

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Bakteriális sejtosztódás és populációs növekedés
vizsgálata *Synechococcus elongatus*-ban**

Nagyapáti Sarolta

Témavezető:

Dr. Ughy Bettina

Tudományos főmunkatárs

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

HUN-REN

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet



Szeged, 2025

Bevezetés

Disszertációmban a baktériumok populációs növekedésével és sejtosztódásával foglalkoztam. A baktériumok közösségi viselekedése nagyon bonyolult, és nem ismert, hogy hogyan szabályozzák szaporodásukat egy populációban. Laboratóriumi körülmények között a baktérium populációk természetbeni növekedését szakaszos fermentációval lehet legjobban modellezni. Az irodalmi információk alapján a bakteriális populáció zárt rendszerben történő növekedése 5 fő szakaszra, fázisra bontható: lag, exponenciális, stacionárius, pusztulási és hosszútávú stacionárius fázis. A lag fázis kezdetén még nincs (vagy alig van) sejtosztódás. Az exponenciális fázisban maximális sebességgel osztódnak a sejtek, amíg bizonyos külső tényezőknek köszönhetően lelassul az osztódás és a populáció belép a stacionárius fázisba, melyet állandó sejtkoncentrációként definiálnak. A növekedésllassulást a szakirodalom tápanyagkimerüléssel magyarázza, vagy mérgező anyagcsere melléktermékek / szignálmolekulák felhalmozódásával, esetleg kontakgtátlással. A fázist, amikor a sejtek telepképző egységeinek (ang. colony forming unit, CFU) számának csökkenése tapasztalható, a szakirodalom pusztulási fázisnak nevezi, és úgy tartják, hogy az elpusztult sejtek törmelégeit hasznosító túlélő sejtek pedig még hosszú ideig fenntarthatják a populációt a hosszútávú stacionárius fázisban.

Bár az egyik legnyilvánvalóbb jelenséget, a stacionárius állapotot azonnal felismerték, és leírták, de alapos jellemzését 225 év alatt sem végezték el. A baktériumok sejtosztódását és populációs növekedését nem csak az alapkutatók szempontjából fontos megismerni és megérteni, hanem a gyógyászat, az ipar, a biotechnológia és a környezetvédelem fejlesztésének érdekében is. A tudományt már több mint 200 éve foglalkoztatja ez a téma,

azonban még mindig vannak bőven megválaszolatlan kérdések. A bakteriális populáció növekedésének szakaszainak kialakulásáról és a háttérben álló folyamatokról különböző elméletek és magyarázatok készültek, de szinte mindegyiket megkérdőjelezték vagy találtak kivételeket, amikor nem bizonyultak helyesnek. Mindezek miatt napjainkban is kiemelten fontos a bakteriális populáció növekedésének részletes vizsgálata.

Célkitűzések

Doktori munkám legfőbb célja a bakteriális populációnövekedés és a fázisok kialakulásának részletes vizsgálata szakaszos fermentációban gazdag tápoldatban, amelyhez a fotoautotróf *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*S. elongatus*) cianobaktériumot és a heterotróf *Escherichia coli* (*E. coli*) enterobaktériumot használtuk modellorganizmusként. Eredményeink elérése érdekében a következő vizsgálatokat tűztük ki célul:

1. Összehasonlítani a populáció fejlődését leíró technikákat, úgy mint sejtkoncentráció, optikai denzitás (OD), CFU és szárazanyag meghatározás, azért mert már ebből is számos *arte fact* származott.
2. Vizsgálni és jellemezni a szakaszos fermentáció során jelentkező alapvető bakteriális növekedési fázisokat (exponenciális, stacionárius és késői stacionárius fázis).
3. Kivizsgálni a szakirodalom által nyújtott magyarázatokat a stacionárius fázis kialakulására, úgy mint a tápanyaghiány, mérgeanyagok/szignálmolekulák felhalmozódása a tápoldatban és kontaktgtátlás.
4. Mivel megfigyeltük, hogy a bakteriális szaporodás kedvező feltételek mellett sem korlátlan, a sejtkoncentráció növekedése mindig lelassul és

beáll a stacionárius fázis, ezért kiemelt célunk ennek a natív stacionárius fázis kialakulásának a feltérképezése.

