

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIAINSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Eliis Liske

**Muropeptiidide poolt indutseeritud statsionaarsest faasist väljumisega
seotud geenide tuvastamine bakteris *Escherichia coli***

Magistritöö

30 EAP

Juhendaja vanemteadur Arvi Jõers

TARTU 2020

INFOLEHT

Muropeptiidide poolt indutseeritud statsionaarsest faasist väljumisega seotud geenide tuvastamine bakteris *Escherichia coli*

Bakterid elavad kasvuks ebasoodsaid tingimusi üle metaboolselt inaktiivses soikeseisundis. Kui elutingimused paranevad, on nad võimelised kasvu jätkama ning kasvavad bakterid vabastavad ümbritsevasse keskkonda peptidoglükaani fragmente ehk muropeptiide, mis on signaaliks ülejäänud soikeseisundis bakteritele. *Escherichia coli* on üks bakteriliikidest, kes on võimeline soikeseisundist väljuma vastusena muropeptiididele. Käesoleva töö eesmärk oli välja töötada katsesüsteem, mis võimaldab identifitseerida geenid, mis on seotud muropeptiididest sõltuva soikeseisundist väljumisega. Välja õnnestus töötada katsesüsteem, mis võimaldab läbi viia suuremahulist Keio kollektsiooni skriinimist, et leida potentsiaalseid mutante, mis muropeptiididele ei reageeri.

Märksõnad: *Escherichia coli*, muropeptiid, peptidoglükaan, signaalmolekul

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Identification of genes that are involved in muropeptide-dependent exit from stationary phase in *Escherichia coli*

Bacteria can exist in a metabolically inactive dormant state which allows them to survive unfavourable conditions for growth. As environmental conditions improve, some bacteria can exit dormancy and the growing bacteria release peptidoglycan fragments, or muropeptides, into the environment, which act as a signal for the the rest of the dormant bacteria. *Escherichia coli* is one of the bacterial species that is able to exit the dormant state in response to muropeptides. The aim of this thesis was to develop an assay to identify genes involved in muropeptide-dependent exit from dormancy. Finally, an assay was developed that would allow large-scale screening of the Keio collection to identify mutants that do not respond to muropeptides.

Keywords: *Escherichia coli*, muropeptide, peptidoglycan, signaling molecule

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Peptidoglükaan ja muropeptiid	8
1.2 Peptidoglükaani biosüntees ja lagundamine bakteris <i>Escherichia coli</i>	10
1.3 Statsionaarne faas ja selle erinevad vormid	14
1.4 Muropeptiid kui signaal bakterite vahel	17
1.4.1 Soikeseisundist väljumine	17
1.4.2 Väliskeskkonnast pärit signaalide vastuvõtmine	18
1.4.3 Soikeseisundist väljumine vastusena muropeptiididele	19
1.4.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.4.3.2 <i>Micrococcus luteus</i>	21
1.4.3.3 <i>Escherichia coli</i>	22
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	25
2.1 Töö eesmärgid	25
2.2 Materjalid ja meetodika	26
2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed	26
2.2.2 Statsionaarsest faasist väljumisel muropeptiididele mittereageerivate bakterite testimine	26
2.2.3 Stressitingimuste rakendamine statsionaarse faasi kultuurile	27
2.2.4 Ärkamiskatse kasutades alamarBlue® värvi	28
2.2.5 Katsesüsteemi optimeerimine Keio kollektiooni skriinimiseks	28
2.3 Tulemused	30
2.3.1 Keio kollektioonist pärit mutantide ärkamiskineetika	30
2.3.2 Stressitingimuste rakendamine, et suurendada ajavahemikku muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahel	33

2.3.3 Süsinikuvaba minimaalsöötme kasutamine ärkamissöötmena	35
2.3.4 Katsesüsteemi optimeerimine KEIO kollektsiooni skriinimiseks	37
2.4 Arutelu	41
KOKKUVÕTE	44
SUMMARY	45
KASUTATUD KIRJANDUS	47
LISAD	52
LIHTLITSENTS	56

KASUTATUD LÜHENDID

(p)ppGpp	guanosiinpentafosfaat (<i>guanosine pentaphosphate</i>)
Ac	atsetaat (<i>acetate</i>)
EF-G	elongatsioonifaktor G (<i>elongation factor G</i>)
EF-Tu	elongatsioonifaktor Tu (<i>elongation factor thermo unstable</i>)
GlcNAc	N-atsetüülglükoosamiin (<i>N-acetylglucosamine</i>)
Glt	glükonaat (<i>gluconate</i>)
Gly	glütserool (<i>glycerol</i>)
m-DAP	meso-diaminopimeliinhape (<i>meso-diaminopimelic acid</i>)
MOPS	3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape (<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>)
MP	muropeptiid (<i>muropeptide</i>)
MurNAc	N-atsetüülmuraamhape (<i>N-acetylmuramic acid</i>)
NaCl	naatriumkloriid (<i>sodium chloride</i>)
PASTA	penitsilliini ja Ser/Thr kinaasiga seotud (<i>penicillin and Ser/Thr kinase associated</i>)
PG	peptidoglükaan (<i>peptidoglycan</i>)
rcf	suhteline tsentrifugaaljõud (<i>relative centrifugal force</i>)
Rpf	kasvamahakkamist soodustav valk (<i>resuscitation promoting factor</i>)

rpm	pöördeid minutis (<i>revolutions per minute</i>)
UDP	uridiin difosfaat (<i>uridine diphosphate</i>)
VBNC	elus, kuid mittekultiveeritav (<i>viable but non-culturable</i>)
wt	metsiktüüpi (<i>wild-type</i>)

SISSEJUHATUS

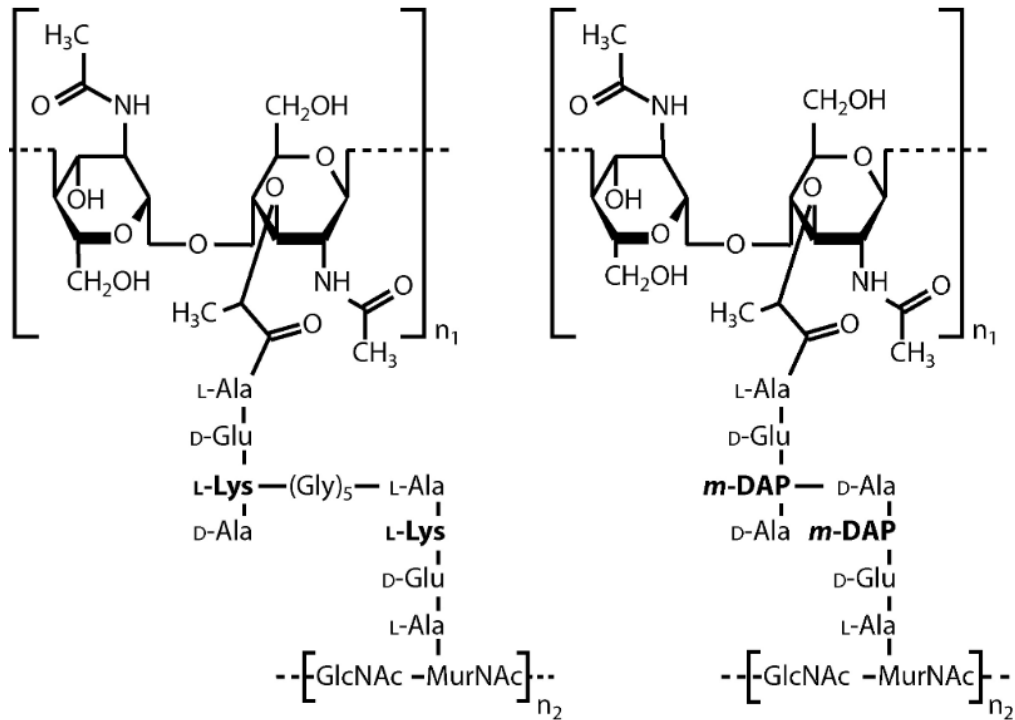
Bakterid võivad pika aja vältel eksisteerida metaboolselt inaktiivses seisundis ehk soikeseisundis. See võimaldab neil ellu jääda kasvuks ebasoodsates tingimustes. Kui keskkonnatingimused paranevad, on bakterid võimelised soikeseisundist väljuma ja kasvu jätkama (Dworkin ja Shah, 2010). Soikeseisundist väljumine ei toimu kogu bakteripopulatsiooni siseselt ühtemoodi, vaid see on stohhastiline protsess, kus osad rakud jätkavad kasvamist varem ja teised hiljem (Jöers *et al.*, 2010). Peale selle, et soikeseisundist väljumist stimuleerib toitainete olemasolu keskkonnas, võib see toimuda ka vastusena signaalidele, mida emitteerivad varem kasvama hakanud bakterid. Üheks selliseks signaaliks on rakuseinast eralduvate muropeptiidide vabastamine kasvavate bakterite poolt, mis annab ülejäänud populatsioonile märku, et keskkonnatingimused on kasvuks soodsad. Näiteks *Bacillus subtilis*'e spoorid on võimelised idanema vastusena muropeptiididele ja nende tuvastamiseks keskkonnast on vajalik membraanseoselise PrkC kinaasi olemasolu (Shah *et al.*, 2008; Dworkin ja Shah, 2010). Meie laboris avastati hiljuti, et muropeptiidid indutseerivad soikeseisundist väljumist ka bakteris *Escherichia coli* (Jöers *et al.*, 2019). *E. coli*'s puudub aga proteiinkinaasi PrkC geeniperekond, mille kaudu tunnevad muropeptiide ära *Bacillus* spoorid, seega gram-negatiivsete liikide puhul peab muropeptiidide tuvastamiseks olema mõni muu viis ning see mehhanism soikeseisundist väljumiseks on *E. coli* puhul veel teadmata. Käesoleva töö eesmärkideks oli identifitseerida geenid, mis on seotud muropeptiididest sõltuva kiirema soikeseisundist väljumisega. Selleks võeti eesmärgiks testida erinevate Keio kollektsoonist pärit erinevate mutantide ärkamiskineetikat muropeptiidide juuresolekul ning välja töötada selline katsesüsteem, mis võimaldaks selle eesmärgi jaoks läbi viia kogu Keio kollektiooni skriinimise. Käesoleva töö praktiline osa teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Peptidoglükaan ja muropeptiid

Bakterite rakukesta komponent peptidoglükaan ehk mureiin on suur makromolekul, mis koosneb kovalentselt seotud glükaanahelatest. Glükaanahelad on omavahel ristseotud lühikeste oligopeptiididega ja selline struktuur tagab, et rakk ei lõhkeks sisemise osmootse rõhu tõttu (Vollmer ja Bertsche, 2008). Peptidoglükaani peamine ülesanne on säilitada raku terviklikkus ning see on kaitsev barjäär füüsikaliste, keemiliste ja bioloogiliste ohtude eest. Selle biosünteesi inhibeerimine või spetsiifiline lagundamine (nt lüsoosüümi toimel) raku kasvu ajal põhjustab raku lüüsi. Peptidoglükaan aitab hoida raku kuju ja on tihedalt seotud rakkude kasvu ja jagunemise protsessidega (Vollmer *et al.*, 2008). Gram-negatiivsete bakterite peptidoglükaani võrgustik on suhteliselt õhuke (3–6 nm) sisemise ja välimise membraani vahel, gram-positiivsetes bakterites on see aga paksem, vahemikus 10–40 nm (Egan *et al.*, 2017).

Peptidoglükaani „selgroog“ koosneb vaheldumisi N-atsetüülglükoosamiini (GlcNAc) ja N-atsetüülmuraamhappe (MurNAc) disahhariididest, mis on omavahel seotud $\beta(1\rightarrow4)$ glükosiidsidemega. Disahhariidid on MurNAc jääkide kaudu kovalentselt seotud peptiidahelaga, mis koosneb kahest kuni viiest L- ja D-aminohappejäägist. Glükaanahelate ristsidumine toimub kas otse või läbi lühikese peptiidsilla ja selle tulemuseks on paks kolmemõõtmeline mitmekihiline võrgustik (joonis 1). Kui glükaanahel on bakteriliikides suures osas konserveerunud, siis peptiidi tüve ehitus ja ristsidemete tüüp nende vahel võib erineda (Vollmer *et al.*, 2008). Gram-negatiivsetel bakteritel ja gram-positiivsete klassi *Bacillus* esindajatel on peptiidi järjestuses kolmandaks aminohappeks m-DAP (meso-diaminopimeliinhape). Paljudel gram-positiivsetel bakteritel on selle asemel aga L-lüsiin (Egan *et al.*, 2017). DAP-tüüpi peptiidid on ristseotud tavaliselt otse, kuid L-lüsiin tüüpi peptiidid on seotud erineva pikkusega peptiidsildade kaudu (Vollmer *et al.*, 2008).



Joonis 1. Peptidoglükaani struktuur. Peptidoglükaan on polümeer, mille moodustavad N-atsetüülglükoosamiini (GlcNAc) ja N-atsetüülmuramüülhappe (MurNAc) jäägid ning mis on ristseotud MurNAc peptiidi tüve kaudu teise glükaanahelaga. Peptiidi tüvi sisaldab L-alaniini (L-Ala), D-glutamiinhapet (D-Glu) ja kas meso-diaminopimeliinhapet (m-DAP) (gram-negatiivsed bakterid ja *Bacillus* esindajad) või L-lüsiini (L-Lys) (gram-positiivsed bakterid), millele järgneb D-alaniin (D-Ala) (Dworkin, 2014).

Peptidoglükaan on suurt huvi pakkunud mitte ainult seetõttu, et see on üks peamisi antibiootikumide sihtmärke, vaid ka selle tähtsuse tõttu peremeesorganismi füsioloogias ja ainevahetuses seoses immunostimuleeriva toimega (Irazoki *et al.*, 2019). Osa peptidoglükaanist pärinevaid fragmente ehk muropeptiide taaskasutatakse rakuseina biosünteesiks, kuid need on olulised ka bakterite vahelises kommunikatsioonis ning paljud hulkraksed eukarüoodid käivitavad nende tuvastamisel immuunvastuse (Boudreau *et al.*, 2012; Dworkin, 2014). Muropeptiidide vabanemist põhjustab peptidoglükaani remodelleerimine bakterite kasvu ajal või toimub see rakkude täieliku lüüsi tagajärjel (Irazoki *et al.*, 2019).

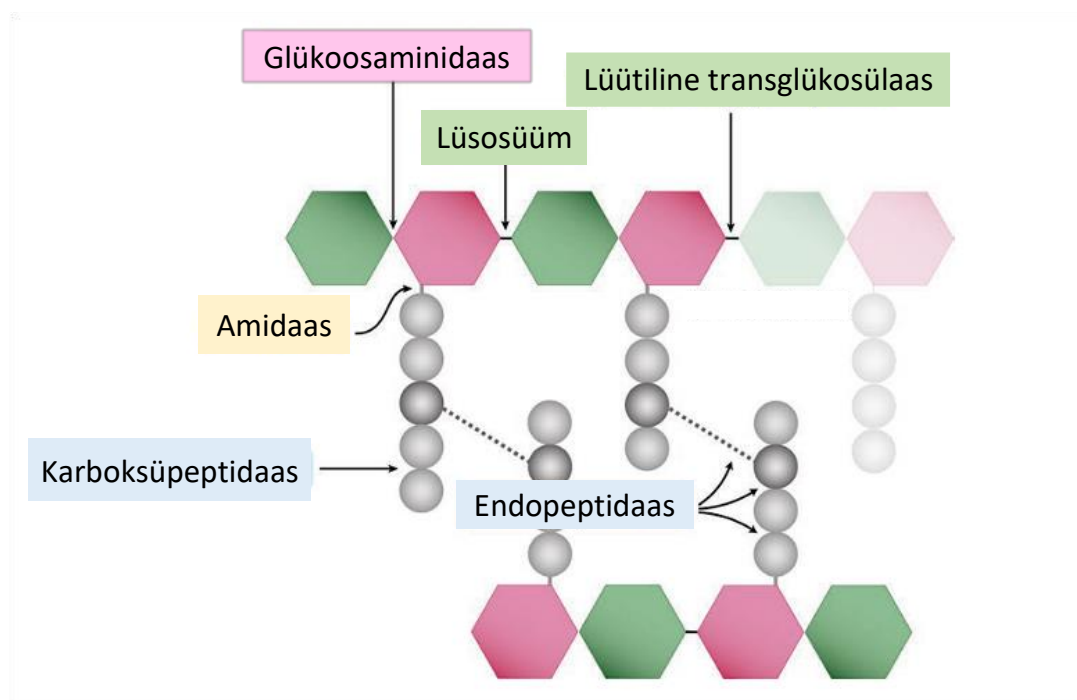
1.2 Peptidoglükaani biosüntees ja lagundamine bakteris *Escherichia coli*

Kasvamise ja jagunemise ajal lagundatakse peptidoglükaani spetsiaalsete ensüümide poolt, mille tagajärjel eralduvad peptidoglükaani fragmendid ehk muropeptiidid. Bakteris *Escherichia coli* muudetakse ühe generatsiooni vältel koguni 50% peptidoglükaanist anhüdromuropeptiidideks ning ligikaudu 95% sellest võetakse uuesti kasutusele peptidoglükaani taaskasutusraja kaudu. Seega eraldub muropeptiididena ainult 6–8% peptidoglükaanist, mis viitab rakuseina komponentide efektiivsele ringlusele (Dworkin, 2014; Park ja Uehara, 2008). Peale selle, et vabanenud materjali saab läbi taaskasutusraja kasutada peptidoglükaani sünteesiks, saab seda kasutada ka toitaine või energiaallikana või vabaneb see ümbritsevasse keskkonda (Irazoki *et al.*, 2019).

