

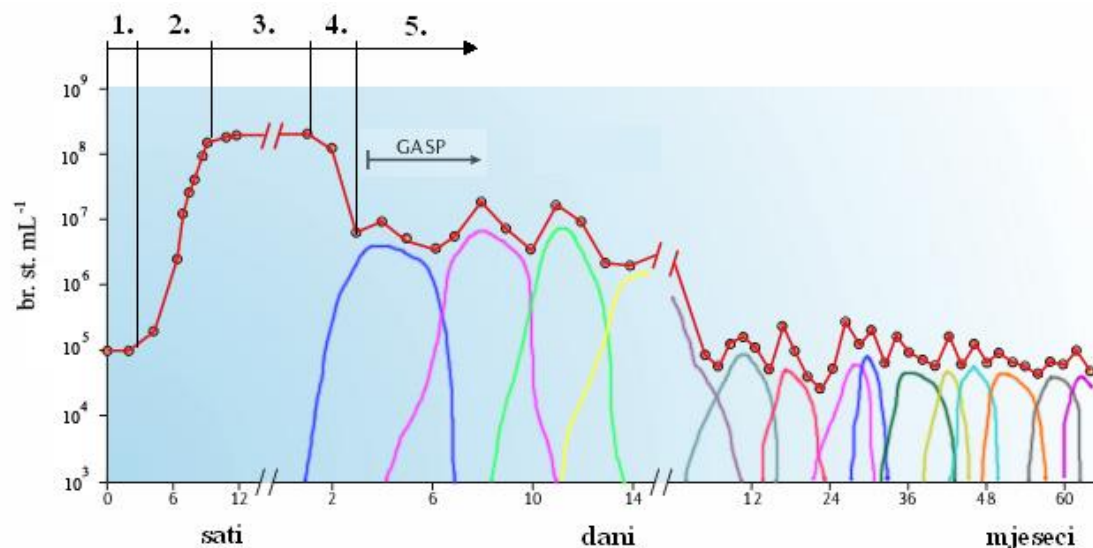
Prednost rasta nesporogenih bakterija tijekom produljene stacionarne faze

Prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina, PBF, Perottijeva 6, Zagreb

Brojni mikroorganizmi koji nas okružuju su razvili različite strategije za naseljavanje gotovo svakog postojećeg mjesta na Zemlji. U laboratoriju, nakon što se bakterije unesu u tekuću hranjivu podlogu, populacija bakterija prolazi kroz nekoliko specifičnih faza. Nakon prilagodbe na medij za vrijeme lag faze, stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta, za vrijeme koje se dijele brzinom maksimalnom za određenu vrstu i uvjete u kojima se nalaze (slika 1. faze 1 i 2). Kada su hranjivi sastojci podloge potrošeni, nedostatak izvora hrane i nakupljanje nusproizvoda metabolizma, dovode do ulaska bakterijske kulture u stacionarnu fazu rasta i odumiranja većine roditeljskih stanica (slika 1. faze 3 i 4).

U prirodnom okruženju bakterije najčešće žive zajedno s velikim brojem drugih mikroorganizama. Vrlo često su izložene različitim oblicima stresa kao što su nedostatak hranjiva, nepovoljna temperatura, UV-zračenje, pH okoliša, osmotski pritisak, te prisutnost različitih toksičnih tvari. Zapravo prirodni uvjeti u kojima žive bakterije su vrlo slični uvjetima stacionarne faze rasta tijekom uzgoja u laboratoriju. Nesporulirajuće bakterije prilikom ulaska u stacionarnu fazu rasta, kao odgovor na novonastale uvjete gladovanja, prolaze kroz niz morfoloških i fizioloških promjena (Hengge-Aronis, 1996). U ovoj fazi moguća su dva ishoda za bakterijsku kulturu. Ukoliko se populacija stanica ne prilagodi na uvjete, kultura stanica ulazi u fazu odumiranja, međutim ukoliko populacija stanica uvede promjene u svoj metabolizam koji će joj omogućiti rast u novonastalim uvjetima takva će populacija nastaviti živjeti u produljenoj stacionarnoj fazi rasta koja može trajati i do pet godina (Finkel i Kolter, 1999).

Sposobnost bakterija da koloniziraju gotovo sve životne okoliše uvjetovana je velikim dijelom njihovom metaboličkom fleksibilnošću, ali i mogućnošću da se brzo prilagode različitim stresovima. Specifični stres inducira određeni odgovor, na primjer SOS odgovor je induciran oštećenjem DNA (Walker i sur., 2000), dok je podjedinica RNA polimeraze protein RpoS glavni regulator općeg odgovora bakterije *E. coli* na stres induciran različitim stresnim uvjetima kao što su gladovanje, virulentnost, anaerobioza, osmotski šok, sniženje pH vrijednosti, temperaturne promjene, oksidativna oštećenja i prijelaz u stacionarnu fazu rasta (Hengge-Aronis, 2000). Glavni prioritet svih bakterijskih sustava je smanjenje negativnog utjecaja stresa na njeno preživljavanje.



Slika 1. Životni ciklus nesporogenih bakterija (prilagođeno prema: Finkel i sur., 2000)

RNA polimeraza

RNA polimeraza je holoenzim koji katalizira transkripciju DNA. Najbolje istraжена polimeraza je u bakteriji *E. coli* i ima molekulsku masu od oko 465 kD. Sastoji se od jezgre ili srži enzima, koju tvore dvije α podjedinice, jedna β i jedna β' podjedinica, i od σ podjedinice. Gen *rpoA* kodira za α podjedinicu, *rpoB* za β podjedinicu, a *rpoC* sadrži informaciju za β' podjedinicu. σ podjedinica odgovorna je za usmjeravanje srži

holoenzima i inicijaciju transkripcije, dok je srž samog enzima sa svojim podjedinicama odgovorna za samu reakciju transkripcije. Jezgra RNA polimeraze uvijek je građena od istih podjedinica, dok se σ podjedinica pojavljuje u sedam različitih oblika. σ^{70} podjedinica sudjeluje u transkripciji većine gena koji su ekspresirani u ekspanzionalnoj fazi rasta i nju kodira gen *rpoD*. Produkt gena *rpoN* je σ^{54} koja je odgovorna za transkripciju gena koji sudjeluju u metabolizmu dušika. Podjedinice σ^{32} , produkt gena *rpoH*, i σ^{24} produkt gena *rpoE*, aktiviraju se kada se stanica nađe pod temperaturnim šokom. Gen *rpoS* kodira za podjedinicu σ^{38} , koja je glavni stanični odgovor na stres, i odgovorna je za transkripciju preko 70 gena induciranih stresom. Gen *rpoF* donosi σ^{28} podjedinicu, koja sudjeluje u transkripciju gena odgovornih za kemotaksiju. Zadnji protein koji može uči u tvorbu RNA holoenzima je protein FecI, koji sudjeluje u transportnom sistemu citrata, i svrstava se u podgrupu σ podjedinica (Jishage i sur., 1996)

