

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Eliis Liske

***Escherichia coli* statsionaarses faasis tekkiva populatsioonisisese
heterogeensuse iseloomustus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja vanemteadur Arvi Jõers

TARTU 2018

INFOLEHT

***Escherichia coli* statsionaarses faasis tekkiva populatsioonisisese heterogeensuse iseloomustus**

Üksiku mikroobiraku fenotüüp on määratud nii geenide, ümbritseva keskkonna, kui ka mitmete rakuliste mehhanismide poolt, mis tekitavad fenotüübilisi muutusi. Varasema töö käigus meie laboris on läbivoolutsütomeetriameetodit kasutades leitud, et LB söötmes kasvanud *E. coli* tüve BW25113 rakkude statsionaarses faasis toimub osade rakkude taasjagunemine (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Seega on märgata populatsioonisisest heterogeensust, kus üks osa populatsioonist on soikeseisundis, teine aga kasvab ja jaguneb. Töö eesmärgiks oli määrata, kas *E. coli* tüve BW25113 rakkude statsionaarses faasis toimuv osade rakkude taasjagunemine on tingitud genotüübilisest või fenotüübilisest muutusest.

Märksõnad: *Escherichia coli*, statsionaarne faas, fenotüübiline heterogeensus, kasvueelis

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Characterization of the intrapopulation heterogeneity of *Escherichia coli* in the stationary phase

The phenotype of a single microbial cell is determined by genes, the surrounding environment, and by several cellular mechanisms that cause phenotypic changes. In the course of the previous work performed in our laboratory, using the flow cytometry method, it has been found that some cells of the *E. coli* strain BW25113 grown in LB medium are re-dividing in stationary phase (Arvi Jõers, unpublished data). Thus, intrapopulation heterogeneity is observed, where one part of the population is dormant, while the other is growing and dividing. The aim of this thesis was to determine whether the growth advantage of the dividing cells was due to a genotypic or a phenotypic change.

Keywords: *Escherichia coli*, stationary phase, phenotypic heterogeneity, growth advantage

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Bakterite kasvufaasid	7
1.2 Statsionaarne faas.....	9
1.3 Kasvueelises statsionaarses faasis	11
1.3.1 GASP mutatsioonid.....	12
1.4 Fenotüübiline heterogeensus.....	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjalid ja meetodika	18
2.2.1 Bakteritüved, söötmed ja plasmiidid.....	18
2.2.2 Plasmiidide eraldamine, bakterite transformeerimine ja säilituskultuuri tegemine	18
2.2.3 Kasvava populatsiooni tekke jälgimine statsionaarses faasis.....	19
2.2.4 Lävivoolutsütomeetria	20
2.2.5 Konkurentsikatse.....	20
2.3 Tulemused.....	21
2.3.1 Jagunemine statsionaarses faasis esineb ka antibiootikumiresistentsetel <i>E. coli</i> tüvedel	21
2.3.2 5 päeva vanune kultuur tõrjub 1 päeva vanuse välja.....	22
2.3.3 Sorditud kloonidel kasvueelises ei esine	24
2.3.4 5 päeva vanune kultuur tõrjub sorditud kultuurid välja.....	26
2.4 Arutelu.....	27
KOKKUVÕTE	29

Summary	30
KASUTATUD KIRJANDUS.....	31
LISAD	34
LIHTLITSENTS.....	36

KASUTATUD LÜHENDID

CFU – kolooniaid moodustav ühik (*colony forming unit*)

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

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

IPTG – isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid (*isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*)

kb – kiloaluspaar (*kilobase pair*)

LPS – lipopolüsahhariid

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

PBS – fosfaat-puhverdatud saliin (*phosphate-buffered saline*)

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

wt – metsiktüvi (*wild-type*)

SISSEJUHATUS

Bakterid veedavad põhilise aja oma elutsüklilist toitainetevaestes tingimustes, kus kiiret kasvu ei esine. Laborikatsetes jäljendab sellist olukorda statsionaarne faas. *E. coli* rakud ei läbi küll olulisi morfoloogilisi muutusi, nagu seda teevad sporuleerivad bakterid, kuid on kindel, et statsionaarsesse faasi sisenemisel toimuvad muutused geeniekspressioonis, aitamaks üle elada vajalike toitainete vaegust, mille tulemusena ollakse võimelised üle elama pikaajalisi näljaperioode (Bohannon *et al.*, 1991). Kui keskkonnatingimused muutuvad soodsamaks ja toitainetevaru täieneb, on bakteritel võimalik kasvu jätkata (Bacun-Družina *et al.*, 2011). Sellised toitainetevaesed kasvukeskkonnad selekteerivad välja mutandid, kes ekspresseerivad GASP fenotüüpi ehk kasvueelise statsionaarses faasis (Finkel, 2006).

Üksiku mikroobiraku fenotüüp ei ole üheselt määratud ainult geenide ja ümbritseva keskkonna poolt. Esineb mitmeid rakulisi mehhanisme, mis tekitavad fenotüübilisi muutusi homoloogses keskkonnas kasvanud ja geneetiliselt identses populatsioonis. Sellist nähtust nimetatakse fenotüübiliseks heterogeensuseks (Ackermann, 2015). Heterogeensus annab bakteritele erineva tundlikkuse stressitingimuste suhtes ja võib tagada ka teatud eelise nende tingimuste üleelamiseks (Sumner ja Avery, 2002). Varasema töö käigus meie laboris on läbivoolutsütomeetriameetodit kasutades leitud, et LB söötmes kasvanud *E. coli* tüve BW25113 rakkude statsionaarses faasis toimub osade rakkude taasjagunemine (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Seega on märgata fenotüübilist heterogeensust, kus üks osa populatsioonist on soikeseisundis, teine aga kasvab ja jaguneb.

Käesoleva töö teoreetilises osas käsitletakse bakterite kasvufaase. Pikemalt kirjeldatakse statsionaarset faasi ning antakse ülevaade selles faasis tekkivatest genotüübilistest ning fenotüübilistest muutustest, mis annavad osale bakteripopulatsioonist kasvueelise.

Töö praktilises osas uuritakse, kas *E. coli* tüve BW25113 rakkude statsionaarses faasis toimuv osade rakkude taasjagunemine on tingitud genotüübilisest või fenotüübilisest muutusest. Töö praktiline osa teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Bakterite kasvufaasid

Bakterite kasvu all mõeldakse tavaliselt rakkude arvu suurenemist populatsioonis, mis on tingitud rakkude suurenemisest ja jagunemisest (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Suletud kultuuri kirjeldavat kasvukõveralt võib eristada viit faasi: lag-faas – viivitus enne eksponentsiaalse kasvu algust; eksponentsiaalne faas – toimub rakujagunemine konstantsel kiirusel; statsionaarne faas – tingimused ei soosi kasvu ja rakkude jagunemine peatub; surmafaas – kultuuri elulemus langeb; ja viimaks pikaajaline statsionaarne faas, kus elulemus püsib stabiilsel madalal tasemel ja mis võib kesta aastaid (Rolfe *et al.*, 2012).

Lag-faasi jooksul sisenevad bakterirakud uude elukeskkonda ning kohanevad uute tingimustega. Toimub metaboolne reprogrammeerimine, et rakud oleksid võimelised antud keskkonnas edukalt kasvama. Lag-faasi pikkust mõjutavad erinevad faktorid, näiteks liikide eripärad, muutlikud keskkonnatingimused ja samuti aeg, mil rakud olid eelnevalt olnud toitainetevaeses keskkonnas n-ö näljas (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Eristatakse kahte erinevat lag-faasi osa: esialgne lag1, kus ei esine biomassi produktsiooni ning hilisem lag2, kus toimub rakkude kasv, kuid mitte jagunemine (Schultz ja Kishony, 2013). Adaptsioon algab nende geenide lühiajalise ekspresseerimisega, mis aitavad rakku transportida fosfaate, süsiniku- ja lämmastikuallikaid. Sellele järgnevad ribosoomide süntees, LPS biosüntees ja erinevate metallioonide kontsentratsioonide reguleerimine. Näiteks raua kontsentratsiooni suurenemist lag-faasi käigus on seostatud lühiajaline tundlikkusega oksüdatiivsele stressile (Rolfe *et al.*, 2012).

Lag-faasile järgneb eksponentsiaalne faas, mil rakud on uue elukeskkonnaga kohanenud ning populatsioon alustab kiiret kasvumist ja jagunemist, kahekordistudes kindla aja vältel. Selles faasis on esmasteks ja eelistatud süsiniku- ja energiaallikateks süsivesikud, kuid need kasutatakse kiirelt ning kasvu jätkamiseks kasutatakse lisaks teisi toitaineid näiteks peptiide, aminohappeid, nukleiinhappeid, nukleotiide ja rasvhappeid (Farrell ja Finkel, 2003). Kasvukiirus on konstantne ja oleneb keskkonnatingimustest, olles aeglasem toitainetevaeses

ning kiirem toitaineterikkas keskkonnas. Näiteks *E. coli* generatsiooniaeg 37 °C juures ning toitaineterikkal söötmel on 20 min (Navarro Llorens *et al.*, 2010).

