

TARTU ÜLIKOOL  
Bioloogia-geograafiateaduskond  
Molekulaar- ja rakubioloogia instituut  
Molekulaarbioloogia õppetool

Johanna Roostalu

**FENOTÜÜBILINE VARIEERUVUS  
*ESCHERICHIA COLI*  
STATSIONAARSE FAASI POPULATSIOONIDES**

Magistritöö

Juhendajad: Tanel Tenson, *PhD*  
Arvi Jõers, *PhD*  
Prof. Jaanus Remme, *PhD*

Tartu 2006

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Bakterite strateegiad heitlike keskkonnatingimustega kohanemiseks.....	7
1.2. Fenotüübilise varieeruvuse tekkepõhjused .....	9
1.2.1. Geeniekspressioonile kui protsessile omane varieeruvus .....	9
1.2.2. Regulatsiooniskeemi iseärasustest tulenev fenotüübiline varieeruvus .....	12
1.2.3. Fenotüübilise varieeruvuse head ja vead .....	14
1.3. Fenotüübiline varieeruvus morfoloogiliselt ühetaoliste bakterite kultuurides.....	15
1.3.1. Varieeruvus geeniekspressiooni tasemel .....	15
1.3.2. Rakkude kasvu ja jagunemisvõimet iseloomustavate parameetrite varieeruvus.....	18
1.3.2.1. Persistorid.....	18
1.3.2.2. VBNC fenotüüp .....	22
2. TÖÖ EESMÄRGID .....	25
3. MATERJALID JA METOODIKA .....	26
3.1. Bakteritüved, söötmed, plasmiidid.....	26
3.2. Plasmiidide konstrueerimine .....	28
3.2.1. PCR.....	28
3.2.2. Kloneerimine .....	29
3.2.3. Transformatsioon.....	29
3.3. Läbivoolutsütomeetria .....	29
3.3.1. Jagunemisvõimeliste rakkude hulga hindamine bakteripopulatsioonis GFP signaali nõrgenemise alusel .....	29
3.3.2. Bakterite membraanipotentsiaali olemasolu määramine .....	30
3.3.3. Stressivastuses osalevate geenide ekspressioonimäära kindlaks tegemine...	31
3.3.4. Uue või vana pooluse olemasolu mõju hindamine raku võimele statsionaarsest faasist toibuda .....	31
3.3.5. Bakterite üldise statsionaarse faasi geeniekspressioonivõime välja selgitamine .....	31
3.3.6. Bakteriraku üldise nukleiinhappe- ning valgusisalduse hindamine .....	32
3.4. Mikroskoopia .....	32
3.5. Bakterikultuuri fraktsioneerimine urograafias .....	32
4. TULEMUSED .....	33
4.1. Kõik rakud <i>E. coli</i> populatsioonis on ühesuguse jagunemisvõimega nii eksponentsiaalses faasis kui ka statsionaarses faasis .....	33
4.2. Statsionaarses faasis toimub <i>E. coli</i> populatsiooni eristumine kaheks erineva jagunemisvõimega alamhulgaks .....	36
4.3. Statsionaarsest faasist toibujate osakaal populatsioonis sõltub	

kasvukeskkonnast.....	38
4.4. Ei jagunev ega ka mittejagunev alampopulatsioon <i>E. coli</i> statsionaarsest faasist toibivas kultuuris ei sisalda surnud rakke.....	40
4.5. Bakteri stressivastuses osalevad geenid on ekspresseeritud kõikides statsionaarsesse faasi jõudnud rakkudes.....	42
4.6. Rakud, mis suudavad indutseerida statsionaarses faasis reportergeeni ekspressiooni, hakkavad pärast statsionaarset faasi kasvama.....	44
4.7. <i>E. coli</i> rakkude võime indutseerida statsionaarses faasis geeniekspressiooni sõltub kasvukeskkonnast .....	47
4.8. Jagunemisel vanema pooluse saanud tütararakud toibuvad statsionaarsest faasist kehvemini kui uute poolustega rakud.....	48
4.9. Erineva geeniekspressioonivõimega <i>E. coli</i> alamhulgad on mõneti eristunud ka üldise valgu- ning nukleiinhappesisalduse alusel, kuid sisaldavad nii uute kui vanade poolustega rakke .....	50
5. ARUTELU.....	53
KOKKUVÕTE .....	63
SUMMARY .....	65
KASUTATUD KIRJANDUS.....	67
TÄNUSÕNAD.....	75
LISA 1 .....	76
LISA 2 .....	77

## KASUTATUD LÜHENDID

AA – aminohapped (*amino acids*)  
Amp – amptsilliin (*ampicillin*)  
Cm – klooramfenikool (*chloramphenicol*)  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
FITC – fluorestseiniisotiotsüanaat (*fluorescein isothiocyanate*)  
GASP – kasvuleelis statsionaarses faasis (*growth advantage in stationary phase*)  
GFP – roheline fluorestseeruv valk (*green fluorescent protein*)  
Glu – glükoos (*glucose*)  
Gly – glütserool (*glycerol*)  
HSL – homoseriinlaktoon (*homoserinelactone*)  
IPTG – isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid (*isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*)  
Km – kanamütsiin (*kanamycin*)  
LB – *Luria-Bertani*  
MOPS – 3-N(morfoliino)propaansulfoonhape (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*)  
OD – optiline tihedus (*optical density*)  
PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)  
PGFP – pooluste tähistamiseks kasutatud GFP  
PI – propiidiumjodiid (*propidium iodide*)  
<sup>R</sup> – resistentus (*resistance*)  
SD – *Shine-Dalgarno*  
SDGFP – statsionaarse faasi geeniekspressiooni uurimiseks kasutatud GFP  
*S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*  
TA – toksiin-antitoksiin (*toxin-antitoxin*)  
Tet – tetratsükliin (*tetracycline*)  
VBNC – elus-aga-mittekultiveeritav (*viable but non-culturable*)  
YT – pärmri trüptoon (*yeast tryptone*)

## SISSEJUHATUS

Bakterite arvukus nende looduslikes elukeskkondades sõltub sellest, kui hästi või halvasti nad heitlikele oludele reageerida suudavad. Üheks mooduseks, mis vähemalt teoreetiliselt võimaldab bakteripopulatsioonidel väga erinevates stressiolukordades ellu jääda, on populatsioonisisene fenotüübiline varieeruvus. Tõik, et geneetiliselt identsetel bakterirakkudel on tõepoolest potentsiaal diferentseeruda väga erineva fenotüübiga rakkudeks, on pikka aega olnud teada sporuleeruvate bakterite näitel. Viimasel ajal ilmunud andmed viitavad sellele, et analoogiline füsioloogiline eristumine võib toimuda ka morfoloogiliselt ühetaoliste bakterite kultuurides. On näidatud, et bakteripopulatsioonid sisaldavad mitmete erinevate antibiootikumide toime suhtes tolerantseid rakke (Keren jt, 2004a). Lisaks sellele leidub populatsioonides baktereid, mis taluvad pikaajalist kuumutamist ja külmutamist (Johnston & Brown, 2002; Wong & Wang, 2004). Teadaolevalt on mõlemat tüüpi rakke avastatud ka patogeensete bakterite populatsioonides. Sellest tulenevalt on bakterite fenotüübilisi variante ja fenotüübilist varieeruvust kui nähtust seostatud mitmete krooniliste infektsioonide ning ka toidumürgistuste tekitamisega (Lewis, 2005; Oliver, 2005).

Eeltoodut arvesse võttes on fenotüübilise varieeruvuse uurimine oluline nii selle meditsiinilise tähtsuse tõttu kui ka bakterite füsioloogia üldise mõistmise seisukohalt. Kuna niisuguse nähtuse olemasolule on hakatud tähelepanu pöörama alles hiljaaegu, pole peale üksikute kirjeldavate näidete selle kohta siiski veel kuigi palju eksperimentaalseid andmeid. Vastuseta on väga paljud olulised küsimused alates fenotüübilise varieeruvuse ulatuslikkusest ja esinemisvormidest kuni selle nähtuse tekkepõhjuste ja tagajärgedeni.

Käesoleva magistr töö teoreetiline osa annab ülevaate bakteripopulatsioonide poolt kasutatavatest strateegiatest muutuvate keskkonnatingimustega kohastumisel, selgitades fenotüübilise varieeruvuse kui ühe võimaliku adapteerumismooduse tekkepõhjusti,

olemust ning olulisust. Nii bakteriraku enese seisukohalt kui ka meditsiinilisest aspektist lähtudes on bakterite kõige olulisemaks omaduseks võime jaguneda. Sel eeldusel seati töö eksperimentaalse osa eesmärgiks uurida *Escherichia coli* rakupopulatsiooni fenotüübilist varieeruvust just üksikute bakterite jagunemisvõime alusel.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Bakterite strateegiad heitlike keskkonnatingimustega kohanemiseks

Bakterite elukeskkond võib tihtipeale olla väga muutlik. Heitlike tingimustega kohanemiseks on bakteritel mitu võimalust. Üheks neist on muutuste tunnetamine mingite sensorsüsteemide abil ning seejärel saadud signaalide mõjul uutele tingimustele sobivalt reageerimine. Teadaolevalt ongi bakterites levinud kahekomponendilised signaalülekanesüsteemid, mille üks osapool tajub keskkonnas toimuvat ning mille teine osapool võimaldab – enamasti geeniekspressiooni aktiveerides – toimuvale ka adekvaatselt vastata (Robinson jt, 2000; Stock jt, 2000). Sõltuvalt olukorrast sünteesivad bakterirakud väga paljusid erinevaid kaitsevalke, et tulla toime kas toitainete puuduse, liiga madalate või kõrgete temperatuuride, reaktiivsete hapnikuosakeste ja veel paljude teiste ebameeldivustega (Wick & Egli, 2004). Sensorsete süsteemide abil reageerimine võib küll olla väga spetsiifiline ja efektiivne moodus kehvade oludega toimetulekuks, kuid sellel on ka oma hind. Selleks, et püsida elus, peab ainult sensorsete süsteemide toimimisest sõltuv bakterirakk keskkonna muutusi tunnetavaid komponente ekspresseerima pidevalt ja neid ka kogu aeg töös hoidma. See aga on rakule energeetiliselt küllaltki kulukas ning alandab kindlasti rakkude kasvukiirust. Juhul kui keskkonnamuutused on harvad, ei pruugi selline kulutus end ära tasuda (Kussell & Leibler, 2005). Mahajäämus kasvukiiruses võib looduslikes oludes, kus konkurents väheste kättesaadavate ressursside pärast on väga tihe, olla suureks puuduseks.

Teine võimalus heitlike keskkonnatingimustega kohanemiseks ning neis ellujäämiseks seisneb bakteripopulatsioonide iseloomulikus füsioloogilises heterogeensuses (Thattai & van Oudenaarden, 2004; Smits jt, 2006). Nimelt ei ole kõik rakud bakteripopulatsioonides sugugi mitte ühetaolised. Vastupidi, bakteripopulatsioonid

sisaldavad väga mitmete erinevate omadustega rakke. Eelkõige on kirjeldatud nähtuse juures oluline tõsiasi, et populatsiooni erinevad alamhulgad on juhuslikult adapteerunud mitmete väga erinevate keskkonnatingimustega. Sellest tulenevalt on üsna tõenäoline, et ka muutlikes oludes on mingi osa bakterirakkudest populatsioonis alati elujõulised (Kussell & Leibler, 2005).

Bakteripopulatsiooni füsioloogilise heterogeensuse põhjused võivad olla geneetilised. Bakterite liigisisene individuaalne varieeruvus tuleneb tihtipeale mutatsioonidest. Näiteks võivad bakterid geneetilise materjali ümberkorralduste mõjul omandada resistentsuse mõnede antibiootikumide suhtes (Lambert, 2005), kasutada mingeid toitaineid efektiivsemalt (Zinser & Kolter, 1999) ja suuta mingites spetsiifilistes keskkonnatingimustes paremini kasvada (Zambrano jt, 1993; Giraud jt, 2001a). Suur mutatsioonisagedus võib tagada üksikute bakterite kiire adapteerumise uue elukeskkonnaga ning olla lühiajaliselt ka populatsioonile kasulik. Pikemas perspektiivis võib see strateegia aga osutada hoopis kahjulikuks. Suure tõenäosusega on mutatsioonid neutraalsed või isegi letaalse toimega (Giraud jt, 2001a; Giraud jt, 2001b). Seetõttu on ka juhuslike mutatsioonide genereerimine populatsiooni jaoks üpris kulukas meetod muutuvates keskkonnatingimustes ellujäämiseks (Giraud jt, 2001b). Mutatsioonide teiseks miinuseks on nende lõplikkus. Mutantne bakter võib küll olla paremini kohastunud mingite kindlate keskkonnatingimustega, kuid olukorra muutudes eelis kaob. Veelgi enam, uutes oludes on mutant tõenäoliselt hoopis vähem elujõuline (Giraud jt, 2001a).

Geneetiliste ümberkorralduste tasemel on populatsioonisisese varieeruvuse genereerimisel teiseks mooduseks nn faasi varieeruvus (*phase variation*) (van der Woude & Baumler, 2004). Faasi varieeruvus tuleneb näiteks homoloogilisest rekombinatsioonist ja inversioonidest mingite geenide regulaatoralas ning selle tulemusena lülitatakse nende geenide ekspressioon kas sisse või välja. Võrreldes mutageneesiga on faasi varieeruvus märksa plastilisem meede ning mis kõige olulisem, see on ka pöörduv. Sõltuvalt keskkonnatingimustest muutub faasi vahetuse sagedus või siis ka suund. Faasi varieeruvust kasutavad paljud patogeensed bakterid oma virulentsusfaktorite ekspressiooni sisse- ja väljalülitamiseks. See suurendab võimalust, et vähemalt osad patogeene, mis peremeesorganismi ründavad, immuunsussüsteemi



poolt ära ei tunta. Sellest tulenevalt on peremeesorganismi nakatamise tõenäosus suurem.

Lisaks geneetilistest muutustest tulenevale varieeruvusele võib heterogeensus bakteripopulatsioonis avalduda ka ainult fenotüübi tasemel, seda ilma igasuguste ümberkorraldusteta geneetilises materjalis (Smits jt, 2006). Peaasjalikult seisneb fenotüübiline heterogeensus geneetiliselt identsete rakkude erinevas võimes ekspresseerida mingeid vaatlusaluseid geene. Selline diferentseerumine võib olla ka palju keerukam. Niisugusel juhul esineb bakteripopulatsioonis mitmesuguste erinevate füsioloogiliste omadustega rakke. Viimasel ajal ilmunud uurimused viitavad sellele, et fenotüübiline varieeruvus on tõenäoliselt väga oluline komponent bakteripopulatsioonide adapteerumisel muutlike keskkonnatingimustega ning nende säilumisel ja levikul erinevates elukeskkondades (Thattai & van Oudenaarden, 2004; Kussell & Leibler, 2005).

## **1.2. Fenotüübilise varieeruvuse tekkepõhjused**

### **1.2.1. Geeniekspressioonile kui protsessile omane varieeruvus**

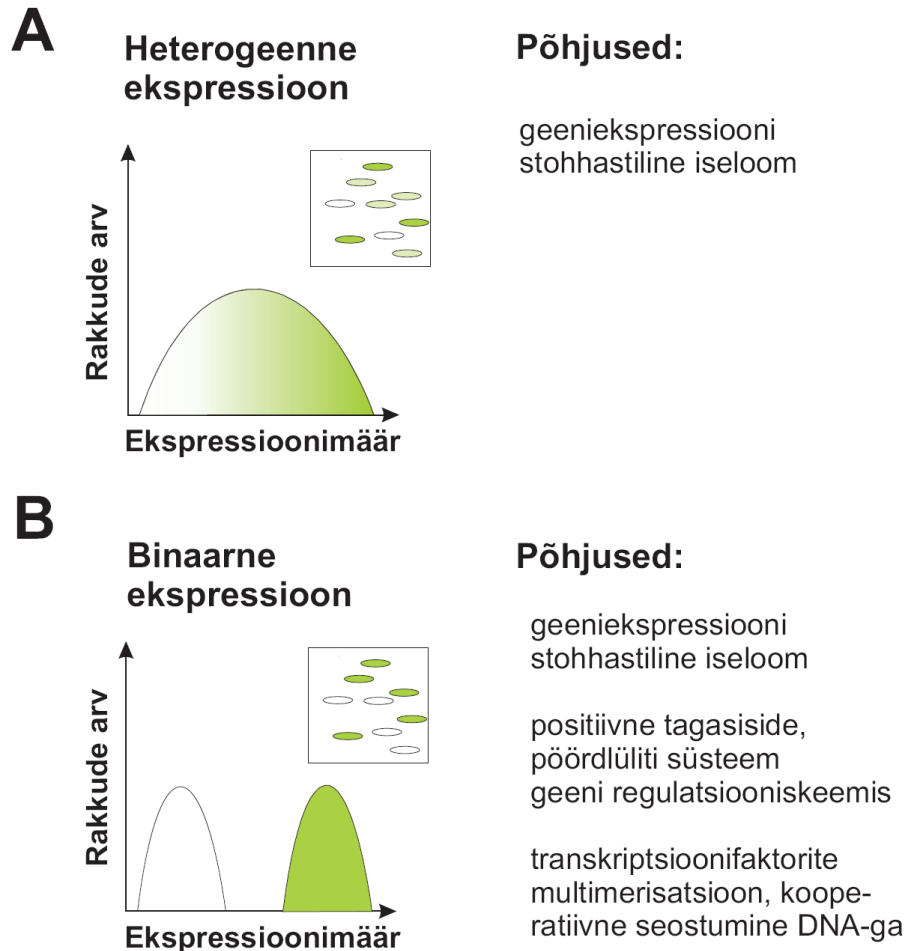
Varieeruvus geeniekspressioonis tuleneb suuresti tõsiasjast, et bakter on väike. Tadaolevalt on väikeste süsteemide käitumine aga väga tundlik neid mõjutavate parameetrite juhuslike muutuste suhtes (Kaern jt, 2005). Süsteemi suurus või väiksus on defineeritud tema komponentide arvuga. Kui süsteemiks on bakterirakk, siis võib komponentidena käsitleda molekule. Paljude oluliste ensüümide, regulaatormolekulide, transkriptsioonifaktorite ning nende märklaudade hulk bakterirakus ongi väga madal (Guptasarma, 1995). Üle 80% *Escherchia coli* geenide produkte toodetakse alla 100 koopia raku kohta (Guptasarma, 1995). Näiteks on raku elutegevuse jaoks olulisi ensüüme nagu DNA polümeraas III, DnaB helikaas või siis metabolismi seisukohalt tähtsat regulaatorvalku LacI rakus vaid 10-20 ühikut. Enamik spetsiifilisi kõrge afiinsusega transkriptsioonifaktorite seostumiskohti DNA-l on aga esindatud vaid 1-2 koopiaga (Kuthan, 2001). Molekulide vähesuse ning keemiliste reaktsioonide juhusliku või stohhastilise iseloomu tõttu ongi geeniekspressioonile iseloomulik varieeruvus, mis seisneb sünteesitavate mRNA ja valgumolekulide arvu juhuslikus varieeruvuses üksikute rakkude vahel erinevatel ajahetkedel (Elowitz jt, 2002; Ozbudak jt, 2002;

Paulsson, 2004). Stohhastilise populatsioonisisese geeniekspressiooni varieeruvuse sünonüümina kasutatakse enamasti terminit müra.

Müral on kaks komponenti: seesmine ja välimine. Seesmine müra seisneb geeniekspressioonile kui biokeemilisele protsessile omases juhuslikkuses ehk stohhastilisuses. Selle alla võib liigitada kõik stohhastilised sündmused, mis toimuvad geeniekspressiooni käigus alates transkriptsioonifaktorite seondumisest DNA-le kuni translatsioonini ja valkude degradatsioonini (Raser & O'Shea, 2005). Kuigi geeniekspressiooni kui protsessi mürarikkust on arvutisimulatsioonide abil iseloomustatud juba varem (McAdams & Arkin, 1997, Thattai & van Oudenaarden, 2001), siis seesmise müra olemasolu näidati eksperimentaalselt alles hiljuti (Elowitz jt, 2002). Autorid sisestasid *E. coli* kromosoomi replikatsioonioriginist võrdsele kaugusele kaks identset promootorit ja kummagi kontrolli alla erineva fluorestseeruva reportergeeni kodeerivad järjestused. Ilmnes, et nende kahe identse regulaatoralaga reportergeenide ekspressioon pole isegi üksikute rakkude sisekeskkonnas ühesugune. Kummagi geeni ekspressioonis toimuvad fluktuatsioonid rakus ei kattu. See näitab, et geeniekspressioon on ka väliste mõjurite puudumisel stohhastiline (Elowitz jt, 2002).

Seesmise müra tagajärjeks on geeniekspressiooni erinevate etappide – transkriptsiooni ja translatsiooni – toimumine pulssidena. Nii mRNA-d kui ka valke sünteesitakse bakterirakkudes üksikute pursete või pulssidena (Golding jt, 2005; Cai jt, 2006; Yu jt, 2006). Iga transkriptsioonilise pulsi käigus võidakse toota erinev arv mRNA molekule (Golding jt, 2005). Need omakorda on matriitsiks translatsioonile, mis nagu mainitud, toimub samuti pulssidena. Iga translatsiooniline pulss lähtub ühelt mRNA molekulilt, kuid sünteesitavate valgumolekulide arv igas translatsioonilises pulsisis on erinev (Cai jt, 2006; Yu jt, 2006). Ei transkriptsioonilised ega ka translatsioonilised pulssid pole perioodilised, vaid toimuvad hooti ja on stohhastilised. Kõik see juhuslikkus kokku muudab geeniekspressiooni mürarikkaks ning varieeruvuse geeniekspressioonis märgatavaks. Kui ulatuslikud ja kui sagedased kõikumised mingite geeniproductide hulgas parajasti esinevad, sõltub lõplikult veel nii transkriptsiooni- kui ka translatsioonikiirusest (Elowitz jt, 2002; Ozbudak jt, 2002). Müra on suurem siis, kui transkriptsioonimäär on madal ja translatsioonimäär on kõrge. Ehk siis olukorras, kus vähestest mRNA molekulidest sünteesitakse palju valku (Ozbudak jt, 2002). Lisaks

sellele võimendub müra järjestikustes regulatsioonikaskaadides (Pedraza & van Oudenaarden, 2005).



**Joonis 1.** Fenotüübilise heterogeensuse avaldumine geeniekspressiooni tasemel ning selle võimalikud põhjused. Graafikud kujutavad läbivoolutsütomeetria tulemusi, ruudud fluorestsentsmikroskoobi vaatevälju.

Välimine müra hõlmab endas igasugust heterogeensust rakupopulatsioonis, mis asetseb väljaspool konkreetse geeni ekspressiooni kui biokeemilise reaktsiooni toimumist. Välimise müra alla kuuluvad kindlasti rakkude lokaalsete kasvutingimuste varieeruvus ning näiteks erinevused mõnede oluliste regulaatorvalkude ja ensüümide hulgas ja aktiivsuses (Elowitz jt, 2002; Rao jt, 2002; Raser & O'Shea, 2005). Kuigi traditsiooniliselt seostatakse välimist müra ainult stohhastiliste faktoritega, siis mõnede autorite käsitluses liigituvad välise müra alla ka mõned deterministlikud ehk

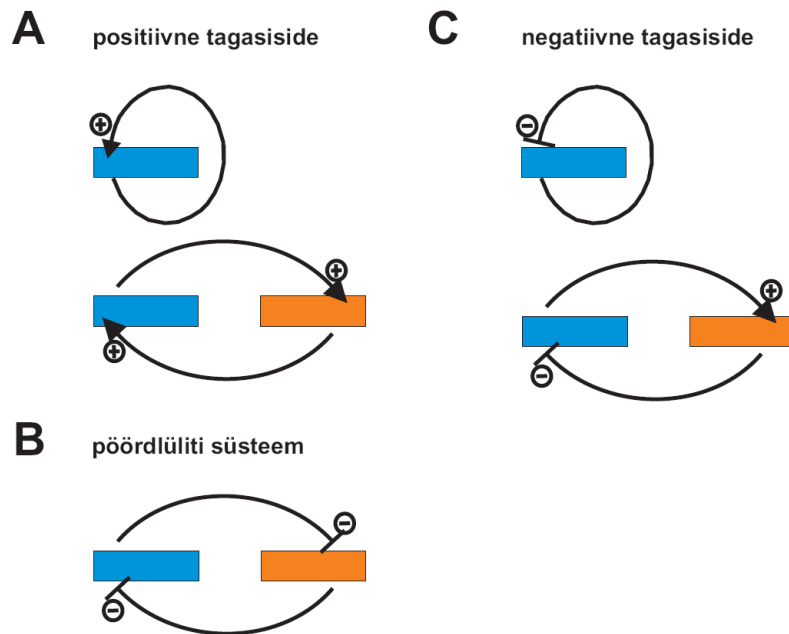
ennustatavad sündmused raku elutegevuses (Raser & O'Shea, 2005). Üheks selliseks näiteks on rakutsükli faaside vaheldumine. On selge, et sõltuvalt sellest, millist rakutsükli faasi rakk parajasti läbib, sisaldab ta ka erineval hulgal molekule – nii kromosoomide kui ka muude molekulide arv (kontsentratsioon) varieerub rakutsükli edenedes. Nii võib öelda, et isegi sõltumata sellest, kas tegemist on müraga või mitte, on rakutsükli faaside vaheldumine igal juhul üks olulisi fenotüübilise heterogeensuse allikaid populatsioonis.

### **1.2.2 Regulaatsiooniskeemi iseärasustest tulenev fenotüübiline varieeruvus**

Teiseks oluliseks faktoriks, mis mõjutab geeniekspressiooni jaotumist rakupopulatsioonis, on viis, kuidas vaadeldava geeni ekspressiooni raku kontrollitakse. Stohhastilised sündmused transkriptsiooni või translatsiooni tasemel põhjustavad eelkõige pideva heterogeense jaotuse teket. See tähendab, et populatsioonis esineb väga mitme erineva ekspressioonimääraga rakke (joonis 1, paneel A). Lisaks sellisele ühtlasele hajutatud jaotusele võib populatsioon geeniekspressiooni alusel eristuda ka mitmeks diskreetseks alamhulgaks. Teoreetiliselt võib erinevate ekspressioonimääradega alamhulki populatsioonis olla lõpmata palju. Sellist jaotuvust nimetatakse multistabiilsuseks. Reaalselt on aga kõigil seni eksperimentaalselt näidatud juhtudel tegemist kahe alamhulga eristumisega. Ühes neist alamhulkadest on geeniekspressioon sisse ning teises välja lülitatud (joonis 1, paneel B). Niisugust binaarset või bistabiilset ekspressiooni võivad põhjustada kaks regulaatsiooniskeemi. Nendeks on positiivne tagasiside (joonis 2, paneel A) (Becskei jt, 2001) ning nn pöördlüti süsteem (*toggle switch*), milles kahe geeni produktid reguleerivad teineteise ekspressiooni vastastikku negatiivselt (joonis 2, paneel B) (Gardner jt, 2000). Kummagi regulaatsiooniskeemi esinemise korral sõltub mingi välise induktori olemasolust või puudumisest see, kas reguleeritava geeni ekspressioon on parajasti sisse või välja lülitatud (Gardner jt, 2000; Becskei jt, 2001). Samuti võib tasakaalu ühes või teises suunas nihutada ülalkirjeldatud mürafaktor. Heterogeensus, antud juhul binaarsus, tekib populatsioonis siis, kui geeniekspressiooni aktiveeriva induktori kontsentratsioon on madal. Juhul kui induktorit on vähe, käivitatakse osades rakkudes stohhastiliselt vaadeldava geeni ekspressioon. Seejärel võimendub ekspressioon positiivse tagasiside

või pöördlüliti olemasolu korral neis rakkudes veelgi. Ülejäänud rakkudes madala induktori kontsentratsiooni mõjul geeniekspressiooni juhulikult aga ei aktiveerita.