5. Vizsgálni a különböző fázisokra jellemző sejtek közötti fenotípusos eltéréseket.

Alkalmazott módszerek

- Felhasznált baktérium törzsek és nevelési feltételek

Kísérleteink során az *S. elongatus* PCC 7942 cianobaktériumot és az *E. coli* DH5alpha enterobaktériumot alkalmaztuk. A baktériumok folyadék kultúrában nőttek Erlenmeyer lombikokban 25–100 ml térfogatban. Az *S. elongatus*-t fotoautotróf módon neveltük BG-11 tápoldatban; a sejt kultúra 110 rpm sebességgel rázódtott 29°C hőmérsékleten és állandó fehér fényű 40 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású megvilágítás mellett (Alatron, Photon System Instruments PSI). Az *E. coli*-t heterotróf módon neveltük Luria-Bertani (LB) tápoldatban, valamint a tápanyaghiány vizsgálatához alkalmaztuk még a 2YT és SOC tápoldatot is; a sejt kultúra 200 rpm sebességen rázódtott 37°C hőmérsékleten.

- Optikai denzitás mérés

A kultúrák sejtsűrűségének, vagyis optikai denzitásának (OD) meghatározásához Nicolet Evolution 500 spektrofotométert használtunk. Az *S. elongatus* kultúrák OD mérését naponta egyszer végeztük 580, 730 és 750 nm-en történő fényelnyelés alapján. *E. coli* esetében óránként mértük az OD-t 600 nm-en.

- Sejtkoncentráció meghatározása

A sejtkoncentrációt sejtszámlálással határoztuk meg, Bürker kamra használatával mikroszkóp alatt.

- Szárazsúly meghatározás

Meghatározott mennyiségű sejt kultúrát (a sejtsűrűségtől függően 5–10 ml) szűrtünk át fecskendő segítségével ismert tömegű üveg mikroszálas szűrőn. A szűrőpapírokat ezután 80 °C-on szárítottuk tömegállandóságig, majd lemértük a tömegüket és kiszámoltuk a minták tömegét.

- Telepképző egységek számítása (CFU)

A telepképző egységek számát (CFU) agar tartalmú táptalajon történő szélesztéssel határoztuk meg. Mintavételezés után a sejtuszpenziókat steril tápoldatban sorozatosan hígítottuk, majd 0,1 ml térfogatot használtunk fel a szélesztéshez.

- Festék kizárásos módszer

Az élettelen sejtek jelöléséhez tripánkéket vagy propidium-jodidot alkalmaztunk a gyártó felhasználási útmutatását követve kisebb módosításokkal.

- Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópos felvételeket egy CoolLED PE-4000 fényforrással ellátott Nikon Eclipse Ni-E mikroszkóp segítségével készítettük.

- Proteomikai analízis

Az *S. elongatus* mintákat standard recept alapján homogenizáltuk, affinitás alapú tisztítás után, tripszines emésztést követően tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá (Thermo Orbitrap Fusion Lumos tömegspektrométer).

Eredmények

- Mindkét vizsgált bakteriális törzset gazdag tápoldatban nevelve, jelentős különbségeket figyelhettünk meg a populációnövekedés nyomonkövetése során a különböző mérési módszerek között (Ughy, Nagyapáti és mtsai, 2023).
- A sejtek pusztulását festékkizárásos módszerrel vizsgáltuk, és sem a korai, sem a késői stacionárius fázisban nem tapasztaltunk jelentős sejtpusztulást.
- Az eredményekből látható, hogy az exponenciális fázisban maximális sebességgel osztódik a populáció, majd a sebesség lassul, és egy átmeneti perióduson keresztül belép a stacionárius fázisba, amelyet állandó sejtszám jellemez. A növekedés azonban nem áll le, hanem a sejtek nyúlnak, ám nem osztódnak, majd egy idő után elveszítik telepképző képességüket, amely eredményeink alapján, a köztudattal ellentétben nem egyenlő a pusztulással, hanem egy ún. élő de nem osztódó fenotípust takar.
- Mivel a stacionárius fázis kialakulásának okaként leginkább az éhezést tartják, ezért vizsgáltam a tápanyagmennyiség kihatását a növekedésre, ami után azt tapasztaltam, hogy sem a szokásostól magasabb tápanyagkoncentráció, sem a rendszeresen frissített tápoldat nem eredményezett gyorsabb szaporodást, vagy magasabb sejtkoncentrációt a stacionárius fázisban. Ráadásul a populáció másodszor is képes ugyanolyan dinamikával felnőni az elhasznált a tápoldatban. A stacionárius állapot gazdag táptalajon/ tápfolyadékban is kialakul és nem tápanyaghiány vagy felhalmozódó méreganyagok/ szignálmolekulák jelenléte okozza.