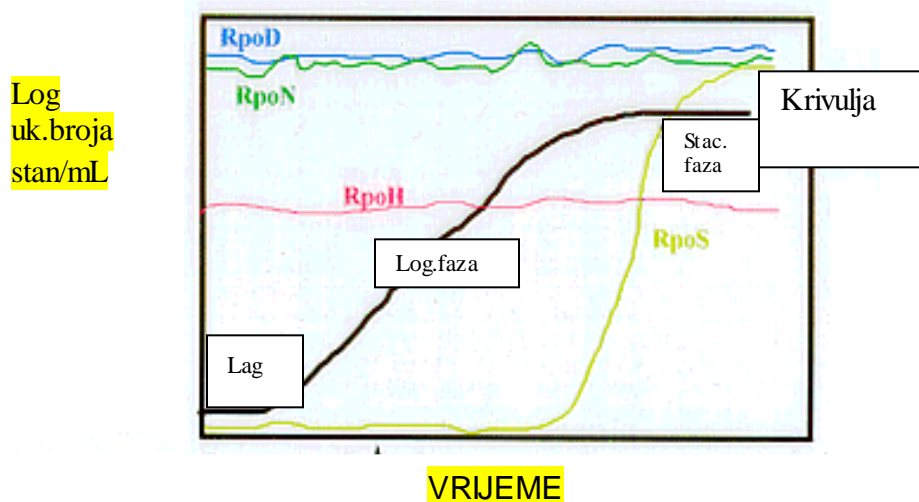
σ PODJEDINICE

Evolucijski program preživljavanja bakterije *E. coli* omogućava enzimu RNA-polimerazi mogućnost da uđe u kompleks s četiri glavne σ podjedinice, koje su odgovorne za transkripciju različitih gena neophodnih za preživljavanje. Primarna σ podjedinica za bakteriju koja raste u ekspanzionalnoj fazi je σ^{70} , koju kodira gen *rpoD*. Sudjeluje u transkripciji većine gena nužnih za rast. Kada je vezana za jezgru RNA polimeraze ona uvijek prepoznaje -10 i -35 mjesta. Prilikom prelaska iz ekspanzionalne u stacionarnu fazu σ^{70} zadržava svoju koncentraciju, no ona u stacionarnoj fazi se nalazi u kompleksu s proteinom Rsd. Ovaj protein se počinje sintetizirati za vrijeme ove tranzicije i u kompleksu počinje ometati ulazak σ^{70} podjedinice u holoenzim RNA polimeraze (Jishage i Ishihama, 1998).

Transkripcija gena čiji produkti sudjeluju u metabolizmu dušika zahtjeva da RNA polimeraza u svom sastavu ima alternativnu σ^{54} podjedinicu. Ova podjedinica je produkt gena *rpoN* i prepoznaje -26 i -12 mjesta na DNA. Kada se nalazi u kompleksu s RNA polimerazom treba dodatne aktivatore za otvaranje kompleksa i početak transkripcije. Koncentracija ove podjedinice zadržava se konstantnom tijekom životnog ciklusa bakterije.

Kada se stanica nađe u uvjetima promjene temperature, odnosno doživi temperaturni šok, alternativna podjedinica σ^{32} sudjeluje u transkripciji gena koji štite stanicu od ovakvog šoka. Gen koji nosi informaciju za ovu podjedinicu je *rpoH* i njegovu transkripciju potiče upravo dodir bakterije s ovom vrstom promjena. Koncentracija i ove podjedinice, kao i σ^{54} podjedinice, zadržava se konstantnom tijekom životnog ciklusa bakterije.

Ulaskom u stacionarnu fazu σ^{38} ili σ^S podjedinica postaje glavna podjedinica koja sudjeluje u transkripciji preko 70 gena, koji se aktiviraju kao odgovor na vrlo stresno razdoblje u koje bakterija ulazi. U stacionarnoj fazi smanjuje se koncentracija hranjivih sastojaka i primarna zadaća bakterije je da preživi. Ovu podjedinicu kodira gen *rpoS* koji se aktivira u stacionarnoj fazi, to je ORF veličine od 1086bp i daje protein od 41,5 kD. U ekspanzionalnoj fazi σ^{38} podjedinica nalazi se u premaloj koncentraciji da bi se mogla detektirati, dok upravo u stacionarnoj fazi njena koncentracija raste. Aktivacija podjedinice regulirana je na razini transkripcije, translacije i stabilnosti nastalog proteina (Hirsch i Elliott, 2002). Ovaj gen nađen je u velikom broju gram negativnih bakterija. Rpo S je virulentan faktor za *S. enterica* i njegova ekspresija se inducira kada ova bakterija uđe u stanicu domaćina.



Slika 2. Koncentracije σ podjedinica tijekom bakterijskog životnog ciklusa. Koncentracija podjedinica koje kodiraju geni *rpoD*, *rpoN* i *rpoH* tijekom životnog ciklusa bakterije se znatnije ne mijenjaju. Najveća promjena primjećena je u koncentraciji proteina Rpos, čija koncentracija raste prilikom prelaska iz logaritamske faze rasta u stacionarnu (prilagođeno prema: <http://latin.arizona.edu>)

UVJETI STRESA

Bakterije u svom prirodnom okolišu nalaze se pod konstantnim uvjetima stresa. Stresni uvjeti života se očituju u nedostatku hranjivih tvari, promjeni temperature, pH ili osmolaritetu. Mogućnost da se prilagode promjenama u svojoj okolini je nužno za njihov rast i preživljavanje. Enterobakterije poput *E. coli* mogu opstati u vrlo različitim uvjetima i opremljene su s velikim brojem regulatornih mehanizama koji reagiraju na promjene u okolišu. Vijabilnost bakterija se smanjuje za dva reda veličine već prvi dan nedostatka hranjivih tvari, a tokom dugog perioda gladovanja ona se polako smanjuje. Stanica mora prevladati nekoliko stresnih uvjeta tokom stacionarne faze ako želi preživjeti. Izgladnjele kulture *E. coli* su visoko dinamične i podvrgnute su stalnim genetičkim promjenama. Stanica će zamijeniti rast za rezistenciju na stresne uvjete i to je mehanizam koji će joj pomoći da opstane (Vulić i Kolter, 2001).

Razdoblja gozbe i gladi

Gozba i glad je najčešći oblik života u svijetu mikroba. Bakterije su razvile sistem koji im omogućuje da koriste hranjive sastojke vrlo efikasno, održavajući visoku stopu rasta kao i preživljavanje u odsutnosti rasta. Tranzicija od gozbe ka gladi nije samo odgovor na nedostatak hranjivih tvari, ova tranzicija također uključuje i signale između stanica. U svakom slučaju složeni genetički krugovi su pokrenuti zaustavljajući mnoge gene potrebne za vegetativni rast i inducirajući desetke drugih. U tom periodu stanica usmjerava iskorištenje još uvijek dostupnih resursa u ovaj energetske skup proces tranzicije. U stacionarnoj fazi rasta stanica drastično smanjuje metaboličku aktivnost i povećava rezistenciju na mnoge stresne čimbenike. Ulazak *E. coli* u stacionarnu fazu je u velikoj mjeri regulirana s σ^S podjedinicom koja pozitivno ili negativno utječe na ekspresiju preko 70 gena. Glavni determinirajući faktor za indukciju σ^S je količina hranjivih sastojaka kao i broj prisutnih stanica koji mogu koristiti raspoložive hranjive tvari. Dakle stanice mogu odgovoriti kao populacija na promjenu u njihovom okolišu i ostvariti koordiniranu tranziciju u stacionarnu fazu. Ulazak u stacionarnu fazu može se opisati kao stanje nalik spori u kojem stanica koristeći minimalne količine hrane uspijeva preživjeti dugi period vremena, izdržavajući mnoge napade iz okoliša prije nego što će moći nastaviti rast kada se uvjeti ponovno promjene unutar populacije. (Vulić i Kolter, 2001).