Statsionaarne faas saab alguse siis, kui järelejäänud toitained on ammendunud. Selles faasis jääb elusrakkude arv 2-3 päevaks muutumatuna ehk rakud ei sure ega jagune (Farrell ja Finkel, 2003). Toitainete ammendumise ning ainevahetusjääkide akumulierumise tulemusena hakkavad bakterid kaotama elulemust ning populatsioon siseneb surmafaasi, kus eluvõimeliste rakkude arv kahaneb eksponentsiaalselt (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Ajaliselt määratakse surmafaas elutsüklis alates sellest, kui umbes 99% bakteritest on elujõulisuse kaotanud. Kui rakud surevad, siis nad ka lagunevad ja allesjäänud elusad rakud on võimelised kataboliseerima nende jäänuseid - aminohappeid valkudest, süsivesikuid rakuseintest, lipiide rakumembraanidest ja ka DNA'd (Finkel, 2006).

Pärast surmafaasi on *E. coli* kultuur võimeline madala elulemusega pikalt stabiilsema püsima. Lisades aeg-ajalt steriilset destilleeritud vett ruumala ja osmolaarsuse säilitamiseks, on aeroobselt kasvanud kultuurid võimelised säilima umbes 10⁶ CFU/ml tiheduse juures kauem kui 5 aastat ning seda toitaineid juurde lisamata (Finkel, 2006). Seda faasi nimetatakse pikaajaliseks statsionaarseks faasiks. Võrreldes varasema statsionaarse faasiga, on pikaajaline faas dünaamiline – osad rakud jagunevad, osad surevad. See tähendab, et pikaajalised kultuurid on võimelised ülal pidama vaid teatud arvu rakke. Selleks, et uued rakud tekiks, peavad vanad rakud surema (Finkel, 2006). Kasvueelis on tingitud mutatsioonidest, mida nimetatakse ka GASP (*growth advantage in stationary phase*) mutatsioonideks. Seda nähtust defineeritakse ka kui vanemate kultuuride rakkude omadust välja tõrjuda nooremate kultuuride rakke (Zinser ja Kolter, 2004).

1.2 Statsionaarne faas

Põhilise aja oma elutsüklist veedavad bakterid toitainetevaestes tingimustes, kus kiiret kasvu ei esine. Laborikatsetes jäljendab sellist olukorda statsionaarne faas. *E. coli* rakud ei läbi küll olulisi morfoloogilisi muutusi, nagu seda teevad sporuleerivad bakterid, kuid on kindel, et statsionaarsesse faasi sisenemisel toimuvad muutused geeniekspressioonis, aitamaks üle elada vajalike toitainete vaegust. Tulemuseks omandavad statsionaarse faasi rakud hea vastupanuvõime keskkonnatingimustele ja on võimelised üle elama pikaajalisi näljaperioode (Bohannon *et al.*, 1991). Kui keskkonnatingimused paranevad ning toitainetevaru täieneb, on võimalik bakteritel kasvu jätkata (Bacun-Družina *et al.*, 2011).

Teatud bakteriliikide soikeseisundit statsionaarses faasis on võimalik morfoloogiliselt eristada. (Dworkin ja Shah, 2010). Vastusena stressile toimub osadel bakteritel sporulatsioon, mille käigus pakitakse genoom spoori, kuni keskkonnatingimused paranevad. Endosporiid moodustuvad emarakust, mis peab olema eelnevalt lüüsunud ja selle tagajärjel spoori keskkonda eritanud. Sporulatsioon on lihtne näide diferentseerumisest (McKenney *et al.*, 2013). Asümmeetrilise jagunemise tulemusena moodustub sporulatsiooniseptum, mis jagab raku kaheks piirkonnaks. Üks neist on spoori alge ja teine emarakk. Eelsporile moodustub korteks ja paks spoorikest ning toimub küpsemine endosporiiks. Spoor vabaneb emaraku lüüsudes (Errington, 2003). Spoorid võimaldavad bakteritel olla vastupanuvõimelised nt UV-kiirguse, kemikaalide, hüdrofüütiliste ensüümide ning kõrge temperatuuri (kuni 100°C) suhtes (McKenney *et al.*, 2013; Errington, 2003). Tuntumad bakterid, kes toitainepuudusele sporulatsiooniga vastavad, on *Bacillus spp.* ja *Clostridium spp.* (Dworkin ja Shah, 2010).

Alati ei pruugi visuaalseid erinevusi soikeseisundi puhul tekkida (Dworkin ja Shah, 2010). *E. coli* vastupidav spoordilaadne seisund väljendub mittejagunevas olekus, kuni taastub bakteritele soodne elukeskkond ja rakud on võimelised kasvu jätkama. Statsionaarsesse faasi sisenemine on väga reguleeritud protsess, mis saab alguse alternatiivse sigma (σ) faktori RpoS-sõltuvast geeniekspressioonist. Muutused RpoS märklaudgeenide ekspressioonimustris ongi aluseks vastupidavama seisundi omandamiseks. See on väga kompleksne reguleeriv kaskaad, kus erinevad signaalid keskkonnast mõjutavad transkriptsioonilisi regulaatoreid ja

sigma faktoreid, mis omakorda mõjutavad RNA polümeraasi aktiivsust viies statsionaarse faasi spetsiifilise geeniekspressioonini (Navarro Llorens *et al.*, 2010).

Lisaks on mittesporuleerivatel bakteritel täheldatud persistereid ja VBNC (*viable but non-culturable*) seisundit, mis võimaldavad ellu jääda muidu letaalsetes keskkondades. Persisteriteks kujuneb väike osa populatsioonist ning nad on tolerantsed antibiootikumide suhtes. Persisterid tekivad bakteritest, kes ei kasva ega jagune ning neil on peatunud rakuseina süntees ja translatsioon, mis on antibiootikumide märklauaks (Dworkin ja Shah 2010). Persisterid erinevad antibiootikumiresistentsetest mutantidest sellepoolest, et tolerantsus antibiootikumide vastu on mittepärilik ja pöördeline (Javaraman, 2008).

VBNC seisund on bakterite ellujäämisstrateegia ebasoodsates keskkonnatingimustes. Need bakterid ei ole kultiveeritavad tavalisel söötmel, kuid säilivad elujõulisena ja virulentsena. VBNC seisundist on võimalik ka väljuda, kui tagada sobivad keskkonnatingimusi (Fakruddin, 2013). Taastunud rakud võivad endiselt olla patogeensed, seega kaasneb VBNC seisundiga oluline risk inimese tervisele. Risk tervisele väljendub soikeseisundis (inglise keeles *dormancy*) olevate patogeensete bakterite võimes säilida infektsioonivõimelisena, olles samal ajal metaboolselt madala aktiivsusega. Samuti pole nad detekteeritavad kasutades kultiveeritavaid proove (Navarro Llorens *et al.*, 2010).

1.3 Kasvueelise statsionaarse faasi

Looduses tingimustes elavad bakterid suure tõenäosusega tingimustes, mis on sarnased pikaajalise statsionaarse faasi kultuuriga. Sellised toitainetevaesed kasvukeskkonnad selekteerivad välja mutandid, kes ekspresseerivad GASP fenotüüpi ehk kasvueelise statsionaarse faasi (Finkel, 2006).

Laboratoorses tingimustes on selliste protsesside mudelorganismiks suletud kultuuris kasvatatud *Escherichia coli*, mille kaudu saab jäljendada geneetilist ja füsioloogilist osa looduslikust selektsioonist. See mudelsüsteem peegeldab bakterite valdavast seisundist looduses – konkurents kättesaadavatele toitainetele on suur, seega vedavad mikroorganismid enamiku oma elust näljatingimustes (Zinser ja Kolter, 2004). Seda mudelsüsteemi on kirjeldatud ka kui “*feast or famine*” (eesti keeles pidusööming või näljahäda) mudel, mis tähendab, et bakterid on võimelised kiiresti ära kasutama kõik kättesaadavad toitained keskkonnast, muutes neid biomassiks, kuid suudetakse olla ka pikalt n-ö soikeseisundis näljas, kui toitained on ära kasutatud (Finkel, 2006).

Suur osa GASP'i katsetest on läbi viidud kasutades spetsiifilist keskkonda – Luria-Bertani (LB) söödet. Et teha kindlaks keskkonnatingimuste roll kasvueelise kujunemisel, teostati konkurentsikatse erinevatel tingimustel – manipuleeriti kättesaadavate toitainetega, pH'ga ning ka mõlemaga korraga. Leiti, et GASP mutatsiooniga bakteritel on tugev eelis aluselise pH'ga keskkonnas, vähenenud eelis neutraalses ning happelises keskkonnas eelis puudub. Sarnased tulemused saadi ka teisi söötmeid kasutades. Suurim eelis tuvastati GASP mutandil aluselisel minimaalsöötmel, kus ainsaks energia- ja süsinikuallikaks oli kas glükoos või kasaminohapped (Farrell ja Finkel, 2003).

GASP'i olemasolu on võimalik näidata ainult nende mõju kaudu wt rakkudele. GASP fenotüüpi demonstreeritakse teostades eksperimente segakultuuridega, kus rakud erineva vanusega kultuurides pannakse omavahel võistlema (Zambrano *et al.*, 1993). Tüüpilises GASP konkurentsikatses inokuleeritakse rakud vanemast kultuurist nooremisse (Bacun-Družina *et al.*, 2011) ja jälgitakse mõlema kultuuri rakkude arvukuse muutust aja jooksul. Praktiliselt kõik *E. coli* kultuurid, mis on LB-söötmes kasvanud, ekspresseerivad GASP fenotüüpi pärast

10 päeva kestnud inkubatsiooni. Rakud, mis on eraldatud varem kui 8-päevastest kultuuridest, ekspresseerisid GASP'i harva (Finkel, 2006). Kui panna 10-päevane kultuuriproov 1-päevasesse kultuuri, siis algselt vähemuses olnud vanemad rakud suudavad aja jooksul arvult ületada noored populatsioonid (Zambrano *et al.*, 1993). 7-10 päeva pärast on nooremate rakkude arvukus langenud alla detektsioonipiiri. Seega ainult rakud, kes on suutnud 10 päeva pärast inokulatsiooni veel ellu jääda, ekspresseerivad GASP fenotüüpi. Kõik bakteritüved aga pole võimelised nii kaua elujõulised olema ja nende puhul GASP'i ei esine (Finkel, 2006).