- A kontaktgátlás lehetőségét is megvizsgáltuk, kísérletünk pedig azt bizonyította, hogy a stacionárius fázisú *S. elongatus* kultúra 30%-os, az *E. coli* pedig 70% hígítás ellenére sem indult osztódásnak, tehát nem kontaktgátlás okozza a stacionárius fázis kialakulását.
- Felfedeztük, hogy más egysejtű populációknál is létezik egy fajra jellemző sejtkoncentráció, amely felett nem indul be az osztódás inokulálást követően, és ezt minimális stacionárius sejtkoncentrációnak neveztük el (ang. minimal stationary cell concentration, MSCC). MSCC pontként a stacionárius sejtkoncentráció legalacsonyabb értékét tekintjük, amelynél a populáció még nem indul osztódásnak a friss leoltást követően.
- Megfigyeltük továbbá azt is, hogy a generációs idő nem állandó érték, hanem függ a sejtkoncentrációtól (Ughy, Nagyapáti és mtsai, 2023).
- Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a stressz hatások befolyásolhatják a populációnövekedést, mely során egyéb metabolikus változások is bekövetkeznek (Kanna és mtsai., 2021).
- A proteomikai vizsgálatok eredménye alapján meg tudunk különböztetni kifejezetten az egyes növekedési fázisokra jellemző fehérjéket. Ez arra enged következtetni, hogy a populáció növekedése során a sejtek folyamatos, genetikailag vezérelt differenciáción mennek át a következő séma alapján: $[Exp] \rightleftharpoons [Stac] \rightarrow [kései\ Stac]$. Az *S. elongatus* és *E. coli* vizsgálata által kapott eredmények közötti erős hasonlóságok miatt következtetéseinket általánosnak tekinthetjük a baktériumokra nézve (Ughy, Nagyapáti és mtsai, 2023).

Összegezve, az eredményeink alapján újra kell gondolni a bakteriális populáció növekedéséről kialakult képet. Csoportunk írta le először a prokarióták/ egysejtűek sejt differenciáción alapuló fejlődését zárt nevelési

rendszerben (Ughy, Nagypáti és mtsai., 2023). Felfedezésünk lényege tehát, hogy az ismert fázisok (exponenciális, stacionárius és késői stacionárius fázisok) alatt folyamatos bakteriális sejtdifferenciáció zajlik, amelynek végén egy terminálisan differenciált fenotípus fejlődik ki, aminek a telepképző készsége megszűnik ugyan, de a sejtek aktív anyagcserét folytatnak. Ezt bakteriális G0 állapotként jellemeztük. További vizsgálatok segíthetnek abban, hogy megtaláljuk a genetikai feket, amely a sejtosztódás szabályzásáért felelős, valamint melyek a bakteriális populáció differenciálódását irányítják.

Konklúzió

Főbb megállapításaink:

1. meghatároztuk, hogy a különböző detektálási módszerek mire alkalmasak (sejtkoncentráció, OD, CFU, szárazanyag);
2. egy tápanyagokban gazdag tápfolyadékban minden esetben kialakul a stacionárius állapot, tehát nem éhezés és nem toxin okozza a stacionárius állapotot;
3. a generációs idő nem állandó érték, folyamatosan változik a sejtsűrűség függvényében;
4. felfedeztük az általunk minimális stacionárius sejtkoncentrációnak nevezett koncentrációt (MSCC), ami fölött friss leoltást követően a sejtek még nem kezdenek el osztódni, csak alatta;
5. a sejtkoncentráció fontos tényező a sejtosztódás leállításához, önmagában azonban nem elég a stacionárius sejtkoncentráció beállításához;

6. proteomikai vizsgálatok bebizonyították, hogy a bakteriális sejtek a leoltást követően egy folyamatos sejtdifferenciáción mennek keresztül, melynek a végén terminálisan differenciálódott, osztódásra képtelen, de élő sejtek alakulnak ki;
7. a populációt elképzelhetjük egy virtuális szövetként, amelyben az osztódó sejtek bakteriális őssejteknek feleltethetők meg, a terminálisan differenciálódott sejtek pedig szomatikus sejteknek.

Summary

Understanding bacterial cell division and population growth is crucial not only from the perspective of basic research, but also to achieve advancements in medicine, industry, biotechnology, and environmental science. Though this topic has intrigued scientists for at least 200 years, many questions remain unanswered. One key mystery is how bacteria regulate their reproduction within a population — how population dynamics influence individual cell division.

The aim of our research was to investigate the growth and the formation of growth phases in batch culture of bacteria. Our model organisms were: *Synechococcus elongatus* PCC 7942 and *Escherichia coli*. The similarities observed between these two strains suggest the existence of fundamental principles governing prokaryotic and unicellular life.