Rakukesta kasv on dünaamiline protsess, mis hõlmab süntetaase peptidoglükaani sünteesimiseks ja selle kinnitamiseks olemasolevasse rakukesta ning hüdrolaase, et lagundada rakukest värskelt sünteesitud materjali sisestamiseks. Ensüümide aktiivsust tuleb ajaliselt reguleerida nii, et uue materjali sisestamine säilitaks raku kuju. Peptidoglükaani süntees toimub kolmes etapis. Esmalt sünteesitakse tsütoplasmas lahustuvad aktiveeritud nukleotiidide prekursorid UDP-N-atsetüülglükoosamiin ja UDP-N-atsetüülmuramüülpentapeptiid. Teises etapis seotakse nukleotiidide prekursorid sisemise membraani poolel oleva undekaprenüülfosfaadiga, moodustades lipiidiga seotud disahhariid-pentapeptiidi monomeeri subühiku (lipiid II). Lipiid II keeratakse ümber flipaas FtsW-RodA poolt ja selle tagajärjel jääb nukleotiidi prekursoriga seotud suhkrujääk suunaga periplasma poole. Kolmandas etapis polümeriseeritakse lipiid II glükosüültransferaaside poolt, vabastades undekaprenüül-pürofosfaadi ning moodustunud glükaanahelad sisestatakse rakukesta koosseisu, kus glükaanahelate küljes olevate peptiidide ristsidumist viivad läbi DD-transpeptidaasid (Typas *et al.*, 2012).

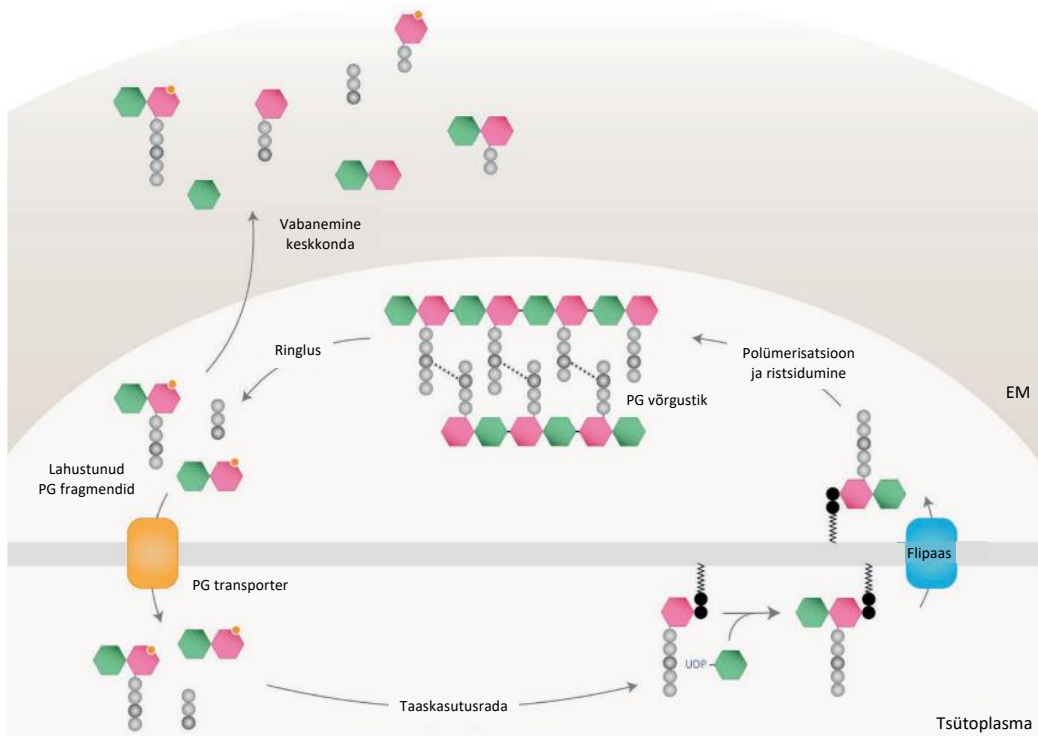
Peptidoglükaani kasv nõuab kovalentsete sidemete lõhustamist rakukestas, et äsja sünteesitud glükaanahelaid saaks võrgustikku sisestada ilma selle paksust suurendamata. Bakteriraku kasvamiseks on seega vaja peptidoglükaani lagundada. *E. coli*'s on vähemalt 13 periplasmaatilist peptidoglükaani hüdrolaasi, mis suudavad ühiselt lõhustada glükosiid- ja amiidsidemeid. Hüdrolaasid on olulised peptidoglükaani kuju, suuruse ja paksuse kujundamisel ning on vajalikud tütarakkude eraldamiseks rakkude jagunemise ajal (Typas *et al.*, 2012). Hüdrolaase rühmitatakse vastavalt lõhustatava sideme tüübile (joonis 2).

Glükosidaasid hüdrolüüsivad glükaanahelates olevaid glükosiidsidemeid, amidaasid lõhustavad peptiidi tüve esimese aminohappe ja MurNac-i vahelise amiidsideme ja vabastavad tri-, tetra- ja pentapeptiide periplasmasse ning peptidaasid hüdrolüüsivad peptiidi tüves esinevate aminohapete vahelisi sidemeid. Peptidoglükaani glükaanahelad sisaldavad kahte glükosidaasidele tundlikku glükosiidsidet. GlcNac-i ja sellele järgeva MurNac-i vahelist sidet hüdrolüüsivad N-atsetüül-glükoosaminidaasid ning MurNac-i ja selle kõrval oleva GlcNac-i vahelist sidet hüdrolüüsivad muramidaasid. Muramidaasid jagatakse kaheks sõltuvalt nende katalüütilisest mehhanismist. Lüsosüüm on hüdrolüütilised ensüümid, mis lisavad lagundamise ajal glükosiidsidemele H₂O ja seeläbi tekib redutseeriv MurNac-i produkt. Teine grupp muramidaase on lüütilised transglükosülaasid, mis lõhustavad MurNac-GlcNac sidemeid peptidoglükaani glükaanahelas, vabastades 1,6-anhüdro-N-atsetüülmuraamhapet (anhMurNac) sisaldavad peptidoglükaani fragmendid ehk anhüdromuropeptiidid. Peptidaasid võib samuti liigitada kahte rühma: karboksüpeptidaasid eemaldavad peptiidi tüves oleva C-terminaalse aminohappe ja endopeptidaasid hüdrolüüsivad peptiidide vahelisi ristsidemeid (Irazoki *et al.*, 2019).



Joonis 2. Peptidoglükaani lõhustavad ensüümid on glükosaminidaasid, amidaasid, peptidaasid ja muramidaasid (Irazoki *et al.*, 2019, kohandatud).

Sõltuvalt peptidoglükaani taaskasutusraja reguleerimisest transporditakse anhidromuropeptiide kas tsütoplasmasse, kus neid seejärel töödeldakse erinevate ensüümidega, või vabanevad ümbritsevasse keskkonda (joonis 3). Suurem osa tekkinud anhidromuropeptiididest jääb esmalt periplasmasse lõksu. AmpG on põhiline permeaas peptidoglükaani taaskasutusrajas, mis transpordib periplasmost tsütoplasmasse GlcNAc-anhidro-MurNAc peptiide, sealjuures peptiidi tüve pikkus võib varieeruda (Park ja Uehara, 2008). Need mureiini tripeptiidid (L-Ala- γ -D-Glu-m-DAP) ja tetrapeptiidid (L-Ala- γ -D-Glu-m-DAP-D-Ala), mis vabanevad peptidoglükaanist või anhidromuropeptiididest amidaaside poolt, viib periplasmost tsütoplasmasse oligopeptiidi transporter Opp koos spetsiifilise seondumisvalgu MppA-ga. Tsütoplasmas hüdrolüüsitakse anhidromuropeptiide veel NagZ (N-atsetüül-glükoosaminidaas) ja AmpD (anhMurNAc-L-Ala amidaas) poolt, mille tagajärjel tekivad GlcNAc, anhMurNAc ja vabad tetrapeptiidid. Saadud tetrapeptiidid hüdrolüüsitakse L,D-karboksüpeptidaasi LdcA poolt tripeptiidideks, mida saab edasi lagundada üksikuteks aminohapeteks, et kasutada neid toitainete või energiaallikana või lisatakse need UDP-MurNAc koosseisu ligaasi Mpl abil. Ligeeritud UDP-MurNAc-tripeptiide ja saadud aminosuhkruid saab seejärel taaskasutada peptidoglükaani sünteesi taaskasutusraja kaudu (Irazoki *et al.*, 2019). Aminosuhkrud GlcNAc ja anhMurNAc muundatakse GlcNAc-6-fosfaadiks. Viimast deatsetüülib NagA, saades GlcN-6-fosfaadi, mis seejärel siseneb peptidoglükaani prekursori UDP-GlcNAc sünteesi rajasse või glükolüüsi kataboolsesse rajasse, mille tagajärjel tekib fruktoos-6-fosfaat. Samuti võidakse GlcNAc ja MurNAc tsütoplasmasse transportida fosfotransferaasi süsteemi transporteritega NagE ja MurP, saades rakusiseselt 6-fosfaat suhkrud (Reith ja Mayer, 2011).



Joonis 3. Peptidoglükaani taaskasutus ja muropeptiidide eraldumine. Peptidoglükaani lagundavad ensüümid lõhustavad rakukesta, vabastades peptidoglükaani fragmente periplasmasse, mida saab seejärel eraldada kas keskkonda või transportida peptidoglükaani transporterite kaudu tsütoplasmasse. Tsütoplasmas olles võivad peptidoglükaani fragmendid siseneda taaskasutusraja, et lõpuks uuesti inkorporeerida äsja sünteesitud peptidoglükaani võrgustiku koosseisu või saab neid kasutada energiaallikana. Peptidoglükaani fragmendid, mis eralduvad keskkonda, võivad ümbritsevate rakkude jaoks toimida kui signaalmolekulid. EM - ekstratsellulaarne maatriks; PG - peptidoglükaan (Irazoki *et al.*, 2019, kohandatud).

1.3 Statsionaarne faas ja selle erinevad vormid

Bakterid võivad pika aja vältel eksisteerida metaboolselt inaktiivsetes seisundites ja selline olek võimaldab neil ellu jääda kasvuks ebasoodsates tingimustes. Nende tingimuste hulka kuuluvad toitainete puudus, äärmuslikud temperatuurid ja kuivus või antimikroobsete ainete, näiteks lüsoosüümi, esinemine keskkonnas. Inaktiivses seisundis võivad eksisteerida mitmed inimese patogeenid ja paljud nakkuslikud osakesed esinevadki selliste soikeseisundis (inglise keeles *dormancy*) olevate rakkudena (Dworkin ja Shah, 2010). Laborikatsetes jäljendab sellist olukorda statsionaarne faas (Bohannon *et al.*, 1991). Keskkonnatingimuste paranedes, kui toitained muutuvad jälle kättesaadavaks, on võimalik bakteritel kasvu jätkata (Bacun-Družina *et al.*, 2011).

Bakteriliigid reageerivad ebasoodsatele tingimustele mitmel viisil, millest mõned hõlmavad selget morfoloogilist diferentseerumist (näiteks spooride moodustumine) ja teised pole morfoloogiliselt nii selgelt eristatavad. Kõikide nende keskkonnatingimustele reageerimiste puhul on tulemuseks metaboolse aktiivsuse märkimisväärne vähenemine, mõnel juhul ka täieliku soikeseisundini (Dworkin ja Shah, 2010). Üheks viisiks ebasoodsate tingimuste üleelamiseks on sporulatsioon, mille käigus pakitakse bakteri genoom spoori, kuni keskkonnatingimused paranevad. Sporulatsioon on lihtne näide ühest diferentseerumise viisist. Sporulatsioon saab alguse asümmeetrilise jagunemisega, mille tulemusena moodustub sporulatsiooniseptum ja see jagab raku kaheks eraldi piirkonnaks - spoori alge ja emarakk. Eelspoorile moodustub peale korteks ja paks spoorikest, toimub küpsemine endospooriks. Spoor vabaneb emaraku lüües (McKenney *et al.*, 2013; Errington, 2003). Spoorid võimaldavad bakteritel olla vastupanuvõimelised UV-kiirguse, toksiliste kemikaalide, liigse kuivuse ning kõrge temperatuuri suhtes. Bakterid, kes toitainepuudusele sporulatsiooniga vastavad, on näiteks *Bacillus spp.* ja *Clostridium spp.* (Dworkin ja Shah, 2010).

Mittesporuleerivatel bakteritel ei pruugi soikeseisundi puhul visuaalseid erinevusi tekkida ja neil on ebasoodsate keskkonnatingimuste üleelamiseks teised mehhanismid (Dworkin ja Shah, 2010). Gram-negatiivsete bakterite soikeseisundisse sisenemisel toimuvad suured muutused nende geeniekspressiooni mustris, mida reguleerib suures osas alarmoon (p)ppGpp ja mis muudab paljude geenide transkriptsiooni. (p)ppGpp indutseerib alternatiivse sigma (σ) faktori RpoS-sõltuva geeniekspressiooni. RpoS märklaudgeenide ekspressioonimustri muutused tagavad vastupidavama seisundi omandamise. See on kompleksne regulatoorne kaskaad, mille

käigus mitmesugused keskkonnast tulenevad signaalid mõjutavad vajaminevate geenide transkriptsiooni regulaatoreid ja sigma faktoreid. Need omakorda mõjutavad RNA polümeraasi aktiivsust, mille tagajärjeks on soikeseisundile iseloomulik spetsiifiline geeniekspressioon, kus vähendatud on kasvule orienteeritud geeniekspressioon ja soodustatakse ellujäämiseks vajalike geenide ekspressioon. Nende muutuste tõttu satuvad rakud n-ö uinuvasse olekusse, mille jooksul suudetakse ilma toitaineteta pikka aega vastu pidada (Nyström, 2004; Navarro Llorens *et al.*, 2010).

Mittesporuleerivatel bakteritel, nt *E. coli*'l, on lisaks täheldatud ka persistereid ja VBNC (*viable but non-culturable*) seisundit, mis võimaldavad rakkudel ellu jääda ebasoodsates keskkondades. Persisterid on väike osa bakteripopulatsioonist ning nad on tolerantsed antibiootikumide suhtes. Tolerantsus on tingitud asjaolust, et need persisteriteks kujunevad bakterid ei kasva ega jagune ning neil on peatunud rakuseina süntees ja translatsioon, mis on paljude antibiootikumide märklauaks (Dworkin ja Shah, 2010). Täpset mehhanismi persisterite moodustumisest veel ei teata, kuid on täheldatud, et bakteris *E. coli* fosforüleerib kinaas HipA (*high persistence A*) translatsiooni elongatsioonifaktorit EF-Tu ja *hipA* mutantidel seas on persisterite moodustumise tase suurenenud (Schumacher *et al.*, 2009). Veel üheks mehhanismiks, mis on persisterite moodustumise kohta välja pakutud, on suurenenud toksiin-antitoksiinide valkude ekspressioon, millest mõned võivad translatsiooni pärssida (Dworkin ja Shah, 2010). Persisterite nähtus on fenotüübiline, mitte geneetiline, mis tähendab seda, et tolerantsus antibiootikumide vastu on mittepärilik ja pöördeline (Jayaraman, 2008). Persisterid võivad hakata uuesti kasvama ja panna aluse uuele populatsioonile siis, kui toitaineid on piisavalt ja keskkonnatingimused on paranenud. Sellisel juhul on nad taas antibiootikumide suhtes tundlikud (Kussell *et al.*, 2005).