1.3.1 GASP mutatsioonid

Geneetiliste analüüside tulemusena on kirjeldatud nelja adaptiivset mutatsiooni pikaajalise statsionaarse faasi üleelamiseks. Erinevate mutatsioonidega tüvesid eristatakse selle kaudu, millistest vanemtüvedest need pärinevad. G_0 (GASP₀) on wt tüvi. G_I tüved on isoleeritud ellujäänud G_0 kultuuridest, kes on omandanud nende suhtes kasvueelise. G_{II} tüved on omakorda ellujäänud isolaadid G_I kultuuridest jne. G_I GASP fenotüüp on tingitud ühest ainsast mutatsioonist, samas kui G_{II} GASP fenotüüp põhineb kolmel mutatsioonil, mis on leitud erinevatest genomipiirkondadest (Zinser ja Kolter, 2004). Kõikide nende mutatsioonide tulemuseks on küll sarnane fenotüüp, kuid kõik erinevad molekulaarsel tasandil (Finkel, 2006).

Esimesena identifitseeriti *E. coli* GASP mutatsioon geenis *rpoS*, mis kodeerib alternatiivset sigma faktorit RpoS (σ^S) (Finkel, 2006; Zinser ja Kolter, 2004). σ^S reguleeritud protsessid muudavad süsinikunäljas raku füsioloogilist seisundit erinevatel viisidel. Raku üldine metaboolne aktiivsus väheneb, kuid tõuseb vastupidavus toitainete puudusele, pH'le, osmootsele, oksüdatiivsele ning temperatuurist tingitud stressile. Samuti väheneb raku suurus (Zinser ja Kolter, 2004). Mutatsioonid geenis *rpoS* on kõige sagedasemad GASP mutatsioonid, mis on 10-päevastest *E. coli* kultuuridest leitud (Finkel 2006). Neid mutante nimetatakse ka G_I tüvedeks, sest need omavad GASP fenotüüpi wt tüve suhtes (Bacun-Družina *et al.*, 2011). Mutatsiooni tagajärjeks on osaliselt vähenenud *rpoS* alleeli funktsioon, mis võimaldab rakul efektiivsemalt teatud aminohappeid kataboliseerida. Zinser oma kolleegidega on näidanud, et mutatsioonid *rpoS* geenis (e *rpoS819* alleelid) hõlbustavadalaniini, arginiini, aspartaadi, glutamaadi, glutamiini, seriini, treoniini ja proliini kasutamist esmasteks süsiniku- ja energiaallikateks (Finkel, 2006). Omavahel on seostatud *rpoS* madalamat geeniekspressiooni ja suurenenud RpoD taset. σ^D subühiku kontrolli alla kuuluvad geenid, mis vastutavad

aminohapete katabolismi eest, seega mutatsioonid *rpoS* geenis võimaldavadki G_I mutantidel efektiivsemalt ära kasutada surnud rakkude poolt eraldatud aminohappeid (Bacun-Družina *et al.*, 2011). Mutatsioon põhjustab 46 aluspaari duplikatsiooni *rpoS* geeni 3' otsas. Selle tulemusena toodetakse valku, kus neli viimast C-terminaalset aminohapet on asendatud 39 uue aminohappega (Navarro Llorens *et al.*, 2010). See toob kaasa madalama *rpoS* aktiivsuse ja languse σ^S -sõltuvate geenide ekspressioonitasemes (Zinser ja Kolter, 2004).

G_{II} GASP fenotüübiga tüved, kes suudavad konkureerivada G_I tüvedega, omavad ühte kolmest erinevast mutatsioonist: *sgaA*, *sgaB* ja *sgaC* (*sga* - *stationary phase growth advantage*), millest kahte on kirjeldatud. (Zinser ja Kolter, 1999). Mutatsioon *sgaB* on geeni *lrp* alleel, mis kodeerib leutsiin-sõltuvat regulaatorvalku (Lrp). Lrp on dimeerne transkriptsioonifaktor (nii aktivaator kui ka repressor), mis reguleerib geenide ekspressiooni, mis võtavad osa aminohapete metabolismist ja transpordist ja selle aktiivsus sõltub sellest, kui palju on intratsellulaarset leutsiini. Mida kõrgem on leutsiini intratsellulaarne kontsentratsioon, seda väiksem on Lrp aktiivsus. Lrp reguleerib aminohapete metabolismi suurendades anabolismi ja vähendades katabolismi ning Lrp, nagu ka σ^S , indutseeritakse üleminekul statsionaarsesse kasvufaasi (Bacun-Družina *et al.*, 2011). Mutantne *lrp* alleel *Lrp-1141* on põhjustatud raamisisesest kolme aluspaari 5'-GGA-3' deletsioonist, mille tulemusena toodetakse valku, millest puudub glütsiinijääk. Tavaliselt on glütsiin konserveerunud heeliks-pööre-heeliks (inglise keeles *helix-turn-helix*) motiivis ja vastutab DNA sidumise eest, kuid mutatsiooni tagajärjel on *Lrp-1141* toodetud valgu konformatsioon muutunud ning DNA sidumise tõenäosus väheneb. Sellest tulenevalt ei aktiveerita ka antud valgu kontrolli all olevaid gene (Zinser ja Kolter, 2004; Bacun-Družina *et al.*, 2011). Lrp alanenud funktsioon võimaldab efektiivsemalt surnud rakkudest vabanenud aminohappeid kataboliseerida ning on ka näidatud, et *lrp* mutandid toodavad suurenenud hulgal ensüüme, mis osalevad glükoneogeenesis ja pentoosfosfaadi rajas. Lisaks on *Lrp-1141* mutatsiooni kandvad rakud vastupidavamad happelise ja osmootse stressi suhtes (Tani *et al.*, 2002).

Teine G_{II} GASP fenotüüpi põhjustav mutatsioon IN(*cstA*::IS5-IS5D) asub geenis *sgaA*. Seda mutatsiooni kirjeldatakse kui genoomi ümberkorraldust, mida põhjustab kahe IS5 järjestuse insertioon ja mille tõttu omakorda aktiveerub *ybeJ-gltJKL-ybeK* viiest geenist koosnev operon ning inaktiveerub *cstA* geen (Zinser *et al.*, 2003). Genoomi ümberkorraldus toimub kahe sündmuse kaudu. Esmalt paigutub üks IS5 element transpositsiooni kaudu *cstA* geeni regulatoorsele alale, mis selle inaktiveerib. Geen *cstA* kodeerib oligopeptiidi permeaasi ja seda

indutseeritakse statsionaarse faasi vältel näljatingimustes. Järgnevalt toimub inversioon sisestatud IS5 ja juba olemasoleva IS5 (IS5D) elemendi vahel, mis asub umbes 60 kb kaugusel. Tulemuseks on *cstA* geeni inaktivatsioon ning *ybeJ-gltJKL-ybeK* operoni aktivatsioon ja see on ainus ümberkorraldus *sgaA* geenis, mis on GASP mutantidest leitud. Aktiveeritud *ybeJ-gltJKL-ybeK* operon suurendab raku võimet kasutada ja transportida aminohappeid kui esmaseid süsinikuallikaid. Operoni esimesed neli geeni (*ybeJ-gltJKL*) kodeerivad suure afiinsusega ABC-transportereid aspartaadi ja glutamaadi transpordiks ning viies geen (*ybeK*) on tsüstiidiini hüdrolaas (Bacun-Družina *et al.*, 2011; Zinser ja Kolter, 2004). Teistest eelmaintud mutatsioonidest erineb IN(*cstA::IS5-IS5D*) selle poolest, et muutus pole geeni kodeerivas osas, vaid ekspressiooni kontrollivas piirkonnas (Tani *et al.*, 2002).

Üleüldine efekt GASP mutatsioonidel on muutus geeniekspressioonis, mitte funktsioonis. Selle evolutsiooniliseks põhjuseks arvatakse olevat eelkõige adaptatsioon uutes keskkondades, mis tugineb olemasolevate geenide ekspressiooni muutusel, mitte uute funktsioonide genereerimisel (Zinser ja Kolter, 2004).

1.4 Fenotüübiline heterogeensus

Üksiku mikroobiraku fenotüüp ei ole üheselt määratud ainult geenide ja ümbritseva keskkonna poolt. Esineb mitmeid rakulisi mehhanisme, mis tekitavad fenotüübilisi erinevusi homogeenses keskkonnas kasvanud ja geneetiliselt identses populatsioonis. Sellist nähtust nimetatakse fenotüübiliseks heterogeensusuks (Ackermann, 2015). Heterogeensus annab bakteritele erineva tundlikkuse stressitingimuste suhtes ja võib tagada ka teatud eelise nende tingimuste üleelamiseks. Põhiliselt tekib fenotüübiline heterogeensus geeniekspressiooni stohhastilise varieerumise tulemusena. Nii näiteks võib kahes naaberrakus olla transkriptsioonifaktori kontsentratsioon juhuslikult natuke erinev, mistõttu on neis rakkudes erinev ka selle transkriptsioonifaktori märklaudgeenide tase (Sumner ja Avery, 2002).

