

Odrednice bakterijske prilagodbe kod pojedinačne okolišne promjene

Colar Zanjko, Mihael

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:880315>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mihael Colar Zanjko

6909/BT

**Odrednice bakterijske prilagodbe kod pojedinačne
okolišne promjene**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Molekularna genetika

Mentor: Prof. dr. sc. *Višnja Bačun-Družina*

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

ODREDNICE BAKTERIJSKE PRILAGODBE KOD POJEDINAČNE OKOLIŠNE PROMJENE

Mihael Colar Zanjko, 6909/BT

Sažetak: Bakterije su prisutne u svakoj ekološkoj niši. To im je omogućeno zbog njihove sposobnosti da se brzo prilagođavaju okolišnim uvjetima. Gram negativne bakterije su razvile najviše mehanizama prilagodbe koji se aktiviraju tijekom ulaska u stacionarnu fazu rasta, a manifestiraju se preko morfoloških, fizioloških i metaboličkih promjena. Mehanizmi prilagodbe su uglavnom regulirani preko globalnih molekularnih transkripcijskih regulatora. Kako će se bakterijska populacija prilagoditi nakon što prođe pojedinačnu okolišnu promjenu ovisi o povijesti njezine kulture i njezinom genotipu. Ovisno o njezinoj povijesti populacija ne mora biti uniformna, nego može doći do pojave heterogenosti. Heterogenost bakterijske kulture također igra važnu ulogu u prilagodbi bakterijske kulture na nove uvjete kod pojedinačne okolišne promjene.

Ključne riječi: stacionarna faza rasta, bakterijska prilagodba, mehanizmi odgovora na stres

Rad sadrži: 31 stranicu, 2 slike, 1 tablicu, 102 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom obliku i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina

Rad predan: 4. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Final work

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

DETERMINANTS OF BACTERIAL ADAPTATION IN A SINGLE ENVIRONMENTAL TRANSITION

Mihael Colar Zanjko, 6909/BT

Abstract: Bacteria are present in every ecological niche. They are able to do that because of their ability to adapt fast to environmental conditions. Gram negative bacteria have the most developed adaptational mechanisms, which are activated upon entry into stationary phase, and manifest themselves through morphological, physiological and metabolic changes. The adaptational mechanisms are regulated through global molecular transcriptional regulators. How a bacterial population will adapt when going through a single environmental transition is dependent on its culture history and genotype. Depending on its culture history the population may not be uniform in that it is heterogenous. Culture heterogeneity also plays a crucial role in the adaptation of a bacterial culture when going through an environmental transition.

Key words: stationary growth phase, bacterial adaptation, stress response mechanisms

Thesis contains: 31 pages, 2 figures, 1 tables, 102 references

Original in: Croatian

Final work is printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Ph.D. Višnja Bačun-Družina, Full Professor*

Thesis delivered: 4th July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. GLAVNI DIO	2
2.1. Krivulja rasta bakterijskih stanica	2
2.2. σ faktori	3
2.2.1. Protein RpoS i gen <i>rpoS</i>	4
2.2.1.1. Regulacija gena <i>rpoS</i> na razini transkripcije	5
2.2.1.2. Regulacija gena <i>rpoS</i> na razini translacije	6
2.2.1.3. Regulacija sinteze RpoS na razini stabilnosti proteina	7
2.2.1.4. Regulacija sinteze RpoS na razini aktivnosti proteina	7
2.3. Bakterijska prilagodba tijekom stacionarne faze rasta	9
2.3.1. Morfološke promjene stanica	9
2.3.2. Promjene u metabolizmu stanica	10
2.3.3. Promjene strukture nukleoida	10
2.3.4. Regulacijska uloga sRNA	11
2.3.5. Leucin regulatorni protein	11
2.4. Genotip kao odrednica bakterijske prilagodbe	12
2.4.1. Sklonost mutacijama	14
2.4.1.1. Popravak krivo sparenih baza	15
2.5. Povijest bakterijske kulture kao odrednica bakterijske adaptacije	16
2.5.1. Brzina rasta bakterijske kulture prije promjene	16
2.5.2. Faza rasta bakterijske kulture prije promjene	17
2.5.3. Prethodno izlaganje bakterijske kulture stresu	18
2.5.4. Veličina i gustoća bakterijske kulture	19
2.5.5. Pojava istraživanja bakterijskih kvoruma	20
2.5.6. Pojava heterogenosti unutar bakterijske populacije	20
2.5.6.1. Fenotipska heterogenost	21
2.5.6.2. Genotipska heterogenost	22
3. ZAKLJUČAK	25
LITERATURA	26

1. UVOD

Organizmi nižeg evolucijskog nivoa poput bakterija žive u okolišnim uvjetima koji su podložni neprestanim promjenama. Iz tog razloga njihovo preživljavanje ovisi o sposobnosti detektiranja uvjeta okoline i prilagođavanju istima. Bakterije su razvile osjetila koja im omogućuju detektiranje izvora hranjivih tvari (izvora ugljika, dušika, sumpora, fosfora i iona) te faktora koji utječu na rast (pH, temperatura, koncentracija kisika, osmotski tlak) primanjem i procesiranjem ekstracelularnih signala. U prirodi bakterije vrlo rijetko žive u uvjetima koji im dozvoljavaju duže periode eksponencijalnog rasta, pa je točnije reći da je bakterijski rast karakteriziran dugim periodima deprivacije hranjivim tvarima koji su povremeno prekinuti kratkim periodima brzog rasta. Takvi ciklusi su opisani kao razdoblja gozbe i gladi (Kolter i sur., 1993). Kada koncentracija hranjivih tvari nije dovoljna za preživljavanje bakterija ili su uvjeti okoline nepovoljni, većina nesporegenih bakterijskih stanica ulazi u stacionarnu fazu rasta kako bi zadržale vijabilnost. S pojavom optimalnih izvora hranjivih tvari bakterije ulaze u lag fazu rasta u kojoj se prilagođavaju na nove uvjete, te zatim ulaze u eksponencijalnu pa u stacionarnu fazu rasta, tj. prolaze uobičajeni bakterijski stanični ciklus (Bačun-Družina i sur., 2011).

Bakterije su jedini organizmi koji su uspjeli pronaći svoje mjesto u svakom ekosistemu, a to su postigle zahvaljujući izvanrednoj sposobnosti adaptacije na nepovoljne okolišne uvjete. Mehanizam adaptacije se uglavnom temelji na djelovanju regulacijskih faktora koji djeluju na razini transkripcije. Osim njih za prilagodbu su ključni i tzv. σ (sigma) faktori koji povećavaju afinitet RNA polimeraze za specifične promotrske regije bakterijskih operona. Broj tih faktora se razlikuje od jedne do druge bakterijske vrste (čak i između nekih sojeva sa specifičnim mutacijama), te ih je npr. u *Escherichii coli* pronađeno 7. Sigma faktori, sklonost mutaciji, te pojava heterogenosti unutar populacije su pokazatelji važnosti genotipa bakterijske kulture kod njezine adaptacije na okoliš u koji je uvedena. Povijest bakterijske kulture i izmjena genetičkog materijala su također dvije bitne determinante prilagodbe bakterijskih stanica na okolišne stresove, čije će komponente biti detaljnije razrađene u nastavku ovog rada, a posebna pažnja će se posvetiti i na promjene koje nastaju tijekom stacionarne faze rasta bakterija, tj. faze u kojoj se bakterije najčešće nalaze u uvjetima stresa.

2. GLAVNI DIO

2.1. Krivulja rasta bakterijskih stanica

Rast bakterijskih stanica u laboratorijskim uvjetima se može prikazati krivuljom rasta, koje se dijeli u nekoliko segmenata (faza). Prva faza se zove lag faza te započinje odmah nakon inokulacije bakterijske kulture u hranjivu podlogu, a karakterizira ju povećanje volumena stanica, sinteza makromolekula i enzima te priprema za razmnožavanje. Dakle, lag faza podrazumijeva pripremanje svih sustava potrebnih za ulazak u eksponencijalnu fazu i intenzivni rast (Rolfe i Rice, 2012). Nakon lag faze slijedi eksponencijalna faza u kojoj se odvija kontinuirano razmnožavanje binarnom fisijom. Ona traje sve dok se ne iscrpe izvori hranjivih tvari ili se nakupi previše otpadnih metabolita, tj. toksina, iako se oni uglavnom nakupljaju u sljedećoj fazi koje se naziva stacionarna faza rasta. To nakupljanje toksina znači da uvjeti više nisu optimalni i u konačnici dovodi do faze odumiranja stanica. U fazi odumiranja broj vijabilnih stanica se naglo smanjuje i određeni dio stanica ugiba. Stanice koje ostanu vijabilne ne mogu se ponovno uzgajati niti izolirati (*engl.* viable but nonculturable state, VBNC) ali mogu iskoristiti nutrijente oslobođene iz mrtvih stanica te se na taj način održati u produljenoj stacionarnoj fazi koja vremenski može trajati mjesecima ili čak godinama (Shimizu, 2014).

Moglo bi se reći da bakterije većinu vremena provedu u stacionarnoj fazi koja im omogućuje preživljavanje u najekstremnijim uvjetima i razvitak rezistencije na određeni stres bez mirovanja dok neke vrste gram pozitivnih bakterija na uvjete gladovanja reagiraju tako da tvore spore (Navarro Llorens i sur., 2010). Glavni cilj bakterijske adaptacije je maksimalno smanjiti štetni učinak nepovoljnih uvjeta na bakterijsku stanicu kako bi ona u vijabilnom stanju dočekala bolje uvjete u kojima može opet ući u lag fazu a posljedično i u fazu eksponencijalnog rasta, te time obnoviti bakterijsku populaciju koja će nakon što se opet istroše svi dostupni nutrijenti prijeći u stacionarnu fazu rasta.

2.2. σ faktori

Sigma faktori su proteinske molekule koje kontroliraju promotorsku selektivnost RNA polimeraze, te nakon vezanja na RNA polimerazu dozvoljavaju efikasno vezanje na promotorsku regiju i inicijaciju transkripcije, tj. smanjuju afinitet RNA polimeraze za nespecifičnu DNA i povećavaju afinitet za određenu promotorsku regiju (Changdrangsu i Helmann, 2005). Sve bakterijske stanice sadrže osnovni sigma faktor koji je odgovoran za transkripciju konstitutivnih gena odgovornih za rast u razvoj stanice. Budući da pojedini sigma faktor može inicirati transkripciju na regulonima koji sadrže po nekoliko stotina gena, sigma faktori su efikasan mehanizam simultane regulacije velikog broja prokariotskih gena (Kazmierczak i sur., 2005). Regulon je skup operona koji su smješteni u genomu bez nekog određenog reda ali su regulirani istim proteinom. Veliki broj bakterijskih vrsta također posjeduje alternativne sigma faktore čija aktivnost uvelike ovisi o okolišnim uvjetima ili intracelularnim signalnim molekulama. Njihovim djelovanjem se aktiviraju setovi određenih gena koji su odgovorni za adaptaciju na stresne uvjete, poput npr. tvorbe endospora (Changdrangsu i Helmann, 2005).