Ainuüksi positiivsest tagasisidest või pöördlülitist bistabiilsuse tekkeks aga siiski ei piisa. Oluline on ka see, missugune on sõltuvus transkriptsioonifaktori hulga ja reguleeritavate geenide ekspressiooni vahel. Bistabiilsust ei teki juhul, kui geenide aktiveerimine või repressioon on proportsionaalne vastavalt kas aktivaatori või repressori hulgaga. Juhul kui niisugust lineaarset sõltuvust ei ole ning regulatsiooniskeemis on ka positiivne tagasiside või pöördlüliti, on selle geeni ekspressioon suure tõenäosusega binaarne. Mittelineaarsus geeniregulatsioonis tuleneb tavaliselt transkriptsioonifaktorite multimerisatsioonist enne aktiveerumist või nende kooperatiivsusest DNA-le seondumisel. Viimatimainitud juhtum tähendab seda, et ühe faktori sidumine muudab teise faktori seondumistõenäosust. Sellest tulenevalt pole DNA-le seostunud faktorite hulk (ning seega ka reguleeritava geeni ekspressioon) üksüheses vastavuses transkriptsioonifaktorite üldhulgaga (Ferrell, 2002; Kaern jt, 2005).



**Joonis 2.** Näiteid erinevatest geeniregulatsiooniskeemidest. Ristkülikud kujutavad erinevaid gene või geeniprodukte. „+” märgid tähistavad positiivset regulatsiooni või aktivatsiooni, „-” märgid negatiivset regulatsiooni või repressiooni.

### 1.2.3. Fenotüübilise varieeruvuse head ja vead

Üldiselt on varieeruvus geeniekspressioonis rakule kahjulik: kõikumised mõnede oluliste regulaatorvalkude ekspressioonis võivad ohtu seada elutegevuse seisukohalt mitmete oluliste protsesside toimumise täpsuse või mõjuda rakule isegi letaalselt. Hiljuti on ilmunud üsna mitmeid uurimusi, mis kinnitavad, et müra vähendamine on organismides tõepoolest evolutsioonilise valiku märklauaks. Nii *E. coli* kui ka üherakulise eukarüoodi *Saccharomyces cerevisiae* geeniregulatsiooni võrgustike analüüs näitab, et kõige rohkem kasutatakse rakus regulatsioonimotiive, mis on vähem tundlikud neist ülesvoolu paiknevate signaalide kõikumisele. Levinud on näiteks negatiivse tagasiside mehhanism (joonis 2, paneel C), mis teatavasti on müra summutava iseloomuga (Milo jt, 2002; Rao jt, 2002; Shen-Orr jt, 2002). Nagu eelmises peatükis kirjeldatud, vähendab madal translatsioonimäär stohhastilisi kõikumisi sünteesisitavate valkude arvus. Seetõttu on mõneti ootuspärane ka leida, et paljude oluliste regulaatorvalkude translatsioon *E. coli*-s toimub madalal tasemel (Ozbudak jt, 2002). *S. cerevisiae* hädavajalikud geenid on transkribeeritud reeglina kõrgel tasemel, kuid nende mRNA-d transleeritakse madala efektiivsusega (Fraser jt, 2004). See tagab kokkuvõttes samuti müravabama ekspressiooni (Ozbudak jt, 2002; Fraser jt, 2004).

Teisalt tuleb aga märkida, et geeniekspressiooni stohhastilisus, bistabiilsus ja sellest tulenev fenotüübiline varieeruvus võivad olla mikroobipopulatsiooni seisukohalt ka kasulikuks nähtuseks. Eriti arvestades seda, et mõned bakterid elavad pidevalt fluktuueerivates keskkonnatingimustes ning peavad väga kiiresti uute oludega kohanema. Geeniekspressiooni varieeruvus annab võimaluse produtseerida füsioloogiliselt erinevaid – ja seega erinevalt adapteerunud – rakke ning suurendada sel viisil tõenäosust, et populatsioon suudab ebasoodsad tingimused üle elada. Kiirete ja pöörduvate fenotüübiliste üleminekute kohta leiab bakterimaailmast ka mõningaid näiteid (Guespin-Michel & Kaufman, 2001; Wolf & Arkin, 2003; Smits jt, 2006). Tihtipeale on sellised fenotüübilised ümberlülitused seotud positiivse tagasiside esinemisega antud fenotüüpi tagavas regulatsioonirajas (Guespin-Michel & Kaufman, 2001; Smits jt, 2006). *In silico* on ennustatud, et sellise dünaamilise heterogeensuse olemasolu tagab muutuvates keskkonnatingimustes tõepoolest bakteripopulatsiooni suurema kasvukiiruse ja on seega populatsioonile kasulik (Thattai & van Oudenaarden,

2004; Kussell & Leibler, 2005). Eeldades, et bakteripopulatsioonid koosnevad geneetiliselt ühetaolistest rakkudest, võib teatud juhtudel evolutsiooniline valik soosida ka geeniekspressiooni stohhastilisust ja bi(multi)stabiilsust. Mõlemad tegurid võimaldavad genereerida populatsioonisisest heterogeensust, vältides geneetilise materjali ümberkorraldustega seotud riske (Giraud jt, 2001a; Giraud jt, 2001b).

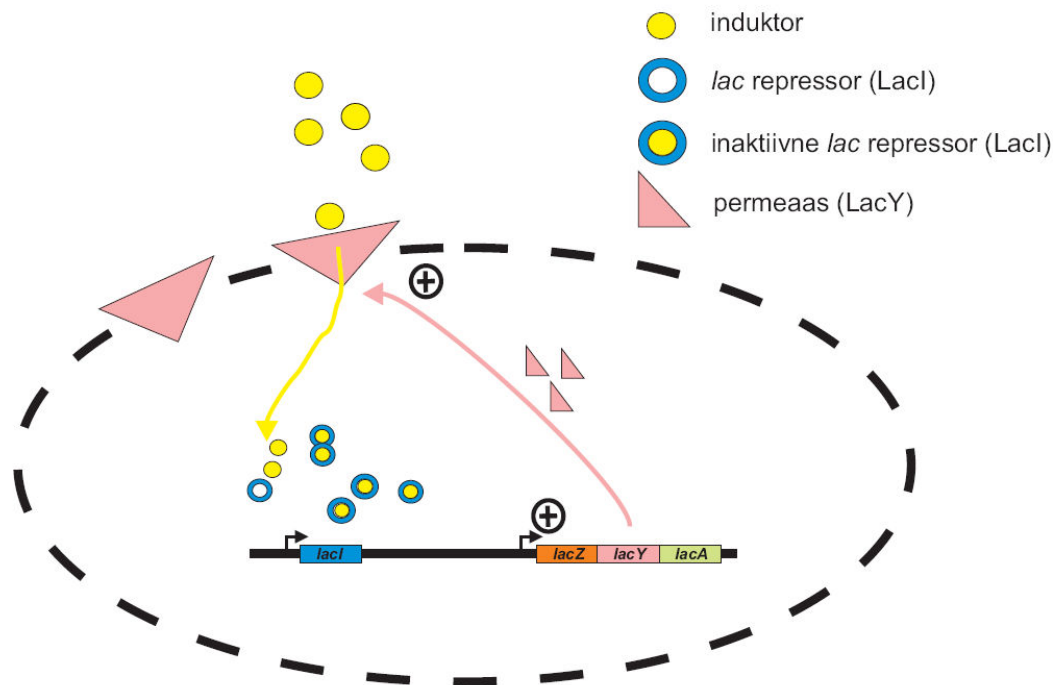
### **1.3. Fenotüübiline varieeruvus morfoloogiliselt ühetaoliste bakterite kultuurides**

Kirjanduses leidub vähesel määral andmeid selle kohta, et morfoloogiliselt mittediferentseeruvate bakterite kultuurid sisaldavad mitmeid füsioloogiliselt erinevas seisundis alampopulatsioone. Ühelt poolt võib eristumine populatsioonis toimuda ainult geeniekspressiooni tasemel. Selle tulemusena võivad isogeensed rakud erineda näiteks võimelt kasutada mingeid süsinikuallikaid. Teisalt sisaldab morfoloogiliselt ühetaoliste bakterite kultuur ka füsioloogiliselt märksa enam eristunud rakke, mis teatud määral meenutavad tõeliselt diferentseeruvate rakkude spooore. Kõige enam uuritud populatsioonisiseseks heterogeensuseks sel tasemel on erineva antibiootikumi- ning stressitaluvusega rakkude olemasolu bakterikultuuris.

#### **1.3.1. Varieeruvus geeniekspressiooni tasemel**

Nii nagu väga paljude teiste fundamentaalsete molekulaarbioloogiliste protsesside uurimisel on *lac* operon (joonis 3) osutunud pioneeriks ka bakteripopulatsiooni heterogeensuse seisukohalt. Juba peaaegu 50 aastat tagasi leiti, et selle operoni ekspressioon lülitatakse induktori lisamisel sisse ainult *E coli* kultuuri osades rakkudes (Novick & Weiner, 1957). Juba siis oletasid autorid, et tegemist pole päriliku diferentseerumisega, vaid pigem fenotüübilise varieeruvusega üksikute bakterite vahel. Nad pakkusid välja hüpoteesi, mille kohaselt selline kõik-või-mitte-midagi fenomen geeniekspressioonis tuleneb stohhastilisusest ning mingist autokatalüütilisest mehhanismist *lac* operoni regulatsioonil (Novick & Weiner, 1957). Hilisemad eksperimentaalsed analüüsid ning ka matemaatilised mudelid on seda hüpoteesi vaid kinnitanud (Cohn & Horibata, 1959; Carrier & Keasling, 1999; Vilar jt, 2003; Ozbudak jt, 2004). Need uurimused kinnitavad, et *lac* operoni binaarne ekspressioon tuleneb positiivse tagaside mehhanismist operoni regulatsiooniskeemis. Positiivse

autoregulaatorina toimib permeaas, mis vahendab laktoosi transportimist raku. Kuna permeaas on kodeeritud *lac* operonis paikneva *lacY* geeni poolt, siis indutseerib rakku transporditud induktor veelgi permeaasi ekspressiooni. See omakorda suurendab induktori omastamist raku poolt. Samasugune binaarsus *lac* operoni ekspressiooni regulatsioonil on leidnud eksperimentaalse tõestuse ka *Salmonella typhimurium*-i näitel (Tolker-Nielsen jt, 1998).



**Joonis 3.** *lac* operoni ekspressiooni aktiveerimine bakterirakus induktori olemasolul. Juhul, kui keskkonnas on induktor (kollane ring), transporditakse see olemaolevate permeaaside (roosa kolmnurk) poolt raku. Induktor seostub repressoriga (sinine rõngas) ning inaktiveerib selle. Isegi kui repressorit pidevalt sünteesitakse (*lacI* geen – sinine ristkülik), on tulemuseks on operoni ekspressiooni aktiveerimine. Lisaks  $\beta$ -galaktosidaasile (*lacZ* geen – oranž ristkülik; laktoosi metaboliseerimine) ning transatsetülaasile (*lacA* geen - roheline ristkülik; funktsioon teadmata) ekspresseeritakse permeaasi (*lacY* geen – roosa ristkülik; valk – roosa kolmnurk), mis liigub raku membraani ning suurendab induktori omastamist veelgi. „+” märgiga on tähistatud operoni ekspressiooni võimendavad etapid. Kohandatud Vilar jt (2003) järgi.

Analoogne geeniekspressiooni sisse- ja väljalülitamine toimub veel *E. coli araBAD* operoni regulatsioonis (Siegele & Hu, 1997). Ka sel juhul on binaarsust tekitavaks teguriks positiivne tagasiside, mis on vahendatud transportervalgu poolt (Siegele & Hu, 1997; Carrier & Keasling, 1999). Kui see positiivne tagasiside regulatsiooniskeemist



kaotada, muutes transporterite ekspressiooni konstitutiivseks ning arabinoosist sõltumatuks, siis kaob operoni ekspressioonist ka binaarsus (Khlebnikov jt, 2000).

Kuigi binaarne ekspressioon on nii *ara* kui *lac* operoni puhul korduvalt kinnitust leidnud, on siiski mõningaid küsitavusi nende operonide binaarse käitumise kohta looduslikes situatsioonides. Kõigis ülalkirjeldatud katsetes ja mudelites kasutati kas mittemetaboliseeritavaid induktoreid (TMG – *thiomethyl-β-D-galactoside*, IPTG *lac* operoni puhul) või laktoosi ja arabinoosi mittemetaboliseerivaid tüvesid. Ühelgi juhul ei ole üksikute rakkude tasemel vaadeldud olukorda, kus need suhkrud oleksid bakterite jaoks ainsaks kättesaadavaks süsinikuallikaks. Samuti pole andmeid situatsiooni kohta, mis kõige enam imiteeriks looduslikku olukorda: ühe eelistatud süsinikuallika ammendumist ning asendumist kas siis laktoosi või arabinoosiga. Võimalik, et juhul kui neid suhkruid metaboliseeritakse, on positiivse tagasiside mõju vähenenud. Kuna suhkur (või selle modifitseeritud vorm allolaktoos) on neil tingimustel lisaks induktoriks olemisele ka ainuke süsinikuallikas, degradeeritakse seda vastavate ensüümide poolt ning positiivse tagasiside efekt võib nõrgeneda või sootuks kaduda. Sel juhul võiks nende *araBAD* või *lac* operonide ekspressioon olla hoopis proportsionaalne olemasoleva arabinoosi või laktoosi hulgaga ning toimuda kõikides rakkudes. Et *lac* operoni ekspressioon võib tõepoolest teatud tingimustel sellisel graduaalsel moel toimuda, on ka eksperimentaalselt tõestatud. Seda siiski veidi muudetud regulatsiooniskeemi korral ja metsiktüüpi bakterist erinevas süsteemis (Ozbudak jt, 2004).

On veel mõned viited rohkem või vähem looduslikes situatsioonides ilmnevast fenotüübilisest varieeruvusest geeniekspressiooni tasemel. Üheks näiteks on kolitsiinide sünteesimine metsiktüüpi kolivormsete bakterite poolt (Kuhar & Zgur-Bertok, 1999). Kolitsiinid on antibakteriaalsed ühendid, mille surmav mõju on suunatud sama liigi erinevast tüvest bakterite vastu. Tootjatüvi ise on toodetava kolitsiini suhtes resistentne. See tagatakse spetsiifilise immuunsusvalgu poolt, mida ekspresseeritakse samast plasmiidis paiknevast operonist nagu kolitsiinigi. Immuunsusvalgu ekspressiooni kontrollib aga teine promootor. Selleks, et kolitsiini vabastada ja sellega tappa konkureerivaid baktereid, peavad kolitsiini tootvad rakud ise lüüsuma. Sel otstarbel ekspresseerivad bakterirakud kolitsiinigeeniga ühise promootori alt vastavat lüüsivalku

(Riley & Gordon, 1999). Teadaolevalt sünteesib *E. coli* mitme erineva toimega kolitsiine. Osa neist inhibeerib translatsiooni või degradeerib DNA-d, osa aga moodustab märklaudraku membraani kanali ning depolariseerib selle (Riley & Gordon, 1999).

Intuitiivselt on peetud tõeseks hüpoteesi, et toksiini tootvate populatsioonide elujõulisuse tagamiseks saab neis tegelikult toksiini sünteesida vaid väike alamhulk rakke. Eksperimentaalne kinnitus sellele fenomenile leiti aga alles hiljaaegu. Membraani depolariseeriva kolitsiini K näitel ilmneb, et toitainete ammendumisel indutseeritakse kõikides rakkudes järk-järguliselt toksiini eest kaitsva immuunsusvalgu süntees. Seejärel hakkab umbes 3% tervest populatsioonist tootma suurel hulgal ka kolitsiini ennast (ning ühes sellega ka rakku lüüsvat valku) (Mulec jt, 2003). Tõenäoliselt tagatakse niisugusel moel populatsiooni ellujäämine ning samas produtseeritakse ka piisaval hulgal kolitsiini, et konkureerivaid bakteripopulatsioone neutraliseerida. Mis täpselt aga tagab kolitsiini K puhul ekspressiooni binaarsuse, pole teada.

Teised binaarse geeniregulatsiooni juhud, mis näivad kirjanduses esitatud andmete põhjal peegeldavat ka reaalselt looduslikku olukorda, on seotud virulentsusfaktorite ekspressiooniga. Mitmed *E. coli*, *S. typhimurium*-i, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Agrobacterium tumefaciens*-i patogeensust tagavad geenid avalduvad binaarsel moel (Guespin-Michel & Kaufman, 2001; Hernday jt, 2002; Hautefort jt, 2003; Brencic jt, 2005; Goulian & van der Woude, 2006). Mõnel puhul on teada ka positiivse tagasiside olemasolu virulentsusfaktorite ekspressiooni regulatsioonis, kuid eksperimentaalselt pole positiivse tagasiside võtmeroll binaarsuse tekitajana nendel konkreetsetel juhtudel veel tõestatud (Guespin-Michel & Kaufman, 2001; Goulian & van der Woude, 2006).

### **1.3.2. Rakkude kasvu ja jagunemisvõimet iseloomustavate parameetrite varieeruvus**

#### **1.3.2.1. Persistorid**

Juba 1944. a. leidis Joseph Bigger, et osa *Staphylococcus aureus*-e bakterikultuurist suudab üle elada ka pikaajalise töötlemise antibiootikumidega (Bigger, 1944). Hiljem

on persistoreid leitud veel mitmete erinevat liiki bakterite kultuuridest. On selge, et just nende rakkude olemasolu on üheks põhjuseks, miks mitmed kroonilised biokilennakkused ei allu ravile (Fux jt, 2005; Lewis, 2005). Nende rakkude tolerantsus antibiootikumide suhtes pole päritav: persistorite järglaskond on antibiootikumide suhtes sama tundlik kui algne bakteripopulatsioon. Samuti ei suuda persistorid antibiootikumi sisaldavas keskkonnas kasvada ja jaguneda (Keren jt, 2004a). Need kaks tunnust eristavad persistoreid antibiootikumide suhtes resistentsetest bakteritest.

Persistorite tekkemehhanismi või olemuse kohta pole just väga palju andmeid. Selle põhjuseks on asjaolu, et üldiselt on selliste rakkude sagedus bakteripopulatsioonides väga madal: vaid üks rakk miljonist *E. coli* rakust eksponentsiaalselt kasvavas bakterikultuuris (Moyed & Bertrand, 1983; Keren jt, 2004a) ning üks rakk sajast statsionaarse faasi kultuuris (Keren jt, 2004a), on persistor. Tegemist on nõ suikuvate bakteritega, mis ei kasva üldse või siis kasvavad väga aeglaselt (Balaban jt, 2004). Osa eksponentsiaalse faasi persistoritest pärineb statsionaarsest faasist. Teine osa neist aga tekib stohhastiliselt, kui kasvavad rakud lülituvad iseeneslikult ümber mittekasvavateks rakkudeks (Balaban jt, 2004; Keren jt, 2004a). Persistorite arvukus tõuseb siis, kui toitained hakkavad kultuurist ammenduma ning bakterite kasvukiirus aeglustub järkjärguliselt. Kõige rohkem, nagu juba eelpool viidatud, on neid statsionaarses faasis (Keren jt, 2004a).

Keren jt (Keren jt, 2004b) pakkusid välja mudeli, mille kohaselt persistorite tolerantsus antibiootikumide suhtes tagatakse tõenäoliselt just nende rakkude madala metaboolse aktiivsuse tõttu. Enamik antibiootikume tapab eelkõige kasvavaid baktereid, mille ainevahetus on aktiivne ja mis sünteesivad suurel hulgal makromolekule. Teada on, et nii aktiivne replikatsioon, transkriptsioon, translatsioon ja ka rakukesta komponentide süntees on paljudele erinevatele antibiootikumidele heaks märklauaks (Walsh, 2003). Seega vähendaks madal metaboolne aktiivsus antibiootikumide sihtmärkide arvu ning suurendaks tõenäosust, et bakter jääb ellu (Keren jt, 2004b).

Niisugust hüpoteesi toetab ka persistorite transkriptsiooniprofiili analüüs. See näitab, et võrreldes eksponentsiaalse või statsionaarse faasi rakkudega on persistorites lisaks stressivastuses osalevatele valkudele tugevamalt ekspresseeritud ka mitmed regulaatorid, mis inhibeerivad makromolekulide sünteesi (Keren jt, 2004b)(Shah., D jt;

avaldamata andmed). Näiteks toodetakse persistorites RMF (*ribosome modulation factor*) valku, mis seob statsionaarses faasis ribosoomid dimeerideks ning vahendab nende muutmist translatsiooniliselt inaktiivseteks 100S kompleksideks (Wada jt, 1990; Wada jt, 1995). Teine persistorites makromolekulide sünteesi inhibeeriv komponent tuleneb kromosomaalsete toksiin-antitoksiin (TA) lookuste üleekspressioonist (Keren jt, 2004b; Shah jt; avaldamata andmed). Need lookused kodeerivad stabiilseid toksiine, mis inhibeerivad raku elutegevust. Teiseks kodeeritakse TA lookustes ka toksiini toimet neutraliseerivat antitoksiini, mille eluiga on toksiiniga võrreldes lühike (Gerdes jt, 2005). Nendele elementidele esialgu omistatud funktsioon on seotud plasmiidide stabiliseerimisega. TA lookust sisaldava plasmidi kaotanud rakkudes säilib toksiin kauem kui ebastabiilne antitoksiin ning mõjub seejärel raku elutegevusele pärssivalt (Hayes, 2003). Antud peatüki seisukohalt on aga kõige olulisem see, et niisugused elemendid on looduses vabalt elavate bakterite genoomses DNA-s väga levinud. Seetõttu arvatakse, et neil on oluline roll bakterite kohanemisel muutuvate keskkonnatingimustega (Pandey & Gerdes, 2005). Niisuguse seisukoha põhjal oleks TA lookuste funktsioon tunnetada ebasoodsate tingimuste saabumist ja seejärel inhibeerida makromolekulide sünteesi. See võimaldaks rakul konserveerida energiat ja elada üle rasked ajad (Gerdes, 2000). Paljud TA lookuste poolt kodeeritud toksiinid inhibeerivad valgusünteesi või replikatsiooni (Pedersen jt, 2002; Christensen jt, 2003; Kurg & Kaldalu, avaldamata andmed) ning seega vähendavad antibiootikumide märklaudade hulka raku. Toksiinide rolli persistorite tekkimisel kinnitab ka tõik, et mõnede toksiinide üleekspressioon suurendab populatsioonis persistorite sagedust (Falla & Chopra, 1998; Keren jt, 2004b). Tõendeid jagub veelgi. Ühe enamuuritud toksiini HipA efekt näib olevat nn poomisvastuse (*stringent response*) esilekutsumine rakkudes (Korch jt, 2003). Poomisvastus on rakkude kompleksne reaktsioon ebasoodsatele tingimustele, eelkõige aminohapete näljale. See hõlmab samuti makromolekulide sünteesi inhibeerimist, stressivastusvalkude tootmist jne (Wick & Egli, 2004). Pole teada, kas TA paaride või teiste persistentsetele rakkudele iseloomulike geenide avaldumine toimub binaarsel viisil või on populatsioonis lihtsalt heterogeense jaotusega. Küll aga on selge, et mingisugune diferentseerumine bakterirakkude vahel nende geenide ekspressiooni alusel toimub.

Persistorite antibiootikumitolerantsuse ja suhtelise metaboolse inaktiivsuse seoseid kinnitavad ka Sufya jt tulemused (Sufya jt, 2003). Autorite eksperimendid näitavad, et aeglaselt kasvavatest bakteripopulatsioonidest jääb pärast antibiootikumidega töötlemist ellu tunduvalt rohkem rakke kui kiiresti kasvanud bakteripopulatsioonidest. Lisaks sellele näitavad autorid, et isegi isogeense populatsiooni piires on üksikute bakterite kasvukiirused väga varieeruvad. Kui eelnevalt sai mainitud, et osa eksponentsiaalse faasi persistoreid pärineb statsionaarsest faasist (Balaban jt, 2004), siis on võimalik, et nende konkreetsete persistorite näol on tegemist rakkudega, mille toibumine statsionaarsest faasist võtab lihtsalt kauem aega. Kui *E. coli* rakud pärast pikaajalist nälgimist taas toitainerikkasse keskkonda satuvad, toimub üksikute rakkude esimene jagunemine väga suures ajavahemikus. Mõned rakud toibuvad 20, mõned aga alles 200 minuti jooksul (Metris jt, 2005; Pin & Baranyi, 2006). Kas kasvukiiruste ja toibumisaegade erinevused on seotud ka mõnede spetsiifiliste geenide ekspressiooni sisse- või väljalülitamisega, on veel ebaselge. Mõne vihje geeniekspressiooni osalemisest sellistes protsessides andis Makinoshima jt uurimus (Makinoshima jt, 2002). Autorid leiavad, et nii eksponentsiaalse kui ka statsionaarse faasi kultuur on rakkude liikuvuse alusel *Percoll*-i gradiendis lahutatav väga mitmeteks diskreetseteks fraktsioonideks (kokku enam kui kahekümneks). Igähele neist on iseloomulik ka mingil määral erinev geeniekspressiooni muster. Statsionaarse faasi saabudes rakkude liikuvus gradiendis kasvab, kuna rakud muutuvad tõenäoliselt järjest tihedamaks. Mida tihedam on aga bakter, seda enam ja seda tugevamalt on temas ekspresseeritud statsionaarsele faasile iseloomulikud geenid. Kahjuks pole autorid nende alamhulkade füsioloogiliste omaduste kohta täpsemat analüüsi teostanud.

Kas bakterite erineva kasvukiiruse põhjuseks on ainuüksi TA lookuste ning teiste raku metabolismi pidurdavate või statsionaarsele faasile spetsiifiliste faktorite süntees, on veel ebaselge. Stewart jt pakuvad bakterite osalise metaboolse inaktiveerumise põhjusena välja vananemise (Stewart jt, 2005). Kui bakter jaguneb, pärivad mõlemad tütarrakud ühe pooluse emarakult. Seda nimetatakse vanaks pooluseks. Teine poolus pärineb pooldumise ajal sünteesitud rakuvaheseinast ning seda nimetatakse tinglikult uueks. Kuna rakukesta komponentide eluiga on üsna pikk, siis on uue ja vana pooluse koostised veidi erinevad. Stewart jt (Stewart jt, 2005) jälgisid uute ja vanade poolustega rakkude jagunemist läbi mitmete põlvkondade. Nad leidsid, et rakud, mis on mitme

põlvkonna vältel pärinud järjest vana pooluse – ja on autorite arvates seetõttu ise vananenud – kasvavad aeglasemalt. Lisaks sellele on nende tütarrakud väiksemad. Vanade poolustega rakkude puhul on tunduvalt suurem ka tõenäosus, et nende kasv seiskub ning nad kaotavad jagunemisvõime sootuks. See näitab, et erinevused kasvu- ja jagunemissuutlikkuses võivad põhimõtteliselt tuleneda ka teguritest, mis ei pruugi esmapilgul olla otseselt seotud geeniekspressiooniga.