Fenotüübilist heterogeensusust võivad bakterid ka kasutada, rakendades muutuvates keskkonnatingimustes ellujäämiseks *bet-hedging* strateegiat (eesti keeles kindlustusstrateegiat). Selle kohaselt on üks kindel fenotüüp parim ühtedes keskkonnatingimustes, teistsugune fenotüüp jälle teises. Bakteripopulatsioonis on igaks juhuks esindatud mõlemad, siis on kindel, et vähemalt mõned rakud omavad parimat võimalikku fenotüüpi (Ackermann, 2015; Healey, 2015). Samuti võib fenotüübiline heterogeensus bakteripopulatsioonile kasuks tulla arvestades n-ö tööjaotust. Üksikud rakud erinevate fenotüüpiliste omadustega saavad keskenduda kindlatele funktsioonidele ja käitumismustritele ning populatsioon tervikuna võidab sellest. Fenotüübiline heterogeensus on ka üks oluline osa bioloogilisest mitmekesisusest – see suureneb üksikute rakkude tasandil ning tagab erinevaid bakterirühmi, mis on erinevate funktsioonidega. Need molekulaarsed mehhanismid, mis fenotüübilisi erinevusi tekitavad, ei vaja tavaliselt ümbritsevast keskkonnast signaale ega ka geneetilisi ümberkorraldusi (Ackermann, 2015).

Fenotüübiline heterogeensus tuleneb individuaalsete geenide heterogeensest ekspressioonist. See leiab aset homogeensetes kasvutingimustes ning tekkivad geeniekspressiooni erinevused ei ole seotud muutustega genoomis. Näiteks eukarüootides on üheks heterogeensususe allikaks kõikuvad heterokromatiini piirid. Need geenid, mis on heterokromatiiniga külgnevatel aladel, võivad olla ühtedes rakkudes aktiivsed, aga teistes transkriptsiooniliselt vaigistatud ja see võib viia erinevate subpopulatsioonide tekkeni (Žgur-Bertok, 2007; Sumner ja Avery, 2002). Prokarüootides on heterogeensus tingitud enamasti “mürast”, mis kujutab endast juhuslikke kõikumisi valkude sünteesis ja degradeerimises. On kahte tüüpi müra: ühel juhul toimub

juhuslik promootori aktiivsuse järsk tõus ning teisel juhul pole jagunevas populatsioonis rakkude elutsüklid sünkroonis ning seega valkude aktiivsus geeniekspressiooni reguleerimisel erineb. Selle tagajärjel tekivad erinevad alampopulatsioonid (Žgur-Bertok, 2007). Esimesena näidati müra põhjustatud fenotüübilist heterogeensust geneetiliselt identsete rakkude vahel, tehes kaitseid *E. coli*'ga. Kaks geneetilist elementi viidi *E. coli* kromosoomi, millest üks kodeeris tsüaansinist fluorestseeruvat valku ja teine kollast fluorestseeruvat valku. Mõlema elemendi reportergeen oli laktoosi promootori kontrolli all ning eeldati, et kõik rakud ekspresseerivad võrdsel hulgal LacI valku. Tulemuseks saadi erineval hulgal produkti, mida põhjustas geeniekspressiooni kõikumine ja seda müra oli võimalik ka kvantiseerida (Elowitz *et al.*, 2012).

E. coli puhul väljendub fenotüübiline heterogeensus ka persisterite kujul, mida on võimalik detekteerida pärast antibiootikumitöötlust. Üldiselt kiiresti kasvavas populatsioonis on persisterid rakud, mis kasvavad väga aeglaselt või üldse mitte. Persisterite aeglane või olematu kasvukiirus annab eelise antud tingimustes, nagu antibiootikumitöötlus, ellu jääda. Lisaks on uuringud *E. coli*'ga näidanud, et fenotüübilist heterogeensust põhjustab ka metaboolne üleminek sekundaarsetele süsinikuallikatele. Osa rakke lülituvad ümber kiiresti, osade jagunemine aga peatub, sest nad pole võimelised oma katabolismi ümber lülitama (Kotte *et al.*, 2014; Amato *et al.*, 2014).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Meie laboris on välja töötatud läbivoolutsütomeetriameetod, mis võimaldab uurida erinevate bakteripopulatsioonide teket statsionaarses faasis (Roostalu *et al.*, 2008; Jõers ja Tenson, 2016). Varasema töö käigus on seda meetodit kasutades leitud, et LB söötmes kasvanud bakterite statsionaarses faasis toimub osade rakkude taasjagunemine (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Seega on geneetiliselt identses ja homogeenses keskkonnas kasvanud populatsioonis märgata fenotüübilist heterogeensust, kus üks osa populatsioonist on soikeseisundis, teine aga kasvab ja jaguneb.

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata, kas taasjagunevate rakkude kasvueelise teiste ees on põhjustatud genotüübilisest või fenotüübilisest muutusest. Selleks kõigepealt märgistati erinevad alampopulatsioonid fluorestseeruvate valkudega GFP ja Crimson. Seejärel eraldati erinevad alampopulatsioonid (uinunud, metaboolselt aktiveerunud ning jagunenud) kasutades rakusorteri. Nende sortitud populatsioonidega teostati konkurentsikatsed nii 1 päeva kui ka 5 päeva vanuste sortimata kultuuridega, et teha kindlaks, kas mõni neist subpopulatsioonidest on omandanud mutatsioone, mis annavad kasvueelise või on tegu pöörduva fenotüübilise muutusega.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Bakteritüved, söötmed ja plasmiidid

Katsete läbiviimiseks kasutati kahte *E. coli* tüve BW25113 (genotüübiga F^- , $\Delta(\text{araDaraB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$, λ^- , *rph-1*, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, *hsdR514*), millest üks oli nalidiksiin- ja teine rifampitsiin-resistentne. Mõlemad variandid olid saadud spontaanse resistentsuse tekke tulemusena. Antud tüvedesse viidi transformatsiooni teel plasmiidid pET-gfpAGGAGG (3) (edaspidi lühidalt pET-gfp(3)) ning pBAD-Crimson. Esimene neist sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeni ja IPTG'ga indutseeritava *tac*-promootori all olevat GFP geeni. Teine plasmiid sisaldab klooramfenikooli resistentsusgeeni ning arabinoosiga indutseeritavat pBAD-promootori all olevat Crimson geeni. GFP on roheliselt fluorestseeruv valk ning Crimson punaselt fluorestseeruv valk (Strack *et al.*, 2009). Plasmiidid eraldati *E. coli* tüvest DH5 α (genotüübiga F^- , $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_K^- , m_K^+), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).

Bakteritüve ja plasmiidide selektsiooniks kasutati järgmisi antibiootikume: kanamütsiin (25 $\mu\text{g/ml}$), klooramfenikool (25 $\mu\text{g/ml}$), nalidiksiin (20 $\mu\text{g/ml}$), rifampitsiin (100 $\mu\text{g/ml}$). Söötmena kasutati kogu töö vältel LB (BDTM DifcoTM, 240230) vedel- või tardsöödet vajalike antibiootikumidega.

Baktereid kasvatati alati 37 °C juures kas inkubatsioonikapis või Sanyo loksutil kiiruse 220 rpm juures.

2.2.2 Plasmiidide eraldamine, bakterite transformeerimine ja säilituskultuuri tegemine

Plasmiidide eraldamiseks inokuleeriti DH5 α + pET-gfp(3) ja DH5 α + pBAD-Crimson LB vedelsöötmesse (10 ml), kuhu oli lisatud vastavalt kanamütsiin või klooramfenikool lõppkontsentratsiooniga 25 $\mu\text{g/ml}$. Kasvatati üleöö 37°C juures loksutil. Järgnevalt eraldati plasmiidid Favorgen komplektiga vastavalt tootja protokollile.

Bakterite kompetentseteks muutmiseks inokuleeriti värskest üleöö kolooniast tüved BW25113 Nal ja BW25113 Rif kasvama LB vedelsöötmesse (3ml) umbes 2 tunniks. Seejärel võeti 1 ml kultuurist 1,5 ml mikrotuubi ning jahutati jääl. Järgnevalt tsentrifugiti bakterid 5 minutit 2500 g juures masinas Eppendorf 5415 R tsentrifuugis rootoriga F45-24-11 temperatuuril 4°C. Eemaldati supernatant ning lisati 1 ml 100 mM CaCl₂ lahust. Bakterid tsentrifugiti uuesti samadel tingimustel. Eemaldati supernatant ja bakterid suspendeeriti 100 µl 100 mM CaCl₂ lahuses. Seejärel hoiti suspensiooni vähemalt 20 minutit jääl.

Bakterite transformeerimiseks lisati jääl hoitud suspensioonile 2 µl pET-gfp(3) lahust ning 2 µl pBAD-Crimson lahust. Segati ettevaatlikult ja hoiti 15 minutit jääl. Järgnevalt hoiti segusid 45 sekundit 37°C juures termostaadis Biosan CH-100 ning siis uuesti 2 minutit jääl. Lisati 0,9 ml LB söödet ja inkubeeriti 45 minutit 37°C juures termostaadis. Seejärel külvati segudest 100 µl kanamütsiini ja klooramfenikooli agari tassile ning kasvatati üleöö 37°C juures. 24 tunni möödudes pandi 1 koloonia tassilt 2-3 tunniks kasvama 3 ml LB söötmesse, kuhu oli lisatud kanamütsiini ja klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml. Säilituskultuuri tegemiseks lisati 750 µl kultuurile lisati krüotuubis 250 µl 60% glütserooli ning säilitati edaspidi temperatuuril -70°C.

