Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/122345

File ID	122345
Filename	Samenvatting
Version	Final published version (publisher's pdf)

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Phase variation of type 1 fimbriae : a single cell investigation
Author	A.M. Adiciptaningrum
Faculty	Faculty of Science
Year	2009
Pages	103
ISBN	9789077209295

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/292190

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Samenvatting

De eerste ideeën over heterogeniteit tussen cellen in isogene populaties zijn al tientallen jaren oud, bijvoorbeeld uit het eerste onderzoek naar bimodale β-galactosidase-expressie in een *batch culture*. Deze heterogeniteit is opnieuw onder de aandacht gekomen dankzij recente technologische ontwikkelingen als *time-lapse* microscopie, fluorescente labeling en beeldanalysesoftware.

In dit proefschrift rapporteren we de resultaten van ons onderzoek naar twee verschillende processen in *Escherichia coli*. Het eerste is de cel-tot-cel heterogeniteit van de celcyclus en het DNA-replicatieproces en het tweede is de fasevariatie van type 1 fimbrische expressie.

In hoofdstuk 2 beschrijven we de experimentele methoden die zijn ontwikkeld om de resultaten in de latere hoofdstukken te vergaren. Om de replicatie van DNA tijdens de celcyclus te volgen is het fluorescente *mCherry* eiwit gefuseerd met *SeqA* eiwit. *SeqA* is een DNA-sekwestratie eiwit dat betrokken is bij de negatieve regulatie van de aanvang van DNA-replicatie door binding aan vers en hemi-gemethyleerd DNA. *In vivo* verzamelt fluorescent gelabeld *SeqA* zich zichtbaar op enkele punten met een hoge concentratie, waardoor de locatie van de replicatievertakking waargenomen kan worden. Om de fase-afhankelijke type 1 fimbrische expressie te volgen hebben we het *gfpmut2* gen onder de invloed van de chromosomale *fim*-schakelaar geplaatst. De combinatie van fluorescente labeling en *time-lapse* microscopie heeft ons in staat gesteld om tegelijkertijd de groei van een enkele cel tot een microkolonie en de DNA-replicatie en dynamica van de *fim*-schakeling te volgen.

In hoofdstuk 3 richten we ons op de de cel-tot-cel heterogeniteit van de celdelingscyclus en het DNA-replicatieproces in individuele langzaam groeiende *E.coli*-cellen. In *E.coli* vangt de DNA-replicatie aan bij de replicatieoorsprong *oriC* en eindigt deze bij het eindpunt *ter*. Gewoonlijk worden afzonderlijke gebeurtenissen in de celdelings- en DNA-replicatiecycli afzonderlijk bestudeerd en worden correlaties tussen beide afgeleid uit modellen. Deze aanpak heeft geleid tot het concept van de initiatiemassa, waarbij de aanvang van de DNA-replicatie zou plaatsvinden bij een constante kritische massa per replicatieoorsprong. De onafhankelijke metingen geven echter geen inzicht in de correlatie tussen gebeurtenissen of hoeveelheden binnen eenzelfde celcyclus. De mogelijkheid om DNA-replicatie en celgroei gelijktijdig te observeren biedt een unieke kans om zulke correlaties direct te onderzoeken.

Het onderzoek naar *SeqA*-dynamica in langzaam groeiende cellen heeft aangetoond dat het aantal locaties met een hoge concentratie in de loop van de celcyclus altijd het volgende patroon volgt: 0-1-2-1-0. Dit patroon is consistent met het ontbreken van replicatie aan het begin en einde van de celcyclus en bidirectionele beweging van de replicatievertakkingen daartussenin. We concluderen dat elke lokaal verhoogde concentratie van *SeqA* overeenkomt met een replicatievertakking.

We hebben een sterke anticorrelatie waargenomen tussen de groeisnelheid van de cel en de tijd tussen celdelingen – een verband dat naar ons weten nog niet eerder is gerapporteerd. We hebben gezien dat de grotere cellen uit een populatie overwegend minder tijd tussen celdelingen hebben dan de kleinere cellen. Bovendien hebben we slechts een kleine variatie in celgrootte waargenomen bij aanvang van de DNA-replicatie. Samen met de grote variatie in de duur van de B-periode (de tijd tussen celdeling en de aanvang van replicatie) en een correlatie tussen de B-periode en de tijd tussen celdelingen ondersteunen onze waarnemingen het kritische-massamodel. Tenslotte hebben we gezien dat de duur van de C-periode (de duur van de replicatie zelf) relatief constant is, in tegenstelling tot de zeer variabele B-periode en D-periode (de tijd tussen het voltooien van de replicatie en de celdeling).

