

**TARTU ÜLIKOOL  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL**

MARI-LIIS OTS

**Polühüdrosüalkanoaadi süntees bakteris *Pseudomonas*  
*mandelii* PC17**

Magistritöö

Juhendajad: Allan Nurk, *Ph.D*  
Oliver Meikar, *M.Sc*  
Andres Mäe, *Ph.D*

TARTU 2007

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>- 7 -</b>
1.1 POLÜHÜDROKSÜALKANOAADID.....	- 7 -
1.1.1 Biokeemilised omadused.....	- 7 -
1.1.2 Biofüüsikalised omadused.....	- 8 -
1.1.3 PHA-de kasutusvaldkonnad.....	- 9 -
1.2 PHA SÜNTEES .....	- 10 -
1.2.1 PHB süntees.....	- 11 -
1.2.2 Mcl-PHA süntees .....	- 11 -
1.2.3 PHA sünteesid .....	- 13 -
1.2.4 PHA sünteesi regulatsioon.....	- 15 -
1.2.5 Kasvuseoseline PHA süntees .....	- 16 -
<b>TÖÖ EESMÄRGID</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>2 MATERJAL JA METOODIKA</b> .....	<b>- 19 -</b>
2.1 BAKTERITÜVED JA VEKTORID .....	- 19 -
2.2 SÖÖTMED JA KASVUTINGIMUSED .....	- 19 -
2.3 PHA SÜNTEESI JÄLGIMINE AJAS.....	- 19 -
2.4 NUKLEIINHAPETE ERALDAMINE .....	- 20 -
2.4.1 Genoomse DNA eraldamine .....	- 20 -
2.4.2 Plasmiidse DNA eraldamine.....	- 20 -
2.4.3 RNA eraldamine.....	- 21 -
2.5 AGAROOSGEELELEKTROFOREES .....	- 21 -
2.6 RESTRIKTSIOON JA LIGEERIMINE.....	- 21 -
2.7 DNA FRAGMENTIDE GEELIST PUHASTAMINE .....	- 22 -
2.8 POLÜMERAASI AHELREAKTSIOON (PCR) .....	- 22 -
2.9 PÖÖRDTRANSKRIPTSIOON-PCR (RT-PCR) .....	- 22 -
2.10 TÖÖS KASUTATUD PRAIMERID .....	- 23 -
2.11 BAKTERITE ELEKTROPORATSIOON .....	- 23 -
2.12 DNA-DNA HÜBRIDISATSIOON .....	- 24 -
2.12.1 Radioaktiivse proovi valmistamine .....	- 24 -
2.12.2 Hübridisatsioon .....	- 24 -
2.13 SEKVENEERIMINE.....	- 25 -
2.13.1 PCR-produkti eelnev töötlus .....	- 25 -
2.13.2 Sekveneerimine .....	- 25 -
2.14 PHA ANALÜÜSIMEETODID .....	- 26 -
2.14.1 PHA eraldamine .....	- 26 -
2.14.2 PHA sisalduse määramine bakterite kuivkaalust.....	- 26 -
2.14.3 PHA metanoliüüs .....	- 26 -
2.14.4 PHA fraksioneerimine atsetoonis .....	- 26 -
2.14.5 Metüül-3-hüdroksüalkanoaatide GC-FID analüüs.....	- 27 -
2.15 KASUTATUD ARVUTIPROGRAMMID JA ANDMEBAASID .....	- 27 -

<b>3</b>	<b>TULEMUSED JA ARUTELU.....</b>	<b>- 28 -</b>
3.1	PC17 POOLT SÜNTEESITUD PHA FRAKTSIONEERIMINE ATSETOONIS.....	- 28 -
3.2	<i>P. MANDELII</i> PC17 PHB SÜNNTAASI KLONEERIMINE JA SEKVENEERIMINE.....	- 29 -
	3.2.1 Hübriidisatsioonisondi valmistamine.....	- 29 -
	3.2.2 PC17 phbC kloneerimine ja sekveneerimine .....	- 29 -
3.3	PC17 PHBC VÕRDLEMINE TEISTE PHBC-DEGA .....	- 30 -
3.4	PHA MONOMEERSE KOOSTISE MUUTUMINE KASVATUSE VÄLTEL .....	- 31 -
	3.4.1 Kasvuseosiselt sünteesitud PHA monomeerne koostis glükoosil .....	- 31 -
	3.4.2 Kasvuseosiselt sünteesitud PHA monomeerne koostis oktanoaadil.....	- 33 -
3.5	PHA SÜNNTAASIDE EKSPRESSIOON PC17-S .....	- 34 -
3.6	KASVUSEOSELISEST PHA SÜNNTAESIST PC17-S .....	- 35 -
	<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>- 37 -</b>
	<b>SUMMARY.....</b>	<b>- 38 -</b>
	<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>- 40 -</b>
	<b>LISA 1 .....</b>	<b>- 47 -</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

<b>3HB</b>	3-hüdroksübutüraat
<b>3HD</b>	3-hüdroksüdekanoaat
<b>3HDD</b>	3-hüdroksüdodekanoaat
<b>3HH</b>	3-hüdroksüheksanoaat
<b>3HO</b>	3-hüdroksüoktanoaat
<b>3HV</b>	3-hüdroksüvaleriaat
<b>4HB</b>	4-hüdroksübutüraat
<b>AcCoA</b>	atsetüül-koensüüm A
<b>ACP</b>	atsüülrühma kandev valk rasvhapete biosünteesis ( <i>acyl carrier protein</i> )
<b>bp</b>	aluspaar ( <i>base pair</i> )
<b>CDW</b>	raku kuivmass ( <i>cell dry weight</i> )
<b>CoA</b>	koensüüm A
<b>dNTP</b>	desoksünukleosiidtrifosfaat
<b>EDTA</b>	etüleendiamiintetraatsetaat
<b>FID</b>	leekionisatsioonidetektor
<b>GC</b>	gaasikromatograaf
<b>IPTG</b>	isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid
<b>KAc</b>	kaaliumatsetaat
<b>LB</b>	Luria-Bertani sööde
<b>mcl-PHA</b>	keskmise ahelapikkusega polühüdroksüalkanoaat ( <i>medium-chain-length polyhydroxyalkanoate</i> )
<b>NaAc</b>	naatriumatsetaat
<b>PCR</b>	polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PHA</b>	polühüdroksüalkanoaat
<b>PHB</b>	polü-3-hüdroksübutüraat
<b>PHV</b>	polühüdroksüvaleriaat
<b>RT-PCR</b>	pöördtranskriptaas-PCR ( <i>reverse-transcriptase PCR</i> )
<b>SAP</b>	kreveti aluseline fosfataas ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )
<b>scl-PHA</b>	lühikese ahelapikkusega polühüdroksüalkanoaat ( <i>short-chain-length polyhydroxyalkanoate</i> )
<b>SDS</b>	naatriumdodetsüülsulfaat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )

<b>TAE</b>	Tris-atsetaat EDTA puhver
<b>TE</b>	Tris/EDTA puhver
<b>Tris</b>	trishüdrosümetüülaminmetaan
<b>U</b>	ühik ( <i>unit</i> )
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-kloro-3-indolüül- $\beta$ -galaktopüranosiid

## SISSEJUHATUS

Polühüdrosüalalkanoaadid (PHA-d) on bakteriaalsed varuained, mida nii gram-negatiivsed kui ka -positiivsed mikroorganismid sünteesivad olukorras, kus keskkonnas on piisaval hulgal süsinikku, kuid napib teisi kasvuks vajalikke makroelemente nagu lämmastik, hapnik, fosfor või väävel. Oma struktuurilt on nad polüestrid, mille monomeeridena on kirjeldatud üle saja erineva hüdroksüalalkanoaadi. Monomeeriahela pikkuse alusel liigitatakse PHA-d lühikese ja keskmise ahelapikkusega PHA-deks. Rakus talletub polümeer inklusioonkehakestena, mille osakaal raku kuivmassist võib ulatuda 90 protsendini. Toitainete limitatsiooni kadumisel lagundatakse PHA süsiniku ja reduktiivjõu saamiseks.

Inimeste seisukohalt on PHA-d potentsiaalsed keskkonnasõbralikud bioplastid, mida erinevalt tänapäeval kasutatavatest petroplastidest valmistatakse taastuvast toormest ning mis on looduses täielikult lagunevad.

*Pseudomonas mandelii* PC17 on efektiivse ning omapärase PHA sünteesi-aparaadiga bakter, keda on meie rühmas juba mõnda aega uuritud. On välja selgitatud, et ta suudab PHA-d sünteesida nii glükoosist kui ka alkanooatidest, kusjuures PHA moodustab raku kuivmassist üle 60% ning sünteesitud PHA sisaldab alati nii lühikese kui ka keskmise ahelapikkusega monomeere. Glükoosist suudab PC17 PHA-d sünteesida isegi mitte-limiteerivates tingimustes, paralleelselt rakujagunemisega. Ühelt poolt on see info heitnud valgust PC17 PHA metabolismile, teiselt poolt aga tekitanud ka hulga uusi küsimusi. Kas segatüüpi PHA sünteesi eest vastutavad ebatavaliselt laia substraadispetsiifikaga PHA süntaasid või esineb PC17 genoomis mitu keskmise või lühikese ahelapikkusega PHA sünteesile spetsialiseerunud ensüümi? Kas PC17 sünteesib mittelimiteerivates tingimustes PHA-d ka oktanoaadil, kus võrreldes glükoosiga on PHA sünteesi seisukohalt olulised teistsugused metabolismirajad? Kas ka kasvuseoseliselt sünteesitud PHA sisaldab mõlema ahelapikkusega monomeere? Nendele küsimustele püüabki käesolev magistritöö vastuseid leida.

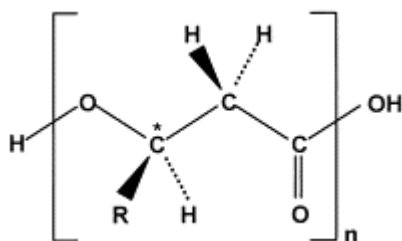
Täna oma juhendajaid, Dr. Viljar Pihli abi eest gaasikromatograafilise analüüsi läbiviimisel ning kõiki teisi, kes olid abiks käesoleva magistritöö valmimisel.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Polühüdrosüalcanoamidid

### 1.1.1 Biokeemilised omadused

Polühüdrosüalcanoamidid (PHA-d) on bakteriaalsed varuained, mida kasutatakse süsiniku ning reaktiivjõu talletamiseks olukorras, kus keskkonnas leidub piisavalt süsinikku, kuid napib teisi kasvuks vajalikke makroelemente nagu lämmastik, fosfor, väävel või hapnik (Jendrossek ja Handrick, 2002; Salehizadeh ja Van Loosdrecht, 2004). Oma keemiliselt struktuurilt on nad polüestrid, mille monomeerideks on reeglina (*R*)-3-hüdrosüürasvhapped (joonis 1). Ahel pikeneb, kui ühe monomeeri karboksüülrühm moodustab estersideme teise monomeeri hüdroksüülrühmaga (Madison ja Huisman, 1999).



**JOONIS 1: PHA keemiline struktuur.** Tärniga (\*) on märgitud kiraalne süsinik, mis on alati (*R*) konfiguratsioonis. Tähega R on joonisel märgitud kõrvalahel, milleks polühüdrosübutüraadi (PHB) puhul on metüülrühm, polühüdrosüvaleriaadi (PHV) puhul etüülrühm ning keskmise ahelapikkusega PHA (mcl-PHA) puhul 3-11 C aatomist koosnev rühm (Zinn *et al.*, 2001).