U bakteriji *E. coli*, koja je modelni organizam, do sada je opisano sedam σ faktora čija je uloga ključna ovisno o stimulacijama iz okoliša (tablica 1) te redom su odgovorni: σ^{19} za transport iona, σ^{24} za ekstremne temperature, σ^{28} za biosintezu bičeva, σ^{32} za toplinski šok, σ^{38} za stacionarnu fazu, σ^{54} za regulaciju dušika, σ^{70} za ekspresiju konstitutivno eksprimiranih gena (Shimizu, 2014). Konstitutivno eksprimiran σ faktor je σ^{70} , a produkt je gena *rpoD*. Alternativni σ faktori: σ^{54} , σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} i σ^{19} su produkti sljedećih redom navedenih gena: *rpoN*, *rpoS*, *rpoH*, *fliA*, *rpoE*, i *fecI*. Jedini sigma faktor koji je esencijalan je σ^{70} jer on kontrolira regulaciju većine ostalih sigma faktora, pa čak i samoga sebe, i njegov regulon je najveće duljine (Cho i sur., 2014). Sigma faktor σ^{38} djeluje kao regulator većine ostalih sigma faktor, dok σ^{24} ima i mogućnost autoregulacije. Svi sigma faktori imaju različit afinitet vezanja za RNA polimerazu (RNAP) pa se posljedično ne transkribiraju svi geni podjednako, a mehanizam počiva na tome da između sigma faktora postoji kompeticija za ograničen broj molekula slobodne RNAP (Kazmierczak i sur., 2005), npr. 600-700 molekula slobodne RNAP po stanici u *Escherichii coli* (Ishihama, 2000). Regulacija sigma podjedinica RNA polimeraze se odvija na više razina i to na razini transkripcije, translacije, stabilnosti nastalog proteina i na razini aktivnosti proteina (Changdrangsu i Helmann, 2005).

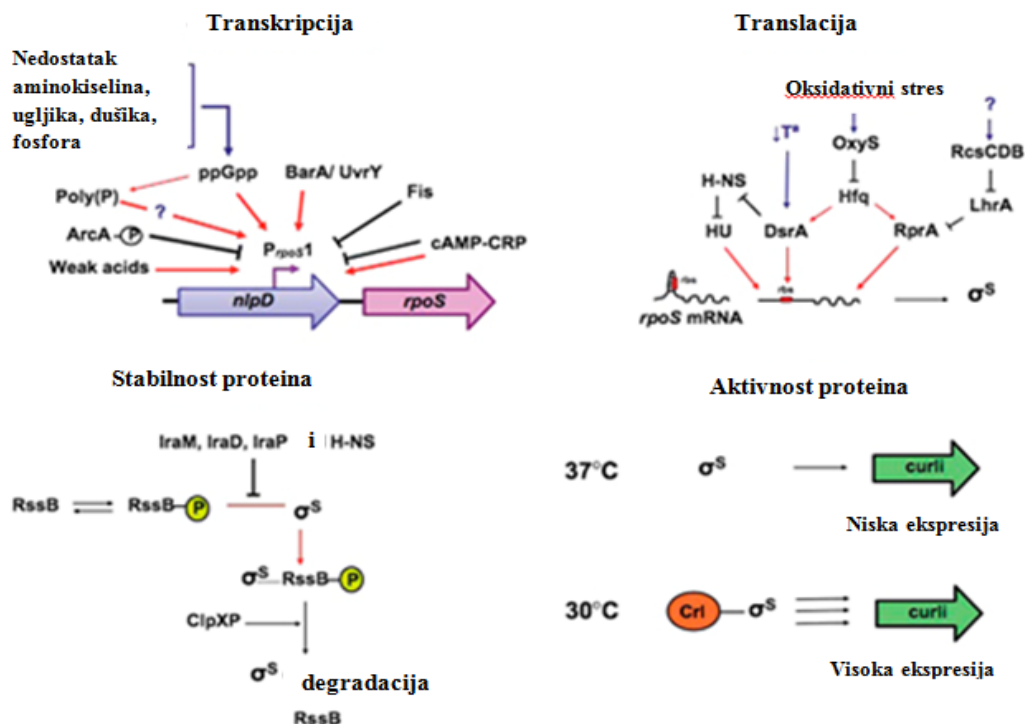
Tablica 1: Lista σ faktora pronađenih u *E. coli*, uz ime gena koji ih kodiraju i funkcije u stanici (plava boja-najzastupljeniji sigma faktor u *E.coli*; zelena boja-sigma faktor koji ima važnu ulogu kod bakterijske prilagodbe)

Sigma faktor	Gen	Funkcija
σ^{70}	<i>rpoD</i>	Ekspresija konstitutivno eksprimiranih gena
σ^{54}	<i>rpoN</i>	Ekspresija gena za regulacija dušika
σ^{38}	<i>rpoS</i>	Ekspresija gena tijekom stacionarne faze
σ^{32}	<i>rpoH</i>	Ekspresija gena za odgovor na toplinski šok
σ^{28}	<i>rpoF</i>	Ekspresija gena odgovornih za sintezu bičeva i kemotaksiju
σ^{24}	<i>rpoE</i>	Ekspresija gena odgovora na ekstremne temperature uvjete
σ^{19}	<i>fecI</i>	Ekspresija gena odgovornih za transport iona

2.2.1. Gen *rpoS* i protein RpoS

Podjedinica holoenzima RNA polimeraze protein RpoS glavni je regulator stacionarne faze rasta te se na primjeru tog regulatora može opisati kompleksnost cijelog sustava regulacije. Protein RpoS pripada porodici faktora σ^{70} . Protein RpoS je odgovoran za ekspresiju oko 1 000 gena, što je oko 10% sveukupnih gena u *E. coli* (Weber i sur., 2005).

Iako je gen *rpoS* eksprimiran i tijekom eksponencijalne faze rasta bakterija, koncentracija proteina RpoS se značajnije povećava tek ulaskom u stacionarnu fazu rasta ili djelovanjem stresa na bakterijsku stanicu. Protein RpoS se smatra glavnim regulatorom generalnog odgovora bakterije na stres, a aktivira se izloženošću različitim stresnim uvjetima te je često popraćen redukcijom ili prestankom bakterijskog rasta, ali ne uvijek, te je zbog toga zaslužan za brzi odgovor bakterije i njezinu adaptaciju na različite stresove, čak i one koji u danom trenutku nisu prisutni (Hengge-Aronis, 2002). Do povećanja razine proteina RpoS u stanici dolazi zbog povećane transkripcije gena *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002), bolje učinkovitosti translacije i povećanja stabilnosti proteina (Lange i Hengge-Aronis, 1994). Regulacija aktivnosti proteina RpoS na svim specifičnim razinama shematski je prikazana na slici 1.



Slika 1: Shema regulacije aktivnosti proteina RpoS na svim specifičnim razinama regulacije (prilagođeno prema Navarro Llorens i sur., 2010)

2.2.1.1. Regulacija gena *rpoS* na razini transkripcije

Gen *nlpD* (strukturalni gen za lipoprotein) se nalazi uzvodno od gena *rpoS* i transkribira se u istom smjeru (suprotno od smjera kazaljke na satu). Iako gen *nlpD* nije induciran tek u stacionarnoj fazi, promotori ova 2 gena koji su jako blizu smješteni doprinose bazalnom nivou ekspresije gena *rpoS* u eksponencijalnoj fazi rasta (Lange i sur., 1995). Što se tiče regulacije transkripcije gena *rpoS* postoji nekoliko odgovornih regulatora. Prvi regulator je cAMP-CRP kompleks koji ovisno o fazi rasta bakterije utječe na transkripciju gena *rpoS*, a sam taj kompleks nastaje vezanjem cAMP (*engl.* cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) na CRP (*engl.* cyclic AMP receptor protein). Navedeni kompleks cAMP-CRP stimulira transkripciju gena *rpoS* tijekom stacionarne faze, a reprimira ju tijekom eksponencijalne faze rasta (Hengge-Aronis, 2002). Kompleks cAMP-CRP stimulira transkripciju tako što se direktno veže na aktivatorsko mjesto na poziciju -62 do -5 uzvodno od startnog mjesta transkripcije gena *rpoS* (Mika i Hengge, 2005). Protein ArcA u fosforiliranom obliku je također jedan od regulatora staničnog odgovora na stres, a veže se između pozicija -63

uzvodno i +23 nizvodno od početnog mjesta transkripcije gena *rpoS*, što se preklapa s veznim mjestom za cAMP-CRP te na taj način aktivira transkripciju. Dvokomponentni sustav BarA/UvrA također pozitivno utječe na transkripciju *rpoS*, ali način djelovanja još uvijek nije poznat (Hengge, 2008).

No, između svih tih regulatora transkripcije gena *rpoS* najveću ulogu igra nukleotid gvanozin 3',5'-difosfat (ppGGpp). Ta molekula je alarmon, tj. mala signalna molekula koja bakterijskoj stanici omogućava brzi odaziv kod različitih uvjeta stresa (Ross i sur., 2013), a djeluje tako da se u uvjetima gladi veže na β i β' podjedinice RNA polimeraze i inducira ekspresiju gena *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002). Istraživanjima je utvrđeno i eksperimentalno dokazano da neke slabe kiseline poput acetata ili propionata također pozitivno utječu na ekspresiju *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002).