ODGOVOR NA STRES U STACIONARNOJ FAZI RASTA

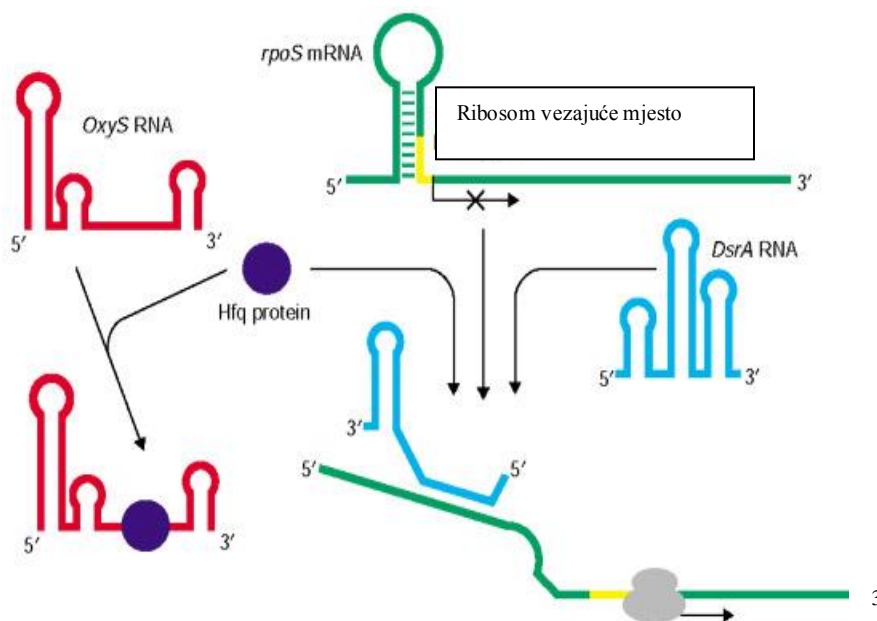
Bakterijska populacija koja se nalazi u stacionarnoj fazi je vrlo dinamična. Dva genetička pristupa su bila korištena za proučavanje prirode selekcije u stacionarnoj fazi. Prvi pristup je da se mutira soj i nađu mutacije koje uzrokuju pad dinamičnosti stanice. Drugi pristup promatra procese koji se pod utjecajem selektivnog pritiska mijenjaju. Analizom ove metode dodijeljene su nove uloge poznatim proteinima i identificirane nove aktivnosti koje do sada nisu bile primjećene (Zinser i Kolter, 2004), kao primjer navodi se mogućnost da bakterije koriste DNA kao izvor ugljika i energije. Jedan od načina kako će bakterija prevladati razdoblje gladi je i aktivacija globalnog regulatora *rpoS*. Unutar dinamične populacije u stacionarnoj fazi javljaju se i recesivni mutanti koji imaju lag fazu dok se ne prilagode na novo nastale uvjete. Ovi mutanti zbog prisutnosti proteina divljeg tipa, koji su nastali prije mutacije zadržavaju fenotip divljeg tipa sve dok se ti proteini ne razgrade ili razrijede uzastopnim dijeljenjem stanice. U uvjetima gladi ukupan broj stanica je konstantan ili je u opadanju, što znači da je dijeljenje stanica ograničeno i to čini proteolizu determinirajući faktor za mutante koje određuje recesivno svojstvo. Mutanti koji nose dominantno svojstvo imaju mogućnost da primjene svoj učinak odmah na produkte koji su zaostali od divljeg tipa i tako smanjuju vrijeme prilagodbe. Unutar populacije mogu se desiti obje vrste mutacije, no dominantni mutanti s kraći vremenom prilagodbe imaju prednost nad recesivnim mutantima. Model evolucije donosi bakterijama mogućnost da se u populacijama pojavljuju slučajne spontane mutacije. Aleli koji pokazuju kompetitivnu prednost u određenom okolišu su selektirani i stanice koje nose ovu povoljnu mutaciju mogu prerasti ostatak populacije (Zinser i Kolter, 2004).

PODJEDINICA σ^s I GEN *rpoS*

Bakterije su tokom svog života često podvrgnuti velikom spektru različitih uvjeta, koji se vrlo brzo mijenjaju. Tokom intenzivnog rasta *E. coli* transkripcija alternativne podjedinice, σ^s nije inducirana. Unutar ovih uvjeta većina holoenzima RNA polimeraze ima u svom sastavu σ^{70} podjedinicu koja sudjeluje u ekspresiji « eng. house keeping » gena. Ovo stanje se mijenja čim se stanica nađe u stresnim uvjetima. RpoS, koji kodira za σ^s faktor je globalni regulator ekspresije gena i igra vrlo važnu ulogu u staničnom odgovoru na stres. U laboratorijskim uvjetima ulaskom u stacionarnu fazu rasta imitira se stresna stanja u kojima se bakterije nalaze u svom prirodnom okolišu. Ulaskom u stacionarnu fazu počinje sinteza σ^s podjedinice koja ulaskom u sastav polimeraze dopušta prepoznavanje i transkripciju gena neophodnih za preživljavanje u ovoj fazi i za postizanje kompetitivne prednosti. Većina do sad poznatih gena, njih više od 70 koji su pod kontrolom ove podjedinice, povezani su s rezistencijom na oksidativni stres, UV-zračenje, visoku temperaturu, visoki osmotski tlak, kiseli pH, etanol i druge stresne uvjete. Nekoliko sigma faktora je ekspremirano za vrijeme stacionarne faze i mnogi geni su regulirani preko više promotora tako da se sigma podjedinice moraju nadmetati za RNA polimerazu. Dva gena koja su pod kontrolom RpoS proteina, koji daju ili kompetitivnu prednost ili mogućnost preživljavanja, su geni *dps* i *nhaA*. *dps* kodira za protein koji se nespecifično veže za DNA i sudjeluje u zaštiti stanice od stresa, dok *nhaA* nosi informaciju za Na^+/H^+ antiporter koji je nužan za preživljavanje u alkalnom mediju (Farrell i Finkel, 2003). Drugi geni koje regulira ova podjedinica odgovorni su za promjene u staničnoj membrani i morfologiji stanice kao i za programiranu staničnu smrt. Ovi geni mogu povećati vjerojatnost opstanka bakterijske populacije u izrazito stresnim uvjetima na način da žrtvuje dio populacije da bi osigurala hranjive sastojke za ostatak stanice preživjeti.

AKTIVACIJA GENA *rpoS*

Ulaskom bakterijske populacije u stacionarnu fazu dolazi do aktivacije gena *rpoS*. Ovaj gen nađen je u velikom broju gram-negativnih bakterija. Nije u potpunosti jasno kako informacija o stresu kontrolira ekspresiju *rpoS*. On se regulira na više nivoa, na razini transkripcije, translacije i aktivnosti proteina. Padom brzine rasta aktivira se transkripcija gena *rpoS* i povećava se za otprilike 5 do 10 puta (Lange, 1994). Translacija već postojeće *rpoS* mRNA je stimulirana visokim osmotskim tlakom, rastom pri djelomično niskim temperaturama (Sladjevski, 1996), postizanjem određene gustoće stanica otprilike $1-2 \times 10^8$ u minimalnom glukoznom mediju (Lange, 1994) i padom pH sa neutralne vrijednosti na 5. Sama translacija zahtjeva prisutnost dvije nekodirajuće RNA, *DsrA* i *OxyS* i prateći protein Hfq. Aktivacija translacije ovisi o spajanju baza između *rpoS* mRNA i *DsrA* RNA. *DsrA* se natječe s sekundarnom strukturom unutar *rpoS* mRNA, koja djeluje kao cis-mjesto koje inhibira translaciju. Translacija pod utjecajem *DsrA* zahtjeva prisustvo RNA vezajućeg proteina Hfq. Translacija je negativno regulirana pomoću *OxyS* RNA, koja se natječe za RNA vezujuće mjesto na proteinu Hfq i tako onemogućuje raskidanje sekundarne strukture *rpoS* mRNA i translaciju. Regulacija na razini aktivnosti proteina očituje se u tome što u nestresnim uvjetima degradacija ovog proteina je vrlo brza.



Slika 3. Translacija *rpoS* mRNA i pozitivan utjecaj *DsrA* RNA koja se zajedno sa Hfq veže za *rpoS* mRNA i tako rastvara sekundarnu strukturu i omogućuje ribosomu da translatira mRNA. *OxyS* RNA negativno utječe na transkripciju jer se natječe za protein Hfq i tako onemogućuje translaciju. (prilagođeno prema: <http://www.genombiology.com>)

FENOTIP GASP

Prednost rasta u stacionarnoj fazi (Growth Advantage in Stationary Phase - GASP) je mehanizama koji su razvile bakterije, a omogućuje im preživljavanje u uvjetima oskudnim hranjivim tvarima. Proučavanjem preživljavanja bakterija u produljenoj stacionarnoj fazi dolazimo da saznanja kako bakterije u svojem prirodnom okolišu reagiraju na nedostatak hranjivih sastojaka. Počeci istraživanja preživljavanja bakterija u produljenoj stacionarnoj fazi datiraju još iz početka dvadesetog stoljeća. Kolter i suradnici primijetili da bakterijske stanice *E. coli* imaju mogućnost preživljavanja u produženoj stacionarnoj fazi. Kada bakterijska populacija umire kao rezultat gladovanja, postoje bakterijske stanice koje se mogu bolje prilagoditi nastalim uvjetima. Takvi mutanti mogu bolje iskoristiti siromašne izvore hranjivih tvari, koje su nastale od mrtvih stanica. Preživjela populacija je vrlo dinamična i konstantan izvor genetičke raznolikosti. Unutar takve populacije dolazi do pojave mutanata koji omogućuju bolju prilagodbu na uvjete gladovanja i takvi mutanti nadrastaju prijašnju populaciju stanica. Stanice koje pokazuju ovakve osobine nazivaju se GASP mutanti. Potvrđene su do sada tri mutacije koje dovode do GASP fenomena. Prve dvije su mutacije u genima *rpoS* i *lrp* (Zambrano i sur., 1993). Treća mutacija nastaje u genu *cstA* kao posljedica genetičkog preuređenja. Gen *rpoS* djeluje kao globalni regulator koji se aktivira u stresnim uvjetima. Proces regulirani σ^S podjedinicom mijenjaju fiziologiju stanice na mnoge načine, smanjuje metabolizam stanice, povećava rezistenciju na glad, pH, osmotski, temperaturni i oksidativni stres (Zinser i Kolter, 2004). Mutanti u ovom genu pokazuju nižu razinu ekspresije gena koji se nalaze pod regulacijom ovog gena. Mutacija u genu *lrp* također pokazuje daje prednost u rastu. Ovaj gen kodira za transkripcijski faktor, leucin regulatorni protein. Odgovoran je za transkripciju mnogih gena i inducira se ulaskom u stacionarnu fazu.