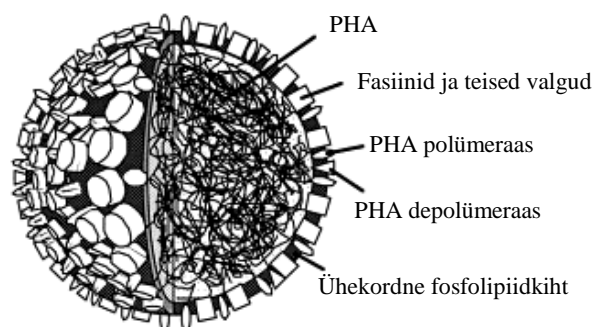
Praeguseks on kirjeldatud umbes 150 erinevat monomeeri, näiteks võivad kõrvalahelad olla küllastumata, hargnevad, aromaatsed, sisaldada hüdroksü-, fluoro-, kloro-, bromo- või tsüanorühmi (Jendrossek ja Handrick, 2002; Rehm, 2003). Monomeerideks võivad olla ka 4-, 5- või 6-hüdrosüürasvhapped, kuid seda tuleb ette harvem (Madison ja Huisman, 1999). PHA-de liigitamisel võetakse aluseks monomeeri ahela pikkus, millele vastavalt jagunevad nad kaheks – lühikese ahelapikkusega e. scl-PHA (3-5 C aatomit) ning keskmise ahelapikkusega e. mcl-PHA (6-14 C aatomit) (Jendrossek ja Handrick, 2002; Reddy *et al.*, 2003).

PHA-de vastu tuntakse üha suuremat huvi sellepärast, et neis nähakse ühte võimalikku keemiliselt sünteesitud plastide asendajat. Sarnaste mehhaaniliste omaduste

juures on nende eelisteks tavapäraste plastide ees taastuval toormel põhinemine ning biolagundatavus, ilma et tekiks keskkonnale kahjulikke kõrvalprodukte (Rehm, 2006). Aeroobsetes tingimustes lõhustatakse PHA lõpuks süsihappegaasiks ja veeks, anaeroobsetes tingimustes süsihappegaasiks ja metaaniks (Reddy *et al.*, 2003). Polümeeri biolagundatavust mõjutavad nii keskkonnatingimused (temperatuur, niiskus, pH, teiste bakteritele kättesaadavate toitainete olemasolu) kui ka materjali enda omadused (keemiline koostis, kristallilise faasi osakaal, lisaained) (Sudesh *et al.*, 2000). Sõltuvalt neist faktoritest kulub polühüdrosübutüraadist (PHB-st) valmistatud eseme täielikuks lagunemiseks aega mõnest kuust kuni aasta-kaheni (Madison ja Huisman, 1999).

### 1.1.2 Biofüüsikalised omadused

PHA esineb kahes erinevas biofüüsikalises olekus. Raku sees on PHA amorfne, ahelad on liikuvad, paiknevad ruumis ebakorrapäraselt ning moodustavad graanuleid, mida ümbritseb fosfolipiididest ja valkudest koosnev kiht (Handrick *et al.*, 2001). See võimaldab PHA-sid raku tuvastada lipofiilsete värvidega, näiteks fluorestseeruva Niiluse punasega (Gorenflo *et al.*, 1999). Valkudest seonduvad graanulitega PHA polümeraasid, depolümeraasid ja fasiinid (joonis 2). Viimased on väikesed amfipaatsed valgud, mis on seotud graanulite tekke ning stabiliseerimisega (Jurasek ja Marchessault, 2004). Rakust väljaspool võtavad polümeeriahelad korrapärase, vasakpoolse heeliksi kujulise konformatsiooni ning PHA kristalliseerub (Handrick *et al.*, 2001).



**JOONIS 2: PHA graanul.** Selle sisemuses on PHA molekulid, mis on ümbritsetud ühekordse fosfolipiididest kihiga. Valkudest leidub PHA graanulit ümbritsevas kihis PHA polümeraase, PHA depolümeraase, fasiine ning vähesel määral ka teadmata funktsiooniga valke (Zinn *et al.*, 2001).



PHA-de molekulmass jääb 200-3000 kDa vahele (Zinn *et al.*, 2001). Oma mehhaanilistelt omadustelt sarnanevad nad päris palju petroplastidele, mis võimaldab PHA-sid kasutada biolaguneva plasti tootmisel (Sudesh *et al.*, 2000). PHB on võrdlemisi jäik ning rabe materjal, ent kui lisada ka 3-hüdroksüvaleriaadi (3HV) monomeere, langeb kristallilise faasi osakaal umbes 50%-ni ja polümeer muutub elastsemaks (Madison ja Huisman, 1999). Mcl-PHA-d on veelgi ebakorrapärasema struktuuriga ning painduvamad (Witholt ja Kessler, 1999). Kõrvalahela pikkus ning keemiline koostis mõjutavad PHA füüsikalisi omadusi päris palju, seega on erinevaid monomeere omavahel kombineerides võimalik saada väga mitmekülsete omadustega keskkonnasõbralikke plaste (Madison ja Huisman, 1999).

### **1.1.3 PHA-de kasutusvaldkonnad**

PHA-de kasutusvaldkondi on mitu. Esmalt nähti nendes võimalikku keemiliselt sünteesitud plastide biolagunevat asendajat. PHA-d hakati tööstuslikult tootma kaheksakümnendate lõpus ning hoolimata vahepealse aja jooksul avastatud uutest erinevatest monomeeridest on siiani tootmises ainult PHB ning 3-hüdroksübutüraadi (3HB) ja 3HV kopolümeer (Dias *et al.*, 2006). Saadud plastist on tehtud näiteks kreemipurke, šampoonipudeleid, kilekotte, ühekordseid pardleid, pastapliiatseid, PHA-st tehtud õhukest kilet kasutatakse ka mähkmetes (Madison ja Huisman, 1999; Reddy *et al.*, 2003). Jaapanis uuritakse võimalusi PHA kasutamiseks kalastusvahendite tootmisel, mis merevees aja jooksul laguneksid (Kasuya *et al.*, 2000).

Teiseks oluliseks PHA kasutusvaldkonnaks on meditsiin. PHA ja tema laguproduktid ei ole inimorganismile kahjulikud, (R)-3-hüdroksübutüürhape on vere normaalne koostisosa. Seega on PHA-d võimalik kasutada ravimikandjatena, haavaõmblusniitides, luukruvides, maatriksina erinevate kudede vigastuste ravimisel, südameklappide valmistamisel, kontrastainetena tomograafia- ja ultraheliuuringutel jm. Oma kristallilisuse tõttu laguneb PHB organismis suhteliselt aeglaselt, seepärast uuritakse praegusel ajal rohkem erinevate kopolümeeride ning mcl-PHA kasutusvõimalusi, kuna nendes on kristallilise faasi osakaal väiksem (Zinn *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2006).

4-hüdroksübutüraat (4HB), mis esineb samuti PHA koostises, on inimese ajukoos tavaline metaboliit. Seda on võimalik kasutada anesteetikumina, narkolepsia, alkoholi- või nikotiinisõltuvuse raviks. Teoreetiliselt on võimalik sünteesida 4HB-d sisaldav PHA film

ning viia see organismi, kus ravim aeglaselt vabaneks, kuid põhjalikumaid kliinilisi uuringuid pole selles vallas veel tehtud (Sudesh *et al.*, 2000).

PHA lagunemisel tekkivad monomeerid leiavad kasutamist ka keemiatööstuses. Kuna polümeeriahelasse lisatakse ainult (*R*)-konfiguratsioonis olevaid üksusi, tekivad lagunemisel ainult ühte tüüpi enantiomeerid (Witholt ja Kessler, 1999).  $\beta$ -hüdrosühapete estritest ning nende derivaatidest saab teha biolagunevaid lahusteid (Madison ja Huisman, 1999).

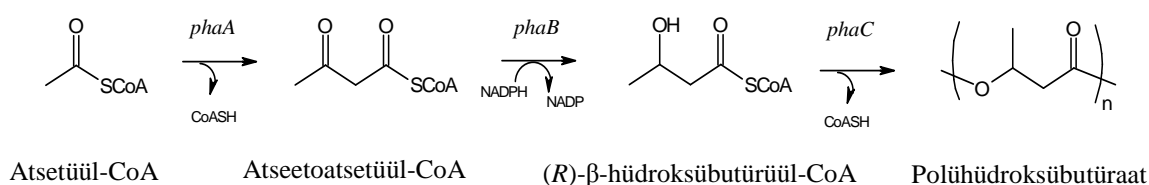
PHA plasti miinus võrreldes keemilise plastiga on tema kõrge hind. Looduslikku tootjat *Ralstonia eutropha*'t kasutades tuleb plast koguni 18 korda kallim (umbes 16 \$/kg). Transgeense *Escherichia coli*'ga saab seda vahet neli korda vähendada, kuid konkurentsivõime tagamiseks peaks plasti omahind veelgi madalam olema (alla 1\$/kg) (Reddy *et al.*, 2003). Kulused aitaks vähendada transgeensete taimede loomine ja kasutamine. Laborites on seda tehtud, kuid võrreldes bakteritega on nende tootlikkus veel madal (Khanna ja Srivastava, 2005). Olulise osa hinnast moodustab ka substraat, seega uuritakse võimalusi PHA sünteesimiseks melassist, vadakust, hemitselluloosist ning teistest tööstuslikest või põllumajanduslikest kõrvalproduktidest (Dias *et al.*, 2006; Keenan *et al.*, 2006)

## 1.2 PHA süntees

Nagu eelnevalt mainitud, sünteesivad bakterid PHA-d siis, kui kasvukeskkonnas on süsinikuallika liig, kuid napib selliseid kasvuks vajalikke makroelemente nagu lämmastik, fosfor, väävel või hapnik (Jendrossek ja Handrick, 2002; Salehizadeh ja Van Loosdrecht, 2004). PHA osakaal raku kuivmassist võib ulatuda kuni 90%-ni (Dias *et al.*, 2006). Sünteesivõime on looduses laialt levinud, nii bakterite kui ka arhede (sugukonna *Halobacteriaceae* mõned liigid) hulgas (Burns *et al.*, 2007; Koller *et al.*, 2007). Seetõttu on aja jooksul välja kujunenud mitmeid erinevaid radu PHA sünteesiks. Võtmeensüümiks on alati PHA polümeraas, varieeruvad ainult seda prekursoritega varustavad metaboolsed rajad (Witholt ja Kessler, 1999). Peale bakteriliigi sõltub polümeeri koostis ka süsinikuallikast, polümeraasi spetsiifikast ning parasjagu aktiivsetest metabolismiradadest raku (Matsusaki *et al.*, 1998; Hein *et al.*, 2002; Hoffmann ja Rehm, 2004).

### 1.2.1 PHB süntees

Uuritui PHA, polühüdrosübutüraadi sünteesirajas osalevad peale polümeraasi veel kaks ensüümi (joonis 3). Esmalt katalüüsib  $\beta$ -ketoatsüül-CoA tiolaas (PhaA ehk PhbA) kahe atsetüül-CoA (AcCoA) molekuli liitumist atseetoatsetüül-CoA-ks. Järgmisena redutseeritakse see NADPH-sõltuva atseetoatsetüül-CoA reduktaasi (PhaB ehk PhbB) poolt (*R*)-3-hüdrosübutüürüül-CoA-ks, mis ongi polümeraasi substraadiks (Reddy *et al.*, 2003; Rehm, 2006).