2.2.3 Kasvava populatsiooni tekke jälgimine statsionaarses faasis

Transformeeritud bakterid kasvatati LB vedelsöötmes kaks päeva 37°C juures loksutil. Tehti kaks kultuuri: 3 ml ilma arabinoosita ning 2 ml, kuhu lisati arabinoosi lõppkontsentratsiooniga 1 mM. Mõlemale kultuurile lisati kanamütsiini ja klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml. Pärast kahte päeva toimus söötmevahetus, selleks tsentrifugiti baktiereid masinas ScanSpeed mini rootoriga GRF-m2.0-12 1 minut täispöoretel. Arabinoosiga rakkudelt eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti ilma arabinoosita rakkudelt eemaldatud 2 ml söötmes, mis oli steriliseeritud filtreerimisega läbi 0,22 µm filtri. Koheselt lisati 1 mM IPTG'd. Seejärel võeti proove voolutsütomeetri jaoks. Esimene proov võeti kohe pärast söötmevahetust, järgnevad proovid võeti iga päev, kokku 5 päeva. Selleks pandi kultuur mikrotuubi võrdses mahus 30% glütserooli lahusega PBS'is ning säilitati temperatuuril -70°C kuni analüüsini voolutsütomeetris.

2.2.4 Lävivoolutsütomeetria

Kasvava populatiooni tuvastamiseks ning bakterite ühe raku tasemel analüüsimiseks kasutati lävivoolutsütomeetria meetodit analüsaatoris BD LSRII. Säilitatud proovid lahjendati PBS'is (5 µl proovi 500 µl PBS'i kohta) ning kasutati tuubist lugemist. Saadud andmete analüüsimiseks kasutati programmi FlowJo 7.5 (Treestar, Inc.), kus mõõdeti GFP ja Crimson signaali tugevusi.

Subpopulatsioonide füüsiliseks eraldamiseks kasutati rakusorteri BD FACSAria. Sortimiseks kasutati 5. päeva proove, mis lahjendati PBS'is (30 µl proovi 3 ml PBS'i kohta) ning sorditi tuubi. Eraldati 3 erinevat alampopulatsiooni – uinunud, ärganud ja jagunevad. Seejärel külvati igast sorditud alampopulatsioonist 100 µl kanamütsiini ja klooramfenikooli agari tassile ning kasvatati üleöö 37°C juures. Järgmisel päeval pandi igalt tassilt 5 kolooniat eraldi kasvama 3 ml LB söötmesse, kuhu oli lisatud kanamütsiini ja klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml. 2-3 tunni möödudes tehti igast kloonist säilituskultuur ja hoiustati -70 kraadi juures.

2.2.5 Konkurentsikatse

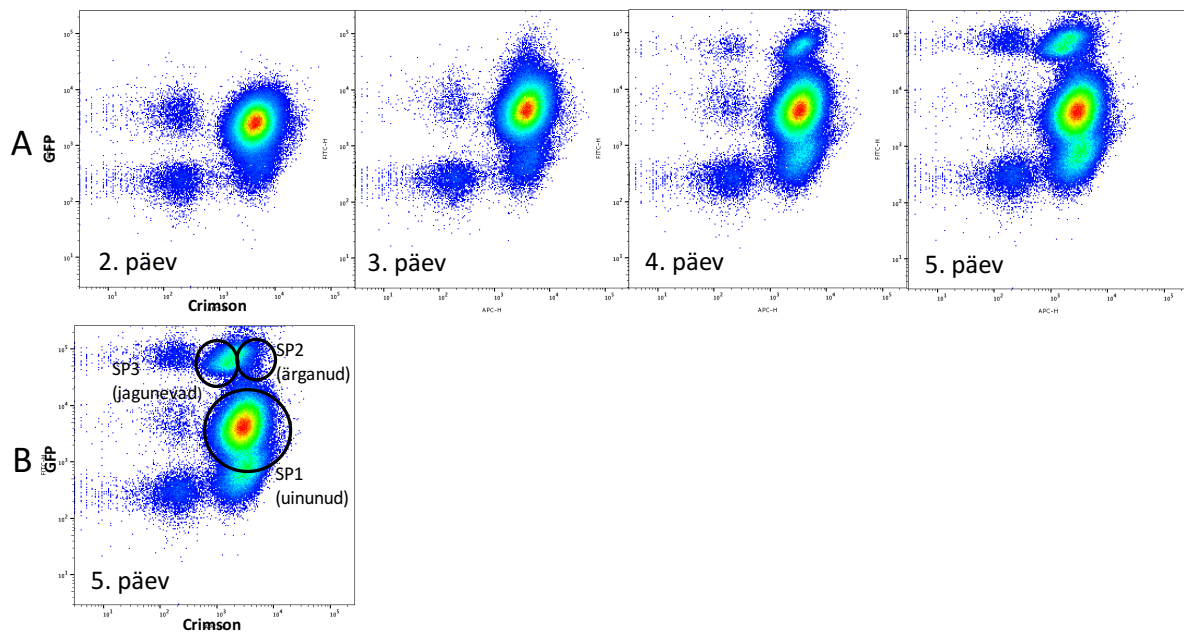
Selgitamaks välja, kas mõnel eraldatud populatsioonil on teiste ees kasvueelne, teostati konkurentsikatse, kus segati kokku kahe erineva klooni rakud. Erinevaid kloone eristati nalidiksiini ja rifampitsiini resistentsuse järgi - nalidiksiin-resistentne kloon segati kokku rifampitsiin-resistentse klooniga. Võrdses mahus kokku segatud kultuurid (1,5 ml + 1,5 ml) pandi 37 kraadi loksutisse kasvama. Kumbagi klooni arvukust segus mõõdeti koloonia moodustamise võime järgi (CFU/ml). Lahjendusread teostati mikrotiiterplaadil, kuhu tehti 8 10-kordset lahjendust PBS'is. Igast lahjendusreast külvati 5 µl kultuuri nii nalidiksiini agari tassile kui ka rifampitsiini agari tassile ja kasvatati üleöö 37°C juures. Järgmisel päeval loeti kolooniad lahjendustest, kus kolooniad olid eristatavad. Lahjendusread tehti kohe pärast kokkusegamist ning 2., 4., 6. ja mõnel korral ka 7. päeval, misjärel arvutati bakterite arvukus CFU/ml kohta.

2.3 Tulemused

2.3.1 Jagunemine statsionaarses faasis esineb ka antibiootikumiresistentsetel *E. coli* tüvedel

Esmalt kontrolliti, kas wt *E. coli* (BW25113) tüvel esinev statsionaarses faasis tekkinud fenotüübiline heterogeensus esineb ka selle tüve Rif ja Nal resistentsetel derivaatidel. Selleks kasutati rakke, milles olid plasmiidid GFP ja Crimsoni induktsiooniks. Statsionaarsesse faasi jõudnud rakud, mis on kasvanud arabinoosi juuresolekul, ekspresseerivad Crimsonit, kuid mitte GFP'd. Söötmevahetuse käigus eemaldati arabinoos ja lisati IPTG, mis indutseerib GFP ekspressiooni. Uuesti metaboolselt aktiveerunud rakud hakkavad ekspresseerima GFP'd ja jagunevates rakkudes väheneb Crimsoni sisaldus lahjenemise tõttu.

Jooniselt 1A on näha esimesi GFP-positiivseid rakke 4. päeval ja 5. päeval on eristatavad ka jagunenud rakud. Seega käituvad Nal- ja Rif-resistentsed BW25113 tüved sarnaselt ematüvele.



Joonis 1.

(A) GFP ja Crimsoni ekspressiooni jälgimine läbivoolutsütomeetria abil statsionaarse faasi Nal- ja Rif-resistentsete BW25113 tüvede rakkudel. X-telje väärtused näitavad Crimsoni signaali tugevust ning Y-telje väärtused GFP signaali tugevust. Esimesed GFP-positiivsed ehk metaboolselt aktiveerunud rakud ilmnevad alates 4. päevast ning erinevad subpopulatsioonid on eristatavad alates 5. päevast. Mõlema tüve puhul olid tulemused samaväärsed. Pseudovärvid märgivad rakkude esinemissagedust.

(B) Nal- ja Rif-resistentsete BW25113 tüvede 5. päeva kultuur, kus on eristatavad 3 erinevat subpopulatsiooni. Uinunud (SP1) rakud ekspresseerivad Crimsonit, kuid mitte GFP'd. Ärganud (SP2) ehk uuesti metaboolselt aktiveerunud rakud hakkavad ekspresseerima GFP'd ja jagunevates (SP3) rakkudes väheneb Crimsoni sisaldus lahjenemise tõttu.

Edasiseks tööks sorditi nii Nal kui Rif-resistentsetest tüvedest 3 erinevat alampopulatsiooni - uinunud, ärganud ja jagunevad (joonis 1B). Sorditud rakud külvati LB Rif/Nal tassile ja üleskasvanud kolooniatest tehti säilituskultuurid.

