA* operonis. Kahe punktmutatsiooniga *hipA7* alleeli puhul tõuseb mutantse populatsiooni tolerantsus rakuseinale mõjuvate antibiootikumide, kuumuse, DNA-d kahjustavate ainete ja fluorokinoloonide suhtes. Võrreldes metsiktüüpi tüvega, on *hipA7* mutantide populatsioonis persistereid 1000 korda rohkem, samal ajal on kasvava populatsiooni tundlikkus (minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon, MIC) antibiootikumidele jäänud samaks. *HipBA* operon kodeerib TA (toksiin-antitoksiin) moodulit. Tavaliselt on TA moodulis toksiiniks valk, mis inhibeerib mõnda tähtsat rakulist funktsiooni, nagu näiteks translatsiooni või replikatsiooni. Kui toksiin seondub antitoksiiniga, muutub toksiin inaktiivseks. *HipBA* operoni poolt kodeeritud TA moodulis on toksiiniks *HipA*, mille üleekspresseerimisel peatub raku jagunemine. *HipB* on antitoksiin – ta on *HipBA* operoni repressor. Toksiin on stabiilne ühend, kuid antitoksiin on ebastabiilne. Kui rakkudes aktiveeritakse mingil põhjusel proteaasid, hakkab antitoksiini kontsentratsioon proteolüüsi tõttu järk-järgult langema, kuid toksiini kontsentratsioon jääb rakus samaks. Kui toksiini kontsentratsioon on piisavalt palju kõrgem antitoksiini omast, peatub raku jagunemine ning seeläbi muutub rakk antibiootikumide suhtes tolerantseks, ehk teisisõnu, rakk muutub persisteriks (Keren *et al.*, 2004).

Persisterid ei püsi lõputult soikeseisundis. Nad võivad spontaanselt tagasi muutuda kasvavateks rakkudeks. Kui toitaineid on piisavalt ja muud eluks vajalikud tingimused on täidetud, suudavad normaalseteks rakkudeks muutunud persisterid aluse panna uuele populatsioonile, mis on taas tundlik antibiootikumide suhtes. Uues populatsioonis leidub jällegi väike osa rakke, milles toimuvad fenotüübilised ümberlülitused ning mille tagajärjel muutuvad nad persisteriteks. *E.coli* metsiktüüpi tüves leidub 10^5 - 10^6 raku kohta 1 persister (Kussell *et al.*, 2005), kuid see number võib olla ka palju suurem sõltudes keskkonnatingimustest. Mida kauem rakukultuur statsionaarses faasis püsib, seda suuremaks persisterite osakaal populatsioonis tõuseb (Luidalepp *et al.*, 2011). Persisterite esinemine bakteri populatsioonis on tähtis, sest nad võivad stressi tingimustes päästa populatsiooni väljasuremisest (Kussell *et al.*, 2005).

1.2.2.2 VBNC seisund ja sellest väljumine

VBNC (*viable but nonculturable*) kujutab endast seisundit, kus bakter on metaboolselt ja füsioloogiliselt aktiivne, kuid ei suuda siiski paljuneda ega alust panna uuele populatsioonile, seda ka kasvu soosivas keskkonnas. Enamik baktereid, kes sisenevad VBNC seisundisse,

kuuluvad gammaproteobakterite klassi, sh ka *E.coli*. VBNC seisundi avastasid Bashford ja tema kolleegid 1979. aastal, kui nad eraldasid jõgedest ja äravoolu kraavidest *Vibrio cholerae* tüvesid ning hiljem kultiveerisid neid laboris. Sarnase fenomeni avastasid samal ajal ka Colwell ja kolleegid *Vibrio cholerae* ja *E.coli* tüvedes. Tavalisel agari-plaadil VBNC bakterid kolooniaid ei moodusta, kuid tarbivad siiski söötmes olevaid substraate ning edastavad signaale keskkonda, mis näitavad, et nad ei ole surnud. 1982. aastal võtsid termini „*viable but nonculturable*“ kasutusele Xu ja tema kolleegid, et kirjeldada selliseid rakke, mis on metaboolselt aktiivsed, kuid ei suuda paljuneda (Fakruddin *et al.*, 2013). Hetkel on mikrobioloogid jagunenud kahte leeri. Osad teadlased usuvad, et VBNC seisundi esinemine osades bakteri populatsioonides on strateegia ebasoodsate keskkonna tingimuste üleelamiseks. Teised teadlased on jällegi arvamusel, et VBNC seisund on tekkinud siis, kui bakteris on stressi tõttu käivitunud degeneratiivsed protsessid ning bakter hakkab surema (Muela *et al.*, 2008).

Rakud võivad siseneda VBNC seisundisse, kui elutingimused on muutunud ebasoodsateks, näiteks toitainete hulk on kasvukeskkonnas vähenenud, temperatuur on liiga kõrge või madal, toimunud on järsk muutus keskkonna pH-s või NaCl kontsentratsioonis, rakus on tekkinud osmootne stress, hapniku kättesaadavus on halvenenud, tekkinud on mehaaniline kahjustus või rakust on puudu tähtsaid rakulisi komponente, rakud puutuvad kokku säilitusainete, raskemetallide või valge valgusega või kui lüsogeensed faagid, suitsiidgeenid või autolüsiinid aktiveeritakse (Fakruddin *et al.*, 2013). VBNC seisundisse minnes kahanevad bakteriraku mõõtmed, toitaineid transportitakse rakku vähem, makromolekulaarseid ühendeid hakatakse sünteesima vähem ning rakk hakkab ka hapnikku vähem tarbima. ATP kontsentratsioon ja membraanipotentsiaal jäävad siiski püsima. Rakk jätkab VBNC seisundis aminohapete sünteesi ning vajadusel nende rakku sisse transportimist (Oliver, 2009). Raku välismembraanis toimuvad valkude ümberkorraldused, et rakk oleks vastupidavam ebasoodsates keskkonna tingimustes. Tsütoplasmaatilises membraanis toimuvad ulatuslikud muutused lipiidide koostises, et membraan säilitaks oma voolavuse ning rakk suudaks lahustada teatud valke (Muela *et al.*, 2008). Lisaks tõuseb raku seina koostises olevates peptidoglükaanides ristsidemete arv ning glükaaniahelad lühenevad. Kuna VBNC seisundis olevate bakterirakkude metaboolne aktiivsus on madal, on nad ka antibiootikumide suhtes vastupidavamad kui normaalsed rakud (Fakruddin *et al.*, 2013).

VBNC seisundist väljumise mehhanismi on enim uuritud *Vibrio vulnificus*'es. Kõige lihtsam viis, kuidas indutseerida bakterite väljumist VBNC seisundist, on keskkonna temperatuuri muutmine. Kui bakter on läinud VBNC seisundisse keskkonna temperatuuri languse tõttu, on võimalik tal

sealt väljuda temperatuuri tõstmisel. Bakter võib väljuda VBNC seisundist ka mõne bioloogilise vahendaja abil (Oliver, 2009). Näiteks *Legionella pneumophila* on patogeenne bakter, mis on võimeline nakatama mitmeid vabalt elavaid algloomade tüvesid (Lau *et al.* 2008). *L. pneumophila* võib siseneda VBNC seisundisse toitainete puudusel või hüpokloriidiga töötlemisel, kuid kui ta satub mõnda oma peremeesorganismi, nagu näiteks *Acanthamoeba polyphaga* 'sse või *Acanthamoeba castellanii* 'sse, toimuvad tema metabolismis muutused ning ta on jällegi suuteline paljunema. Täpne mehhanism, kuidas patogeenne bakter väljub VBNC seisundist, kui ta on sattunud peremeesorganismi, on hetkel teadmata. Küll aga on leitud inimesi nakatavate patogeenide puhul, et inimeste hormoonid võivad avaldada mõju bakterite geeniekspressioonile (Oliver, 2009). Kvoorumitunnetamise (*quorum sensing* ehk lühidalt QS) kaudu on bakteritel võimalik reguleerida samas populatsioonis olevates bakterites teatud füsioloogilisi protsesse, sekreteerides keskkonda madalmolekulaarseid signaalmolekule. Sperandio ja tema kolleegid avastasid enterohemorraagilisest *Escherichia coli* (EHEC) tüvest QS süsteemi, millega patogeenne *E.coli* ja peremeesorganism on omavahel võimelised suhtlema. EHEC-is on sellises QS süsteemis signaalmolekuliks AI-3 (*autoinducer*), millega bakter saab indutseerida virulentsusgeenide ekspressiooni ka teistes samas populatsioonis olevates bakterirakkudes. Inimese organismis toodetakse stressi olukordades kahte hormooni- epinefriini ja norepinefriini. Kuna epinefriinil ja norepinefriinil on sarnane struktuur AI-3-ga, siis on nad võimelised asendama AI-3-e ning seeläbi võib hoopis peremeesorganism indutseerida patogeensete bakterite virulentsusgeenide aktiveerimist (Sperandio *et al.*, 2003) või ka väljumist VBNC seisundist (Oliver, 2009).

1.3 Rakkude-vaheline signalisatsioon

Bakterid kasutavad mitmesuguseid väikeseid molekule, et edastada signaale enda sees ning ka enda ja teiste rakkude vahel. Nende signaalide vastuvõtmisel saavad nad infot nii enda füsioloogilise seisundi kohta kui ka infot väliskeskkonna seisundi kohta. Kui kuskil on toimunud mingi muutus, on bakteritel võimalik sellest signaalide abil kiirelt teada saada ning kohaneda vastavate muutustega. Samuti saavad nad signalisatsiooni abil teavitada toimunud muutustest ka lähedal asuvaid baktereid (Camilli *et al.*, 2006).

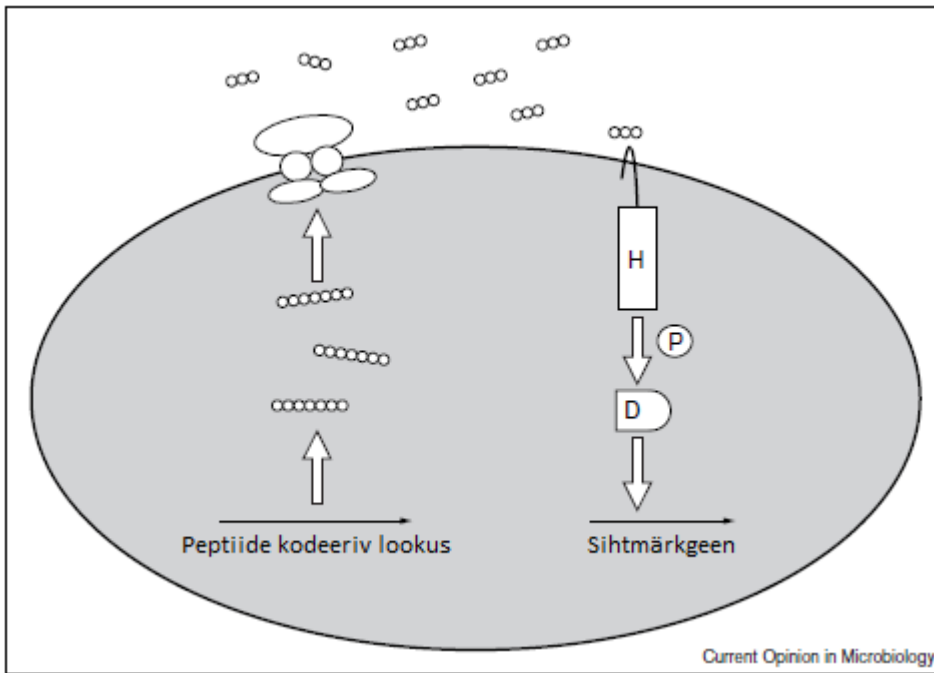
Kvoorumi tunnetamine ehk rakk-rakk kommunikatsioon on enim levinud rakkude-vaheline signalisatsiooni süsteem. Üks rakk toodab ja sekreteerib ümbritsevasse keskkonda kindla struktuuriga signaalmolekule, mille teised samas populatsioonis olevad rakud ära tunnevad. Signaalmolekule, mida kvoorumi tunnetamisel kasutatakse, nimetatakse autoinduktoriteks (AI). QS abil saavad rakud jälgida üksteise asukohta populatsioonis ning vastavalt populatsiooni tihedusele oma geeniekspressiooni muuta. Populatsiooni tihedus on korrelatsioonis autoinduktorite ekstratsellulaarne kontsentratsiooniga. Kui AI kontsentratsioon on ekstratsellulaarses ruumis saavutanud kindla piiri, indutseeritakse samas populatsioonis olevates rakkudes signaali ülekande kaskaad ning seeläbi käivitatakse rakkudes erinevad füsioloogilised protsessid. QS abil reguleeritakse näiteks biofilmi moodustumist, virulentsete faktorite ekspressiooni, antibiootikumide sünteesi ning ka sporulatsiooni (Camilli *et al.*, 2006).