**JOONIS 3: PHB süntees.**

### 1.2.2 Mcl-PHA süntees

Mcl-PHA sünteesivõime on iseloomulik just rRNA I homoloogsusgrupi pseudomonaadidele (Zhang *et al.*, 2001; Hein *et al.*, 2002). Sõltuvalt substraadist saadakse prekursoreid mcl-PHA sünteesiks erinevatest radadest (joonis 4):

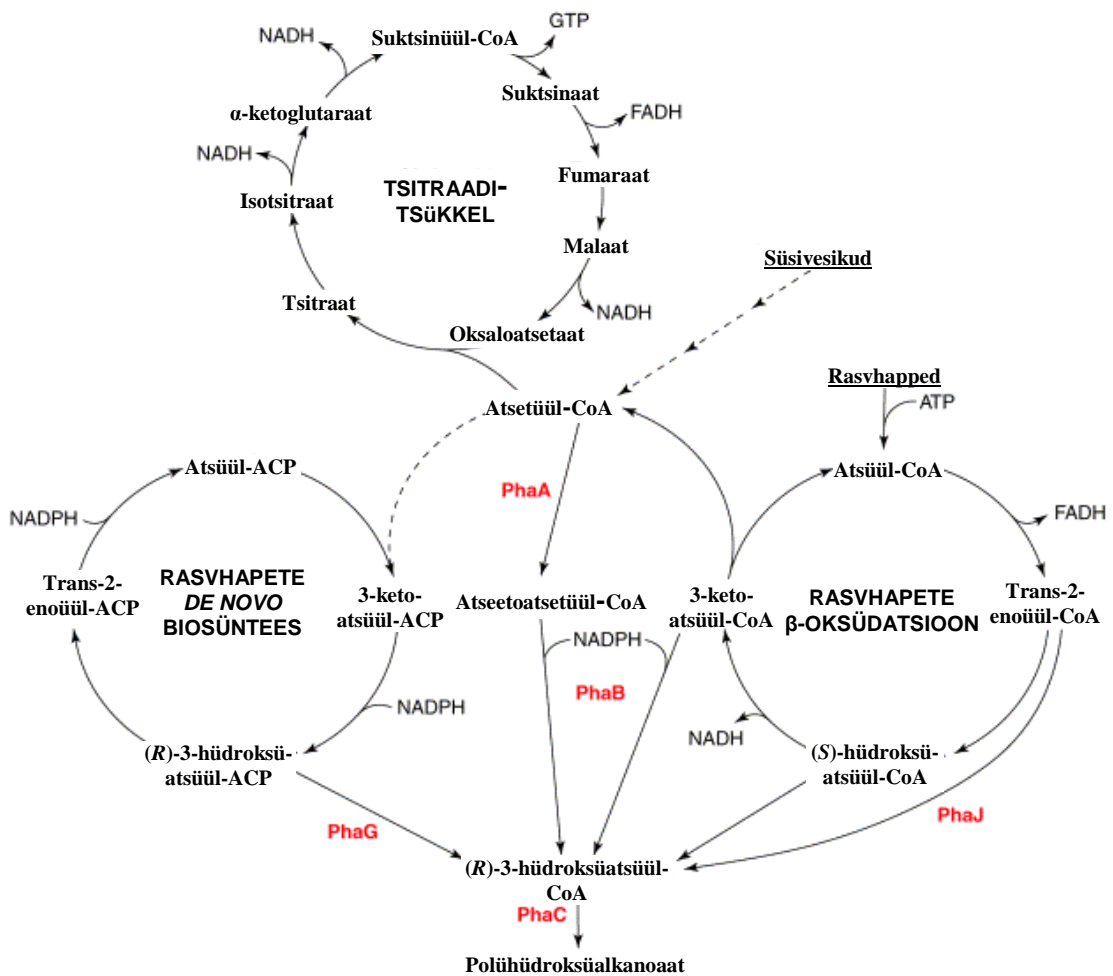
- 1) atsüül-CoA pikendamine üle AcCoA molekuli(de). Seda on kirjeldatud juhul, kui substraadiks on heksanoaat (Huijberts *et al.*, 1994)
- 2) rasvahapete  $\beta$ -oksüdatsioonirada
- 3) rasvahapete *de novo* biosünteesirada

Rasvahapete  $\beta$ -oksüdatsioonirajast saadakse monomeere siis, kui süsinikuallikaks on rasvhapped, alkeenid või alkaanid. Seda kinnitavad katsed, kus PHA süntees nimetatud ainetest peatatakse akrüülhappega, mis on rasvahapete  $\beta$ -oksüdatsiooni blokaator (Huijberts *et al.*, 1994). Samuti on polümeeri struktuur, täpsemalt monomeeri kõrvalahela pikkus nende ühendite puhul otseses sõltuvuses kasvusubstraadist (kas sama pikk või paarisarvuliste ühikute võrra lühem; Madison ja Huisman 1999). Kuna taoliste süsinikuallikate struktuur peegeldub ka PHA monomeerides, nimetatakse antud substraate *related carbon sources* ehk sarnasteks süsinikuallikateks.

Rasvahapete  $\beta$ -oksüdatsiooni vaheproduktideks on *trans*-2-enoüül-CoA, (*S*)-3-hüdrosüatsüül-CoA ja 3-ketoatsüül-CoA (Garrett ja Grisham 1995). Ükski neist kolmest pole PHA süntaasile otseseks substraadiks. Järelikult peab eksisteerima mehhanism, mis

ühendab omavahel rasvahapete  $\beta$ -oksüdatsiooni- ja PHA sünteesiraja. See, milline neist kolmest vaheühendist konverteeritakse PhaC substraadiks, (*R*)-3-hüdroksüatsüül-CoA-ks, sõltub bakteritüvest (Steinbuchel ja Lütke-Eversloh, 2003). Iga vaheühendi jaoks on oma spetsiifiline ensüüm (joonis 4):

1) Hüdrataaside (mida kodeerib *phaJ*) substraadiks on trans-2-enoüül-CoA ning sellist ensüümi on kirjeldatud organismidel *Aeromonas caviae* (Fukui ja Doi, 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (Tsuge *et al.*, 2000), *Pseudomonas putida* ja *Pseudomonas oleovorans* (Fiedler *et al.*, 2002).



**JOONIS 4: PHA metabolismi seotus teiste metabolismiradadega rakus.** Lühendid: PhaA –  $\beta$ -ketotiolaas; PhaB – (*R*)-3-ketoatsüül-CoA reduktaas; PhaC – PHA süntaas; PhaG – (*R*)-3-hüdroksüatsüül-ACP:CoA transatsülaas; PhaJ – enoüül-CoA hüdrataas. Katkendlike joontega on tähistatud reaktsioonid, mille vaheetappe pole joonisel näidatud (Aldor ja Keasling, 2003).

2) Epimeraasid konverteerivad (*S*) konfiguratsioonis oleva 3-hüdroksüatsüül-CoA (*R*) konfiguratsiooni (Madison ja Huisman, 1999).

3) 3-ketoatsüül-CoA reduktaasid redutseerivad 3-ketoatsüül-CoA 3-hüdroksüatsüül-CoA-ks (Madison ja Huisman, 1999).

Kui substraadiks on suhkrud, etanool või ka atsetaat, kasutatakse mcl-PHA prekursoritena rasvhapete biosünteesi vaheühendeid. Seda on tõestatud keruleniini (rasvhapete biosünteesi blokaator) inhibeeriva toimega PHA sünteesile glükoosist (Huijberts *et al.*, 1994), samuti temperatuurikatsetega, kus madalamatel temperatuuridel suurenes küllastumata rasvhapete hulk nii mebraanilipiidides kui ka PHA-s (Huijberts *et al.*, 1992). Enne rasvhapete biosünteesiratta suunamist konverteeritakse söötmes olnud suhkur AcCoA-ks. Seetõttu pole PHA struktuur substraadi struktuuriga seotud, millest tulenevalt nimetatakse süsivesikuid (ka etanooli ja atsetaati) *non-related carbon sources* ehk mitesarnasteks süsinikuallikateks.

PHA sünteesil sellistest ühenditest on võtmeensüümiks PhaG – atsüültransferaas, mis kannab hüdroksüatsüüljäägi ACP-lt (*acyl carrier protein*) üle CoA-le, teisisõnu vahendab rasvhapete biosünteesiraja intermediaate PHA süntaasile (Rehm *et al.*, 1998). Organismid, kellel *phaG* on muteerunud või puudub hoopis, pole võimelised mitesarnastest süsinikuallikatest PHA-d tootma, selline on näiteks *Pseudomonas oleovorans* GPo1 (Timm ja Steinbuchel, 1990; Hoffmann *et al.*, 2000).

### **1.2.3 PHA süntaasid**

Substraadispetsiifika, primaarstruktuuri ja subühikute arvu põhjal jagatakse PHA süntaasid nelja rühma (Rehm, 2003):

**Klass I** – ühest subühikust koosnevad valgud, mille substraadiks on 3-5 C aatomist koosnevad (*R*)-3-hüdroksürasvhapped. Asuvad enamasti *phbA* ja *phbB*-ga ühes operonis (joonis 5). Tüüpiline esindaja – *R. eutropha* (Peoples ja Sinskey, 1989).

**Klass II** – siia kuuluvad PHA süntaasid, mille substraadiks on 6-14süsinikulised (*R*)-3-hüdroksürasvhapped. Seda tüüpi süntaasid on iseloomulikud pseudomonaadidele. Klass II süntaase on alati kaks (PhaC1 ja PhaC2) ning nad on 50-60% ulatuses identsed. Koos rakusisese PHA depolümeraasi (PhaZ) ning teadmata ülesannet täitva valguga PhaD moodustavad nad operoni (joonis 5; Timm ja Steinbuchel 1992).

PhaC1 ja PhaC2 panus polümeeri sünteesi pole päris võrdne. *Pseudomonas mendocina*'s on peamine PHA süntaas PhaC1. Inaktiveeritud PhaC2-ga tüvi ei erinenud

sünteesitud PHA hulga poolest oluliselt metsiktüübist, samas kui PhaC1 *knock-out* mutant säilitas vaid murdosa metsiktüübi PHA sünteesi võimest (Hein *et al.*, 2002). Samale järeldusele jõuti ka *P. putida* ja *P. aeruginosa* klass II PHA süntaase *E. coli*'s ekspresseerides – PhaC1 abil saavutati palju kõrgem polümeeri hulk raku kuivmassis (Qi *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2006).

Klass III – kahest subühikust, PhaC-st ja PhaE-st koosnevad ensüümid, mis sünteesivad scl-PHA-d. Sellist tüüpi PHB süntaas on *Allochromatium vinosum*'il. *PhaC* ja *phaE* moodustavad operoni (joonis 5; Liebergesell *et al.* 2000).

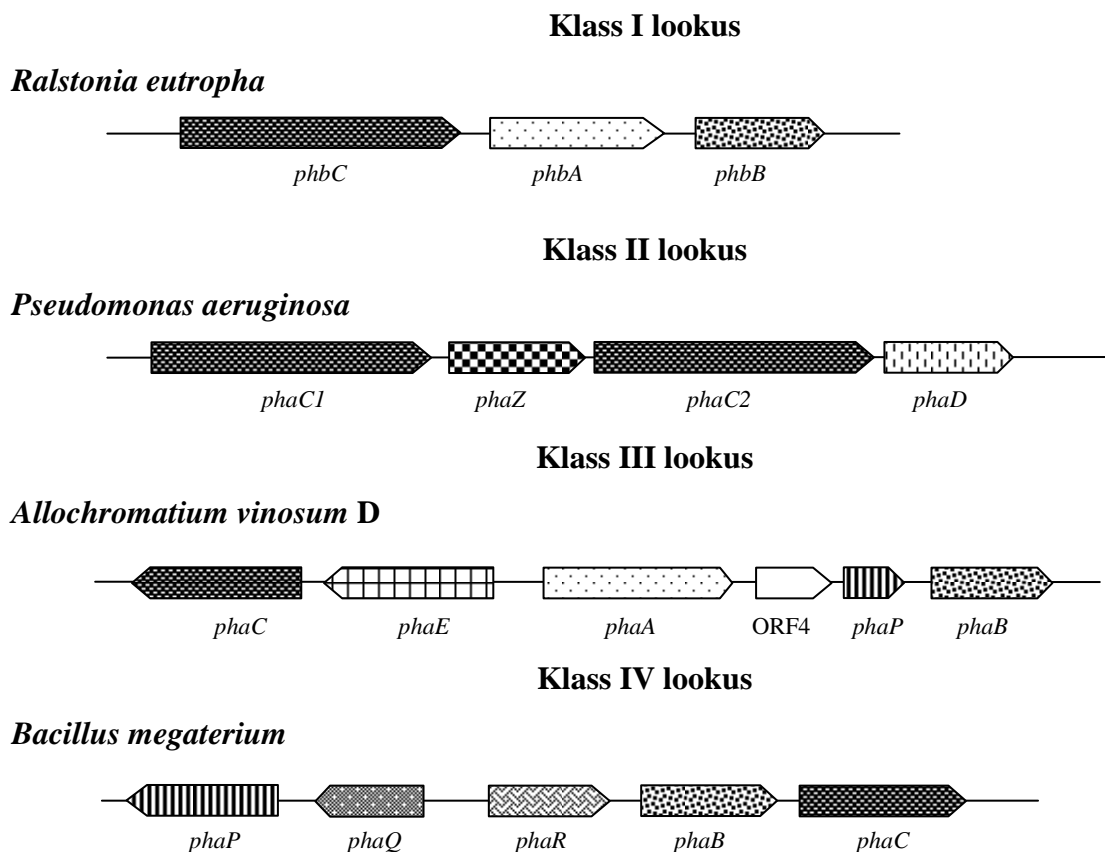
Klass IV – perekonna *Bacillus* esindajatel on kirjeldatud samuti kahest subühikust koosnevat scl-PHA süntaasi. Üks subühik, PhaC, on sarnane eelmise rühma samanimelisele subühikule, teine, PhaR, on aga PhaE-st poole väiksem. Ka operoni struktuur on teistsugune – *phaR* ning *phaC* vahel paikneb *phaB* (joonis 5; McCool ja Cannon 2001).

