

DISS. ETH NO. 21278

**Phenotypic heterogeneity in clonal bacterial populations –  
on origins and adaptive functions**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**MARKUS ARNOLDINI**

MSc ETH in Biology

born June 16<sup>th</sup>, 1985

Austrian citizen

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Ackermann, examiner  
Prof. Dr. Tobias Bollenbach, co-examiner  
Prof. Dr. John D. McKinney, co-examiner

2013

## Summary

Traditionally, differences between individuals belonging to the same species are explained by differences in their genes and the environments they live in. In microbiological research, working with populations of genetically identical bacteria growing in homogeneous environments is standard procedure. A great amount of knowledge, on bacteria but also on general biological principles, has been gained by treating such populations as homogeneous samples and measuring traits on the population level. However, drawing conclusions from such measurements is only valid under the implicit assumption that the measured trait is unimodally distributed in the population, and for a number of traits this assumption is wrong. Considering bacterial individuality generated by means other than genes and the environment – phenotypic heterogeneity – can lead to new insights in how bacterial communities work. This thesis is about the origins and functions of phenotypic heterogeneity.

One potential function of phenotypic heterogeneity is bet-hedging, the strategy of reducing temporal variance in fitness at the cost of a lower arithmetic mean fitness. In other words, bet-hedging is the strategy of not putting all eggs in one basket. We describe an example for bet-hedging in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, where a part of the population that expresses a certain set of virulence genes grows more slowly than the rest, but is in turn protected when antibiotics are added to the environment.

When bacteria use cellular responses to react to environmental stresses, bet-hedging can also be important; we show theoretically that bet-hedging, here meaning stochastic use of a costly stress response, can be adaptive when cells are exposed to fluctuating environments in which they perceive unreliable signals about the future environmental state.

A potential origin of phenotypic heterogeneity in bacteria is a cell's pole age. When a bacterial cell divides, one of the two emerging cells can be seen as an aging mother cell, inheriting the cell pole that is older, whereas the other cell can be seen as a rejuvenated daughter cell, inheriting the cell pole that was just formed in the previous division. We investigated an *Escherichia coli* strain carrying a mutation in a metabolic regulator, *csrA*. Cells carrying this mutation are only capable of dividing until a pole age of 4. We show that glycogen accumulates in old pole cells, and that these cells do not contain DNA, presumably due to spatial exclusion. The fact that mutations exist that affect cells only once they reach a certain pole age raises the question why wild type *E. coli* cells are capable of dividing more than 100 times; selection against mutations that render cells unable to divide at high pole ages is extremely weak.

To investigate phenotypic heterogeneity it is necessary to analyze single cells. Most commonly, this is done by light microscopy and flow cytometry. Microscopy allows the observation of a small number of individual cells over time, whereas flow cytometry allows analysis of a great number of cells at a single time point. We show proof of principle experiments where flow cytometry is used to analyze highly dynamic processes in bacterial populations in real time.

Overall, in this thesis I provide theoretical and experimental evidence confirming the importance of phenotypic heterogeneity in bacteria. The fact that phenotypic heterogeneity plays a role in *Salmonella* infections might have medical implications; the theoretical prediction that bet-hedging in stress responses can be beneficial awaits experimental testing; and our finding that a mutation exists that stops bacteria from dividing at a certain pole age raises the question what benefit a bacterial population gains by keeping cells with very high pole ages.

## Zusammenfassung

Traditionell werden Unterschiede zwischen Individuen, die zur selben Art gehören, durch Unterschiede in ihren Genen und in der Umwelt in der sie leben erklärt. In der mikrobiologischen Forschung ist die Arbeit mit genetisch identischen bakteriellen Populationen, die in derselben Umwelt wachsen, der Standard. Eine grosse Menge an Wissen, über Bakterien aber auch über allgemeine biologische Prinzipien, ist gewonnen worden, indem man solche Populationen als homogene Proben behandelt und deren Eigenschaften auf Populationsebene gemessen hat. Allerdings ist es nur zulässig, Schlüsse aus solchen Messungen zu ziehen, wenn man implizit annimmt, dass die gemessene Eigenschaft in der untersuchten Population unimodal verteilt ist. Bei einigen Eigenschaften ist diese Annahme falsch. Wenn man bakterielle Individualität, die von anderen Mechanismen als den Genen und der Umwelt generiert wurde – phänotypische Heterogenität – in Betracht zieht, kann das zum Gewinn neuer Erkenntnisse darüber führen, wie bakterielle Gemeinschaften funktionieren. Diese Arbeit behandelt die Ursprünge und Funktionen von phänotypischer Heterogenität.