1.3.1 Kahekomponentne QS süsteem

Gram-positiivsete bakterite signaalmolekulideks QS süsteemis on lühikesed oligopeptiidid ning nende ära-tundmiseks on bakteritel olemas kahekomponendilised regulatsiooni süsteemid (joonis 2), mis koosnevad sensorvalgust ja vastuse regulaatorvalgust (Stock *et al.*, 2000). Lühikesi oligopeptiide transporditakse rakust välja ABC transporterite kaudu. Klassikalises kahekomponendilises regulatsiooni süsteemis jälgib signaalmolekulide kontsentratsiooni väliskeskkonnas sensorvalk histidiinkinaas (Miller *et al.*, 2001), mis koosneb kahest domäänist: katalüütiline ja ATPaasne (*catalytic and ATPase*, CA) domään ning dimerisatsiooni ja histidiini fosfotransferaasne (*dimerization and histidine phosphotransferase*, DHp) domään. Kui signaalmolekulide kontsentratsioon on väliskeskkonnas piisavalt kõrge, seob CA domään endaga ATP molekule ning seejärel katalüüsib ta DHp domääni küljes oleva histidiini jäägi

autofosforüleerimist. Edasi kantakse fosfaatrühm histidiinkinaasilt vastuse regulaatorvalgule, millel on samuti kaks domääni: vastuvõtudomään ja väljunddomään. Vastuvõtudomäänis on fosfoaktseptoriks aspartaadi jääk ja veel mõned kõrgelt konserveerunud aminohapped, mis katalüüsivad fosfaatrühma ülekannet histidiinkinaasilt vastuvõtudomäänile. Selle tagajärjel aktiveerub väljunddomään, mis seejärel omakorda aktiveerib sihtmärkgeeni transkriptsiooni (Laub *et al.*, 2007).

Bacillus subtilis kasutab peptiidide vahendatud QS süsteemi, et valida kompetentse seisundi ja sporulatsiooni käivitamise vahel. Kompetentne seisund esineb bakteri populatsioonis enim just aeglustavas faasis. Statsionaarse faasi alguses hakkavad rakud järk-järgult lüüsuma ning seetõttu pääseb nende DNA ekstratsellulaarsesse ruumi. Rakud muutuvad kompetentseteks, et sisse transportida ekstratsellulaarsesse ruumi paisatud DNA-d, mida kasutatakse elutingimuste halvenemise tõttu kahjustunud või muteerunud DNA parandamiseks. Kompetentsus päästab vaid ajutiselt rakku surmast. Pikemaks ajaks ellu jäämiseks moodustavad bakterid spoores. Kaks peptiidi, mis vahendavad QS süsteemi *B. subtilis* 'es, on ComX (*competence*) ja CSF (*competence and sporulation factor*). ComX on 10 aminohappe pikkune peptiid ja sisaldab signaliseerimiseks vajaminevat trüptofaani jääki. ComX signaal tuntakse ära kahekomponentse ComP/ComA süsteemi kaudu, milles ComP on sensorvalk ja ComA regulaatorvalk. ComA fosforüleerimisel tekib ComA-fosfaadi kompleks, mis aktiveerib *comS* geeni ekspressiooni. ComS inhibeerib ComK degradatsiooni. ComK on valk, mis kontrollib struktuursete geenide, mida läheb vaja kompetentse seisundi saavutamiseks, ekspressiooni. Kui raku sees tõuseb peptiidi CSF kontsentratsioon piisavalt kõrgele, hakkavad nad inhibeerima ComS valke, mistõttu ComK degradatsiooni ei toimu ning kompetentsesse seisundisse minek on takistatud. Lisaks inhibeerib CSF RapB fosfataasi, mis muidu defosforüleeriks vastuse regulaatorvalku Spo0A. Kuna RapB fosfataasi aktiivsus on maha surutud, saab moodustuda Spo0A-fosfaadi kompleks, mis indutseerib sporulatsiooni. (Miller *et al.*, 2001).



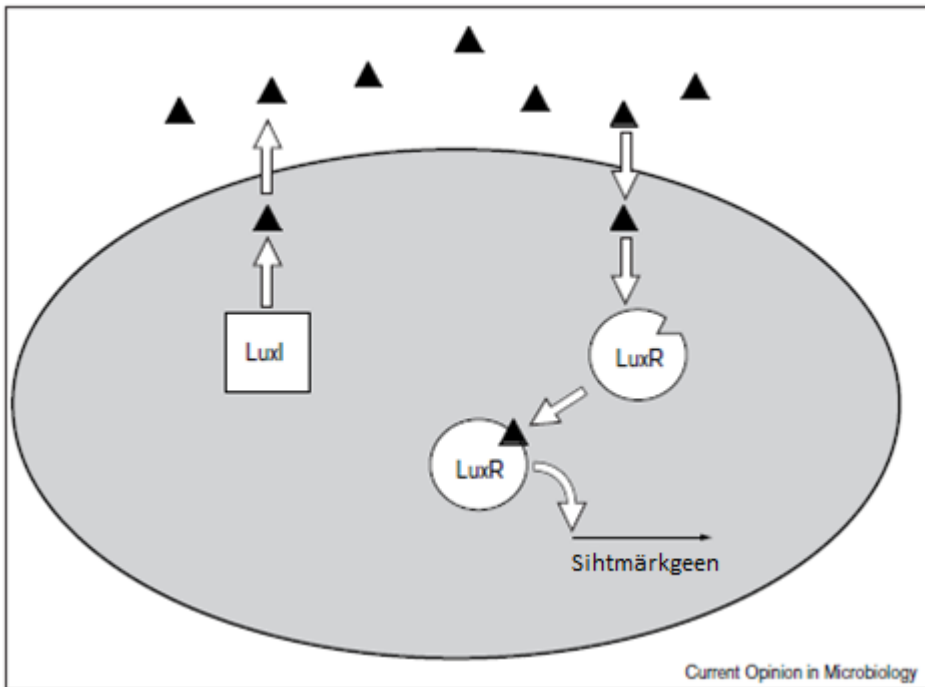
Joonis 2. Klassikaline kahekomponentne QS süsteem. Peptiidid transporditakse ekstratsellulaarsesse ruumi ATP transporterite kaudu. Kui peptiidide kontsentratsioon on piisavalt kõrge, käivitub fosforüleerimiskaskaad. Esmalt autofosforüleeritakse histidiinkinaas (joonisel kujutatud H) ning seejärel transporditakse fosfaatrühm (joonisel kujutatud P) vastuse regulaatorvalgule (joonisel kujutatud D), mis seejärel aktiveerib sihtmärkgeeni transkriptsiooni (Bassler, 1999).

1.3.2 LuxI/LuxR süsteem

LuxI/LuxR süsteem (joonis 3) on gram-negatiivsetes bakterites esinev QS süsteem, kus signaalmolekulideks on atsüleeritud homoseriinlaktooni molekulid (HSL) (Camilli *et al.*, 2006). AHL molekulil võib olla 4 kuni 18 süsiniku aatomi pikkune atsüleeritud kõrvalahel, mille täpne pikkus varieerub liigiti. Sõltuvalt atsüülahela pikkusest, jagatakse HSL molekulid lühikese ja pika ahelaga molekulideks (Lithgow *et al.*, 2000). Lühikese ahelaga molekulid, millel on kõrvalahelas 4-6 süsiniku aatomit, võivad vabalt difundeeruda läbi bakteriraku membraani. Pika ahelaga molekulid, millel on kõrvalahelas 7-18 süsiniku aatomit, transporditakse aktiivselt läbi membraanis paiknevate pumpade. LuxI on ensüüm, mis osaleb HSL-i sünteesis. Iga LuxI ensüüm katalüüsib vaid ühte tüüpi HSL molekulide biosünteesi. LuxR on retseptorvalk, mis seob ja moodustab HSL molekulidega kompleksi (Myszka *et al.*, 2012). LuxR koosneb kahest domäänist: amino-terminaalsest domäänist, mis on vajalik HSL-i sidumiseks, ning karboksüül-terminaalsest domäänist, mis on vajalik LuxR valgu multimerisatsiooniks, DNA sidumiseks ja sihtmärk geenide transkriptsiooniliseks aktivatsiooniks. Kui HSL molekulide kontsentratsioon

tõuseb rakukultuuris piisavalt kõrgele, seonduvad signaalmolekulid LuxR amino-terminaalse domääniga. Amino-terminaalne domään inhibeerib karboksüül-terminaalset domääni, kuid kui HSL moodustab kompleksi LuxR-iga, siis inhibitsioon lõpeb. LuxR valgud muutuvad aktiivseks kas tänu konformatsiooni muutusele, aktiivse di- või multimeeri tekkele. Edasi seondub aktiveeritud LuxR-HSL kompleks sihtmärk geeni promooter alale ning käivitab vastavas operonis transkriptsiooni (Miller *et al.*, 2001).

LuxI/LuxR süsteemi on kõige põhjalikumalt uuritud bioluminestseerivas merebakteris *Vibrio fischeri*'s. *V. fischeri* on sümbioosis paljude erinevate erukarüootsete peremeesorganismidega. Nende peremeestes on spetsiaalselt välja arenenud valgusorganid, kus *V.fischeri* bakteritüved suure tihedusega paiknevad. *V.fischeri* saab peremehelt toitaineid ning vastutasuks varustab ta peremeest valgusega, mida kasutatakse erinevatel otstarvetel, näiteks saagi või kaaslase ligimeelitamiseks või ka kiskjate eemale peletamiseks. Valguse tootmiseks kasutavad *V.fischeri* bakterid lutsiferaasi ensüümi, mida kodeerib luxCDABE operon. Kui HSL-i kontsentratsioon on keskkonnas piisavalt kõrge, moodustub LuxR-HSL kompleks, mis seondub luxCDABE operonile ning algab lutsiferaasi süntees (Miller *et al.*, 2001).

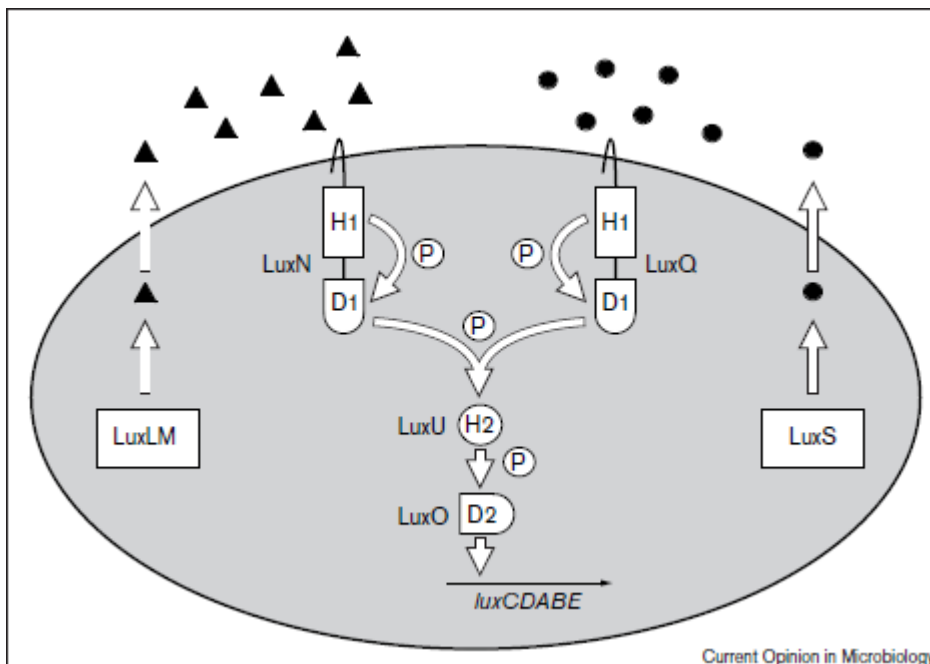


Joonis 3. LuxI/LuxR süsteem. LuxI sünteesib keskkonda HSL molekule (joonisel kujutatud väikeste kolmnurkadena), mis difundeeruvad vabalt läbi rakumembraani rakust sisse ja välja. Kui HSL molekulide kontsentratsioon ületab kriitilise läve, seonduvad nad LuxR retseptorvalguga, aktiveerides viimase. LuxR-HSL kompleks seondub sihtmärk geeniga ja käivitab transkriptsiooni (Bassler, 1999).