VBNC seisund on mittesporuleerivate bakterite selline ellujäämisstrateegia, kus ebasoodsates keskkonnatingimustes jäädakse küll füsioloogiliselt ja metaboolselt aktiivseks ning säilitakse virulentsena, kuid tavalisel agari-söötmel ei suuda bakter kasvada. Kui VBNC seisundis rakkudele tagada sobivad keskkonnatingimused, on sellest olekust võimalik ka väljuda (Fakruddin *et al.*, 2013). Nad on võimelised kasvama siis, kui neile tagatakse sellised soodsad tingimused nagu rikas sööde või kasvavate rakkude filtraat (Dworkin ja Shah, 2010). Samas võivad taastunud rakud olla endiselt patogeensed, seega kaasneb seoses VBNC seisundiga ka risk inimese tervisele. Soikeseisundis olevad patogeensed bakterid on võimelised säilima infektsioonivõimelisena ja olla samal ajal metaboolselt madala aktiivsusega. Samuti ei ole neid

võimalik kultiveeritavaid proove kasutades detekteerida (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Seni on vaieldav, kas VBNC seisund on tõeline füsioloogiline seisund või kajastab selline liigitus piiratud mõistmist bakterite toitainete vajadustest, mis on nende kasvamiseks vajalik (Dworkin ja Shah, 2010).

1.4 Muropeptiid kui signaal bakterite vahel

1.4.1 Soikeseisundist väljumine

Üks peamisi signaale, mis stimuleerib soikeseisundist väljumist, on toitainete olemasolu keskkonnas. Lisaks võivad bakterirakud soikeseisundist väljuda vastusena teiste bakterite vabastatud signaalidele. Väljumine soikeseisundist võib olla stohhastiline sündmus, mida ei mõjuta mingid välised stiimulid. Ehkki toitainete olemasolu keskkonnas on kooskõlas kasvu toetavate tingimustega, kajastab see ainult ühte kasvu jaoks vajalikku omadust. Näiteks võib peremeesorganismis lisaks piisavale toitainete ressursile olla ka antimikroobsete ainete, näiteks lüsoosüümi, kõrge kontsentratsioon. See mõjutab kasvuks vajalikke protsesse ja muudab keskkonna soikeseisundis mitteolevate (aktiivsete) rakkude jaoks elamiskõlbmatuks. Soikeseisundis olevad rakud peavad seetõttu tuvastama kasvu soodustavad tingimused ja üheks selliseks signaaliks on rakuseinast eralduvate muropeptiidide vabastamine teiste kasvavate bakterite poolt (Dworkin ja Shah, 2010).

Seoses soikeseisundist väljumisega on kirjeldatud skaudi-teooriat, mis pakub välja hüpoteesi, et osa ühest populatsioonist pärinevaid bakterirakke, kes on soikeseisundis, muutuvad aktiivseteks nn skautideks juhuslikult ja keskkonnatingimustest sõltumatult. Skaudi seisundi moodustumine on sarnane epigeneetilisele, mürapõhisele ja stohhastilisele ebastabiilsusele. Skaut on rakk, mis väljub soikeseisundist madalal sagedusel toimuvate juhuslike sündmuste tagajärjel, milleks võib olla näiteks põhiregulaatori geeni ekspressiooni või repressiooni stohhastilised muutused. Skavidid ei erine geneetiliselt samast populatsioonist olevatest rakkudest ega ole ka spetsialiseerunud rakud ning võivad olla identsed aktiivselt kasvava populatsiooni rakkudega. Skautide esinemine jagab populatsiooni kaheks fenotüübiks, uinuvaks ja aktiivseks, ja see kumb nendest fenotüüpidest domineerib, sõltub keskkonnatingimustest (Epstein, 2009; Buerger *et al.*, 2012). Mõiste skaut pärineb eeldatavast funktsioonist - skaut on stohhastiliselt aktiivseks muutunud rakk, mis testib toitainete ja teiste kasvuks vajalike ressursside olemasolu keskkonnas. Ebasoodsate tingimuste püsimisel sureb skaut pärast seda, kui ta on oma sisemised ressursid ära kasutanud. Seejärel moodustuvad samast populatsioonist uued skavidid, kes jällegi soodsate keskkonnatingimuste olemasolu testivad. Kui skaut tekib kasvu soosivates tingimustes, saab ta aluse panna uuele populatsioonile. Juhul kui keskkonnatingimused muutuvad taas ebasoodsateks, jääb äsjatekinud populatsioon taas soikeseisundisse ning kogu tsükkel algab otsast pihta. Seega

pakub skaudi-teooria välja, et bakteripopulatsioon kindlustab ellujäämise ebasoodsates tingimustes selliselt, kui pidevalt liigutakse soikeseisundi ja aktiivse oleku vahel (Buerger *et al.*, 2012). Mõnede liikide puhul on täheldatud, et aktiivseks muutunud rakud on signaalmolekulide abil suutelised signaliseerima teisi populatsioonis olevaid baktereid keskkonna muutustest ning seeläbi indutseerida nende soikeseisundist väljumist (Epstein, 2009).

1.4.2 Väliskeskkonnast pärit signaalide vastuvõtmine

Bakteritevahelise signalisatsiooniga seostatakse hulgatunnetust (inglise keeles *quorum sensing*). Hulgatunnetus on geeniekspressiooni reguleerimine vastusena rakkude populatsiooni tiheduse kõikumistele. Hulgatunnetust kogeivad bakterid toodavad ja vabastavad keemilisi signaalmolekule, mida nimetatakse autoinduktoriteks ja mille kontsentratsioon suureneb kooskõlas raku tihedusega. ning seeläbi reguleeritakse mitmesuguseid füsioloogilisi seisundeid. Need seisundid hõlmavad näiteks sümbioosi, virulentsust, konjugatsiooni, antibiootikumide tootmist, motiilsust, sporulatsiooni ja biofilmi moodustumist. Üldiselt kasutavad gram-negatiivsed bakterid autoinduktoritena homoseriinlaktoone ja gram-positiivsed bakterid oligopeptiide (Miller ja Bassler, 2001).

Bakterid on välja töötanud keerukad signalisatsioonisüsteemid mitmesuguste keskkonnatingimustega kohanemiseks. Kahekomponendiline signalisatsioonisüsteem on bakterite üks põhilisi stiimulit ja vastust ühendav mehhanism, mis võimaldab tajuda muutusi erinevates keskkonnatingimustes ja nendele ka vastavalt reageerida (Stock *et al.*, 2000). Tüüpiline kahekomponendiline süsteem koosneb sensorikinaasist ja vastuseregulaatorist. Sensorikinaasid jälgivad mõnda keskkonnaparametrit ja moduleerivad vastavalt vastuseregulaatorite aktiivsust. Vastuseregulaatorid reguleerivad geeniekspressiooni muutusi või rakkude käitumist vastusena keskkonnamõjudele. Sensorite ja nendele vastavate regulaatorite vaheline molekulaarne kommunikatsioon hõlmab fosforülekande reaktsioone (fosforüülimine ja defosforüülimine) (Mizuno *et al.*, 1996). Väliskeskkonnast tulenevat signaali tajub sensorikinaasi sisenddoomeen, mis läbib autofosforüülimise. Seejärel viiakse fosforüülrühm vastuseregulaatorile, mis reguleerib vastust signaalile, muutes sihtgeenide ekspressiooni (Oshima *et al.*, 2002).

Gram-negatiivsetel bakteritel on kompleksne rakuümbris, mis koosneb välismembraanist, sisemembraanist ja nende vahelisest periplasmaatilise ruumist. Välismembraan moodustab füüsilise barjääri, mis kaitseb karmide keskkonnatingimuste ja toksiliste molekulide, näiteks antibiootikumide, proteaaside ja raskemetallide, eest. Välismembraan sisaldab ka valke, mis vahendavad kasvu ja raku funktsioneerimiseks vajaminevate väikeste molekulide passiivset või aktiivset transporti raku. Enamik neist valkudest moodustab hüdrofiilsed poorid, mis võimaldavad väikestel toitainetel ja signaalmolekulidel siseneda raku ning neid nimetatakse seetõttu poriinideks. Poriinid koosnevad 8–24 β -ahelast, mis moodustavad β -tünn struktuurid, ning neid klassifitseeritakse vastavalt nende struktuurile ja spetsiifilisusele või lihtsalt üldisteks poriinideks, mis vahendavad kuni 600 Da suuruste molekulide mittespetsiifilist difusiooni (Kefala *et al.*, 2010; Vergalli *et al.*, 2020).

Substraatide transporti vahendavad ka ABC-transporterid (*ATP-binding cassette transporters*). Need on membraanivalgud, mis transpordivad läbi rakumembraanide mitmesuguseid substraate, saades energiat ATP hüdrolüüsist. Bakterites katalüüsivad ABC-transporterid oluliste toitainete omastamist või toksiliste ainete väljutamist. ABC-transporterid jagunevad kahte alatüüpi olenevalt transporti reaktsiooni suunast. Ainult prokarüootides esinevad importijad vajavad substraati siduvat valku, mis toimetab seondunud substraadi transporteri välispinnale. Eksportijad seevastu seovad substraate otse tsütoplasmast või lipiidse kaksikkihi tsütoplasmapoolsest osast (Hollenstein *et al.*, 2007). Oligopeptiidi transpordisüsteem (Opp) on viiekomponendiline ABC-transporter, mis koosneb membraaniga seotud substraati siduvast valgust OppA, kahest transmembraansest valgust OppB ja OppC ning kahest nukleotiidi siduvast domeenist, OppD ja OppF. OppA seob peptiidi ja toimetab selle translokaatori kompleksi, kus ATP hüdrolüüsi tagajärjel transporditakse peptiid raku (Doeven *et al.*, 2004). OppA koos selle spetsiifilise seondumisvalgu MppA-ga vastutab ka mureiinist vabanevate tri- ja tetrapeptiidide transporti eest periplasmast tsütoplasmasse (Irazoki *et al.*, 2019).

1.4.3 Soikeseisundist väljumine vastusena muropeptiididele

1.4.3.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis'e spoorid on võimelised idanema nii toitainete juuresolekul kui ka aktiivselt kasvavate rakkude poolt vabastatud muropeptiidide (m-DAP-i sisaldavate) madala kontsentratsiooni korral (Shah *et al.*, 2008; Dworkin ja Shah, 2010). Gram-positiivsetel

bakteritel ei ole sellist muropeptiidide taaskasutussüsteemi nagu gram-negatiivsetel ja seega vabanevad muropeptiidid ekstratsellulaarsesse ruumi (Reith ja Mayer, 2011; Doyle *et al.*, 1988). Muropeptiidide toimel soikeseisundist väljumiseks on vajalik membraanseoselise PrkC kinaasi olemasolu. See on seriini/treoniini kinaasi perekonna liige, millel on rakusisene kinaasidomeen ja rakuväline peptidoglükaani sidumisdomeen, kus on mitu PASTA (*penicillin and Ser/Thr kinase associated*) kordust. Need kordused on vajalikud muropeptiidide äratundmiseks ja sidumiseks väliskeskkonnast (Irazoki *et al.*, 2019). PASTA domeen on globulaarne struktuur, mis koosneb kolmest β -lehest ja ühest α -heeliksist. Esimese ja teise β -lehe vahel on silmus, mis on sõltuvalt liigist erineva pikkusega (Yeats *et al.*, 2002). Kui muropeptiidid seonduvad PrkC-ga, siis fosforüleerib viimane EF-G (elongatsiooni faktor G), mis osaleb mRNA ja tRNA translokatsioonis valgusünteesi käigus. Selle tagajärjel indutseeritakse translatsioon, mis võib olla üheks esmaseks biosünteesiliseks protsessiks spoori idanemisel. Siiski peetakse ebatõenäoliseks, et translatsiooni käivitamine EF-G fosforüleerimise kaudu on olulisim mehhanism soikeseisundist väljumisel (Shah *et al.*, 2008; Dworkin ja Shah, 2010).

On leitud veel üks mehhanism, kuidas PrkC reguleerib soikeseisundist väljumist vastusena muropeptiididele. PrkC reguleerib WalRK kahekomponendilist süsteemi, mis on gram-positiivsetes bakterites konserveerunud. WalRK signaalsüsteem koosneb sensorkinaasist WalK ja sellele vastavast vastuse regulaatorist WalR. WalK autofosforüleerub ja annab fosfaatrühma edasi regulaatorvalgule WalR, mis seejärel reguleerib mitmete geenide ekspressiooni, kas siis neid aktiveerides või inhibeerides. Need geenid, mille ekspressiooni WalRK signaalsüsteem reguleerib, mängivad olulist rolli peptidoglükaani metabolismis ja WalRK regulonis olevate geenide hulgas on mitmed peptidoglükaani hüdrolaase kodeerivad geenid. *B. subtilis*'e puhul näidati, et vastusena muropeptiididele võib WalR-i fosforüleerida ka PrkC. Kõige suuremat mõju avaldab PrkC WalR reguloni ekspressioonile statsionaarses faasis, kuna siis langeb sensorkinaasi WalK aktiivsus (Libby *et al.*, 2015).

Tänaseks on PrkC homolooge nii rakusisese kinaasi kui ka rakuvälise peptidoglükaani siduva domeeni puhul leitud enamikus, kui mitte kõigis gram-positiivsetes liikides, sealhulgas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ja *Mycobacterium tuberculosis*. Nendes bakteriliikides osaleb PrkC rakuseina metabolismis ja sellel on oluline, kuid seni veel ebamääraselt kirjeldatud, roll bakteriaalses patogeneesis. *B. subtilis*'e PrkC asendamine *S. aureus*'e homologiga võimaldab samuti *B. subtilis*'e spooridel vastusena peptidoglükaani

fragmentidele idaneda, mis viitab sellele, et see kinaas tuvastab samuti muropeptiide ja osaleb EF-G fosforüleerimises. Huvitav on see, et *S. aureus*'e homoloogi ekspresseerivad spoorid reageerivad nii m-DAP-i kui ka L-Lys-i sisaldavatele muropeptiididele, viidates sellele, et seda kinaasi ekspresseerivad bakterid on võimelised vastama signaalidele, mis pärinevad mitmetelt erinevalt liikidelt (Dworkin ja Shah, 2010).

1.4.3.2 *Micrococcus luteus*

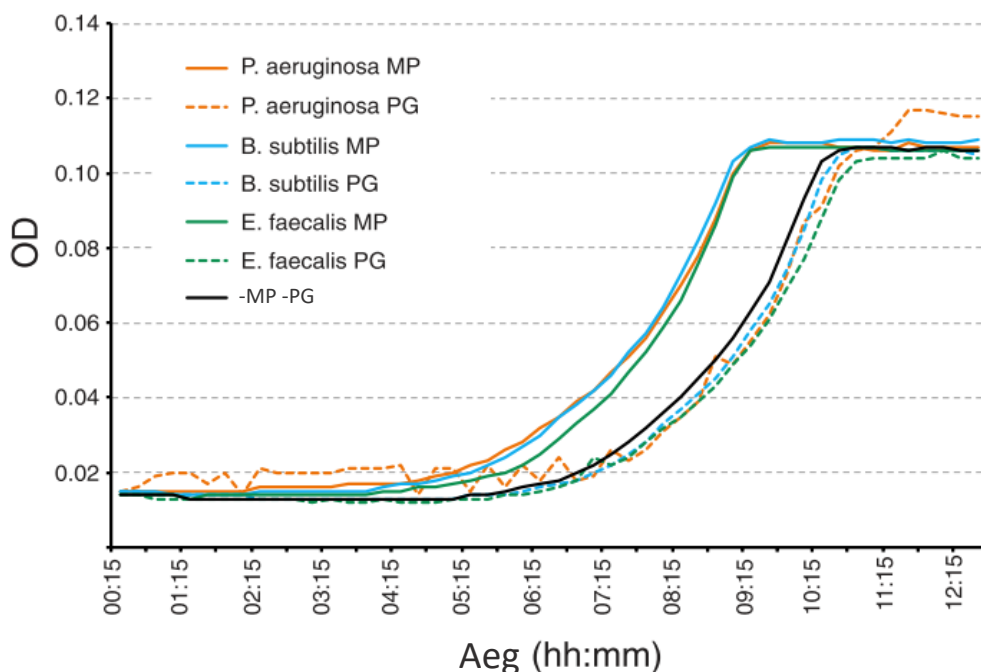
Mittesporuleeriva bakteri *Micrococcus luteus* puhul on muropeptiidide kaudu soikeseisundist väljumisega seotud valk Rpf (*resuscitation-promoting factor*), mida sekreteerivad keskkonda kasvavad ja jagunevad rakud (Telkov *et al.*, 2006). Rpf molekul on avastatud ka teistest grampositiivsetest bakteritest, kelle DNA on kõrge G+C sisaldusega (Mukamolova *et al.*, 1998). See on muralüütiline ensüüm, mis hüdrolüüsib $\beta(1\rightarrow4)$ glükosiidsidet peptidoglükaani glükaanahelas ja selle tagajärjel satuvad muropeptiidid ekstratsellulaarsesse ruumi (Mukamolova *et al.*, 2006). Mehhanism, kuidas Rpf indutseerib soikeseisundist väljumist, ei ole teada, kuid välja on pakutud kolm hüpoteesi. Esiteks, Rpf-ile iseloomulik peptidoglükaani hüdrolüüsiv toime võib soikeseisundis olevas bakteris indutseerida rakuseina biosünteesi ja rakujagunemise protsessi ning seeläbi on soodustatud ka rakkude kasv (Nikitushkin *et al.*, 2016). Vaatamata asjaolule, et soikeseisundis olevate rakkude kasvu jätkamise mehhanism Rpf poolt on endiselt teadmata, võib selle valgu teadaolevate ensümaatiliste omaduste alusel seda hüpoteesi püstitada. On teada, et spooride idanemise ajal on esimestena tuvastatud aktiivsused nn lüütilised aktiivsused, mis on vajalikud kasvu taastamiseks. Samuti osalevad idanemisel spetsiifilised lüütilised ensüümid, milleks on N-atsetüül-glükoosaminidaas, lüütiline transglükosülaas ja amidaas. Nende ensüümide koostoimimine põhjustab spoori korteksi, mis on bakterite spoorides esinev paksenenud rakusein, decondenseerumist. Selle protsessi tagajärjel muutuvad spoorid tundlikumaks väliste stiimulite (aminohapped, ioonid, aktiivsed hapnikuvormid jne) suhtes, mis omakorda võib esile kutsuda nende ülemineku aktiivseks eluvormiks. Ebaharilikult paksenenud rakuseina esinemine VBNC seisundis olevates *M. luteus*'e rakkudes meenutab spoori korteksit ja selle modifitseerimine soikeseisundist väljumisel vihjab Rpf valkude arvatavale rollile selles protsessis (Telkov *et al.*, 2006).