2.2.1.2. Regulacija gena *rpoS* na razini translacije

Vrijeme poluživota većine mRNA molekula u *E. coli* iznosi nekoliko minuta te je isti slučaj s mRNA proteina RpoS, na čiju stabilnost može utjecati prekomjerna produkcija sRNA molekula (*engl.* small RNAs) što ujedno stimulira translaciju (McCullen i sur., 2010). Za uspješan proces translacije transkripta gena *rpoS* potreban je RNA vezujući protein Hfq (*engl.* host factor for phage Q beta). Naime, on djeluje kao poveznica koja olakšava interakcije sRNA i mRNA molekula tijekom translacije, a ulazi u interakcije s barem tri sRNA: ArcZ (*engl.* arc-associated sRNA Z), DsrA (*engl.* derepressor of *rcaA*) i RprA (*engl.* RpoS regulatory RNA A) prilikom translacije mRNA RpoS (Mandin i Gottesman, 2010). U stresnim uvjetima, prilikom početka translacije, događa se promjena sekundarne strukture u 5'-UTR regiji mRNA RpoS nakon čega inicijacijska regija translacije postaje dostupna za vezanje na ribosome. Sama translacija počinje nakon što se određena sRNA molekula veže s inicijacijskom regijom translacije mRNA RpoS. Sve tri prije navedene sRNA molekule (DsrA, ArcZ i RprA) aktiviraju translaciju istim mehanizmom ali u različitim uvjetima (McCullen i sur., 2010). Tako npr. protein RprA inducira translaciju RpoS u hiperosmotskim uvjetima, dok protein DsrA to radi pri niskim temperaturama. Protein ArcZ funkcionira malo drugačije, on se nalazi pod negativnom kontrolom dvokomponentnog sistema ArcB/ArcA (Mandin i Gottesman, 2010). Još jedna molekula koja stimulira inicijaciju translacije mRNA RpoS je HU (*engl.* histon-like protein; Hengge-Aronis, 2002). Protein HU se veže direktno na inicijacijsku regiju translacije te na taj način direktno stimulira proces translacije. Sustav

otpuštanja fosfata Rcs, je također jedan od načina aktivacije translacije RpoS, a to može postići na dva načina: direktnom stimulacijom RprA (Majdalani i sur., 2001) i represijom RprA represorom LrhA (Peterson i sur., 2006). Molekula sRNA OxyS je zabilježena kao negativni regulator translacije mRNA RpoS u uvjetima stresa izazvanima s vodikovim peroksidom, no sam mehanizam te regulacije još nije razjašnjen (Zhang i sur., 1998).

2.2.1.3. Regulacija gena *rpoS* na razini stabilnosti proteina

Stabilnost proteina RpoS ovisi o fazi rasta bakterijskih stanica, pa je protein prilično nestabilan u stanicama koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, a stabilnost mu se povećava kada su stanice izložene uvjetima gladovanja ili nekim drugim stresovima.

Regulator staničnog odgovora RssB (*engl.* regulator of sigma S) je potreban za proces degradacije RpoS, a samu degradaciju kontrolira ClpXP, ATP ovisna proteaza (Zhou i sur., 2001). Fosforilacijom proteina RssB raste njegov afinitet za protein RpoS, te se proteinu RpoS nakon vezanja fosforiliranog RssB mijenja konformacija, a ta promjena konformacije omogućava proteazi ClpXP prepoznavanje N-terminalnog kraja proteina RpoS. Ključni dio koji proteaza prepoznaje se nalazi između 7. i 35. aminokiselinskog ostatka. Lako je za pretpostaviti da se fosforilacija proteina RssB mijenja ovisno o okolišnim uvjetima pošto je dokazano da se samo fosforilirani oblik proteina RssB može vezati na RpoS in *in vitro* i in *vivo*. No, fosforilacija RssB se ne čini kao pogodan mehanizam regulacije iz nekoliko razloga: (a) fosforilirani RssB je u usporedbi s drugim regulatorima veoma stabilan i ne pokazuje intrinzičnu fosfataznu aktivnost, (b) eksperimentalno je dokazano da tijekom proteolize ne dolazi do defosforilacije proteina RssB i (c) potraga za mutantima fosfataze koja fosforilira RssB nije dala nikakve rezultate (Filloux, 2012). Brza stabilizacija RpoS postiže mijenjanjem omjera proteina RssB i RpoS, koji se održava regulacijom u negativnoj povratnoj sprezi jer je ekspresija RssB ovisna o proteinu RpoS. Smanjenje dostupne količine proteina RssB se može postići pomoću 3 mala anti-RssB proteina: IraP, IraM i IraD. Ovi proteini „izoliraju“ protein RssB direktnom interakcijom, a induciraju se u različitim uvjetima. IraP se inducira prilikom nedostatka fosfata (Bougdour i sur., 2006), IraM pri niskoj koncentraciji magnezija (Bougdour i sur., 2008), a IraD nakon oštećenja DNA ili zbog djelovanja vodikovog peroksida (Merrikh i sur., 2009). Pretpostavlja se da H-NS doprinosi degradaciji RpoS jer u mutantima *hns* nije pronađen degradiran protein RpoS (Zhou i Gottesman, 2006).

2.2.1.4. Regulacija sinteze RpoS na razini aktivnosti proteina

Aktivnost sigma faktora a samim time i proteina RpoS je ovisna o njihovom vezanju na jezgru RNA polimeraze, pa je sama meta regulacije formacija holoenzima RNAP (Sharma i Chatterji, 2010). Za razliku od ostalih sigma faktora ne postoji niti jedan anti-sigma faktor koji bi inhibirao aktivnost σ^{38} posljedično i proteina RpoS. Kompeticija između različitih sigma faktora za vezanje na ograničenu količinu dostupne RNA polimeraze je glavni način kontrole aktivnosti sigma faktora. Zapravo se na prvi pogled RpoS čini kao loš kandidat za takvu vrstu kompeticije, jer iako je dominantan sigma faktor u stacionarnoj fazi te kontrolira oko 10% gena u *E. coli* ima ga tri puta manje nego σ^{70} podjedinice i njegov afinitet za RNA polimerazu je najmanji (Filloux, 2012). Dakle, podjedinica σ^{70} je najveći konkurent za vezanje na srž enzima, ali joj onemogućava anti- σ^{70} protein Rsd koji se u stacionarnoj fazi nakuplja i veže na nju te ju tako sprječava da se veže na srž RNAP. Još jedan faktor inhibicije induciran u stacionarnoj fazi je molekula 6S RNA koji inhibira aktivnost faktora σ^{70} vezanog na RNA polimerazu, a ppGGpp utječe na konformaciju RNA polimeraze tako da omogućuje nastajanje holoenzima s vezanom RpoS podjedinicom. Pronađena su 2 faktora koji specifično utječu na aktivnost proteina RpoS. Jedan od njih je Crl koji se veže na RpoS i aktivno potiče formaciju holoenzima RNAP s vezanom RpoS podjedinicom, te je dokazano da u koordinaciji s RNA polimerazom i RpoS regulira ekspresiju najmanje 40 gena karakterističnih za produljenu stacionarnu fazu pri 30 °C (Lelong i sur., 2007). Drugi faktor je protein FliZ koji ne dolazi u direktnu interakciju s proteinom RpoS, već negativno utječe na ekspresiju RpoS-ovisnih gena (Filloux, 2012).

Iako se proteinu RpoS izvorno pripisuje uloga odgovara na različite tipove stresa kojima su bakterijske stanice prirodno izložene u cilju adaptacije stanica, njegova regulatorna uloga nije isključivo vezana uz gene odgovorne za bakterijsku adaptaciju. Funkcijske razine RpoS-ovisnih gena su: popravak DNA, sinteza proteina, transporta proteina, biosinteza i metabolizam ugljikohidrata, aminokiselina i masnih kiselina (Cho i sur., 2014). Protein RpoS također regulira ekspresiju enzima koji sudjeluju u popravku DNA poput egozonukleaze kodirane genom *xthA* i metil transferaze kodirane genom *ada*, ekspresiju gena *bolA* koji determiniraju staničnu morfologiju i druge (Cho i sur., 2014).

2.3. Bakterijska prilagodba tijekom stacionarne faze rasta

2.3.1. Morfološke promjene stanica

Ulaskom u stacionarnu fazu bakterijske stanice prolaze kroz morfološke promjene, a glavna od njih je smanjenje veličine stanica. To smanjenje je rezultat dvaju procesa koji se odvijaju simultano. Prvi od njih je reduktivna dioba koja je dijelom posljedica inicijalne količine dostupne DNA u trenutku kada stanica uđe u stacionarnu fazu rasta, jer se DNA u stanicama koje se nalaze u stacionarnoj fazi ne replicira tako dugo dok sve stanice ne ostanu sa jednim kromosomom. Kod reduktivne diobe se omjer površine i volumena stanica kćeri smanjuje, te kao posljedica nastaju stanice sferičnog oblika (Nystrom, 2004). Za takav oblik stanica jednim je dijelom odgovoran transkripcijski faktor BolA (*engl.* regulator of penicillin binding proteins and beta lactamase transcription). Ekspresija gena odgovornih za sintezu BolA je uglavnom pod kontrolom proteina RpoS (Navarro Llorens i sur., 2010), ali može biti i inducirana djelovanjem nekih stresnih uvjeta (Santos i sur., 1999). Kržljanje se može objasniti kao oblik autodigestije, tj. dolazi do degradacije staničnog materijala u citoplazmi i unutarnjih membrana (Nystrom, 2004).

Kako bi se adaptirale na stresne uvjete bakterijske stanice prolaze kroz strukturalne promjene stanične stijenke, počevši od unutarnje membrane, preko periplazmatskog prostora i peptidoglikanskog sloja do vanjske membrane (Huisman i sur., 1996). Bakterijske stanice povećavaju debljinu peptidoglikanskog sloja, čime povećavaju svoju otpornost na nepovoljne uvjete (Navarro Llorens i sur., 2010). U periplazmatskom prostoru počinje se nakupljati trehaloza, ugljikohidrat koji povećava termotolerantnost stanica. Na površini vanjske membrane povećava se koncentracija lipopolisaharidnog sloja te se smanjuje broj membranskih proteina. Unutarnja membrana prolazi kroz nekoliko promjena. Smanjenje mononezasićenih masnih kiselina prati povećanje polinezasićenih masnih kiselina, od kojih se dio konvertira u derivate ciklopropila. Ukratko se može reći da se morfološke promjene unutarnje membrane stanice manifestiraju kao visoko uređena struktura sa smanjenom fluidnošću (Navarro Llorens i sur., 2010).

2.3.2. Promjene u metabolizmu stanica

Odgovor bakterija na nedostatak aminokiselina u okolišu posredovan je akumulacijom alarmona ppGGpp te je poznat pod pojmom strogi odgovor (Cashel i sur., 1996). Alarmon ppGGpp ima ulogu ključnog faktora bakterijske fiziologije jer brzo odgovara na različite signale stresa iz okoline. Istraživanjima se ustvrdilo da ima veoma bitnu ulogu u različitim procesima od formacije biofilma, preko istraživanja kvoruma (*engl.* quorum sensing, QS), antibiotske produkcije i prirodne antibiotske rezistencije (Navarro Llorens i sur., 2010).