1.3.3 QS süsteem *Vibrio harveyi*'s

Bakteril *Vibrio harveyi* on kaks QS süsteemi (joonis 4). Esimene süsteem on sarnane gram-negatiivsete bakterite QS süsteemile, kuna seal on signaalmolekulideks atsüleeritud homoseriinlaktooni (AI-1) molekulid. Esimest süsteemi kasutatakse liigisisesele signaliseerimisele. Teises süsteemis kasutatakse signaalmolekulidena furanosüülboraat diestreid (AI-2) ning neid kasutatakse liikidevahelisel signaliseerimisele. AI-1 sünteesi eest vastutab LuxLM, AI-2 sünteesi eest LuxS. Sarnaselt gram-positiivsetele bakteritele on bakteril *V.harveyi* signaalide äratundmiseks kahekomponentne süsteem. Sensorvalk LuxN tunneb ära ja seondub AI-1 molekulidega ning sensorvalk LuxQ seondub AI-2 molekulidega (Reading *et al.*, 2006). Lisaks on bakteril *V.harveyi* AI-2 detekteerimiseks olemas periplasmaatiline sidumisvalk LuxP. Nii LuxN ja LuxQ koosnevad kahest domäänist: sensor kinaasi-domäänist ja vastuse regulaator-domäänist. Kui keskkonnas on signaalmolekule vähe, siis LuxN ja LuxQ autofosforüleeruvad ja transpordivad fosfaatrühma läbi fosfotransferaasse LuxU valgu regulaatorvalgule LuxO. Fosforüleeritud LuxO moodustab kompleksi, mis repressseerib luxCDABE ekspressiooni ning

lutsiferaasi ei toodeta. Kui signaalmolekule on keskkonnas piisavalt, muutuvad LuxN ja LuxQ kinaasidest fosfataasideks, mis hüdrolüüsivad fosfaadi LuxO-fosfaat kompleksist. Nii muutub LuxO inaktiivseks ja luxCDABE operoni ekspressiooni repressiooni enam ei toimu. LuxR saab seonduda luxCDABE promootorile ja käivitab transkriptsiooni, mille tulemusena hakkab bakter lutsiferaasi tootma (Miller *et al.*, 2001).



Joonis 4. Fosforüleerimise kaskaad, mis käivitub bakteris *V.harvey*, kui keskkonnas on piisavalt signaalmolekule. Kolmnurgad tähistavad AI-1 signaalmolekule, mille sünteesi eest vastutab LuxLM. Täpid tähistavad AI-2 signaalmolekule, mille sünteesi eest vastutab LuxS. H1 tähistab sensor kinaasi-domääni ja H2 tähistab vastuse regulaator-domääni. H2 on LuxU valgu küljes olev histidiini jääk, kuhu kinnitub signaaliülekanal fosfaatrühm. D2 on LuxO valgu küljes olev konserveerunud aspartaadi jääk, kuhu kinnitub fosfaatrühm LuxO aktiveerimisel (Bassler, 1999).

1.4 Statsionaarsest faasist väljumise regulatsioon signaalmolekulidega

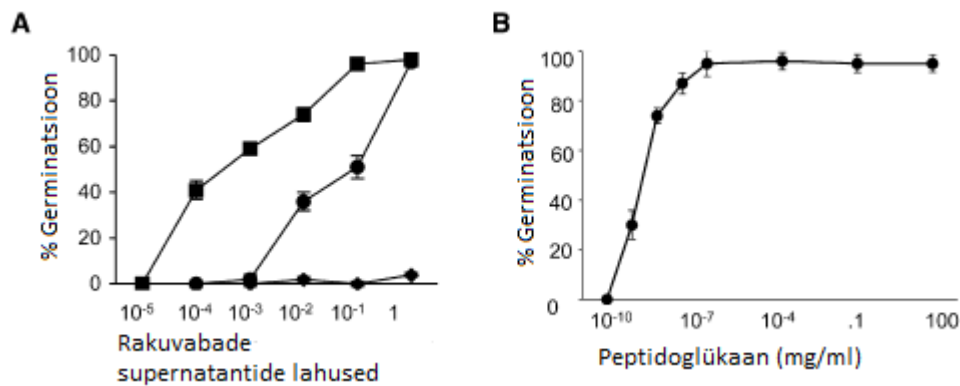
Skaudi-teooria lähtub hüpoteesist, et osad samast populatsioonist pärinevad soikeseisundis olevad bakterirakud muutuvad aktiivseteks (nö skautideks) stohhastiliselt ehk keskkonnatingimustest sõltumatult. Skaudid ei ole geneetiliselt erinevad samas populatsioonis olevatest bakteritest (Epstein, 2009). Stohhastiliselt aktiivseks muutunud bakterid jälgivad toitainete ja muude eluks vajalike ühendite kättesaadavust keskkonnas. Kui elutingimused on jätkuvalt ebasoodsad ja skaut on kõik oma viimased ressursid ära kasutanud, siis ta sureb. Mõne aja tagant moodustuvad samas populatsioonis uued skaudid, kes jällegi jälgivad, kas elutingimused on soodsateks muutunud. Lõpuks, kui skaut moodustub kasvu soosivates tingimustes, paneb ta aluse uuele populatsioonile. Uues populatsioonis jääb väike osa rakkudest soikeseisundisse, juhul kui elutingimused peaksid muutuma taas ebasoodsateks ning tsükel saab algusest pihta hakata. Skaudi-teooria pakub välja võimaluse, et bakteri populatsioon elab üle ebasoodsad elutingimused pidevalt aktiivse seisundi ja soikeseisundi vahel pendeldades. Buerger *et al.* inkubeerisid soikeseisundis olevaid *Mycobacterium smegmatis* baktereid 100 päeva toitainete- ja hapniku-vaeses keskkonnas ning nägid, et bakterid hakkasid kasvama juhuslikel ajahetkedel. Osad bakterid hakkasid kasvama alles kolme kuu möödudes (Buerger *et al.*, 2012). Aktiivseks muutunud rakud võivad signaalmolekulide abil teavitada ka teisi samast liigist pärit baktereid toimunud muutustest ning seeläbi indutseerida neis statsionaarsest faasist väljumist (Epstein, 2009).

1.4.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis on gram-positiivne bakter, mis moodustab ebasoodsate elutingimuste üleelamiseks spore. Spoorid idanevad, kui keskkonnas on jälle eluks vajalikud tingimused täidetud. Spooride idanemist võivad lisaks toitainetele, lüsoosüümidele, sooladele, kõrgele rõhule, Ca^{2+} -DPA kontsentratsioonile ja katioonsetele pindaktiivsetele ainetele (Setlow, 2003) indutseerida ka teised juba kasvama hakanud *B.subtilis*'e bakterid, sekreteerides ekstratsellulaarsesse ruumi vastavaid signaale (Shah *et al.*, 2008).

Peptidoglükaanid kujutavad endast pikki lineaarseid glükaani ahelaid, mis on seotud lühikeste peptiididega. Nad kuuluvad kuuluvad bakterite rakuseina koostisesse (Heijenoort, 2001). Peptidoglükaanide lagundamisel tekib fragmentide kogum, mis sisaldab ka muropeptiidide

fragmente. Need fragmendid käituvad signaalidena erinevates reaktsiooniradades, sealhulgas ka bakterite statsionaarsest seisundist väljumise mehhanismis (Cloud-Hansen et al., 2006). Erinevalt gram-negatiivsetest bakteritest ei ole gram-positiivsetel bakteritel mehhanismi, mis taaskasutaks muropeptiidide fragmente rakus, ning seetõttu liiguvad need fragmendid vabalt ekstratsellulaarsesse ruumi (Doyle et al., 1988; Mauck et al., 1971). Bakteritel on membraaniseoselises Ser/Thr kinaasi (*B.subtilis*'es PrkC) ekstratsellulaarses domäänis olemas PASTA (*penicillin and Ser/Thr kinase associated*) järjestus, millega nad on võimelised siduma väliskeskkonnast muropeptide. PASTA domään on väike globulaarne struktuur, mis koosneb kolmest β lehest ja ühest α heeliksist. Esimese ja teise β ahela vahel on silmus, mille pikkus varieerub liigiti. Kui muropeptiid on seondunud PrkC-ga, fosforüleerib viimane elongatsiooni faktori G (EF-G), mis viib läbi ribosoomi translokatsiooni valgusünteesi käigus. Seeläbi indutseeritakse translatsioon, mis võib olla tähtsaks biosünteesiliseks sammuks spoori idanemisel. Siiski on vähetõeline, et translatsiooni indutseerimine on kõige tähtsam samm spoori idanemisel. Usutakse, et mõnel tundmatul kinaasi sihtmärgil võib olla roll spooris vee osakaalu tõstmisel, mis on vajalik nii translatsiooni kui ka muude bioloogiliste protsesside käivitamiseks. Shah ja tema kolleegid kinnitasid oma katsetes, et lisaks sellele, et muropeptiidid tõepoolest indutseeruvad idanemist, mõjutavad erinevate bakteriliikide muropeptiidid ja erinevad peptidoglükaanide kontsentratsioonid *B.subtilis*'e spooride idanemise kineetikat erinevalt (joonis 5) (Shah et al., 2008).



Joonis 5. (A) *B. subtilis*'e spooride idanemine 60 minuti jooksul erinevate supernatantide lahustes, mis olid valmistatud kasvavate *B. subtilis* PY79 (ruudud), *E. coli* DH5 α (ringid) ja *S. aureus*'e (rombid) rakkude söötmetest, kust rakud hiljem välja filtreeriti. Supernatandid sisaldavad vastavate bakterite muropeptiide. Katse näitas, et erinevate rakkude muropeptiidid mõjuvad erinevalt *B. subtilis*'e spooride idanemisele (Shah *et al.*, 2008).

(B) Peptidoglükaanide kontsentratsiooni mõju *B. subtilis*'e spooride idanemisele. Kui peptidoglükaanide kontsentratsioon tõuseb üle 10⁻⁷ mg/ml, siis peptidoglükaanide mõju spooride idanemisel saavutab maksimaalse taseme ja hiljem enam ei muutu (Shah *et al.*, 2008).

1.4.2 *Micrococcus luteus*

M. luteus'es on ärkamise mehhanismiga seotud rpf (*resuscitation-promoting factor*) molekulid. Need on 16-17 kDa suurused valgud, mida sekreteerivad kasvavad rakud. Rpf molekule on uuritud enim *Micrococcus luteus* bakterites, kuid sarnaseid molekule on avastatud ka teistest kõrge G+C sisaldusega gram-positiivsetest bakteritest (Mukamolova *et al.*, 1998). Rpf valk on ensüüm, mis seondub rakuseinaga LysM (*lysozyme*) tüüpi domääni kaudu. Seejärel hüdrolüüsib ta peptidoglükaanide koostises olevaid glükaane, mille tagajärjel satuvad ekstratsellulaarsesse ruumi muropeptiidide fragmendid. Need fragmendid on tähtsad signaalmolekulid statsionaarsest faasist väljumise mehhanismis (Kana *et al.*, 2009).

Valku rpf kirjeldasid esmakordselt Mukamolova *et al.* 1998. aastal. Nad kasvasid *M. luteus*'e baktereid statsionaarse faasini ning hoidsid neid seejärel kaks kuud toatemperatuuril, et neid veelgi sügavamalt soikeseisundisse viia. Nii langes rakkude kultiveeritavus mitu suurusjärku. Seejärel valmistati rakuvabad söötmed eksponentsiaalsesse kasvufaasi jõudnud *M. luteus*'e rakkude söötmetest, mis eeldatavalt sisaldasid rpf valke, ning need söötmed lisati soikeseisundis olevatele rakkudele. Selle tulemusena taastus kultiveeritavus peaaegu täielikult. Kui uuriti erinevate rpf kontsentratsioonide mõju soikeseisundis olevatele rakkudele, avastati et rpf mõjub rakkude aktiivsusele juba pikomolaarsetes kogustes. Lisaks sellele, et rpf indutseerib

soikeseisundis olevate bakterite kasvamahakkamist, stimuleerib puhastatud rpf valk nii aeglaselt kui ka kiiresti kasvavate *M.luteus* 'e rakkude kasvu (Mukamolova *et al.*, 1998).