Teine hüpotees Rpf toimemehhanismi kohta põhineb Rpf võimel lahutada bakterite agregate, mis näib olevat tingitud selle hüdrolüütilisest aktiivsusest. *M. luteus* rakkude agregatsioon on oluline kasvu initsieerimiseks kultuuri lag-faasis ja ka *M. tuberculosis*'e reaktiveerimise

esimestel etappidel. Näib, et Rpf valgud võivad osaleda nende agregaatide lahutamises enne rakkude jagunemise algust. Kolmas on nn signaliseerimise hüpotees, mille järgi vabastab Rpf peptidoglükaani hüdrolyüsi käigus muropeptide, mis on signaaliks soikeseisundist väljumisel. Seda hüpoteesi toetab asjaolu, et bakteril *M. tuberculosis*, kes samuti sekreteerib Rpf-i, on olemas membraanseoseline Ser/Thr kinaas (PknB), mis on *B. subtilis*'el esineva PrkC homoloog. PknB kinaasil on olemas PASTA domeenid, mis teadupärast tunnevad ära muropeptide. PknB PASTA domeen tunneb ära kasvavad peptidoglükaani ahelad ja reguleerib vaheseina eraldumise ja moodustumisega seotud valkude jaotumist. PASTA domeeni interaktsioon rakuseinaga on oluline mehhanism, mis mängib rolli rakuseina terviklikkuse ja bakterite kasvu kontrollimises. Kuigi see hüpotees pole veel kinnitatud, on võimalik, et proteiinkinaas PknB reageerib muropeptiididele, mida vabastatakse Rpf-i poolt, ja käivitab seejärel soikeseisundist väljumiseks vajalikud protsessid (Nikitushkin *et al.*, 2016).

1.4.3.3 *Escherichia coli*

Meie laboris on hiljuti avastatud, et muropeptiidid indutseerivad soikeseisundist väljumist ka mittesporuleerivas bakteris *Escherichia coli* (Jöers *et al.*, 2019). Statsionaarsesse faasis olles ja toitainete ammendumises väheneb oluliselt bakterite metaboolne aktiivsus, nende kasv peatub ning nad jäävad soikeseisundisse. Nad on võimelised kasvu jätkama, kui tagatakse soodsad tingimused, näiteks rikas sööde või kasvavate rakkude filtraat (Dworkin ja Shah, 2010). Kui statsionaarses faasis olevad *E. coli* bakterid viidi üle värskesse söötmesse ning neile lisati juurde muropeptide, täheldati, et soikeseisundist väljumine toimub muropeptiidide lisamisel kiiremini kui kontrollisöötmes, kuhu polnud muropeptide lisatud. Värskesse söötmesse lisades stimuleerivad muropeptiidid kasvu jätkamist, lagundamata peptidoglükaan aga mitte. Lisaks väljuvad *E. coli* rakud soikeseisundist vastusena teiste liikide muropeptiididele, näidates sellega nende rolli liikidevahelise signaalina (joonis 4) (Jöers *et al.*, 2019).



Joonis 4. Erinevatest liikidest pärinevad muropeptiidid stimuleerivad *E. coli* rakkude kasvu jätkamist soikeseisundist. PG - peptidoglükaan; MP - muropeptiid (Jöers *et al.*, 2019, kohandatud).

Kasvu jätkamise stimuleerimiseks on vajalik suhkru ja peptiidi vahelise sideme olemasolu muropeptiidides. Peptidoglükaani lõhustamisel mutanolüsiiniga tekivad muropeptiidid, mis varieeruvad peptiidi tüve pikkuse ja koostise poolest. Leiti, et 4, 3 või 2 aminohapet sisaldavate peptiididega disahhariidid on kõik võimelised stimuleerima kasvu jätkamist ja sama näidati ka tetrapeptiidiga seotud monosahhariid N-atsetüül-muraamhappe kohta. Seevastu N-atsetüül-muraamhappe ja tripeptiid eraldi molekulidena ei stimuleeri kiiremat soikeseisundist väljumist. See näitab, et suhkru ja peptiidi vaheline side on kasvu jätkamise stimuleerimiseks ülioluline ja rakud võivad reageerida mitmele muropeptiidi variandile (Jöers *et al.*, 2019).

E. coli peptidoglükaani taaskasutusraja süsteemi kuuluvad *ampG* (permeraas), *ampD* (amidaas) ja *nagZ* (N-atsetüülglükosaminidaas) ja nende geenide koosmõjul imporditakse, lagundatakse ja taaskasutatakse raku kasvu ajal vabanenud anhidromuropeptide. Eeldati, et see süsteem on seotud ka muropeptiidide poolt vahendatud soikeseisundist väljumisega. Kuid ühegi eelnimetatud geeni deleteerimine ei näidanud mingit fenotüüpi ja kõik *knock-out* tüved reageerisid muropeptiididele nagu metsiktüvi. See viitab sellele, et esmane muropeptiidi signaaliülekanne retseptor paikneb kas raku pinnal või periplasmas. *Bacillus* spooride korral

tuvastatakse muropeptiide membraanseoselise proteiinkinaasi PrkC kaudu. See geeniperekond on aga ainult gram-positiivsetes bakterites ja puudub *E. coli*'s. Seega on selge, et gram-negatiivsete liikide puhul peab muropeptiidide tuvastamiseks olema mõni muu viis ning see mehhanism soikeseisundist väljumiseks on *E. coli*'s veel teadmata (Jõers *et al.*, 2019).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Varasemalt on leitud, et muropeptiidid indutseerivad kiiremat soikeseisundist väljumist bakteris *Escherichia coli* (Jöers *et al.*, 2019). See viis, kuidas *E. coli* on võimeline ümbritsevast keskkonnast muropeptiide tuvastama ja millised geenid on seotud muropeptiidide poolt indutseeritud kiirema väljumisega statsionaarsest faasist, ei ole veel teada.

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- testida Keio kolleksioonist pärit erinevate mutantide ärkamiskineetikat muropeptiidide juuresolekul ja seeläbi identifitseerida geenid, mis on seotud muropeptiididest sõltuva statsionaarsest faasist väljumisega;
- välja töötada selline katsesüsteem, mis võimaldaks eelnimetatud eesmärgi jaoks läbi viia kogu Keio kolleksiooni skriinimise.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed

Kõikide katsete läbiviimiseks kasutati kas wt *E. coli* tüve BW25113 või selle derivaate. Kõik kasutatud bakteritüved on välja toodud lisas 1 ning kõik kasutatud mutandid on pärit Keio kollektsioonist (Baba *et al.*, 2016). Katsetes, kus mõõdeti bakterikultuuri optilist tihedust, kasutati *E. coli* tüve BW25113, mis sisaldas plasmidi pET-gfpAGGAGG(3) (edaspidi lühidalt pET-gfp). Plasmid sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeni. Baktereid kasvatati MOPS minimaalsöötmetes (Neidhardt *et al.*, 1974), mis sisaldas süsinikuallikana 0,1% glütserooli (Gly), 0,1% glükonaati (Glt), 0,1% atsetaati (Ac) või oli ilma süsinikuallikata. Glütserooli säilituskultuuride jaoks kasvatati baktereid LB vedelsöötmes. Selekteerimiseks lisati söötmetesse kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 25 µl/ml. Kasvukeskkonna pH muutmiseks kasutati tsitraadi ning TRIS puhvreid (tabel 1).

Tabel 1. Eksperimentides kasutatud puhvrid

Puhver	Koostis
1,5 M Tris puhver	1,5 M C ₄ H ₁₁ NO ₃ ; 0,1 M HCl; pH 7,2/9
0,1 M Tsitraatpuhver	0,04 M C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ *2H ₂ O; 0,06 M C ₆ H ₈ O ₇ ; 0,1 M HCl; pH 5

Baktereid kasvatati alati 37 °C juures kas inkubatsioonikapis, Sanyo loksutil kiiruse 220 rpm juures või Stuart SI505 mikrotiiterplaadi loksutil 750 rpm juures. Tsentrifugimine viidi alati läbi tsentrifuugis Sigma 4K15C rootoriga 13350/11150 1 minut 13 200 rcf juures. Bakterikultuuri optilise tiheduse (OD) mõõtmiseks lainepikkusel 600 nm ning fluorestsentsi mõõtmiseks ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm kasvatati baktereid samuti 37 °C juures ning kasvu jälgiti 96-kannuga mikrotiiterplaatidel BioTek Synergy™ Mx mikrotiiterplaadilugejas.

2.2.2 Statsionaarsest faasist väljumisel muropeptiididele mittereageerivate bakterite testimine

Keio kollektsioonist pärit mutantide testimiseks tehti esmalt kõikidest tüvedest glütserooli säilituskultuurid. Selleks külvati bakterid LB tardsöötmele ning kasvatati üleöö 37 °C juures inkubatsioonikapis. Järgmisel päeval pandi 1 koloonia tassilt paariks tunniks kasvama 3 ml LB

vedelsöötmesse, kuni kultuuri optiline tihedus oli vahemikus 0,5-1. Seejärel lisati 750 µl kultuurile krüotubis 250 µl 60% glütserooli ning säilitati edaspidi temperatuuril -80 °C.

Ärkamiskatse läbiviimiseks kasvatati glütserooli säilituskultuurist võetud bakterid esmalt LB tardsöötmele, enne kui nad külvati edasi 2 ml MOPS Gly 0,1% söötmesse. 4 päeva pärast inkubatsiooni tsentrifugiti baktereid, supernatant eemaldati ning bakterid suspendeeriti samas ruumalas steriilses vees. Rakud tsentrifugiti veelkord ning suspendeeriti samas ruumalas steriilses vees. Rakususpensioonist tehti 1:20 lahjendus MOPS Glt 0,1% söötmesse. Seejärel lisati statsionaarse faasi kultuur 100 µl kaupa 96-kannuga mikrotiiterplaadile, mille äärtes olevatesse kannudesse lisati 200 µl vett. Igasse kannu lisati erinevates kontsentratsioonides *Bacillus subtilis*'est pärit muropeptiidi preparaati. Negatiivse kontrollina ei lisatud söötmesse midagi. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti kultuuri OD muutuse järgi ajas lainepikkusel 600 nm BioTek Synergy™ Mx mikrotiiterplaadilugejas. OD-d mõõdeti iga 15 minuti järel.

2.2.3 Stressitingimuste rakendamine statsionaarse faasi kultuurile

Tekitamaks statsionaarses faasis olevatele bakteritele võimalikult suurt stressi, et nad ei alustaks koheselt pärast värskesse söötmesse üleviimist uuesti kasvamist ja jagunemist, muudeti ärkamiskatse ülesehitust järgmiselt. Üleöö *E. coli* BW25113 + pET-gfp kultuurile, mis oli kasvatatud 2 ml MOPS Glt 0,1% söötmes, lisati pärast tsentrifugimist 200 mM, 400 mM, 600 mM ja 1 M NaCl lahus. 4 päeva hiljem tsentrifugiti baktereid, supernatant eemaldati ning bakterid suspendeeriti samas ruumalas steriilses vees. Rakud tsentrifugiti veelkord ning suspendeeriti samas ruumalas steriilses vees. Rakususpensioonist tehti 1:20 lahjendus MOPS Ac 0,1% söötmesse. Seejärel lisati statsionaarse faasi kultuur 100 µl kaupa 96-kannuga mikrotiiterplaadile, mille äärtes olevatesse kannudesse lisati 200 µl vett. Ühele kultuurile lisati 4 µl muropeptiidi ning teine oli negatiivne kontroll, kuhu ei lisatud söötmesse midagi. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti kultuuri OD muutuse järgi ajas lainepikkusel 600 nm mikrotiiterplaadilugejas. OD-d mõõdeti iga 15 minuti järel.

Kasvukeskonna pH muutmiseks kasutati eelnevalt kirjeldatud ärkamiskatse süsteemi, kuid üleöö *E. coli* BW25113 + pET-gfp kultuur, mis oli kasvatatud 2 ml MOPS Glt 0,1% söötmes, lisati pärast tsentrifugimist tsitraatpuhvrisse (pH 5) või TRIS puhvritesse (pH 7,2 ja 9). Kõikide puhvrite kontsentratsioon oli 100 mM. Lisaks pandi üleöö kultuur puhvris 4 °C juurde ja kasvatati 5 päeva. Ülejäänud osas jäi katse ülesehitus samaks.

Oksüdatiivse stressi tekitamiseks lisati üleöö *E. coli* BW25113 + pET-gfp kultuurile juurde 10 mM, 100 mM ja 200 mM vesinikperoksiidi lahust, mida kasvatati edasi 37 °C juures 5 päeva. Ülejäänud osas jäi katse ülesehitus samaks.

2.2.4 Ärkamiskatse kasutades alamarBlue® värvi

Ärkamiskatse läbiviimiseks kasvatati *E. coli* BW25113 tüve 2 ml MOPS Gly 0,1% söötmes. 4 päeva pärast inkubatsiooni tsentrifugiti baktereid, supernatant eemaldati ning bakterid suspendeeriti samas ruumalas steriilses vees. Rakud tsentrifugiti veelkord ning suspendeeriti samas ruumalas steriilses vees. Rakususpensioonist tehti 1:20 lahjendus ilma süsinikuallikata MOPS söötmesse, kuhu lisati juurde 10 µl alamarBlue® värvi 100 µl kultuuri kohta. Seejärel lisati statsionaarse faasi kultuur 100 µl kaupa 96-kannuga mikrotiiterplaadile, mille äärtes olevatesse kannudesse lisati 200 µl vett. Ühele kultuurile lisati 4 µl muropeptiidi ning teine oli negatiivne kontroll, kuhu ei lisatud söötmesse midagi. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti kultuuri fluorestsentsignaali muutuse järgi ajas ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm mikrotiiterplaadilugejas. Fluorestsentsignaali mõõdeti iga 15 minuti järel.

Võrdluseks tehti samalaadne ärkamiskatse, kuid alamarBlue® värvi lisamata. Sel juhul jälgiti statsionaarsest faasist väljumist kultuuri OD muutuse järgi ajas lainepikkusel 600 nm mikrotiiterplaadilugejas. OD-d mõõdeti iga 15 minuti järel.