Koncentraciju ppGGpp unutar stanice reguliraju 2 proteina, RelA i SpoT (Cashel i sur., 1996). Protein RelA može sintetizirati ppGGpp te se naziva ppGGpp sintetaza I, dok protein SpoT uz sposobnost sinteze, ppGGpp sintetaza II, posjeduje i mogućnost degradacije molekule ppGGpp koju katalizira ppGGpp hidrolaza (Navarro Llorens i sur., 2010). U uvjetima nedostatka izvora ugljika, željeza, masnih kiselina i fosfora inhibira se hidrolazna a inducira se sintetazna aktivnost, dok prisustvo prije navedenih hranjivih tvari stimulira hidrolaznu aktivnost hidrolaze ppGGpp. Što se pobliže tiče samog proteina RelA, njegova je uloga da katalizira prijenos pirofosfata s ATP-a na GTP/GDP koji zatim služi za sintezu ppGGpp (Wendrich i sur., 2002). Uloga proteina SpoT je detekcija, tj. prepoznavanje razina masnih kiselina, te u slučaju niske koncentracije istih aktivira sintezu ppGGpp (Navarro Llorens i sur., 2010) a vezan je na acilni nosač proteina.

2.3.3. Promjene strukture nukleoida

Kromosomalna DNA bakterije *E. coli*, veličine oko 4,7 megabaza, se može opisati kao slojevita i kompleksna struktura koja se sastoji od nukleoida koji su udruženi sa specifičnim proteinima, takozvanim NAP (*engl.* nucleoid associated proteins). Stanice usklađuju strukturu nukleoida preko modulacije oblika proteina NAP te na taj način odgovaraju na različite fluktuacije okolišnih uvjeta (Lin i sur., 2012). Proteinski NAP kompleks sadrži više proteina koji imaju ulogu u regulaciji ekspresije na nekoliko razina. Jedan od tih proteina je heterodimerni protein IHF (*engl.* integration host factor) i on doprinosi regulaciji određenih gena koji su aktivirani u stacionarnoj fazi rasta (Navarro Llorens i sur., 2010). Broj kopija proteina IHF u stanici varira od 12000 u eksponencijalnoj fazi rasta do 55000 u ranoj stacionarnoj fazi.

Protein HU (*engl.* histone-like protein) je strukturni homolog proteina IHF, koji je ekstenzivno proučavan zbog svoje sposobnosti vezanja nespecifične DNA. Strukturno je također dimer, a sastavljen je od podjedinica HU α i HU β . Kod istraživanja osobina HU otkriven je njegov utjecaj na translaciju mRNA proteina RpoS, ali ne i na njegovu transkripciju i stabilnost, te je nakon toga eksperimentalno dokazano da odsustvo HU rezultira manjom koncentracijom proteina RpoS. Time je potvrđena teza da je protein HU potreban za normalnu akumulaciju RpoS tijekom tranzicije bakterijskih stanica u stacionarnu fazu rasta.

2.3.4. Regulacijska uloga sRNA

Molekule sRNA također imaju regulacijsku ulogu u stacionarnoj fazi rasta, a posebno se ističu dvije sRNA molekule, MicA (*engl.* mRNA interfering complementary RNA) i RybB (*engl.* regulator of OmpC and OmpW mRNA stability) (Nagamitsu i sur., 2013). Geni *micA* i *rybB* se eksprimiraju u specifičnim uvjetima stresa poput anaerobnih uvjeta, homeostaze stanične stijenke i ograničenja ugljikom, pod utjecajem faktora σ^E (Vogel, 2009). Spomenute sRNA sprječavaju sintezu proteina vanjske membrane, tzv OMP-ove (*engl.* outer membrane protein), točnije OmpA, OmpC, i OmpW u *E. coli* što naposljetku dovodi do oštećenja stanične membrane i lize stanica (Udekwi i Wagner, 2007). Iako je njihova uloga u bakterijskoj stanici poznata, nije još pronađen točan mehanizam njihovog djelovanja. Postoji pretpostavka da liza stanica koja je ovisna o proteinu RpoE može doprinijeti uklanjanju oštećenih stanica, a do nje dolazi tijekom produljene stacionarne faze rasta (Nagamitsu i sur., 2013).

2.3.5. Leucin regulatorni protein

Leucin regulatorni protein (*engl.* leucine-responsive regulatory protein, Lrp) je globalni transkripcijski faktor pod čijom se kontrolom nalazi ekspresija 10% ukupnih gena u bakteriji *E. coli* te oko $\frac{3}{4}$ gena koji su inducirani tijekom stacionarne faze, uključujući i gene koji su zaslužni za odgovor na različite stresove poput osmotskog stresa, ograničenja hranjivih tvari i visoku koncentraciju organskih kiselina (Tani i sur., 2002). Protein Lrp aktivira ekspresiju gena čiji produkti su potrebni za rast u nutritivno siromašnom mediju, a reprimira gene koji su

potrebni za rast u nutritivno bogatom mediju (Holmqvist i sur., 2012), te promiče i neke druge transkripcijske faktore koji djeluju na nižim hijerarhijskim razinama regulacije transkripcije (Cho i sur., 2008). Svrha njegove aktivacije je koordinacija bakterijskog metabolizma s hranjivim tvarima u okolišu. Tijekom tranzicije iz eksponencijalne u stacionarnu fazu Lrp inducirani proteini potiču mobilizaciju rezervnih hranjivih tvari i metabolizam produkata fermentacije u stanici (Tani i sur., 2002). Regulatorna aktivnost proteina Lrp se regulira pozitivno ili negativno, ovisno o razini staničnog leucina, no taj efekt može i izostat, a njegova ekspresija podliježe negativnoj autoregulaciji, tako što se Lrp veže na svoj promotor (Lin i sur., 1992). Ekspresiju proteina Lrp inducira i ppGGpp.

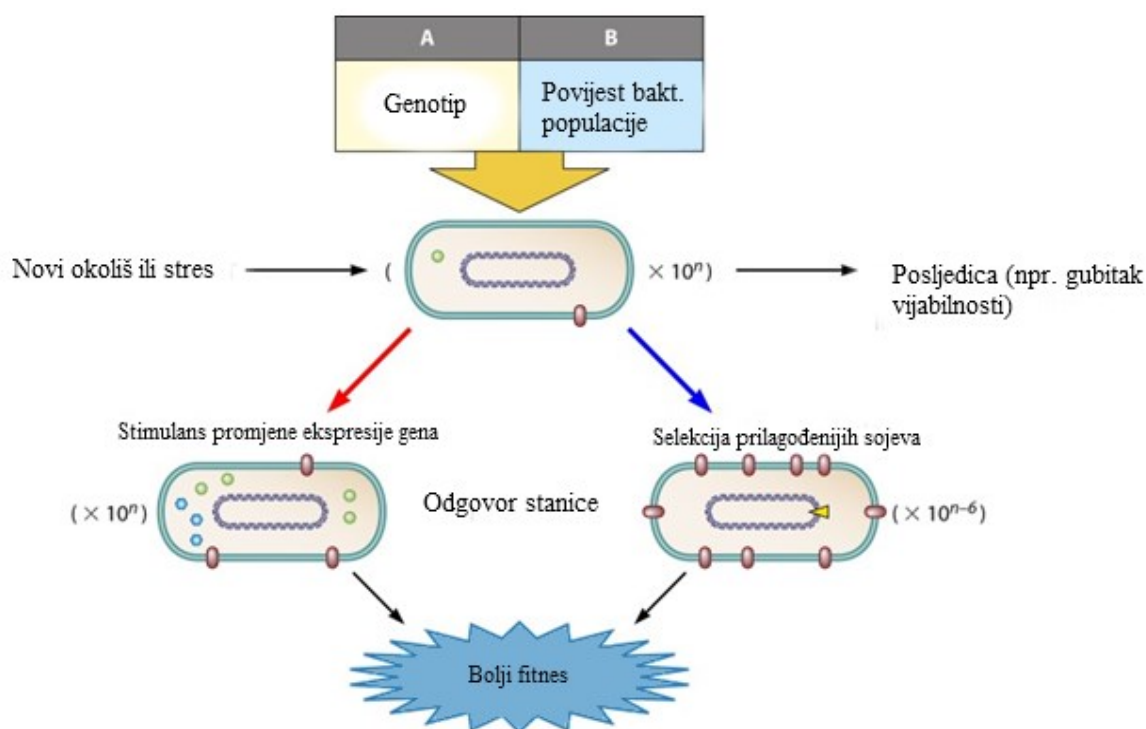
2.4. Genotip kao odrednica bakterijske prilagodbe

Genom nekog organizma determinira puteve adaptacije prikazane na slici 2 i to na dva načina. Kao prvo, genom kodira sve vitalne funkcije nekog organizma i način na koji su geni tog organizma regulirani, a pošto genomi bakterija variraju u veličini zbog različitih selekcijskih pritisaka tako se i njihova sposobnost adaptacije razlikuje između pojedinih bakterijskih vrsta (Lynch, 2006). Nadalje struktura genoma i sama sekvenca utječu na mogućnosti mutacije u bakterijskom kromosomu.

Kao što je već prije u radu spomenuto, odaziv određene bakterijske vrste na neki stres kontroliraju i određuju transkripcijski faktori i druge regulacijske komponente, a sva ta regulatorna mreža je određena genotipom određene bakterijske vrste. Novijim istraživanjima, je čak utvrđeno da se regulatorna mreža razlikuje od jedinke do jedinke, posebice u kulturama koje su „starije“ ili već bile izložene stresovima, o čemu će biti kasnije više rečeno. Te regulatorne mreže, transkripcijski faktori i njihova organizacija su istraženi za mnogo bakterijskih vrsti, između ostalog i za *E. coli* (Martinez-Antonio i sur., 2008). Iako je većina gena zadužena za regulaciju jako očuvana tijekom evolucije i predstavljaju temeljne elemente genoma to ne znači da djeluju na identičan način, pa čak unutar predstavnika iste vrste. Centralni elementi regulacije gena, npr. koncentracija sigma faktora i alarmona poput ppGGpp-a jako variraju unutar jedinki iste vrste u jednakim uvjetima (Spira i sur., 2008). Iako su varijacije specifične za pojedini genotip one ne uključuju uvijek polimorfizme u samom

regulatornom genu. Dobar primjer za to je ranije spomenuti protein RpoS, na čiju koncentraciju u stanici utječe mnoštvo faktora, te internih i eksternih stresnih signala. Alternativni ulazni signali koji utječu na razinu proteina RpoS mogu pružiti degenerativne načine utjecaja na regulaciju i mnogo alternativnih gena može promijeniti određeni dio regulatornog kruga razine proteina RpoS (Wang i sur., 2010).