Bakteri genoomis võib olla ka mitu erinevat PHA süntaasi, näiteks *Pseudomonas* sp. 61-3-es on olemas nii klass I kui ka klass II süntaasid (Matsusaki *et al.*, 1998), *Pseudomonas* sp. 3Y2 genoomis on aga kaks komplekti klass II süntaase (Delamarre *et al.*, 2005).

PHA süntaaside valgujärjestusi omavahel võrreldes selgub, et N-terminaalne piirkond on üsna muutlik, C-terminus aga konserveerunud ning kahe esimese klassi süntaasidel hüdrofoobne. III ja IV klassi PhaC-del hüdrofoobne C-terminus puudub, küll aga on see olemas kummagi klassi teisel subühikul, vastavalt PhaE-l ja PhaR-il. Ilmselt on C-terminaalse domääni ülesanne sünteesitava polüestriga seonduda (Rehm, 2006). Kõigis PHA süntaasides leidub lipaas-boksiga sarnanev konsensusjärjestus Gly-X<sub>1</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Gly, kus lipaasidele iseloomulik seriin on asendunud tsüsteiiniga (Rehm, 2003).

Klass II PHA süntaasid on reeglina spetsiifilised keskmise ja ülejäänud klassidesse kuuluvad süntaasid lühikese ahelapikkusega monomeeride suhtes, kuid esinevad ka mõned erandid, kes sünteesivad scl-mcl-PHA segu, näiteks *Thiocapsa pfennigii* (Liebergesell *et al.*, 2000) ja *Aeromonas caviae* (Fukui ja Doi, 1997). Pseudomonaadidest on mcl-scl-PHA segu sünteesijatena kirjeldatud tüvesid *Pseudomonas* sp. GP4BH1 (Steinbuchel ja Wiese 1992), *Pseudomonas* sp. A33 (Lee *et al.* 1995), *Pseudomonas* sp. 61-3 (Matsusaki *et al.*, 1998), *Pseudomonas nitroreducens* AS 1.2343 (Yao *et al.*, 1999), *Pseudomonas stutzeri* 1317 (Xi *et al.*, 2000), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1 (Hang *et al.*, 2002), *Pseudomonas* sp. 14-3 (Ayub *et al.*, 2004), *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-778 (Ashby *et al.*, 2002) ja NRRL B-14682 (Solaiman ja Ashby, 2005). Nii sarnastest kui ka

mittesarnastest süsinikuallikatest suudavad polümeeride segu toota *Pseudomonas* sp 61-3 ning *P. oleovorans*'i mõlemad tüved, ülejäänud teevad seda ainult siis, kui neid kasvatada sarnastel süsinikuallikatel.



**JOONIS 5: Erinevad *pha* lookused (Rehm, 2003 järgi).**

#### **1.2.4 PHA sünteesi regulatsioon**

PHB süntees on ensümaatilisel tasandil reguleeritud vaba CoA hulga ning NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> suhte kaudu rakus (Kessler ja Witholt, 2001). Klass I sünteeside molekulaarse regulatsiooni uurimisel on põhitähelepanu suunatud valgule PhaR. Esimesena kioneerisid ning uurisid selle funktsiooni Matsusaki *et al.* (1998). Leiti, et tegemist on heeliks-pööre-heeliks motiivi sisaldava valguga, mis suudab seonduda nii DNA-le kui ka PHA-le, ning mis mõjutab positiivselt *Pseudomonas* sp 61-3 klass I operoni transkriptsiooni. Hiljem püstitati hüpotees, mille järgi PhaR kontrollib PHA sünteesi läbi

fasiinide (Maehara *et al.*, 2002). Fasiinid on väikesed amfipaatsed valgud, mis ümbritsevad kõiki PHA graanuleid, mõjutades nende suurust ja hulka (Potter ja Steinbuchel, 2005). Kui rakus on ebapiisav hulk monomeeride prekursoreid polüestri sünteesiks, takistab PhaR nii enda kui ka fasiine kodeeriva *phaP* ekspressiooni, blokeerides mõlema geeni promootorid. Graanulite tekkides seondub PhaR nendele ning promootorid vabanevad. PHA sünteesi lõppemisel või polümeeri lagundamisel peatab PhaR jälle kummagi geeni transkriptsiooni.

PhaR homolooge on leitud rohkem kui 30 bakteriliigi esindajate seas, kes enamasti on ka võimelised sünteesima scl-PHA-d, seega võib taoline mudel olla laialt levinud (Maehara *et al.*, 2002). Klass I PHB sünteesi eest on seni leitud ainult  $\sigma^{70}$  promootoreid (Schubert *et al.*, 1991; Genser *et al.*, 1998).

Klass II operoni regulatsiooni on uuritud *Pseudomonas oleovorans*'is. Leiti geen *phaF*, millelt sünteesitud valk surus maha transkriptsiooni *phaC1* ees asuvalt promootorilt (Prieto *et al.*, 1999). Samas on nii *Pseudomonas corrugata* kui ka *P. aeruginosa* kohta teada, et *phaC1-Z-C2* transkripti neis ei leidu, viimasest otsiti tulutult ka *phaC1-Z* transkripti (Hoffmann ja Rehm, 2004; Conte *et al.*, 2006). Seega on tõenäoline, et PhaF mõjutab eelkõige *phaC1* ekspressiooni. Kuna kasvatades *P. aeruginosa*'t glükonaadil sõltub PHA tootmine  $\sigma^{54}$  faktorist (Timm ja Steinbuchel, 1992) ning põhjusel, et nii  $\sigma^{70}$ - kui ka  $\sigma^{54}$ -sõltuvaid promootorjärjestusi on leitud *Pseudomonas* sp. 61-3 ning *P. oleovorans*'i *phaC1* geenide eest (Matsusaki *et al.*, 1998; Prieto *et al.*, 1999), uurisid Hoffmann ja Rehm klass II PHA sünteesi ekspressiooni *P. putida* ja *P. aeruginosa* RpoN<sup>-</sup> mutantides. Mõlemas mutandis oli *phaC1* ekspressiooni induktsioon tugevalt häiritud, mis näitab, et  $\sigma^{54}$  on *phaC1* ekspressiooniks tõepoolest vajalik (Hoffmann ja Rehm, 2004; Hoffmann ja Rehm, 2005).

Ka transatsülaas *phaG*, mis on oluline PHA sünteesil mittesarnastest süsinikuallikatest, ei ekspresseeru konstitutiivselt. *Pseudomonas putida*'s indutseerib *phaG* transkriptsiooni glükonaat (Hoffmann *et al.*, 2000), samuti on nii *P. putida*'s kui ka *P. aeruginosa*'s *phaG* ekspressiooniks vajalik lämmastiku limitatsioon (Hoffmann ja Rehm, 2004; Hoffmann ja Rehm, 2005).

### **1.2.5 Kasvuseoseline PHA süntees**

On üldlevinud seisukoht, et PHA süntees toimub mingi süsinikust erineva toitainete limitatsiooni tingimustes, kuid esineb ka erandeid, kes sünteesivad PHA-d samaaegselt



rakkude jagunemisega. Kasvuseoselist PHA sünteesi on kirjeldatud bakterites *Azotobacter vinelandii* UWD [PHA moodustab 65% raku kuivmassist (CDW)] (Page ja Knosp, 1989), *Paracoccus denitrificans* (22% CDW) (Yamane *et al.*, 1996), *Methylobacterium rhodesianum* (30% CDW) (Ackermann ja Babel, 1997), *Alcaligenes latus* (35% CDW) (Genser *et al.*, 1998), *Azospirillum brasilense* (42% CDW) (Sun *et al.*, 2000) ja *Bacillus mycoides* (69% CDW) (Thakur *et al.*, 2001). *A. vinelandii* ja *A. brasilense* näol oli tegu laboratooriumis tekitatud mutantidega, ülejäänud tüved olid looduslikud. Kõik bakterid sünteesisid scl-PHA-d.

*A. vinelandii* ja *A. latus*'e puhul on kasvuseoselise PHA sünteesi põhjuseks defektne NADH oksüdaas. See tekitab olukorra, kus rakus tõuseb NADH/NAD<sup>+</sup> suhe. Kõrge redutseerivate ekvivalentide kontsentratsioon inhibeerib tsitraadi sünteesi. Tsitraaditsükkel peatub ning AcCoA kontsentratsioon rakus tõuseb. AcCoA on muuhulgas ka PHB sünteesiraja esimene substraat. Kuna PHB sünteesiraja ühe ensüümi kofaktoriks on NADPH, vähendab PHB süntees ka redutseerivate ekvivalentide hulka rakus. Olulist rolli mängivad siin ka transhüdrogenaasid, mis kannavad elektrone NADH-lt NADP<sup>+</sup>-le, regenereerides nii NAD<sup>+</sup> (Page ja Knosp, 1989; Genser *et al.*, 1998).

*M. rhodesianum* on metülotroof, kes metanoolil kasvades sünteesib PHB-d ainult limitatsioonis, fruktoosil aga kasvuseoseliselt. Autorite arvates oli põhjuseks metülotroofidele omane tsitraaditsükli ensüümide madal efektiivsus, mis tekitab metaboolse pudelikaela. Sellest ülesaamiseks käivitus PHB süntees, mis kõrvaldas üleliigse AcCoA (Ackermann ja Babel, 1997; Mothes *et al.*, 1998).

*A. brasilense* metsiktüüp kasvuseoseliselt PHB-d ei sünteesi, küll aga teevad seda *ntnC*<sup>-</sup> ja *ntnBC*<sup>-</sup> mutandid. NtrB ja NtrC moodustavad kahekomponentse regulatsioonisüsteemi, mis vastusena lämmastiku kontsentratsiooni hulgale rakus mõjutab mitmete geenide, ilmselt siis ka PHB sünteesis osalejate ekspressiooni. Seega võib öelda, et neis mutantides on kasvuseoseline PHB süntees põhjustatud mitte metaboolsetest iseärasustest, vaid regulatsioonisüsteemi häirest (Sun *et al.*, 2000).

*P. denitrificans*'i ja *B. mycoides*'e kasvuseoselise PHA sünteesi oletatavaid põhjuseid ei ole autorid välja toonud (Yamane *et al.*, 1996; Thakur *et al.*, 2001).

## TÖÖ EESMÄRGID

*Pseudomonas mandelii* PC17 on efektiivse ning omapärase PHA sünteesiapaaraadiga bakter, keda on meie rühmas juba mõnda aega uuritud. On leitud, et tema genoomis esineb pseudomonaadidele tüüpiline klass II *pha* lookus, et ta suudab PHA-d sünteesida nii sarnastest kui ka mittesarnastest süsinikuallikatest, et sünteesitud PHA sisaldab alati nii scl- kui ka mcl-monomeere, samuti on rakke lipofiilse fluorestreeruva värvi Niiluse punasega töödeldes ning läbivoolutsütomeetris analüüsid näidatud, et glükoosil kasvades algab PC17 PHA süntees eksponentsaalses kasvufaasis. Ühelt poolt on see info heitnud valgust PC17 PHA metabolismile, teiselt poolt aga tekitanud ka hulga uusi küsimusi, millele käesolev magistritöö vastuseid püüab leida. Seega on töö eesmärkideks:

- välja selgitada, kas PC17 poolt sünteesitud scl-mcl-PHA segu näol on tegu kopolümeeri või polümeeride seguga;
- otsida PC17 genoomist võimalikku scl-PHA süntaasi ning võrrelda seda teiste teadaolevate scl-PHA süntaasidega;
- iseloomustada mittelimeerivates tingimustes glükoosil kasvades sünteesitud PHA monomeerse koostise dünaamikat kasvatusel vältel ning sisalduse muutumist kuivmassis;
- välja selgitada, kas ka oktanoaadist on PC17 võimeline kasvuseoseliselt PHA-d sünteesima;
- eelneva punkti tõseks osutumise korral iseloomustada mittelimeerivates tingimustes oktanoaadil kasvades sünteesitud PHA monomeerse koostise dünaamikat kasvatusel vältel ning sisalduse muutumist kuivmassis;
- võrrelda PC17 PHA sünteesi limiteerivates ja mittelimeerivates tingimustes;
- võrrelda PHA süntaaside ekspressiooni sarnastel või mittesarnastel süsinikuallikatel.