2.2.5 Katsesüsteemi optimeerimine Keio kollektiooni skriinimiseks

Välja selgitamiseks, kas 96-kannuga mikrotiiterplaadil on võimalik kultuure kasvatada statsionaarsesse faasi 3-5 päeva jooksul nii, et olenemata asukohast plaadil kasvavad kultuurid ühtemoodi ja et aurustumine oleks võimalikult väike, tehti järgnev ärkamiskatse. *E. coli* BW25113 külvati MOPS Gly 0,1% söötmesse ja viidi üle veesärgiga 96-kannuga mikrotiiterplaadile kolmes erinevas algruumalas - 100, 150, 200 µl. Kõiki ruumalaid prooviti nii mikrotiiterplaadi keskmistes kui ka servas olevates kannudes kahes korduses. Kannude ümber ja äärtesse lisati 5 ml destilleeritud vett. Kultuure inkubeeriti mikrotiiterplaadi loksutil 37 °C ja 750 rpm juures. 3., 4. ja 5. päeval tõsteti replikaatoriga statsionaarse faasi kultuurid 1:20 lahjendusena MOPS Gly 0,1% söötmesse teisel 96-kannuga mikrotiiterplaadil. Seejärel lisati 10 µl alamarBlue® värvi 100 µl kultuuri kohta ning statsionaarsest faasist väljumist jälgiti

kultuuri fluorestsentsignaali muutuse järgi ajas ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm mikrotiiterplaadilugejas. Fluorestsentsignaali mõõdeti iga 15 minuti järel.

Keio kollektsiooni testplaadiks tehti *E. coli* BW25113 tüve glütserooli säilituskultuur. Selleks külvati bakterid LB tardsöötmele ning kasvatati üleöö 37 °C juures inkubatsioonikapis. Järgmisel päeval pandi 1 koloonia tassilt mõneks tunniks kasvama 3 ml LB vedelsöötmesse, kuni kultuuri optiline tihedus oli vahemikus 0,5-1. Seejärel lisati 3 ml kultuuri kohta 1 ml 60% glütserooli, jagati 100 µl kaupa 96-kannuga mikrotiiterplaadile igasse kannu ning säilitati edaspidi temperatuuril -80 °C. Ärkamiskatse läbiviimiseks tehti säilituslahustest tempelkülvi 150 µl MOPS Gly 0,1% söötmesse veesärgiga 96-kannuga mikrotiiterplaadile ja kasvatati mikrotiiterplaadi loksutil 4 päeva. Seejärel tõsteti replikaatoriga statsionaarse faasi kultuurid 1:20 lahjendusena ilma süsinikuallikata MOPS söötmesse, kuhu oli lisatud alamarBlue® värvi 10 µl 100 µl kohta. Samuti lisati kolme kannu 4 µl muropeptiidi, et selgitada välja, kas fluorestsentsignaali väärtuse järgi on võimalik muropeptiidi efekti statsionaarsest faasist väljumisel detekteerida. Mikrotiiterplaat pandi seejärel 37 °C inkubatsioonikappi ning 24 tundi hiljem mõõdeti mikrotiiterplaadilugejas fluorestsentsignaali ühe ajapunkti kohta ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm.

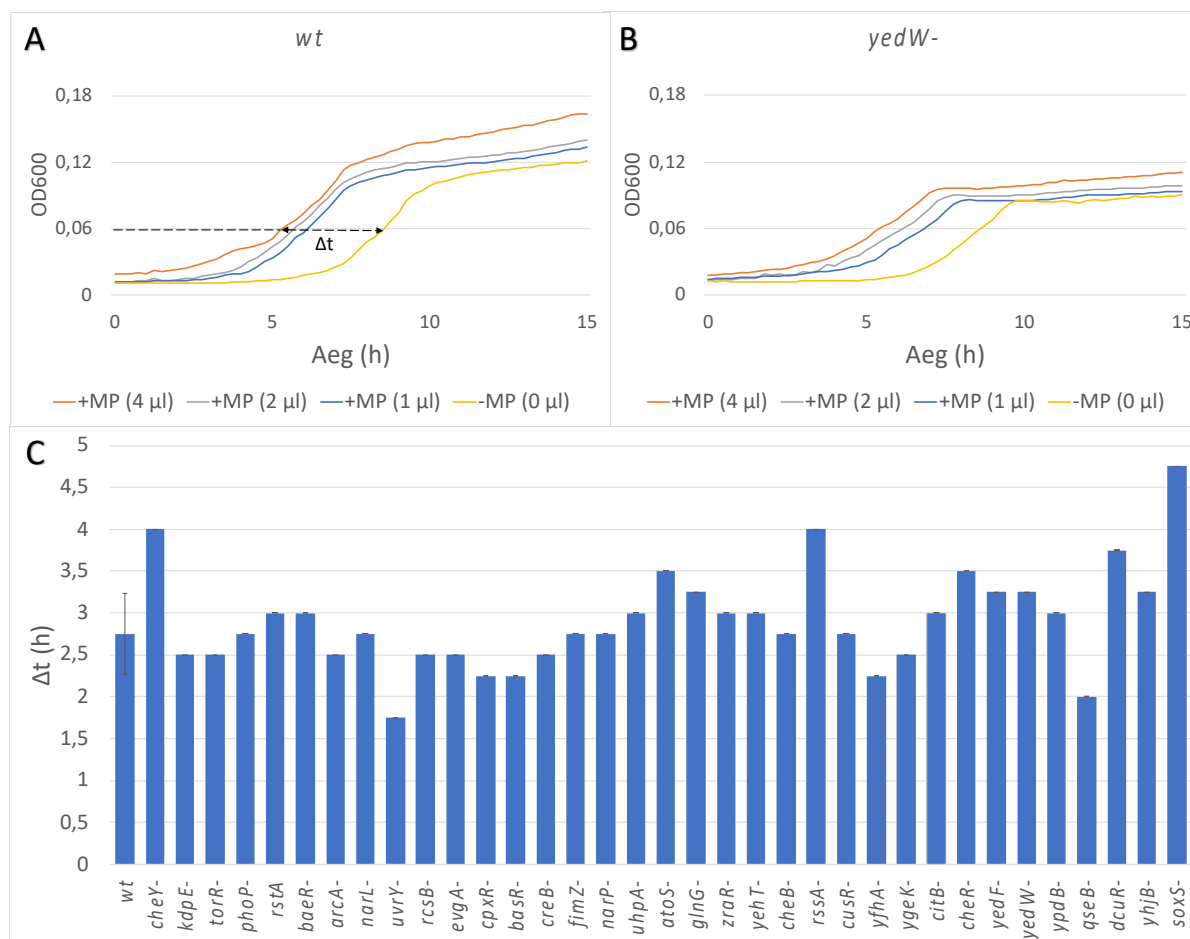
Muropeptiidi erinevate kontsentratsioonide testimiseks külvati *E. coli* BW25113 MOPS Gly 0,1% söötmesse ja viidi üle 150 µl kaupa veesärgiga 96-kannuga mikrotiiterplaadile ühte ritta. 4 päeva pärast inkubatsiooni mikrotiiterplaadi loksutil tõsteti statsionaarse faasi kultuurid replikaatoriga 1:20 lahjendusena ilma süsinikuallikata MOPS söötmesse nelja erinevasse ritta. Igasse ritta oli lisatud alamarBlue® värvi 10 µl 100 µl kohta. Iga rida esindas ühte muropeptiidi kontsentratsiooni - 1 µl, 2 µl ja 4 µl. Üks rida jäi negatiivseks kontrolliks ja sinna muropeptiide ei lisatud. Selliselt oli iga statsionaarse faasi kultuuri kohta olemas nelja erineva muropeptiidi kontsentratsiooniga kultuur. Mikrotiiterplaat pandi seejärel 37 °C inkubatsioonikappi ning 24 tundi hiljem mõõdeti mikrotiiterplaadilugejas fluorestsentsignaali ühe ajapunkti kohta ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm.

2.3 Tulemused

2.3.1 Keio kolleksioonist pärit mutantide ärkamiskineetika

Selleks, et leida signaalisüsteemi, mis on seotud muropeptiidide tuvastamisega keskkonnast, testiti erinevaid mutante Keio kolleksioonist. Keio kolleksioon on komplekt *E. coli* K-12 BW25113 tüve mutante, kus igas mutandis on üks mitteolulistest geenidest deleteeritud (Baba *et al.*, 2006). Testimiseks valiti Keio kolleksioonist välja mutandid, mille genoomist olid deleteeritud kahekomponendiliste süsteemide vastuseregulaatori geenid, poriinide geenid ja oligopeptiidi transporteri OppA ja selle seondumisvalgu MppA geen. Nendega viidi läbi ärkamiskatse, kus sai näha antud geenide deleteerimise mõju ärkamiskineetikale, kui lisati juurde erinevaid muropeptiidide kontsentratsioone. Värskesse söötmesse üleviimisel ja muropeptiidide lisamisel väljuvad osad bakterid statsionaarsest faasist kiiremini kui ülejäänud. Statsionaarse faasi kultuurist lahjenduse tegemine värskesse söötmesse ja värske söötme süsinikuallika vahetamine aeglustavad bakterite väljumist statsionaarsest faasist ja nii on muropeptiidide efekt ärkamisel paremini märgatav.

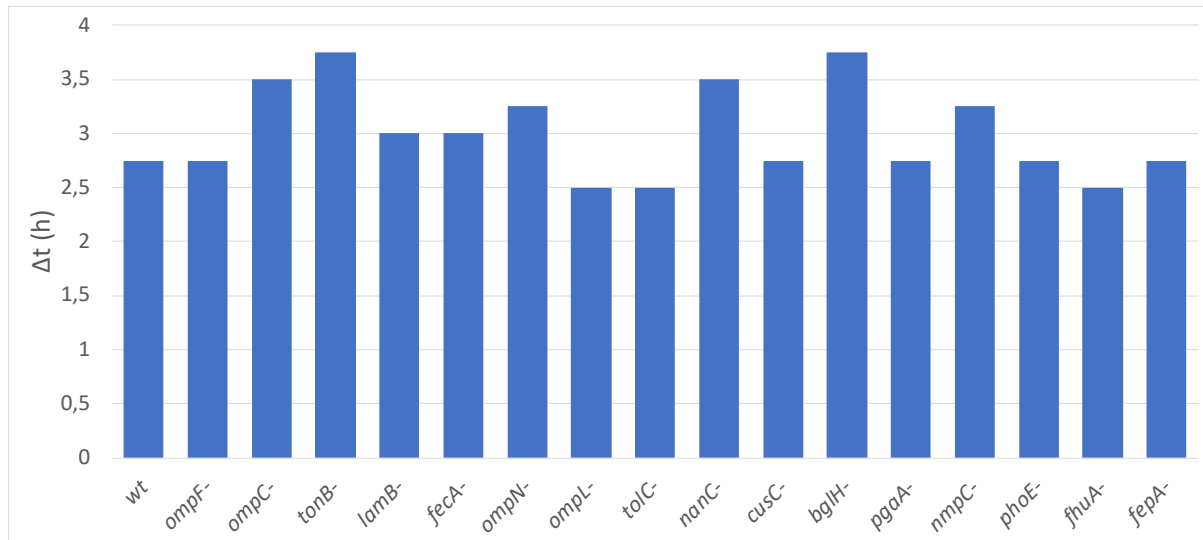
Esmalt üritati muropeptiididele mittereageerivaid mutante leida kahekomponendilise süsteemi mutantide hulgast. Tüüpiline kahekomponendiline süsteem koosneb sensorinaasist ja vastuseregulaatorist ning kuna vastuseregulaatorid on seotud geeniekspressiooni reguleerimisega, valiti testimiseks välja just selle komponendi mutandid. Nendega viidi läbi ärkamiskatse, et selgitada välja, kas statsionaarsest faasist väljumist vastusena muropeptiididele reguleerib mõni kahekomponendiline süsteem või mitte. Eesmärk oli leida selliseid mutante, mis muropeptiidide juuresolekul statsionaarsest faasist kiiremini ei välju. Kokku testiti 35 vastuseregulaatori geeni mutanti Keio kolleksioonist. Katsete tulemusena ei leitud ühtegi tüve, mille statsionaarsest faasist väljumise kiirust muropeptiidid ei mõjutanud. Kõikide mutantide ärkamiskineetika sarnases *wt* tüvega - mida kõrgem oli muropeptiidide kontsentratsioon söötmes, seda kiiremini väljusid bakterid statsionaarsest faasist (joonis 5).



Joonis 5. Kahekomponendiliste süsteemide vastuseregulaatori geenide mutantide ärkamiskineetika muropeptiidi juuresolekul. Lühend MP tähistab muropeptiide. Muropeptiidide hulgad on 100 μ l kultuuri kohta. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures. (A) *wt* tüve väljumine statsionaarsest faasist vastusena muropeptiidi erinevatele kontsentratsioonidele. (B) Näitena on välja toodud ühe mutandi ärkamiskineetika. Sarnane tulemus esines kõikidel testitud mutantidel. (C) Kõigi 35 testitud mutandi kvantitatiivsed tulemused võrrelduna *wt* tüvega. Δt on aegade vahe, mis kulub +MP (4 μ l) ja -MP (0 μ l) kultuuridel OD 0,06 jõudmiseks. OD on mõõdetud 100 μ l kultuuri kohta. *Wt* tüve puhul on välja toodud viie sõltumatu katse tulemuste standardhälve piirid. Mutantidega on tehtud üks katse.

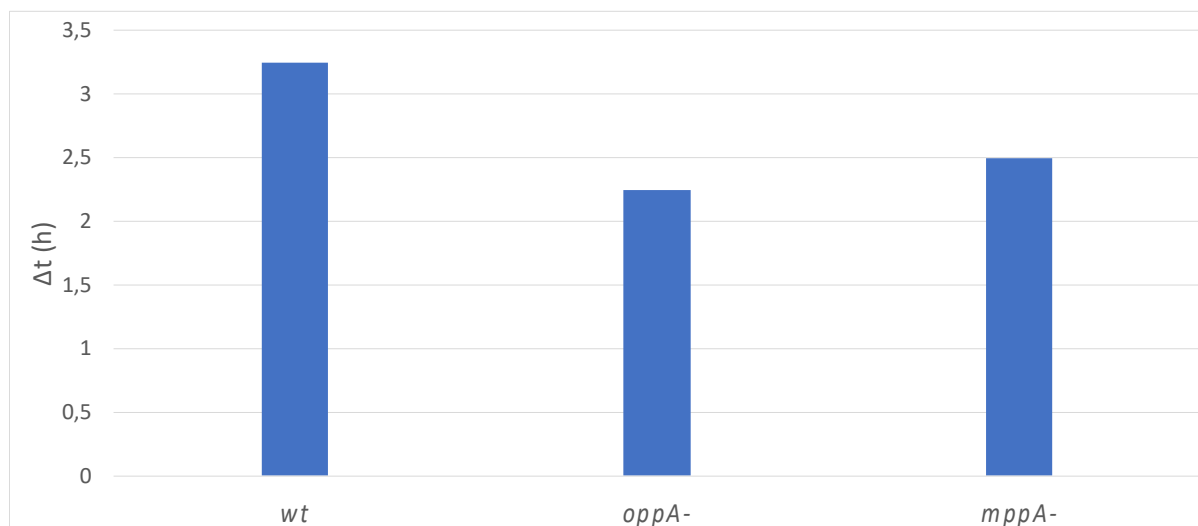
Järgnevalt testiti poriini geenide mutante ja tehti samalaadsed ärkamiskatsed, nagu eespool kirjeldatud. Poriinid moodustavad hüdrofiilseid poore, mis võimaldavad väikestel toitainetel ja signaalmolekulidel siseneda raku ja kuna muropeptiid on samuti väike hüdrofiilne molekul, annab see alust eeldada, et muropeptiide transporditakse raku poriinide kaudu. Kokku testiti 16 poriini geeni mutanti Keio kolleksioonist. Katsete tulemusena ei leitud ühtegi mutanti,

mille statsionaarsest faasist väljumise kiirust muropeptiidid ei mõjutanud. Kõikide mutantide ärkamiskineetika sarnases *wt* tüvega ja mida kõrgem oli muropeptiidide kontsentratsioon söötmes, seda kiiremini väljusid bakterid statsionaarsest faasist (joonis 6).



Joonis 6. Poriini geenide mutantide ärkamiskineetika muropeptiidi juuresolekul. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures. Esitatud on kõigi 16 testitud mutandi kvantitatiivsed tulemused võrrelduna *wt* tüvega. Δt on aegade vahe, mis kulub muropeptiidiga (4 μ l 100 μ l kultuuri kohta) ja muropeptiidita kultuuridel OD 0,06 jõudmiseks. OD on mõõdetud 100 μ l kultuuri kohta.