Genotip također određuje mobilnost genomske DNA i način na koji rekombinacijski mehanizmi pridonose bakterijskoj adaptaciji. Ta osobina obuhvaća i potencijal za rearanžmane koje dozvoljavaju pokretni genetički elementi i integroni, pogotovo ako bakterijska stanica sadrži faktor F (*engl.* fertility factor) ili lizogene fage koji olakšavaju prijenos DNA iz stanice u stanicu. Transpozoni, insercijske sekvencije (IS), duplikacije u genomu i sekvence koje doprinose visokim stopama mutacija iskazuju potencijal za pojavu mutacija koji je opet određen genotipom kao determinantom bakterijske adaptacije, o čemu će biti više riječi u nastavku rada.



Slika 2. Shematski prikaz genotipa i povijesti bakterijske kulture kao najvažnijih odrednica bakterijske prilagodbe kod pojedinačne okolišne promjene (prilagođeno prema Ryall i sur., 2012)

2.4.1. Sklonost mutacijama

Kada se bakterijska populacija izloži promjeni okolišnih uvjeta dolazi do povećanja stope mutacija te se posljedično i poveća pojava korisnih mutacija koje će bakterijskoj kulturi pomoći kod adaptacije na nove uvjete. Jedan od načina na koji se to događa u bakterijskoj populaciji je postojanje tzv. subpopulacija konstitutivnih mutator ili hipermutator stanica (Giraud i sur., 2001).

Veliku ulogu u stopi mutacije igra sposobnost popravka DNA te mutacije u genima koji su zaduženi za popravak DNA što dovodi do povećane stope mutacija. Postoji velik broj komponenata koje su zadužene za popravak DNA koje utječu na mutabilnost stanica, no najčešće i najistraživanije mutacije su koje izazivaju nasljedni, konstitutivni mutator fenotip su one koje uključuju gene staničnog popravka krivo sparenih baza (*engl.* Mismatch repair, MMR), o kojem će više biti rečeno u sljedećem odlomku rada.

Osim što bakterijske stanice mogu posjedovati konstitutivni mutator fenotip, bakterije mogu eksprimirati i tranzijentno povećanu stopu mutacija na dva načina, iako se ponekad ti mehanizmi preklapaju. Prvi način su transkripcijske i translacijske greške ili greške nastale tijekom diobe stanica koje rezultiraju niskim koncentracijama komponenti popravka MMR, te na taj način dolazi do tranzijentne mutageneze (Ninio, 1991). Drugi mehanizam koji uzrokuje privremeno povećanje stope mutacije nosi naziv stresom inducirana mutageneza (*engl.* stress-induced mutagenesis, SIM). Sustav SIM je česta komponenta populacija *E.coli*, čemu svjedoči podatak čak 80% ispitivanih izolata starijih kolonija pokazuje fenotip stresom inducibilne mutageneze. Ta pojava dovodi do velikog povećanja broja mutacija u nekoj populaciji, no točna stopa povećanja varira i razlikuje se između pojedinih sojeva (Bjedov i sur., 2003). Nekoliko tipova genetskih alteracija može biti uključeno u SIM, poput supstitucija baza, malih insercija i delecija, rearanžmana kromosoma i kretanja pokretnih genetičkih elemenata. Sustav SIM često uključuje aktivaciju odgovora SOS zbog oštećene DNA, točnije komponenti odgovora SOS koje rade greške (*engl.* error-prone) te se time značajno poveća stopa mutacija. Korelacija između stresa i mutageneze se proteže čak do ekstracitoplazmatskih stresora preko sigma faktora RpoE. Naime, postoji pretpostavka da je jedna od funkcija RpoE uvođenje dvostrukih lomova u DNA molekulu čime se izaziva odgovor SOS, te samim time dolazi do pojave sustava SIM, te se taj mehanizam smatra

privremenom kontrolom mutageneze bakterijskih stanica tijekom njihove prilagodbe na okoliš.

2.4.1.1 Popravak krivo sparenih baza

Popravak krivo sparenih baza je vrlo važan za očuvanje integriteta genetičkog materijala, te su osnovni mehanizmi tog sustava visoko očuvani tijekom evolucije (Harfe i Jinks-Robertson, 2000). Popravak krivo sparenih baza je najpoznatiji po svojem djelovanju tijekom poslije replikacijskog popravka, što je kritično za održavanje stope mutacija na razini koja je prihvatljiva za bakterijsku stanicu. Usto, proteini MMR mogu prepoznati i greške u formiranim heterodupleksima rekombinacijskih intermedijera.

Proteini MMR su najprije otkriveni kod prokariota, gdje njihova odsutnost rezultira nastankom stanica sa mutator fenotipom. Prvi korak u popravku replikacijskih grešaka pomoću MMR je prepoznavanje helikalnih promjena koje nastaju kao rezultat inkorporacije nekomplementarnog nukleotida. Nadalje, novosintetizirani lanac DNA koji sadrži pogrešku mora se selektivno ukloniti i resintetizirati. Sposobnost prepoznavanja lanaca DNA je bitan čimbenik popravka MMR, te ukoliko taj mehanizam prepoznavanja ne funkcionira postoji mogućnost da će se replikacijska greška koristiti kao predložak za popravak DNA. Ova prva dva koraka uključuju specijalizirane proteine Mut koji su evolucijski visoko očuvani, dok se u daljnjim koracima popravka pomoću MMR koriste proteini koji su uključeni u generalne metaboličke procese DNA. MMR u *E. coli* uključuje 3 proteina Mut: MutS, MutL i MutH. Protein MutS je ATP-aza koja prepoznaje krivo sparene baze, MutL je ATP-aza koja koordinira prepoznavanje krivo sparene baze zajedno s MutS i daljnje procesiranje DNA, a MutH je endonukleaza osjetljiva na metilaciju koja označava područje popravka na novosintetiziranom lancu DNA. Dva MutS proteina se povežu i tvore dimer, za to je zadužen C-terminalni kraj proteina, te se jedino u takvom obliku mogu vezati na DNA, za što je zaduženi N-terminalni kraj proteina. Zatim se protein MutL veže na MutS, nakon čega dolazi do interakcije između MutL i MutH što za posljedicu ima stimulaciju endonukleazne aktivnosti proteina MutH. Novosintetizirani lanac DNA nije metiliran te na taj način MutH prepoznaje koji lanac mora rezati. Protein MutH može zasjecati lanac s bilo koje strane krivo sparene baze, jedina razlika u ta dva slučaja je u tome što su potrebne različite egzonukleaze za degradaciju lanca ovisno o tome s koje strane je lanac zasječen. Ipak, kako bi endonukleaze djelovale, najprije je potrebno razmotati dvostruku uzvojnica DNA, za što je zadužena

helikaza UvrD. Treba napomenuti da pritom MutL ulazi u direktnu interakciju sa UvrD helikazom, orijentira ju u pravom smjeru u zasječeno mjesto te aktivira njezinu helikaznu aktivnost.

Iako sustav MMR nije jednak kod svih prokariota, pogotovo način diskriminacije lanaca, ono što općenito vrijedi je da nedostatak istog dovodi do visokog porasta stope mutacije, čak do 200 puta, te su nam iz tog razloga posebno zanimljivi sojevi kod kojih MMR nije u funkciji za proučavanje frekvencije korisnih mutacija.

2.5. Povijest bakterijske kulture kao odrednica bakterijske prilagodbe

Uz genotip, neposredna povijest bakterijske kulture je bitna odrednica utjecaja okolišne promjene na bakterijsku prilagodbu. Povijest bakterijske kulture se rijetko spominje kao bitan faktor bakterijske adaptacije, posebice zbog toga jer se njezini utjecaji u laboratorijskim uvjetima i istraživanjima pokušavaju ukinuti. Samim time dobiveni rezultati ne prikazuju najbolje mogući tijek adaptacije bakterijskih stanica kod jednostavne okolišne promjene u prirodi (Ryall i sur., 2012). U svakom slučaju, postoji mnogo dokaza kako 2 bakterijske kulture koje rastu u istim uvjetima u istom mediju, ali različitim brzinama rasta ili u različitim fazama rasta odgovaraju na istu okolišnu tranziciju jako različito. Važnost povijesti bakterijske kulture je prepoznata u mikrobiologiji namirnice gdje procesne metode za predviđanje moraju u obzir uzeti varijacije u osobinama bakterijskih stanica zbog prijašnjih uvjeta kultivacije. U sljedećim odlomcima rada će biti razjašnjene pojedine komponente koje obuhvaća povijest bakterijske kulture.

2.5.1. Brzina rasta bakterijske kulture prije promjene

Mnogi sastojci bakterijskih stanica i sama veličina stanica su strogo zavisni od uvjeta uzgoja (Maaloe i Kjeldgaard, 1966). U *E. coli* sam makromolekularni sastav stanice više ovisi

o brzini rasta nego o sastavu hranjivog medija. Brzina rasta također ima veliki utjecaj na regulaciju i ekspresiju gena (Ferenci, 1999).

Podcijenjena posljedica bakterija čiji konstituenti variraju sa brzinom rasta je ta da njihovi odgovori prilagodbe imaju različita polazišta tijekom promjene. Sporo rastuće bakterije, kada je dioba svaka 3-4 sata, imaju povišene koncentracije alarmona ppGGpp i protein RpoS, čime se stimulira opći odgovor na stres i ostali proteini ovisni o ppGGpp. Koncentracija stres-protektora u stanici, poput trehaloze čija sinteza ovisi o proteinu RpoS, je također povišena tijekom sporog rasta, tako da se ublažava tranzicija u novi okoliš pomoću djelomično ili visoko eksprimiranih mehanizama odgovora na stres.

Kad bakterijske stanice ostanu bez neke od hranjivih komponenata ili su izložene djelovanju toksičnih agenasa se aktivira mehanizam odgovora na stres pomoću ppGGpp. Alarmon ppGGpp inducira sintezu proteina RpoS i mnogih gena ovisnih o proteinu RpoS geni također trebaju ppGGpp za njihovu indukciju (Kvint i sur., 2000). Bitna promjena koja se događa pod kombiniranim utjecajem RpoS i ppGGpp je smanjene propusnosti vanjske membrane, zbog čega stanice postaju rezistentnije prema antibioticima, tj. djelovanje antibiotika je usko povezano uz rast stanica, kada su stanice osjetljivije. Sintaza visokih koncentracija proteina RpoS i alarmona ppGGpp ima određenu cijenu jer bakterija mora žrtvovati vrijedne resurse koje je mogla iskoristiti za vegetativni rast. Prirodni izolati *E. coli* variraju u brzini rasta, a djelomičan razlog tome je i varijacija RpoS i ppGGpp sastava u različitim sojevima *E. coli* koji rastu u identičnim uvjetima. Individualne populacije su često mješavine subpopulacija mutanata *rpoS*⁻ i divljeg tipa stanica *rpoS*⁺. Koegzistencija tih dvaju subpopulacija je mehanizam balansiranja između rezistencije na stres, koju stimulira RpoS, i prehrambene sposobnosti, koju inhibira RpoS, a naziva se samoočuvanje i prehrambena sposobnost (*engl.* self-preservation and nutritional competence, SPaNC).