Treća mutacija je u genu *cstA* koji kodira za oligopeptid permeazu. Ova mutacija je posljedica genetičkog preuređenja i uključuje inserciju dvije IS5 sekvencije. GASP fenotip golica znatizelju i napreže maštu znanstvenika već desetljećima, gotovo sigurno postoje još mutacija i mehanizama kojima bakterije prkose zakonima logike i preživljavaju u naizgled nemogućim uvjetima.

NASTANAK I NESTANAK MUTANATA GASP

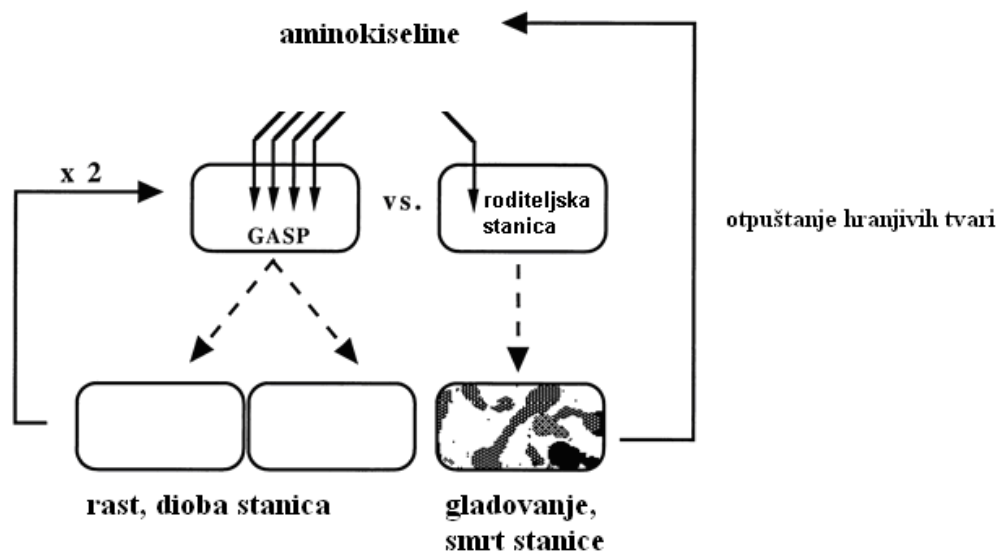
Prvi primjećeni fenomen GASP bio je kod bakterije *E. coli*, koja je uzgajana u LB tekućem mediju. Nakon 10 dana pomiješana je sa bakterijskom kulturom starom 1 dan. U toj mješavini primjećeno je da « stara » bakterijska kultura prevlada mladu. Ovaj fenomen se pokazao i u mješavinama koje su se sastojale od 20 dana stare kulture i 10 dana stare kulture, kao i u mješavinama gdje je populacija stara 30 dana prerastala populaciju staru 20 dana. Trend prerastanja je dokazan i s bakterijskom kulturom starom 120 dana koja je nadvladala 90 dana staru populaciju (Finkel, Zinser i Kolter, 2000). Proučavanjem ovih fenomena znanstvenici su došli do odgovora njihovog nastanka. U populaciji koja se uzgaja u produženoj stacionarnoj fazi i koja je vrlo dinamična dolazi da konstantnih mutacija. Mutanti koji nose povoljnu i stabilnu mutaciju za trenutno stanje pokazuju prednost rasta nad stanicama koje nemaju tu mutaciju. Ovi mutanti imaju prednost tek određeno vrijeme, sve do pojave novih mutanata koji su bolje prilagođeni nastalim uvjetima u okolišu. Ova višestruka međusobna prevladavanja mutanata dešavaju se u valovima, što dovodi do koegzistencije višestrukih oblika mutanata, od koji jedan, ali samo trenutno ima mogućnost prerasti druge stanice (Finkel, Zinser i Kolter, 2000). Ovi valovi preuzimanja prikazani su na slici 8, koja prikazuje snažnu kompeticiju i borbu pojedinih mutanata za prevlast, a ujedno i dočarava dinamičnost koja se dešava unutar populacije.

Gen *rpoS* kodira sigma S (σ^S) faktor veličine 38 kDa koji je odgovoran za promjenu u ekspresiji gena *E. coli* kada se nađe u uvjetima nedostatka izvora ugljika. Aktiviranje gena *rpoS* uzrokuje usporavanje metabolizma bakterije te istovremeno povećanja otpornosti bakterije na izgladnjivanje, pH, osmotski, temperaturni i oksidativni stres (Kolter i Zinser, 2004). Protein RpoS direktno ili indirektno kontrolira indukciju ili represiju do 10% gena *E. coli* (Lacour i Landini 2004, Patten i sur., 2004, Weber i sur., 2005). Većina saznanja o biološkoj ulozi globalnog regulatora stresa i njegovom utjecaju na genomsku stabilnost temelji se na istraživanjima *E. coli* tijekom stacionarne faze rasta (Bjedov i sur., 2003, Layton i Foster, 2003, Lombardo i sur., 2004). Izgleda da je strategija djelovanja RpoS zaštita DNA od oštećenja, a ne povećanje sposobnosti stanice da popravi već nastala oštećenja. Na taj način stanica “štedi“ ATP u uvjetima nedostatka hrane. Još jedna uloga proteina RpoS je povećanje stope mutacija tijekom stacionarne faze na način da regulira popravak krivo sparenih baza (MMR) i ekspresiju gena *dinB* koji kodira za DNA polimerazu IV.

Veliki značaj za prilagodbu bakterije na stresne uvjete kao i za samu evoluciju ima varijabilnost genetičkog materijala, koja omogućuje selekciju povoljnih mutacija i prilagodbu na novonastale uvjete života. Stacionarna faza rasta ima vrlo značajno mjesto u evoluciji bakterija te su mnoga istraživanja posvećena procesima ulaska bakterija u stacionarnu fazu rasta te njihovog dugotrajnog preživljenja u uvjetima stresa.

Sposobnost rasta bakterije *Escherichia coli* tijekom produljene stacionarne faze u uvjetima nedostatka izvora ugljika naziva je prednost rasta u stacionarnoj fazi (eng. Growth Advantage in Stationary Phase - GASP) ili fenomen GASP. Proučavanjem preživljenja bakterija divljeg tipa i mutanata tijekom produljene stacionarne faze moguće je pratiti evoluciju i mehanizme nastanka fenomena GASP u laboratorijskim bakterijskim sojevima te bakterija uzetih iz prirodnog okoliša. Kolterova istraživačka grupa (Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, SAD) utvrdila je da bakterijske kulture *E. coli* imaju mogućnost održavanja tijekom produljene stacionarne faze i do 5 godina, samo uz dodatak vode. Kada bakterijska populacija umire kao rezultat gladovanja, postoje bakterijske stanice koje se mogu bolje prilagoditi nastalim uvjetima. Takvi mutanti GASP mogu bolje iskoristiti siromašne izvore hranjivih tvari, koje su nastale od mrtvih stanica. Preživjela populacija je vrlo dinamična i konstantan izvor genetičke raznolikosti (slika 1 faza 5.). Unutar takve populacije stalno dolazi do pojave novih mutanata GASP koji imaju sposobnost bolje prilagodbe na novonastale uvjete gladovanja te tako zadnja generacija mutanta GASP nadrasta prijašnju.