Viimaks testiti Keio kollektsioonist oligopeptiidi transporteri OppA ja seondumisvalgu MppA mutanti. Mureiini tripeptiidid ja tetrapeptiidid, mis vabanevad peptidoglükaanist või anhüdromuropeptiididest amidaaside poolt, viib periplasmast tsütoplasmasse oligopeptiidi transporter Opp koos spetsiifilise seondumisvalgu MppA-ga (Irazoki *et al.*, 2019). Seetõttu valiti Keio kollektsioonist välja testimiseks nii *oppA* kui ka *mppA* mutandid ning nendega viidi läbi ärkamiskatse. Katsete tulemused näitasid, et mõlema mutandi ärkamiskineetika sarnases *wt* tüvega (joonis 7).



Joonis 7. *oppA* ja *mppA* mutantide ärkamiskineetika muropeptiidi juuresolekul. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures. Esitatud on *oppA* ja *mppA* kvantitatiivsed tulemused võrrelduna *wt* tüvega. Δt on aegade vahe, mis kulub muropeptiidiga (4 μ l 100 μ l kultuuri kohta) ja muropeptiidita kultuuridel OD 0,06 jõudmiseks. OD on mõõdetud 100 μ l kultuuri kohta.

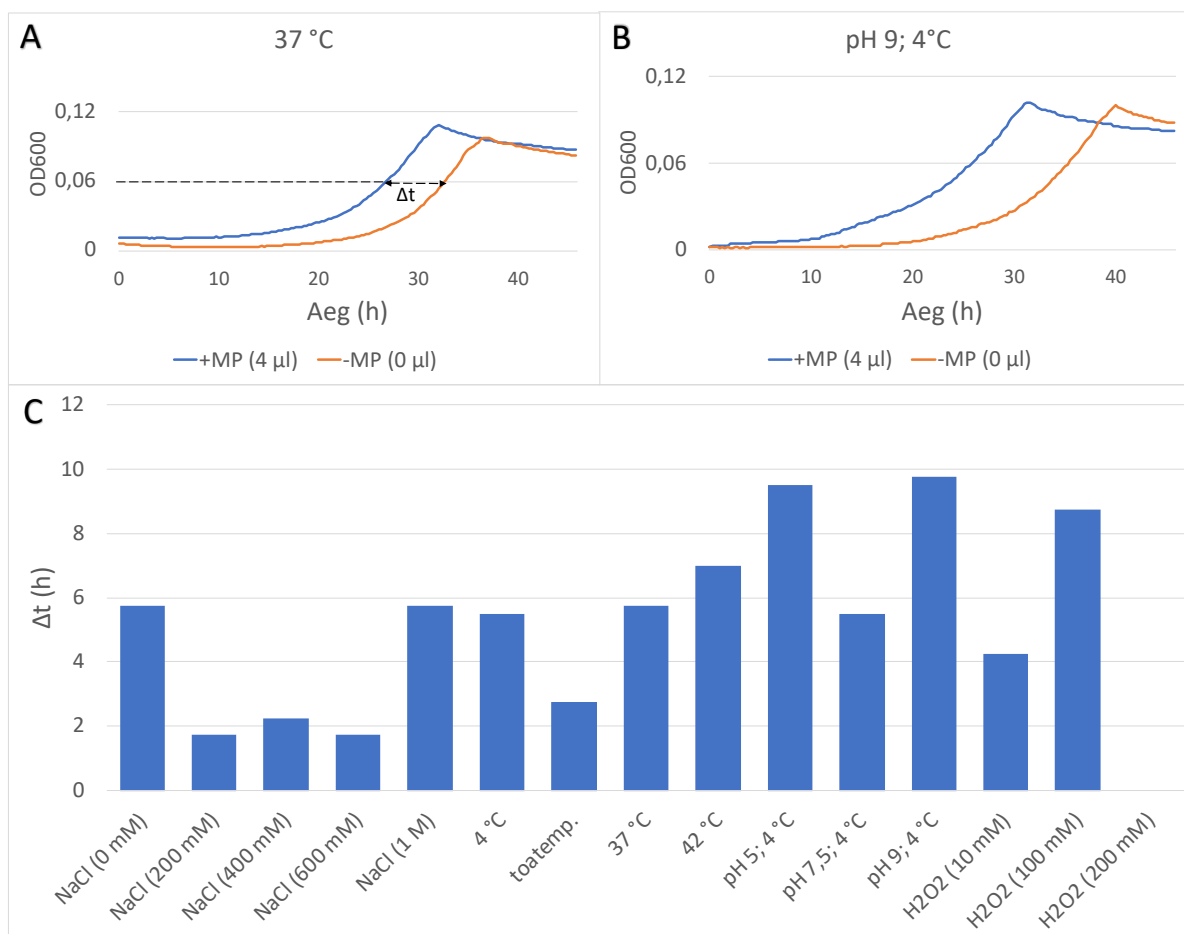
2.3.2 Stressitingimuste rakendamine, et suurendada ajavahemikku muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahel

Erinevate Keio kolleksioonist pärit mutantide testimise kaudu ei leitud ühtegi sellist, mis muropeptiididele statsionaarsest faasist väljumisel ei reageeri. Järgmisena võeti eesmärgiks testida kogu Keio kolleksiooni. Selleks tuli välja töötada välja selline katsesüsteem, kus muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahet mõõdetakse üks kord katse lõpus. Keio kolleksiooni säilitatakse glütserooli säilituskultuuridena, mis asuvad 96-kannuga mikrotiiterplaatidel, seega tuleb katse üles ehitada sellises formaadis, kus kogu eksperiment teostatakse mikrotiiterplaatidel ja võimalikult väheste etappidega. Selliselt saaks kasutada mõõtmist ühes kindlas ajapunktis, et välja selgitada geen, mis osaleb muropeptiidide äratundmises keskkonnast.

Esmalt prooviti tekitada statsionaarses faasis olevatele bakteritele võimalikult suur stress, et nad ei alustaks koheselt pärast värskesse söötmesse üleviimist uuesti kasvamist ja jagunemist. Selleks üritati indutseerida VBNC-laadne seisund, mis on mittesporuleerivate bakterite selline ellujäämisstrateegia, kus ebasoodsates keskkonnatingimustes jäädakse küll füsioloogiliselt ja

metaboolselt aktiivseks, kuid tavalisel agari-söötmele ei suuda bakter kasvada. Kui aga VBNC seisundis rakkudele tagada sobivad keskkonnatingimused, on sellest olekust võimalik ka väljuda (Fakruddin *et al.*, 2013). Antud juhul oli eesmärk välja töötada olukord, kus bakterid jätkaksid kasvamist siis, kui lisatakse muropeptiidi ning muropeptiidi mittelisamisest jääksid edasi soikeseisundisse.

Siinkohal viidi ärkamiskatse läbi selliselt, nagu üksikute mutantide testimisel, kuid mõningate variatsioonidega. Bakterid kasvatati üleöö MOPS Glt 0,1% söötmes ning seejärel lisati kultuur erinevatele temperatuuridele või viidi pärast tsentrifugimist üle erinevate kontsentratsioonidega NaCl/peroksiidi lahustesse või erineva pH-ga puhvritesse. Kultuure kasvatati veel 4 päeva, mille järel viidi bakterid pärast tsentrifugimist üle värskesse MOPS Ac 0,1% söötmesse 20-kordse lahjendusena. Atsetaadi kui kasvaks võimalikult ebasoodsa süsinikuallika kasutamise eesmärk värskes söötmes oli muuta bakterite ärkamine veelgi aeglasemaks. Samuti prooviti kombineerida erinevaid stressitingimusi, nt happeline või aluseline pH + erinevatel temperatuuridel kasvatamine. Katsete tulemusena ei ilmnenud ühtegi stressitingimust, mille puhul muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahel oleks olukord, kus üks kasvab ja teine ei kasva. Suurim ajaline vahe, mis kultuuride vahel saadi, oli ligikaudu 10 tundi ja see ilmnis pH 9 ja 4 °C tingimusel (joonis 8).

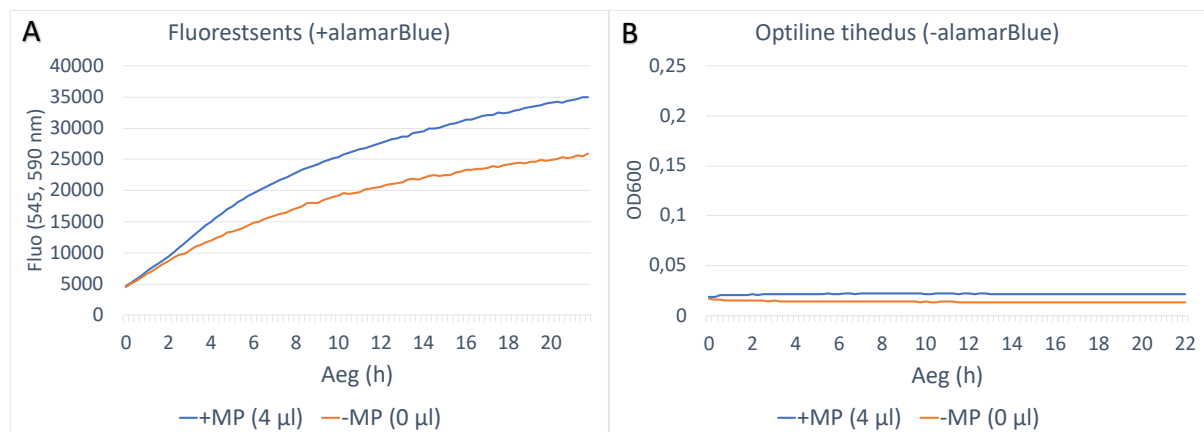


Joonis 8. *wt* tüve ärkamiskineetika muropeptiidi juuresolekul rakendades erinevaid stressitingimusi. Lühend MP tähistab muropeptiide. Muropeptiidide hulgas on 100 μ l kultuuri kohta. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures. (A) *wt* tüve väljumine statsionaarsest faasist vastusena muropeptiidile 37 °C juures. (B) *wt* tüve ärkamiskineetika rakendades stressitingimusi, mis andsid kahe kultuuri vahel suurima ajavahemiku. (C) Esitatud on *wt* tüvele rakendatud kõikide stressitingimuste kvantitatiivsed tulemused. Δt on aegade vahe, mis kulub muropeptiidiga (4 μ l 100 μ l kultuuri kohta) ja muropeptiidita kultuuridel OD 0,06 jõudmiseks. OD on mõõdetud 100 μ l kultuuri kohta.

2.3.3 Süsinikuvaba minimaalsöötme kasutamine ärkamissöötmena

Eelnevate katsete tulemused näitasid, et bakteritele stressi tekitamisel ja kasvuks ebasoodsa süsinikuallika kasutamisel ärkavad ka muropeptiidita kultuuri rakud statsionaarsest faasist ja jätkavad kasvamist. Seega ei saa sellise katsesüsteemiga lõpp-punkti mõõtmist ja Keio kollektsiooni skriinimist üles ehitada. Järgmiseks prooviti, kas oleks võimalik statsionaarsest faasist väljumist detekteerida tingimustes, kus uut süsinikuallikat juurde ei lisata. OD

mõõtmine siinkohal ei sobi, sest sellisel viisil pole kasvu näha. Edasiseks tööks otsustati kasutada alamarBlue® värvi, mis detekteerib metaboolset aktiivsust. See on indikaatorvärv, mida kasutatakse bakterite elujõulisuse kvantitatiivseks mõõtmiseks. Värv hõlmab oksüdeerimise-redutseerimise indikaatorit, mis hakkab fluorestseeruma ja muudab ka värvi vastusena kasvukeskkonna keemilisele redutseerimisele, mis tuleneb rakkude kasvust. Värvaine toimib vahepealse elektronide aktseptorina elektrontransportahelas toimides molekulaarse hapniku asendajana. Kui indikaatorvärv (resasuriin) võtab vastu elektrone, muutub see oksüdeeritud mittefluorestsentsist sinisest olekust roosaks, mis on redutseeritud fluorestsereuv vorm (resorufiin). Tekkiva fluorestsentsi intensiivsus on võrdeline metaboolselt aktiivseks muutunud rakkude arvuga (Rampersad, 2012). Kuna alamarBlue® detekteerib metaboolset aktiivsust juba enne rakkude kasvama hakkamist, siis prooviti ärkamissöötmena kasutada süsinikuvaba söödet. Katse tulemusena ilmnes, et fluorestsentssignaal kasvab muropeptiidiga kultuuri puhul kiiremini ja jääbki kõrgemaks kui ilma muropeptiidita kultuur. Kui samalaadset katset tehti süsinikuallikaga söötmes, siis oli erinevus kahe kultuuri vahel näha ainult teatud aja jooksul, nüüd aga jääb erinevus püsima. Optilist tihendust mõõtes bakterite kasvu ei detekteerita, seega on võimalik, et muropeptiidide lisamisel hakkavad bakterid kasutama oma sisemisi reserve ja seeläbi on statsionaarsest faasist väljumine alamarBlue®-ga näha, isegi kui OD ei muutu (joonis 9).

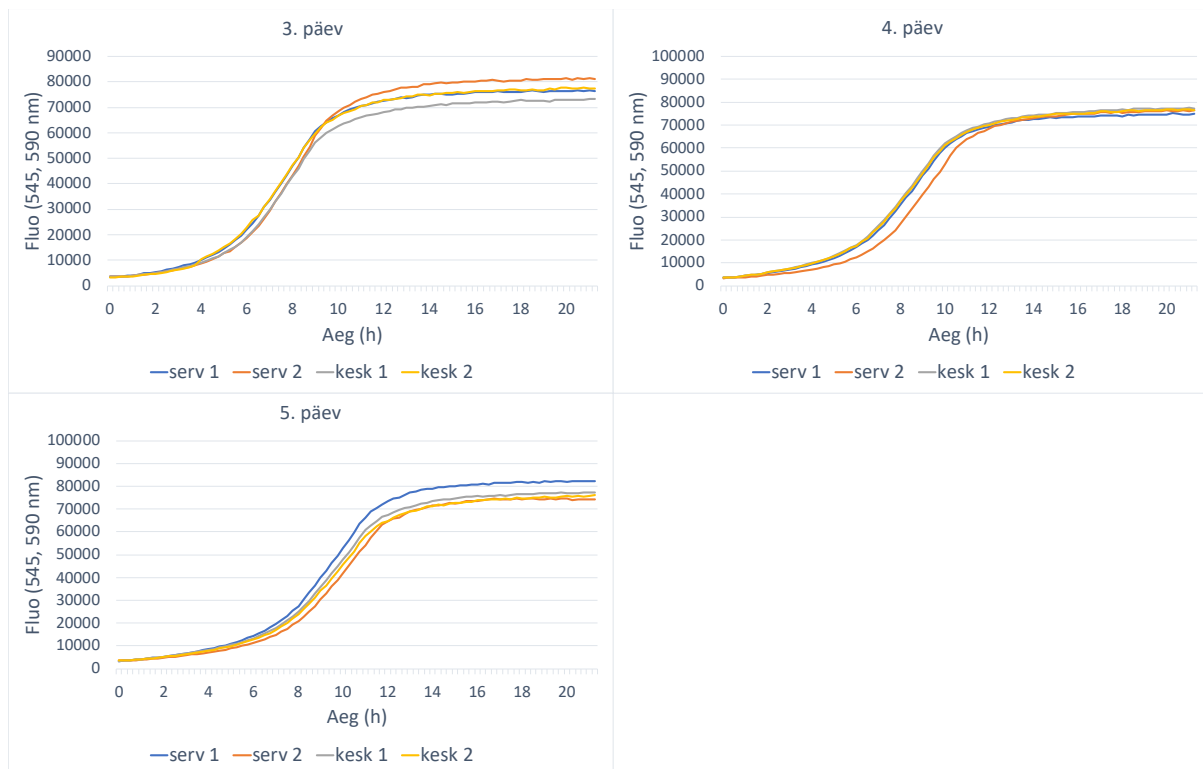


Joonis 9. *wt* tüve ärkamiskineetika muropeptiidi juuresolekul, kui ärkamissöötmena kasutati süsinikuvaba söödet. Lühend MP tähistab muropeptiide. Muropeptiidide hulgas on 100 µl kultuuri kohta. Võrreldud on *wt* tüve väljumist statsionaarsest faasist, detekteerides fluorestsentssignaali ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm, kasutades alamarBlue® värvi (A), ning *wt* tüve statsionaarsest faasist väljumist OD 600 nm juures, kui värvi ei lisatud (B). OD on mõõdetud 100 µl kultuuri kohta.