Kui üheks oluliseks küsimuseks persistorite uurimise juures on nende tekkemehhanism, siis teiseks probleemiks on kindlasti küsimus persistori kui fenotüübi ühetaolisusest. Nii ofloksatsiini kui ampitsilliini suhtes tundetuid rakke on eksponentsiaalselt kasvavates *E. coli* kultuurides enam-vähem ühepalju (Keren jt, 2004a). Samuti on kirjeldatud, et ühe antibiootikumi suhtes tundetud rakud on võimelised ellu jääma pärast nende töötlemist teist tüüpi surmavate antibiootikumidega (Sufya jt, 2003; Wiuff jt, 2005). Viimane seos pole aga absoluutne ning sellisel risttolerantsusel on palju erandeid (Wiuff jt, 2005). Võimalik, et bakteripopulatsioonis esineb palju erinevate persistorite alamhulki, mis on igaüks tolerantne erineva mõjuri suhtes. Seejuures on iga sellise alamhulga sagedus tõenäoliselt väga madal. Senini on persistoreid uuritud jälgides muutusi antibiootikumide suhtes tolerantsete bakterite üldises arvukuses. See, kuidas üksikud rakud antibiootikumidele reageerivad, pole tegelikult teada.

### **1.3.2.2. VBNC fenotüüp**

Lisaks persistoritele on ligi 60 erineva bakteriliigi kultuuridest isoleeritud rakke, mille iseloomustamiseks kasutatakse terminit elus-aga-mittekultiveeritav (*viable but non-culturable*, VBNC) (Oliver, 2005). Nagu mõiste ütleb, on VBNC rakud küll mitme raku metaboolset aktiivsust kinnitava parameetri põhjal elusad (rakusisese ensümaatilise aktiivsuse ning normaalse membraanipotentsiaali olemasolu, membraanide intaktsus), kuid nad ei suuda moodustada kolooniaid ega jaguneda vedelkultuuris (Roszak & Colwell, 1987; Oliver, 2005). Mittekultiveeritavaks muutuvad rakud ebasoodsates tingimustes nagu näiteks pikaajaline nälg, pH stress, osmootne stress ja järsud temperatuurimuutused. Erinevates elukeskkondades kasvavate bakteriliikide puhul on eeldused mittekultiveeritavaks muutumisel erinevad. Küll on aga selge, et mida kauem bakterikultuur pidanud taluma ebasoodsaid tingimusi, seda suurem on selles ka VBNC fenotüübiga rakkude osakaal kultuuris (Oliver, 2005). Nii nagu äsjakirjeldatud

persistorite puhul, pole ka VBNC rakkude kasvu- ja jagunemisepeetus alati lõplik: mõnikord võivad nad soodsate tingimuste saabudes taas kasvama hakata (Oliver & Bockian, 1995){Whitesides, 1997 #89}.

Molekulaarsel tasandil on VBNC fenomeni tekkepõhjuste ning selle füsioloogilise seisundi olemuse kohta informatsiooni napilt. On esitatud vastukäivaid andmeid, kas VBNC fenotübile on iseloomulik spetsiifiline geeniekspressiooniprofiil või mitte {Benaissa, 1996 #91}(Heim jt, 2002; Bumann jt, 2004). Mitmed autorid peavad VBNC fenotüüpi bakterite spetsiifiliseks diferentseerumiseks (Oliver, 2005). Samas pole senini leitud aga ühtegi geeniproducti, mille olemasolu või puudumine markeeriks kindlalt VBNC seisundit. Üldiselt on aktsepteeritud asjaolu, et VBNC bakterite rakukest on modifitseeritud ning tihedamalt ristsidemetega seotud kui eksponentsiaalse või statsionaarses faasi bakterite oma (Costa jt, 1999; Signoretto jt, 2000). Mõne liigi VBNC rakud väiksemad ning teise liigi omad hoopis suuremad kui nende kultiveeritavad kaaslased (Benaissa jt, 1996; Signoretto jt, 2000). VBNC fenotüübi mõiste võib endas tegelikult hõlmata väga mitmesuguseid füsioloogiliselt erinevaid rakke. Sellele viitab tõsiasi, et erinevates tingimustes mittekultiveeritavaks muutunud patogeenid – sõltuvalt liigist – kas kaotavad või säilitavad oma virulentsuse (Oliver & Bockian, 1995; Rahman jt, 1996; Rahman jt, 2001; Fischer-Le Saux jt, 2002).

Üheks peamiseks faktoriks, miks VBNC bakterid ei suuda enam kasvama hakata, näib olevat rakkude oksüdatiivne kahjustus ja võimetus selle vastu võidelda (Mizunoe jt, 1999; Bogosian jt, 2000). *E. coli* puhul on teada, et statsionaarse faasi saabudes karbonüleeritakse reaktiivsete hapnikuradikaalide mõjul paljusid valke (Dukan & Nystrom, 1998; Tamarit jt, 1998). Eriti tundlikud on karbonüleerimise suhtes need valgud, mis on valesti voltunud (Dukan jt, 2000; Ballesteros jt, 2001). Niisuguseid valke toodetakse peamiselt translatsioonivigade tõttu. Teadaolevalt suureneb transleerivate ribosoomide vigade tegemise sagedus just statsionaarses faasis (Barak jt, 1996; Wentzel jt, 1998). Seetõttu ongi rakud statsionaarses faasis oksüdatiivsele kahjustusele eriti vastuvõtlikud. Üksikute rakkude tasemel on mittekultiveeritavates bakterites tõepoolest palju rohkem karbonüleeritud valke kui kultiveeritavates. Samas aga ei sisalda kaugeltki mitte kõik jagunemisvõimetud *E. coli* rakud selliselt kahjustatud

valke (Desnues jt, 2003). Mis põhjustab niisuguste bakterite mittekultiveeritavust, on ebaselge.

Oksüdatiivne kahjustus võib olla üks olulisemaid põhjuseid, miks osad VBNC bakterid enam kasvama ei suuda hakata. Samas aga tekib küsimus, kuidas niisugused kahjustatud rakud suudavad mõnel juhul paremini temperatuuristressi taluda (Johnston & Brown, 2002; Wong & Wang, 2004) ning veelgi enam – mis võimaldab kahjustatud rakkudel soodsate tingimuste saabudes siiski mõnikord jagunemisvõime taastada.

Kirjanduses esitatud andmete põhjal on üsna selge, et ei persistorid ega ka VBNC fenotüübiga rakud pole kumbki iseenesest homogeenne grupp baktereid. On ka uurimusi ja seisukohti, mis seavad kahtluse alla VBNC ja persistorite kui spetsiifiliste füsioloogiliste seisundite olemasolu üleüldse (Kell jt, 1998; Bogosian & Bourneuf, 2001; Nystrom, 2003). Mõningad sarnasused nende kahe ülalkirjeldatud fenomeni juures – peatunud kasv, tolerantsus teatud ebasoodsate keskkonnatingimuste suhtes, võime mingitel tingimustel taas kasvama hakata – viitavad võimalusele, et VBNC fenotüüp ning persistorid on lihtsalt ühe ja sama nähtuse erinev tõlgendus.



## 2. TÖÖ EESMÄRGID

Kirjanduses leidub mõningaid viiteid sellele, et morfoloogiliselt ühetaoliste bakterite populatsioonid võivad sisaldada paljusid füsioloogiliselt erinevate omadustega rakke. Mitmed uurimused kinnitavad, et niisuguse fenotüübilise eristumise kõige olulisemaks väljundiks on muutused raku kasvu- ning jagunemisvõime. Seda kinnitab veel asjaolu, et ühtede meditsiinilisest seisukohast tõenäoliselt olulisematele bakteripopulatsiooni alamhulkadele – persistoritele ja VBNC fenotüübiga rakkudele – on iseloomulik aeglane või siis sootuks peatunud kasv. Kui välja arvata mõned harvad erandid, pole populatsioonisiseseid erinevusi üksikute bakterite kasvu- ja jagunemisvõimes siia maani eriti palju uuritud. Antud magistr töö raames on bakteripopulatsiooni fenotüübilise varieeruvuse uurimisel lähtutud aga just bakterite jagunemisvõimest.

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- kirjeldada üksikute rakkude kasvu- ning jagunemissuutlikkust *E. coli* rakupopulatsiooni näitel bakteri elutsükli erinevates etappides ja erinevates kasvukeskkondades;
- selgitada välja tegurid, millest sõltub üksikute bakterite jagunemisvõime.

### 3. MATERJALID JA METOODIKA

#### 3.1. Bakteritüved, söötmed, plasmiidid

Kõikide eksperimentide läbiviimiseks kasutati nn metsiktüüpi *E. coli* tüve MG1655 (F- $\lambda$ -*ilvG*-*rfb*-50 *rph*-1) (Blattner jt, 1997). Kloneerimised teostati *E. coli* tüves DH5 $\alpha$  [*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\Phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*] (Sambrook & Russell, 2001).

**Tabel 1.** Käesolevas töös kasutatud söötmed

Nimetus	Iseloomustus	Allikas
2YT		(Sambrook & Russell, 2001)
LB	Mõnes katses lisati söötmesse ka 0,2% glütserooli (peatükk 3.3.4); tardsöötme saamiseks lisati vedelsöötmesse 1,5%-lise lõppkontsentratsioonini agarit.	(Sambrook & Russell, 2001)
MOPS Glu	Sisaldas süsinikuallikana 0,1% glükoosi	(Neidhardt jt, 1974)
MOPS Glu +AA	Sisaldas süsinikuallikana 0,1% glükoosi; lisati 20 L-aminohapet, igäühe lõppkontsentratsiooniks 100 $\mu$ g/ml.	(Neidhardt jt, 1974)
MOPS Glu –N	Sisaldas süsinikuallikana 0,1% glükoosi; lämmastikunälja tekitamiseks alandati ammoniumikontsentratsiooni söötmes 2,7 mM-ni (algselt 9,52 mM).	(Neidhardt jt, 1974; Chuang jt, 1993)
MOPS Glu –P	Sisaldas süsinikuallikana 0,1% glükoosi; fosfaadinälja tekitamiseks alandati fosfaadikontsentratsiooni söötmes 0,132 mM-ni (algselt 1,32 mM).	(Neidhardt jt, 1974; Chuang jt, 1993)
MOPS Gly	Sisaldas süsinikuallikana 0,2% glütserooli.	(Neidhardt jt, 1974)

Baktereid kasvatati alati temperatuuril 37 °C. Vastavalt plasmidi resistentsusmarkerile lisati söötmesse järgmisi antibiootikume: ampitsilliin (lõppkontsentratsioon 100  $\mu$ g/ml), kanamütsiin (lõppkontsentratsioon 25 või 50  $\mu$ g/ml), klooramfenikool (lõppkontsentratsioon 10  $\mu$ g/ml), tetratsükliin (lõppkontsentratsioon 15  $\mu$ g/ml).

**Tabel 2.** Käesolevas töös kasutatud plasmiidid

Nimetus	Iseloomustus	Allikas
pMSLuxR	pMS201 plasmidi (saadud Uri Alonilt) baasil valmistatud ekspressioonikonstruk, milles <i>gfpmut2</i> reportergeeni (Cormack jt, 1996) ekspressiooni kontrollib <i>Vibrio fischeri luxICDABEG</i> operoni promootor (gi: 297488, nukleotiidid 910 – 971), mida reguleerib <i>luxR</i> aktivaator (gi: 5726577, nukleotiidid 214 – 1051); Km <sup>R</sup> .	Arvi Jõers
pETgfpmut2-UAAGGAGG (1, 2, 3)	pET41a ( <i>Novagen</i> ) plasmidi baasil valmistatud ekspressioonikonstruk translatsiooniniitsatsiooniregiooni analüüsimiseks; Km <sup>R</sup> . Konstruktsioon kontrollib <i>gfpmut2</i> geeni ekspressiooni transkriptsiooni tasemel <i>tac</i> promootor (de Boer jt, 1983) ja translatsioonitasemel, kas <ol style="list-style-type: none"> <li>1) GC-nukleotiidirikas enhanserjärjestus koos plasmidi nimes sisalduva SD järjestusega (suured tähed);</li> <li>2) Plasmidi nimes sisalduv SD järjestus (enhanserjärjestus puudub);</li> <li>3) AU-nukleotiidirikas enhanserjärjestus koos plasmidi nimes sisalduv SD järjestusega;</li> </ol> AU-rikka enhanserina kasutati <i>rrnB BoxA</i> järjestust ning GC-rikka enhanserina selle vastavalt muteeritud varianti (Komarova jt, 2002). Ka SD järjestused on disainitud Komarova jt kirjelduste põhjal.	Vladimir Vimberg
pETgfpmut2-AAGGAGG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-AGGAGG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-GGAGG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-GGAG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-GAGG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-AGG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-GAG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-GG (1, 2, 3)		
pETgfpmut2-G (1, 2, 3)		
pMPR402	pBAD24 plasmiidil (Guzman jt, 1995) põhinev ekspressioonikonstruk, milles <i>gfpmut2</i> geeni kodeeriva ala külge on liidetud polaarse lokaliseerimisega valgu IcsA C-terminus, mis paigutab GFP reportervalgu bakteri poolusele. Liitvalgu ekspressiooni kontrollib L-arabinoosist sõltuv P <sub>BAD</sub> promootor; Amp <sup>R</sup> (Charles jt, 2001).	Marcia B. Goldberg
pRpoSmut2	pACYC184 (Rose, 1988) plasmidi baasil valmistatud ekspressioonikonstruk, milles <i>gfpmut2</i> reportergeeni ekspressiooni kontrollib <i>E. coli rpoS</i> geeni regulaatorala (piirkond 2865575 – 2866335 nukleotiidini <i>E. coli</i> MG1655 kromosoomis; www.ecocyc.org); Cm <sup>R</sup> .	Käesolev töö
pJBgadA	pJB866 plasmidi (Blatny jt, 1997) baasil valmistatud ekspressioonikonstruk, milles <i>gfpmut2</i> reportergeeni ekspressiooni kontrollib <i>E. coli gadA</i> geeni regulaatorala (piirkond 3665607 – 3665810 nukleotiidini <i>E. coli</i> MG1655 kromosoomis; www.ecocyc.org); Tet <sup>R</sup> .	

**Tabel 2 järg.** Käesolevas töös kasutatud plasmiidid

Nimetus	Iseloomustus	Allikas
pJBdps	pJB866 plasmidi baasil valmistatud ekspressioonikonstruk, milles <i>gfpmut2</i> reportergeeni ekspressiooni kontrollib <i>E. coli dps</i> geeni regulaatorala (piirkond 848138 – 848391 nukleotiidini <i>E. coli</i> MG1655 kromosoomis; www. ecocyc.org); Tet <sup>R</sup> .	Käesolev töö
pJBkatE	pJB866 plasmidi baasil valmistatud ekspressioonikonstruk, milles <i>gfpmut2</i> reportergeeni ekspressiooni kontrollib <i>E. coli katE</i> geeni (piirkond 1811725 – 1811887 nukleotiidini <i>E. coli</i> MG1655 kromosoomis; www. ecocyc.org); Tet <sup>R</sup> .	
pJBosmE	pJB866 plasmidi baasil valmistatud ekspressioonikonstruk, milles <i>gfpmut2</i> reportergeeni ekspressiooni kontrollib <i>E. coli osmE</i> geeni regulaatorala (piirkond 1820278 – 1820450 nukleotiidini <i>E. coli</i> MG1655 kromosoomis; www. ecocyc.org); Tet <sup>R</sup> .	

## 3.2. Plasmiidide konstrueerimine

### 3.2.1. PCR

PCR viidi läbi firma *Fermentas* reagentide kasutades ning tootja poolt soovitud protokoll järgides. *E. coli* MG1655 genoomse DNA fragmentide amplifitseerimiseks korrati järgmist tsükli 30 korda: 96 °C 60 s, 50 °C 60 s; 72 °C 90 s. Kasutatud praimerid on toodud tabelis 3.

**Tabel 3.** Töös kasutatud praimerid

Nimetus	Järjestus
<i>dpsF</i>	5' AATCTAGACTCGCTACTTTTCCTCTACACC3'
<i>dpsR</i>	5' AACATATGTTTCATATCCTCTTGATGTTATGTCC3'
<i>gadAF</i>	5' AATCTAGATTTGATCGCCCGAACAGCAATG3'
<i>gadAR</i>	5' AACATATGGAACCTTAAATTTATTTGAAGGC3'
<i>katEF</i>	5' AATCTAGACTGTAGTTTAGCCGATTTAGCC3'
<i>katER</i>	5' AACATATGACTCGTCTCCTTAAATTTATTTACTG3'
<i>osmEF</i>	5' AATCTAGACCTTAAAGCTAACCCGTTGCTACTG3'
<i>osmER</i>	5' AACATATGCCGTCCTCTTGTATTATCAGCGTGTTAG3'
<i>rpoSF</i>	5' AAAAGCTTGCGCAACAATATTCAGGCACCATACG3'
<i>rpoSR</i>	5' AACATATGAGGTGGCTCCTACCCGTGATCCC3'

### 3.2.2. Kloneerimine

PCR-i abil amplifitseeritud *dps*, *gadA*, *katE*, *osmE* ja *rpoS* geenide regulaatoralad kloneeriti koos *gfpmut2* geeniga lähteplasmiididesse (pJB866, pACYC184) nagu toodud tabelis 2. Selleks kasutati firma *Fermentas* ensüüme (restriktaasid, T4 DNA ligaas) ja vastavaid puhvreid. Restriksioonifragmendid lahutati elektroforeesil 1x TAE (*Tris-Acetic acid-EDTA*) puhvril 0,8%-lises agaros-TAE geelis, mis sisaldas 0,1 µg/ml etiidumbromiidi ning eraldati seejärel geelist *UltraClean™ 15 DNA Purification Kit-i* (*MoBio*) abil. Valmistatud konstruktide õigsust kontrolliti sekveneerimise teel *DYEnamic™ ET Dye Terminator Sequencing Kit-i* (*Amersham Biosciences*) kasutades ja tootja poolt soovitatud protokollil järgides. Plasmiidid eraldati *E. coli* üleökultuuridest *Plas/mini Isolation Spin-Kit-i* (*AppliChem*) abil.

### 3.2.3. Transformatsioon

Kompetentsed *E. coli* DH5α või MG1655 rakud valmistati Inoue meetodil (Sambrook & Russell, 2001). Jääl hoitud kompetentsetele rakkudele lisati 10 µl ligatsioonisegu või plasmidi ja inkubeeriti 30 minutit jääl. DNA rakku sisestamiseks kasutati kuumašokki (42 °C 90 sekundit). Pärast seda jahutati rakud 5 minuti jooksul jääl ning turgutati tund aega 1 ml LB söötmes 37 °C juures. Seejärel plaaditi rakususpensioon antibiootikumi sisaldavatele LB tardsöötme tassidele.

## 3.3. Läbivoolutsütomeetria

Kõikides järgnevates eksperimentides kasutati bakterite jälgimiseks ühe raku tasemel läbivoolutsütomeetrit (*FACSCalibur*, *Becton & Dickinson*). Alati vaadeldi vähemalt 30 000 sündmust. Tulemused analüüsiti programmiga *FlowJo 7.0.6*. (*Treestar, Inc.*). Juhul, kui pole viidatud teisiti, segati eksperimendi käigus võetud proovid 1:1-le 30%-lise glütserooli lahusega 1x PBS-s (Sambrook & Russell, 2001) ning külmutati kuni analüüsini – 80°C juures.

### 3.3.1. Jagunemisvõimeliste rakkude hulga hindamine bakteripopulatsioonis GFP signaali nõrgenemise alusel

Bakterite jagunemisvõime hindamiseks kasutati *E. coli* MG1655 tüve, millesse oli viidud pMSLuxR plasmiid (tabel 2). Üleökultuur lahjendati värsekesse LB

vedelsöötmesse ja kasvatati seni, kuni kultuuri optiline tihedus (OD) jõudis 0,6 ühikuni (siin ja edaspidi on optilist tihedust mõõdetud 600 nm juures). Seejärel indutseeriti rakkudes homoseriinlaktooniga (HSL, eraldatud Arvi Jõersi poolt *Erwinia carotovora subspecies carotovora* kasvukeskkonnast etüülatsetaadiga ekstraheerides) reportergeeni *gfpmut2* ekspressioon.

Selleks, et hinnata eksponentsiaalse faasi rakkude jagunemisvõimet lahjendati kultuur pärast 1 h jooksul HSL-ga indutseerimist alla 0,05 OD ühikuni ning jälgiti seejärel rakkude jagunemist, võttes 3 h jooksul iga 30 min möödudes kultuurist ajapunkte. Statsionaarsesse faasi sisenevate rakkude jagunemisvõime jälgimiseks kasvatati baktereid HSL-i juuresolekul, kuni kultuuri tihedus jõudis 2 OD ühikuni. Pärast seda pesti rakud 1x PBS-ga, suspendeeriti konditsioonitud LB söötmes ning võeti 4 h jooksul iga tunni möödudes ajapunkte. Konditsioonitud söötme saamiseks kasvatati bakterid paralleelselt samades tingimustes 2 OD ühikuni, kuid ilma HSL-ta. Bakterid eemaldati tsentrifuugimise teel, supernatant filtreeriti läbi 0,2 µm pooriläbimõõduga filtri (*Millipore*).

Statsionaarsest faasist toibuvate rakkude hulga hindamiseks kasvatati baktereid LB söötmes. Siin ja edaspidi on statsionaarse faasi alguseks loetud alati ajahetke, mil kultuuri optiline tihedus 30 min jooksul ei suurenenud rohkem kui 5%. 24 h statsionaarses faasis viibinud kultuur lahjendati värskesse LB söötmesse 0,05 OD ühikuni. Kasvamahakkamise jälgimiseks võeti 3 h jooksul iga 30 minuti möödudes ajapunkte.

Samasugusel viisil hinnati *E. coli* MG1655 rakkude toibumist statsionaarsest faasist 5 päeva jooksul erinevates söötmetes (2YT, LB, MOPS Glu +AA, MOPS Glu, MOPS Glu -P, MOPS Glu -N, MOPS Gly). Erinevalt äsjakirjeldatust, kasutati neil juhtudel reporterkonstruktsiona pETgfpmut2-AGGAGG(3) plasmidi (tabel 2), milles *gfpmut2* ekspressioon indutseeriti 1 mM IPTG abil.

### **3.3.2. Bakterite membraanipotentsiaali olemasolu määramine**

Vedelkultuurist võetud proovid pesti kahel korral külma 1x PBS-ga ning värviti seejärel toatemperatuuril 5 minuti jooksul 10 µg/ml propiidiumjodiidi (PI) sisaldavas 1x PBS-i lahuses. Proovid analüüsiti koheselt läbivoolutsütomeetri abil

### **3.3.3. Stressivastuses osalevate geenide ekspressioonimäära kindlaks tegemine**

Erinevate stressivastuses osalevate geenide (*rpoS*, *dps*, *gadA*, *katE*, ja *osmE*) ekspressiooni jälgimiseks transformeeriti *E. coli* MG1655 ekspressiooniplasmiididega, milles nimetatud geenide regulaatoralad kontrollivad reportergeeni *gfpmut2* ekspressiooni (tabel 2). Vastavaid plasmide sisaldavate bakteritega inokuleeriti LB vedelsööde ning iga 2 h möödudes võeti kultuuridest proovid, seda 28 h jooksul. Reportergeeni ekspressioon neis ajapunktides analüüsiti läbivoolutsütomeetri abil.

### **3.3.4. Uue või vana pooluse olemasolu mõju hindamine raku võimele statsionaarsest faasist toibuda**

Selleks, et hinnata jagunemisel uue või vana pooluse pärinud rakkude võimet toibuda statsionaarsest faasist, kasutati pooluste märgistamiseks pMPR402 plasmidi abi (tabel 2). Selles plasmiidis on *gfpmut2* kodeeriva alaga liidetud ühe raku poolusel paikneva valgu, IcsA, C-terminus, mis lokaliseerib GFP raku poolustele (Charles jt, 2001). Rakkude pooluste märkimiseks kasutati Charles jt poolt pakutud protokolliga modifitseeritud varianti. Rakke kasvatati LB söötmes, millele oli lisatud 0,2% glütserooli. Üleöökuultuurist tehti samasuguse koostisega söötmesse allalahjendus 0,05 OD ühikuni ja kasvatati kuni tiheduseni 0,4 OD ühikut. Seejärel indutseeriti GFP ekspressioon 1 h jooksul 0,2%-lise L-arabinoosiga. Pärast seda pesti induktor maha, suspendeeriti rakud algses mahus 0,2% glütserooli sisaldavas LB-s ning lasti neil veel 24 h kasvada. Statsionaarsest faasist toibuvate rakkude hulga hindamiseks lahjendati vana kultuur alla värskesse söötmesse 0,05 OD ühikuni ning jälgiti rakkude kasvama hakkamist, kasutades selleks läbivoolutsütomeetrit. Kasvavate rakkude markerina kasutati selles katses rakkude külghajuvuse tõusu.

### **3.3.5. Bakterite üldise statsionaarses faasi geeniekspressioonivõime välja selgitamine**

Selleks, et hinnata, kas *E. coli* MG1655 rakud suudavad statsionaarses faasis indutseerida reportergeeni ekspressiooni transformeeriti bakterid erinevate variantidega pETgfpmut2 plasmiidist (tabel 2), milles reportergeeni *gfpmut2* ekspressiooni kontrollib erinev translatsiooniinitsiatsiooniregioon. Et vaadelda translatsiooni toimumist,

indutseeriti 24 h statsionaarses faasis viibinud kultuuris, kas 6 h või 24 h jooksul 1 mM IPTG-ga reportergeeni ekspressioon. Proovid analüüsiti läbivoolutsütomeetril.

### **3.3.6. Bakteriraku üldise nukleiinhappe- ning valgusisalduse hindamine**

Esmalt fikseeriti rakud 24 h jooksul jääkülmas 80%-lises etanoolis. Seejärel pesti fikseeritud rakke kahel korral 1x PBS-ga ning värviti neid 1 h jooksul pimedas jääl. Nukleiinhappesisalduse hindamiseks kasutati värvilahusena 20 µg/ml propiidiumjodiidi 1x PBS-s ning valgusisalduse hindamiseks 50 µg/ml fluorestsüanotsüanaati (FITC) sisaldavas 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> lahuses. Pärast seda pesti rakke taas kahel korral 1x PBS-ga ning analüüsiti koheselt läbivoolutsütomeetril.

### **3.4. Mikroskoopia**

Rakud pesti 1x PBS-ga ning pipeteeriti seejärel 1x PBS-i suspensioonina alusklaasi ja katteklasi vahele. Mikroskopeerimiseks kasutati *OLYMPUS DP70* digitaalkaameraga varustatud *OLYMPUS BX41* fluorestsentsmikroskoopi. Joonisel 12 esitatud fotod on pildistatud võrdse säriaajaga.