Kada u okolini dođe do smanjenja ugljikohidrata, *E. coli* prestaje rasti zbog ekstracelularnih i intracelularnih signala. Ovakav programirani prijelaz stanica u stanje mirovanja uzrokuje smanjenje metaboličke aktivnosti stanice čime joj se omogućuje preživljavanje. Mutanti GASP međutim ne odgovaraju na signale iz okoline i nastavljaju rasti na ostatcima hrane, a potom na odumrlim stanicama (slika 4) što dovodi po povećanja frekvencije GASP mutanata (Kreft, 2004).



Slika 4. Model fiziološke osnove fenotipa GASP (prilagođeno prema: <http://jb.asm.org/cgi/content/full/181/18/5800>)

Ekspresija fenotipa GASP ovisi o sposobnosti bakterijske stanice da uvede adaptivnu mutaciju koja će joj omogućiti preživljavanje u uvjetima gladovanja tijekom stacionarne faze. Genom mikroorganizama je pod konstantnom promjenom te stalno dolazi do primanja gena horizontalnim transferom, do gubitka funkcije gena uslijed mutacija te do rearanžmana gena unutar genoma.

Praćenjem razvoja fenotipa GASP soja divljeg tipa (G_0) mogu se uočiti dvije generacije mutanata GASP, GASP₁ i GASP₂. U nepovoljnim uvjetima G_0 soj uvodi jednu mutaciju u svoj genom te nastaje mutant GASP₁, a daljnjim gladovanjem soj GASP₁ uvodi dodatne mutacije te se razvija generacija mutanata GASP₂ (Zinser i Kolter, 2004).

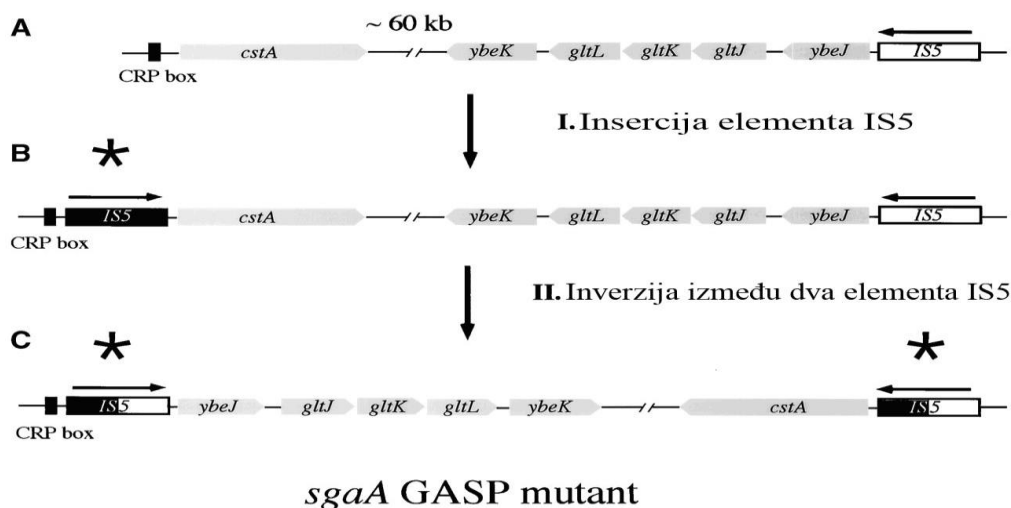
Prethodna istraživanja kompeticije između stare i mlade bakterijske kulture *E. coli* pokazala su da na pojavu fenomena GASP utječu različite povoljne mutacije u genima globalnih regulatora transkripcije RpoS (Zambrano i sur., 1993; Zinser i Kolter 2000) i/ili Lrp Zinster i Kolter, 2000), kao i rearanžmani koji uključuju IS5 insercijsku sekvenciju (Zinster i Kolter, 2004; Finkel, 2006).

U većini je slučajeva, kod GASP G_1 mutanata, je pronađena smanjena ekspresija gena *rpoS*, što rezultira smanjenom ekspresijom σ^S regulona. Izoliranjem mutanata GASP i sekvencioniranjem gena *rpoS* uočena je duplikacija 46 parova baza unutar ovoga gena koja rezultira smanjenom ekspresijom gena (Kolter, 1993). Smanjena ekspresija gena *rpoS* omogućuje povećanu ekspresiju gena ovisnih o proteinu RpoD, koji je jedan od alternativnih podjedinica RNA polimeraze (Nystrom, 2004). Pod kontrolom σ^D podjedinice nalaze se geni koji sudjeluju u katabolizmu aminokiselina (Notley-McRobb i sur., 2002). Budući da su σ^D i σ^S podjedinice izravni konkurenti za vezanje na RNA polimerazu, takve mutacije gena *rpoS* povećavaju katabolizam aminokiselina te na taj način ubrzavaju rast na aminokiselinama oslobođenim iz mrtvih stanica (Zinster i Kolter, 1999).

Gen *lrp* kodira transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju mnogih gena uključenih u metabolizam i transport aminokiselina, a induciran je tijekom prelaska u stacionarnu fazu rasta. Protein Lrp je dimerni protein koji može biti i aktivator i represor. Njegova aktivnost u stanici regulira se količinom intracelularnog leucina. Ovaj protein regulira metabolizam aminokiselina tako što povećava anabolizam, a smanjuje katabolizam. Homolozi proteina Lrp pronađeni su i u drugim mikroorganizmima (Zinser i Kolter, 2000). U mutanta GASP G_2 uočeno je da dolazi do delecije 3 para baza 5'-GGA-3' u *lrp* genu što rezultira nastankom proteina kojemu na 39. mjestu nedostaje aminokiselina glicin u DNA-vezujućem (eng. DNA binding) mjestu. Posljedica mutacije je nastanak proteina koji ima drugačiju konformaciju u području odgovornom za vezanje na DNA te se zbog toga ne može vezati na DNA. Time ne dolazi do aktivacije gena koji su pod kontrolom ovog proteina. Mutacija u ovoj regiji omogućava bolji fitness u fazi izgladnjivanja mutantima GASP.

Druga mutacija zbog koje nastaju mutanti GASP G_2 je u genu *sgaA*. Identificirana je kao genomski rearanžman koji je posljedica insercije sekvencije IS5, pri čemu dolazi do aktivacije operona *ybeJ-gltJKL-ybeK* i inaktivacije gena *cstA*. Rearanžman se odvija u dva koraka koji uključuju inserciju IS5 elementa koji je

udaljen 103 bp od početka čitanja gena *ybeJ*. Prvo dolazi do insercije novog IS5 elementa na regulatorno mjesto gena *cstA* između promotora i CRP mjesta. Gen *cstA* kodira za oligopeptid permeazu, a induciran je tijekom stacionarne faze rasta specifičnom aktivacijom pomoću CRP mjesta. Slijedeći korak je homologna rekombinacija između insertiranog IS5 elementa i starog IS5 (slika 5) što rezultira inverzijom u bakterijskom genomu (Zinser i sur., 2003). Posljedica ovoga rearanžmana je zamjena mjesta gena *cstA* i operona *ybeJ-gltJKL-ybeK* i ovo je jedina mutacija detektirana unutar gena *sgaA* kod mutanata GASP. Aktivirani operon *ybeJ-gltJKL-ybeK* također povećava kapacitet stanice za transport i rast na aminokiselinama kao jedinom izvoru ugljika (Zinser i Kolter, 2004).