1.4.3 *Mycobacterium*

Mycobacterium tuberculosis on inimese patogeen, mis põhjustab tuberkuloosi. Iga aasta nakatub tuberkuloosi 8 miljonit ja sureb 2 miljonit inimest. *Mb.tuberculosis* võib peremehe organismis olla soikeseisundis aastaid. Tuberkuloosi sümptomid ilmnevad siis, kui bakter väljub soikeseisundist. Bakteris *Mb.tuberculosis* on olemas geenid, mis on homoloogsed rpf valke kodeeriva geeniga *M.luteus* 'es. *Mb.tuberculosis* 'e geenid kodeerivad viite rpf valku: rpfA, rpfB, rpfC, rpfD, rpfE. Arvatakse, et kõik viis valku on funktsionaalse spetsiifilisuse poolest erinevad (Kana *et al.*, 2008). Näiteks Tufariello *et al.* leidsid, et defektse *rpfB* geeniga *Mb.tuberculosis* väljub soikeseisundist mõnevõrra hiljem kui metsiktüüpi bakterid (Tufariello *et al.* 2006). Kana *et al.* avastasid, et piisab ainult rpfB või rpfE valke kodeerivast geenist, et aktiivseks muutunud bakter paneks normaalse kiirusega aluse uuele populatsioonile. Mutandil, milles oli ainult rpfD valke kodeeriv geen, võttis kasvama hakkamine palju kauem aega kui metsiktüüpi rakkudel. On leitud, et rpfB valk interakteerub mükobakterite endopeptidaasiga ehk valguga RipA (*rpf-interacting protein A*). RipA-rpfB kompleks seondub rakujagunemise ajal rakukestaga ning seejärel hüdrolüüsib ta rakuseinas olevat peptidoglükaani. RipA moodustab komplekse ka rpfE valguga. Võimalik, et rpfA, rpfC ja rpfD valkudel on muud mehhanismid rakukestaga seondumiseks. Nagu *M.luteus* bakteriski tekivad peptidoglükaanide hüdrolüüsil muropeptiidide fragmendid, mis on signaalmolekulideks soikeseisundist väljumise mehhanismis (Kana *et al.*, 2008).

Sarnaseid rpf valke kodeerivaid geene on leitud ka teistest *Mycobacterium* perekonda kuuluvatest bakteritest, milleks on *Mb.leprae*, *Mb. smegmatis*, *Mb.bovis* ning *Mb.kansasii* (Mukamolova *et al.*, 1998).

1.4.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli on gram-negatiivne bakter, mis elab ebasoodsad elutingimused üle persisteritena (Kussell *et al.*, 2005) või VBNC seisundisse jäädes (Fakruddin *et al.*, 2013). Kui elutingimused paranevad, muutuvad soikeseisundisse jäänud rakud aktiivseks. Statsionaarsest faasist väljumine

võib olla nii homogeenne, kus bakterid muutuvad aktiivseks üheaegselt, või heterogeenne, kus bakterid muutuvad aktiivseks erinevatel ajahetkedel. Kristiina Tüür uuris oma bakalaureusetöös, millised faktorid mõjutavad *E.coli* kasvamahakkamist, ning leidis, et kasvama hakanud *E.coli* tüvi BW25113 sekreteerib tundmatut ühendit ekstratsellulaarsesse ruumi, mis indutseerib samas kultuuris soikeseisundis olevate *E.coli* tüvede BW25113 kasvamahakkamist. Lihtsuse mõttes nimetati tundmatut ühendit faktor X-iks (Tüür, 2013).

Faktor X-i uurimiseks valmistati kõigepealt konditsioneeritud söötmed. Rakke kasvatati 4 päeva MOPS söötmes, mis sisaldas süsiniku allikana glütserooli. 4. päeval viidi rakud värskesse MOPS söötmesse, mis sisaldas süsiniku allikana glükonaati. Kui rakke kasvatada alguses glütserooliga MOPS söötmes ja hiljem glükonaadiga MOPS söötmes, siis hakkavad bakterid glükonaadiga söötmes statsionaarsest faasist väljuma heterogeenselt. Rakke kasvatati kuni esimesed rakud aktiivseks muutusid ning poolduma hakkasid. Eeldatavalt hakkasid aktiivseks muutunud rakud sekreteerima söötmesse faktor X-i. Seejärel eemaldati rakud söötimest filtreerimise teel. Kui konditsioneeritud söödelt lisati statsionaarse faasi rakkudele, oli näha selget muutust kasvamahakkamise dünaamikas võrreldes bakteritega, keda kasvatati värskes glükonaadiga MOPS söötmes, kus faktor X-i sees ei olnud. Konditsioneeritud söötmes muutusid bakterid märgatavalt kiiremini aktiivseks (Tüür, 2013).

Kuna faktor X on tundmatu ühend, mille struktuuri ega laengut ei teata, üritati seda esialgu söötimest välja ekstraheerida etüülatsetaadiga. Etsüülatsetaati on kasutatud söötimest homoseriinlaktooni molekulide ekstraheerimiseks, kuid faktor X-i puhul see meetod ei töötanud. Faktor X-i üritati söötimest puhastada ka pöördfaasikoloni abil, kuid see meetod ei andnud samuti soovitud tulemust, kuna faktor X-i aktiivsus jäi koloni läbijooksu. See tähendab seda, et faktor X on hüdrofiilne molekul ning seetõttu ei interakteerunud see pöördfaasikoloni maatriksiga (Tüür, 2013).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Siiani on tuvastatud faktor X sekretsioon *E.coli* tüvedest ainsana BW25113 tüves (Tüür, 2013). Seda, kas on olemas ka teisi faktor X sekreteerivaid *E.coli* tüvesid ning kui tüvespetsiifiline faktor X on, uuritud ei ole.

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- faktor X-i sekretsiooni tuvastamine *E.coli* bakteritüvedes BW25113, MG1655, BL21(DE3), CFT073, env76.
- tuvastamine, kas ühe *E.coli* tüve poolt sekreteeritud faktor X mõjutab teise *E.coli* tüve ärkamiskiirust soikeseisundist.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Materjalid

Katsetes kasutati viite bakteritüve: *E.coli* K-12 tüvesid MG1655 ja BW25113, B tüve BL21(DE3), patogeenset tüve CFT073 ning keskkonnast isoleeritud tüve env76 (tabel 1). MG1655, BW25113 ja BL21(DE3) on laialdaselt uurimistöös kasutatavad laboritüved.

Tabel 1. Käesolevas töös kasutatud bakteritüved.

Bakteri tüvi	Genotüüp
MG1655	F-, lambda-, ilvG-, rfb-50, rph-1
BW25113	F-, $\Delta(\text{araDaraB})$ 567, $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$, λ -, rph-1, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})$ 568, hsdR514
BL21DE3	F-, ompT, gal, dcm, lon, hsdSB(rB- mB-), $\lambda(\text{DE3} [\text{lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5}])$
CFT073	Andmed puuduvad
env76	Andmed puuduvad

Laboritüvedesse viidi transformatsiooni teel plasmiid pETgfp AGGAGG (3), mis sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeni ja *tac*-promooteri all olevat *GFP* geeni (Vimberg *et al.*, 2007). *Tac*-promooterit indutseeritakse IPTG-ga. Tüvedesse CFT073 ja env76 oli juba eelnevalt plasmiid sisse viidud. Enne transformeerimist muudeti bakterid kompetentseteks. Selleks kasvatati neid LB söötmetes. Tüvede MG1655 ja BW25113 bakterite pesemiseks ja hiljem resuspendeerimiseks kasutati CaCl_2 lahust. Tüve BL21(DE3) baktereid inokuleeriti SOB söötmes, kuhu oli lisatud glükoosi 0,39% (50 ml SOB söötmesse lisati 1 ml 20%-list glükoosi lahust). Tüve BL21(DE3) bakterite kompetentseteks muutmiseks kasutati RF1 (tabel 2) ja RF2 (tabel 3) puhvreid, mis sisaldavad rubiidiumkloriidi (RbCl).

Tabel 2. RF1 puhvri koostis.

Koostis	Lõppkontsentratsioon
RbCl	100 mM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 mM
Kaaliumatsetaat	30 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mM
Glütserool	15% lõppmahust
Äädikhape (0,2M)	Lisada kuni pH 5,8

Tabel 3. RF2 puhvri koostis.

Koostis	Lõppkontsentratsioon
MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75 mM
Glütserool	15% lõppmahust
NaOH (1M)	Lisada kuni pH 6,8

Konditsioneeritud söötmete valmistamisel ja GFP signaali tugevuse mõõtmiseks kasvatati baktereid 3-(N-morfoliin)propan sulfoonhappe söötmetes ehk lühidalt MOPS söötmetes. MOPS sööde on keemiliselt defineeritud sööde, mis sisaldab *E.coli* jaoks kõiki vajalikke ühendeid, välja arvatud süsinikku, lämmastikku ja fosforit. Süsinikuallikana lisati söötmetesse erinevaid suhkruid (tabel 4).

Tabel 4. Käesolevas töös kasutatud MOPS söötmed.

Nimetus	Süsinikuallikana kasutatud suhkur	Allikas
MOPS Glt	Glükonaat 0,2%	Neidhardt <i>et al.</i> , 1974
MOPS Gly	Glütserool 0,1%	Neidhardt <i>et al.</i> , 1974

Lämmastikuallikana lisati MOPS söötmesse ammooniumkloriidi (NH₄Cl) ja fosforiallikana dikaaliumvesinikfosfaati (K₂HPO₄). Kõikidesse MOPS söötmetesse lisati ka kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 25 µl/ml. GFP signaali tugevuse mõõtmisel lisati MOPS Glt söötmesse ampitsiliini lõppkontsentratsiooniga 150 µl/ml, mis põhjustab jagunevate bakterite lüüsumist ning takistab nende paljunemist. Kui rakud hakkaksid jagunema, hakkaksid uued rakud samuti GFP-d ekspresseerima ning GFP signaali tugevus ei näitaks enam statsionaarsest faasist väljumise dünaamikat.

Baktereid kasvatati alati 37 °C juures Sanyo loksutil kiirusel 210 rpm.

2.2.2 Bakterite kompetentseteks muutmise ja transformeerimine

2.2.2.1 Tüved MG1655 ja BW25113

Bakterite kompetentseteks muutmiseks viidi bakterid LB vedelsöötmesse (2 ml) kasvama 2 kuni 3 tunniks. Seejärel tõsteti 1 ml kultuurist 1,5 ml Eppendorfi tuubi ning jahutati jääl. Baktereid fuugiti 2500 g juures 5 minutit temperatuuril 4 °C masinas Eppendorf Centrifuge 5415 R rooriga F45-24-11. Supernatant eemaldati ning baktereid pesti samas mahus 100 mM CaCl₂

lahusega. Baktoreid fuugiti uuesti 2500 g juures 5 minutit temperatuuril 4 °C masinas Eppendorf Centrifuge 5415 R rootoriga F45-24-11. Supernatant eemaldati ja bakterid suspendeeriti 100 µl CaCl₂ lahuses. Suspensiooni hoiti jääl vähemalt 20 minutit.

Transformeerimisel lisati jääl hoitud suspensioonile 2 µl DNA-d (pET gfp AGGAGG (3)), segati ettevaatlikult ning hoiti jääl 10 minutit. Segu võeti jäält, soojendati 45 sekundit temperatuuril 37 °C termostaadil Eppendorf Thermostat 5320 ning hoiti seejärel uuesti jääl 2 minutit. Segule lisati 900 µl LB söödet ning soojendati 45 minutit temperatuuril 37 °C termostaadil Eppendorf Thermostat 5320. Baktoreid fuugiti 2500 g juures 5 minutit masinas Eppendorf Centrifuge 5415 R rootoriga F45-24-11. 9/10 supernatandist eemaldati ning allesjäänud supernatandis suspendeeriti bakterid. Suspensioon külvati kanamütsiiniga agari plaadile. 24 tunni möödudes viidi plaadilt 1 koloonia 2 ml LB söötmesse kasvama 2 kuni 3 tunniks. Kultuurile lisati 8% dimetüülsulfoksiidi (DMSO), 120 µl kaupa pipeteeriti segu PCR tuubidesse ning säilitati edaspidi temperatuuril -70 °C.