Naposljetku treba spomenuti da postoji sve više dokaza kako neka mutacija koja je korisna kod jedne brzine rasta može biti fatalna kod neke druge brzine rasta, a to je posljedica drugačijeg metaboličkog i regulatornog odnosa između sporo- i brzo- rastućih bakterija.

2.5.2. Faza rasta bakterijske kulture prije promjene

Česta strategija koju bakterije koriste kao odgovor na nepovoljne uvjete okoline je unaprijeđenje sposobnosti preživljavanja po cijenu vegetativog rasta. Prednost prijelaska u stacionarnu fazu rasta ili rezistentne forme, npr. spore, leži u stvaranju sveopćeg sigurnijeg stanja (Veening i sur., 2008).

Budući da je oko 10% gena *E. coli* drugačije regulirano u stacionarnoj fazi rasta i da su mnogi od tih eksprimiranih gena zaduženi za zaštitu stanice jasno je vidljivo zašto je odgovor stanice na različite stresove, visoka osmolarnost, niski pH, i dr., veoma različit u stacionarnoj i eksponencijalnoj fazi rasta. Moguće je čak razlikovati bakterije u ranoj i kasnoj stacionarnoj fazi rasta. Naime što se populacija duže nalazi u stacionarnoj fazi to više postaje heterogenija i kompleksnija, a razlog tome je nepotpuno prerastanje od mutanata s prednošću rasta u stacionarnoj fazi (*engl.* growth advantage in stationary phase, GASP), tj. stanica koje imaju neku povoljnu mutaciju koja im daje prednost u odnosu na ostale stanice s obzirom na trenutni okoliš u kojem se nalaze. Također, tijekom kasne stacionarne faze pojavljuje se i sve više oštećenih stanica koje će opet drugačije reagirati na neku dodatnu okolišnu promjenu. Čak se i genotipska stabilnost u stacionarnoj fazi razlikuje od one u eksponencijalnoj fazi rasta. Naime, u stacionarnoj fazi se dovija alternativna regulacija mehanizama popravka DNA, a najizraženija promjena je smanjena razina proteina MutS i MutH, te inhibirani sustav MMR.

Faza rasta u kojoj se nalaze bakterijske stanice je bitan faktor za bakterijsku prilagodbu, budući da pokazuje način na koji će stanice reagirati na okolišnu promjenu te koliko će im vremena biti potrebno da se prilagode na novi okoliš.

2.5.3. Prethodno izlaganje bakterijske kulture stresu

Još jedan aspekt povijesti bakterijske kulture koji utječe na bakterijsku adaptaciju je prethodno izlaganje stresu. U *E. coli*, opći mehanizam odgovora na stres koji je reguliran sigma faktorom RpoS i alarmonom ppGGpp može biti stimuliran ne samo brzinom rasta, nego i subletalnom razinom kiselina, niski pH, visokom osmolarnošću ili suboptimalnim temperaturama (Hengge-Aronis, 2002). Pošto opći mehanizam odgovora na stres inducira samo jedan od navedenih faktora, bitno je primijetiti da njegovom aktivacijom bakterijska

stanica postane otpornija i na ostale stresove, tj. dolazi do unakrsne zaštite. Ovakav tip zaštite najbolje je proučen u mikrobiologiji namirnica kod istraživanja bakterijske inaktivacije (Leenanon i Drake, 2001).

Idući vid djelovanja stresa u povijesti bakterijske kulture je taj što se često osim općeg odgovora na stres aktiviraju i specifični odgovori na određenu vrstu stresa. Tako je npr. kod odgovora *E. coli* na subletalnu razinu kiselina u koji nisu uključeni samo RpoS -ovisno djelovanje, nego i specifični odgovori na aciditet koji se reguliraju neovisno o proteinu RpoS. Takva dvostruka regulacija prisutna je i kod izlaganja drugim stresovima, npr. oksidativnom stresu ili visokoj temperaturi (Foster i Spector, 1995).

Udio kisika u okolini i promjena iz aerobnih u anaerobne uvjete i obratno, može značajno utjecati na prilagodbu bakterijskih stanica. Prisutnost kisika potencira detoksifikacijske mehanizme i povisuje razinu hidroksiperoksidaza i katalaza (Partridge i sur., 2006), a mutacijski procesi su različito uvjetovani iz aspekta aerobnog/anaerobnog metabolizma (Singh i sur., 2010). Bitno je za primijetiti da kulture koje su bile izložene jakom stresu sadrže veći udio mutanata, te će nakon tranzicije u novi okoliš taj povišeni broj mutanata također utjecati na prilagodbu, bilo pozitivno ili negativno.

2.5.4. Veličina i gustoća bakterijske kulture

Neke odrednice u prilagodbi bakterija ovise o veličini populacije, pa je veoma bitno da li okolišnu tranziciju prolazi mala ili velika populacija. Ponajprije, veličina populacije određuje zalihu spontanih mutacija i njihov domet. Dobar primjer toga koliko je bitna veličina populacije je za njezino preživljavanje je patogena kultura koja se nalazi u agresivnom domaćinu gdje je velika varijacija u infektivnoj dozi patogena veoma bitna za suprotstavljanje obrambenim mehanizmima domaćina.

Gustoća bakterijske populacije je bitan faktor kod lokalne koncentracije i produkcije signala kvoruma (Straight i Kolter, 2009). Veliki broj bakterijskih karakteristika, uključujući i virulenciju, je pod efektom istraživanja kvoruma (fenomen o kojem će biti riječi u idućem odlomku rada) i signalnih molekula, pa je vrlo lako moguće da će se kultura koja je bila podvrgnuta signalima kvoruma drugačije ponašati kod tranzicije u novu okolinu nego razrijeđena kultura bez signala.

Rijetke korisne mutacije ili duplikacije određenih gena imaju malu vjerojatnost pojavljivanja u malim populacijama, što smanjuje mogućnosti uspješne adaptacije. Još jedna mogućnost koju treba razmotriti je gubitak vijabilnosti stanica neke populacije tijekom tranzicije. Ukoliko se to dogodi dobivamo „učinak boce s uskim grlom“ i preživjet će samo mali dio početne populacije koji se još uvijek mora adaptirati na nove uvjete, ali su mu se sa smanjenjem veličine populacije smanjile i šanse za uspješnu prilagodbu.

2.5.5. Pojava očitavanja bakterijskih kvoruma

Pojava očitavanja kvoruma (*engl.* quorum sensing, QS) je proces kooperativnog ponašanja bakterija kojim se regulira ekspresija gena, a funkcionira na principu mjerenja gustoće stanica. Klasična interpretacija objašnjava taj fenomen na način da stanice proizvode signalne molekule čija koncentracija ukazuje na gustoću stanica (Cornforth i sur., 2013). S obzirom na gustoću, tj. broj stanica akumulirat će se određeni udio signalnih molekula koje one ispuštaju i kada koncentracija neke signalne molekule dosegne određeni prag, stanice ju detektiraju te izazivaju specifični odgovor. Pri bakterijskom očitavanju kvoruma maksimalna produkcija signalnih molekula postiže se u stacionarnoj fazi.

Mehanizmi produkcije signalnih molekula, povećanja razine signala i detekcije signala dobro su istraženi, ali se relativno malo zna o tome kako QS doprinosi adaptaciji i preživljavanju bakterija. Geni kontrolirani sustavom QS uglavnom kodiraju za produkciju ekstracelularnih spojeva koje bakterije koriste za preživljavanje te se dijele između svih pripadnika populacije neovisno o stanicama producentima. Proizvedeni ekstracelularni spojevi važni su za pribavljanje nutrijenata, kompeticiju između različitih vrsta i virulenciju (Goo i sur., 2012). U bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, kontrola proteaza sustavom QS doprinosi boljem fitnessu jer se proteaze proizvode samo u uvjetima kada se mogu i uspješno iskoristiti (Goo i sur., 2012). Nadalje, QS u *Legionella pneumophila* doprinosi regulaciji virulencije, a u *Streptomyces antibioticus* doprinosi procesu antibiotičke produkcije (Navarro Llorens i sur., 2010). Predložena je hipoteza da QS omogućuje bakterijama predviđanje kapaciteta nosivosti populacije (*engl.* population carrying capacity) u danom okolišu. Iščekivanje stacionarne faze potencijalno može omogućiti individualnim bakterijama modifikaciju njihove fiziologije koja bi im omogućila preživljavanje na temelju sposobnosti određene populacije (Goo i sur., 2013).

2.5.6. Pojava heterogenosti unutar bakterijske populacije

Posljednjih godina raste interes za proučavanje heterogenosti kao jedne od značajki bakterijskog rasta i ponašanja. Pojava heterogenosti u čistim bakterijskim kulturama nije ništa novo, te su varijacije u brzini rasta i osjetljivosti na antibiotike dugo poznate. Kinetika ubijanja stanica izlaganjem različitim stresovima također je upućivala na postojanje heterogenosti u populaciji, a najnoviji dokaz je prikupljen pomoću protočne citometrije kad su otkrivena čak 4 različita fiziološka stanja stanica u nekoj čistoj kulturi u eksponencijalnoj fazi rasta. Heterogenost pridonosi kompleksnosti bakterijske kulture i povećava mogućnost prilagodbe na novu okolinu. Heterogenost možemo podijeliti na fenotipsku i genotipsku, te je svaka od te dvije kategorije jedno veliko i sveobuhvatno područje pa će u sljedeća 2 odlomka ovog rada biti rečeno nešto općenito i najbitnije o oba tipa heterogenosti.