## 2 MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1 Bakteritüved ja vektorid

Käesolevas magistritöös kasutati bakteritüvesid *Pseudomonas mandelii* PC17 (Ots, 2004) ja *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook *et al.*, 1989). Kloneerimisvektorina oli kasutusel pBluescript II SK (Stratagene). PCR-i produktide kloneerimiseks modifitseeriti vektorit järgnevalt. Vektor avati restriктаasiga *Sma*I ja puhastati fenool- ja kloroformtöötuse abil (vt. punkt 2.4.1). Peale 70%-lise etanooliga pesemist sade kuivatati ning lahustati PCR-i puhvris (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20). Seejärel segati 20  $\mu$ l mahus kokku lõigatud vektor (1  $\mu$ g), dTTP (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) ning Taq DNA polümeraas (1 U, Fermentas) ja inkubeeriti segu 2 tundi temperatuuril 72 °C. Järgnes uus fenool- ja kloroformtöötus, mille järel plasmiid lahustati deioniseeritud vees.

### 2.2 Söötmed ja kasvutingimused

Vedelsöötmena kasutati Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972) söödet või minimaalsöötmeid, mida loksutati aereerimiseks 200-220 pööret minutis. Tardsöötmetele lisati 1,5% agarit (Merck). Transformantide selekteerimiseks lisati söötmele ampitsilliini (lõppkontsentratsioon 0,1 mg/ml), 100 mM-set IPTG-d (isopropüül- $\beta$ -D-tiogalaktosiid; 30  $\mu$ l 20 ml tardsöötme kohta) ning 4%-list X-Gal-i (5-bromo-4-kloro-3-indolüül-D-galaktopüranosiid; samuti 30  $\mu$ l 20 ml tardsöötme kohta). Minimaalsöötmed valmistati M9 (Adams, 1959) baasil (1 $\times$ M9, 0,25% mikroelemente [Beachop ja Elsdén, 1960]). Süsinikuallikatenä kasutati glükoosi, heksanoaati või oktanoaati. *P. mandelii* säilitati fenooli (2,5 mM) minimaaltassidel. *P. mandelii*'d kasvatati temperatuuril 30 °C ning *E. coli*'t temperatuuril 37 °C.

### 2.3 PHA sünteesi jälgimine ajas

Kasvatused, mille käigus uuriti PHA koostise ja sünteesi kulgu ajas, viidi läbi kahes seerias. Esimeses seerias inokuleeriti 500 ml värsket glükoosi (7 g/l) või oktanoaadi (0,2% v/v) minimaalsöödet üleöö glükoosil (1 g/l) või oktanoaadil (0,1% v/v) kasvanud rakkudega nii, et algne optiline tihedus ( $\lambda=600$  nm) oleks 0,1. Eksponentsiaalse kasvufaasi jooksul võeti iga kolme tunni tagant väike kogus biomassi, mis lüofiliseeriti, metanolüüsiti

ning analüüsiti gaasikromatograafis. Samal ajal rakud ka loendati Gorjajevi kambris. Samad analüüsid viidi läbi ka inokuleerimisest üle jäänud rakkudega.

Teises seerias inokuleeriti samal moel 5 kolbi 250 ml glükoosi või oktanoaadi minimaalsöötmega. Igas esimese seeriaga sarnases ajapunktis eemaldati üks kolb ning määrati PHA protsentuaalne sisaldus kuivmassis.

Mõlemad seeriad viidi läbi kolmes korduses.

## **2.4 Nukleiinhapete eraldamine**

### **2.4.1 Genoomse DNA eraldamine**

Rakke kasvatati üleöö 5 ml LB vedelsöötmes ning tsentrifuugiti seejärel põhja ( $10\,000 \times g$ , 3 minutit). Sade suspendeeriti 250  $\mu$ l TE 50/5-s (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0), kuhu oli lisatud 7  $\mu$ l RNAasi (10 mg/ml; Fluka) ning 12  $\mu$ l lüsotsüümi (10 mg/ml; Sigma). Segu inkubeeriti 1 tund temperatuuril 37 °C. Seejärel töödeldi rakke proteinaas K (0,1 mg) ning pronaas E-ga (1,9 mg; mõlemad ensüümid firmalt Roche) 600  $\mu$ l-s vastavas puhvis (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5% SDS; 5 mM CaCl<sub>2</sub>), segu inkubeeriti 50 °C juures 1 tund. Järgnes fenool- ja kloroformtöötlus, kus reaktsioonisegu pesti 1 mahu tasakaalustatud fenooliga, seejärel 1 mahu fenool-kloroformi seguga (1:1) ja lõpuks kaks korda 1 mahu kloroformiga. Iga pesu järel pipeteeriti tsentrifuugimisel ( $10\,000 \times g$ , 10 minutit) saadud DNA-d sisaldav ülemine vesifaas uude tuubi. DNA sadestamiseks lisati 0,1 osa 3 M KAc ja 2,5 osa 96%-list etanooli. Sadenenud DNA keerati külviaasa ümber, pesti 70%-lises etanoolis ning lahustati deioniseeritud vees.

### **2.4.2 Plasmiidse DNA eraldamine**

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati *Perfectprep Plasmid Mini Kit*'i (Eppendorf) vastavalt tootja juhendile või aluselise lüüsi meetodit (ehk minipreparatsiooni). Aluselise lüüsi korral võeti LB tardsöötmetelt tikuga rakke ning suspendeeriti need 150  $\mu$ l TE 50/5-s (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0). RNA lagundamiseks lisati 4  $\mu$ l RNAasi (10 mg/ml). Seejärel lüüsitati rakud 150  $\mu$ l lüüsilahusega (0,2 M NaOH ja 1% SDS), segati õrnalt üle korgi keeramisega. Segu neutraliseeriti sama mahu 3 M KAc-ga (pH 5,5) ning inkubeeriti seejärel 10 minutit jään. Lahustunud plasmiidne DNA eraldati sademest tsentrifuugimisega ( $10\,000 \times g$ , 10 minutit), supernatant tõsteti puhtasse tuubi ning plasmiidne

DNA sadestati 2,5 mahu 96%-lise etanooliga. Lahust inkubeeriti 30 minutit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures, tsentrifuugiti uuesti ( $10\ 000 \times g$ , 10 minutit), sadet pesti 70%-lise etanooliga. Peale seda eemaldati supernatant, sade kuivatati ning plasmiidne DNA lahustati TE 50/5-s või deioniseeritud vees.

### **2.4.3 RNA eraldamine**

Totaalse RNA eraldamiseks kasutati *Purescript RNA Purification Kit*'i (Gentra) vastavalt tootja juhendile. DNA eemaldamiseks ekstraheeriti saadud lahus võrdse mahu lahusega, mis sisaldas 4 osa vesiküllastatud happelist fenooli (pH 4,5) ning 1 osa kloroformi. Faasid eraldati tsentrifuugimisel ( $10\ 000 \times g$ , 10 minutit), ülemine vesifaas tõsteti uude tuubi ning RNA sadestati 0,1 mahu 2 M NaAc-ga ning 1 mahu isopropaanooliga. Tsentrifugimisel ( $10\ 000 \times g$ , 20 minutit) tekkinud sade pesti 70%-lise etanooliga ning lahustati dietüül pürokarbonaadiga töödeldud vees. RNA-d säilitati temperatuuril  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5 Agaroosgeelelektroforees**

Elektroforeesiks segati proovid elektroforeesi värviga (1  $\mu\text{l}$  värvi 10  $\mu\text{l}$  DNA lahuse kohta; 6 $\times$ Loading Dye, Fermentas). Seejärel kanti proov(id) horisontaalsele 0,7-1%-lisele agaroosgeelile TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA, pH 8,2), mis sisaldas ka etiidiumbromiidi (lõppkontsentratsiooniga 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Elektroforees viidi läbi TAE puhvril toatemperatuuril, 50 või 100 voldise pingega elektriväljas. Proovide suuruse kindlaksmääramiseks jooksutati nendega üheaegselt ka DNA suurusmarkerit (*Gene Ruler<sup>TM</sup> 1 kb DNA ladder*, Fermentas).

## **2.6 Restriksioon ja ligeerimine**

Restriksiooniks kasutati firma Fermentas poolt toodetud klass II restriктаase, ligeerimiseks T4 DNA ligaasi (Fermentas). Restriksioon ja ligeerimine teostati vastavalt ensüümide tootjafirma poolt soovitatud protokollile.

## 2.7 DNA fragmentide geelist puhastamine

Geelist puhastati suuruse järgi eraldatud DNA restriksioonifragmendid ja vektorid peale restriiktaasidega avamist, et eraldada lineariseeritud molekulid nendest, mis ei lõikunud (tsirkulaarne DNA liigub agarosgeelis kiiremini kui lineaarne). Geelist eraldamiseks kasutati *QIAquick Gel Extraction Kit*'i (Qiagen) ja *Perfectprep Gel Cleanup Kit*'i (Eppendorf), mõlemat vastavalt tootja juhendile.

## 2.8 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Reaktsioonid viidi läbi masinas Mastercycler Personal (*Eppendorf*). 50 µl reaktsioonisegu sisaldas 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl kumbagi praimerit (30 pmol), ligikaudu 20 ng matriits-DNA-d, 0,5 U *Taq* polümeraasi ning 5 µl 10×PCR puhvrit (750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1% Tween 20).

PCR-i reaktsioon toimus järgmistel tingimustel: matriits-DNA kaksikahela denatureerimine (96 °C, 45 sekundit), praimerite seondumine (45 sekundit, temperatuur valiti vastavalt praimerile), DNA süntees (72 °C, 45 sekundit kuni 3 minutit, sõltuvalt amplifitseeritava fragmendi pikkusest). Tsükleid oli kokku 31. Kasutatud praimerid on toodud punktis 2.10.

## 2.9 Pöördtranskriptsioon-PCR (RT-PCR)

Totaalsest RNA-st cDNA sünteesimiseks kasutati M-MuLV pöördtranskriptaasi (*Fermentas*) vastavalt tootja juhendile. Reaktsiooniks kasutati 2 µg totaalset RNA-d ning 30 pmol järjestus-spetsiifilist *reverse* praimerit (*DNA Technology*). Järgnevas PCR-i reaktsiooniks võeti 1,5 µl cDNA-d 25 µl reaktsioonisegu kohta. Negatiivses kontrollreaktsioonis võeti cDNA asemel samasugune kogus totaalset RNA-d, positiivses kontrollreaktsioonis asendas cDNA-d genoomne DNA. Tsükleid oli kokku 35, kasutatud praimerid on toodud punktis 2.10.

## 2.10 Töös kasutatud praimerid

PCR-iks ja sekveneerimiseks kasutati järgmisi praimereid:

Nimi	Järjestus
T3	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'
T7	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
PHB-Fw	5' GCTGCAGATCAACAAGT(A/T)CTACATC 3'
PHB-Rv	5' GCTGCAG TTG(A/T)A(A/G/C)AGCAG(G/A)TC 3'
PhbC-sekv-F	5' ATGGACAATAACG(C/G)(G/A)CA(T/C)AC(A/C)TTC 3'
PhbC-sekv-R	5' GCGCATCTTGCCTTCCTGC 3'

RT-PCR-iks kasutati järgmisi praimereid:

Nimi	Järjestus
PhaC1-RNA-F	5' ACTTGCACGCACGACTGATCG 3'
PhaC1-RNA-R	5' CACCGAGTCGCTTCATTCGC 3'
PhaC2-RNA-F	5' CCAAGGAGTGTTGAGTCATGCG 3'
PhaC2-RNA-R	5' CGGTACACGATGAGGGTTGGAA 3'
PhbC-RNA-F	5' GCAGGAAGGCAAGATGCGCC 3'
PhbC-RNA-R	5' CTGCAGGAGCTAGACCGGC 3'

## 2.11 Bakterite elektroporatsioon

Kompetentsete rakkude saamiseks kasutati järgmist protokollit (Miller ja Nickoloff, 1995): *E. coli* rakke kasvatati üleöö 5 ml YENB söötmes (0,75% Bacto Yeast Extract, 0,8% Bacto Nutrient Broth). Seejärel inokuleeriti rakud 0,5 l värskesse YENB söötmesse ja kasvatati optilise tiheduseni 0,5-0,9 ( $\lambda=600$  nm). Rakud külmfuugiti söötmest (7000  $\times$  g, 10 minutit, 4 °C), pesti kaks korda 100 ml külma destilleeritud veega ning 20 ml 10%-lise glütserooliga. Lõpuks suspendeeriti rakud 2 ml 10%-lises glütseroolis ning külmutati (-70 °C) 40  $\mu$ l portsjonitena.