### **3.5. Bakterikultuuri fraktsioneerimine urografiinis**

Statsionaarse faasi bakterite fraktsioneerimisel lähtuti Cuny jt poolt esitatud protokollist (Cuny jt, 2005). 20 ml LB söötmes 24 h statsionaarses faasis viibinud *E. coli* MG1655 pETgfpmut2-AGGAGG(3) rakkudes indutseeriti 4 h jooksul 1 mM IPTG-ga valgusüntees. Seejärel pesti rakud 1x PBS-ga, suspendeeriti 1 ml 26,45%-lises urografiinis [1 l sisaldab – 36,8 g Na-diatrisoaat-dihüdraat (*Sigma*); 229,7 g meglumiindiatrisoaat (*Sigma*)] ning pipeteeriti ultratsentrifuugitopsi 10 ml 37%-lise urografiini padjale [1 l sisaldab – 51,45 g Na-diatrisoaat-dihüdraat; 321,3 g meglumiindiatrisoaat (*Sigma*)]. Kõige peale lisati 7 ml 1x PBS-i. Baktereid tsentrifuugiti Ti70 rootoris ultratsentrifuugiga (*Optima<sup>TM</sup> L-90K, Beckman & Coulter*) kiirusel 55 000 pöört/minutis 3 h. Lahutunud fraktsioonid eemaldati ettevaatlikult pipetiga, pesti 1x PBS-ga ning kasutati edasisteks analüüsideks.



## 4. TULEMUSED

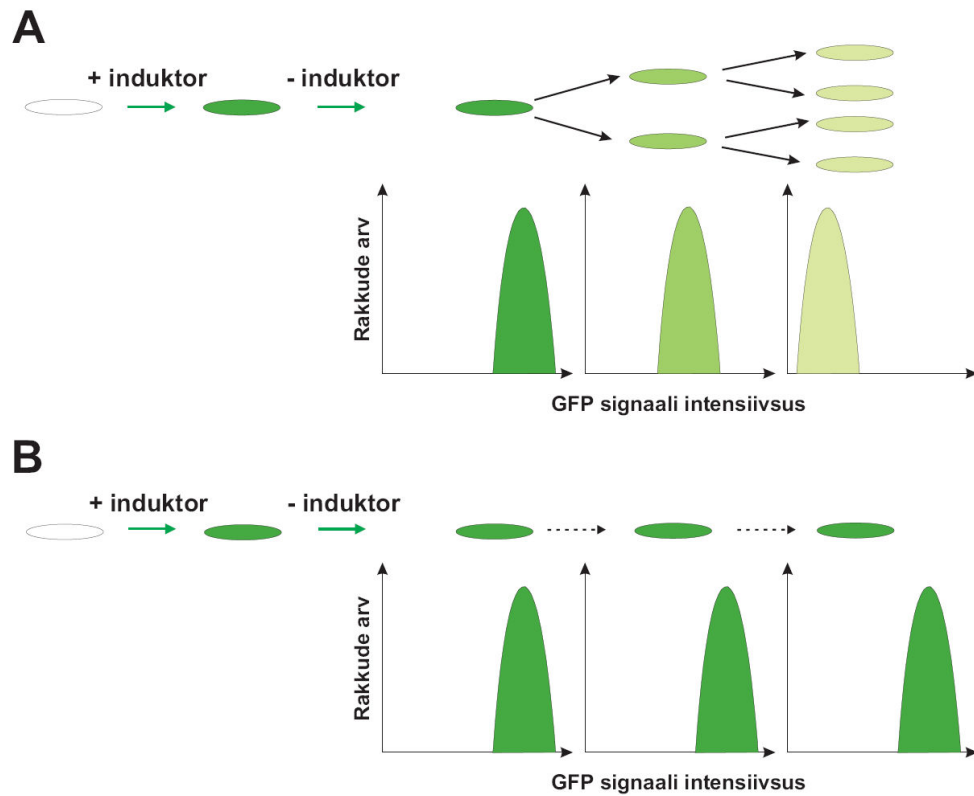
Antud töö eesmärkideks seati üksikute bakterite jagunemisvõime välja selgitamine erinevates tingimustes *E. coli* rakupopulatsiooni näitel. Selleks, et püstitatud küsimusele vastata, rakendati järgmist lihtsat katseskeemi (joonis 4). Et muuta üksikud bakterirakud jälgitavaks, indutseeriti neis kõigis rohelise fluorestseeruva valguga (GFP) ekspressioon. Seejärel pesti induktor maha ja lasti bakteritel värskes söötmes kasvada, jälgides samal ajal GFP signaali muutumist. Kuna kasutati väga stabiilset GFP isovormi, mida bakterirakkudes praktiliselt lagundada ei suudeta (GFPmut2; (Cormack jt, 1996)), hakkas GFP signaal pärast induktori eemaldamist järk-järgult nõrgenema ainult siis, kui rakud kasvasid ja jagunesid. Selle käigus GFP molekulide arv raku kohta vähenes pidevalt (joonis 4, paneel A). Juhul, kui rakud ei jagunenud, jäi GFP signaal neis jätkuvalt intensiivseks (joonis 4, paneel B). GFP signaali tugevuse muutumist kasutati rakkude jagunemise indikaatorina ning seda jälgiti läbivoolutsütomeetri abil.

### 4.1. Kõik rakud *E. coli* populatsioonis on ühesuguse jagunemisvõimega nii eksponentsiaalses faasis kui ka statsionaarses faasis

Esmalt analüüsiti *E. coli* rakkude jagunemisvõimet rikkas söötmes (LB), olukorras, kus toitained oli piisavalt ning bakterite arv suurenes eksponentsiaalselt (joonis 5). Joonisel 5, paneelil A esitatud histogrammidel on näha, kuidas rakkude GFP sisaldust kajastav kõver nihkub pärast induktori eemaldamist ajas järk-järguliselt ja ühtlaselt nõrgema GFP signaali suunas. Sellest tulenevalt võib öelda, et eksponentsiaalse faasi rakud *E. coli* populatsioonis jagunevad ühesuguse kiirusega.

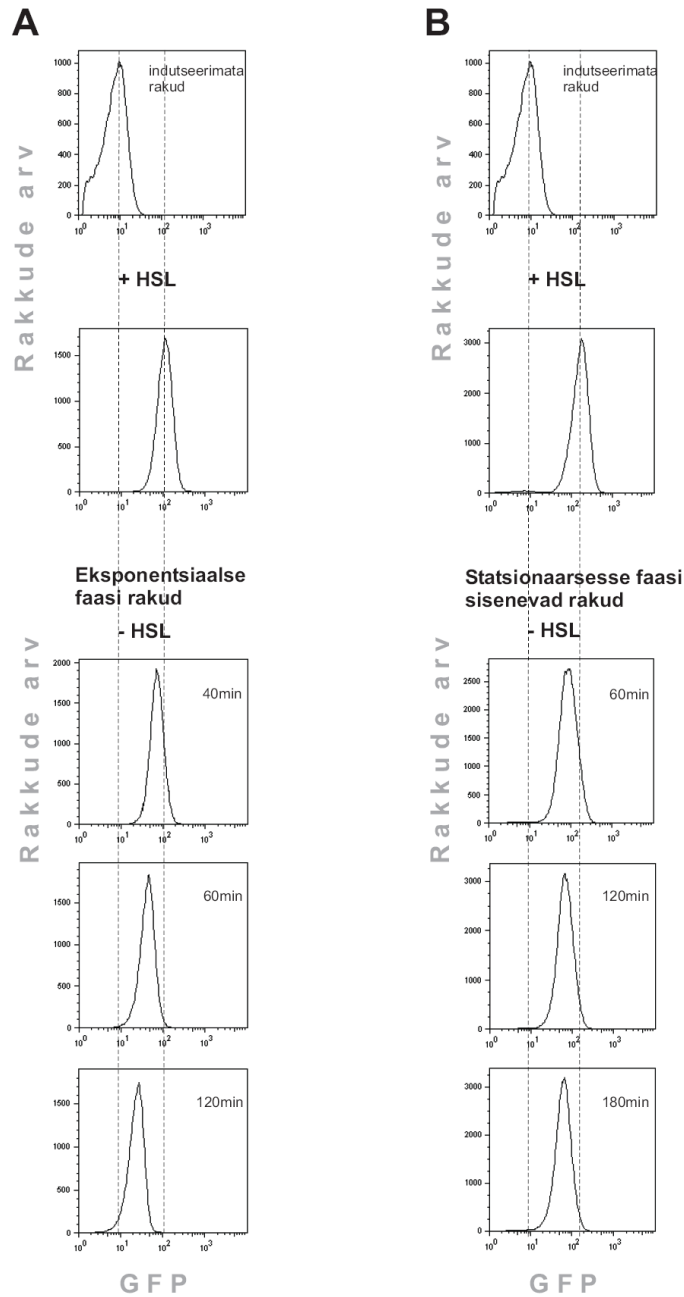
Sama väide kehtib ka olukorras, kus toitained hakkavad kasvukeskkonnast ammenduma ning rakkude jagunemine aeglustub. GFP signaali ühetaoline järk-järguline nõrgenemine statsionaarsesse faasi sisenevas populatsioonis näitab, et ka neis

tingimustes on bakterid individuaalse jagunemissuutlikkuse alusel võrdsed (joonis 5, paneel B).



**Joonis 4.** Lihtsustatud skeem bakterite jagunemise ning selle jälgimise kohta GFP reportergeeni signaali tugevuse alusel, kasutades läbivoolutsütomeetriat. Paneelil A on kujutatud olukorda, kus kõik bakterid kultuuris jagunevad. Paneelil B on kujutatud olukorda, kus ükski bakter kultuuris ei jagune. Pidevad rohelised nooled tähistavad induktori lisamist või eemaldamist. Pidevad mustad nooled tähistavad jagunemiste toimumist, katkendlikud nooled seda, et bakter ei jagunenud.

Tõenäoliselt veedavad nii mõnedki bakterid oma looduslikus keskkonnas enamuse elutsüklist statsionaarse faasi populatsioonidena. Kõige tavalisemalt iseloomustatakse kirjanduses statsionaarset faasi kui elutsükli faasi, milles rakkude kasv ning jagunemine on peatunud. Statsionaarses faasi rakkude arvukust ja eluvõimet jälgitakse tavaliselt kolooniate moodustamise võime järgi. Kuna kolooniate arv bakterikultuuri ruumalaühiku kohta püsib reeglina üsna pika aja vältel muutumatuna, ongi laialt levinud seisukoht, et statsionaarses faasis rakkude jagunemist ei toimu (Siegele jt, 1993). Konkreetset eksperimentaalset alust niisugusel seisukohal tegelikult pole, sest seda, mis toimub vedelkultuuris statsionaarse faasis, pole üksikute rakkude tasemel varem



**Joonis 5.** Üksikute rakkude jagunemine *E. coli* eksponentsiaalse faasi kultuuris ning statsionaarsesse faasi sisenevas kultuuris. *E. coli* MG1655 pMSLuxR bakterite üleõökultuurid lahjendati värskesse LB söötmesse (50 µg/ml Km) ja kasvatati kuni optilise tiheduseni 0,6. Seejärel indutseeriti rakkudes 1 h jooksul HSL-ga reportergeeni *gfpmut2* ekspressioon. Eksponentsiaalse faasi rakkude jagunemisvõime analüüsimiseks (paneel A) lahjendati kultuur alla 0,05 OD ühikuni ja lasti rakkudel kasvada. Statsionaarsesse faasi siseneva kultuuri jagunemisvõime hindamiseks (paneel B) kasvatati seda edasi kuni tiheduseni 2 OD ühikut. Siis rakud pesti, suspendeeriti konditsioneeritud LB söötmes ning lasti kasvada. Osutatud ajapunktidel võeti kultuuridest proovid ning analüüsiti läbivoolutsütomeetri abil. Graafikute X-telg tähistab GFP signaali intensiivsust, Y-telg rakkude arvu.

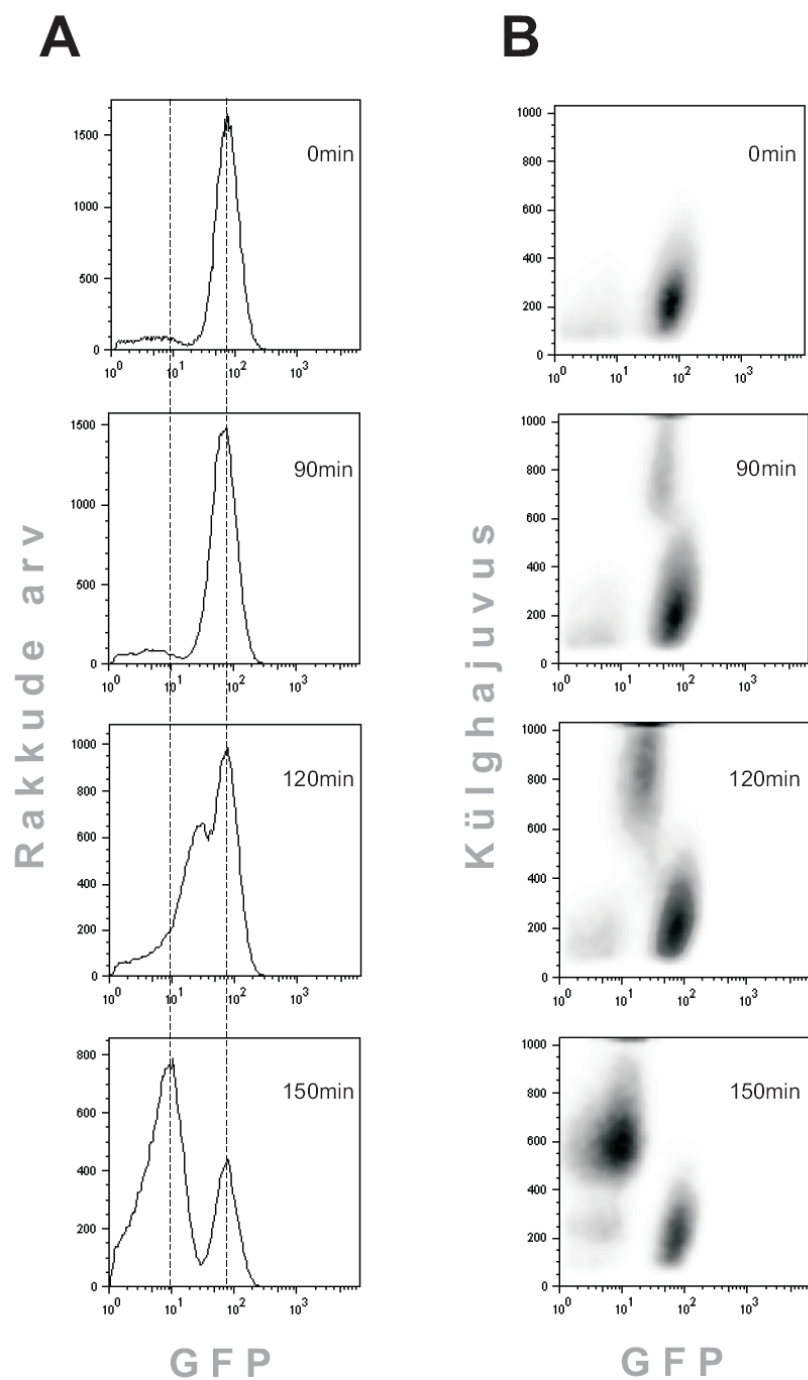
uuritud. Käesolevas töös kasutatud GFP väljalahjenemise meetod pakub sellele käibetoole ka eksperimentaalse tõestuse. Isegi mitu päeva statsionaarses faasis viibinud populatsioonis rakkude GFP signaal ei nõrgenenud, mis on märk sellest, et rakkude jagunemist statsionaarses faasis tõepoolest ei toimu (andmeid pole näidatud).

## **4.2. Statsionaarses faasis toimub *E. coli* populatsiooni eristumine kaheks erineva jagunemisvõimega alamhulgaks**

Eelnevast peatükist on selge, et bakterid peavad tihtilugu saama hakkama tingimustes, kus toitained keskkonnas pole. Neis oludes ongi bakterid oma elutsükli statsionaarses faasis ning nad ei kasva ega jagune. Aeg-ajalt muutuvad toitained siiski ka looduslikes oludes kättesaadavaks, kuid seda tavaliselt harva ja väheses koguses. Seetõttu on bakteriraku jaoks väga oluline statsionaarsest suikvelolekust kiiresti toibuda ning võimalikult kiiresti jagunema hakata.

Selleks, et imiteerida äsjakirjeldatud olukorda ning saada teada, kas kõik bakterid suudavad keskkonnatingimuste paranemisele reageerida, jälgiti *E. coli* rakkude jagunemist pärast statsionaarse faasi kultuuri lahjendamist värskesse söötmesse (joonis 6, paneel A). Selgub, et sellises olukorras ei suuda sugugi mitte kõik rakud jagunemist alustada. GFP signaal nõrgeneb vaid osades rakkudes, samas kui enamik baktereid jääb eredalt fluorestseeruvaks (joonis 6, paneel A, 120 min ajapunkt). Seega jaotub populatsioon statsionaarsest faasist toibumisel jagunemisvõime alusel kaheks erinevaks alamhulgaks.

Lisaks ilmneb läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil, et peale GFP signaali lahjenemise on olemas veel üks parameeter, mis võimaldab ennustada, kas rakud suudavad jagunema hakata või mitte. Selleks on külghajuvus, mille väärtus suureneb vahetult enne bakteri jagunemist ja võimaldab tulevasi jagunemisvõimelisi rakke tuvastada veel enne seda, kui pooldumine tegelikult toimub (joonis 6, paneel B, 90 min ajapunkt). Kui imetajarakkudel on külghajuvus raku granulaarsust (näiteks organelide rohkust) kirjeldav parameeter, siis selle mõiste täpne sisu bakterirakkudes on teadmata. Käesoleva töö raames tehti kindlaks, et külghajuvuse tõus korreleerub nii makromolekulide hulga (valgu- ja nukleiinhappesisaldus) kui ka raku üldiste mõõtmete suurenemisega (andmeid pole näidatud).



**Joonis 6.** *E. coli* rakkude toibumine statsionaarsest faasist. *E. coli* MG1655 pMSLuxR üleökultuurid lahjendati värskesse LB söötmesse (50  $\mu\text{g/ml}$  Km) ja kasvatati kuni tiheduseni 0,6 OD ühikut. Seejärel lisati kultuurile *gfpmut2* reportergeeni ekspressiooni indutseerimiseks HSL ja lasti veel kasvada. Statsionaarsest faasist toibuvate rakkude osakaalu hindamiseks lahjendati 24 h statsionaarses faasis viibinud kultuur värskesse söötmesse tiheduseni 0,05 OD ühikut. Osutatud ajapunktidel võeti allalahjendatud kultuurist proovid ning analüüsiti läbivoolutsütomeetri abil. Graafikute X-telg tähistab GFP signaali intensiivsust, Y-telg rakkude arvu (paneel A) või külghajuvust (paneel B).

### 4.3. Statsionaarsest faasist toibujate osakaal populatsioonis sõltub kasvukeskkonnast

Kuigi mittejagunev olek on iseloomulik kõikidele statsionaarse faasi kultuuridele, võib rakkude füsioloogiline seisund siiski varieeruda ning oleneb kindlasti varasematest kasvutingimustest (Mason & Egli, 1993). Sõltuvalt söötmetest, on erinev näiteks oksüdatiivse kahjustuse ulatus *E. coli* statsionaarse faasi rakkudes (Ballesteros jt, 2001). Samuti on leitud, et vaesemates kasvukeskkonnas statsionaarsesse faasi jõudnud kultuurides säilivad bakterirakud kauem ning suuremal hulgal eluvõimelistena (Siegele jt, 1993).

Ülaltoodud arvestades näis olevat üheks viisiks leida põhjuseid, mille alusel eristub bakterikultuuris kaks alamhulka statsionaarsest faasist toibumisel, muuta bakterite kasvukeskkonda ning selgitada välja, kas erinevates tingimustes statsionaarsesse faasi jõudnud bakterikultuurid sisaldavad erineval hulgal statsionaarsest faasist toibuvaid rakke. Selleks kasvatati baktereid mitmetes erinevates söötmetes ning vaadeldi, kuidas nad suudavad pärast statsionaarses faasis viibimist värskes söötmes taas kasvama hakata. Kõikidel juhtudel kasutati toitainerikka keskkonna taastamiseks sama söödet, milles populatsioon algselt kasvas. Statsionaarsest faasist toibuvate rakkude osakaal kogu populatsioonis arvatati esimesel ajapunktil, mil GFP *versus* külghajuvus teljestikus eristus algsest rakupilvest nõrgema GFP signaaliga ja suurema külghajuvuse signaaliga alamhulk (joonis 6, paneel B näitel 120 minuti ajapunkt). Saadud numbreid ei tohiks käsitleda absoluutsete väärtustena mingist söötmetest toibuvate rakkude osakaalu kirjeldamiseks, vaid pigem kui üldisi hinnanguid, mis võimaldavad erinevates söötmetes toimuvat omavahel võrrelda.

Joonisel 7 esitatud andmetest selgub, et kõikides kasvukeskkondades väheneb statsionaarsest faasist toibuvate rakkude hulk ajas järk-järguliselt. Nii toitainetevaesemates kui ka toitainerikastes kasvutingimustes väheneb pärast statsionaarset faasi kasvama hakkavate rakkude osakaal ajas pidevalt, kuid vaesemates söötmetes on toibujaid alati rohkem kui rikastes söötmetes samal ajal.

Kõige lühemat generatsiooniaega võimaldanud söötmetes (2YT, LB, MOPS Glu +AA; tabel 4) kasvanud bakteritest suudab isegi pärast suhteliselt lühiajalist statsionaarses

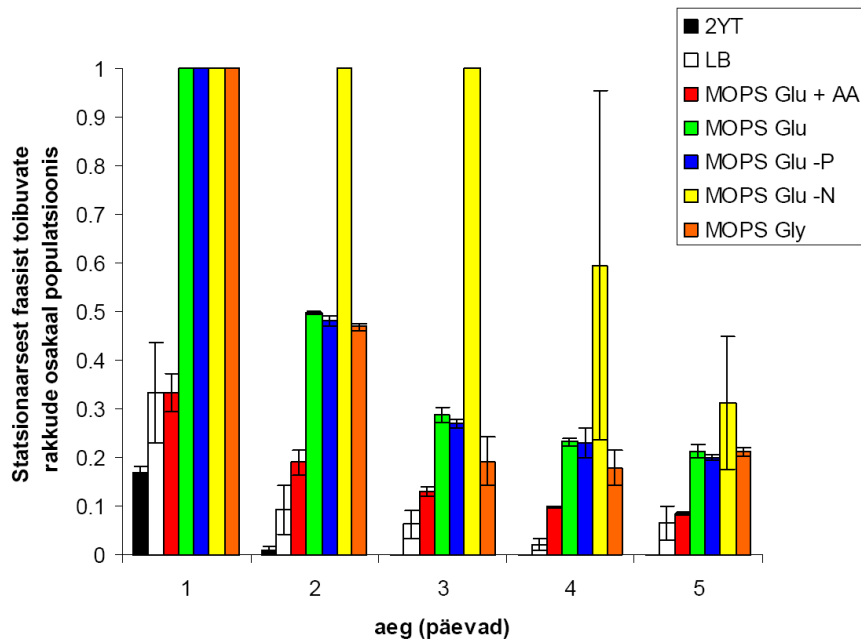
faasis viibimist (joonis 7, esimene päev) soodsate tingimuste taastumisel jagunema hakata vaid väike osa (alla 40%). Veelgi enam, eksponentsiaalses faasis kõige kiiremat kasvu võimaldanud 2YT söötme statsionaarsest faasist 3 päeva möödudes rakud enam ei toibugi (joonis 7, mustad tulbad).

**Tabel 4.** *E. coli* MG1655 generatsiooniajad erinevates söötmetes

Sööde	Minimaalne generatsiooniaeg eksponentsiaalses faasis
2YT	26 min
LB	34 min
MOPS Glu +AA	38 min
MOPS Glu	65 min
MOPS Glu –P	66 min
MOPS Glu –N	70 min
MOPS Gly	100 min

Vaesemates söötmetes (MOPS Glu, MOPS Glu –P, MOPS Glu –N, MOPS Gly) kasvanud rakupopulatsioonide kõik liikmed on võimelised pärast lühiajalist statsionaarset faasi taas jagunema hakkama (joonis 7, esimene päev). Samas ei sõltu jagunemisvõimeliste rakkude osakaal bakterite kasvukiirusest antud söötmes. Glütserooli süsinikuallikana sisaldavas vaeses söötmes (MOPS Gly) on rakkude generatsiooniaeg eksponentsiaalses faasis, võrreldes näiteks glükoosipõhise (MOPS Glu) vaese söötmega, tunduvalt pikem (tabel 4). Statsionaarsest faasist toibuda suutvate rakkude alamhulk on neis kahes söötmes aga kõikides ajapunktides võrreldava suurusega (joonis 7, rohelised ja oranžid tulbad).

Erinevate kasvukeskkondade võrdluses on silmapaistvaks erandiks lämmastikuvaene sööde (joonis 7, kollased tulbad). Kõik lämmastikuvaeses söötmes kasvanud rakud suudavad toitainete kättesaadavaks muutudes hakata jagumena isegi pärast kolmepäevalist statsionaarset faasis viibimist. Kui arvestada veel sellega, et kõige kehvemini suudavad statsionaarsest faasist toibuda peptiide või aminohappeid sisaldavates söötmetes kasvanud rakud (2YT, LB, MOPS Glu +AA), võib järeldada, et just kasvukeskkonna lämmastikusisaldus on see tegur, millest sõltub kui palju rakke populatsioonis on võimelised pärast statsionaarset faasi taas jagunema hakkama.



**Joonis 7.** *E. coli* rakkude toibumine erinevatest statsionaarse faasi tingimustest. Erinevates söötmetes kasvanud *E. coli* MG1655 pETgfpmut2-AGGAGG(3) üleöökultuurid lahjendati vastavatesse värskettesse söötmetesse (25 µg/ml Km) 0,05 OD ühikuni ja lisati GFP ekspressiooni indutseerimiseks IPTG (lõppkontsentratsiooniga 1 mM). Kultuuridel lasti kasvada statsionaarsesse faasi. 5 päeva jooksul lahjendati kultuurid osutatud ajapunktidel vastavatesse värskettesse söötmetesse ning vaadeldi läbivoolutsütomeetrial, kui suur osa populatsioonist suudab taas jagunema hakata. Joonisel on toodud kolme katse põhjal arvatud keskmised jagunema hakkavate rakkude osakaalud koos standardhälvetega.