2.5.6.1. Fenotipska heterogenost

Način na koji se određen subpopulacije adaptiraju na okoliš je uglavnom nepoznat, osim u slučaju antibiotske rezistencije kada je fenotip poznat. Još jedan faktor je taj da se heterogenost rijetko promatra kao cjelovita; rezistentne stanice koegzistiraju sa ostalim subpopulacijama koje se razlikuju u ekspresiji gena, veličini, brzini rasta, itd. Zbog toga će naglasak u ovom i sljedećem odlomku biti na utjecaju povijesti bakterijske kulture na heterogenost te posljedično i na prilagodbu bakterija tijekom tranzicije u novi okoliš.

Različite brzine rasta mogu dovesti do pojave heterogenosti, pri čemu je važno za primijetiti da se to događa skoro u svakoj populaciji. Najbolji pokazatelj da kultura sadrži sporo rastuće stanice je bakterijska rezistencija, koja je definirana kao sposobnost bakterija osjetljivih na antibiotik da prežive izlaganje letalnim dozama tog antibiotika (Lewis, 2010). Tijekom istraživanja rezistencije izolirani su visoko -rezistentni mutanti koji imaju mutaciju u lokusu *hip*, a definirana su i 2 tipa visoko -rezistentnih mutanata: tip I u koji spadaju stanice koje ne rastu, a generirane su u stacionarnoj fazi, i tip II, u koji spadaju stanice koje sporo rastu i generirane su tijekom eksponencijalne faze. Bitno je za napomenuti kako različite brzine rasta dovode do različitih koncentracija alarmona ppGGpp u stanicama, što dovodi do pojave različitih fenotipova, tj. fenotipske heterogenosti.

Do pojave heterogenosti može doći i zbog stohastičkih varijacija u regulaciji. Te stohastičke varijacije se nazivaju „šumovi“. Šumovi mogu utjecati na ekspresiju preko transkripcije i translacije. Postoji „intrinzični šum“ koji je određen sekvencom gena i osobinama proteina za koji kodira, te „ekstrinzični šum“ koji opisuje flukutacije određene varijacijama u broju polimeraza i ribosoma u stanici. Neki regulacijski mehanizmi mogu iskoristavati te šumove te pri tome dolazi do pojave alternativne regulacije i fenotipova, te naposljetku do pojave heterogenosti.

Genotipski determinirani mehanizmi za generiranje više različitih subpopulacija su također jedan način stvaranja heterogenosti. Takav jedan mehanizam je posebno dobro izražen u *Bacillus subtilis*, naime ta bakterija može diferencirati u nekoliko različitih tipova stanica ovisno o povijesti kulture (Lopez i Kolter, 2010). Jedan oblik divergencije je u mobilnosti. Populacije *B. subtilis* se sastoje od pokretljivih i sesilnih stanica, te će se u okvirima pojedinačne okolišne tranzicije adaptacija odvijati prema tome da li je pokretljivost potrebna ili nije kako bi stanice došle do izvora hranjivih tvari. Kod izgladnjivanja *B. subtilis* oko polovica svih stanica prelazi u spore, dok druga polovica ne sporulira. Od ovih stanica koje ne sporuliraju čak 10% može razviti sposobnost prihvatanja tuđe DNA. Neke stanice će tijekom sporuliranja izlučivati bakteriocine koji će lizirati nesporeluirajuće stanice kako bi im one poslužile kao izvor hranjivih tvari, primjer kanibalizma. To je posebice izraženo u stanicama koje formiraju biofilm (Gonzalez-Pastor i sur., 2003). Ako sve sumiramo možemo vidjeti da u jednoj populaciji *B. subtilis* može postojati čak do 6 subpopulacija, tj. 6 vrsta stanica sa različitim fenotipovima koje će se različito prilagoditi na istu okolišnu promjenu.

Još jedan mogući izvor heterogenosti su šaperoni, ili proteini temperaturnog šoka koji mogu umanjiti negativne efekte mutacije koje uzrokuje defekte proteina. Koncentracije šaperona DnaK i GroEL su povišene u sojevima koji su akumulirali puno štetnih mutacija (Tokuriki i Tawfik, 2009). Zadnji i jedan od čestih načina pojave fenotipske heterogenosti uz jednake genotipe su transkripcijske i translacijske greške. Pogrešna inkorporacija aminokiseline se događa dovoljno često, da oko 15% proteina prosječne duljine sadrži barem jednu pogrešnu aminokiselinu. Također treba naglasiti da na točnost sinteze proteina utječu i ekstracelularni faktori poput manjka aminokiselina, što znači da su translacijske greške u dinamičnoj ravnoteži čija promjena utječe na fitnes bakterija.

2.5.6.2. Genotipska heterogenost

Iako regulatorne mreže i njihova preciznost omogućavaju različita rješenja kod prilagodbe, broj mogućih situacija i okolišnih uvjeta u prirodi je velik i ne postoji dovoljno regulatornih mehanizama koji bi nudili odgovor na svaku okolišnu tranziciju. Kod nedostatka fenotipskih rješenja će se stanica nalaziti pod pritiskom prirodne selekcije da se prilagodi na novi okoliš pomoću genetičkih promjena.

Jedna od najčešćih promjena genoma je amplifikacija/duplikacija gena (*engl.* gene duplication/amplification, GDA). Sustav GDA može zahvatiti bilo koji gen i inherentno je nestabilna/reverzibilna. Upravo zbog te lake reverzibilnosti GDA znači da duplikacija može biti izgubljena u neselektivnom okruženju. GDA se događa u rastućoj populaciji bakterija frekvencijom od $>10^{-2}$ do 10^{-4} po genomu (Andersson i Hughes, 2009). Najčešći istražen mehanizam za pojavu jednostavnih duplikacija se događa kod RecA-ovisne homologne rekombinacije između regija vezanih na direktno ponovljene sekvence, poput rRNA operona, transpozona, itd. Sustav GDA povećava ekspresiju određenih gena njihovim duplikacijama, ali isto tako osigurava mogućnost da jedna kopija gena ostane funkcionalna ukoliko se na drugoj dogodi neka štetna mutacija.

Slučajni lokusi su hipermutabilne regije genomske DNA koje dozvoljavaju organizmu da ograniči visoku stopu promjene samo na određenim genima čija ekspresija pomaže kod adaptacije i preživljavanja, a da pritom reducira štetu povećane stope mutacija u genomu. Mehanizam koji može povećati varijaciju ekspresije kriznih gena je mjesno-specifična rekombinacija. Taj mehanizam uključuje inverziju kratkog segmenta DNA koji sadrži krizni gen ili njegov promotor, a sa svake strane tog segmenta se nalaze sekvence koje prepoznaju specifične rekombinaze. Gen se zatim eksprimira ili ne ovisno o orijentaciji inverzne sekvencije (van der Woude i Baumler, 2004). Ovakvim mehanizmom je kontrolirana npr. flagelarna faza u bakterije *Salmonella enterica*.

Promjene uzrokovane delecijama i transpozicijama su također uzrok genotipske heterogenosti. U bakterijskim genomima insercijske sekvence (IS elementi) i transpozoni su široko rasprostranjeni. Transpozoni su često odgovorni za adaptivne mutacije, a IS elementi pridonose adaptaciji povećanjem zalihe mutacija. Uzroci transpozicija nisu još do kraja istraženi, a sama stopa njihovog umetanja u genom varira od elementa do elementa. Ipak, pretpostavlja se da su transpozicije do određene mjere uzrokovane raznim okolišnim

stresovima. Tako je mogućnost transpozicija u velikim nakupinama gena za rezistenciju na kromosomima i plazmidima u multirezistentnim izolatima velika, ali pod anitiobiotskom selekcijom (Toleman i Walsh, 2011).

Mogućnost dostupa do strane DNA dovodi do ogromnog potencijala za genetičku varijabilnost, a analizom bakterijskih genoma je potvrđena važnost horizontalnog transfera gena (*engl.* horizontal gene transfer, HGT) u bakterijskoj evoluciji i adaptaciji (Lerat i sur., 2005). Ipak, u populaciji sa sličnim genomima (npr. klonska kultura *E. coli*) mogućnost za neku veliku promjenu pomoću HGT-a je značajna samo ako nova okolina sadrži druge bakterije kao izvor strane DNA, što i stvarno je slučaj u većini okoliša. Pošto je dokazano da se HGT pojavljuje kod nekih bakterijskih vrsta češće nego kod drugih možemo sa sigurnošću reći da je sposobnost za HGT ovisna o genotipu. Konjugacija je također mehanizam koji dozvoljava pojavu heterogenosti u populaciji. Naime, istraživanjima je utvrđeno da je u prisutnosti plazmida F porasla fiksacija korisnih mutacija pomoću transfera gena posredovanog plazmidima. Konjugacija dozvoljava korisnim mutacijama iz različitih roditeljskih linija da se rekombiniraju, te time povećava mogućnosti bakterijske adaptacije (Cooper, 2007).

3. ZAKLJUČCI

Bakterije su sveprisutni organizmi koji se nalaze u svakoj biološkoj niši na Zemlji. Razlog takvog evolucijskog fitnesa je njihova sposobnost da se vrlo brzo prilagođavaju na različite uvjete na koje nailaze. Neke bakterijske vrste odgovaraju na okolišni stres procesima poput mirovanja, neke tvore spore dok većina gram-negativnih bakterija ulazi u stacionarnu fazu. Ulazak u stacionarnu fazu je najčešće uvjetovan nepovoljnim uvjetima, a sama prilagodba bakterija na nepovoljne uvjete započinje već kod prijelaska iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta.

U stacionarnoj fazi mijenja se regulacija gena na način koji aktivira mehanizme prilagodbe u bakterijskoj stanici. Tada dolazi do morfoloških, fizioloških i metaboličkih promjena u ovisnosti o uvjetima okoline ili stresu pod kojim se stanica nalazi. Stacionarna faza je regulirana raznim kompleksnim mehanizmima, no njezin glavni regulator je protein RpoS, produkt gena *rpoS*, koji je ujedno i glavni regulator općeg odgovora na stres. Nakon što neka populacija bakterijskih stanica uđe u stacionarnu fazu način na koji će se pokušati adaptirati na određeni stres je određen njezinim genotipom, posljedično i fenotipom, i poviješću te bakterijske kulture. Važna činjenica bakterijske adaptacije je pojava heterogenosti unutar populacije, koja unosi veliku varijabilnost u tu populaciju, a do koje može doći nizom mehanizama poput horizontalnog prijenosa gena, različite brzine raste između pojedinih stanica u populaciji, itd.

Sposobnost bakterija da se prilagode na nove stresove ili uvjete okoline je skoro beskonačna te je odličan pokazatelj snage evolucije, a može poslužiti za bolje razumijevanje prilagodbe patogenih bakterija i za njihovo uklanjanje. Nadalje adaptivna evolucija služi za dobivanje industrijskih bakterija sa poželjnim osobinama za nove biotehnološke procese i proizvode.