40  $\mu$ l-le kompetentsetele rakkudele lisati 1-2  $\mu$ l ligaasisegu. Rakud ja DNA segati hoolikalt, lasti umbes 1 minut jääs seista ning pipeteeriti siis eelnevalt jahutatud 1 mm elektroporatsiooniküveti (Bio-Rad). Segule rakendati elektrilaeng (25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 1500 V;

Bio-Rad MicroPulser™). Peale seda suspendeeriti rakud kiiresti 1,5 ml LB söötmes ning pipeteeriti katseklaasi. Rakke kasvatati 45-60 minutit loksutil, et võimaldada antibiootikumi resistentsust määravate geenide ekspressiooni. Seejärel koguti bakterid tsentrifuugimisel ( $2500 \times g$ , 4 minutit) ja plaaditi ampitsilliini sisaldavale LB tardsöötmele. Sini-valge värvusreaktsiooni testi jaoks lisati söötmele veel 100 mM-set IPTG-d ning 4%-list X-Gal-i.

## 2.12 DNA-DNA hübridisatsioon

### 2.12.1 Radioaktiivse proovi valmistamine

Radioaktiivne proov valmistati *random priming* meetodil ( $\alpha^{32}\text{P}$ )dCTP-ga, kasutades selleks *DecaLabel DNA Labeling Kit*'i (Fermentas) vastavalt tootja juhendile.

### 2.12.2 Hübridisatsioon

Hübridiseeriti nii genoomse DNA restriksioonifragmente kui ka söötmele asetatud filtril üleskasvatatud bakterikolooniate DNA-d.

Agarosgeelelektroforeesil lahutatud restriksioonifragmentide ülekandmine filtrile toimus järgnevalt. Geeli loksutati 45 minutit denatureerivas SolA-s (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), loputati mQ vees ja loksutati neutraliseerivas SolB-s (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 1mM EDTA) algul 30 minutit, seejärel vahetati lahus värske vastu ning loksutati veel 15 minutit. Järgnes DNA kapillaarne ülekanne (Southern, 1975) üleöö 20×SSC-s (pH 7,0; 3 M NaCl, 0,3 M Na-tsitraat) nailonfiltrile (Nytran N; Schleicher & Schuell). Puhvrivanni kohal asuvale alusele paigutati vatmanpaber, mis ulatus mõlemat otsa pidi 20×SSC-sse. Paberile asetati töödeldud geel, selle peale filter ning 6-7 cm kõrgune filterpaberitest pakk, mille peal omakorda seisis raskus. Peale ülekandmist filter kuivatati õhu käes ning DNA ristseoti filtrile, eksponeerides seda 1 min UV valguses ( $\lambda=254$  nm).

Kolooniate hübridiseerimisel kasvatati rakud üles tardsöötmele asetatud nailonfiltril. Rakud lüüsi ja DNA denatureeriti, inkubeerides filtrit 7 minutit SolA-s. Järgnes neutraliseerimine SolB-s, 2×3 minutit. Rakukestad pesti filtrilt maha 2×SSC-ga, DNA ristseoti filtrile, nagu eelnevalt kirjeldatud.



Selliselt töödeldud filtrid asetati hübriidisatsioonitorudesse ning inkubeeriti ühe tunni jooksul 65 °C temperatuuril prehübriidisatsiooni lahusega (6×SSC; 0,5% SDS; 20 µg/ml heeringa sperma DNA-d; 0,5 g Ficoll; 0,5 g polüvinüülpirrolidooni; 0,5 g BSA-d [veiseseerumi albumiin]). Seejärel lisati märgistatud proov ning hübriidisatsioon jätkus üleöö.

Pärast hübriidiseerimist pesti filtrit esmalt 2×SSC ja 0,1% SDS lahusega, siis 1×SSC ja 0,1% SDS lahusega ning lõpuks 0,1×SSC ja 0,1% SDS lahusega. Kõik pesud kestsid 15 minutit, temperatuuril 65 °C. Filter kuivatati ja eksponeeriti 24 h-ks röntgenfilmile (Fuji).

## 2.13 Sekvenerimine

### 2.13.1 PCR-produkti eelnev töötlus

Enne sekvenerimist lisati 5 µl PCR-produktile 1 µl kreveti aluselist fosfataasi (SAP, 1 U/µl) ja 1 µl eksonukleas I-te (2,5 U/µl). SAP eemaldab nukleosiidtrifosfaatide 5' otsas olevad fosfaatrühmad, nii et need ei lülitu sekvenerimisreaktsioonil kasvavasse DNA ahelasse, eksonukleas lagundab praimerid.

Reaktsioon viidi läbi 15 minuti jooksul temperatuuril 37 °C, millele järgnes ensüümide 15minutiline termiline inaktiveerimine temperatuuril 80 °C.

### 2.13.2 Sekvenerimine

Sekveneriti automaatse MegaBACE 1000 sekvenaatoriga, kasutades DYEnamic™ ET *terminator cycle sequencing premix kit*'i (Amersham) tootja poolt soovitatud protokollil modifitseeritud variandi alusel. Reaktsiooniks võeti 0,2-0,5 µg DNA-d ja 5 pmol praimerit, lisaks sisaldas reaktsioonisegu ka tavalisi nukleotiide ning termineerivaid didesoksüribonukleotiide.

Sekvenerimisreaktsioonid viidi läbi PCR-i masinas järgmistel tingimustel: denaturatsioon 95 °C 20 sekundit, praimerite seondumine (temperatuur valiti vastavalt praimerile) 15 sekundit, ahela pikendamine 60 °C 1 minut, kokku 41 tsüklit.

Kõigi nelja didesoksüribonukleotiidi küljes oli erinev fluorestseeruv märgis, mis tuvastati hiljem sekvenaatori poolt laserdetektoriga.

Sekvenerimiseks kasutatud praimerid on ära toodud punktis 2.10.

## **2.14 PHA analüüsimeetodid**

### **2.14.1 PHA eraldamine**

PHA eraldamiseks kasutati kloroformekstraktsiooni (Lee *et al.*, 1999). Lüofiliseeritud biomass kaaluti ja lisati iga µg biomassi kohta 50 µl kloroformi. Segu inkubeeriti 48 h toatemperatuuril, segades seda magnetsegajaga (250 pööret/minutis). Lahustunud PHA ja rakujäätgid eraldati filtreerimisel läbi filterpaberi (Ekros). PHA sadestamiseks lisati 5 mahuosa 70%-list külma metanooli ja hoiti segu üleöö 4 °C juures. Seejärel PHA tsentrifuugiti (3500 × g, 15 min) ning kuivatati.

### **2.14.2 PHA sisalduse määramine bakterite kuivkaalust**

Lüofiliseeritud biomass kuivatati termostaadis temperatuuril 95 °C üleöö ja kaaluti analüütiliste kaaludega. Järgnevalt eraldati biomassist PHA, kuivatati 56 °C juures üleöö ning kaaluti samuti analüütiliste kaaludega. PHA sisaldus kuivas biomassis leiti kaalude vahest.

### **2.14.3 PHA metanolüüs**

PHA monomeerse koostise määramiseks rakkudes oli vaja polümeer monomeerideks lõhkuda. Selleks kasutati järgmist protokollit (Brandl *et al.*, 1988): keeratava korgiga klaasviaalis olevale 3-6 mg lüofiliseeritud bakterimassile lisati 0,5 ml kloroformi ja 0,5 ml lüüsisegu (85% metanool, 15% väävelhape) ning kuumutati temperatuuril 100 °C 3 tundi. Järgnevalt lisati segule 0,5 ml destilleeritud vett ja segati vorteksil intensiivselt 1 minuti jooksul. Peale faaside eraldumist viidi alumine orgaaniline faas, mis sisaldas monomeeride metüülestreid, uude klaasviaali. Veetustamiseks lisati naatriumsulfaati ja edasisteks analüüsideks säilitati segu temperatuuril –20 °C.

### **2.14.4 PHA fraktsioneerimine atsetoonis**

Rakkudest puhastatud PHA-le lisati atsetooni ning inkubeeriti 24 h toatemperatuuril, magnetsegajaga segades (250 pööret/minutis). Lahustunud ning mittelahustunud fraktsioon eraldati filtreerimisel, metanolüüsiti ning analüüsiti leekionisatsioonidetektoriga gaasikromatograafis (GC-FID).

### **2.14.5 Metüül-3-hüdroksüalkanoaatide GC-FID analüüs**

PHA metanolüüsil saadud monomeeride metüülestrid lahutati 25 m × 0,53 mm kvartskapillaarkolonniga gaasikromatograafis (Micromat HRGC 412), millel oli leek-ionisatsioonidetektor. Kolonni statsionaarseks faasiks oli Carbowax 20M, kandjagaasiks heelium. Proovi maht oli 1 µl.

Temperatuuriprogramm oli järgmine: 4,5 minutit 65 °C, seejärel tõsteti kiirusega 15 °C minutis temperatuur 90 °C-ni, hoiti 2 minutit ning tõsteti sama kiirusega 240 °C-ni, mida hoiti 8 minutit.

Referentsidena kasutati 3-hüdroksüalkaanhapete metüülestreid firmast *Larodan Lipids*. PHA monomeeride vahetõrge leiti proovide mass-spektrite piikide ruumaladest.

## **2.15 Kasutatud arvutiprogrammid ja andmebaasid**

Antud töös kasutati järgmisi programme:

Oligo calculator – praimerite  $T_m$ -i leidmiseks

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

Blast II NCBI – nukleotiidsete ja aminohappeliste järjestuste homoloogide otsimisel GenBank'ist ja reastamisel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

DNAsis Bioedit – DNA- ja valgujärjestuste analüüsiks

GenBank – geeni- ja valgujärjestuste andmebaas

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)

### 3 TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1 PC17 poolt sünteesitud PHA fraktsioneerimine atsetoonis

Kuna varasemast oli teada, et PC17 poolt sünteesitud polümeer sisaldab nii lühikese kui ka keskmise ahelapikkusega monomeere, sai esimeseks ülesandeks välja selgitada, kas tegu on kopolümeeriga (erinevat tüüpi monomeerid on omavahel kovalentselt seotud) või polümeeride seguga (konkreetses polümeeriahelas esinevad ainult ühte tüüpi monomeerid). Selleks fraktsioneeriti PC17 rakkudest eraldatud polümeer atsetoonis ja analüüsiti nii lahustuvat kui ka mittelahustuvat fraktsiooni gaasikromatograafis. Analüüsimiseks valiti heksanoaadist sünteesitud polümeer, kuna scl- ja mcl-monomeere sisaldus selles ligikaudu ühepalju (Ots, 2004). Tulemused on esitatud tabelis 1:

**Tabel 1:** PC17 poolt heksanoaadil sünteesitud PHA fraktsioneerimine atsetoonis. Lühendid: 3HB – 3-hüdroksübutüraat; 3HH – 3-hüdroksüheksanoaat; 3HO – 3-hüdroksüoktanoaat; 3HD – 3-hüdroksüdekanooat; 3HDD – 3-hüdroksüdodekanooat

<i>Fraktsioon</i>	<i>PHA monomeerne koostis (%)</i>			
	3HB	3HH	3HO	3HD
Atsetoonis lahustuv	–	93,9	4	2,1
Atsetoonis mittelahustuv	100	–	–	–

PHB homopolümeer atsetoonis ei lahustu, mcl-PHA aga küll. Scl-mcl-kopolümeer jaotub atsetoonis lahustuva ja mittelahustuva fraktsiooni vahel vastavalt sellele, kumb monomeeritüüp konkreetses polümeeriahelas ülekaalus on (Huang ja Reusch, 1996). Asjaolu, et lahustavas fraktsioonis sisalduvad ainult keskmise ahelapikkusega monomeerid ning mittelahustuvas fraktsioonis ainult lühikese ahelapikkusega monomeerid näitab, et PC17 poolt sünteesitud PHA näol on tegu scl- ja mcl-PHA seguga, mitte kopolümeeriga. Järelikult on PC17 genoomis eraldi süntaasid scl- ja mcl-PHA jaoks. Pseudomonaadidele iseloomuliku mcl-PHA-spetsiifilise klass II *pha* operoni olemasolu PC17-s on juba varem tõestust leidnud (Ots, 2004), nüüd otsustati isoleerida ka scl-PHA süntaas.