2.2.2.2 Tüvi BL21(DE3)

Bakterite kompetentseteks muutmiseks kasvatati neid 24 tundi (3 ml) LB söötmes. 2 ml üleöö kasvanud kultuuri inokuleeriti 50 ml SOB söötmes 250 ml kolvis. Jälgiti kultuuri optilist tihedust (OD) SOB söötmes lainepikkusel 600 nm, kuni OD tõusis 0,332-ni. Kultuur tõsteti ümber 50 ml tsentrifuugi tuubi, hoiti jääl 15 minutit ning seejärel baktoreid fuugiti 2700 g juures 10 minutit temperatuuril 4 °C masinas Eppendorf Centrifuge 5415 R rootoriga F45-24-1. Supernatant eemaldati ning bakterid suspendeeriti 1/3 esialgses mahust (17 ml) jahutatud RF1 puhvris. Suspensiooni hoiti jääl 15 minutit. Baktoreid fuugiti 580 g juures 15 minutit temperatuuril 4 °C masinas Eppendorf Centrifuge 5415 R rootoriga F45-24-1. Supernatant eemaldati ja bakterid suspendeeriti ettevaatlikult 1/25 esialgses mahust (2 ml) jahutatud RF2 puhvris. Segu hoiti jääl 15 minutit, tõsteti 100 µl kaupa jahutatud 1,5 ml Eppendorfi tuubidesse ja säilitati edaspidi temperatuuril -80 °C.

Transformeerimiseks sulatati temperatuuril -80 °C olnud bakterite ja RF2 puhvri segu jääl üles. Transformatsioon viidi läbi samal viisil nagu eelmiste tüvede puhul.

2.2.3 Söötmete konditsioneerimine

Baktereid kasvatati 3 päeva 125 ml kolvis 15 ml MOPS Gly söötmes. Kolme päeva möödudes fuugiti baktereid 15 minutit 5000g juures tsentrifuugis Sigma 4K15C rootoriga 13350/11150. Supernatant eemaldati ning bakterid suspendeeriti samas mahus MOPS Glt söötmes, kuhu lisati IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 1mM. Enne loksutite kasvama panemist 125 ml kolvis, võeti osa kultuurist välja ja fuugiti 2 minutit 16060 g juures masinas Heraeus Biofuge Pico rootoriga PP 4/97 #3324. Seejärel tõsteti 4/5 supernatandist uude Eppendorfi tuubi ning säilitati edaspidi temperatuuril -20 °C. Peale bakterite suspendeerimist uues söötmes, võeti veel osa kultuurist välja 3, 4, 5, 6 ja 7 tunni möödudes, rakud fuugiti, osa supernatandist tõsteti uude Eppendorfi tuubi ja säilitati edaspidi temperatuuril -20 °C.

2.2.4 GFP signaali tugevuse mõõtmine

Baktereid kasvatati 5 ml MOPS Gly söötmes 125 ml kolvis 3 ööpäeva. Kultuur tõsteti ümber 50 ml tsentrifuugi tuubi ja baktereid fuugiti 15 minutit 5000 g juures masinas Sigma 4K15C rootoriga 13350/11150. Supernatant eemaldati ja bakterid suspendeeriti poolest esialgselt mahust (2,5 ml) MOPS Glt söötmes. Söötmesse lisati IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 1mM ja ampitsiliini lõppkontsentratsiooniga 150 µg/ml. Kultuuri lisati 50 µl kaupa mikrotiiterplaadi aukudesse ja peale lisati 50 µl konditsioneeritud söödet. Plaadile pandi peale temperatuuril 37 °C eelsoojendatud kaas ja pandi mikrotiiterplaadi lugejasse Synergy Mx. Temperatuuri hoiti masinas konstantsena 37 °C juures. GFP signaali tugevust mõõdeti 24 tunni jooksul iga 15 minuti tagant.

2.2.5 Katsete ülesehitus

Uurimaks, kas valitud bakteritüvi sekreteerib keskkonda ühendit, mis mõjutab sama tüve bakterite kasvamahakkamise dünaamikat, valmistati erinevatel ajapunktidel konditsioneeritud söötmeid ning lisati neid soikeseisundis olevate rakkude kultuuridele. Mikrotiiterplaadile kanti statsionaarse faasi bakterite kultuuri kolmes korduses. Muutusi bakterite kasvamahakkamise dünaamikas jälgiti GFP signaali tugevuse kaudu. Et teada, kas katse töötas või oli tegemist juhusliku muutusega, tehti igas katses ka positiivne ja negatiivne kontroll. Positiivse kontrollina lisati katses kasutatavatele statsionaarse faasi bakteritele söödet, milles oli eelnevalt kontrollitud

faktor X aktiivsus olemas. Negatiivse kontrollina lisati statsionaarse faasi bakteritele puhast MOPS Glt söödet. Kui kontrollid töötasid, oli alust arvata, et ka katses saadud tulemused on õiged.

Et leida, kas faktor X on erinevate tüvede vahel vastastikku äratuntav, tehti kahte erinevat risttesti. Ühes lisati statsionaarses faasis olevate laboritüvede rakkudele ainult laboritüvede kultuuridest valmistatud kontrollsöötmeid (0h) ja maksimaalse faktor X aktiivsusega söötmeid. Selliseid ristteste tehti viis korda, tulemustes on graafikutena esitatud representatiivsed näited. Teises risttestis lisati statsionaarses faasis olevatele tüvede BW25113, env76 ja CFT073 bakteritele BW25113, env76 ja CFT073 tüvede kultuuridest valmistatud kontrollsöötmeid (0h) ja maksimaalse faktor X aktiivsusega söötmeid. Selliseid ristteste tehti kolm korda, tulemustes on graafikutena esitatud representatiivsed näited. Muutusi bakterite kasvudünaamikas erinevates konditsioneeritud söötmetes jälgiti GFP signaali tugevuse kaudu. Mõlemas risttestis oli positiivse kontrollina statsionaarse faasi tüve BW25113 bakteritele lisatud maksimaalse faktor X aktiivsusega BW25113 kultuurist valmistatud konditsioneeritud söödet ning negatiivse kontrollina oli statsionaarse faasi tüve BW25113 bakteritele lisatud 0 ajapunktil konditsioneeritud söödet.

2.3 Tulemused

Kasvama hakanud *E.coli* bakteritüve BW25113 rakud sekreteerivad ekstratsellulaarsesse ruumi faktor X-i, mis indutseerib sama kultuuri veel soikeseisundis olevate rakkude kasvamahakkamist (Tüür, 2013). Käesolevas töös uuriti, kas selline nähtus esineb ka teistes *E.coli* bakteritüvedes. Selleks kasvatati *E.coli* tüvesid BW25113, MG1655, BL21(DE3), CFT073 ja env76 MOPS-i minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud süsinikuallikana 0,1% glütserooli (Gly). Kolme päeva möödudes, kui bakterid olid jõudnud statsionaarsesse faasi, vahetati vana sööde uue MOPS söötme vastu, kuhu oli lisatud süsinikuallikana 0,2 % glükonaati (Glt) ning paari tunni pärast, kui osa rakke oli juba kasvama läinud, valmistati kultuuridest konditsioneeritud sööde. Selline sööde sisaldab bakterite poolt keskkonda eritatud aineid, eeldatavasti ka faktor X-i. Kas kõik *E.coli* tüved sekreteerivad faktor X-i ja kas ühe tüve poolt toodetud faktor X suudab mõjutada ka teise *E.coli* tüve rakke olid käesoleva töö põhiküsimused.

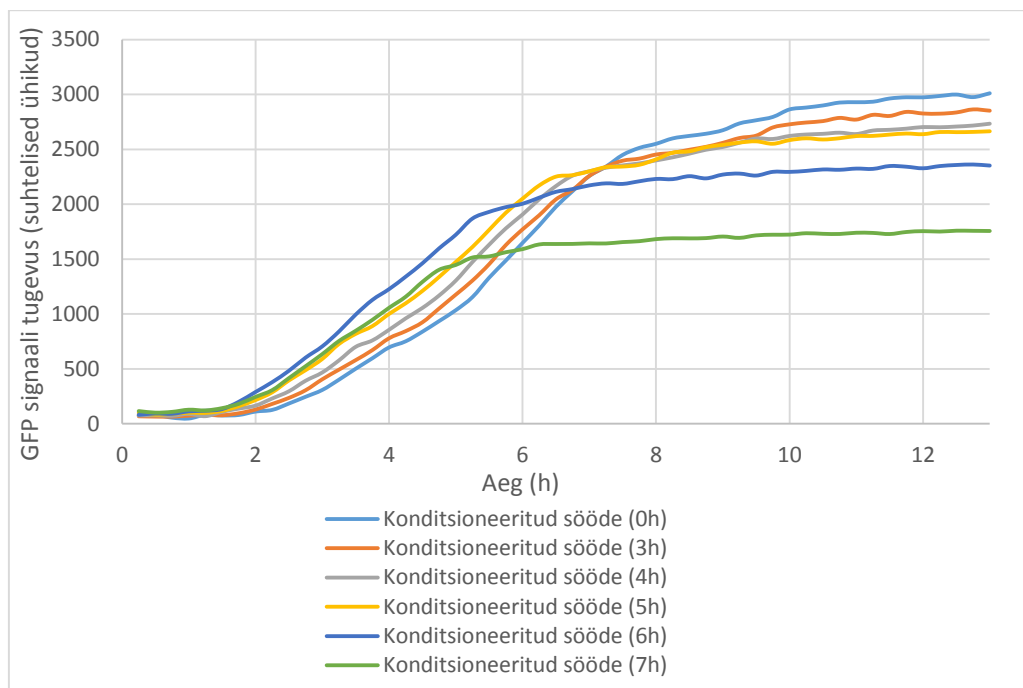
2.3.1 Faktor X sisaldus kasvamahakkavas kultuuris muutub ajas

Faktor X sisaldus kasvavas kultuuris muutub aja jooksul, kuid millisel ajahetkel on faktor X hulk maksimaalne, ei olnud teada. Faktor X produktsiooni dünaamika selgitamine saigi minu esmaseks ülesandeks.

Maksimaalse faktor X aktiivsusega ajapunkti leidmiseks valmistati erinevatel ajapunktidel konditsioneeritud söötmeid, mida hiljem katsetati soikeseisundis olevate bakterite peal. Selleks eemaldati iga teatud aja tagant osa kasvavast kultuurist, rakud fuugiti põhja ning sööde viidi uude tuubi ja säilitati temperatuuril -20 °C. Erinevateks ajapunktideks, millal osa kultuurist kolvist välja võeti ja sööde eemaldati, olid 0h, 3h, 4h, 5h, 6h ja 7h. 0 ajapunkt võeti kohe peale uue MOPS söötme lisamist soikeseisundis olevatele bakteritele. Kuna bakterid ei olnud sel ajahetkel jõudnud kasvama hakata, siis nendes söötmetes faktor X puudub. Seega saab faktor X-i aktiivsust mõõta erinevates konditsioneeritud söötmetes neid 0 ajapunktil eemaldatud söötmega võrreldes. Varasemalt on teada, et *E.coli* tüvi BW25113 hakkab söötmesse enim sekreteerima faktor X-i kolme kuni seitsme tunni jooksul (Tüür, 2013), seetõttu võeti ka siin katsetes ajapunktideks 3 kuni 7 tundi.

Et leida, millisel ajapunktil oli söötmes faktor X-i aktiivsus suurim, lisati soikeseisundis olevatele rakkudele erinevatel ajapunktidel valmistatud konditsioneeritud söötmeid. Soikeseisundist

väljumise dünaamikat jälgiti GFP signaali tugevuse kaudu (joonis 2). Mida suurem oli faktor X-i aktiivsus konditsioneeritud söötmes, seda kiiremini tõusis ajas GFP signaali tugevus.



Joonis 2. Tüvi BW25113 sekreteerib ja reageerib sama tüve poolt sekreteeritud faktor X-iga. Soikeseisundis olevatele BW25113 tüve rakkudele lisati erinevatel ajapunktidel valmistatud BW25113 tüve konditsioneeritud söötmeid. Rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi. Eksperimenti viidi läbi kaks korda, esitatud on representatiivne näide.