LITERATURA

- Andersson, D.I., Hughes, D. (2009) Gene amplification and adaptive evolution in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 167–195.
- Baćun-Družina, V., Butorac, A., Mrvčić, J., Landeka Dragičević, T., Stehlik-Tomas, V. (2011) Bacterial Stationary Phase Evolution. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 13-23.
- Bjedov, I. i sur. (2003) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* **300**, 1404–1409.
- Calvo, J.M., Matthews, R.G. (1995) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**, 466-490.
- Cashel, M., Gentry, D., Hernandez, V. J., Vinella, D. (1996) The Stringent Response. U: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, (Neidhart, F. C., Curtiss, R., Inhamgram, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., ured.), *American Society for Microbiology Press*, Washington, DC., str. 1458-1496.
- Chandrangsu, P., Helmann, J. D. (2014) Sigma Factors in Gene Expression. *Encyclopedia of Life Sciences* **22**, 853-871, DOI: 10.1002/9780470015902.a0000854.pub3.
- Cho, B. K., Kim, D., Knight, E. M., Zengler, K., Palsson, B.O. (2014) Genome scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: topology and functional states. *BMC Biology* **12**, 1-11.
- Cooper, T.F. (2007) Recombination speeds adaptation by reducing competition between beneficial mutations in populations of *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* **5**, 1899–1905.
- Cornforth, D. M., Popat, R., McNally, L., Gurney, J., Scott-Phillips, T. C., Ivens, A., Diggle, S. P., Brown, S. P. (2013) Combinatorial quorum sensing allows bacteria to resolve their social and physical environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 4280-4284.
- Ferenci, T., Galbiati, H., Betteridge, T., Phan, K., Spira, B. (2011) The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **11**, 62 doi:10.1186/1471-2180-11-62.
- Ferenci, T. (1999) Regulation by nutrient limitation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 208–213.
- Finkel, S. E., Kolter, R. (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4023-4027.
- Foster, J.W., Spector, M.P. (1995) How *Salmonella* survive against the odds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 145–174.

- Foster, P.L. (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **42**, 373-397.
- Giraud, A., Radman, M., Matic, I., Taddei, F. (2001) The rise and fall of mutator bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 582–585.
- Gonzalez-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., Losick, R. (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**, 510–513.
- Goo, E., Majerczyk, C. D., An, J. H., Chandler, J. R., Seo, Y. S., Ham, H., Lim, J. Y., Kim, H., Lee, B., Greenber, E.P., Hwang, I. (2012) Bacterial quorum sensing, cooperativity, and anticipation of stationary-phase stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19775-19780.
- Harfe, B.D., Jinks-Robertson, S. (2000) DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual Review of Genetics* **34**, 359-399.
- Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol R* **66**, 373–395.
- Hirsch, M., Elliott, T. (2005) Stationary phase regulation of *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 7204-7213.
- Holmqvist, E., Unoson, C., Reimegard, J., Wagner, E. G. (2012) A mixed double negative feedback loop between the sRNA *micF* and the global regulator Lrp. *Mol Microbiol* **84**, 414–427.
- Hottes, A. K., Freddolino, P. L., Khare, A., Donnell, Z. N., Liu, J. C. (2013) Bacterial Adaptation through Loss of Function, *PLoS Genet* **9**: e1003617.
- Huisman G. W., Siegele, M., Zambrano, M., Kolter, R. (1996) Morphological and Physiological Changes During Stationary Phase. U: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, (Neidhart, F. C., Curtiss, R., Ingham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., ured.), *American Society for Microbiology Press*, Washington, DC., str. 1210-1223.
- Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol.* **54**, 499-518.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., Modrich, P. L. (2005) DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.* **106**, 302–323.
- Johansen, J., Rasmussen, A. A., Overgaard, M., Valentin-Hansen, P. (2006) Conserved small non coding RNAs that belong to the σ^E regulon in down regulation of outer membrane proteins. *J Mol Bio* **364**, 1-8.
- Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2005) Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**, 527–543.

- Klauck, E., Hengge, R. (2012) σ^S -Controlling Networks in *Escherichia coli*. U: Bacterial Regulatory Networks (Filloux, A., ured.), *Caister Academic Press, Norfolk*, str. 1-16.
- Kolter, R., Siegele, D. A., Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 855–874.
- Kvint, K., Farewell, A., Nystrom, T. (2000) RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). *J. Biol. Chem.* **275**:14795–14798.
- Lange, R., Fischer, D., Hengge-Aronis, R. (1995) Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 4676–4680.
- Lange, R., Hengge-Aronis, R. (1994) The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Gene Dev.* **8**, 1600–1612.
- Leenanon, B., Drake, M. A. (2001) Acid stress, starvation, and cold stress affect poststress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* **64**, 970–974.
- Lelong, C., Aguiluz, K., Luche, S., Kuhn, L., Garin, J., Rabilloud, T., Geiselmann, J. (2007) The Crl-RpoS regulon of *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* **6**, 648–659.
- Lerat, E., Daubin, V., Ochman, H., Moran, N.A. (2005) Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *PLoS Biol.* **3**, 807–814.
- Lewis, K. (2010) Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 357–372.
- Lin, J., Chen, H., Dröge, P., Yan, J. (2012) Physical Organization of DNA by Multiple Non-Specific DNA-Binding Modes of Integration Host Factor (IHF). *PLoS ONE* **7**, 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0049885.
- Lopez, D., Kolter, R. (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 134–149.
- Lynch, M. (2006) Streamlining and simplification of microbial genome architecture. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 327–349.
- Maaloe, O., Kjeldgaard, N.O. (1966) Control of macromolecular synthesis. *WA Benjamin, New York*.
- Babu, M. M. (2003) Did the loss of sigma factors initiate pseudogene accumulation in *M. leprae*? *TRENDS in Microbiology* **11**, 59-61.

- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K., Gottesman, S. (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* **39**, 1382–1394.
- Mandin, P., Gottesman, S. (2010) Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J.* **29**, 3094-3104.
- Martinez-Antonio, A., Janga, S.C., Thieffry, D. (2008) Functional organisation of *Escherichia coli* transcriptional regulatory network. *J. Mol. Biol.* **381**, 238–247.
- McCullen, C. A., Benhammou, J. N., Majdalani, N., Gottesman, S. (2010) Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. *J. Bacteriol.* **192**, 5559-5571.
- Mika, F., Hengge, R. (2005) A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA and RssB coordinates synthesis and proteolysis of σ^S in *E. coli*. *Genes Dev.* **19**, 2770-2781.
- Muffler, A., Fischer, D. i Hengge-Aronis R. (1996) The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **10**, 1143-1151.
- Nagamitsu, H., Murata, M., Kosaka, T., Kawaguchi, J., Mori, H., Yamada, M. (2013) Crucial Roles of MicA and RybB as Vital Factors for σ^E -Dependent Cell Lysis in *Escherichia coli* Long-Term Stationary Phase. *J Mol Microbiol Biotechnol* **23**, 227-232.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., Martinez-Garcia, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 476-495.
- Ninio, J. (1991) Transient mutators: a semiquantitative analysis of the influence of translation and transcription errors on mutation rates. *Genetics* **129**, 957–962.
- Nystrom, T. (2004) Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 161–181.
- Partridge, J.D., Scott, C., Tang, Y., Poole, R.K., Green, J. (2006) *Escherichia coli* transcriptome dynamics during the transition from anaerobic to aerobic conditions. *J. Biol. Chem.* **281**, 27806–27815.
- Peterson, C. N., Carabetta, V. J., Chowdhury, T., Silyhavy, T. J. (2006) LrhA regulates *rpoS* translation in response to the Rcs phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **188**, 3175-3181.
- Rappé, M.S., Giovannoni, S.J.(2003) The Uncultured Microbial Majority, *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 369-394.
- Rolfe, M.D., Rice, C.J. i sur. (2012) Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *J. Bacteriol.* **194**, 686–701.

- Ross, W., Vrentas, K. E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., Gourse, P. L. (2014) The magic spot: A ppGGpp Binding Site on *E. coli* RNA Polymerase Responsible for Regulation of Transcription Initiation. *Mol Cell* **50**, 420-429. doi: 10.1016/j.molcel.2013.03.021.
- Ryall, B., Ferenci, T., Eydallin, G. (2012) Culture History and Population Heterogeneity as Determinants of Bacterial Adaptation: the Adaptomics of a Single Environmental Transition, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; **76**, 597–625.
- Singh, A., Karimpour-Fard, A., Gill, R.T. (2010) Increased mutation frequency in redox-impaired *Escherichia coli* due to RelA- and RpoS-mediated repression of DNA repair. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5463–5470.
- Shimizu, K. (2014) Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites* **4**, 1-35.
- Spira, B., Hu, X., Ferenci T. (2008) Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **154**, 2887–2895.
- Straight, P. D., Kolter, R. (2009) Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 99–118.
- Tani, T. H., Khodursky, A., Blumenthal, R. M., Brown, P. O., Matthews, R. G. (2002) Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13471–13476.
- Tokuriki, N., Tawfik, D. S. (2009) Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution. *Nature* **459**, 668–671.
- Toleman, M. A., Walsh, T. R. (2011) Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 912–935.
- Udekwi, K. I., Wagner, E. G. (2007) Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Res*; **35**, 1279–1288.
- van der Woude, M. W., Baumber, A.J. (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 581-611.
- Veening, J.-W., Stewart, E. J., Berngruber, T. W., Taddei, F., Kuipers, O. P., Hamoen, L. W. (2008) Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4393–4398.
- Wang, L., Spira, B., Zhou, Z., Feng, L., Mahrjan, R. P., Li, X., Li, F., McKenzie, C., reeves, P. R., Ferenci, T. (2010) Divergence involving global regulatory gene mutations in an *Escherichia coli* population evolving under phosphate limitation. *Genome Biol. Evol.* **2**, 478–487.

- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., Nierhaus, K. H. (2002) Dissection of the mechanism for the stringent response RelA. *Mol Cell* **10**, 779-788.
- Whitman, W. B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., (1998) Prokaryotes: The unseen majority, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6578–6583.
- Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., Storz, G. (1998) The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hqf (HF-I) protein. *EMBO J.* **17**, 6061-6068.
- Zhou, Y., Gottesman, S. (2006) Models of regulation of RpoS by HN-S. *J. Bacteriol.* **188**, 7022-7025.
- Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J. R., Maurizi, M. R., Wickner, S. (2001) The RssB response regulator directly targets σ^S for degradation by ClpXP. *Genes Dev.* **15**, 627-637.