2.3.4 Katsesüsteemi optimeerimine Keio kollektiooni skriinimiseks

Eelneva katse tulemus, kus saadi muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuri vahel püsiv erinevus, andis võimaluse suuremahuliseks testimiseks, mis hõlmab kogu Keio kollektiooni. Eesmärk oli ühel kindlal ajapunktil määrata võimalikud geenid, mis võiksid olla seotud muropeptiidi ära tundmisega keskkonnast. Suuremahuliseks testimiseks tuli katsesüsteemi vastavalt optimeerida. Keio kollektiooni säilitatakse glütserooli säilituskultuuridena, mis asuvad 96-kannuga mikrotiiterplaatidel ja kuna eelnevalt välja töötatud ärkamiskatset üritati rakendada ka selles skriinimise faasis, siis oli esmalt vaja välja selgitada, kas 96-kannuga mikrotiiterplaadil on võimalik kultuure kasvatada statsionaarsesse faasi. Potentsiaalne probleem siinkohal on küsimus, kas 3-5 päeva jooksul on võimalik kultuure väikeses ruumalas kasvatada nii, et olenemata asukohast plaadil kasvavad kultuurid ühtemoodi ja et aurustumine oleks võimalikult väike. Aurustumise minimeerimiseks kasutati veesärgiga 96-kannuga mikrotiiterplaati, kuhu lisati kannude ümber ja äärtesse vett. Statsionaarse faasi kultuuri kasvatamisel testiti ka mitut algruumala ning kõiki ruumalaid prooviti nii mikrotiiterplaadi keskmistes kui ka servas olevates kannudes kahes korduses.

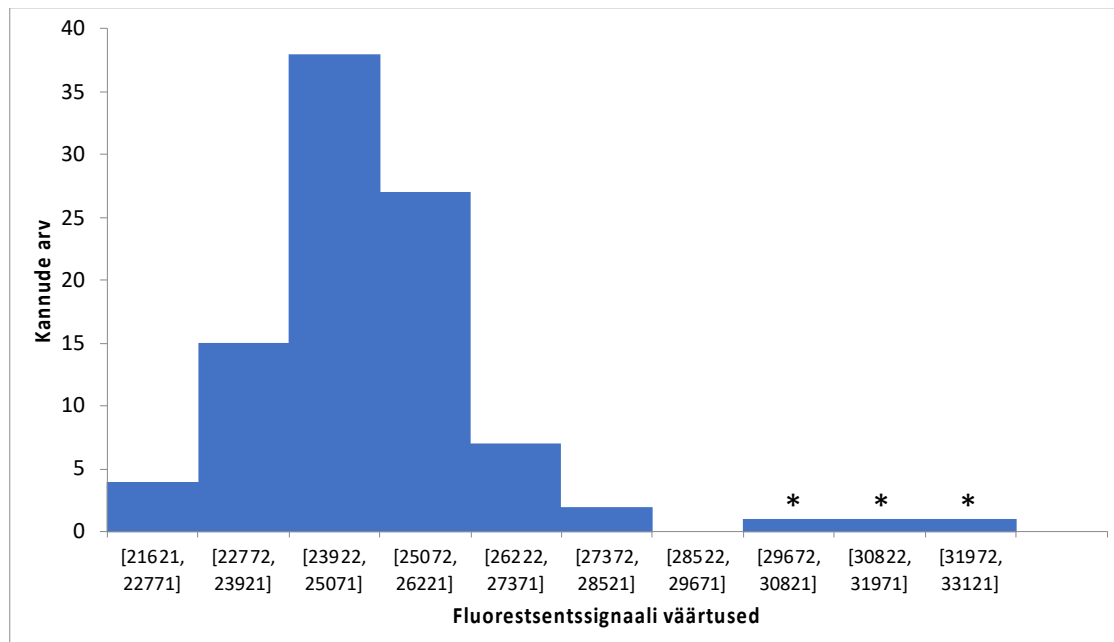
Ärkamiskatse läbiviimiseks kasvatati bakterid MOPS Gly 0,1% söötmes, mille järel viidi bakterid 3., 4. ja 5. päeval pärast tsentrifuugimist üle MOPS Glt 0,1% söötmesse 20-kordse lahjendusena ning lisati alamarBlue® värvi. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti fluorestsentssignaali mõõtes. Katse näitas, et veesärgiga mikrotiiterplaadil on võimalik kultuurid statsionaarsesse faasi kasvatada nii, et aurustumine on minimaalne ning samuti on kultuuride ärkamiskineetika värskesse söötmesse üle viies sarnane sõltumata asukohast plaadil. Tulemus oli sarnane kõikide algruumalade puhul (joonis 10).



Joonis 10. *wt* tüve ärkamiskineetika kasvatades kultuurid statsionaarsesse faasi 96-kannuga mikroitiiterplaadil 3-5 päeva jooksul. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti fluorestsentssignaali ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm, kasutades alamarBlue® värvi. Statsionaarse faasi kultuuri kasvatamisel katsetati mitut algruumala ning kõiki ruumalasiid prooviti nii mikroitiiterplaadi keskmistes kui ka servas olevates kannudes kahes korduses. Antud joonisel on näidatud tulemused 150 µl algruumala kohta.

Tehes kindlaks, et kultuurid on võimalik statsionaarsesse faasi kasvatada mikroitiiterplaadil, viidi järgmine katse läbi selliselt, nagu see peaks välja nägema Keio kollektsiooni mikroitiiterplaate kasutades. Selleks tehti esmalt *n*-ö testplaat *wt* tüvega, kus 96-kannuga mikroitiiterplaadil oli igas kannus *wt* tüve glütserooli säilituslahus. Säilituslahustest tehti seejärel tempelkülv MOPS Gly 0,1% söötmesse veesärgiga 96-kannuga mikroitiiterplaadile ja kasvatati 4 päeva. Seejärel viidi bakterid üle värskesse ilma süsinikuallikata MOPS söötmesse 20-kordse lahjendusena ning lisati alamarBlue® värvi. Samuti lisati kolme kannu pimekatsena muropeptiidi, et selgitada välja, kas fluorestsentssignaali väärtuse järgi on võimalik muropeptiidi efekti statsionaarsest faasist väljumisel detekteerida. Seega ei olnud mõõtmiste ja analüüside läbiviija teadlik, mitmesse ja millistesse kannudesse muropeptiidi lisati. 24 tundi hiljem mõõdeti mikroitiiterplaadilugejas fluorestsentssignaali ühe ajapunkti kohta. Seejärel vaadati fluorestsentssignaali väärtuste jaotust histogrammil, et näha, kas kõik kannud käituvad

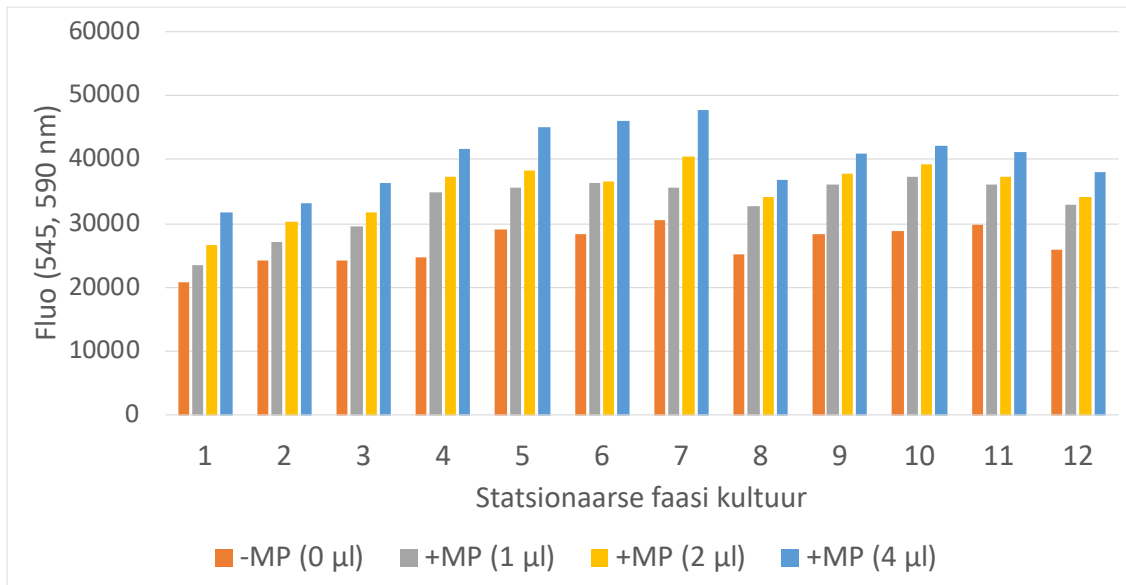
sarnaselt ning kas on võimalik eristada kannusid, kuhu on lisatud muropeptiidi. Katse tulemusena ilmnes, et fluorestsentssignaali väärtuste jaotus ei ole küll kogu mikroitiiterplaadi ulatuses täiesti ühtlane, kuid muropeptiidi lisamist on võimalik väärtuste järgi eristada (joonis 11).



Joonis 11. wt tüve fluorestsentssignaali väärtuste jaotus ühes ajapunktis. Mõõtepiirkond on jagatud 10-ks võrdseks väärtuste vahemikuks. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti fluorestsentssignaali ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm, kasutades alamarBlue® värvi. Muropeptiididega kannud on märgistatud tärnidega ning nende kolm väärtust on ülejäänud väärtustest eristatavad.

Järgmiseks taheti välja selgita, kas oleks võimalik kasutada muropeptiide väiksemas kontsentratsioonis kui 4 µl 100 µl kultuuri kohta. Kogu Keio kollektsiooni skriinimine hõlmaks väga suurt muropeptiidi kogust ning seega taheti välja selgitada, kas väiksem kontsentratsioon annab sarnase efekti statsionaarsest faasist väljumisel kui eelnevates katsetes kasutatud 4 µl. Antud ärkamiskatses kasvatati kultuurid statsionaarsesse faasi mikroitiiterplaadi ühes 12-kannuga reas, kasutades söötmena MOPS Gly 0,1%. 4 päeva möödudes külvati bakterid replikaatoriga ilma süsinikuallikata MOPS söötmesse 20-kordse lahjendusena ning lisati alamarBlue® värvi. Bakterid külvati nelja erinevasse ritta mikroitiiterplaadil, kus igas reas oli erinev kontsentratsioon muropeptiide. Selliselt oli iga statsionaarse faasi kultuuri kohta olemas nelja erineva muropeptiidi kontsentratsiooniga kultuur. Järgmisel päeval mõõdeti

mikroitiiterplaadilugejas fluorestsentsignaali ühe ajapunkti kohta. Tulemustest selgus, et erinevus muropeptiidita (0 μ l) ja muropeptiidiga (4 μ l) kultuuride vahel statsionaarsest faasist väljumisel on selgelt eristatav. Fluorestsentsignaali väärtuste vahe esineb ka 0 μ l ja 1 μ l kontsentratsioonide juures. See näitab, et kasutada on võimalik ka väiksemaid muropeptiidide kontsentratsioone kui 4 μ l 100 μ l kultuuri kohta, eristamaks neid mutantne, mis muropeptiididele statsionaarsest faasist väljudes reageerivad või ei reageeri (joonis 12).



Joonis 12. Erinevate muropeptiidi kontsentratsioonide mõju *wt* tüve statsionaarsest faasist väljumisele. Lühend MP tähistab muropeptiide. Muropeptiidide hulgad on 100 μ l kultuuri kohta. Iga mikroitiiterplaadil kasvatatud statsionaarse faasi kultuur lisati värskesse söötmesse kolme erineva muropeptiidi kontsentratsiooni juuresolekul. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti fluorestsentsignaali ergastuse ja emissiooni lainepikkustel 545 ja 590 nm, kasutades alamarBlue® värvi.

2.4 Arutelu

Käesoleva magistritöö raames oli eesmärgiks välja selgitada potentsiaalseid geene, mis võiksid olla seotud muropeptiidide detekteerimisega keskkonnast ja seeläbi indutseerida kiiremat soikeseisundist väljumist bakteris *Escherichia coli*. Varasemalt on meie laboris leitud, et muropeptiidide tuvastamine keskkonnast ei toimu *E. coli* puhul peptidoglükaani taaskasutusraja komponentide kaudu (Jöers *et al.*, 2019). Seega üritati selle töö käigus saada aimu, millise tundmatu mehhanismi kaudu võiks muropeptiidide äratundmine toimuda.

Algselt loodeti otsitavaid geene leida selliste Keio kolleksioonist pärit mutantide seast, mis võiksid tõenäoliselt olla seotud muropeptiidide äratundmisega keskkonnast või nende transpordiga rakku. Selleks valiti Keio kolleksioonist välja mutandid, mille genomist olid deleteeritud kahekomponendiliste süsteemide vastuseregulaatori geenid, poriinide geenid ja oligopeptiidi transporteri OppA ja selle seondumisvalgu MppA geen. Nendega viidi läbi ärkamiskatse, kus sai näha antud geenide deleteerimise mõju ärkamiskineetikale, kui lisati juurde erinevaid muropeptiidide kontsentratsioone. Sellist katse ülesehitust kasutades ja erinevaid mutante testides ilmnes, et kõikide mutantide ärkamiskineetika vastusena muropeptiididele sarnases *wt* tüvega. Fakt, et muropeptiidid ei toimi läbi teadaolevate kahekomponendiliste süsteemide, lubab oletada, et mängus on mingi teistsugune signaliseerimise süsteem. Üheks selliseks võib olla mõni AmpR sarnane transkriptsioonifaktor. AmpR paikneb tsütoplasmas ja aktiveerib *ampC* transkriptsiooni vastusena anhidro-muropeptiidide akumulereerumisele (Jacobs *et al.*, 1997). Selles töös kasutatud *E. coli* tüves BW25113 puudub *ampR* geen, kuid on võimalik, et eksisteerib mõni *ampR* analoog. Lähedast homoloogi BW251213 tüves leitud pole, küll aga on kümneid valke, millel esineb LysM sarnane domeen (Arvi Jöers, suuline info). See domeen seob potentsiaalselt peptidoglükaani ja võib siduda ka muropeptiide (Oldroyd, 2013). Sellisel juhul saaksid muropeptiidid signaali edastada ilma kahekomponendiliste süsteemide osavõtuta.

Järgmisena seati eesmärgiks läbi testida kogu Keio kolleksioon. Ei ole mõeldav, et ligi 4000 Keio kolleksiooni tüve testitakse katses, kus iga kultuuri kasvu mõõdetakse dünaamiliselt 12 tunni jooksul, selleks puuduvad tehnoloogiainstituudis sobivad masinad. Selle asemel tuli välja töötada selline katsesüsteem, kus muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahet mõõdetakse üks kord katse lõpus. Selleks prooviti tekitada statsionaarses faasis olevatele bakteritele tingimused, kus neil oleks võimalikult suur stress, et nad ei alustaks koheselt pärast

värskesse söötmesse üleviimist uuesti kasvamist ja jagunemist. Eesmärk oli leida olukord, kus bakterid jätkaksid kasvamist ainult siis, kui lisatakse muropeptiidi ning selle mittelisamisel jääksid edasi soikeseisundisse. Siinkohal jäljendaks muropeptiidi lisamine ümbritseva keskkonna tingimusi, kus kasv oleks soodustatud. Stressitingimusi rakendati NaCl, peroksiidi ja erineva pH-ga puhvrite näol. Ärkamissöötmes kasutati süsinikuallikana atsetaati ning selle, kui kasvuks ebasoodsa süsinikuallika kasutamise eesmärk värskes söötmes oli muuta bakterite ärkamine veelgi aeglasemaks. Katsete tulemusena ei leitud ühtegi stressitingimust, mille puhul muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahel oleks olukord, kus üks kasvab ja teine ei kasva. Stressi tekitamisel ja kasvuks ebasoodsa süsinikuallika kasutamisel ärkavad ka muropeptiidita kultuuri rakud statsionaarsest faasist ja jätkavad kasvamist. Järelikult ei saa sellise katsesüsteemiga lõpp-punkti mõõtmist ja Keio kollektiooni skriinimist üles ehitada.