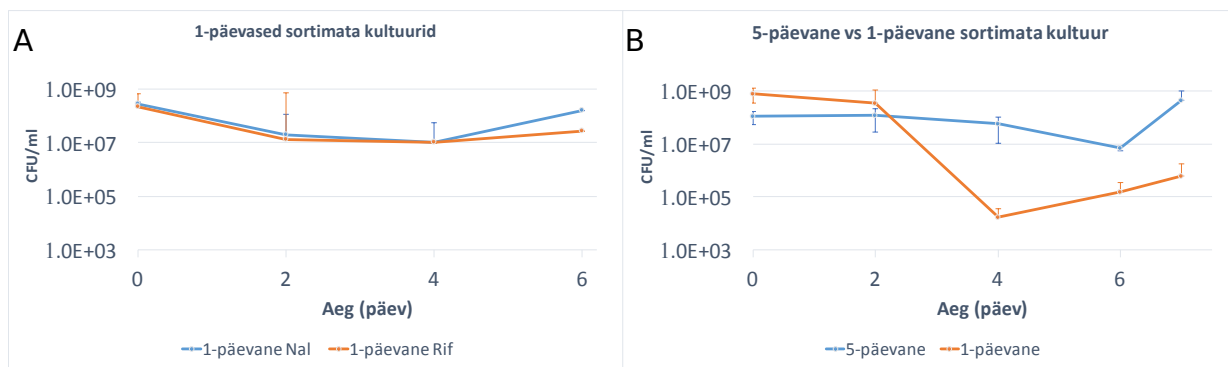
2.3.2 5 päeva vanune kultuur tõrjub 1 päeva vanuse välja

Selgitamaks välja, kas pikaajalise statsionaarse faasi rakkudele omane nähtus, kus vanemad rakud tõrjuvad välja nooremate kultuuride rakke (Zinser ja Kolter, 2004), esineb ka Nal ja Rif

resistentsetel BW25113 tüvedel, teostati konkurentsikatse sortimata 5-päevaste ja 1-päevaste kultuuridega (joonis 2B). Kokku segati võrdses mahus 5-päevane ja 1-päevane kultuur. Eristamaks tüvesid, segati kokku 5-päevane Nal-resistentne tüvi ja 1-päevane Rif-resistentne tüvi ning vastupidi. Seejärel jälgiti kultuuride arvukuse muutust 6-7 päeva jooksul. Bakterite arvukuse arvutamisel (CFU/ml) kasutati mõõdetud väärtusi mõlemast katseformaadist (5-päevane Nal/1-päevane Rif ning 5-päevane Rif/1-päevane Nal). Joonisel 2B toodud graafikult selgub, et 5-päevastel rakkudel on kasvueelis 1-päevaste ees ning nooremad rakud tõrjutakse välja.

Kontrollimaks, kas Nal- ja Rif-resistentsete tüvede elulemus on samaväärne, teostati katse 1-päevaste kultuuridega (joonis 2A), kus kokku segati võrdses mahus 1-päevane Nal-resistentne tüvi ja 1-päevane Rif-resistentne tüvi. Selgus, et mõlemad tüved on suhteliselt võrdse elulemusega, alles 6. päeval ilmneb väike Nal-resistentse tüve ülekaal.

Kõikidel joonistel on välja toodud katsete keskmised koos standardhälvetega. Mõnel juhul on standardhälvete väärtus suurem põhjustatuna arvukuse absoluutarvude erinevusest erinevates katsetes ja sellisel juhul on iga katse graafik ka eraldi välja toodud lisades (lisa 1 ja 2).



Joonis 2.

(A) Nal- ja Rif-resistentsete BW25113 tüvede 1 päeva vanuste kultuuride kasvukõver koos standardhälvetega. Katse eesmärk oli välja selgitada, kas erineva resistentsusega tüvedel võib kasv erineda. Kokku segati võrdses mahus Nal-resistentne ja Rif-resistentne tüvi ja jälgiti arvukuse muutust CFU/ml kohta 6 päeva jooksul. Alates 6. päevast ilmneb väike Nal-resistentse tüve ülekaal, kuid üldiselt on mõlemad tüved samaväärse elulemusega. Antud katse viidi läbi kolmes korduses.

(B) Konkurentsikatse sortimata 5-päevaste ja 1-päevaste kultuuridega. Välja on toodud kolme sõltumatu katse (vt. Lisa 1) tulemuste keskmine koos standardhälvetega. Kokku segati võrdses mahus 1 päeva vanune ja 5 päeva vanune sortimata kultuur. Jooniselt on näha, et kui algselt oli kokku segatud kultuuris 1 päeva vanuseid rakke rohkem, siis aja jooksul ületab 5 päeva vanune kultuur nooremat ja omab selget kasvueelist.

Antud katsetega 5-päevaste ja 1-päevaste sortimata Nal- ja Rif-resistentsete BW25113 tüvedega kinnitati, et 5 päeva vanune kultuur tõrjub 1 päeva vanuse kultuuri välja ning seega omab kasvueelist noorema kultuuri ees.

2.3.3 Sorditud kloonidel kasvueelist ei esine

Eelnevas katses tehti kindlaks, et 5-päevane kultuur kasvab üle noorema kultuuri. Järgnevalt taheti välja selgitada, kas ka mõnel subpopulatsioonil, mis on eraldatud 5 päeva vanusest kultuurist, võib olla tekkinud püsiv kasvueelist nooremate kultuuride ees. Selline püsiv kasvueelist, mis on säilinud läbi sortimise ja uue kasvufaasi, viitab tekkinud mutatsioonile. Teostati konkurentsikatsed kasutades sorditud Nal ja Rif tüvede subpopulatsioone ning selleks pandi kõik sorditud subpopulatsioonid võistlema 1 päeva sortimata kultuuriga. Kultuurid segati

kokku võrdses mahus ning eristamiseks tüvesid, segati kokku 1-päevane sortitud Nal-resistentne tüvi ja 1-päevane sortimata Rif-resistentne tüvi ning vastupidi. Seejärel jälgiti kultuuride arvukuse muutust 6-7 päeva jooksul. Bakterite arvukuse arvutamisel CFU/ml kohta võeti keskmine mõlemast tüvest. Joonistel 3 ja 4 on märgitud uinunud subpopulatsioon kui SP1, ärganud kui SP2 ja jagunenud kui SP3 (joonis 1B). Katsed tehti 4 erineva subpopulatsiooni klooniga (2 erineva Nal-resistentse ning 2 erineva Rif-resistentse klooniga).

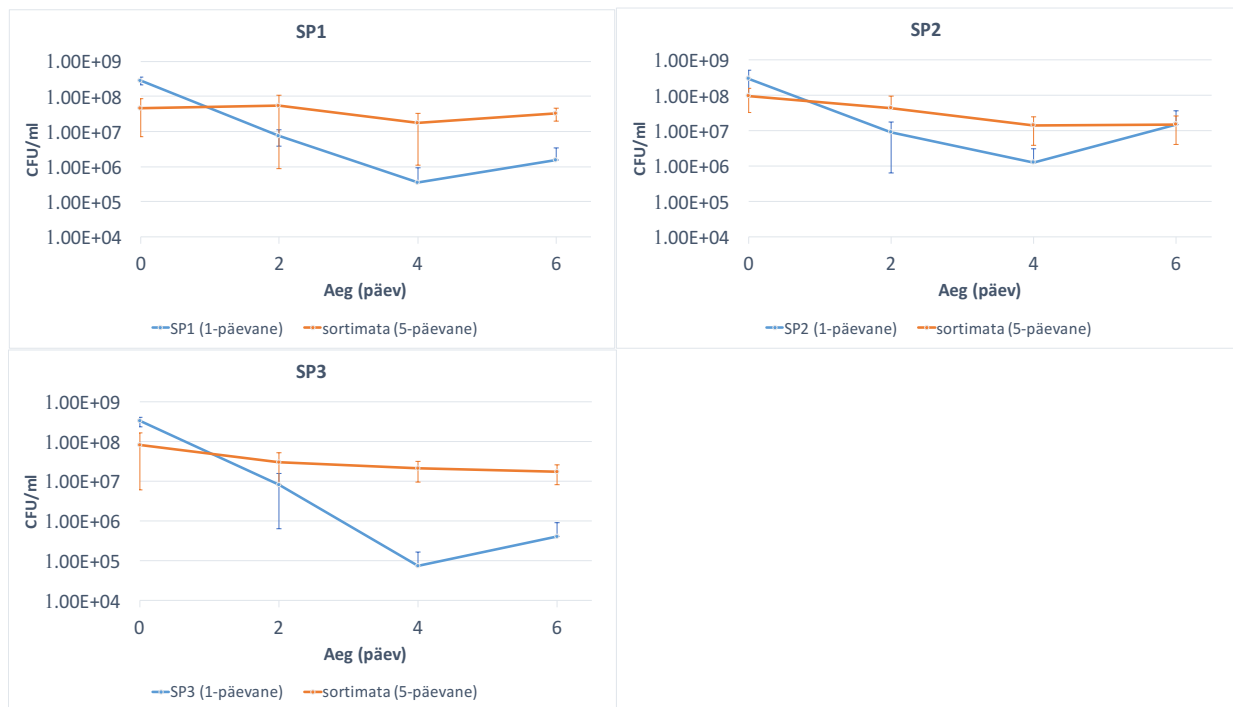
Joonisel 3 olevad tulemused näitavad, et mitte ühelgi 1-päevasel sortitud subpopulatsioonil ei esine kasvueelset samavärsust sortimata tüve ees. Seega käituvad kõik sortitud kloonid kui 1-päevased kultuurid.



Joonis 3. Konkurentsikatsed 1-päevaste uinunud (SP1), ärganud (SP2) või jagunenud (SP3) subpopulatsioonidega ning 1-päevase sortimata tüvega. Kõikide graafikute puhul on välja toodud nelja sõltumatu katse tulemused ning nende katsete keskmised koos standardhälvetega. Kokku segati võrdses mahus 1 päeva vanune sortitud ja 1 päeva vanune sortimata kultuur. Graafikutelt ilmneb, et mitte ühelgi kultuuril - ei sortitud ega ka sortimata - ei ole kasvueelset teise ees.