In hoofdstuk 4 beschrijven wij de resultaten van de eerste *real-time* studie naar de fasevariatie van de type-1 fimbriae in *E. coli* op ééncellig niveau. Fasevariatie van antigenen en andere eiwitten die op het celoppervlak tot expressie komen, is wijd verbreid onder ziekteverwekkers. Fasevariatie wordt traditioneel gezien als een mechanisme om het gastheerimmuunsysteem te vermijden en betreft een erfelijke en omkeerbare 'alles-of-niets' expressie van één gen of een reeks genen. Het schakelen tussen de staten wordt beschouwd als een stochastisch proces, dat resulteert in een heterogene populatie van verschillende staten.

In *E.coli* is de expressie van het type 1 pili (fimbriae) fasevariabel. De promotor voor *fim* expressie bevindt zich in een omkeerbaar DNA fragment van 314 bps (*fimS*). Wanneer omkering plaatsvindt, verandert de promotor in *fimS* van orientatie en fungeert daarmee als genetische schakelaar. In de 'ON'-oriëntatie, stuurt *fimS* de expressie aan van een aantal structurele genen van het *fim* systeem. In de 'OFF'-oriëntatie worden de *fim*-genen niet tot expressie gebracht. De inversie van *fimS* staat onder controle van twee locatie-specifieke recombinases, FimB en FimE. Terwijl FimB in beide richtingen kan schakelen, heeft FimE een grote voorkeur om te schakelen in de 'OFF'-oriëntatie. Bulk-studies hebben een gedetailleerd inzicht verschaft in de regulatie van het *fim*-systeem. Echter, deze benadering is niet geschikt voor de exploratie van de schakel-dynamica en van de

correlatie tussen schakel-gebeurtenissen en andere celprocessen (zoals de replicatie van DNA).

Het optreden van schakel-gebeurtenissen wordt in bulk-studies van het *fim*-systeem bepaald door het volgen van de verhouding van de *E.coli*-populaties in verschillende staten. Hier hebben wij GFP (Green Fluorescent Protein) onder controle van de *fim*-schakelaar geplaatst en met *timelapse*-fasecontrast- en fluorescentie-microscopie gekeken naar groeiende microkolonies. Individuele schakel-gebeurtenissen konden we direct volgen en we observeerden verschillende GFP-expressiepatronen in genealogisch verwante cellijnen. Naast de verwachte monotone stijging van het fluorescentieniveau, zagen we ook cellijnen met een tijdelijke fluorescentie-toename. Door gelijktijdig de voortgang van de replicatie te volgen, tonen wij aan dat deze patronen het gevolg zijn van de overerving van verschillende *fim*-staten door de dochtercellen. Onze data zijn consistent met het optreden van meerdere replicatievorken zoals door het Cooper-Helmstetter-model wordt beschreven. Voorts vonden wij dat 'OFF'-naar-'ON'-schakeling afhankelijk is van de celleeftijd, met een hogere schakel-kans aan het begin van de celcyclus, wat een mogelijke correlatie tussen *fim*-schakeling en chromosoomreplicatie suggereert.

In hoofdstuk 5 onderzoeken wij hoe de *fim*-schakeling door het celverleden wordt beïnvloed. In eerder onderzoek naar fasevariatie werd verondersteld dat dit een zuiver willekeurig proces is dat een Poisson-statistiek volgt. Echter, deze aanname is nooit direct getest. In recente fasevariatie-studies worden verschillende mogelijke mechanismen gesuggereerd die zouden kunnen leiden tot niet-Poisson schakel-gedrag. Een voorbeeld is de afhankelijkheid van *fimE*-expressie van de staat van *fimS*. Er is geopperd dat een dergelijke regulatie de 'OFF'-schakel-kans tijdsafhankelijk maakt vanwege de tijd die FimE nodig heeft om een *steady-state* niveau te bereiken.

Wij volgen cellen in een groeiende microkolonie en maten de tijd die een cel in de 'ON'-staat blijft, nadat hij naar de 'ON'-staat geschakeld is. De gegevens laten zien dat de 'OFF'-schakel-snelheid constant is in de tijd en onafhankelijk van het schakel-verleden, waarmee het Poisson-karakter van de *fim*-schakeling wordt bevestigd.