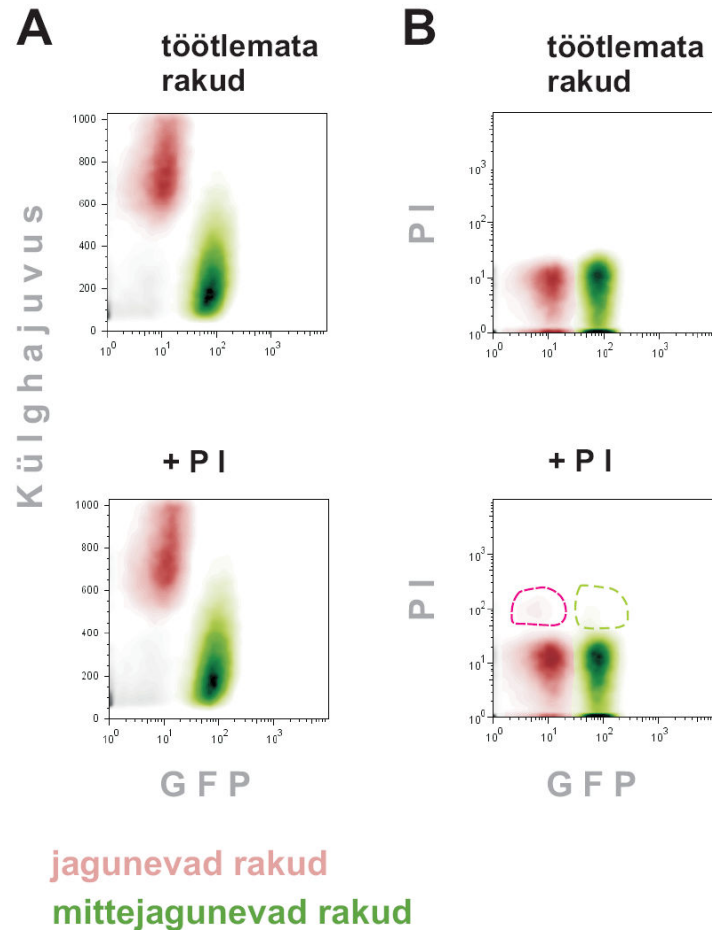
#### 4.4. Ei jagunev ega ka mittejagunev alampopulatsioon *E. coli* statsionaarsest faasist toibuvas kultuuris ei sisalda surnud rakke

Teatavasti hakkavad statsionaarse faasi kultuurides bakterid mõne aja möödudes surema. Nn surmafaas saabub kirjanduses esitatud andmete põhjal (Siegele jt, 1993) tunduvalt hiljem kui toimub populatsiooni diferentseerumine jagunemisvõime alusel (joonis 7). Samas on siiski võimalik, et need kaks leitud alamhulka erinevad teineteisest elusate ja surnud rakkude sisalduse poolest.

Selleks, et hinnata surnud bakterite osakaalu kummaski alamhulgas, töödeldi juba jagunema hakanud bakterikultuuri propiidiumjodiidiga. See on värv, mis pääseb vaid kahjustatud membraaniga rakkudesse ning on laialdaselt kasutatav surnud rakkude markeerimiseks (Nebe-von-Caron jt, 2000). Joonisel 8 esitatud tulemustest ilmneb aga



esiteks, et bakteripopulatsioonis on propiidiumjodiidiga värvunud ehk surnud rakke suhteliselt vähe (joonis 8, paneel B, roosa ja roheline punktiirjoonega ümbritsetud rakupilved). Teise olulise tulemusena selgub, et nii jagunev kui ka mittejagunev alamhulk (joonis 8, paneel B, roosa ja roheline punktiirjoonega ümbritsetud rakupilved) sisaldavad ühtviisi vähe kahjustatud membraaniga rakke. Seega ei tulene ühe alamhulga jagunemisvõimetus sellest, et enamik rakke selles alamhulgas oleksid surnud.

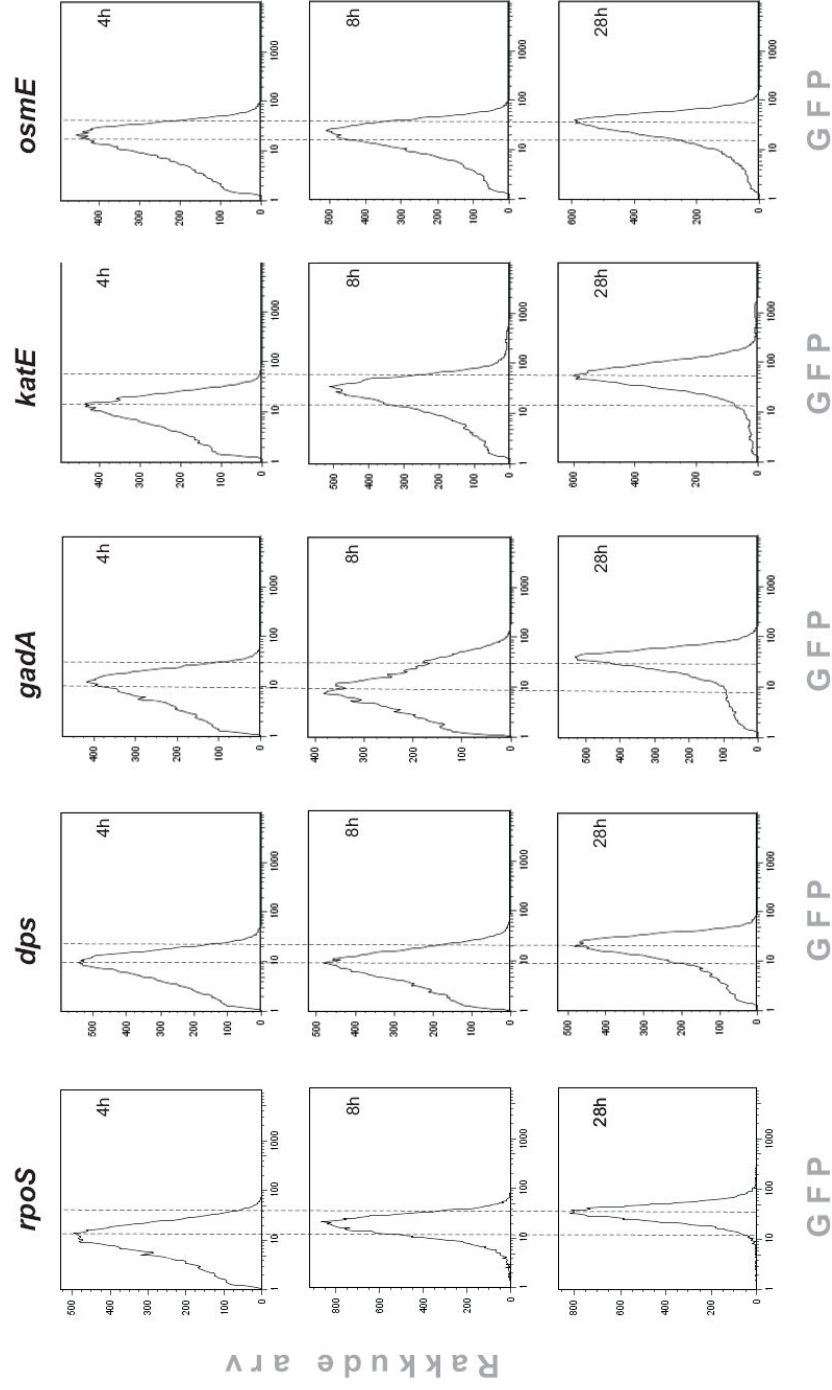


**Joonis 8.** Kahjustatud membraaniga rakkude osakaal jagunevas- ja mittejagunevas alampopulatsioonis. *E. coli* MG1655 pMSLuxR üleökultuur lahjendati värskesse LB söötmesse (50 µg/ml Km) ja kasvatati kuni tiheduseni 0,6 OD ühikut. Siis lisati reportergeeni *gfpmut2* ekspressiooni indutseerimiseks HSL ja lasti rakkudel jõuda statsionaarsesse faasi. 24 h statsionaarses faasis viibinud kultuur lahjendati taas värskesse söötmesse tiheduseni 0,05 OD ühikut ja kasvatati 2 h. Pärast seda rakud fikseeriti 24 h jooksul jääkülmas etanoolis ja jagati kaheks. Üks pool jäeti värvimata (ülemised graafikud, A ja B). Teine pool värviti propiidiumjodiidiga (PI). Joonisel on esitatud läbivoolumeetrilisel analüüsil saadud graafikud. X-telg tähistab GFP signaali intensiivsust ja Y-telg külghajuvust (paneel A) või PI signaali intensiivsust (paneel B).

#### **4.5. Bakteri stressivastuses osalevad geenid on ekspresseeritud kõikides statsionaarsesse faasi jõudnud rakkudes**

Üks tõenäolisi põhjuseid, miks osa baktereid pärast pikaajalist nälgimist enam kasvama hakata ei suuda, võib peituda nende defektses stressivastuses. Selle väljaselgitamiseks otsustati hinnata olulisemate statsionaarsele faasile spetsiifiliste geenide ekspressiooni ühe raku tasemel. Valiku aluseks oli konkreetsete geenide tugev ekspressioonitase statsionaarses faasis, osalus stressivastuse erinevates radades ning ekspressiooni erinev kineetika. Vaadeldi statsionaarse faasi peamist  $\delta$  faktorit,  $\delta^S$ -i, mille olemasolust sõltub nälgivates bakterirakkudes erinevatel andmetel enam kui 30 geeni transkriptsioon (Hengge-Aronis, 1993; Lacour & Landini, 2004; Shimada jt, 2004). Lisaks jälgiti veel nelja olulist  $\delta^S$ -i märklauda – *dps*, *gadA*, *katE*, *osmE*. *Dps* kodeerib valku, mis on *E. coli* nukleoidi peamine komponent statsionaarses faasis (Ali Azam jt, 1999). *Dps* pakib bakteri kromosoomi tihedaks struktuuriks ja kaitseb seda näiteks aktiivsete hapnikuradikaalide eest (Martinez & Kolter, 1997). *GadA* on üks kõige kõrgemini ekspresseeritud geene statsionaarses faasis (Shimada jt, 2004; Weber jt, 2005). Selle produkt glutamaadi dekarboksülaas A funktsioneerib *E. coli* happestressi vastuses (De Biase jt, 1999). Katalaas (*katE*) neutraliseerib reaktiivseid hapnikuühendeid, redutseerides vesinikperoksiidi hapnikuks ja veeks (Schellhorn & Hassan, 1988). *OsmE* kodeerib välismembraani lipoproteiini, mida ekspresseeritakse ohtralt nii rakkude sisenemisel statsionaarsesse faasi kui ka osmootse stressi korral (Conter jt, 1997). Nimetatud geenide regulaatoralad (hõlmasid ka vastava geeni startkoodonit) kloneeriti GFP-d kodeeriva reportergeeni järjestuse ette, vastavat konstrukti sisaldavad plasmiidid transformeeriti *E. coli* rakkudesse ning seejärel jälgiti GFP signaali akumulereerumist erinevates kasvufaasides.

Kõikide vaadeldud geenide ekspressioonimäär tõuseb ajas järk-järguliselt ning saavutab oma kõrgeima taseme statsionaarse faasi rakkudes (joonis 9). Siiski on ilmne, et uuritud geenide ekspressioon ei suurene ühesuguse kineetikaga. 8 tunni möödudes ehk statsionaarsesse faasi sisenevas kultuuris on *rpoS*, *katE* ja *osmE* geenide ekspressioon oluliselt tõusnud, samal ajal kui *dps* ja *gadA* geenide ekspressioonis pole erilisi muutusi toimunud. *gadA* ekspressioonis on 8 h ajapunktis näha ka teatav heterogeensuse tõus võrreldes 4 h ajapunktiga. Samas ei saa väita, et tegemist oleks



**Joonis 9.** Erinevate stressivastuses osalevate geenide ekspressioon *E. coli* populatsioonis. *E. coli* MG1655 kolooniaga, mis sisaldasid kas pRpoSmut2, pJBdps, pJBgadA, pJBkatE või pJBosmE plasmide, inokuleeriti LB vedelsööde (10 µg/ml Cm või 15 µg/ml Tet). Osutatud ajahetkedel võeti kultuuridest proovid ning analüüsiti reportergeeni ekspressiooni alusel läbivoolutsütomeetrit. Graafikute X-telg tähistab GFP ekspressioonimäära, Y-telg rakkude arvu.

binaarse ekspressiooniprofiiliga. Statsionaarse faasi populatsioon (28 h ajapunkt) on kõikide vaadeldu geenide ekspressiooni alusel suhteliselt homogeenne. Sellest lähtuvalt võib öelda, et statsionaarse faasi *E. coli* kultuuri eristumine kaheks erineva jagunemisvõimega alamhulgaks ei tulene erinevustest stressivastuses osalevate geenide ekspressioonis üksikute rakkude vahel.

#### **4.6. Rakud, mis suudavad indutseerida statsionaarses faasis reportergeeni ekspressiooni, hakkavad pärast statsionaarset faasi kasvama**

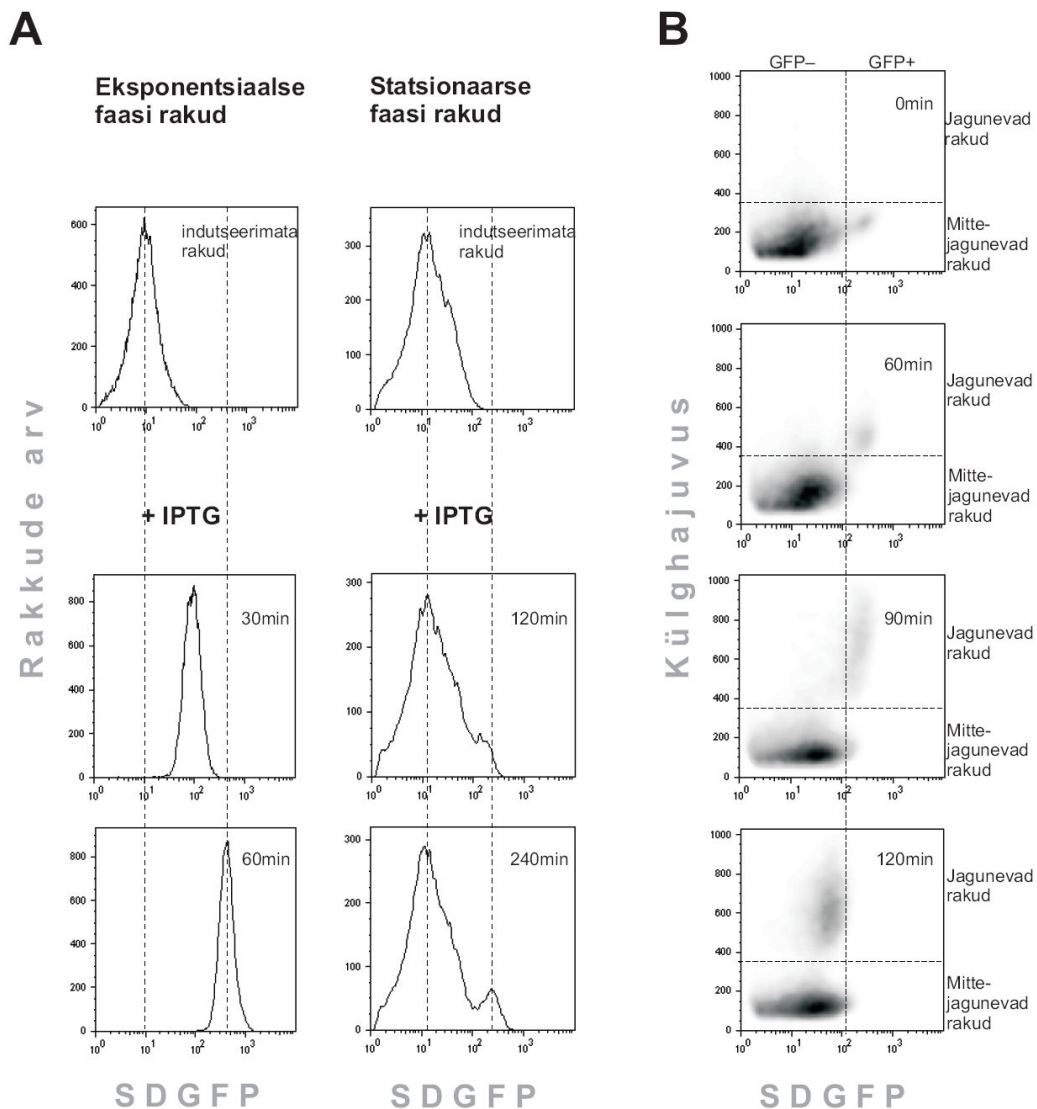
Kui bakterid satuvad toitainetevaesest keskkonnast ümbrusse, kus toitaineid on piisavalt, ei hakka nad sugugi mitte kohe poolduma. Esmalt rakud adapteeruvad uute oludega ning hakkavad seejärel sünteesima kasvuks ja jagunemiseks vajalikke komponente. Võib väita, et statsionaarsest faasist toibumine sõltub suurel määral raku suutlikkusest indutseerida toitainerikkasse keskkonda sattudes kiiresti uute valkude süntees. Võimalik, et *E. coli* rakud on geeniekspressiooni võime alusel diferentseerunud juba nälgivas populatsioonis. Juhul, kui keskkonnatingimused paranevad, ilmneb selline lahkumine rakkude suutlikkuses või suutmatuses taas jagunema hakata.

Selle hüpoteesi kontrollimiseks vaadeldi *E. coli* rakkude võimet indutseerida reportergeeni ekspressiooni statsionaarses faasis. Selleks transformeeriti *E. coli* rakkudesse plasmiidid, milles GFP ekspressiooni (edaspidi SDGFP) kontrollivad *tac* promootor ja erinevad translatsiooniinitsiatsiooniregioonid (tabel 2). Translatsiooniinitsiatsiooni efektiivsust tagav piirkond sisaldas erineva tugevusega SD järjestusi (lisa 1; Vladimir Vimberg, avaldamata andmed), mille toimet võimendas kas GC-rikas nõrk enhanser (Komarova jt, 2002) või AU-rikas tugev enhanser (Komarova jt, 2002). 24 h LB söötmes statsionaarses faasis viibinud bakterikultuurile lisati reportergeeni ekspressiooni indutseerimiseks IPTG-d. Kuna transkriptsiooni tasemel on reportergeeni ekspressioon kõigis neis konstruktidest sarnaselt reguleeritud ja erinevused on vaid translatsiooni efektiivsust tagavas regulaatorpiirkonnas, siis peaksid konstruktiivahelised erinevused GFP ekspressioonis eelkõige peegeldama erinevusi valgusünteesis.

Geeniekspressiooni toimumiseks on statsionaarses faasis vaja väga head translatsiooniinitsiatsiooniregiooni (lisa 2): tugevat AU-rikast enhanserit (Komarova jt, 2002) koos väga hästi konsensusele vastava SD järjestusega (lisa 1). Isegi nende järjestuselementide olemasolul ekspresseeritakse SDGFP-d vaid suhteliselt vähestes rakkudes. Kui enhanser on nõrgem (GC-rikas) (Komarova jt, 2002) või puudub, siis ei suuda nälgitud rakud enam üldse SDGFP ekspressiooni aktiveerida, või siis indutseeritakse see väga madalal tasemel üksikutes rakkudes. Samuti ei initsieerita statsionaarses faasis translatsiooni konsensusele mittevastavatelt SD järjestustelt (lisa 2).

Kõige suuremas hulgas statsionaarse faasi rakkudes reportergeeni ekspressiooni taganud konstrukti varal (AU-rikas enhanser koos AGGAGG SD järjestusega) võrreldi geeniekspressiooni kineetikat eksponentsiaalse ja statsionaarse faasi rakkude vahel (joonis 10, paneelid A ja B). Tulemused näitavad, et eksponentsiaalses faasis indutseeritakse SDGFP ekspressioon kiiremini ning see toimub kõikides rakkudes (joonis 10, paneel A). Seevastu võtab statsionaarses faasis SDGFP sünteesimine tunduvalt rohkem aega ning sellega saavad hakkama vaid vähesed bakterid (joonis 10, paneel B).

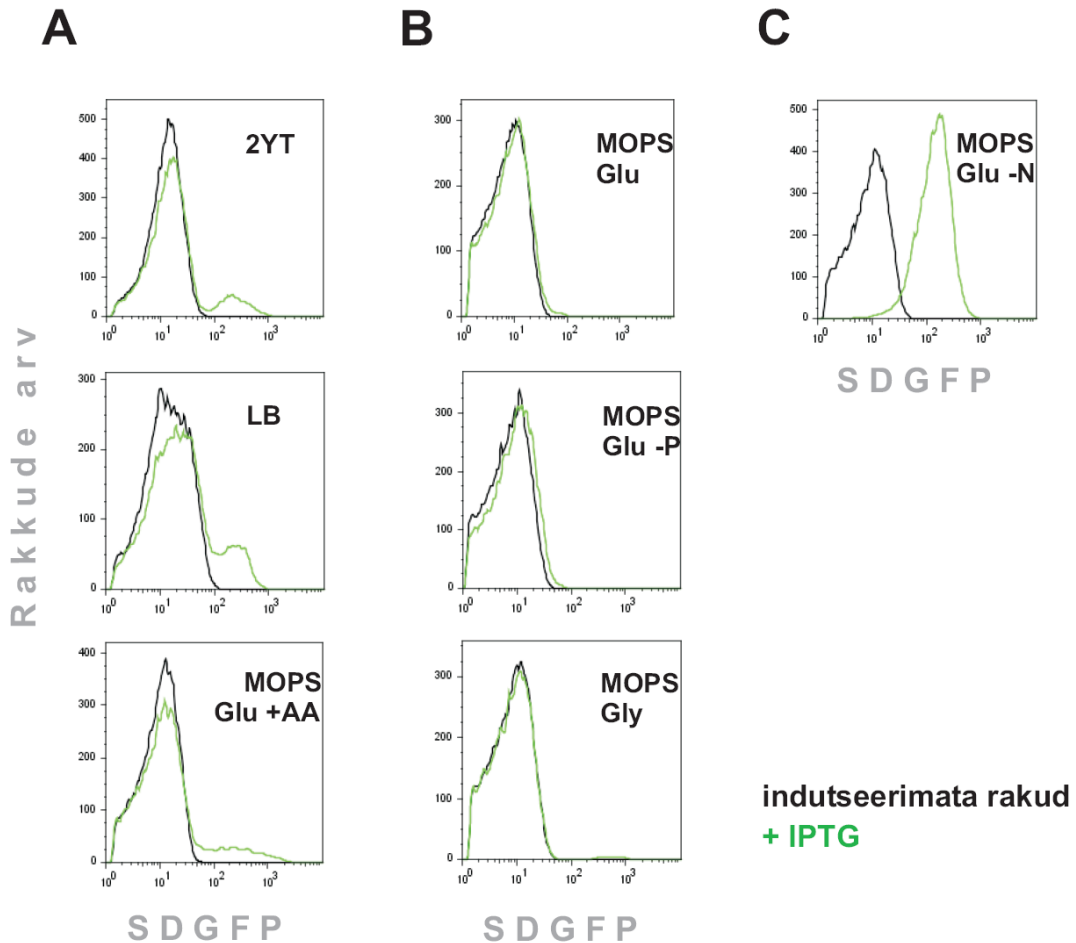
Statsionaarses faasis SDGFP-d ekspresseerivate bakterite osakaal (joonis 10, paneel B) on võrreldav statsionaarsest faasist toibuvate rakkude osakaaluga populatsioonis (joonis 6). Katses, mille käigus jälgiti erineva geeniekspressiooni võimega alamhulkade jagunemisvõimet pärast kultuuri lahjendamist värskesse söötmesse selgub, et tegemist on kattuvate alamhulkadega populatsioonis (joonis 10, paneel C). Graafikutel on näha, et külghajuvuse signaal, mille tõus võimaldab tuvastada tulevase jagunevaid rakke (joonis 6, paneel B), suureneb eelkõige SDGFP-d ekspresseerivas rakupilves (joonis 10, paneel C). Seega on rakud, mis suudavad statsionaarses faasis indutseerida reportergeeni ekspressiooni, suure tõenäosusega ka need, mis hakkavad toitainete kättesaadavaks muutudes jagunema.



**Joonis 10.** *E. coli* eksponentsiaalse ja statsionaarse faasi rakkude võime indutseerida reportergeeni ekspressiooni. Reportergeeni induksiooni ja jagunemisvõime seos statsionaarse faasi kultuuris. *E. coli* MG1655 pETgfpmut2-AGGAGG(3) üleökultuur lahjendati värskesse LB söötmesse (25 µg/ml Km) tiheduseni 0,05 OD ühikut. Eksponentsiaalse faasi geeniekspressiooni võime jälgimiseks indutseeriti 2 h pärast 0,1 mM IPTG-ga reportergeeni ekspressioon (paneel A). Statsionaarse faasi geeniekspressiooni võime jälgimiseks lasti kultuuril esmalt 24 h statsionaarses faasis viibida ning seejärel indutseeriti 1 mM IPTG-ga reportergeeni ekspressioon (paneel B). Statsionaarse faasi geeniekspressiooni võime ja jagunemissuutlikkuse seoste analüüsimiseks lahjendati paneeli B 240 min ajapunkt värskesse söötmesse ning lasti kasvada (paneel C). Osutatud ajapunktidel võeti kultuuridest proovid ning analüüsiti läbivoolutsütomeetril. Graafikute X-telg tähistab GFP signaali intensiivsust, Y-telg rakkude arvu (paneelid A ja B) või külghajuvust (paneel C).

#### 4.7. *E. coli* rakkude võime indutseerida statsionaarses faasis geeniekspressiooni sõltub kasvukeskkonnast

Rakkude toibumine statsionaarsest faasist sõltub nende kasvukeskkonnast (joonis 7) ning korreleerub rakkude võimega indutseerida statsionaarses faasis reportergeeni SDGFP ekspressiooni (joonis 10). Järgnevalt võrreldi 24 h erinevates söötmetes statsionaarses faasis viibinud rakkude geeniekspressioonivõimet.



**Joonis 11.** *E. coli* statsionaarse faasi rakkude võime indutseerida reportergeeni ekspressiooni erinevates söötmetes. Erinevates söötmetes kasvanud *E. coli* MG1655 pETgfpmut2-AGGAGG(3) üleökultuur lahjendati sama koostisega värskettesse söötmetesse (25 µg/ml Km) tiheduseni 0,05 OD ühikut ning kasvatati statsionaarsesse faasi. Statsionaarse faasi geeniekspressioonivõime jälgimiseks lasti kultuuril viibida 24 h statsionaarses faasis ning seejärel indutseeriti 24 h jooksul 1 mM IPTG-ga reportergeeni ekspressioon. Paneelil A on analüüsitud aminohappeid sisaldavas söötmes, paneelil B optimaalse lämmastikukontsentratsiooniga söötmes ja paneelil C lämmastikuvaeses söötmes kasvanud rakkude statsionaarse faasi geeniekspressiooni võimet. Graafikute X-telg tähistab reportergeeni SDGFP signaali intensiivsust, Y-telg rakkude arvu.