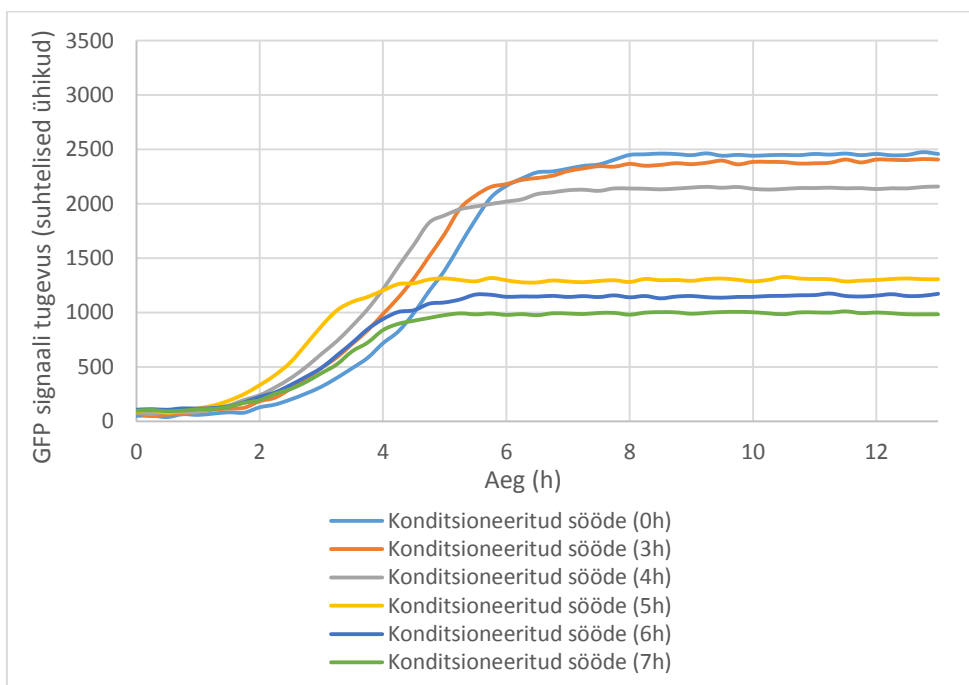
Jooniselt 2 on näha, et kõige suurem faktor X aktiivsus on 6. tunnil konditsioneeritud söötmes. Selles kultuuris toimub GFP signaali kogunemine kõige kiiremini. Ka 5. ja 7. tunnil konditsioneeritud söötmetes on faktor X sisaldus selgelt detekteeritav, teistes ajapunktides erineb see aga kontrollisöötimest (0h) vähe. Seega on *E.coli* BW25113 tüve puhul maksimaalne faktor X sisaldus 6. tunnil konditsioneeritud söötmes.

2.3.2 Faktor X-i toodavad erinevad *E.coli* tüved

2.3.2.1 Laboritüved BW25113, MG1655, BL21(DE3)

Seni on meie laboris analüüsitud faktor X olemasolu ainult *E.coli* tüves BW25113. Järgnevalt analüüsisin, kas faktor X toodavad ka teised *E.coli* tüved või on tegemist ainult kitsa tüvespetsiifilise fenomeniga.

Tüvedest MG1655 ja BL21(DE3) valmistati erinevatel ajapunktidel konditsioneeritud söötmed ning katsetati, kas need söötmed suudavad muuta rakkude ärkamiskiirust. Jooniselt 4 on näha, et MG1655 puhul on konditsioneeritud söötmes rakkude ärkamiskiirus suurem võrreldes kontrollsöötmelega ning maksimaalne erinevus esineb 5. tunnil konditsioneeritud söötmes. BL21(DE3) puhul jäid muutused GFP signaali tugevuses minimaalseks, mis viitab sellele, et BL21(DE3) tüvi nendes tingimustes mikrotiiterplaadil ei hakkagi kasvama (andmeid ei ole näidatud). Seega on võimalik, et BL21(DE3) tüvi küll toodab kolvis kasvatades faktor X, kuid samal tüvel selle olemasolu testida ei saa.



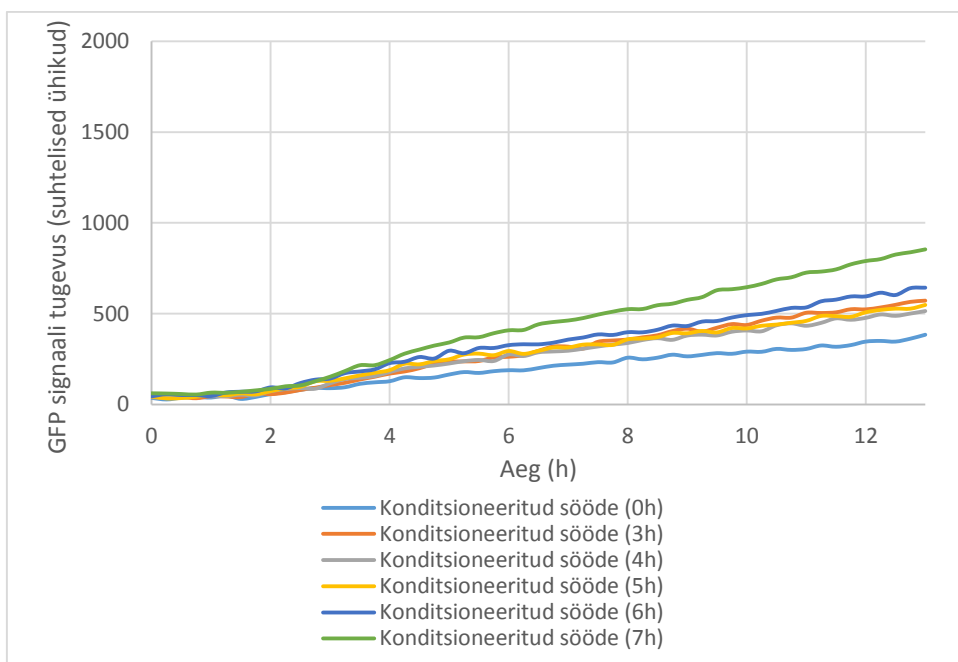
Joonis 4. *E.coli* tüvi MG1655 sekreteerib ja reageerib sama tüve poolt sekreteeritud faktor X-iga. Soikeseisundis olevatele MG1655 tüve rakkudele lisati erinevatel ajapunktidel valmistatud MG1655 tüve konditsioneeritud söötmeid. Rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi. Eksperimenti viidi läbi kaks korda, esitatud on representatiivne näide.

2.3.2.2 Tüved CFT073 ja env76

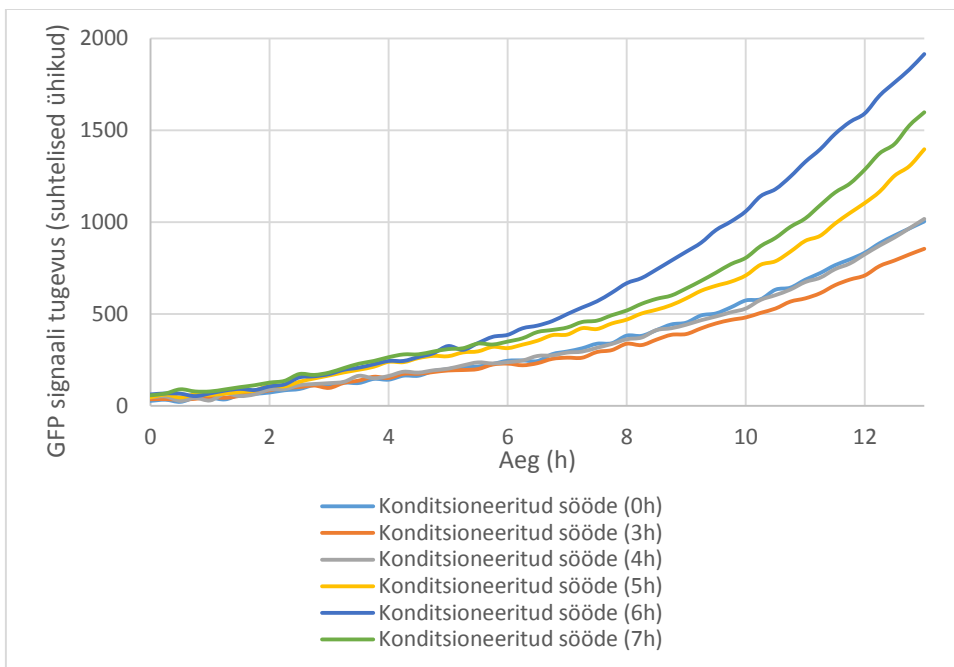
Kui leiti, et lisaks laboritüvele BW25113 sekreteerib ka teine laboritüvi MG1655 ühendit, mis mõjutab kontrollsöötmelega võrreldes statsionaarses faasis olevate bakterite ärkamiskiirust märgatavalt, otsustati uurida, kas selline fenomen ulatub laboritüvedest veelgi kaugemale. Selleks valiti kaks *E.coli* tüve, mis oleksid nii laboritüvedest kui ka üksteisest geneetiliselt kauged. Üheks tüveks valiti patogeenne tüvi CFT073, mis põhjustab nakatumisel uroinfektsioone (Mobley *et al.*,

1990). Teiseks tüveks valiti Tartust Emajõesst isoleeritud tüvi env76 (Mailiis Laht, suuline informatsioon).

Tüvedest CFT073 ja env76 valmistati erinevatel ajapunktidel konditsioneeritud söötmed ja katsetati, kas erinevates konditsioneeritud söötmetes on bakterite ärkamiskiirused erinevad. Leiti, et ärkamiskiirused on erinevad ning et tüve CFT073 puhul oli maksimaalse faktor X aktiivsusega 7. tunnil konditsioneeritud sööde (joonis 5) ja tüve env76 puhul 6. tunnil konditsioneeritud sööde (joonis 6).



Joonis 5. Tüve CFT073 puhul on suurim faktor X aktiivsus 7. tunnil konditsioneeritud söötmes. Soikeseisundis olevatele CFT073 tüve rakkudele lisati erinevatel ajapunktidel valmistatud CFT073 tüve konditsioneeritud söötmeid. Rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi.

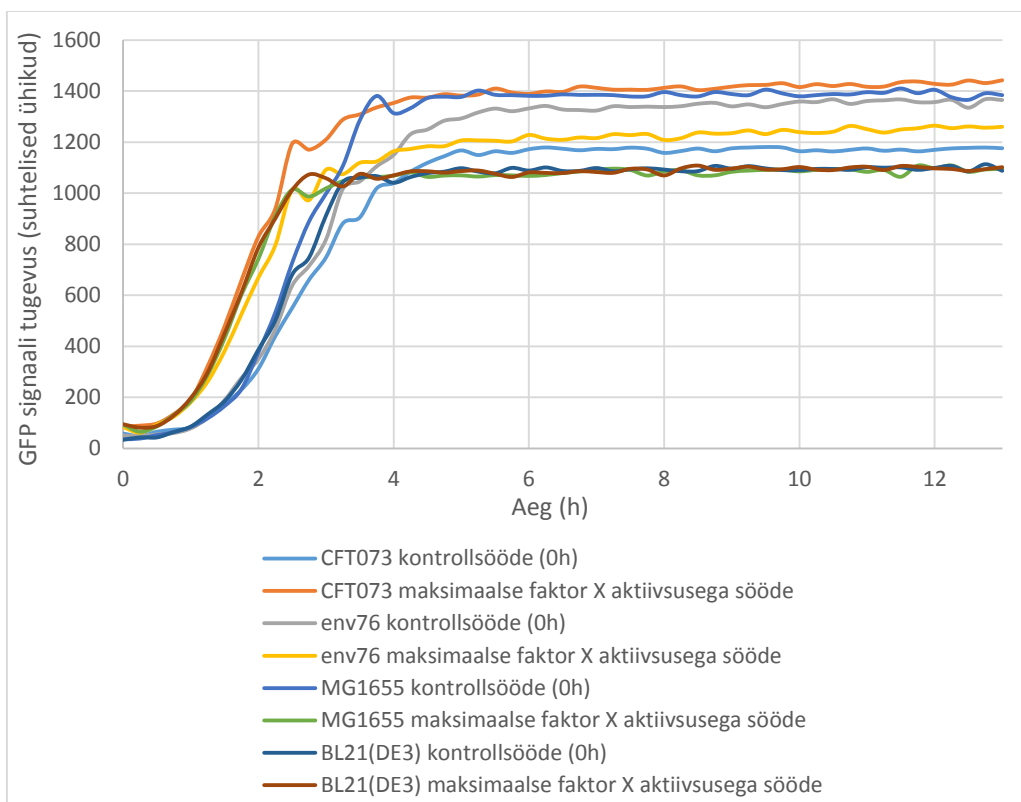


Joonis 6. Tüve env76 puhul on suurim faktor X aktiivsus 6. tunnil konditsioneeritud söötmes. Soikeseisundis olevatele env76 tüve rakkudele lisati erinevatel ajapunktidel valmistatud env76 tüve konditsioneeritud söötmeid. Rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi.

Nii env76 kui CFT073 tüvi suudavad samuti toota faktor X-i, seega ei ole faktor X olemasolu piiratud ainult laboris kasutatavate *E.coli* tüvedega.