## **3.2 *P. mandelii* PC17 PHB süntaasi kloonimine ja sekveneerimine**

### **3.2.1 Hübriidisatsioonisondi valmistamine**

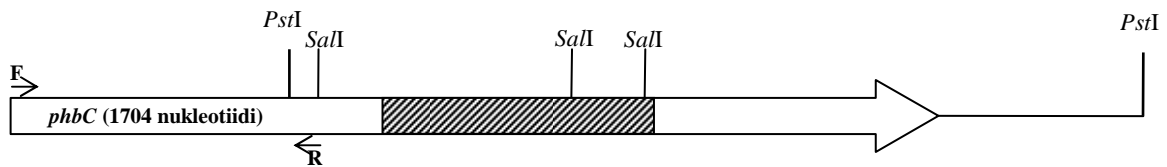
Teadaolevate PHB süntaaside konserveerunud järjestuste põhjal disainiti praimerid PHB-Fw ja PHB-Rv, mille abil õnnestus PC17 genoomist amplifitseerida ~500 bp ning ~200 bp pikkused fragmendid. Kumbki fragment ligeeriti eelnevalt töödeldud vektorisse ning sekveneeriti vektorspetsiifiliste praimeritega T3 ja T7. Järjestuste analüüsimine programmiga BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) näitas, et ~200 bp pikkune fragment on pärit klass II PHA süntaasist *phaC1*, ~500 bp pikkuse fragmendi näol on aga tõepoolest tegu osaga klass I PHB süntaasist. Pikem fragment märgistati radioaktiivselt ning kasutati seda hübriidisatsioonisondina tervikliku PC17 *phbC* leidmiseks.

### **3.2.2 PC17 *phbC* kloonimine ja sekveneerimine**

Restriktaasidega *Pst*I, *Bsp*120I, *Cfr*42I ja *Kpn*I töödeldud PC17 genoom lahutati geelelektroforeesil, kanti filtrile ning hübriidiseeriti radioaktiivselt märgitud ~500 bp pikkuse PCR-i produktiga. Edasiseks tööks sobivaimaks osutus *Pst*I, millega töödeldud genoom andis hübriidisatsioonil signaali ~1,5 kb piirkonnas. Teiste restriktaaside puhul hübriidiseerusid üle 10 kb või alla 1 kb fragmendid.

Järgnevalt lahutati PC17 *Pst*I-ga lõigatud genoom uuesti agarosgeelelektroforeesil, lõigati ~1,5 kb pikkused fragmendid geelist välja ning ligeeriti need *Pst*I-ga avatud pBlueskript SK vektorisse. Vektorid transformeeriti *E. coli* DH5 $\alpha$  rakkudesse. Õiget fragmenti kandvad kloonid selekteeriti koloonia hübriidisatsiooniga.

Fragmendi külgmised piirkonnad sekveneeriti, kasutades vektorspetsiifilisi primereid T3 ja T7, täieliku järjestuse saamiseks teostati subkloneerimine, kasutades restriktaasi *Sal*I. Subkloonid sekveneeriti samuti, kasutades primereid T3 ja T7. Kõigi sekveneeritud fragmentide järjestamine ja TBLASTX analüüs näitas, et terviklikust geenist jäi puudu ligikaudu 500 5'-otsa poolset nukleotiidi. Nende sekveneerimiseks kasutati järjestusspetsiifilisi primereid PhbC-sekv-F ja -R, millega piirkond esmalt genoomist amplifitseeriti ning seejärel sekveneeriti. Eelkirjeldatu võtab kokku joonis 6.



**JOONIS 6: PC17 *phbC* kloneerimine.** Viirutatud ala tähistab hübriidsatsioonisondi. Noolekesed märgivad praimerite PhbC-sekv-F ja -R ligikaudseid asukohti.

### 3.3 PC17 *phbC* võrdlemine teiste *phbC*-dega

Sekvencerimisel saadud 2083 nukleotiidi pikkust järjestust analüüsiti programidega BLASTN ja BLASTX. Leiti, et isoleeritud on 1704 nukleotiidi ja 567 aminohappe pikkune klass I PHB süntaas, mille geeni- ning valgujärjestus on toodud lisas 1. Ootuspäraselt sarnanes isoleeritud järjestus kõige rohkem pseudomonaadides kirjeldatud klass I PHB süntaasidega. Nukleotiidsel tasandil oli PC17 *phbC*-l kõige enam ühist *Pseudomonas* sp. 61-3 PHB süntaasiga – kokku langesid 80,8% nukleotiididest. Järgnesid *Pseudomonas* sp. 14-3 (72,6%), *Pseudomonas* sp. HJ-2 (72,5%) ja *P. oleovorans* NRRL B-778 (72,5%). Ka valgu tasandil saavutati kõrgeim identsete aminohapete protsent *Pseudomonas* sp. 61-3-ga (83%), järgnesid *Pseudomonas* sp. HJ-2 (72,8%), *Pseudomonas* sp. 14-3 (72,3%) ning *P. oleovorans* NRRL B-778 (72,3%). PC17 PhbC võrdlemisel uurituimate klass I PHB süntaasidega organismidest *R. eutropha* ja *A. latus* selgus, et identseid aminohappeid oli vastavalt 48,6% ja 45,4%. Seega võib öelda, et PC17 PhbC näol on tegu tavapärase klass I PHB süntaasiga.

Nagu kõigil PHA süntaasidel, esineb ka PC17 PHB süntaasil konserveerunud lipaas-boksile sarnanev ala, mille moodustavad aminohapped 299-304 ja mille järjestus on Gly-Phe-Cys-Ile-Gly. Selline järjestus on iseloomulik enamikule PHB süntaasidele, teises ja neljandas positsioonis võivad esineda ka vastavalt Tyr või Val (Rehm, 2003).

*PhbC*-le järgnevad ~300 nukleotiidi ei anna homoloogiat ühegi GenBank'is oleva järjestusega. Kuna teadaolevate *phb* operonide intergeensed alad jäävad 80 kuni 120 nukleotiidi vahele, võib asjaolu, et 300 nt sees ühtegi PHB sünteesil osalevatele geenidele sarnanevat avatud lugemisraami ei alga, viidata operoni lõppemisele. See oleks veel üks ühisjoon *Pseudomonas* sp. 61-3-ga, kelle *phb* operonis on *phbC* samuti viimaseks geeniks. Enamasti esineb operon kujul *phbCAB* (Rehm, 2003).

### 3.4 PHA monomeerse koostise muutumine kasvatusel vältel

Varasematest eksperimentidest PC17-ga oli teada, et lämmastiku limitatsioonil sünteesib bakter nii scl- kui ka mcl-monomeere sisaldavat PHA-d ning seda nii sarnastest kui ka mittesarnastest süsinikuallikatest (Ots, 2004). Järgnevate katsete käigus selgus, et PHA süntees glükoosil toimub samaaegselt rakkude jagunemisega, alates umbes kuuendal tunnil kasvatusel algusest (Meikar, 2004). Kasvuseoselisel sünteesitud PHA koostise ning koguse kohta täpsem info puudus. Teadmine, et PC17 genoomis on vähemalt kahe PHA sünteesi klassi esindajad tekitab küsimuse, millisel määral kumbki neist PHA sünteesi panustab – kas kasvuseoselisel sünteesitud PHA koostis erineb tunduvalt limiteerivates tingimustes sünteesitu omast ja kas eksponentsiaalses kasvufaasis on aktiivsed mõlema klassi sünteesid või ainult üks neist. Selle väljaselgitamiseks kasvatati rakke nii glükoosil kui ka oktanoaadil ning võeti iga kolme tunni tagant väike kogus biomassi, mis lüofiliseeriti, metanolüüsiti ning analüüsiti gaasikromatograafis. Samal ajal rakud ka loendati. Eraldi katseserias määrati kindlaks PHA protsentuaalne sisaldus raku kuivmassis. Kõik katsed viidi läbi kolmes korduses.

#### 3.4.1 Kasvuseoselisel sünteesitud PHA monomeerne koostis glükoosil

Uurimaks kasvuseoselist PHA sünteesi mittesarnastel süsinikuallikatel, kasvatati PC17 rakke glükoosi (7 g/l) minimaalsöötmele. Et hoida algne PHA sisaldus rakkudes võimalikult madal, kasutati inokulumina üleöö 1 g/l glükoosisisaldusega minimaalsöötmele kasvanud rakke – varasematel katsetel ei täheldatud sellisel kontsentratsioonil märkimisväärt PHA akumulatsiooni (Meikar, 2004). Katse tulemused on toodud joonisel 7.

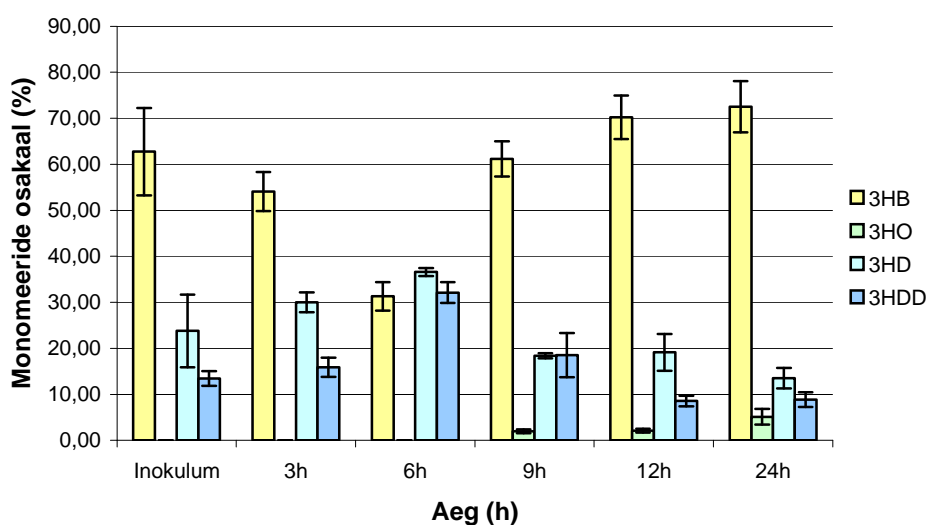
Esmalt selgus, et hoolimata eelkasvatuse madalast glükoosiprotsendist sisaldavad inokulumirakud siiski arvestatava koguse PHA-d – tervelt 10% raku kuivmassist. Võrreldes limiteerivates kasvutingimustes sünteesitud polümeeriga (Ots, 2004) on huvitavaks erinevuseks 3-hüdroksüoktanoadi (3HO) monomeeri täielik puudumine.

Esimesel kuuel tunnil polümeerisisaldus rakkudes langeb – PHA depolümeraasid on ilmselt aktiivsed. Selle käigus muutub ka polümeeri koostis – 3HB osakaal, mis ületas inokulumis 50%, langeb 6. tunni lõpuks 30% tasemele. Põhjuseks võib olla nii 3HB kiirem lagundamine võrreldes mcl-PHA-ga kui ka mcl-PHA süntees, madala polümeerisisalduse tõttu selles ajapunktis on tõenäolisem esimene variant.