Our main findings are:

1. we characterized the different detection methods, what are they exactly suitable for (cell concentration, OD, CFU, dry matter);
2. stationary state inevitably occurs even in a nutrient-rich medium, therefore, neither starvation nor toxins are not necessary to the stationary state;
3. the generation time is not a constant value, it changes continuously depending on the cell density;
4. we discovered a special inoculation concentration named minimal stationary cell concentration (MSCC), above which the cells do not commence dividing upon a fresh inoculation;

5. cell concentration is an important factor in the regulation of the population growth, but it is not sufficient itself to establish the stationary cell concentration;
6. proteomic studies have proven that bacterial cells are in a continuous cell differentiation following inoculation, which ends with a terminally differentiated, unable to divide, but living cells;
7. we suggest that a unicellular population can be considered as a virtual tissue, in which the dividing cells can be considered as bacterial stem cells, and the terminally differentiated cells are similar to the G0 somatic cells.

Publikációs lista

MTMT azonosítószám: **10081086**

Összesített impakt faktor: **11,73**

A disszertációban felhasznált közlemények:

Ughy, B. *, **Nagyapáti, S. ***, Lajkó, D. B., Letoha, T., Prohászka, A., Deeb, D., Dér, A., Pettkó-Szandtner, A., & Szilák, L. (2023). Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations. *Cells*, 12(10), 1430. doi: 10.3390/cells12101430. (IF: 5,1)

Kanna, S. D., Domonkos, I., Kóbori, T. O., Dergez, Á., Böde, K., **Nagyapáti, S.**, Zsiros, O., Ünneper, R., Nagy, G., Garab, G., Szilák, L., Solymosi, K., Kovács, L., & Ughy, B. (2021). Salt Stress Induces Paramylon Accumulation and Fine-Tuning of the Macro-Organization of Thylakoid Membranes in *Euglena gracilis* Cells. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi: 10.3389/fpls.2021.725699 (IF: 6,627)

* megosztott első szerzőség

Társszerzői nyilatkozatok:

A levelező szerző nyilatkozata

Nagyapáti Sarolta hozzájárulásáról a következő tudományos cikkhez:

Sai Divya Kanna, Ildikó Domonkos, Tímea Ottília Kóbori, Ágnes Dergez, Kinga Böde, **Sarolta Nagyapáti**, Ottó Zsiros, Renáta Ünneper, Gergely Nagy, Gyöző Garab, László Szilák, Katalin Solymosi, László Kovács, Bettina Ughy

Salt stress induces paramylon accumulation and fine-tuning of the macro-organization of thylakoid membranes in *Euglena gracilis* cells.

2021, *Frontiers in Plant Science*, 12:725699., doi: 10.3389/fpls.2021.725699. eCollection 2021.

Ezennel kijelentem, hogy Nagyapáti Sarolta társszerzőként jelentősen hozzájárult a cikkben leírt kísérletek előkészítéséhez és végrehajtásához, a kísérleti eredmények elemzéséhez.

A cikkhez kapcsolódó, a Nagyapáti Sarolta által a disszertációjában bemutatott eredmények nem használhatók fel más PhD cím megszerzéséhez.

Szeged, 2025.08.25

Dr Ughy Bettina

Tudományos főmunkatárs, Projekt vezető

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

A levelező szerzők nyilatkozata

Nagyapáti Sarolta hozzájárulásáról a következő tudományos cikkhez:

Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations.

Ughy B, **Nagyapáti S**, Lajkó DB, Letoha T, Prohászka Á, Deeb D, Dér A, Pettkó-Szandtner A, Szilák L.

Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations.

Cells. 2023 May 19;12(10):1430. doi: 10.3390/cells12101430.

Ezennel kijelentem, hogy Nagyapáti Sarolta, mint elsőszerző, jelentős mértékben hozzájárult a cikkben leírt kísérletek előkészítéséhez és végrehajtásához, a kísérleti eredmények elemzéséhez, valamint részben a cikk megírásához.

A cikkhez kapcsolódó, a Nagyapáti Sarolta által a disszertációjában bemutatott eredmények nem használhatók fel más PhD cím megszerzéséhez.

Szeged, 2025.08.25

Dr Ughy Bettina

Tudományos főmunkatárs, Projekt vezető

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Dr Szilák László

Cégvezető

Szilák Labor Kft.

PhD fokozat előtt álló társszerző:

Deeb Dima

PhD hallgató