2.3.3 Faktor X on erinevate tüvede vahel vastastikku äratuntav

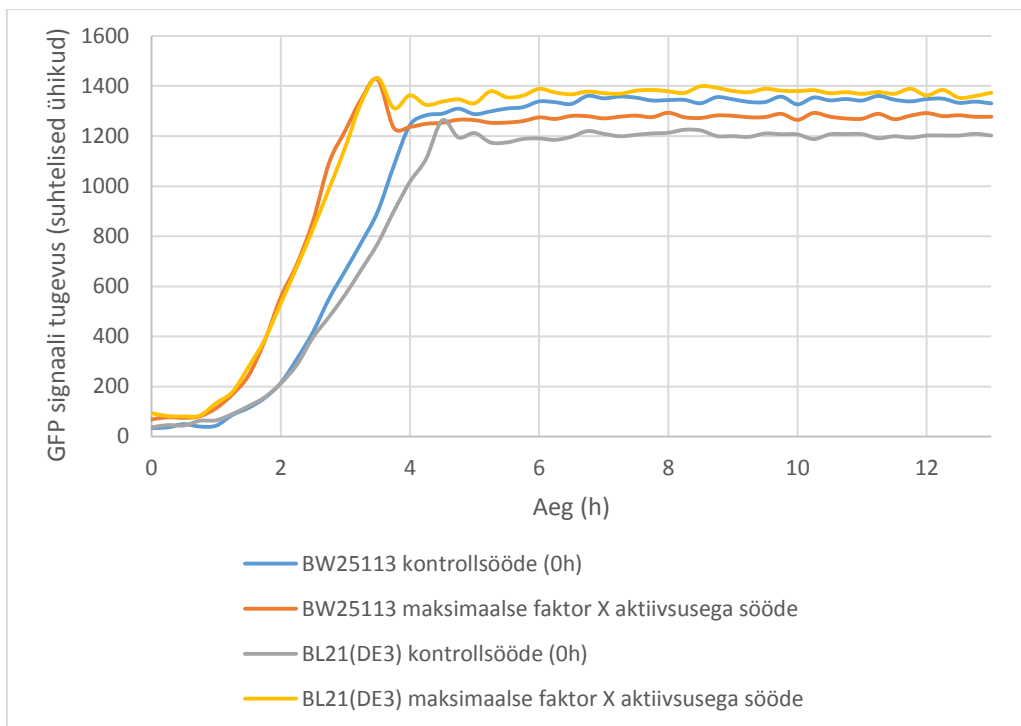
Faktor X aktiivsus tuvastati nii laboritüvede MG1655 ja BW25113, patogeense tüve CFT073 ja keskkonnast isoleeritud tüve env76 konditsioneeritud söötmetes ning leiti, et need söötmed mõjutavad samade tüvede kasvamahakkamise dünaamikat. Seejärel otsustati uurida, kas faktor X on ainult tüvespetsiifiline või mõjuvad erinevate tüvede faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötmed ka erinevate tüvede bakterite ärkamiskiirusele. Selleks lisati ühe tüve konditsioneeritud söödete teise tüve statsionaarse faasi rakkudele ning jälgiti GFP signaali kaudu bakterite ärkamiskiirust. Katsete tulemusena leiti, et faktor X on erinevate tüvede vahel vastastikku äratuntav. BW25113 tüve statsionaarse faasi bakterite ärkamiskiirust mõjutavad tüvede MG1655, CFT073, env76 kui ka BL21(DE3) maksimaalse faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötmed (joonis 7).



Joonis 7. BW25113 rakud reageerivad teiste tüvede faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötmetele. Soikeseisundis BW25113 rakkudele lisati erinevate tüvede konditsioneeritud söödete ja rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi.

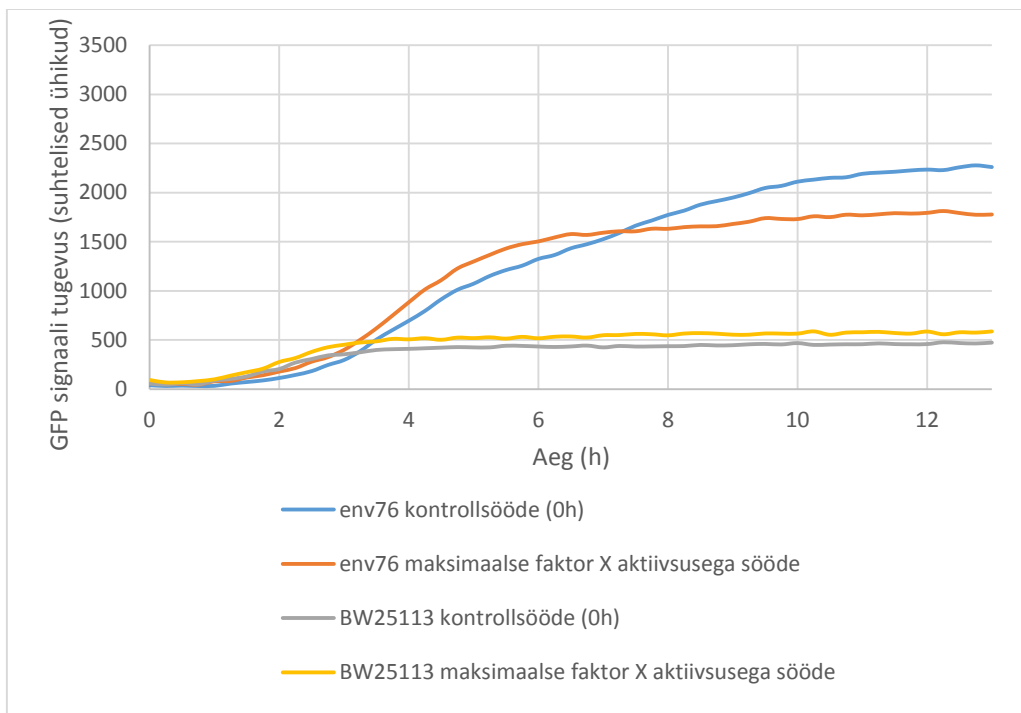
Kuigi BL21(DE3) konditsioneeritud söötmetes BL21(DE3) statsionaarse faasi rakud kasvama ei hakanud, saadi risttestide tulemusena teada, et selle tüve konditsioneeritud söötmetes on faktor X aktiivsus siiski olemas.

MG1655 tüve bakterite ärkamiskiirusele mõjusid BL21(DE3) ja BW25113 tüvede maksimaalse faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötmed (joonis 8).



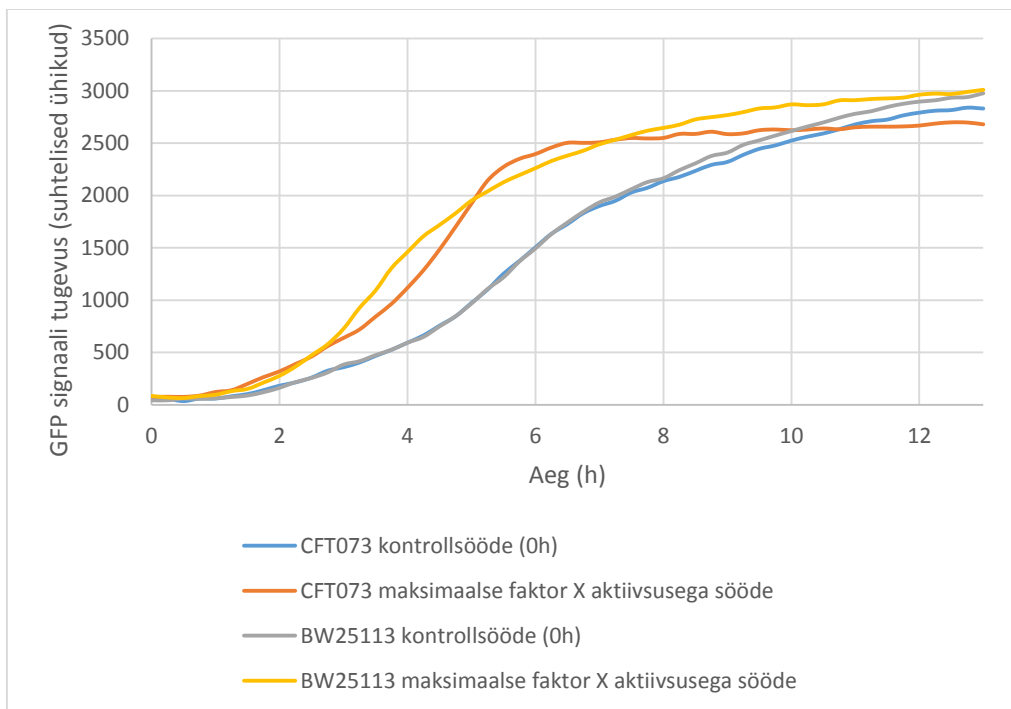
Joonis 8. MG1655 rakud reageerivad BW25113 ja BL21(DE3) tüvede faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötmetele. Soikeseisundis MG1655 rakkudele lisati BW25113 ja BL21(DE3) tüvede konditsioneeritud söötmeid ning rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi.

Tüve CFT073 bakterite ärkamiskiirust mõjutas env76 konditsioneeritud söödet, BW25113 konditsioneeritud söötme mõju oli väga väike (joonis 9).



Joonis 9. CFT073 rakud reageerivad env76 tüve faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötmetele. BW25113 tüve faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötme mõju CFT073 rakkude ärkamiskiirusele on väike. Soikeseisundis CFT073 rakkudele lisati env76 ja BW25113 tüvede konditsioneeritud söötmeid ning rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi.

Tüve env76 rakkude ärkamiskiirusele mõjusid nii BW25113 kui ka CFT073 maksimaalse faktor X aktiivsusega söötmed (joonis 10).



Joonis 10. env76 rakud reageerivad BW25113 ja BL21(DE3) tüvede faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söötmetele. Soikeseisundis env76 rakkudele lisati BW25113 ja BL21(DE3) tüvede konditsioneeritud söötmeid ning rakkude kasvamahakkamist jälgiti GFP signaali kogunemise kiiruse järgi.

2.4 Arutelu

Käesolevas töös uurisin, kas lisaks *E.coli* BW25113 tüvele sekreteerivad faktor X-i ka teised *E.coli* tüved või on faktor X-i sekretsioon omane ainult BW25113 tüvele. Leidsin, et laboritüvede MG1655 ja BL21(DE3), patogeense CFT073 ja Tartust Emajõest isoleeritud env76 tüve konditsioneeritud söötmetes on olemas faktor X aktiivsus. Kui soikeseisundis bakteritele lisati sama tüve konditsioneeritud söötmeid, kuhu eeldatavalt olid bakterid eelnevalt sekreteerinud faktor X-i, oli näha muutust bakterite „ärkamise“ dünaamikas, võrreldes nende bakteritega, kes hakkasid kasvama faktor X aktiivsusega kontrollsöötmetes. Faktor X aktiivsusega söötmetes väljusid bakterid kiiremini soikeseisundist. Seega faktor X-i on võimelised sekreteerima peale BW25113 rakkude ka laboritüvi MG1655, patogeenne CFT073 tüvi ning Emajõest isoleeritud env76 tüvi.

Eelnevalt kirjeldatud viisil ei suudetud kohe tuvastada, kas ka *E.coli* BL21(DE3) tüve konditsioneeritud söötmetes on olemas faktor X aktiivsus, kuna selle tüve soikeseisundis bakterid ei hakanud kasvama konditsioneeritud MOPS Glt söötmetes ning seetõttu ei saanud jälgida muutusi kasvamahakkamise dünaamikas. Samuti tahtsin teada, kas faktor X on tüvespetsiifiline või on ühe tüve bakterid võimelised reageerima ka teise tüve poolt sekreteeritud faktor X-iga. Selleks lisasin ühe tüve soikeseisundis bakteritele teise tüve faktor X aktiivsusega konditsioneeritud söödet. Leidsin, et BL21(DE3) tüvi on sekreteerinud söötmesse faktor X-i, sest selle tüve konditsioneeritud söötmes hakkasid MG1655 ja BW25113 tüve rakud kiiremini väljuma soikeseisundist kui kontrollsöötmetes. Lisaks sain teada, et *E.coli* laboritüved MG1655 ja BW25113 reageerivad laboritüvede MG1655, BW25113 ja BL21(DE3) poolt sekreteeritud faktor X-iga ning env76, CFT073 ja BW25113 reageerivad env76, CFT073 ja BW25113 tüvede poolt sekreteeritud faktor X-iga. Seega faktor X on erinevate *E.coli* tüvede puhul vastastikku äratuntav.