Slika 5. Mutacija gena *sgaA* u mutantima GASP posljedica rearanžmana (prilagođeno prema: Zinser i sur., 2003)

ČETIRI VRSTE FENOTIPA GASP

Proučavanjem fenotipa GASP otkriveno je da postoje četiri različite vrste pojave ovog fenomena prikazanih na slici 9. Razlikovanje ova četiri tipa povezano je s mutantima u genima koji kodiraju za DNA polimeraze koje sudjeluju u SOS popravku. Od pet polimeraza koje su prisutne u *E. coli*, tri su inducirane u sklopu SOS regulona kod odgovora na DNA oštećenje (Goodman, 2000). Polimeraze V i IV, koje su kodirane genima *umuDC* odnosno *dinB*, su svrstane u Y-porodicu polimeraza, to su polimeraze koje repliciraju DNA s niskom točnošću, eng. “error-prone” polimeraza (Ohmori i sur., 2001), dok polimeraza II iz B-porodice polimeraza replicira DNA sa visokom točnošću, eng. “error free” polimeraza. U stanicama koje se dijele Pol V je odgovorna za supstitucijske mutacije, na mjestima DNA oštećenja (Friedberg i sur., 1995). Pol II je ključna kod zaustavljanja replikacijskih rašlji na oštećenju DNA (Rangarajan i sur., 1999), ali za razliku od pol V, inicijacija replikacije katalizirana sa pol II, se dešava bez povećane vjerojatnosti nastanka novih mutacija. Pol IV je primarno uključena u stvaranje jednostavnih, neusmjerenih frameshift mutacija (Kim i sur., 1997), te na taj način pomaže oslobađanje replikacijskih rašlji, zakočenih na neoštećenju DNA. Error-prone SOS-polimeraze imaju značajnu ulogu u stvaranju genetičke varijabilnosti, koja će omogućiti selekciju povoljnih mutacija u uvjetima stresa SOS-polimeraze također su ključne i za samo preživljenje stanice, u uvjetima kada je DNA podložna raznim oštećenjima, na način da ta oštećenja zaobilaze i omogućavaju provođenje replikacije. Yeiser i sur. (2002) su primijetili da se geni *polB*, *dinB* i *umuDC* transkribiraju za vrijeme stacionarne faze rasta u odsustvu izvanstaničnog uzročnika DNA oštećenja, što znači da su ove polimeraze od velikog značaja za dugotrajno preživljenje, jer osim u popravku oštećenja sudjeluju i u stvaranju genetičke raznolikosti u stacionarnoj fazi rasta. Eksperimenti, u kojima su mutanti pol miješani sa divljim tipom te međusobno, su pokazali da SOS-pol mutanti ne ostvaruju uvijek klasični fenotip GASP u odnosu na roditelja divljeg tipa, ali gotovo uvijek pokazuju fenotip GASP u odnosu na drugog mutanta pol, uz iznimku stare kulture mutanta pol V koja nije uspjela ostvariti fenotip GASP u mješavini s mladom kulturom mutanta pol IV.

Možemo razlikovati četiri načina ponašanja miješanih bakterijskih kultura. Prvi tip ili prvu klasu karakterizira to da stara divlja bakterijska kultura u potpunosti nadraste mladu divlju bakterijsku kulturu. Pojava ovakvog fenotipa naziva se jaki GASP. Kod drugog tipa starija bakterijska kultura mutanata povećava svoj broj i može doseći mladu kulturu divljeg tipa, ali ne može je i preteći. Ovakav fenotip se naziva slabi fenotip GASP. Fenotip do koje dolazi kod trećeg tipa naziva se abortivni fenotip GASP, jer stara kultura mutanata pokušava prerasti mladu divlju bakterijsku kulturu, ali joj to ne uspijeva. Mutanti iskazuju svoju prednost u rastu samo određeno vrijeme nakon kojeg odumiru. Četvrti tip karakterizira fenotip kod kojeg ne dolazi do ekspresije GASP fenomena. Bakterijska kultura mutanata ne može prerasti mladu divlju bakterijsku kulturu (Yeiser i sur., 2002).

Proučavanjem mutanata GASP u bakteriji *E. coli* identificirane su tri mutacije odgovorne za njegovu pojavu i to unutar globalnih regulatora gena *rpoS* i *lrp* (Zambrano i sur., 1993; Zinser i Kolter 2000) te genu *sgaA* (Zinser, 2003).

Pojava fenotipa GASP najbolje se može pratiti u mješovitim bakterijskim kulturama stanica koje već neko vrijeme rastu u uvjetima gladovanja (starih kultura) i mladih stanica koje nisu bile izložene uvjetima stresa. U ovakvim mješavinama može se vidjeti kako stare kulture zbog bolje prilagodbe imaju intenzivniji rast u odnosu na mladu kulturu. Odnosno mutanti GASP imaju veći relativni fitnes nego stanice divljeg tipa.

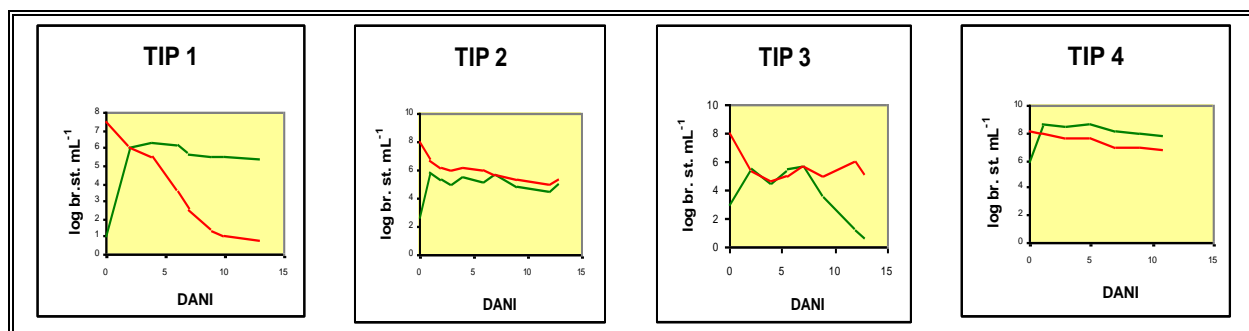
Prema analizi Yeiser i sur. (2002), kompeticijski rast mutanata *E. coli* može rezultirati jednim od četiri moguća fenotipa GASP (slika 6).

Tip 1 je definiran kao jaki GASP. Mutanti GASP su sposobni nadržati mladu bakterijsku kulturu iako je mlada kultura u znatno većem broju u odnosu na staru kulturu (slika 6).

Slabi GASP (slika 6, tip 2) karakterizira pojava da stara kultura koja je na početku u manjem broju u odnosu na mladu kulturu dostiže njen broj te se broj stanica održava na jednakoj vrijednosti. Daljnjim uzgojem broj stanica obje kulture ostaje nepromijenjen.

Treći fenotip je nazvan abortivni GASP (slika 6, tip 3). U tom slučaju stara bakterijska kultura koja je na početku u manjem broju pokušava nadržati mladu kulturu, odnosno preuzeti vodstvo u mješavini, ali joj to ne uspijeva. Kratki period rastu u jednakom broju, ali nakon toga dolazi do odumiranja stare bakterijske kulture dok mlada nastavlja rasti (Yeiser i sur., 2002).

Tip 4 je umjereni GASP. Stara bakterijska kultura je i u ovom slučaju na početku u manjem broju u odnosu na mladu kulturu, ali nakon kratkog vremena ona nadržati mladu kulturu te se njihov odnos zadržava konstantnim tijekom daljnje kultivacije (slika 6).



Slika 6. Grafički prikaz četiri različita tipa pojave fenotipa GASP. Crvena linija označava bakterijsku kulturu staru 10 dana. Zelena linija označava mladu bakterijsku kulturu od 24 sata (prilagođeno prema: Yeiser i sur., 2002).