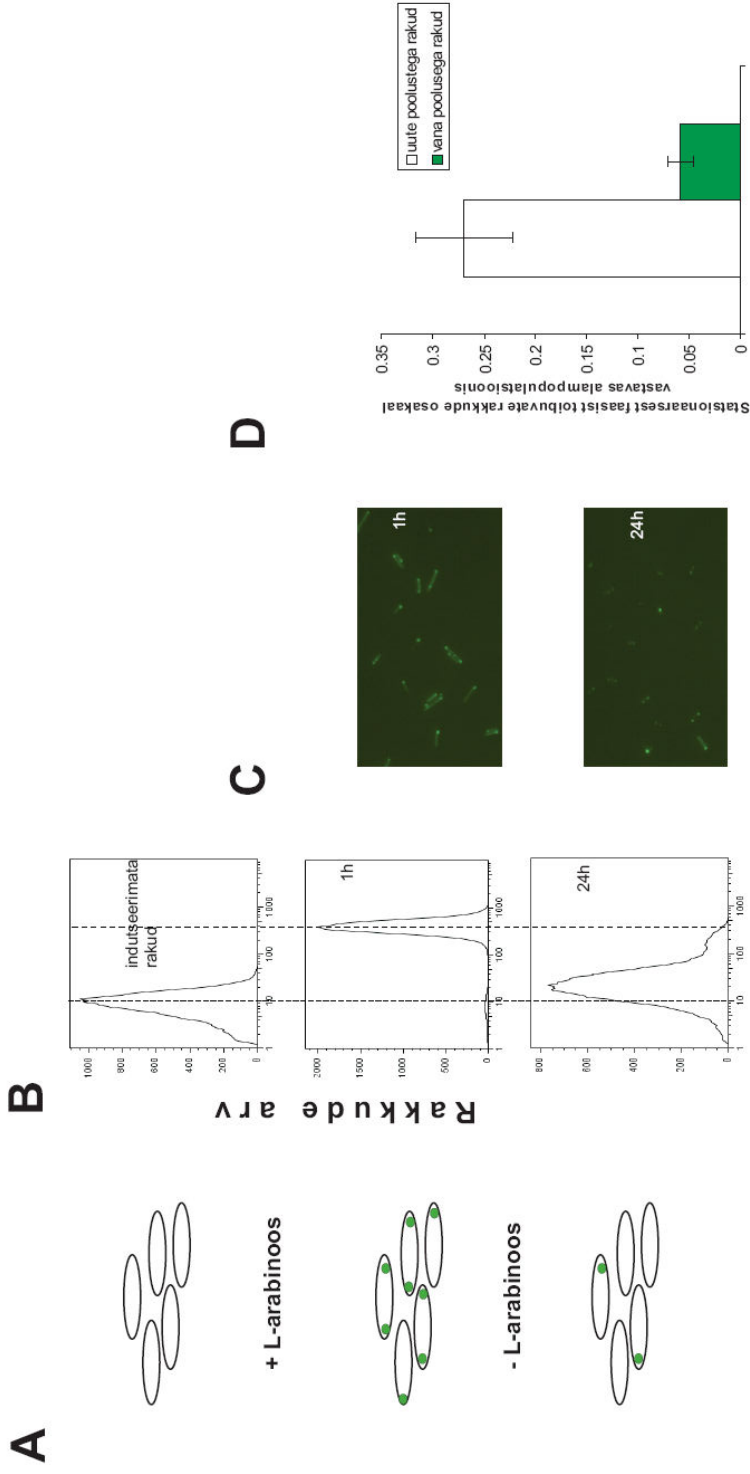
Lämmastikuvaeses söötmes statsionaarsesse faasi jõudnud rakud ekspresseerivad kõik SDGFP-d (joonis 11, paneel C). Peptiide või aminohappeid sisaldavates tingimustes kasvanud statsionaarse faasi bakteritest suudab seda teha vaid väike alamhulk (joonis 11, paneel A). Seega korreleerub 2YT, LB, MOPS Glu +AA ja MOPS Glu –N söötmetes statsionaarses faasis geeniekspressiooni indutseerida suutvate rakkude osakaal statsionaarsest faasist toibuvate rakkude osakaaluga. Teistes vaadeldud söötmetes (MOPS Glu, MOPS Glu –P, MOPS Gly) statsionaarse faasi rakud SDGFP ekspressiooni indutseerida ei suuda (joonis 11, paneel B).

#### **4.8. Jagunemisel vanema pooluse saanud tütararakud toibuvad statsionaarsest faasist kehvemini kui uute poolustega rakud**

Stewart jt (Stewart jt, 2005) näitasid, et raku pooldumisel mitme põlvkonna jooksul vana pooluse pärinud tütararakud on nõ vananenud ning jagunevad eksponentsiaalses kasvufaasis veidi aeglasemalt kui nende uute poolustega kaaslased. Tekkis küsimus, kas erineva vanusega poolustega rakkudel on ka erinev võime statsionaarsest faasist toibuda.

Sellele küsimusele vastamiseks märgistati bakteriraku poolused GFP-ga (edaspidi PGFP). Märke tegemiseks kasutati indutseeritavat reporterkonstrukti, milles *gfpmut2* geeni kodeerivale alale on lisatud ühe poolusele lokaliseeruva valguga, IcsA domeeni, mis tagab ka sünteesitava PGFP paigutumise raku poolusele (Charles jt, 2001). Vastava plasmiidiga transformeeritud *E. coli* rakkudes indutseeriti eksponentsiaalses faasis reportergeeni ekspressioon ning veenduti, et PGFP märgistas tõepoolest rakkude poolused (joonis 12, paneelid B ja C). Seejärel pesti induktor maha ning lasti rakkudel jaguneda. Teoreetiliselt sel ajal enam uusi märgistatud poolusega rakke ei sünteesita ning need rakud, milles poolusel säilib PGFP signaal, on vana poolusega ja Stewart jt definitsiooni järgi ka ise vananenud. Rakupopulatsiooni analüüs 24 h pärast induktori eemaldamist näitabki seda, et PGFP signaal on alles vaid osades rakkudes ning see paigutub endiselt raku poolusele (joonis 12, paneelid B ja C). Seega sobib äsjakirjeldatud meetod rakkude vanade pooluste märgistamiseks.





### PGFP

**Joonis 12.** *E. coli* rakkude pooluste märgistamine. Uute ja vanade poolustega rakkude tobumine stationaarsest faasist. 0,2% glütserooli sisaldavas LB söötmes (100 µg/ml Amp) kasvanud *E. coli* MG1655 pMPR402 kultuur lahjendati samasse värskesse söötmesse tiheduseni 0,05 OD ühikut. Tihedusel 0,4 OD ühikut indutseeriti rakkudes 0,2%-lise L-arabinoosiga 1 h jooksul poolusele paigutuva PGFP ekspressioon (paneelid B ja C, ajapunkt 1 h). Seejärel pesti induktor maha ning lasti rakkudel kasvada stationaarsesse faasi (paneelid B ja C, ajapunkt 24 h). Osutatud ajapunktidel võeti kultuuridest proovid ning analüüsiti läbivoolutsütoometri (paneel B; X-telg tähistab PGFP signaali intensiivsust, Y-telg rakkude arvu) või fluoretsentsmikroskoobi abil (paneel C). Uute ja vanade poolustega rakkude jagunemisvõime hindamiseks lahjendati samaselt märgistatud stationaarse faasi kultuur värskesse söötmesse ning jälgiti külghajuvuse muutuse alusel rakkude kasvama hakkamist. Paneelil D on toodud kolme kaise põhjal arvatud keskmised jagunevate rakkude osakaalud koos standardhälvetega.

Järgmiseks uuriti, kuidas suudavad sel moel märgistatud vanade poolustega rakud võrreldes uued poolused pärinud bakteritega pärast statsionaarse faasi kultuuri lahjendamist värskesse söötmesse taas kasvama ja jagunema hakata. Sarnaselt joonisel 10, paneelil B toodule, kasutati ka selles katses bakterite kasvamise indikaatorina külghajuvuse suurenemist. Statsionaarsest faasist toibuvate rakkude osakaalu hindamiseks arvutati suurenenud külghajuvusega rakkude suhe vanade või uute poolustega rakkude koguhulgas ajapunktis, mil tulevased jagunevad rakud olid juba kasvanud suuremaks kui mittejagunejad, kuid esimene pooldumine polnud veel toimunud (90 min).

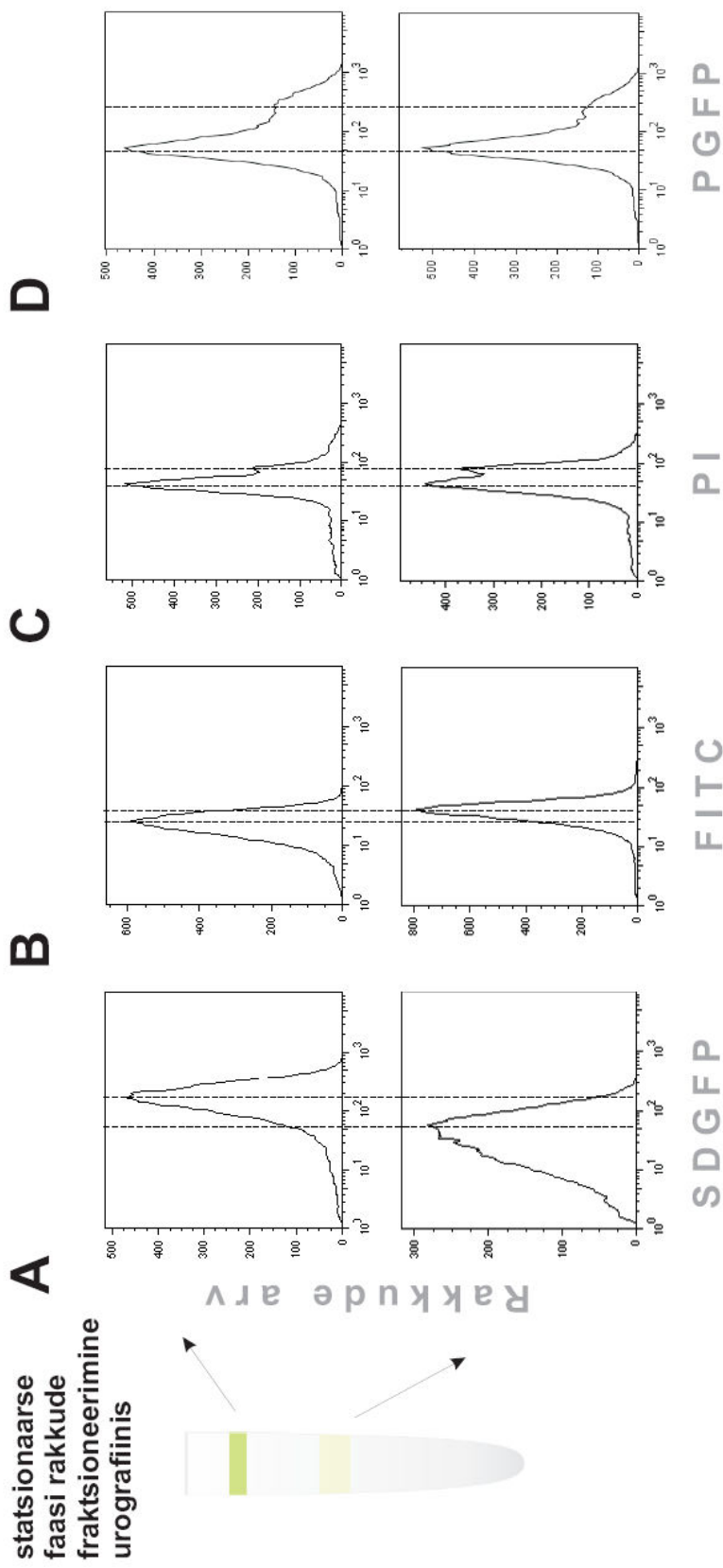
Joonisel 12, paneelil D esitatud tulemustest selgub, et vananenud rakud toibuvad statsionaarsest faasist tunduvalt kehvemini kui nende uute poolustega kaaslased. Uute poolustega rakkudest hakkab toitainete kättesaadavaks muutudes kasvama ligi kolmandik, vana poolusega rakkudest aga kõigest iga kahekümnes rakk. Seega mõjub vana poolus negatiivselt raku võimele statsionaarsest faasist toibuda.

#### **4.9. Erineva geeniekspressioonivõimega *E. coli* alamhulgad on mõneti eristunud ka üldise valgu- ning nukleiinhappesisalduse alusel, kuid sisaldavad nii uute kui vanade poolustega rakke**

Hiljuti avaldatud töös, milles samuti uuriti nälgiva *E. coli* populatsiooni jaotumist kultiveeritavateks ja mittekuultiveeritavateks rakkudeks, kasutati nende füsioloogiliselt erinevate rakkude eraldamiseks tsentrifuugimist urografiinis (Cuny jt, 2005). Sama meetodit kasutades leiti käesolevas uurimuses, et erineva valgusünteesi võimega *E. coli* statsionaarse faasi rakud jaotuvad pärast tsentrifuugimist erinevatesse fraktsioonidesse (joonis 13). Statsionaarses faasis SDGFP-d ekspresseerida suutvad ja statsionaarsest faasist toibuvad rakud on urografiinis väiksema liikuvusega ning moodustavad ülemise fraktsiooni. SDGFP-d mitteekspresseerivad ja statsionaarsest faasist halvemini toibuvad rakud on aga suurema liikuvusega ja moodustavad alumise fraktsiooni (joonis 13, paneel A). Selline tulemus on kooskõlas Cuny jt poolt saadud andmetega (Cuny jt, 2005). Fraktsioneerimine võimaldas kahte uurimisalust alamhulka põhjalikumalt iseloomustada, mida järgnevalt ka tehti.

Lisaks spetsiifiliste geenide erinevale ekspressioonitasemele, on raku füsioloogia seisukohalt olulisteks näitajateks ka üldine valgusisaldus ning ka DNA ja RNA sisaldus. On teada intrigeerivad andmed, et statsionaarses faasis on *E. coli* populatsioon nukleiinhappesisalduse põhjal heterogeenne (Akerlund jt, 1995). Bakterirakud sisaldavad reeglina kas ühte või kahte kromosoomikoopiat. Seega on võimalik, et erinev valgusünteesi võime tuleneb näiteks erinevusest geneetilise materjali hulgas üksikutes rakkudes.

Joonisel 13, paneelil B esitatud histogrammid näitavad, et üldine valgusisaldus (korreleerub FITC signaali intensiivsusega) on uuritavates alampopulatsioonides erinev. Suurema tihedusega ja tulevastes jagunemisvõimetutes rakkudes on üldine valgukontsentratsioon suurem kui neis bakterites, mis soodsate tingimuste saabudes kasvama suudavad hakata. Fraktsioonid erinevad vähesel määral ka üldise nukleiinhappe sisalduse poolest (joonis 13, paneel C). Madalama tihedusega fraktsioon sisaldab valdavalt ühe kromosoomikoopiaga rakke ning vähem neid, milles on kaks kromosoomi. Tulevaste mittejagunevate bakterite fraktsioonis on aga ühe ja kahe kromosoomikoopiaga rakke enam-vähem võrdselt. Uute ja vanade poolusega rakkude (nõrgema ja tugevama PGFP signaaliga) jaotuvus on seevastu mõlemas fraktsioonis ühesugune (joonis 13, paneel D).



**Joonis 13.** Statsionaarse faasi *E. coli* populatsiooni fraktsioneerimine urografiinis ja tsentrifugimisel eristuvate fraktsioonide iseloomustamine. 24 h statsionaarses faasis viibinud fraktsioneeriti urografiinis ning saadud kaks alamhulka analüüsiti statsionaarse faasi valgusünteesivõime (paneel A, *E. coli* MG1655 pETgfpmut2-AGGAGG(3), valgusüntees indutseeritud nagu joonisel 10, paneelil B), üldise valgusisalduse (paneel B; *E. coli* MG1655, värvitud fluorestseinsotiootsüanaadiga - FITC), nukleiinhappesisalduse (paneel C; *E. coli* MG1655, värvitud propiidiumjodiidiga - PI) ja uute ja vanade pooluste sisalduse alusel (paneel D, *E. coli* MG1655 pMPR402; poolused märgistatud nagu joonisel 12, paneelid B ja C). Proovid on analüüsitud läbivoolutsitomeetriga. X-telg tähistab kas SDGFP (paneel A), FITC-i (paneel B), PI (paneel C) või PGFP signaali intensiivsust; Y-telg rakkude arvu.

## 5. ARUTELU

Käesolevas töös uuriti bakterikultuuri fenotüübilist varieeruvust lähtudes bakterirakkude kõige olulisemast omadusest – jagunemisvõimest. Jagunemisvõime hindamiseks töötati välja uudne meetod (joonis 4), mis võimaldab jälgida üksikute bakterite jagunemist vedelsöötmes kasvavas kultuuris. Meetod põhineb bakterirakkude märgistamisel rasketilagundatava fluorestseeruva valgu GFP-ga. Märgise etapiviisiline väljalahjenemine kajastab järjestikku toimuvaid jagunemissündmusi ning võimaldab hinnata seda, kuivõrd ühetaoline või heterogeenne on bakteripopulatsioon üksikute rakkude jagunemisvõime alusel.

Nii eksponentsiaalses faasis kui ka statsionaarsesse faasi sisenedes on *E. coli* rakkude jagunemissuutlikkus populatsioonis ühetaoline ning mingisuguseid mittejagunevaid alamhulki populatsioonis ei esine (joonis 5). Kirjanduses on hinnatud, et neil ajahetkedel on mittejagunevate või väga aeglaselt jagunevate rakkude sagedus populatsioonis vaid üks miljonist kuni üks tuhandest bakterirakust (Moyed & Bertrand, 1983; Keren jt, 2004b). Tegemist on persistoritega. Persistorite hulk populatsioonis on võrdne nende rakkude arvuga, mis on suutnud pärast antibiootikumitöötlust ellu jääda ja kolooniaid moodustada. Käesolevas töös kasutatud meetodi tundlikkus võimaldab eristada rakke, mille esinemissagedus populatsioonis on minimaalselt üks rakk sajast. Seega toetavad saadud tulemused kirjanduses esitatud väiteid, et mittejagunevate rakkude osakaal on kasvavas kultuuris üldiselt väga väike.

Mõnes mõttes on tõik, et statsionaarsesse faasi sisenedes mingisugust eristumist rakkude jagunemisvõimes ei tuvastatud, siiski ka üllatav. Nimelt on Makinoshima jt (Makinoshima jt, 2002) näidanud, et kui *E. coli* kasv aeglustub, siis hakkab rakkude liikuvus *Percoll*-i gradiendis vähehaaval suurenema ning seda mitte pidevalt, vaid astmeliselt, jaotades rakupopulatsiooni tõenäoliselt tiheduse alusel mitmeteks erinevateks alamhulkadeks. See viitab rakkude järk-järgulisele diferentseerumisele, mis

toimub diskreetsete etappide kaupa. Ka geeniekspressiooni analüüs toetab autorite väidet. Mida suurem on bakteri liikuvus *Percoll*-i gradiendis, seda tugevamalt on selles ekspresseeritud statsionaarses faasis olulised geenid ja seda nõrgemalt eksponentsiaalselt kasvavale bakterile iseloomulikud geenid. Kuigi autorid ei anna hinnangut, kui suures hulgas erinevad fraktsioonid rakke sisaldavad, on need fraktsioonid siiski selgesti eristatavad. Kindlasti on alamhulkades piisavalt baktereid, et läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil oleks võimalik tuvastada erinevusi rakkude jagunemiskiirustes. Käesolevas magistritöös esitatud tulemuste põhjal võib väita, et diferentseerumine toimub statsionaarsesse faasis sisenevas kultuuris siiski ainult geeniekspressiooni tasemel ja rakkude jagunemisvõimet see ei mõjuta.

On levinud arvamus, et statsionaarse faasi populatsioonides rakud ei jagune. Niisuguse seisukoha aluseks on andmed, et statsionaarses faasis püsib rakkude võime moodustada kolooniaid pikka aega konstantsena (Siegele jt, 1993). Ühelt poolt võib selle põhjuseks olla tõepoolest fakt, et rakud ei jagune. Teisalt võib statsionaarse faasi populatsioon olla ka pidevas muutumises: osa rakke sureb, teine osa aga jaguneb, toitudes samal ajal surevate rakkude jäänustest. Selline dünaamika tagab samuti kolooniate arvu püsimise muutumatuna. Käesolevas töös kasutatud GFP väljalahjenemise meetod võimaldab kahel ülalkirjeldatud võimalusel vahet teha. Üheski antud töö raames vaadeldud söötmetest ei toimunud rakkudes GFP signaali nõrgenemist isegi kuni nädalapikkusel viibimisel statsionaarses faasis (andmeid pole näidatud). Sellest võib järeldada, et vähemalt sel perioodil on statsionaarne faas tõepoolest staatiline ning pidevat rakkude jagunemist ning suremist populatsioonis ei toimu.

Pikaajalisel statsionaarses faasis viibimisel hakkavad bakterirakkudes toimuma geneetilised ümberkorraldused (Bjedov jt, 2003). Nende protsesside üheks tulemuseks on statsionaarses faasis kasvueelset omava fenotüübiga rakkude teke (GASP – *growth advantage in stationary phase*) (Zambrano jt, 1993). GASP fenotüübiga rakud on mutandid, mis suudavad statsionaarses faasis teiste rakkude arvelt jagunema hakata ning muutuda kultuuris arvukamaks kui esialgsed metsiktüüpi rakud (Zambrano jt, 1993). GFP väljalahjenemise meetodit kasutades selgus, et nõrgenenud GFP signaaliga rakud ehk jagunevad rakud (ja seega arvatavasti GASP rakud) on üle seitsme päeva statsionaarses faasis viibinud kultuuris tõepoolest olemas. Aja jooksul suureneb

kultuuris nende rakkude arvukus (andmeid pole näidatud). Seega on käesolevas töös populatsiooni fenotüübilise varieeruvuse uurimiseks kasutatud meetod edukalt rakendatav ka genotüübilise varieerumise tuvastamiseks. Seda loomulikult juhul, kui geneetiliste muutustega kaasnevad muutused rakkude jagunemisvõimes.

Nagu eelpool kirjeldatud, on kõik rakud nii eksponentsiaalses faasis kui ka statsionaarses faasis ühesuguse jagunemisvõimega. Kui eksponentsiaalses faasis jagunevad kõik rakud, siis statsionaarses faasis on olukord vastupidine ja mingit jagunemist ei toimu. See, et statsionaarse faasi populatsioon võib siiski sisaldada erinevate omadustega rakke, selgub statsionaarse faasi kultuuri lahjendamisel värskesse söötmesse. Ilmneb, et kui toitained muutuvad kättesaadavaks, suudab ebasoodsatest tingimustest toibuda ainult osa rakke (joonis 6). Pärast 24 h LB söötmes statsionaarses faasis viibimist on bakterikultuuris jagunemisvõime alusel selgelt eristunud kaks alamhulka – jagunev ja mittejagunev. Sealjuures on jagunevate rakkude osakaal üllatavalt väike (joonis 6).

Tõenäoliselt sõltub statsionaarsest faasist toibumise edukus sellest, kui kiiresti hakkab rakk värskesse söötmesse sattudes sünteesima kasvuks ja jagunemiseks vajalikke valke. Arvatavasti on need rakud esialgu veel statsionaarses ja mittekasvavas seisundis. Ometi peavad nad kiiresti indutseerima uute geenide ekspressiooni. Antud töö tulemused näitavad, et rakud on indutseeritava geeniekspressioonvõime alusel eristunud juba statsionaarse faasi populatsioonis (joonis 10, paneel A). Huvitav on see, et kui eksponentsiaalses faasis suudavad geeniekspressiooni käivitada kõik rakud (joonis 10, paneel A), siis statsionaarses faasis ekspresseeritakse reportergeeni vaid üksikutes rakkudes. Statsionaarses faasis reportergeeni ekspresseerivad bakterirakud on needsamad rakud, mis on võimelised statsionaarsest faasist toibuma (joonis 10, paneel B). Sellest järelduvalt võib öelda, et rakkude võime indutseerida kunstliku reportergeeni ekspressiooni statsionaarses faasis peegeldab kõige tõenäolisemalt rakkude üldist metaboolset aktiivsust.

Märkimisväärne on veel asjaolu, et statsionaarses faasis ekspresseeritakse reportergeeni vaid väga hea translatsiooniinitsiatsiooniregiooniga regulaatoraladest lähtuvalt (lisa 2). Ekspressiooni toimumine sõltub eelkõige AU-rikka enhanseri olemasolust reportergeeni regulaatoralas (lisa 2). On teada, et AU-rikas enhanser seostub translatsiooni

initsiatsioonil ribosoomi S1 valguga ning see seostumine tagabki valgusünteesi käivitamise kõrge efektiivsuse (Komarova jt, 2002). Nende teadmiste põhjal tekib küsimus, kas näiteks statsionaarsele faasile spetsiifiliste geenide ekspressioon võiks samuti sõltuda AU-rikka enhanseri olemasolust geeni regulaatoralas. Enhanserite järjestus on bakterites väga varieeruv ning ühtset konsensusjärjestust on olnud raske defineerida. Seetõttu pole suuremahulisi andmebaaside analüüsil põhinevaid uuringuid enhanserjärjestuste otsimiseks geenide regulaatoraladest veel tehtud. Sellele, et enhanserjärjestuste olemasolu võib statsionaarsele faasile iseloomulike geenide ekspressioonil olla vajalik, viitab hiljutine Hirsch-i ja Elliotti poolt tehtud uurimus (Hirsch & Elliott, 2005). Autorid analüüsisid, kuidas on reguleeritud statsionaarse faasi spetsiifilist  $\delta^S$  faktorit kodeeriva *rpoS* geeni ekspressioon. Ilmnes, et selle geeni statsionaarse faasi spetsiifiline ekspressioon tagatakse just translatsiooni tasemel ning see sõltub eelkõige *rpoS* geeni regulaatorpiirkonnas paiknevast enhanserist (Hirsch & Elliott, 2005).

Statsionaarsest faasist toibuda suutvate rakkude arv sõltub kasvukeskkonnast (joonis 7). Toibuma hakkava alamhulga suurus ei korreleeru rakkude kasvukiirusega eksponentsiaalses faasis. Küll aga näib see sõltuvat lämmastikuallika või aminohapete olemasolust keskkonnas (joonis 7). Nendes söötmetes, mis sisaldavad aminohappeid või peptiide (2YT, LB, MOPS Glu +AA), toimub kultuuri eristumine kaheks alamhulgaks statsionaarsest faasist toibumisel juba esimesel päeval. Juhul kui lämmastikuallikat on söötmes vähe, suudavad kõik rakud pärast statsionaarset faasi kasvama hakata. Ja seda isegi kolme päeva möödudes. Samasugune korrelatsioon on ka lämmastikuallika olemasolu ja rakkude üldise metaboolse aktiivsuse vahel (lähtuvalt võimest indutseerida statsionaarses faasis reportergeeni ekspressiooni). Nendes söötmetes, milles toimub rakkude eristumine kasvama hakkamise alusel, on rakud eristunud ka metaboolselt aktiivsemaks ning inaktiivsemaks alamhulgaks (joonis 11, paneel A). Seevastu lämmastikuvaeses söötmes on ka pikemat aega statsionaarses faasis viibinud rakud kõik metaboolselt aktiivsed ning võimelised statsionaarses faasis geeniekspressiooni indutseerima (joonis 11, paneel C). Siit võib järeldada, et lämmastikuallika olemasolu kasvukeskkonnas on just see tegur, mis määrab, kui suur hulk rakke populatsioonis on statsionaarses faasis metaboolselt aktiivsed ja hakkavad pärast statsionaarset faasi kasvama.



Mitmed bakterid, sealhulgas ka *E. coli*, akumuleerivad lämmastikuvaeses keskkonnas kasvades rakku mitmeid erinevaid varuaineid nagu glükogeeni, lipiide ja polüfosfaate. Toitainerikkas keskkonnas kasvades bakterid neid polümeere ei talleta (Leckie jt, 1983; Mason & Egli, 1993). Võimalik, et lämmastikuvaeses söötmes kasvanud *E. coli* populatsiooni pikemat aega säiliv metaboolne aktiivsus ja võime statsionaarsest faasist toibuda tulenebki varuainete olemasolust rakkudes. Kuigi näiteks *Klebsiella pneumoniae* rakkudes talletatakse varupolüsahhariide ka fosfaadivaeses keskkonnas, on selge, et polüfosfaati sellistes rakkudes ei ole (Mason & Egli, 1993). Fosforiallikaks neis tingimustes on tõenäoliselt ribosomaalne RNA. Ribosomaalse RNA lagundamine võiks seletada ka tõika, miks vaatamata varuainete olemasolule ei suuda fosfaadivaestes tingimustes kasvanud *E. coli* rakud statsionaarses faasis valgusünteesi indutseerida ning toibuvad statsionaarsest faasist halvemini kui lämmastikuvaeses keskkonnas kasvanud rakud (joonis 7; joonis 11, paneel B). Olukorras, kus eksponentsiaalses faasis on toitaineid piisavalt, bakterid reeglina varuaineid ei sünteesi (Mason & Egli, 1993). Kõikides teistes käesoleva töö käigus kasutatud söötmetes on bakteritel eksponentsiaalses faasis toitaineid küllaldaselt. Varuaineid seega ei sünteesita. Varuainete puudumise tõttu võivadki neis söötmetes kasvanud rakud olla statsionaarsesse faasi jõudes metaboolselt inaktiivsemad ning seepärast ei suuda statsionaarsest faasist hästi toibuda.