Soikeseisundis bakter peab jälgima ümbritsevat keskkonda. Kui elutingimused muutuvad jälle soodsateks, saab bakter sellest väliskeskkonnas olevate signaalmolekulide kaudu kiiresti teada ning ta käivitab oma metabolismi (Camilli *et al.*, 2006). Aktiivseks muutunud bakterid sekreteerivad keskkonda signaalmolekule, mis on võimelised aktiveerima ka teisi soikeseisundis baktereid (Epstein, 2009). Ka faktor X on *E.coli* tüvedes üheks selliseks signaalmolekuliks. Siiski ei ole veel teada, kas *E.coli* tüved sekreteerivad faktor X-i eesmärgiga aktiveerida teisi soikeseisundis olevaid baktereid või on faktor X lihtsalt kõrvalprodukt mõnes bioloogilises

protsessis. Näiteks satuvad rakujagunemise käigus *Bacillus subtilis*'e rakuseina koostises olevad muropeptiidid ekstratsellulaarsesse ruumi (Shah *et al.*, 2008), kus nad on signaalideks ka teistele *B.subtilis* spooridele, et elutingimused on muutunud taas soodsateks (Cloud-Hansen *et al.*, 2006). *B.subtilis* ei sekreteeri muropeptiidide väliskeskkonda eesmärgiga aktiveerida teisi *B.subtilis* spoore, vaid muropeptiidide fragmendid satuvad väliskeskkonda, kuna gram-positiivsetel bakteritel ei ole vastavaid mehhanisme, mis taaskasutaks neid fragmente ning seetõttu satuvad need ekstratsellulaarsesse ruumi (Doyle *et al.*, 1988; Mauck *et al.*, 1971). *B.subtilis*'e spoorid suudavad neid fragmente signaalidena interpreteerida. Kui teised rakud on võimelised jagunema, siis peaks olema elukeskkond piisavalt hea. Sarnane fenomen võib esineda ka faktor X-i puhul.

E.coli bakteritele on kasulik, kui nad tunnevad ära ka teiste tüvede poolt sekreteeritud faktor X-i. Nii on võimalik kiiremini saada väliskeskkonnast informatsiooni selle kohta, kas elutingimused on taas soodsateks muutunud. Kui *E.coli* bakter tunneks ära ainult sama tüve poolt sekreteeritud faktor X-i, siis võib juhtuda, et kui mõni sama tüve bakter väljub lõpuks soikeseisundist ja hakkab sekreteerima faktor X-i, mis äratav ka teised sama tüve bakterid üles, on teised tüved selleks ajaks juba ammu väljunud soikeseisundist, kasutanud ära enamus toitaineid ning pannud aluse mitmetele oma tüve populatsioonidele. Sellisel juhul on raskem alles „ärgeand“ bakteritel konkureerida teiste tüve bakteritega. Samas, kui *E.coli* tüved sekreteerivad faktor X-i eesmärgiga aktiveerida teised samast tüvest soikeseisundis bakterid, siis ei ole see eriti kasulik, kui faktor X on erinevate tüvede vahel vastastikku äratuntav. Kui ühe tüve poolt sekreteeritud faktor X hakkab mõjuma ka teistele tüvedele, hakkavad ka teiste tüvede rakud väljuma soikeseisundist ning tarbima keskkonnas olevaid toitaineid, samal ajal kuhjuvad keskkonda bakterite elutegevuse tagajärjel tekkinud jääkained (Schaetcher, 2012). Nii halvenevad elutingimused keskkonnas kiiremini ning bakterid saavad aluse panna ainult vähestele populatsioonidele.

Kuna bakterid tunnevad ära teiste tüvede poolt sekreteeritud faktor X-i, võib see tähendada seda, et erinevate tüvede rakkude pinnal on olemas samasugused retseptorid, mis võimaldavad siduda ja transportida faktor X-i läbi rakumembraani, või transporditakse faktor X-i läbi rakumembraanis olevate pooride või kanalite. Kõige enam uuritud signaalmolekulideks gram-negatiivsetes bakterites on homoseriinlaktooni molekulid (Camilli *et al.*, 2006). Lühikese ahelaga HSL molekulid võivad vabalt difundeeruda läbi rakumembraani (Myszka *et al.*, 2012). Tegemist on hüdrofoobse molekuliga, kuid faktor X on hüdrofiilne (Tüür, 2013), mistõttu on vähetõeline, et faktor X vabalt läbi bakteriraku membraani difundeerub. Pikema ahelaga HSL molekule

transporditakse aktiivselt läbi membraanis paiknevate pumpade (Myszka *et al.*, 2012). Võimalik, et samal viisil transporditakse ka faktor X-i.

Järgmise etapina tuleks selle projekti raames uurida, kas faktor X-i sekretsioon on omane ainult *E.coli* tüvedele või on ka teised *E.coli*-ga lähedased liigid võimelised sekreteerima ja reageerima faktor X-iga.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti kas lisaks *E.coli* BW25113 tüvele sekreteerivad ka teised *E.coli* laboritüved MG1655 ja BL21(DE3), patogeenne CFT073 tüvi ning keskkonnast isoleeritud env76 tüvi äratussignaale, mis indutseerivad soikeseisundist väljumist. Kõik tüved, peale BL21(DE3), sekreteerisid ja reageerisid sama tüve poolt sekreteeritud äratussignaalidele. BL21(DE3) tüve bakterid ei hakanud statsionaarsest faasist väljuma katses kasutatud MOPS Glt söötmes, mistõttu ei saanud jälgida antud tüve soikeseisundist väljumise dünaamikat. Kui uuriti, kas ühe tüve bakterid on võimelised reageerima teise tüve poolt sekreteeritud äratussignaalidele, leiti, et BL21(DE3) tüvi siiski sekreteerib äratussignaale, mis mõjuvad BW25113 ja MG1655 tüvede ärkamiskiirustele. BW25113 tüve soikeseisundis bakterid reageerisid kõigi katses kasutatud tüvede äratussignaalidele. MG1655 tüve bakterid reageerisid BL21(DE3) ja BW25113 tüvede äratussignaalidele. CFT073 tüve bakterid reageerisid env76 ja BW25113 tüvede äratussignaalidele. env76 tüve bakterid reageerisid CFT073 ja BW25113 tüvede äratussignaalidele. Seega on *E.coli* tüvedes äratussignaalid vastastikku äratuntavad.

SUMMARY

***Escherichia coli* signals that induce exiting from dormancy existence in different bacterial strains**

Many bacteria survive growth-permissive conditions by switching from active to dormant state. In dormant state the metabolism of bacteria is slowed down. They don't grow or divide. When conditions change back to favourable, bacteria start to exit from dormancy (Dworkin *et al.*, 2010). In some species the active bacteria may secrete growth-inducing signalling compounds to the extracellular space and thus wake up other bacteria that are in dormant state (Epstein, 2009). This thesis focuses on the existence of the signals that induce exiting from dormancy in different *Escherichia coli* strains. So far the only *E.coli* strain where these kind of signals were found was BW25113 (Tüür, 2013). Through experiments it was found that *E.coli* strains MG1655, BL21(DE3), CFT073 and env76 also produce these kind of signals. Furthermore, the signals were recognizable between different *E.coli* strains. BW25113 strain reacts to the signals produced by MG1655, BL21(DE3), CFT073 and env76 strains. MG1655 strain reacts to signals produced by BL21(DE3) and BW25113 strains. CFT073 strain reacts to signals produced by env76 and BW25113 strains. env76 strain reacts to signals produced by CFT073 and BW25113 strains. BL21(DE3) didn't grow in MOPS Glt medium, therefore it couldn't be determined whether the signals produced by other *E.coli* strains could affect waking up speed in dormant BL21(DE3) bacteria.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Bacun-Družina, V., Butorac, A., Mrvcic, J., Dragicevic, T. L., Stehlik-Tomas, V. (2011). Bacterial stationary-phase evolution. *Food Technology, Biotechnology* 49(1): 13-23.
- Bassler, B.L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 2: 582-587.
- Buerger, S., Spoering, A., Gavrish, E., Leslin, C., Ling, L., Epstein, S.S. (2012). Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. *Applied and Environmental Microbiology* 78(9): 3221-3228.
- Camilli, A., Bassler, B.L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science Magazine* 311(5764): 1113-1116.
- Cloud-Hansen, K.A., Peterson, S.B., Stabb, E.V., Goldman, W.E., McFall-Ngai, M.J., Handelsman, J. (2006). Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nature Reviews of Microbiology* 4: 710-716.
- Doyle, R.J., Chaloupka, J., Vinter, V. (1988). Turnover of cell walls in microorganisms. *Microbiology Reviews* 52: 554-567.
- Dworkin, J., Shah, I.M. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature Review Microbiology* 8(12): 890-896.
- Epstein, S.S. (2009). Microbial awakenings. *Nature* 457: 1083.
- Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., Andrews, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiology*. Article ID 703813, p. 1-6.
- Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11: 25-36.
- Heritage, J., Evans, E. G. V., Killington, R. A. 1996. Bacterial spores, p. 46-49. *In* *Introductory microbiology*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Jöers, A., Kaldalu, N., Tenson, T. (2010). The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *Journal of Bacteriology* 192(13): 3379-3384.

Kana, B.D., Gordhan, B.G., Downing, K.J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E.E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G., Mizrahi, V. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. *Molecular Microbiology* 67(3): 672-684.

Kana, B.D., Mizrahi, V. (2009). Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 58: 39-50.

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): 8172-8180.

Khan, M.M. 2008. Role of cytokines, p. 33-55. *In Immunopharmacology*. Springer Science+Business Media, NY.

Koch, A. 2001. Phases of the culture cycle, p 78-79. *In Bacterial growth and form*, 2nd ed. Springer Science+Business Media, B.V.

Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q., Leibler, S. (2005). Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* 169: 1807-1814.

Lau, H.Y., Ashbolt, N.J. (2008). The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology* 107: 368-378.

Laub, M.T., Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics* 41: 121-45.

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

Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P., Downie, J.A. (2000). The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Molecular Microbiology* 37(1): 81-97.

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. *Journal of Bacteriology* 193(14): 3598-3605.

- Mauck, J., Chan, L., Glaser, L. (1971). Turnover of the cell wall of Gram positive bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 246: 1820-1827.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11: 33-44.
- Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 165-199.
- Mobley, H.L.T., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockatell, C.V., Jones, B.D., 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): 1281-1289.
- Moyed, H. S., Bertrand, K. P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology* 155(2): 768-775.
- Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruno, M., Lopez, J. A., Barcina, I. (2008). Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 28-36.
- Mukamolova, G.V., Karpelyants, A.S., Young, D.I., Young, M., Kell, D.B. (1998). A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 8916-8921.
- Myszka, K., Czaczyk, K. (2012). N-acylhomoserine lactones (AHLs) as phenotype control factors produced by gram-negative bacteria in natural ecosystems. *Polish Journal of Environmental Studies* 21(1): 15-21.
- Neidhardt, F.C. Bloch, P.L., Smith, D.F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology* 119(3): 736-747.
- Oliver, J. D. (2009). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 415-425.
- Reading, N.C., Sperandio, V. (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 254: 1-11.

Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D.S., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, M.W., Hinton, J.C.D. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology* 194(3): 686-701.

Schaechter, M. (2012). Growing and resting states, p. 33-35. *In* Engleberg, N.C., DiRita, V., and Dermody, T.S (ed.), *Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD.

Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6: 550-556.

Shah, I. M., Laaberki, M.-H., Popham, D. L., Dworkin, J. (2008). A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. *Cell* 135: 486-496.

Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., Kaper, J.B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100: 8951-8956.

Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 69: 183-215.

Taylor, J. 2001. The bacterial growth curve, p. 44-46. *In* *Microorganisms and Biotechnology*, 2nd ed. Nelson Thomas Ltd, United Kingdom.

Tufariello, J.M., Mi, K., Xu, J., Manabe, Y.C., Kesavan, A.K., Drumm, J., Tanaka, K., Jacobs, W.R.Jr., Chan, J. (2006). Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis. *Infection and Immunity* 74: 2985-2995.

Tüür, K. (2013). Soikeseisundist väljumine ja seda mõjutavad tegurid *Escherichia coli*'s. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituut.

Waterbury, J.B. 1979. Cell wall structure and its role in growth and development, p. 205-209. *In* J.H.Parish (ed.), *Developmental biology of prokaryotes*, vol. 1. University of California Press.

Vimberg, V., Tats, A., Remm, M., Tenson, T. (2007). Translation initiation region sequence preferences in *Escherichia coli*. *BMC Molecular Biology* 8: 100.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Regina Maruste (sünnikuupäev: 29.08.1993)

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

Escherichia coli äratussignaali olemasolu erinevates bakteritüvedes,

mille juhendaja on Arvi Jõers,

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. mail 2015