MUTANTI GASP – EVOLUCIJSKE VARALICE

U prirodi bakterije vrlo rijetko se nalaze u uvjetima koji podržavaju njihov neograničeni rast, dakle preživljavanje između faza uzastopnog rasta je presudno za njihovo preživljavanje. Mutanti GASP imaju utišanu ekspresiju sigma S regulona i zato se nastavljaju hraniti ostacima mrtvih stanica i rasti, a ne održavati visoko rezistentno stanje prestanka rasta. Evolucijski gledano ono što se dešava u strategiji preživljavanja kultura *E. coli* u stacionarnoj fazi je to da se rezistencija i opstanak suprotstavljaju hranjenju na mrtvim stanicama i rastu. Kao i u svakom sistemu koji ovisi o koordinaciji tako i ova tranzicija je ranjiva od strane varalica koji ne reagiraju na tipične podražaje. Ove varalice ne reagiraju na signale od drugih stanica i one ne

zaustavljaju dijeljenje, ali profitiraju na neki način u činjenici da drugi članovi populacije reagiraju na podražaje. Za *E. coli* to znači da varalice se mogu naći u svakoj populaciji koja se nalazi u stacionarnoj fazi. Dokazano je da kulture *E. coli* koje se nalaze u stacionarnoj fazi su dosta lako napadnute od mutanata koji prerastaju kulturu svojih predaka. Ovi mutanti koji pokazuju fenotip GASP imaju mogućnost rasti kada su njihovi preci u stanju u kojem se više ne dijele. Čini se da mutanti GASP imaju mogućnost zadržavanja rasta hraneći se ostacima mrtvih stanica. Ovo njihovo ponašanje može se smatrati varanjem, zato što ignoriraju signale koji zadržavaju ostatak populacije divljeg tipa u stanju ne dijeljenja profitirajući svojim rastom. Mutanti zadržavaju svoju mogućnost rasta tako što ili u potpunosti ne induciraju gene na podražaje o glad ili obustavljaju prerano te podražaje i nastavljaju vegetativni rast. Mutanti koji preuzimaju populaciju su heterogeni i imaju poboljšan metabolizam aminokiselina, kao i rast na aminokiselinama od mrtvih stanica. Kada koncentracija hranjiva padne ispod kritične i gustoća stanica dosegne svoj maksimum dolazi do indukcije sigmas regulona, koji usmjerava populaciju u stadij prestanka rasta i razvitak rezistencije na razne stresne podražaje. Stoga logično je da većina mutanata, koji mogu ignorirati ovu strategiju preživljavanja su mutanti u sigma s regulonu. Drugim riječima samo deregulacija funkcije gena *rpoS* dopušta nastavak rasta unutar stacionarne faze. Prednost mutanta GASP koja se očituje u njegovom povećanju broja stanica je najbolje vidljivo kada se on nalazi u manjini prema populaciji divljeg tipa. Fenotip GASP možemo opisati kao dezertiranjem od utvrđene strategije preživljavanja, ulaganje energije u rast, hranjenje tvarima koji su još prisutni u mediju i onima nastalih od mrtvih stanica radije nego razvijanje rezistencije na stres i održavanje populacije. Sve ove mogućnosti daju mu prednost nad divljim tipom koji ostaje u fazi ne dijeljenja unutar stacionarne faze. Mutanti koji prevladaju kulturu bakterije *E. coli* divljeg tipa mogu se zvati evolucijskim varalicama (Vulić i Kolter, 2001).

NEOVISNOST FENOTIPA GASP O σ^S MUTACIJI

Najveći broj potvrđenih fenotipova GASP dokazan je na bakteriji *E. coli* koji zahtijeva kao prvu potrebnu mutaciju onu u genu *rpoS*. Istraživanja su provedena da se utvrdi da li i druge bakterije iz obitelji enterobakterija imaju sposobnost pojavljivanja GASP fenotipa i da li i kod njih je potrebna mutacija gena *rpoS*. Proučavanja donose dokaze da pojava GASP-a nije rijetka pojava, već je gotovo pravilo i prisutno je u mnogim bakterijskim vrstama. GASP ima visoku frekvenciju pojavljivanja u populaciji stanica i predstavlja općenito ponašanje u enterobakterija. Moguće je za očekivati da prirodne populacije stječu prednost rasta u stacionarnoj fazi preko mehanizama koji su neovisni o mutacijama u genu *rpoS*. Kao dokaz ovoj tvrdnji prilažu se dokazi da frekvencija pojavljivanja fenotipa GASP je slična u bakteriji divljeg tipa kao i u bakteriji koja je bila knock-out mutant za ovaj gen. Ako mutacija u genu *rpoS* nije potrebna za stjecanje fenotipa GASP, onda je moguće da i bakterije koje nemaju ovaj gen također pokažu fenotip GASP i to je doista i dokazano za enterobakteriju *P. stuartii* (Martinez-Garcia i sur., 2003). U drugim vrstama enterobakterija za koje je dokazano da pokazuju prednost rasta gen *rpoS* nije mutiran, već je njegova ekspresija utišana, odnosno smanjena kao i ekspresija gena pod njegovim regulonom. Bitno je istaknuti da ako je gen *rpoS* prisutan, najveća frekvencija mutacija u laboratorijskim uvjetima koje potvrđuju GASP fenotip su upravo mutacije u ovom genu.

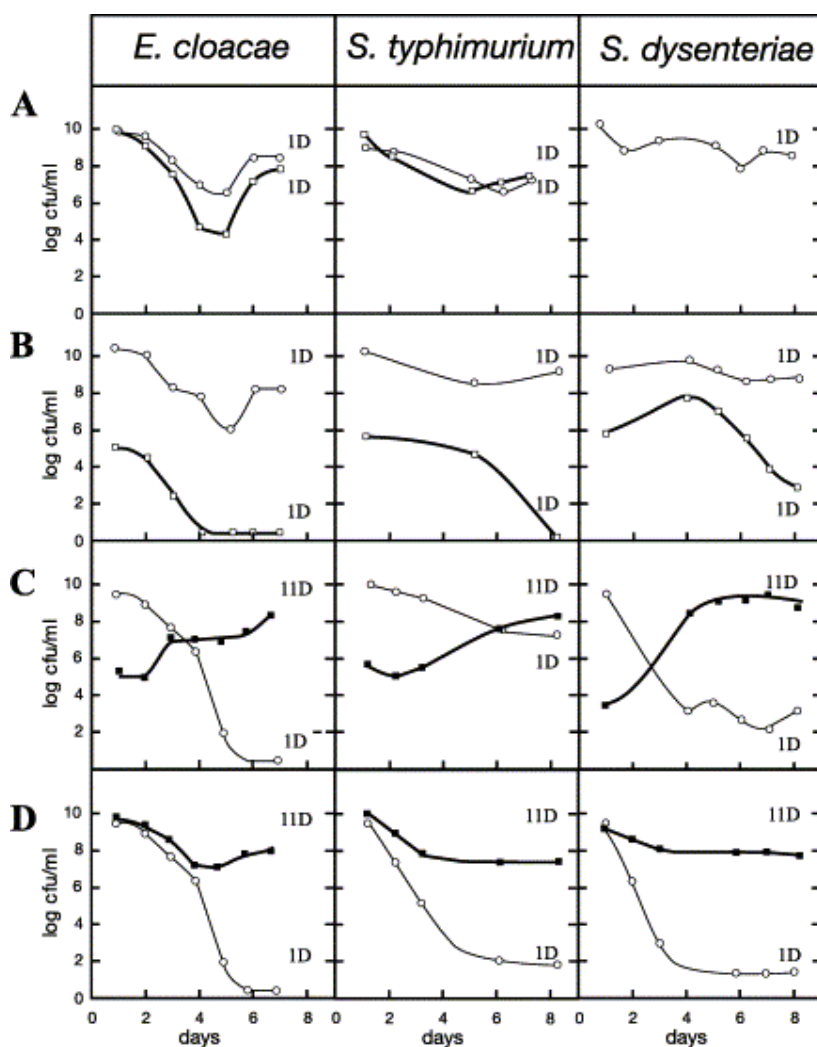
DNA- IZVOR HRANE I ENERGIJE

Horizontalan prijenos gena između bakterija može se odvijati između različitih i istih vrsta pomoću tri mehanizma: konjugacijom, transdukcijom i transformacijom. Transformacija ovisi o sposobnosti stanice da unese stabilnu izvanstraničnu DNA. Bakterije uzimaju DNA iz okoliša ne samo kao izvor genetičke informacije, već ju mogu koristiti i kao izvor hranjivih sastojaka. Prednost koju stanica može dobiti uzimajući izvanstraničnu DNA i tako genetički unaprijediti svoj genom s novim korisnim genima je očita. Stanica također može imati korist i uzimajući DNA iz okoliša koja je heterologna i koja zbog toga ima manju vjerojatnost da rekombinira s genetičkim materijalom same stanice. Takvu DNA stanica koristi kao izvor hrane i energije i upravo ta mogućnost daje joj prednost nad drugim stanicama. Koristeći DNA kao hranu stanica možda može izgubiti neki koristan gen, ali također se i osigurava od mogućnosti da joj se u genom ugradi neka letalna mutacija. Činjenica da se prenos genetičkog materijala horizontalnim putem održao tokom evolucije govori o tome da je prednost koju bakterija može dobiti s novim genetičkim materijalom velika. Kod gram-negativnih bakterija degradacija jednolančane DNA koja u cijelosti ne uđe u citoplazmu vjerojatno se dešava u periplazmatskom prostoru, gdje se DNA zadržava i nastali nukleotidi se transportiraju u citoplazmu za katalitičku upotrebu. Prirodna kompetentnost i transformacija nije uočena kod mnogih bakterijskih vrsta, uključujući i bakteriju *E. coli*. Kod vrsta koje nisu prirodno kompetentne pronađeni su homolozi gena čiji produkti kod kompetentnih vrsta učestvuju u mehanizmu unošenja DNA u stanicu. Produkti tih gena