2.3.4 5 päeva vanune kultuur tõrjub sorditud kultuurid välja

Eelnevad katsed viitavad sellele, et mitte ühelgi subpopulatsioonil ei esine mutatsioonist tingitud kasvueelist, mis oleks jäänud alles ka pärast sortimist ning uuesti kasvatamist. Kinnitamaks, et kõik sorditud subpopulatsioonid käituvad kui 1 päeva vanused kultuurid, teostati konkurentsikatse, kus pandi omavahel võistlema 1 päeva vanused sorditud subpopulatsioonid ning 5 päeva vanused sortimata kultuurid (joonis 4). Eeldati, et 5-päevased kultuurid omavad 1-päevaste sorditud kultuuride ees kasvueelist. Katsete ülesehitus oli analoogne eelnevatele ning järgnevad katsed tehti samade subpopulatsiooni kloonidega, mida kasutati ka eelmistes katsetes.



Joonis 4. Konkurentsikatseid 1-päevaste uinunud (SP1), ärganud (SP2) või jagunenud (SP3) subpopulatsioonidega ning 5-päevase sortimata tüvega. Kõikidel graafikutel on välja on toodud nelja sõltumatu katse (vt. Lisa 2) keskmised koos standardhälvetega. Kokku segati võrdses mahus 1 päeva vanune sorditud subpopulatsiooni kultuur ja 5 päeva vanune sortimata kultuur. Graafikutelt on näha, et aja jooksul ületab 5 päeva vanuse sortimata kultuuri arvukus nooremat sorditud kultuuri ja seega omab kasvueelist.

Nendest katsetest selgus, et kõigi sorditud subpopulatsioonide kloonid käituvad kui 1 päeva vanused kultuurid ning ei oma kasvueelist sortimata kultuuri ees.

2.4 Arutelu

E. coli BW25113 tüvedel on statsionaarses faasis kirjeldatud fenotüübilist heterogeensust homogeenses keskkonnas kasvanud ja geneetiliselt identses populatsioonis, kus üks osa populatsioonist on soikeseisundis, teine aga kasvab ja jaguneb. Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata, kas nendel tüvedel esinev kasvavate ja taasjagunevate rakkude kasvueelise teiste ees on põhjustatud genotüübilisest või fenotüübilisest muutusest. Selleks kõigepealt märgistati erinevad subpopulatsioonid fluorestseerivate valkudega GFP ja Crimson, eraldati erinevad subpopulatsioonid (uinunud, metaboolselt aktiveerunud ning jagunenud) ning nende sorditud populatsioonidega teostati konkurentsikatsed nii 1 päeva kui ka 5 päeva vanuste sortimata kultuuridega. Nii saab teha kindlaks, kas mõni neist subpopulatsioonidest on omandanud mutatsioone, mis annavad kasvueelise või on tegu pöörduva fenotüübilise muutusega. Tulemustest selgus, et mitte ühelgi sorditud alampopulatsioonidest kasvueelise püsima ei jää.

Genotüübilist ja fenotüübilist muutust saab eristada selle järgi, kas vaadeldav omadus on püsiv või ajutine. Kui tegu on genotüübilise muutusega, mida põhjustab mutatsioon genoomis, pärandub see edasi ka järgnevatele põlvkondadele ning ei kao pärast uuesti üles kasvatamist. Fenotüübilised muutused aga ei vaja geneetilisi ümberkorraldusi ja need tulenevad enamasti geenide heterogeensusest ekspressioonist, mis võivad anda teatud eelise stressitingimuste üleelamiseks (Sumner ja Avery, 2002). Sellisel juhul on vaadeldav omadus pöörduv, mis tähendab, et see ei pärandu edasi ja ei püsi läbi uute kasvufaaside. Selles töös teostatud katsed näitasid, et statsionaarses faasis kasvavate ja taasjagunevate rakkude kasvueelise kaob pärast sortimist ja uuesti üles kasvatamist, millest saab järeldada, et tegu on fenotüübilise muutusega.

Varasema töö käigus meie laboris on leitud, et statsionaarses faasis toimuv osade rakkude taasjagunemine on kirjeldatav just LB söötmes (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Kuna suur osa GASP fenotüüpi kirjeldavatest katsetest on läbi viidud kasutades LB söödet (Farrell ja Finkel, 2003), siis võis algselt eeldada, et kasvueelise jagunevatel rakkudel võiks olla tingitud GASP mutatsioonidest. Varasemad katsed GASP mutatsioonide kirjeldamisel on näidanud, et praktiliselt kõik *E. coli* kultuurid, mis on LB-söötmes kasvanud, ekspresseerivad GASP fenotüüpi pärast 10 päeva kestnud inkubatsiooni. Rakud, mis on eraldatud varem kui 8-päevastest kultuuridest, ekspresseerisid GASP'i harva (Finkel, 2006). Käesolevas töös eraldati subpopulatsioonid 5 päeva vanustest kultuuridest, mis võib olla põhjuseks, miks ei ole taasjagunevate rakkude kasvueelise tingitud geneetiliselt mutatsioonist, vaid on pöörduv

fenotüübiline muutus – mutatsioonid pole jõudnud veel tekkida. On alust eeldada, et GASP mutatsioonid võivad välja kujuneda antud subpopulatsiooni rakkudel hiljem, s.t alates 10. päevast.

Huvitaval kombel ei esine erinevate subpopulatsioonide teket MOPS-põhistes minimaalsöötmetel (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Samuti ei teki minimaalsöötmetel GASP mutante, vähemalt mitte LB söötmega võrreldavas ajaskaalas (Finkel, 2006). See viitab võimalusele, et GASP mutatsioonide tekkimiseks on esmalt vajalik jaguneva subpopulatsiooni teke. Nii loob fenotüübiline heterogeensus eeldused geneetilise heterogeensuse tekkeks.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti *E. coli* BW25113 fenotüübilist heterogeensust, mis ilmneb LB söötmes kasvanud rakkudel statsionaarses faasis. Geneetiliselt identses ja homogeenses keskkonnas kasvanud populatsioonis on märgata fenotüübilist heterogeensust, kus üks osa populatsioonist on soikeseisundis, teine aga kasvab ja jaguneb. Töö eesmärgiks oli määrata, kas taasjagunevate rakkude kasvueelise teiste ees on tingitud genotüübilisest või fenotüübilisest muutusest. Katseskeem nägi välja järgmine: jälgiti kasvava populatsiooni teket statsionaarses faasis, kus erinevad alampopulatsioonid märgiti fluorestseerivate valkudega GFP ja Crimson; eraldati erinevad alampopulatsioonid (uinunud, metaboolselt aktiveerunud ning jagunenud) kasutades rakusorteri; sorditud populatsioonidega teostati konkurentsikatsed nii 1 päeva kui ka 5 päeva vanuste sortimata kultuuridega. Tulemustest selgus, et mitte ühelgi subpopulatsioonil ei esine mutatsioonist tingitud kasvueelise, mis oleks jäänud alles ka pärast sortimist ning uuesti kasvatamist. Seega on statsionaarses faasis märgatav kasvavate ja taasjagunevate rakkude kasvueelise teiste ees tingitud fenotüübilisest muutusest.

Characterization of the intrapopulation heterogeneity of *Escherichia coli* in the stationary phase

Eliis Liske

Summary

The phenotype of a single microbial cell is determined by genes, the surrounding environment, and by several cellular mechanisms that cause phenotypic changes. Heterogeneity gives bacteria a different sensitivity to stressful conditions and may also give some benefit to overcoming these conditions. In this thesis, the phenotypic heterogeneity of *Escherichia coli* strain BW25113, which appears in stationary phase cells grown in LB medium, was studied. There is a phenotypic heterogeneity in a population that has grown in a genetically identical and homogeneous environment, where one part of the population is dormant and the other is growing and dividing. The aim of this thesis was to determine whether the growth advantage of the dividing cells was due to a genotypic or a phenotypic change. The experimental work included monitoring the population in a stationary phase using flow cytometry, where different subpopulations were detected with fluorescent proteins GFP and Crimson. Then different subpopulations (dormant, metabolically activated and dividing) were isolated using cell sorter and competition experiments were carried out between these sorted populations and 1 day and 5 days old unsorted cultures. The results show that no subpopulation has a growth advantage due to a mutation, which would have remained even after sorting and re-cultivation. Thus, in the stationary phase, the growth advantage of growing and dividing cells is due to a phenotypic change.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 13: 497-508.

Amatto, S. M., Fazen, C. H., Henry, T. C., Mok, W. W. K., Orman, M. A., Sandvik, E. L., Volzing, K. G., Brynildsen, M. (2014). The role of metabolism on bacterial persistence. *Frontiers in Microbiology* 5: 70.

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

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: 4482–4492.

Dworkin, J. ja Shah, I. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature reviews. Microbiology* 8: 890–6.

Elowitz, M. B., Lavine A. J., Siggia, E. D., Swain P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297(5584): 1183-1186.

Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews. Microbiology* 1: 117–26.

Farrell, M. J., Finkel, S. E. (2003). The Growth Advantage in Stationary-Phase Phenotype Conferred by *rpoS* Mutations Is Dependent on the pH and Nutrient Environment. *Journal of Bacteriology* 185(24): 7044-7052.

Finkel, S.E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature reviews. Microbiology* 4: 113–120.