Järgmiseks prooviti, kas oleks võimalik statsionaarsest faasist väljumist detekteerida söötmes, kuhu ei lisata juurde süsinikuallikat. Kultuuri optilise tiheduse mõõtmist siinkohal kasutada ei saa, sest sellisel viisil pole ärkamist näha. Edasiseks tööks võeti kasutusele indikaatorvärv alamarBlue®, mis detekteerib metaboolset aktiivsust ja mida kasutatakse bakterite elujõulisuse kvantitatiivseks mõõtmiseks. Värv hõlmab oksüdeerimise-redutseerimise indikaatorit, mis fluorestseerub ja muudab ka värvi vastusena kasvukeskkonna keemilisele redutseerimisele, mis tuleneb rakkude kasvust (Rampersad, 2012). Kuna alamarBlue® detekteerib metaboolset aktiivsust juba enne rakkude kasvama hakkamist, siis kasutati ärkamissöötmena süsinikuvaba söödet. Katse tulemusena ilmnes, et fluorestsentssignaal kasvab muropeptiidiga kultuuri puhul kiiremini ja jääbki kõrgemaks kui ilma muropeptiidita kultuur. Kui samalaadset katset tehti süsinikuallikaga söötmes ja mõõtes kultuuri optilist tihendust, siis oli erinevus kahe kultuuri vahel näha ainult teatud aja jooksul, nüüd aga jääb erinevus püsima. On tõenäoline, et kui lisada juurde muropeptiide, hakkavad bakterid kasutama oma sisemisi reserve ja seeläbi on statsionaarsest faasist väljumine alamarBlue®-ga näha, isegi kui OD ei muutu. Sellise katsega saavutati eesmärk, kus muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuri vahel esineb püsiv vahe, mis võimaldab läbi viia lõpp-punkti mõõtmist katse lõpus.

Seejärel tuli katsesüsteem muuta selliseks formaadiks, mis võimaldaks kogu Keio kollektiooni läbi testida. Kuna Keio kollektiooni säilitatakse glütserooli säilituskultuuridena, mis asuvad 96-kannuga mikrotiiterplaatidel, siis tuli leida viis, kuidas saaks mikrotiiterplaatidel võimalikult väheste etappide arvuga samalaadne ärkamiskatse läbi viia. Kasutades n-ö testplaati *wt* tüvega, suudeti välja töötada katsesüsteem, mis võimaldab kogu katse teostada

mikroitiiterplaatidel. Statsionaarsesse faasi kasvatati bakterid veesärgiga 96-kannuga mikroitiiterplaadil, seejärel lahjendati kultuure süsinikuvabasse minimaalsöötmesse ning statsionaarsest faasist väljumist jälgiti fluorestsentsignaali mõõtes, kasutades alamarBlue® värvi. Lisades statsionaarse faasi kultuuridele juurde muropeptiidi, on võimalik antud kultuure fluorestsentsignaali väärtuste järgi eristada nendest, kuhu muropeptiidi ei lisatud. Selline ülesehitus võimaldab ühel inimesel läbi testida 5 - 10 mikroitiiterplaati päevas ja muudab taolise skriini tehtavaks ka akadeemilises laboris.

Edaspidises töös tuleks katsesüsteemi optimeerimist jätkata ja teha kindlaks võimalikult väike muropeptiidi kogus, mida saab antud katsetes kasutada, eristamaks vahet muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahel. Seejärel saab läbi viia suuremahulise Keio kollektsiooni testimise, et identifitseerida geene, mis võiksid olla seotud muropeptiidide tuvastamisega keskkonnast ja seeläbi statsionaarsest faasist kiirema väljumise indutseerimisega.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli identifitseerida geenid, mis on seotud muropeptiididest sõltuva soikeseisundist väljumisega. Selleks võeti eesmärgiks testida Keio kollektsoonist pärit erinevate mutantide ärkamiskineetikat muropeptiidide juuresolekul ning välja töötada selline katsesüsteem, mis võimaldaks eelnimetatud eesmärgi jaoks läbi viia kogu Keio kollektsooni skriinimise.

Selleks, et leida signaalisüsteemi, mis on seotud muropeptiidide tuvastamisega keskkonnast, testiti esmalt erinevaid mutante Keio kollektsoonist. Keio kollektsoonist valiti välja mutandid, mille genomist olid deleteeritud kahekomponendiliste süsteemide vastuseregulaatori geenid, poriinide geenid ja oligopeptiidi transporteri OppA ja selle seondumisvalgu MppA geen. Nendega viidi läbi ärkamiskatse, kus sai näha antud geenide deleteerimise mõju ärkamiskineetikale, kui lisati juurde erinevaid muropeptiidide kontsentratsioone. Kõikide mutantide ärkamiskineetika sarnases *wt* tüvega. Seejärel võeti eesmärgiks testida kogu Keio kollektsooni. Selleks tuli välja töötada välja selline katsesüsteem, kus muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahet mõõdetakse üks kord katse lõpus ja selleks tuli varem kasutatud katsesüsteemi muuta. Esmalt prooviti rakendada bakteritele erinevaid stressitingimusi, et suurendada ajavahemikku muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahel. Ei ilmnenud ühtegi stressitingimust, mille puhul muropeptiidiga ja muropeptiidita kultuuride vahel esineks püsiv erinevus.

Edasise töö käigus õnnestus Keio kollektsooni skriinimiseks välja töötada järgmine katsesüsteem. Statsionaarsesse faasi kasvatati bakterid veesärgiga 96-kannuga mikrotiiterplaadil, seejärel lahjendati kultuure süsinikuvabasse minimaalsöötmesse ning statsionaarsest faasist väljumist jälgiti fluorestsentssignaali mõõtes, kasutades alamarBlue® värvi, mis detekteerib metaboolset aktiivsust. Lisades osadele lahjendatud kultuuridele juurde muropeptiidi, on võimalik neid kultuure fluorestsentssignaali väärtuste järgi eristada. Sellist katsesüsteemi kasutades saaks läbi testida kogu Keio kollektsooni ning leida potentsiaalseid mutante, mis muropeptiididele statsionaarsest faasist väljumisel ei reageeri.

Identification of genes that are involved in muropeptide-dependent exit from stationary phase in *Escherichia coli*

Eliis Liske

Summary

Bacteria can exist in a metabolically inactive state which allows them to survive unfavourable conditions for growth. As environmental conditions improve, bacteria can exit dormancy and start to grow (Dworkin and Shah, 2010). Exit from dormancy can also occur in response to signals released by other growing bacteria. For example, spores of *Bacillus subtilis* are able to germinate in response to muropeptides (Shah *et al.*, 2008). In our laboratory, it was recently discovered that muropeptides also induce exit from dormancy in *Escherichia coli* (Jöers *et al.*, 2019). However, the mechanism how *E. coli* detects muropeptides from the environment is not known. The aim of this thesis was to identify genes that are involved in muropeptide-dependent exit from dormancy.

In order to find a signaling system that is involved in the detection of muropeptides from the environment, various mutants from the Keio collection were tested. Mutants were tested that had the following genes deleted from the genome: response regulator genes of the two-component systems, the porin genes, and the oligopeptide transporter OppA and its binding protein MppA. These were used in an growth resumption experiment to see the effect of deletion of these genes on awakening kinetics when different concentrations of muropeptides were added. The awakening kinetics of all mutants were similar to the wild-type strain. The aim was then to test the entire Keio collection. For this, an assay had to be developed in which the difference between cultures with and without added muropeptides is measured once at the end of the experiment and therefore the previously used assay had to be modified. At first, attempts were made to apply different stress conditions to the bacteria to increase the time difference between cultures with and without added muropeptides. None of the applied stress conditions showed a consistent difference.

As a result of further work, the following assay was developed to screen the Keio collection. Bacteria were grown to stationary phase in a 96-well microtiter plate with an inter-well space and a moat surrounding the edge wells. The cultures were then diluted into carbon-free minimal medium, and the exit from the stationary phase was monitored by measuring the fluorescence signal using alamarBlue® dye, which detects metabolic activity. By adding muropeptides to

some diluted cultures, it is possible to distinguish these cultures by the values of the fluorescence signal. Using this kind of assay, the entire Keio collection could be tested to identify potential mutants that do not respond to muropeptides when exiting dormancy.

KASUTATUD KIRJANDUS

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., ... Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008.

Bacun-Družina, V., Butorac, A., Mrvacic, J., Dragicevic, T. L., Stehlik-Tomas, V. (2011). Bacterial stationary-phase evolution. *Food Technology, Biotechnology*, 49(1): 13-23.

Bohannon, D. E., Connell, N., Keener, J., Tormo, A., Espinosa-Urgel, M., Zambrano, M. M., Kolter, R. (1991). Stationary phase-inducible “gearbox” promoters: differential effects of *katF* mutations and role of $\sigma 70$. *Journal of Bacteriology*, 173(14): 4482–4492.

Boudreau, M. A., Fisher, J. F., Mobashery, S. (2012). Messenger functions of the bacterial cell wall-derived muropeptides. *Biochemistry*, 51(14): 2974-2990.

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.

Doeven, M. K., Abele, R., Tampé, R., Poolman, B. (2004). The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(31): 32301-32307.

Doyle, R.J., Chaloupka, J., Vinter, V. (1988). Turnover of cell walls in microorganisms. *Microbiology Reviews*, 52(4): 554-567.

Dworkin, J. (2014). The medium is the message: interspecies and interkingdom signaling by peptidoglycan and related bacterial glycans. *Annual Review of Microbiology*, 68: 137-154.

Dworkin, J., Shah, I. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12): 890–896.

Egan, A. J., Cleverley, R. M., Peters, K., Lewis, R. J., Vollmer, W. (2017). Regulation of

bacterial cell wall growth. *FEBS J*, 284(6): 851-867.

Epstein, S.S. (2009). Microbial awakenings. *Nature*, 457(7233): 1083.

Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews Microbiology*, 1(2): 117–126.

Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., Andrews, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiology*. Article ID 703813, doi: 10.1155/2013/703813.

Hollenstein, K., Dawson, R. J., Locher, K. P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(4): 412-418.

Irazoki, O., Hernandez, S. B., Cava, F. (2019). Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Frontiers in Microbiology*, 10: 500.

Jacobs, C., Frere, J.-M., Normark, S. (1997). Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -Lactam resistance in Gram-negative bacteria. *Cell*, 88(6): 823-832.

Jayaraman, R. (2008). Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *Journal of Biosciences*, 33(5): 795-805.

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.

Jöers, A., Vind, K., Hernández, S. B., Maruste, R., Pereira, M., Brauer, A., Remm, M., Cava, F., Tenson, T. (2019). Muropeptides Stimulate Growth Resumption from Stationary Phase in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1): 18043.

Kefala, G., Ahn, C., Krupa, M., Esquivies, L., Maslennikov, I., Kwiatkowski, W., Choe, S. (2010). Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12. *Protein Science*, 19(5): 1117-1125.

Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q., Leibler, S. (2005). Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*, 169(4): 1807-1814.

Libby, E. A., Gross, L. A., Dworkin, J. (2015). The Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase PrkC Regulates the Essential WalRK Two Component System in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics*, 11(6): e1005275.

McKenney, P. T., Driks A., Eichenberger P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature reviews Microbiology*, 11(1): 33-44.

Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-199.

Mizuno, T., Kaneko, T., Tabata, S. (1996). Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Research*, 3(6): 407-414.

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(15): 8916-8921.

Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Young, M. (2006). Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Molecular Microbiology*, 59(1): 84-98.

Navarro Llorens, J., Tormo, A., Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4): 476–495.

Neidhardt, F. C. Bloch, P. L., Smith, D. F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, 119(3): 736-747.

Nikitushkin, V. D., Demina, G. R., Kaprelyants, A. S. (2016). Rpf Proteins Are the Factors of Reactivation of the Dormant Forms of Actinobacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 81(13): 1719-1734.

Nyström, T. (2004). Stationary-Phase Physiology. *Annual Review of Microbiology*, 58: 161–181.

Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4): 252-263.

Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B. L., Mori, H., Mizuno, T. (2002). Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 46(1): 281-291.

Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel)*, 12(9): 12347-12360.

Reith, J., Mayer, C. (2011). Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1): 1-11.

Schumacher, M., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., Brennan, R. G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science*, 323(5912): 396-401.

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(3): 486-496.

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

Telkov, M. V., Demina, G. R., ... Kaprelyants, A.S. (2006). Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases. *Biochemistry (Moscow)*, 71(4): 414-422.

Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2): 123-136.

Vergalli, J., Bodrenko, I. V., Masi, M., Moynié, L., Acosta-Gutiérrez, S., Naismith, J. H., Davin-Regli, A., Ceccarelli, M., van den Berg, B., Winterhalter, M., Pagès, J. M. (2020). Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3): 164-176.

Vollmer, W., Bertsche, U. (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9): 1714-1734.

Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2): 149–167.

Yeats, C., Finn, R. D., Bateman, A. (2002). The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9): 438-440.

LISAD

Lisa 1. Eksperimentides kasutatud *E. coli* tüved

Tüvi	Genotüüp
K-12 BW25113	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1</i>
K-12 BW25113 <i>ΔcheY</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔcheY</i>
K-12 BW25113 <i>ΔkdpE</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔkdpE</i>
K-12 BW25113 <i>ΔtorR</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔtorR</i>
K-12 BW25113 <i>ΔphoP</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔphoP</i>
K-12 BW25113 <i>ΔrstA</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔrstA</i>
K-12 BW25113 <i>ΔbaeR</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔbaeR</i>
K-12 BW25113 <i>ΔarcA</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔarcA</i>
K-12 BW25113 <i>ΔnarL</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔnarL</i>
K-12 BW25113 <i>ΔuvrY</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔuvrY</i>
K-12 BW25113 <i>ΔrcsB</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔrcsB</i>
K-12 BW25113 <i>ΔevgA</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔevgA</i>
K-12 BW25113 <i>ΔcpxR</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔcpxR</i>
K-12 BW25113 <i>ΔbasR</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔbasR</i>
K-12 BW25113 <i>ΔcreB</i>	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔcreB</i>

K-12 BW25113 $\Delta fimZ$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta fimZ$
K-12 BW25113 $\Delta narP$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta narP$
K-12 BW25113 $\Delta uhpA$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta uhpA$
K-12 BW25113 $\Delta atoS$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta atoS$
K-12 BW25113 $\Delta glnG$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta glnG$
K-12 BW25113 $\Delta zraA$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta zraA$
K-12 BW25113 $\Delta yehT$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta yehT$
K-12 BW25113 $\Delta cheB$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta cheB$
K-12 BW25113 $\Delta rssA$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta rssA$
K-12 BW25113 $\Delta cusR$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta cusR$
K-12 BW25113 $\Delta yfhA$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta yfhA$
K-12 BW25113 $\Delta ygeK$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta ygeK$
K-12 BW25113 $\Delta citB$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta citB$
K-12 BW25113 $\Delta cheR$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta cheR$
K-12 BW25113 $\Delta yedF$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta yedF$
K-12 BW25113 $\Delta yedW$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> $\Delta yedW$

K-12 BW25113 $\Delta ypdB$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta ypdB</i>
K-12 BW25113 $\Delta qseB$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta qseB</i>
K-12 BW25113 $\Delta dcuR$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta dcuR</i>
K-12 BW25113 $\Delta yhjB$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta yhjB</i>
K-12 BW25113 $\Delta soxS$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta soxS</i>
K-12 BW25113 $\Delta ompF$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta ompF</i>
K-12 BW25113 $\Delta ompC$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta ompC</i>
K-12 BW25113 $\Delta tonB$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta tonB</i>
K-12 BW25113 $\Delta lamB$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta lamB</i>
K-12 BW25113 $\Delta fecA$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta fecA</i>
K-12 BW25113 $\Delta ompN$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta ompN</i>
K-12 BW25113 $\Delta ompL$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta ompL</i>
K-12 BW25113 $\Delta tolC$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta tolC</i>
K-12 BW25113 $\Delta nanC$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta nanC</i>
K-12 BW25113 $\Delta cusC$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta cusC</i>
K-12 BW25113 $\Delta bglH$	<i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)567$ $\Delta(rhaBAD)568$ <i>rph-1</i> <i>\Delta bglH</i>

K-12 BW25113 Δ <i>pgaA</i>	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> <i>\Delta</i> <i>pgaA</i>
K-12 BW25113 Δ <i>nmpC</i>	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> <i>\Delta</i> <i>nmpC</i>
K-12 BW25113 Δ <i>phoE</i>	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> <i>\Delta</i> <i>phoE</i>
K-12 BW25113 Δ <i>fhuA</i>	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> <i>\Delta</i> <i>fhuA</i>
K-12 BW25113 Δ <i>fepA</i>	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> <i>\Delta</i> <i>fepA</i>
K-12 BW25113 Δ <i>oppA</i>	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> <i>\Delta</i> <i>oppA</i>
K-12 BW25113 Δ <i>mppA</i>	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> <i>\Delta</i> <i>mppA</i>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Eliis Liske (sünnikuupäev 24.09.1995)

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

Muropeptiidide poolt indutseeritud statsionaarsest faasist väljumisega seotud geenide tuvastamine bakteris *Escherichia coli*,

mille juhendajaks on Arvi Jõers,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

1. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Eliis Liske

11.06.2020