vjerojatno kod nekompetentnih bakterija učestvuju u unosu DNA u stanicu, ali njena sudbina nije integracije u bakterijski genom (Finkel i Kolter, 2001). Većina DNA koja se nalazi u prirodnom okolišu je heterologna i njezina integracija bila bi nepovoljna za stabilnost genetičkog materijala bakterije, no ta DNA predstavlja važan izvor hrane i energije, stoga bakterije poput *E. coli* razvile su mehanizme kojima mogu iskoristiti DNA u svom okolišu kao hranu. Ovisno o uvjetima u kojim se stanica nalazi ovisi da li će DNA unesena u stanicu rekombinirati i integrirati u genom bakterije ili će biti usmjerena u reakcije koje proizvode energiju u stanici (Finkel i Kolter, 2001).

Fenotip GASP u drugih enterobakterija

Jaki fenotip GASP najviše je proučavan u *E. coli*, ali je također pronađen i u *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae* (Martinez-Garcia i sur., 2003, slika 7), i drugih bakterijskih vrsta (Eberl i sur., 1996; Smeulders i sur., 1999; Finkel i sur., 2000; Silby i sur., 2005) te u mješovitim kulturama enterobakterija (Bačun-Družina i sur. 2007, slika 8).



Slika 7. Mješovite kulture enterobakterija *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* i *Shigella dysenteriae* (Rif^r, Nal^r); u omjeru 1:1 (slike A i D) i 1:10 000 (slike B i C), 1D = 1 dan stare; 11D = 11 dana stare kulture (prilagođeno prema: Esteban i sur., 2003).

Regulon *rpoS* i protein RpoS

-Protein RpoS pozitivno ili negativno regulira ekspresiju više od 500 gena

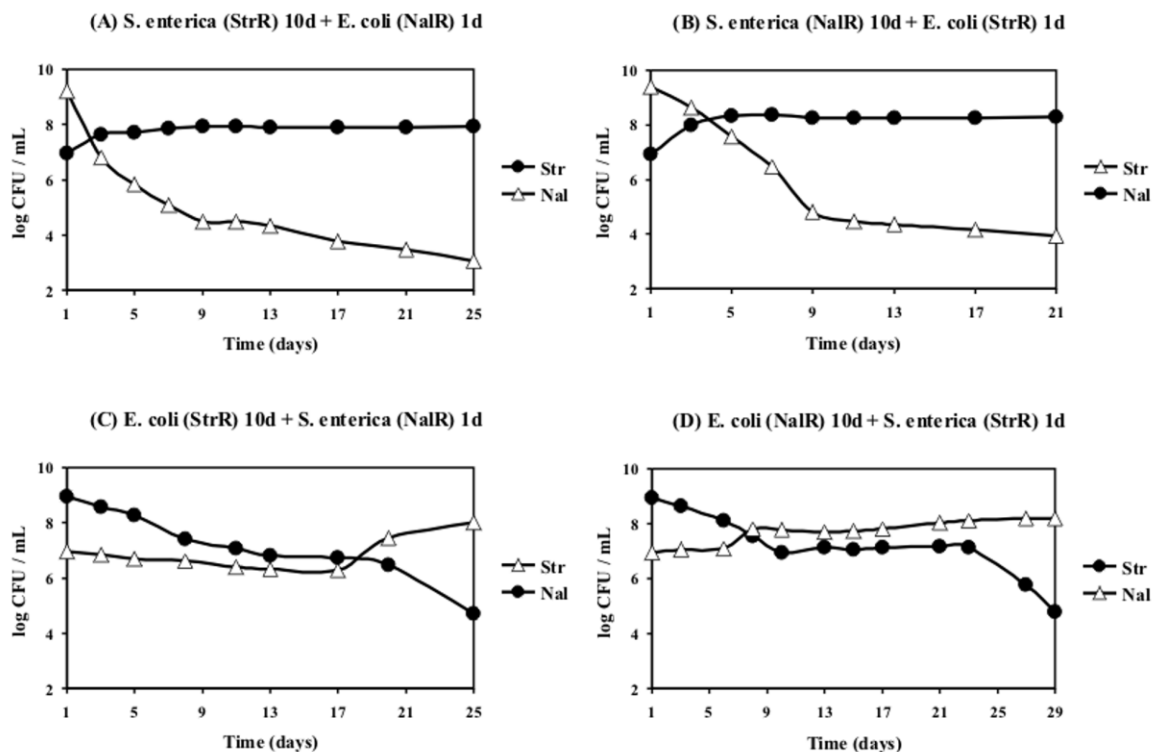
-uključeni su u stanični odgovor na različite stresove kao što su gladovanje, virulentnost, anaerobioza, osmotski šok, sniženje pH vrijednosti, temperaturne promjene, oksidativna oštećenja i prijelaz u stacionarnu fazu rasta.

Protein RpoS

-kontrolira promotorska mjesta regulona za korištenje izvora ugljika kao što su CAP (catabolite activator protein)/Crp (cyclic AMP [cAMP] receptor protein) te dozvoljava korištenje alternativnog izvora ugljika,

-Kontrolira dvo komponentne regulatorne sustave PhoR/PhoB i NtrB/NtrC, koji reguliraju korištenje izvora fosfora i dušika.

-Mijenjaju svaki dio u stanici, uključujući obje membrane (unutarnja i vanjska) i peptidoglikan, morfologiju i indukciju funkcija koje omogućavaju adheziju i formiranje biofilma.



Slika 8. Mješovite kulture enterobakterija *E. coli* (bijeli trokut) i *Salmonella enterica* (crni krug); rezistentne na nalidixinsku kiselinu (NalR) ili streptomycin (StrR) u minimalnoj podlozi M9, u omjeru 1:100, 10d = deset dana stare i 1d = jedan dan stare kulture (A; B; C; D; Bačun-Družina i sur. 2007).

RpoS- precizni regulatorni mehanizmi

(i) aktivacija transkripcije gena *rpoS* zahtjeva signalnu molekulu 5'-difosfat 3'-difosfat guanozin (ppGpp) koja se veže na β i β' podjedinicu RNA polimeraze;

(ii) aktivacija translacije *rpoS* mRNA, koja uključuje strukturni rearanžman *rpoS* mRNA, RNA-čaperon Hfq i nekoliko malih regulatornih molekula RNA;

(iii) smanjenje proteolize proteina σ S (RpoS);

(iv) nekoliko faktora pomaže formiranje σ S-RNA polimeraze holoenzima ($E\sigma$ S) kao što su σ faktor vezajući protein Crl, anti- σ 70 factor Rsd i ppGpp.

Nukleotid guanozin 3', 5'- difosfat, ppGpp

Mali nukleotid guanozin 3', 5'- difosfat, ppGpp, djeluje kao globaln regulator ekspresije gena koji omogućavaju preživljenje bakterija u limitiranim uvjetima;

Odgovor na mnoge različite vrste ograničenja nutrijenata i uvjete koji dovode do prestanka rasta stanica;

Ostvaruje preusmjeravanje transkripcije gena koji favoriziraju transkripciju gena važnih za opstanak tijekom izgladnjivanja, rasta, za adaptaciju, proizvodnju sekundarnih metabolita, otpornost na toksine, diobu stanica, pokretljivost, stvaranje biofilma, razvoj, kompetenciju i virulentnost.