Selget fenotüübilist eristumist statsionaarse faasi populatsiooni rakkude vahel on võimalik seletada lähtudes kahest põhimõtteliselt väga erinevast vaatenurgast. Esiteks võib eristumise põhjuseks olla rakuline spetsialiseerumine. See võib olla diferentseerumine kui protsess, mis molekulaarsel tasemel seisneb kindlate geenide järjestikulises ekspressioonis ja mis põhjustab kindla fenotüübiga rakkude teket populatsioonis. Antud juhul diferentseeruks *E. coli* kultuur statsionaarses faasis metaboolselt aktiivsemaks (statsionaarsest faasist toibuvaks) ja inaktiivsemaks (statsionaarsest faasist mittetoibuvaks) alampopulatsiooniks. Oluline on siin rõhutada, et isegi kui diferentseerumine eeldab mingite kindlate geenide kindla järjekorraga ekspressiooni, siis võidakse see protsess rakkudes käivitada ka täiesti stohhastiliselt. Seda eelkõige põhjusel, et geeniekspressioon kui biokeemiline protsess on seesmiselt mürarikas ning ühe geeni juhuslik ekspressioon võib aktiveerida terve kaskaadi teisi. Teine vaatenurk on see, et statsionaarse faasi bakterid on kahjustunud, ühed juhuslikult

rohkem, teised juhuslikult vähem. Ka selle käsitluse järgi võivad rakud populatsioonis geeniekspressiooni alusel üksteisest erineda. Sel juhul on see pigem tagajärg kui põhjus.

Kahjustatuse hüpoteesi toetavad ka mõned käesolevas töös saadud tulemused. Rakud, mis ei suuda pärast statsionaarset faasi jagunema hakata, on metaboolselt inaktiivsed. Metaboolset inaktiivsust ja mittekultiveeritavust tõlgendatakse kirjanduses reeglina kahjustatuse sünonüümina. Paljude muude mõjurite kõrval on *E. coli* rakud statsionaarses faasis tundlikud oksüdatiivse kahjustuse suhtes. Oksüdatiivse kahjustuse indikaatorina kasutatakse tavaliselt valkude karbonüleeritust, kuna see on pöördumatu modifikatsioon (Dukan & Nystrom, 1998, , 1999). Desnues' jt esitatud andmed näitavad, et 48 h vanuses *E. coli* kultuuris on ligi 60% rakkudes valgud karbonüleeritud (Desnues jt, 2003). Karbonüleeritud valke sisaldavates rakkudes on tugevamalt ekspresseeritud ka mitmed oksüdatiivse kahjustuse vastu võitlevad stressivastuse rajad. Kasvama suudab sellistest rakkudest minna vaid iga kahekümnes (Desnues jt, 2003).

Stewart jt (Stewart jt, 2005) näitasid, et bakteri pooldumisel mitme põlvkonna vältel vana pooluse pärinud tütarrakud on kehvema jagunemisvõimega kui uute poolustega rakud. Stewart jt väitel on eksponentsiaalselt kasvavas bakterikultuuris vanadel poolustel rakkude kasvu pidurdav efekt. Käesolevas töös ilmneb, et vana poolusega rakud on võrreldes oma uute poolustega kaaslastega ka kehvemad statsionaarsest faasist toibujad (joonis 12, paneel D). Kuna pooluse komponendid uuenevad võrreldes teiste raku komponentidega suhteliselt aeglaselt (de Pedro jt, 1997; de Pedro jt, 2004), siis on võimalik, et vana poolusega rakud rohkem vananenud ja potentsiaalselt kahjustunud komponente, mis võivad raku elutegevust pärssida.

Kahjustatuse hüpoteesi vastu räägib aga tõsiasi, et statsionaarses faasis kõige kauem täies koosseisus metaboolselt aktiivsena püsiv ning ühtlasi ka statsionaarsest faasist kõige paremini toibuv bakterikultuur on kasvanud lämmastikuvaeses söötmes (joonised 7, kollased tulbad; joonis 11, paneel C). Ometi on aga just lämmastikuvaeses söötmes valkude karbonüleerituse tase kõige kõrgem (Ballesteros jt, 2001). Eeldades, et valkude karbonüleeritus peegeldab tõepoolest oksüdatiivse kahjustuse määra, on üllatav, et kõige paremini toibuvad statsionaarsest faasist ilmselt kõige rohkem kahjustunud rakud. Seda võib käsitleda tõsise argumendina oksüdatiivse kahjustuse kui peamise bakterite mittekultiveeritavust põhjustava teguri vastu. Sellele, et valkude karbonüleerimine (ja

sellest tulenevalt ka oksüdatiivne kahjustus) ei pruugi üldse olla rakkude jagunemisepeetuse põhjuseks, viitavad ka Fredrikssoni jt andmed (Fredriksson jt, 2005). Selle järgi alandab molekulaarsete tsaperonide DnaK / DnaJ üleekspressioon küll tunduvalt valkude karbonüleeritust, kuid ei päästa statsionaarse faasi rakke muutumast jagunemisvõimetuks. Vastuargumendina kahjustatuse hüpoteesile võib käsitleda veel tulemust, et mitmed olulised bakterite stressivastuses osalevad geenid (*rpoS*, *dps*, *gadA*, *katE*, *osmE*) on ekspresseeritud kõikides statsionaarse faasi rakkudes (joonis 9). Vaatamata sellele, et üldise metaboolse aktiivsuse alusel on rakupopulatsioon jaotunud selgelt kaheks erinevaks alamhulgaks, suudavad ka metaboolset inaktiivsemad rakud stressivastuses osalevaid geene ekspresseerida.

Nagu eelpool mainitud, võib alternatiivina kahjustatuse hüpoteesile kahe alamhulga eristumist *E. coli* rakupopulatsioonis vaadelda ka diferentseerumisena. Tegemist oleks samasuguse kontrollitud ja kohastumusliku protsessiga nagu näiteks *Bacillus*-te sporulatsioon ja müksobakterite viljakeha moodustumine ebasoodsate tingimuste üleelamiseks (O'Connor & Zusman, 1991; Piggot & Hilbert, 2004). Looduslikes oludes tagaksid statsionaarses faasis metaboolset aktiivsemad ja mittejagunevast olekust kiiremini toibuvad rakud isogeense bakteripopulatsiooni konkurentsivõimelisuse toitainete kättesaadavaks muutudes. Metaboolset inaktiivsem alamhulk võiks aga sisaldada rakke, mis võimaldaksid populatsioonil kannatada pikemaajalist näljaperioodi.

Kirjanduses esitatud andmete põhjal sisaldab *E. coli* kultuur selliseid madala metaboolse aktiivsusega alamhulki, mis taluvad ebasoodsaid tingimusi nagu antibiootikumitöötlust või temperatuuristressi paremini kui ülejäänud bakteripopulatsioon keskmiselt. Nendeks on vastavalt persistorid ja VBNC fenotüübiga rakud (Johnston & Brown, 2002; Balaban jt, 2004; Keren jt, 2004b; Wong & Wang, 2004). Antibiootikumide suhtes tolerantsete persistorite puhul on teada, et nad ekspresseerivad spetsiifiliselt selliseid geene, mille produktid suruvad maha makromolekulide sünteesi (Keren jt, 2004b). Võimalik, et käesolevas töös leitud alamhulgad ekspresseerivad erineval määral statsionaarses faasis translatsiooni inhibeerivate geenideprodukte. See võiks olla üheks võimalikest seletustest, miks üks alamhulk suudab statsionaarses faasis geeniekspressiooni indutseerida ning teine mitte (joonis 10, paneel A).

Eelnevalt kirjeldati asjaolu, et rakud võivad eksponentsiaalse faasi lõpus akumulierida endasse varuaineid. Teoreetiliselt võib statsionaarse faasi rakkude erinev metaboolne aktiivsus tuleneda bakterirakkude erinevast varuainete sisaldusest ühe populatsiooni piires. Enamik andmeid viitab sellele, et varuainete süntees toimub lämmastiku- või fosfaadinäljas kasvanud kultuurides (Mason & Egli, 1993). Tuleb aga arvestada, et need andmed pärinevad töödest, mis on tehtud rakupopulatsioonide tasemel tervikuna. Hiljuti näidati, et rikkas söötmes (LB) statsionaarsesse faasi sisenevate *E. coli* rakkude järjest suurenev liikuvus *Percoll*-i gradiendis korreleerub järjest suureneva glükogeeni graanulite arvuga neis rakkudes (Makinoshima jt, 2003). Kuna ka sügavas statsionaarses faasis leidub populatsioonis väga erineva tihedusega baktereid (Makinoshima jt, 2002), siis on tõenäoline, et vähemalt LB söötmes kasvades kõik rakud glükogeeni ei talleta. Glükogeeni graanulite arv rakus saavutab Makinoshima jt andmetel maksimumi juba 12 h vanuses kultuuris (Makinoshima jt, 2003). Sel ajahetkel pole bakteripopulatsioonis rakkude jagunemisvõime alusel eristumist veel kindlasti toimunud (autor, avaldamata andmed). Samuti pole nii lühikest aega statsionaarses faasis viibinud rakud veel mingilgi moel oksüdatiivselt kahjustunud (Cuny jt, 2005). Seetõttu on tõenäoline, et glükogeeni sünteesimata jätmise osades rakkudes viitab populatsiooni diferentseerumisele. Eriti kui arvestada tõsiasi, et varuainete talletamine on raku jaoks tõenäoliselt üsna kulukas protsess. Glükogeeni mittesünteesivad rakud võivad kulutamata jäetud energiat kasutada näiteks mõnede muude protsesside töös hoidmiseks või geenide ekspresseerimiseks.

*E. coli* looduslikuks elukeskkonnaks on tõenäoliselt vaheldumisi nii imetajate soolestik ning väliskeskkond. Esimeses neist on toitaineid ohtralt ning teises väga napilt. Seedeensüümide aktiivsuse tulemusena on inimese peensooles väga kõrges kontsentratsioonis 3 – 6 aminohappe pikkusi peptiide (hinnanguliselt 120 – 145 mM) ja vabasid aminohappeid (30 – 60 mM) (Adibi & Mercer, 1973). Seega võiks 2YT, LB ja MOPS Glu +AA söötmetes kasvamine lämmastiku kättesaadavuse seisukohalt peegeldada olukorda inimese soolestikus. Neis söötmetes muutub suur osa bakteritest kiiresti metaboolselt inaktiivseks ja mittejagunevaks (joonis 7). Eeltoodud diferentseerumise hüpoteesi järgi võiksid mittejagunevad rakud oma madala metaboolse aktiivsuse tõttu olla vastupidavamad mitmesugustele stressitingimustele ning pikemas perspektiivis populatsiooni jaoks seega kasulikud. Niisuguste rakkude olemasolu tagaks

populatsiooni ellujäämise toitainetevaesemates ja märksa muutlikemas oludes, mis baktereid pärast seedetraktist väljumist ees ootavad. Samas on selge, et katseklaasis tehtav eksperiment pole sobiv mudel soolestikus toimuva kirjeldamiseks. Lisaks erinevustele kõikvõimalike metaboliitide hulgas ning pH-s on soolestik anaeroobne keskkond ning bakterite metabolism suure osas fermentatiivne. Samal ajal on katseklaasis kasvavad bakterid hästi aereeritud ning rakkude metabolism on seega oksüdatiivne. Sellest tulenevalt on selge, et sooles kasvavate bakterite füsioloogiline seisund võib olla hoopis teistsugune.

Spetsialiseerumise või diferentseerumise hüpoteesi toetavad veel käesoleva töö autori esialgsed andmed, mis viitavad sellele, et erinevad alamhulgad *E. coli* statsionaarse faasi kultuuris võivad tagada populatsiooni tolerantsuse erinevate antibiootikumide suhtes. Statsionaarses faasis metaboolselt aktiivsem osa rakupopulatsioonist suudab paremini taluda töötlemist mitomütsiiniga C-ga. Metaboolselt inaktiivsem alamhulk on aga tundetum ofloksatsiini suhtes (andmeid pole näidatud).

Üldiselt tuleb tõdeda, et konkreetseid eksperimentaalseid tõendeid on nii kahjustatuse kui ka diferentseerumise hüpoteesidele raske leida. Seda juba korduvalt mainitud põhjusel, et ühe raku tasemel on bakteripopulatsioone veel suhteliselt vähe uuritud. Ka on kirjanduses esitatud tulemuste interpreteerimine keeruline, kuna nii kahjustatuse kui ka spetsialiseerumise teooria pooldajad eitavad või eiravad kangekaelselt vastaspoole argumente, kuid eksperimentaalselt neid ümber lükata ei ürita või ei suuda (või ei taha?). Pole avaldatud ühtegi tööd, kus oleks vaadeldud valkude karbonüleeritust persistorites. Samuti pole oksüdatiivse stressi uurijad teinud katseid, et teha kindlaks, kui hästi või halvasti suudavad erineva karbonüleerituseastmega rakud taluda antibiootikumidega töötlemist. Mõlemad lihtsad eksperimendid tooksid palju selgust kummagi teooria paikapidavuse või ekslikkuse kohta.

Intuitiivselt on selge, et kui fenotüübiline varieeruvus oleks tõepoolest üheks bakteripopulatsioonide poolt kasutatavaks kohastumuslikuks mehhanismiks, ei saaks varieeruvus piirduda ainult 2-3 füsioloogiliselt erineva rakutüübi olemasoluga populatsioonis. Käesoleva töö ning kirjanduses esitatud andmete põhjal on selge, et statsionaarse faasi kultuur sisaldab suhteliselt palju metaboolselt inaktiivseid rakke: peristoreid, VBNC fenotüübiga rakke, kahjustatud rakke ja neid rakke, mis ei suuda

statsionaares faasis indutseerida reportergeeni ekspressiooni. Vähesel määral leidub statsionaarses faasis metaboolselt aktiivsemaid rakke. On aga selge, et tegelikult on bakteripopulatsioon veel märksa heterogeensem. *E. coli* statsionaarse faasi rakud erinevad üksteisest ka kromosoomide koopiaarvu ning pooluste vanuste poolest. Statsionaarse faasi kultuuri fraktsioneerimine urograafias võimaldas kahte peamist käesolevas töös käsitletud alamhulka – metaboolselt aktiivsemat ja inaktiivsemat – lähemalt analüüsida. Selgub, et üldiselt puudub igasugune korrelatsioon kõikide vaadeldud füsioloogiliste näitajate vahel (joonis 13). Ainuke üksühene kokkulangevus on statsionaarse faasi suhtelise metaboolse aktiivsuse ja statsionaarsest faasist toibumise vahel. Ülejäänud parameetrid võivad üksikus rakus esineda kõikvõimalike erinevate kombinatsioonidena (joonis 13). Sestap on selge, et rakkude lahterdamine persistoriteks, VBNC fenotüübiga või kahjustatud rakkudeks on liigne lihtsustus. Kui arvestada veel seda, et Makinoshima jt (Makinoshima jt, 2002) lahutasid *E. coli* statsionaarse faasi kultuuri vähemalt kümneks erinevaks alamhulgaks ainuüksi rakkude liikuvuse põhjal *Percoll*-i gradiendis, on selge, et populatsioonisisene heterogeensus on väga suur. Missugune võiks olla kõikide nende erinevate alamhulkade – uute ja vanade poolustega rakkude, ühte ja kahte kromosoomi sisaldavate rakkude, metaboolselt aktiivsemate ja inaktiivsemate rakkude, jne – funktsioon bakteripopulatsioonis ja kas neil üldse on mingi funktsioon, vajab veel põhjalikku uurimist.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti *E. coli* rakkude jagunemissuutlikkuse põhjal populatsiooni fenotüübilist varieeruvust bakteri erinevates eluetappides. Seejuures analüüsiti teadaolevalt esmakordselt üksikute rakkude jagunemisvõimet vedelsöötmes kasvavas bakteripopulatsioonis. Töö tulemustest selgub, et *E. coli* populatsioon sisaldab suhteliselt ühesuguse jagunemisvõimega rakke nii eksponentsiaalses faasis kasvades kui ka statsionaarses faasis. Statsionaarsest faasist toibumisel leiab aset rakkude jagunemisvõime alusel bakterikultuuri eristumine kaheks alamhulgaks. Selgub, et pärast statsionaarset faasi kasvama hakkavate rakkude osakaal populatsioonis sõltub kasvukeskkonnast, täpsemalt selle lämmastikuisaldusest. Juhul kui kasvukeskkonnas on aminohappeid või peptiide, toibuvad statsionaarsest faasist vaid vähesed rakud. Lämmastikunäljas kasvanud bakterid hakkavad seevastu kõik pärast statsionaarset faasi kasvama. Lähtuvalt bakterirakkude erinevast võimest indutseerida statsionaarses faasis reportergeeni ekspressiooni, võib öelda, et rakkude võime statsionaarsest faasist toibuda on positiivses korrelatsioonis rakkude üldise metaboolse aktiivsusega. Kasutades bakteri pooluste märgistamist fluorestseeruva pulssmärgisega selgub, et vana poolusega rakud hakkavad pärast statsionaarset faasi halvasti kasvama. Seega on statsionaarsest faasist toibumine negatiivses korrelatsioonis rakkude vanusega. Samas pole väga selget seost rakkude kromosoomi koopiaarvu ning statsionaarsest faasist toibumise vahel. Ka ei korreleeru omavahel otseselt sellised olulised füsioloogilised näitajad nagu raku vanus, kromosoomi koopiaarv ning metaboolne aktiivsus.

Eeltoodut arvestades võib töö tulemusi kokku võttes kõige olulisema järeldusena tõdeda, et *E. coli* statsionaarse faasi populatsioon sisaldab väga mitmeid erinevate omadustega rakke ning on füsioloogilistelt märksa heterogeensem kui senised kirjanduses esitatud andmed arvata lubasid. Vaatamata sellele, et rakkude erineva jagunemisvõime konkreetseid tekkepõhjusi ei leitud, sai kinnituse oletus fenotüübilise

varieeruvuse suure ulatuse ja mitmetasandilisuse kohta *E. coli* statsionaarse faasi kultuuris. Fenotüübiline varieeruvus bakteripopulatsioonis on seega tõsiasi, millega edaspidi tuleks bakterifüsioloogia uurimisel alati arvestada.



## SUMMARY

### PHENOTYPIC VARIATION IN *ESCHERICHIA COLI* STATIONARY PHASE POPULATIONS

Johanna Roostalu

Phenotypic variation has been hypothesized to be an important mechanism for adapting with changing environments. At least theoretically, this phenomenon has been shown to increase the fitness of bacterial populations, especially under fluctuating environmental conditions. Since the occurrence of antibiotics tolerance and heat resistance in pathogenic bacteria has also been linked with the phenomenon of phenotypic variance, the issue is also of great medical importance. Experimental evidence describing the occurrence, the causes and the significance of phenotypic variation in non-differentiating bacteria however, has remained scarce.

The current thesis investigates phenotypic variance related to the capacity of individual bacteria to propagate. For the first time, single cell measurements are used to analyze the growing bacterial population in liquid culture with respect to bacterial cells ability to divide. The results of this study show that *E. coli* population remains homogenous during both, exponential and stationary phases of its life cycle. However, right after nutritional upshift following a prolonged period of starvation, bacterial population shows heterogeneity in its ability to start reproduction. The population splits into two subsets, one of which is able to recover from stationary phase, whereas the other is not. The proportion of either subset in the population is determined by the growth conditions and is largely dependent on the nitrogen availability in the growth media. Amino acids and peptides in the growth media have a negative effect on stationary phase recovery. Nitrogen deprivation however, enhances the capacity to recover. Judged by the positive correlation between cells ability to induce gene expression in stationary phase and the

ability to start reproduction after stationary phase, it can be said that the recovery from stationary phase strongly depends on the overall metabolic activity of bacteria. The pulse-labeling of bacterial poles shows that the possession of an old pole significantly corrupts cells ability to recover from stationary phase. Therefore, the cells age is negatively correlated with its ability to start dividing. However, there is no direct connection between the chromosome copy number and the ability to start reproduction after stationary phase. Also, there seems to be no correlation between various important physiological parameters: cells age, chromosome copy number and metabolic ability.

In sum, the most important conclusion that can be drawn from this study is that *E. coli* stationary phase population contains very many subpopulations with different physiological properties. The heterogeneity is far more pronounced than has been proposed in the literature so far. Although the causes of phenotypic variation at the level of cells divisional ability were not found, the hypothesis about extensive heterogeneity at different levels in *E. coli* stationary phase population was confirmed. Thus, the existence of phenotypic variability is a fact that should always be considered while investigating the physiology of bacteria.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Adibi SA, Mercer DW. 1973. Protein Digestion in Human Intestine as Reflected in Luminal, Mucosal, and Plasma Amino Acid Concentrations after Meals. *J Clin Invest* 52:1586-1594.
- Akerlund T, Nordstrom K, Bernander R. 1995. Analysis of Cell Size and DNA Content in Exponentially Growing and Stationary-Phase Batch Cultures of Escherichia Coli. *J Bacteriol* 177:6791-6797.
- Ali Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A. 1999. Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the Escherichia Coli Nucleoid. *J Bacteriol* 181:6361-6370.
- Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. 2004. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* 305:1622-1625.
- Ballesteros M, Fredriksson A, Henriksson J, Nystrom T. 2001. Bacterial Senescence: Protein Oxidation in Non-Proliferating Cells Is Dictated by the Accuracy of the Ribosomes. *Embo J* 20:5280-5289.
- Barak Z, Gallant J, Lindsley D, Kwieciszewski B, Heidel D. 1996. Enhanced Ribosome Frameshifting in Stationary Phase Cells. *J Mol Biol* 263:140-148.
- Beckskei A, Seraphin B, Serrano L. 2001. Positive Feedback in Eukaryotic Gene Networks: Cell Differentiation by Graded to Binary Response Conversion. *Embo J* 20:2528-2535.
- Benaissa M, Babin P, Quellard N, Pezenec L, Cenatiempo Y, Fauchere JL. 1996. Changes in Helicobacter Pylori Ultrastructure and Antigens During Conversion from the Bacillary to the Coccoid Form. *Infect Immun* 64:2331-2335.
- Bigger JW. 1944. Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin *Lancet* ii:497-500.
- Bjedov I, Tenaillon O, Gerard B, Souza V, Denamur E, Radman M, Taddei F, Matic I. 2003. Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Science* 300:1404-1409.
- Blatny JM, Brautaset T, Winther-Larsen HC, Karunakaran P, Valla S. 1997. Improved Broad-Host-Range Rk2 Vectors Useful for High and Low Regulated Gene Expression Levels in Gram-Negative Bacteria. *Plasmid* 38:35-51.
- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. 1997. The Complete Genome Sequence of Escherichia Coli K-12. *Science* 277:1453-1474.
- Bogosian G, Aardema ND, Bourneuf EV, Morris PJ, O'Neil JP. 2000. Recovery of Hydrogen Peroxide-Sensitive Culturable Cells of Vibrio Vulnificus Gives the Appearance of Resuscitation from a Viable but Nonculturable State. *J Bacteriol* 182:5070-5075.
- Bogosian G, Bourneuf EV. 2001. A Matter of Bacterial Life and Death. *EMBO Rep* 2:770-774.

- Brencic A, Angert ER, Winans SC. 2005. Unwounded Plants Elicit *Agrobacterium* Vir Gene Induction and T-DNA Transfer: Transformed Plant Cells Produce Opines yet Are Tumour Free. *Mol Microbiol* 57:1522-1531.
- Bumann D, Habibi H, Kan B, Schmid M, Goosmann C, Brinkmann V, Meyer TF, Jungblut PR. 2004. Lack of Stage-Specific Proteins in Coccoid *Helicobacter Pylori* Cells. *Infect Immun* 72:6738-6742.
- Cai L, Friedman N, Xie XS. 2006. Stochastic Protein Expression in Individual Cells at the Single Molecule Level. *Nature* 440:358-362.
- Carrier TA, Keasling JD. 1999. Investigating Autocatalytic Gene Expression Systems through Mechanistic Modeling. *J Theor Biol* 201:25-36.
- Charles M, Perez M, Kobil JH, Goldberg MB. 2001. Polar Targeting of *Shigella* Virulence Factor Icsa in Enterobacteriaceae and *Vibrio*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9871-9876.
- Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG, Gerdes K. 2003. Toxin-Antitoxin Loci as Stress-Response-Elements: Chpak/Mazf and Chpbk Cleave Translated Rnas and Are Counteracted by Tmrna. *J Mol Biol* 332:809-819.
- Chuang SE, Daniels DL, Blattner FR. 1993. Global Regulation of Gene Expression in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 175:2026-2036.
- Cohn M, Horibata K. 1959. Analysis of the Differentiation and of the Heterogeneity within a Population of *Escherichia Coli* Undergoing Induced Beta-Galactosidase Synthesis. *J Bacteriol* 78:613-623.
- Conter A, Menchon C, Gutierrez C. 1997. Role of DNA Supercoiling and Rpos Sigma Factor in the Osmotic and Growth Phase-Dependent Induction of the Gene Osme of *Escherichia Coli* K12. *J Mol Biol* 273:75-83.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. Facs-Optimized Mutants of the Green Fluorescent Protein (Gfp). *Gene* 173:33-38.
- Costa K, Bacher G, Allmaier G, Dominguez-Bello MG, Engstrand L, Falk P, de Pedro MA, Garcia-del Portillo F. 1999. The Morphological Transition of *Helicobacter Pylori* Cells from Spiral to Coccoid Is Preceded by a Substantial Modification of the Cell Wall. *J Bacteriol* 181:3710-3715.
- Cuny C, Dukan L, Fraysse L, Ballesteros M, Dukan S. 2005. Investigation of the First Events Leading to Loss of Culturability During *Escherichia Coli* Starvation: Future Nonculturable Bacteria Form a Subpopulation. *J Bacteriol* 187:2244-2248.
- De Biase D, Tramonti A, Bossa F, Visca P. 1999. The Response to Stationary-Phase Stress Conditions in *Escherichia Coli*: Role and Regulation of the Glutamic Acid Decarboxylase System. *Mol Microbiol* 32:1198-1211.
- de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. 1983. The Tac Promoter: A Functional Hybrid Derived from the Trp and Lac Promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:21-25.
- de Pedro MA, Grunfelder CG, Schwarz H. 2004. Restricted Mobility of Cell Surface Proteins in the Polar Regions of *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 186:2594-2602.
- de Pedro MA, Quintela JC, Holtje JV, Schwarz H. 1997. Murein Segregation in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 179:2823-2834.
- Desnues B, Cuny C, Gregori G, Dukan S, Aguilaniu H, Nystrom T. 2003. Differential Oxidative Damage and Expression of Stress Defence Regulons in Culturable and Non-Culturable *Escherichia Coli* Cells. *EMBO Rep* 4:400-404.

- Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nystrom T. 2000. Protein Oxidation in Response to Increased Transcriptional or Translational Errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5746-5749.
- Dukan S, Nystrom T. 1998. Bacterial Senescence: Stasis Results in Increased and Differential Oxidation of Cytoplasmic Proteins Leading to Developmental Induction of the Heat Shock Regulon. *Genes Dev* 12:3431-3441.
- Dukan S, Nystrom T. 1999. Oxidative Stress Defense and Deterioration of Growth-Arrested Escherichia Coli Cells. *J Biol Chem* 274:26027-26032.
- Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. 2002. Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science* 297:1183-1186.
- Falla TJ, Chopra I. 1998. Joint Tolerance to Beta-Lactam and Fluoroquinolone Antibiotics in Escherichia Coli Results from Overexpression of Hipa. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3282-3284.
- Ferrell JE, Jr. 2002. Self-Perpetuating States in Signal Transduction: Positive Feedback, Double-Negative Feedback and Bistability. *Curr Opin Cell Biol* 14:140-148.
- Fischer-Le Saux M, Hervio-Heath D, Loaec S, Colwell RR, Pommepuy M. 2002. Detection of Cytotoxin-Hemolysin Mrna in Nonculturable Populations of Environmental and Clinical Vibrio Vulnificus Strains in Artificial Seawater. *Appl Environ Microbiol* 68:5641-5646.
- Fraser HB, Hirsh AE, Giaever G, Kumm J, Eisen MB. 2004. Noise Minimization in Eukaryotic Gene Expression. *PLoS Biol* 2:e137.
- Fredriksson A, Ballesteros M, Dukan S, Nystrom T. 2005. Defense against Protein Carbonylation by Dnak/Dnaj and Proteases of the Heat Shock Regulon. *J Bacteriol* 187:4207-4213.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. 2005. Survival Strategies of Infectious Biofilms. *Trends Microbiol* 13:34-40.
- Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. 2000. Construction of a Genetic Toggle Switch in Escherichia Coli. *Nature* 403:339-342.
- Gerdes K. 2000. Toxin-Antitoxin Modules May Regulate Synthesis of Macromolecules During Nutritional Stress. *J Bacteriol* 182:561-572.
- Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. 2005. Prokaryotic Toxin-Antitoxin Stress Response Loci. *Nat Rev Microbiol* 3:371-382.
- Giraud A, Matic I, Tenaillon O, Clara A, Radman M, Fons M, Taddei F. 2001a. Costs and Benefits of High Mutation Rates: Adaptive Evolution of Bacteria in the Mouse Gut. *Science* 291:2606-2608.
- Giraud A, Radman M, Matic I, Taddei F. 2001b. The Rise and Fall of Mutator Bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:582-585.
- Golding I, Paulsson J, Zawilski SM, Cox EC. 2005. Real-Time Kinetics of Gene Activity in Individual Bacteria. *Cell* 123:1025-1036.
- Goulian M, van der Woude M. 2006. A Simple System for Converting Lacz to Gfp Reporter Fusions in Diverse Bacteria. *Gene* 372:219-226.
- Guespin-Michel J, Kaufman M. 2001. Positive Feedback Circuits and Adaptive Regulations in Bacteria. *Acta Biotheor* 49:207-218.
- Guptasarma P. 1995. Does Replication-Induced Transcription Regulate Synthesis of the Myriad Low Copy Number Proteins of Escherichia Coli? *Bioessays* 17:987-997.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose Pbad Promoter. *J Bacteriol* 177:4121-4130.

- Hautefort I, Proenca MJ, Hinton JC. 2003. Single-Copy Green Fluorescent Protein Gene Fusions Allow Accurate Measurement of Salmonella Gene Expression in Vitro and During Infection of Mammalian Cells. *Appl Environ Microbiol* 69:7480-7491.
- Hayes F. 2003. Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science* 301:1496-1499.
- Heim S, Lleo MM, Bonato B, Guzman CA, Canepari P. 2002. The Viable but Nonculturable State and Starvation Are Different Stress Responses of Enterococcus Faecalis, as Determined by Proteome Analysis. *J Bacteriol* 184:6739-6745.
- Hengge-Aronis R. 1993. The Role of Rpos in Early Stationary Phase Gene Regulation in E.Coli. In: Kjelleberg S, ed. *Starvation in Bacteria*. New York: Plenum Press.
- Hernday A, Krabbe M, Braaten B, Low D. 2002. Self-Perpetuating Epigenetic Pili Switches in Bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4:16470-16476.
- Hirsch M, Elliott T. 2005. Stationary-Phase Regulation of Rpos Translation in Escherichia Coli. *J Bacteriol* 187:7204-7213.
- Johnston MD, Brown MH. 2002. An Investigation into the Changed Physiological State of Vibrio Bacteria as a Survival Mechanism in Response to Cold Temperatures and Studies on Their Sensitivity to Heating and Freezing. *J Appl Microbiol* 92:1066-1077.
- Kaern M, Elston TC, Blake WJ, Collins JJ. 2005. Stochasticity in Gene Expression: From Theories to Phenotypes. *Nat Rev Genet* 6:451-464.
- Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR. 1998. Viability and Activity in Readily Culturable Bacteria: A Review and Discussion of the Practical Issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-187.
- Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. 2004a. Persister Cells and Tolerance to Antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230:13-18.
- Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. 2004b. Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia Coli. *J Bacteriol* 186:8172-8180.
- Khlebnikov A, Risa O, Skaug T, Carrier TA, Keasling JD. 2000. Regulatable Arabinose-Inducible Gene Expression System with Consistent Control in All Cells of a Culture. *J Bacteriol* 182:7029-7034.
- Komarova AV, Tchufistova LS, Supina EV, Boni IV. 2002. Protein S1 Counteracts the Inhibitory Effect of the Extended Shine-Dalgarno Sequence on Translation. *Rna* 8:1137-1147.
- Korch SB, Henderson TA, Hill TM. 2003. Characterization of the Hipa7 Allele of Escherichia Coli and Evidence That High Persistence Is Governed by (P)Ppgpp Synthesis. *Mol Microbiol* 50:1199-1213.
- Kuhar I, Zgur-Bertok D. 1999. Transcription Regulation of the Colicin K Cka Gene Reveals Induction of Colicin Synthesis by Differential Responses to Environmental Signals. *J Bacteriol* 181:7373-7380.
- Kussell E, Leibler S. 2005. Phenotypic Diversity, Population Growth, and Information in Fluctuating Environments. *Science* 309:2075-2078.
- Kuthan H. 2001. Self-Organisation and Orderly Processes by Individual Protein Complexes in the Bacterial Cell. *Prog Biophys Mol Biol* 75:1-17.

- Lacour S, Landini P. 2004. Sigmas-Dependent Gene Expression at the Onset of Stationary Phase in Escherichia Coli: Function of Sigmas-Dependent Genes and Identification of Their Promoter Sequences. *J Bacteriol* 186:7186-7195.
- Lambert PA. 2005. Bacterial Resistance to Antibiotics: Modified Target Sites. *Adv Drug Deliv Rev* 57:1471-1485.
- Leckie MP, Ng RH, Porter SE, Compton DR, Dietzler DN. 1983. Regulation of Bacterial Glycogen Synthesis. Stimulation of Glycogen Synthesis by Endogenous and Exogenous Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate in Escherichia Coli and the Requirement for a Functional Crp Gene. *J Biol Chem* 258:3813-3824.
- Lewis K. 2005. Persister Cells and the Riddle of Biofilm Survival. *Biochemistry (Mosc)* 70:267-274.
- Makinoshima H, Aizawa S, Hayashi H, Miki T, Nishimura A, Ishihama A. 2003. Growth Phase-Coupled Alterations in Cell Structure and Function of Escherichia Coli. *J Bacteriol* 185:1338-1345.
- Makinoshima H, Nishimura A, Ishihama A. 2002. Fractionation of Escherichia Coli Cell Populations at Different Stages During Growth Transition to Stationary Phase. *Mol Microbiol* 43:269-279.
- Martinez A, Kolter R. 1997. Protection of DNA During Oxidative Stress by the Nonspecific DNA-Binding Protein Dps. *J Bacteriol* 179:5188-5194.
- Mason CA, Egli T. 1993. Dynamics of Microbial Growth in the Decelerating and Stationary Phase of Batch Culture. In: Kjelleberg S, ed. *Starvation in Bacteria* New York: Plenum Press. pp 81-102.
- McAdams HH, Arkin A. 1997. Stochastic Mechanisms in Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:814-819.
- McAdams HH, Arkin A. 1999. It's a Noisy Business! Genetic Regulation at the Nanomolar Scale. *Trends Genet* 15:65-69.
- Metris A, Le Marc Y, Elfving A, Ballagi A, Baranyi J. 2005. Modelling the Variability of Lag Times and the First Generation Times of Single Cells of E. Coli. *Int J Food Microbiol* 100:13-19.
- Milo R, Shen-Orr S, Itzkovitz S, Kashtan N, Chklovskii D, Alon U. 2002. Network Motifs: Simple Building Blocks of Complex Networks. *Science* 298:824-827.
- Mizunoe Y, Wai SN, Takade A, Yoshida S. 1999. Restoration of Culturability of Starvation-Stressed and Low-Temperature-Stressed Escherichia Coli O157 Cells by Using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Degrading Compounds. *Arch Microbiol* 172:63-67.
- Moyed HS, Bertrand KP. 1983. Hipa, a Newly Recognized Gene of Escherichia Coli K-12 That Affects Frequency of Persistence after Inhibition of Murein Synthesis. *J Bacteriol* 155:768-775.
- Mulec J, Podlesek Z, Mrak P, Kopitar A, Ihan A, Zgur-Bertok D. 2003. A Cka-Gfp Transcriptional Fusion Reveals That the Colicin K Activity Gene Is Induced in Only 3 Percent of the Population. *J Bacteriol* 185:654-659.
- Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. 2000. Analysis of Bacterial Function by Multi-Colour Fluorescence Flow Cytometry and Single Cell Sorting. *J Microbiol Methods* 42:97-114.
- Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF. 1974. Culture Medium for Enterobacteria. *J Bacteriol* 119:736-747.
- Novick A, Weiner M. 1957. Enzyme Induction as an All-or-None Phenomenon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 43:553-566.

- Nystrom T. 2003. Nonculturable Bacteria: Programmed Survival Forms or Cells at Death's Door? *Bioessays* 25:204-211.
- O'Connor KA, Zusman DR. 1991. Behavior of Peripheral Rods and Their Role in the Life Cycle of *Myxococcus Xanthus*. *J Bacteriol* 173:3342-3355.
- Oliver JD. 2005. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J Microbiol* 43 *Spec No*:93-100.
- Oliver JD, Bockian R. 1995. In Vivo Resuscitation, and Virulence Towards Mice, of Viable but Nonculturable Cells of *Vibrio Vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 61:2620-2623.
- Ozbudak EM, Thattai M, Kurtser I, Grossman AD, van Oudenaarden A. 2002. Regulation of Noise in the Expression of a Single Gene. *Nat Genet* 31:69-73.
- Ozbudak EM, Thattai M, Lim HN, Shraiman BI, Van Oudenaarden A. 2004. Multistability in the Lactose Utilization Network of *Escherichia Coli*. *Nature* 427:737-740.
- Pandey DP, Gerdes K. 2005. Toxin-Antitoxin Loci Are Highly Abundant in Free-Living but Lost from Host-Associated Prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 33:966-976.
- Paulsson J. 2004. Summing up the Noise in Gene Networks. *Nature* 427:415-418.
- Pedersen K, Christensen SK, Gerdes K. 2002. Rapid Induction and Reversal of a Bacteriostatic Condition by Controlled Expression of Toxins and Antitoxins. *Mol Microbiol* 45:501-510.
- Pedraza JM, van Oudenaarden A. 2005. Noise Propagation in Gene Networks. *Science* 307:1965-1969.
- Piggot PJ, Hilbert DW. 2004. Sporulation of *Bacillus Subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 7:579-586.
- Pin C, Baranyi J. 2006. Kinetics of Single Cells: Observation and Modeling of a Stochastic Process. *Appl Environ Microbiol* 72:2163-2169.
- Rahman I, Shahamat M, Chowdhury MA, Colwell RR. 1996. Potential Virulence of Viable but Nonculturable *Shigella Dysenteriae* Type 1. *Appl Environ Microbiol* 62:115-120.
- Rahman MH, Suzuki S, Kawai K. 2001. Formation of Viable but Non-Culturable State (Vbnc) of *Aeromonas Hydrophila* and Its Virulence in Goldfish, *Carassius Auratus*. *Microbiol Res* 156:103-106.
- Rao CV, Wolf DM, Arkin AP. 2002. Control, Exploitation and Tolerance of Intracellular Noise. *Nature* 420:231-237.
- Raser JM, O'Shea EK. 2005. Noise in Gene Expression: Origins, Consequences, and Control. *Science* 309:2010-2013.
- Riley MA, Gordon DM. 1999. The Ecological Role of Bacteriocins in Bacterial Competition. *Trends Microbiol* 7:129-133.
- Robinson VL, Buckler DR, Stock AM. 2000. A Tale of Two Components: A Novel Kinase and a Regulatory Switch. *Nat Struct Biol* 7:626-633.
- Rose RE. 1988. The Nucleotide Sequence of Pacyc184. *Nucleic Acids Res* 16:355.
- Rozsak DB, Colwell RR. 1987. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiol Rev* 51:365-379.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schellhorn HE, Hassan HM. 1988. Transcriptional Regulation of *Kate* in *Escherichia Coli* K-12. *J Bacteriol* 170:4286-4292.



- Shen-Orr SS, Milo R, Mangan S, Alon U. 2002. Network Motifs in the Transcriptional Regulation Network of Escherichia Coli. *Nat Genet* 31:64-68.
- Shimada T, Makinoshima H, Ogawa Y, Miki T, Maeda M, Ishihama A. 2004. Classification and Strength Measurement of Stationary-Phase Promoters by Use of a Newly Developed Promoter Cloning Vector. *J Bacteriol* 186:7112-7122.
- Siegele DA, Almiron M, Kolter R. 1993. Approaches to the Study of Survival and Death in Stationary Phase Escherichia Coli. In: Kjelleberg S, ed. *Starvation in Bacteria*. New York: Plenum Press.
- Siegele DA, Hu JC. 1997. Gene Expression from Plasmids Containing the Arabidopsis Promoter at Subsaturating Inducer Concentrations Represents Mixed Populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8168-8172.
- Signoretto C, Lleo MM, Tafi MC, Canepari P. 2000. Cell Wall Chemical Composition of Enterococcus Faecalis in the Viable but Nonculturable State. *Appl Environ Microbiol* 66:1953-1959.
- Smits WK, Kuipers OP, Veening JW. 2006. Phenotypic Variation in Bacteria: The Role of Feedback Regulation. *Nat Rev Microbiol* 4:259-271.
- Stewart EJ, Madden R, Paul G, Taddei F. 2005. Aging and Death in an Organism That Reproduces by Morphologically Symmetric Division. *PLoS Biol* 3:e45.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000. Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* 69:183-215.
- Sufya N, Allison DG, Gilbert P. 2003. Clonal Variation in Maximum Specific Growth Rate and Susceptibility Towards Antimicrobials. *J Appl Microbiol* 95:1261-1267.
- Tamarit J, Cabisco E, Ros J. 1998. Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in Escherichia Coli Cells Exposed to Oxidative Stress. *J Biol Chem* 273:3027-3032.
- Thattai M, van Oudenaarden A. 2001. Intrinsic Noise in Gene Regulatory Networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8614-8619.
- Thattai M, van Oudenaarden A. 2004. Stochastic Gene Expression in Fluctuating Environments. *Genetics* 167:523-530.
- Tolker-Nielsen T, Holmstrom K, Boe L, Molin S. 1998. Non-Genetic Population Heterogeneity Studied by in Situ Polymerase Chain Reaction. *Mol Microbiol* 27:1099-1105.
- van der Woude MW, Baumler AJ. 2004. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17:581-611, table of contents.
- Vilar JM, Guet CC, Leibler S. 2003. Modeling Network Dynamics: The Lac Operon, a Case Study. *J Cell Biol* 161:471-476.
- Wada A, Igarashi K, Yoshimura S, Aimoto S, Ishihama A. 1995. Ribosome Modulation Factor: Stationary Growth Phase-Specific Inhibitor of Ribosome Functions from Escherichia Coli. *Biochem Biophys Res Commun* 214:410-417.
- Wada A, Yamazaki Y, Fujita N, Ishihama A. 1990. Structure and Probable Genetic Location of A "Ribosome Modulation Factor" Associated with 100s Ribosomes in Stationary-Phase Escherichia Coli Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2657-2661.
- Walsh C. 2003. *Antibiotics: Action, Origins, Resistance*. Washington DC: ASM Press.
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R. 2005. Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in Escherichia Coli: Sigma-

- Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *J Bacteriol* 187:1591-1603.
- Wentzel AM, Stancek M, Isaksson LA. 1998. Growth Phase Dependent Stop Codon Readthrough and Shift of Translation Reading Frame in Escherichia Coli. *FEBS Lett* 421:237-242.
- Wick LM, Egli T. 2004. Molecular Components of Physiological Stress Responses in Escherichia Coli. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89:1-45.
- Wiuiff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin BR. 2005. Phenotypic Tolerance: Antibiotic Enrichment of Noninherited Resistance in Bacterial Populations. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1483-1494.
- Wolf DM, Arkin AP. 2003. Motifs, Modules and Games in Bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6:125-134.
- Wong HC, Wang P. 2004. Induction of Viable but Nonculturable State in Vibrio Parahaemolyticus and Its Susceptibility to Environmental Stresses. *J Appl Microbiol* 96:359-366.
- Yu J, Xiao J, Ren X, Lao K, Xie XS. 2006. Probing Gene Expression in Live Cells, One Protein Molecule at a Time. *Science* 311:1600-1603.
- Zambrano MM, Siegle DA, Almiron M, Tormo A, Kolter R. 1993. Microbial Competition: Escherichia Coli Mutants That Take over Stationary Phase Cultures. *Science* 259:1757-1760.
- Zinser ER, Kolter R. 1999. Mutations Enhancing Amino Acid Catabolism Confer a Growth Advantage in Stationary Phase. *J Bacteriol* 181:5800-5807.

[www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org)

## **TÄNUSÕNAD**

Tänu kõikidele, kes mind selle töö juures juhendasid ja aitasid. Eriti suur aitäh Tanelile ja Arvile heade nõuannete ja kannatlikkuse eest.

A-labori inimesed, olge kõik sama vahvad edasi!

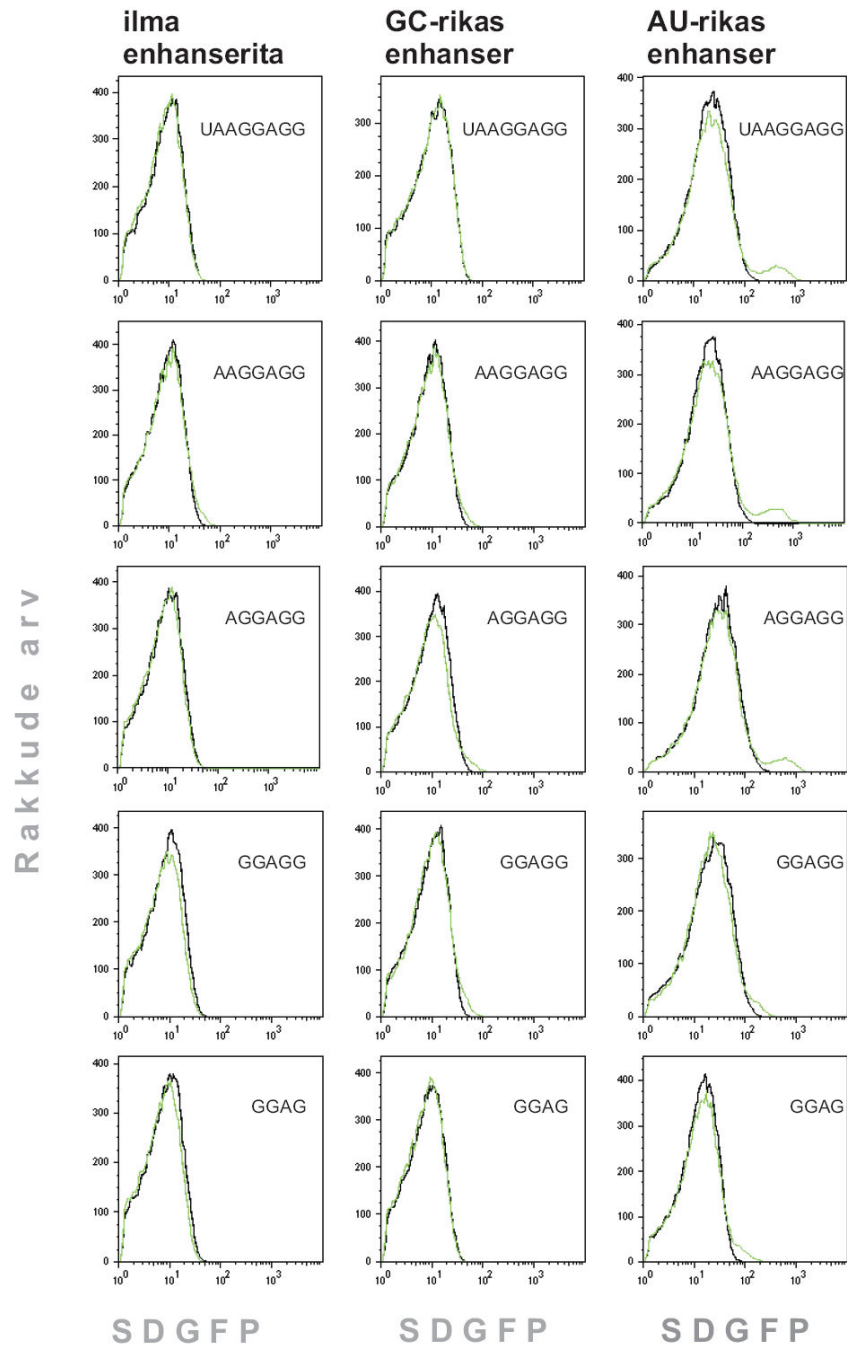
Täna ka oma armsat meest ja väikest ema, kes mind töö kirjutamise ajal toetasid.

## LISA 1

1. \*\* AGGAGG
2. \*\*\* GGAGG
3. \* AAGGAGG
4. UAAGGAGG
5. \*\*\* GGAG \*
6. \*\*\*\* GAGG
7. \*\*\*\* GAG \*
8. \*\*\*\*\* AGG
9. \*\*\*\*\* GG
10. \*\*\*\*\* G

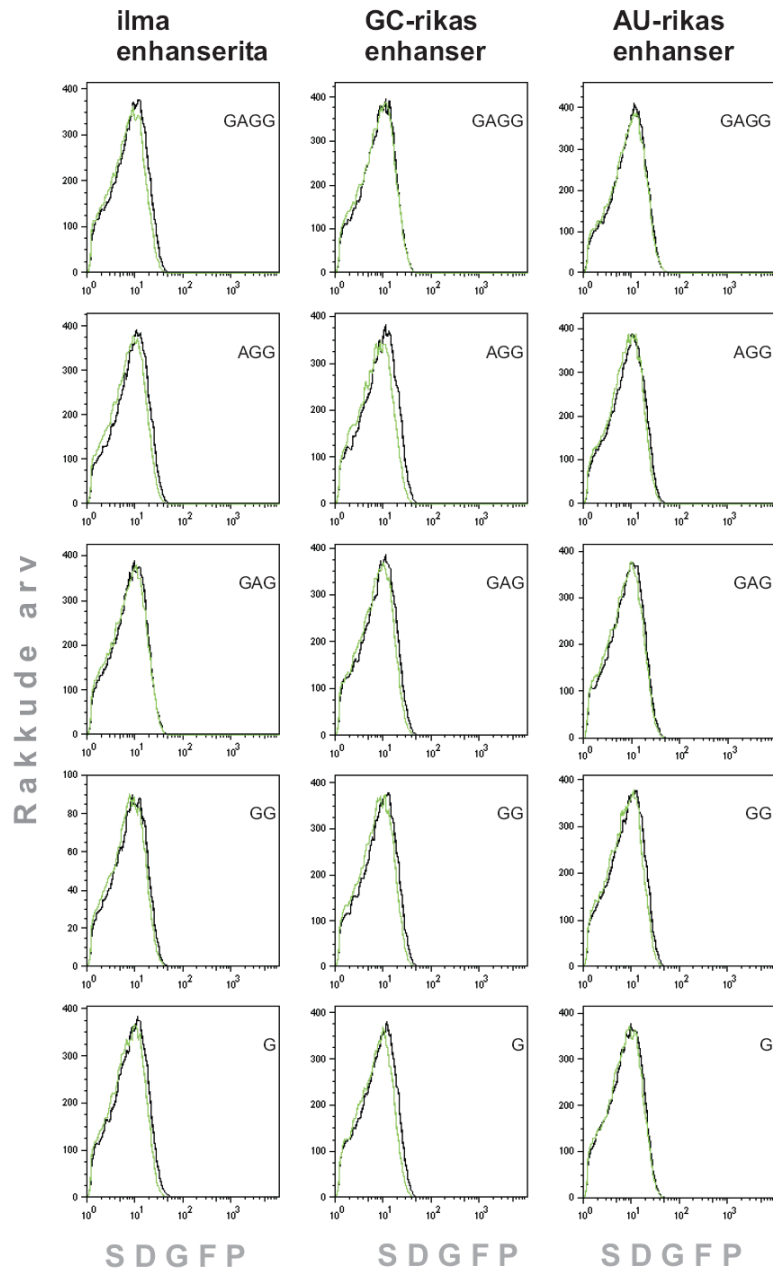
**Lisa 1.** Alustades kõige tugevamast on ülevalt alla loetletud SD järjestused vastavalt nende efektiivsusele initsieerida *E. coli* rakkudes translatsiooni (Vladimir Vimberg, avaldamata andmed). Järjestused on konstrueeritud Komarova jt (2002) eeskujul lähtudes järjestusest nr 4. Tärniga on tähistatud nukleotiidid, mis on võrreldes järjestuses nr 4 toodule asendatud vastavale positsioonile komplementaarse nukleotiidiga.

# LISA 2



indutseerimata rakud  
+ IPTG

# LISA 2 järg



## LISA 2 järg

**Lisa 2.** *E. coli* rakkude võime indutseerida statsionaarses faasis reportergeeni ekspressiooni. Translatsiooniinitsiatsiooniregioonide efektiivsuse võrdlus statsionaarses faasis. *E. coli* MG1655 bakterid sisaldasid erinevaid pETgfpmut2 plasmidi variante (tabel 2), milles reportergeeni ekspressiooni kontrollib erinev translatsiooniinitsiatsiooniregioon (kombinatsioonid erinevates SD järjestustes ja GC- või AU-rikastest enhanserist). 24 h statsionaarses faasis viibinud kultuuris indutseeriti 1 mM IPTG-ga, kas 24 h jooksul reportergeeni ekspressioon. Proovid analüüsiti läbivoolutsütomeetrial. X-telg tähistab SDGFP signaali intensiivsust, Y-telg rakkude arvu.