Healey, D. W. (2015). Phenotypic heterogeneity and evolutionary games in microbial populations. Doctoral dissertation. Massachusetts Institute of Technology.

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

Jöers, A., Tenson, T. (2016). Growth resumption from stationary phase reveals memory in *Escherichia coli* cultures. *Scientific Reports* 6: 24055.

Kotte, O., Volkmer, B., Radzikowski J. L., Heinemann, M. (2014). Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism. *Molecular Systems Biology* 10: 736.

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.

Navarro Llorens, J., Tormo, A. ja Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gramnegative bacteria. *FEMS microbiology reviews* 34: 476–95.

Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., ... Hinton, J.C.D. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology* 194(3): 686-701.

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

Sánchez-Romero M. A., Casadesús J. (2014). Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(1): 355-360.

Schultz D., Kishony R. (2013). Optimization and control in bacterial Lag phase. *BMC Biology* 11: 120.

Strack, R. L., Hein, B., Bhattacharyya, D., Hell, S. W., Keenan, R. J., Glick, B. S. (2009). A Rapidly Maturing Far-Red Derivative of DsRed-Express2 for Whole-Cell Labeling. *Biochemistry* 48(35): 8279-8281.

Sumner E. R., Avery S.V. (2002). Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 148(2): 345-351.

Tani T.H., Khodursky A., Blumenthal R.M., Brown P.O., Matthews R.G. (2002). Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21): 13471–13476.

Zambrano, M. M., Siegele, D. A., Almirón, M., Tormo, A., Kolter, R. (1993). Microbial competition: *E. coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* 259(5102): 1757–1760.

Zinser E. R., Kolter R. K. (2004). *E. coli* evolution during stationary phase. *Research in Microbiology* 155(5): 328–336.

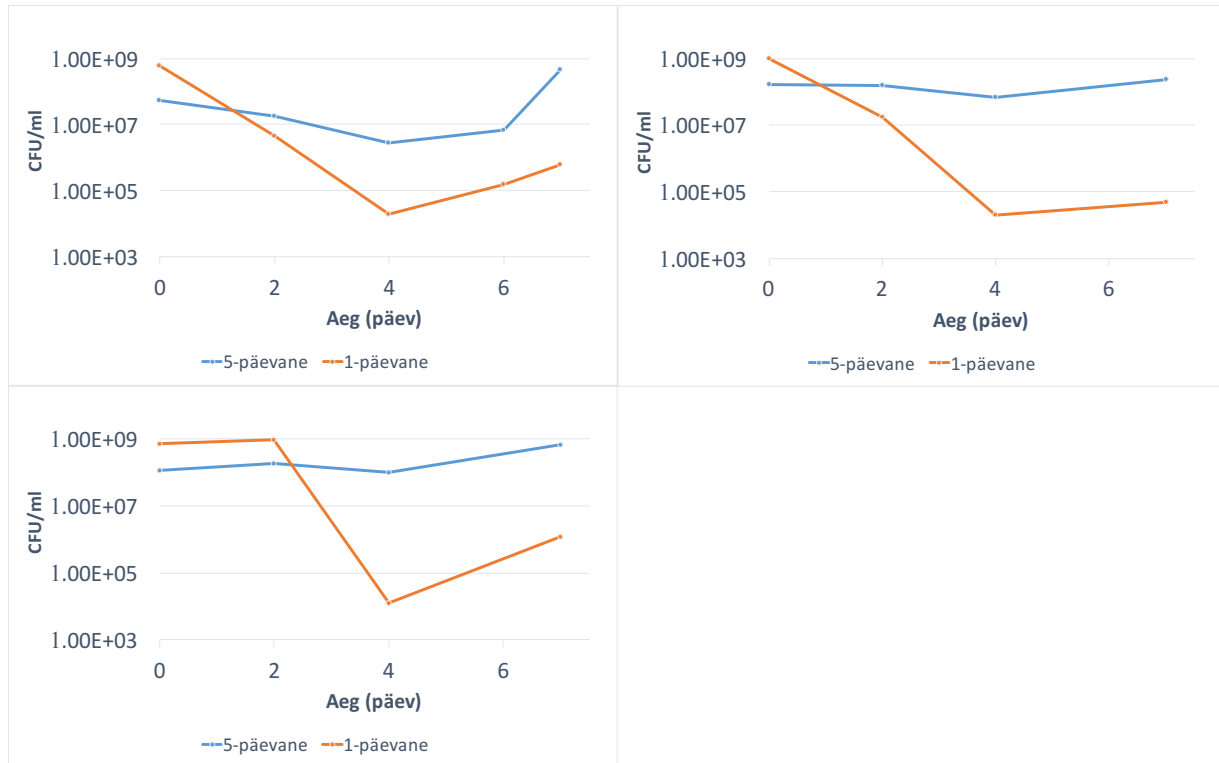
Zinser E. R., Kolter R. (1999). Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *Journal of Bacteriology* 181(18): 5800-5807.

Zinser E. R., Schneider D., Blot M., Kolter R. (2003). Bacterial evolution through the selective loss of beneficial genes. Trade-offs in expression involving two loci. *Genetics* 164(4): 1271–1277.

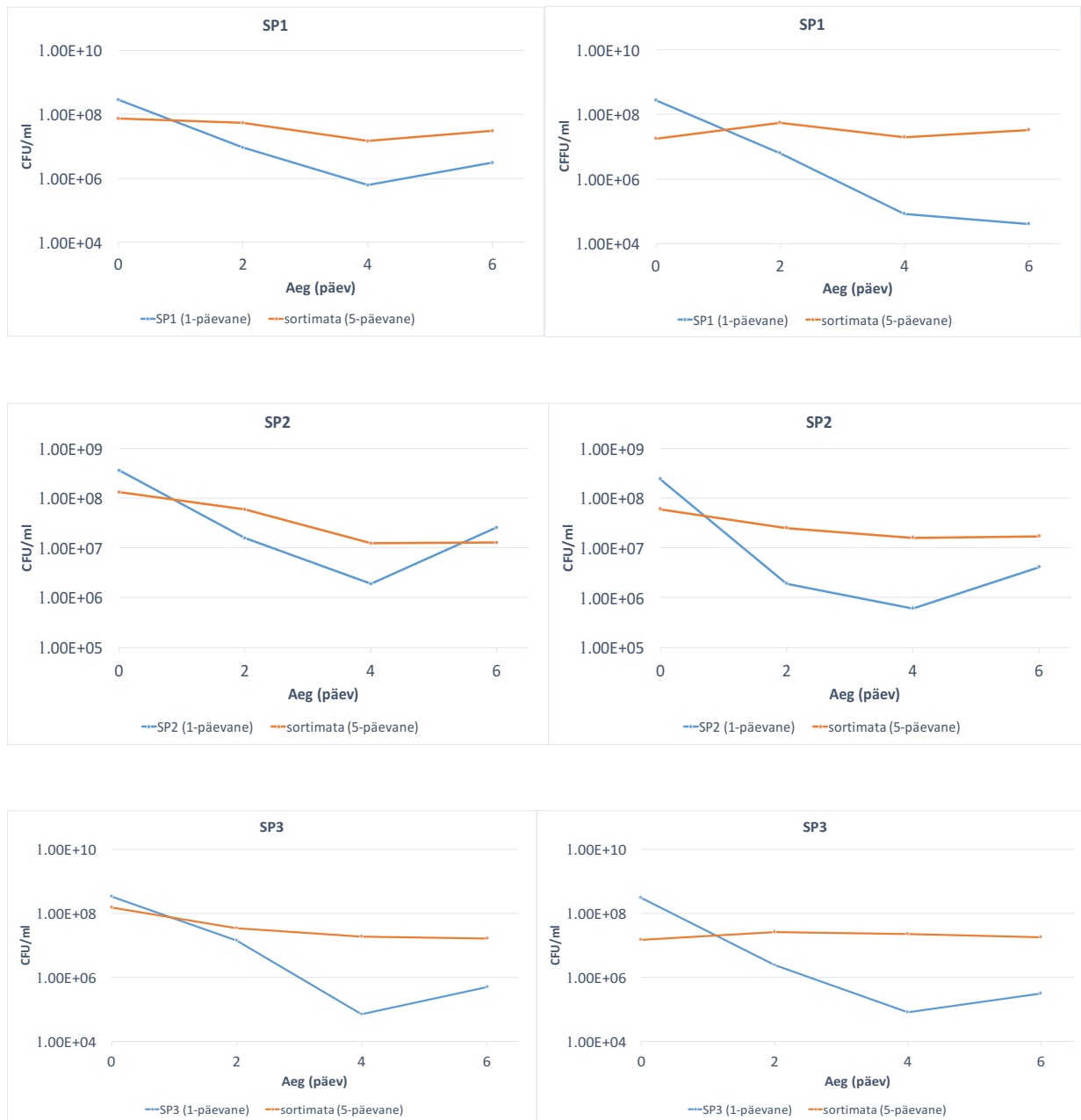
Žgur-Bertok, D. (2007). Phenotypic heterogeneity in bacterial populations. *Acta agriculturae Slovenica* 90: 17-24.

LISAD

Lisa 1. Konkurentsikatsed sortimata 5-päevaste ja 1-päevaste kultuuridega.



Lisa 2. Konkurentsikatsed 1-päevaste uinunud (SP1), ärganud (SP2) või jagunenud (SP3) subpopulatsioonidega ning 5-päevase sortimata tüvega.



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

Escherichia coli statsionaarses faasis tekkiva populatsioonisisese heterogeensuse iseloomustus,

mille juhendajaks on Arvi Jõers,

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 28. mail 2018