Eine mögliche Funktion von phänotypischer Heterogenität ist bet-hedging, eine Strategie, bei der die Varianz in der Fitness über die Zeit zu Lasten des arithmetischen Mittels der Fitness reduziert wird. In anderen Worten ist bet-hedging die Strategie, nicht alles auf eine Karte zu setzen. Wir beschreiben ein Beispiel für bet-hedging in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, wo ein Teil der Population, der ein bestimmtes Set von Virulenzgenen exprimiert, langsam wächst, dafür aber geschützt ist wenn Antibiotika zur Umwelt hinzugefügt werden.

Auch wenn Bakterien zelluläre Antworten verwenden, um auf Umweltstress zu reagieren, kann bet-hedging wichtig sein; wir zeigen theoretisch, dass bet-hedging, in diesem Fall im Sinn der stochastischen Verwendung einer kostspieligen Stressantwort, adaptiv sein kann, wenn Zellen fluktuierenden Umwelten ausgesetzt sind, in denen sie unverlässliche Signale über den zukünftigen Zustand der Umwelt empfangen.

Ein möglicher Ursprung von phänotypischer Heterogenität in Bakterien ist das Polalter einer Zelle. Wenn sich eine bakterielle Zelle teilt kann eine der dabei entstehenden Zellen als alternde Mutterzelle gesehen werden, die den Zellpol erbt der älter ist, während die andere Zelle als verjüngte Tochterzelle gesehen werden kann, die den Zellpol erbt, der erst in der letzten Teilung gebildet wurde. Wir haben einen *Escherichia coli* Stamm untersucht, der eine Mutation in einem metabolischen Regulator, *csrA*, trägt. Zellen, die diese Mutation tragen, können sich nur teilen bis sie ein Polalter von 4 erreichen. Wir zeigen, dass sich Glykogen in Zellen mit hohem Polalter anhäuft, und dass diese Zellen keine DNS

mehr enthalten, vermutlich aufgrund von räumlicher Ausschliessung. Die Tatsache, dass Mutationen existieren, die Zellen erst nach dem Erreichen eines bestimmten Polalters betreffen, wirft die Frage auf, weshalb Wildtyp *E. coli* Zellen sich mehr als 100 mal teilen können; die Selektion gegen Mutationen, die es für Zellen unmöglich machen, sich noch nach Erreichen eines hohen Polalters zu teilen, ist extrem schwach.

Um phänotypische Heterogenität zu untersuchen ist es notwendig, einzelne Zellen zu analysieren. Üblicherweise wird das mit Lichtmikroskopie und Durchflusszytometrie gemacht. Mikroskopie erlaubt die Beobachtung einer kleinen Anzahl individueller Zellen über die Zeit, während Durchflusszytometrie es erlaubt, eine grosse Anzahl Zellen an einem Zeitpunkt zu analysieren. Wir zeigen in einer Reihe von Experimenten dass man über Durchflusszytometrie äusserst dynamische biologische Prozesse, die sich in bakteriellen Populationen abspielen, in Echtzeit messen kann.

In dieser Arbeit zeige ich theoretische und experimentelle Hinweise darauf, dass phänotypische Heterogenität für bakterielle Populationen wichtig ist. Die Tatsache, dass phänotypische Heterogenität in Infektionen mit *Salmonella* eine Rolle spielt, könnte medizinische Bedeutung haben; die theoretische Voraussage, dass bet-hedging in Stressantworten nützlich sein kann, muss noch experimentell bestätigt werden; und unsere Entdeckung, dass eine Mutation existiert, die Bakterien davon abhält sich nach Erreichen eines bestimmten Polalters weiter zu teilen, wirft die Frage auf, welchen Nutzen bakterielle Populationen daraus ziehen, Zellen mit hohen Polaltern zu behalten.