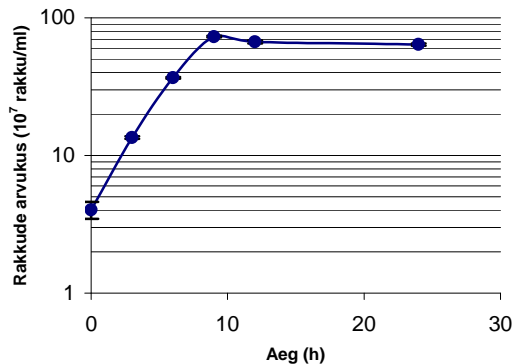
9. tunni lõpuks on toimunud märkimisväärsed muutused – polümeerisisaldus raku kuivmassis on tõusnud 2%-lt 11%-le, järsult on kasvanud 3HB osakaal ning ilmunud 3HO

monomeer. Kõik see viitab PHA süntaaside aktiivsusele. Samas võib ka väita, et PHA sisaldus on tõusnud ainult 3HB sünteesi arvelt ning mcl-PHA lagundamine jätkub, sellest ka tema osakaalu langus võrreldes 6. tunniga. Sellele räägib vastu 3HO monomeeri ilmumine – ei ole loogiline, et 3HO monomeeri sünteesitakse, teisi mcl-monomeere aga lagundatakse. Seega võib öelda, et glükoosil kasvades algab nii scl- kui ka mcl-PHA süntees PC17 rakkudes peale kuue tunni möödumist kasvatusel algusest, eksponentsiaalse kasvufaasi lõpus.

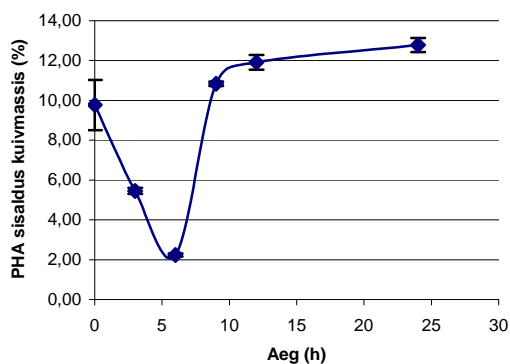
A



B



C

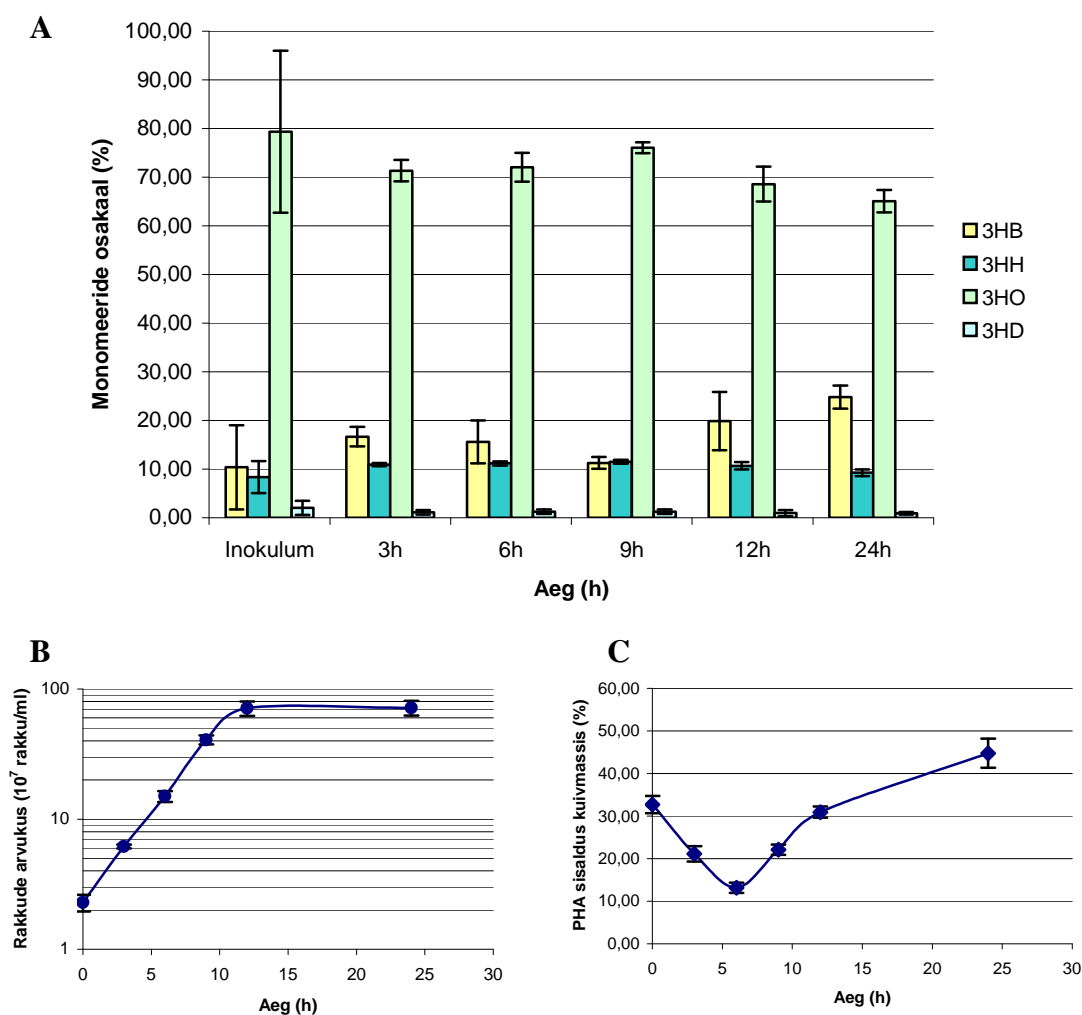


**JOONIS 7: *Pseudomonas mandelii* PC17 PHA sünteesi mittelimiteerivates tingimustes glükoosil (7 g/l).** A – PHA monomeerse koostise muutus kasvatusel vältel; B – rakkude arvukus; C – PHA sisaldus rakkude kuivmassis. Joonistel on kujutatud kolme katse keskmist. Lühendid: 3HB – 3-hüdrosübutüraat; 3HO – 3-hüdrosüoktanoaat; 3HD – 3-hüdrosüdekanoaat; 3HDD – 3-hüdrosüdekanooat



### 3.4.2 Kasvuseoseliselt sünteesitud PHA monomeerne koostis oktanoaadil

Et uurida kasvuseoselist PHA sünteesi sarnastel süsinikuallikatel, kasvatati rakke 0,2%-lisel oktanoaadi minimaalsöötmel. Inokulumi kasvatati analoogselt glükoosikatsega madalama süsinikuallika kontsentratsiooniga söötmes (0,1%). Katse tulemused on näha joonisel 8.

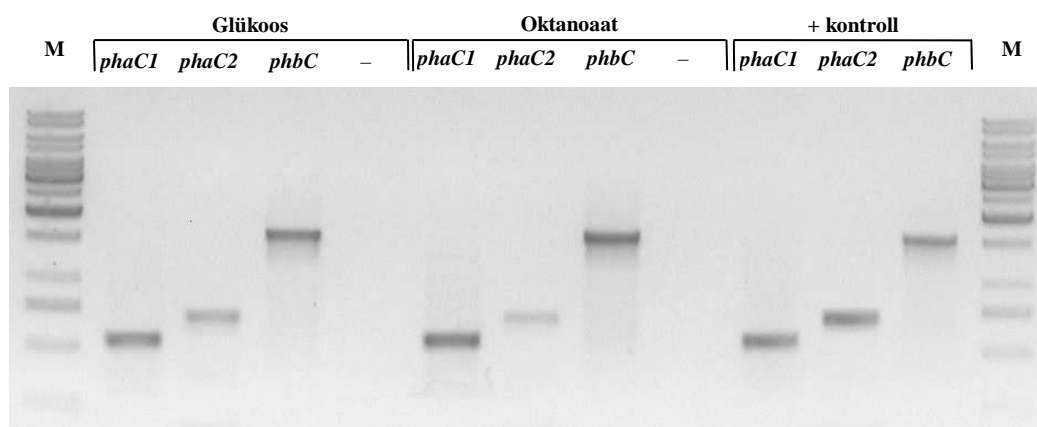


**JOONIS 8:** *Pseudomonas mandelii* PC17 PHA süntees mittelimiteerivates tingimustes oktanoaadil (0,2% v/v). A – PHA monomeerse koostise muutus kasvatusel vältel; B – rakkude arvukus; C – PHA sisaldus rakkude kuivmassis. Joonistel on kujutatud kolme katse keskmist. Lühendid: 3HB – 3-hüdroksübutüraat; 3HH – 3-hüdroksüheksanoaat; 3HO – 3-hüdroksüoktanoaat; 3HD – 3-hüdroksüdekanooat.

Kõigepealt selgub, et tõepoolest algab ka oktanoaadil kasvades PHA süntees eksponentsiaalses kasvufaasis, peale kuue tunni möödumist kasvatusel algusest ning võrreldes kasvatusel glükoosil on PHA protsentuaalne sisaldus isegi kõrgem. Monomeerse koostise muutus on suhteliselt väike, nagu limiteerivates tingimusteski on peamine monomeer kogu aeg 3HO, alates 10. tunnist hakkab tõusma 3HB osakaal. 24 tundi kestnud kasvatusel lõpuks moodustab peaaegu poole bakterimassist PHA.

### 3.5 PHA sünteeside ekspressioon PC17-s

Asjaolu, et glükoosil sünteesitud PHA koosnes peamiselt scl-PHA-st, oktanoaadil sünteesitud PHA aga mcl-PHA-st tekitab küsimuse, kas ka scl- ja mcl-PHA sünteeside ekspressioon erineb sõltuvalt süsinikuallikast. Selleks eraldati 7 tundi kasvanud (glükoosil) või 8 tundi kasvanud (oktanoaadil) rakkudest totaalne RNA ning analüüsiti seda RT-PCR meetodil. Kasutati praimeripaare PhaC1-RNA-F ja -R, PhaC2-RNA-F ja -R ning PhbC-RNA-F ja -R, vastavalt *phaC1*, *phaC2* ja *phbC* amplifitseerimiseks. Tulemused on toodud joonisel 9.



**JOONIS 9: PC17 klass II (*phaC1* ja *phaC2*) ning klass I (*phbC*) sünteeside ekspressioon glükoosil ja oktanoaadil.** M – suurusmarker (*Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder*, Fermentas). Miinusega on tähistatud negatiivne kontroll, kus matriitsina kasutati vastavalt oktanoaadil või glükoosil kasvanud rakkudest eraldatud totaalset RNA-d ning primereid PhaC1-RNA-F ja -R.

Nagu näha, ekspresseeruvad mõlemad mcl-PHA sünteesid ning PHB süntees nii glükoosil kui ka oktanoaadil kasvanud rakkudes. Seega ei tulene erinev mcl- ja scl-PHA osakaal glükoosil või oktanoaadil sünteesitud polümeeris vastavate sünteeside erinevast ekspressioonist. Põhjus võiks peituda hoopis sünteeside paiknemises metaboolsete

voogude suhtes (joonis 4). Glükoosil kasvades on PHA sünteesi seisukohalt olulised metaboolsed vood glükoosist AcCoA-ni, mis on PHB sünteesiraja substraat, sealt rasvhapete biosünteesi ning üle PhaG mcl-PHA sünteesini. Selles voos asub PHB sünteesi-aparaat PhaG-st ülevalpool ning peamine monomeer on 3HB. Seevastu oktanoaadil liiguvad prekursorid esmalt  $\beta$ -oksüdatsiooniratta, kus vastavad ensüümid neid mcl-PHA süntaasidele vahendavad. PHB sünteesiraja substraat AcCoA on  $\beta$ -oksüdatsiooni lõpp-produkt. Seega asuvad mcl-PHA süntaasid ülevalpool ning peamiseks monomeeriks on 3HO.

Mcl-PHA süntaase eraldi vaadates selgub, et nii glükoosil kui ka oktanoaadil kasvavates rakkudes annab *phaC1* intensiivsema signaali kui *phaC2*. Klass II süntaaside ekspressiooni sõltuvalt süsinikuallikast on uuritud *P. corrugata*'s, kus saadi pisut teistsugused tulemused – glükoosil olid indutseeritud mõlemad süntaasid, kuid tugevama signaali andis *phaC2*, oktanoaadil aga ekspresseerus ainult *phaC1* (Conte *et al.*, 2006).

### 3.6 Kasvuseoselisest PHA sünteesist PC17-s

Siiani on kasvuseoselist PHA sünteesi kirjeldatud kuues bakteris. Kõik nad sünteesivad scl-PHA-d. *Pseudomonas mandelii* PC17 on teadaolevalt ainuke bakter, kes sünteesib kasvuseoseliselt scl-mcl-PHA segu ning seda nii sarnastel kui ka mittesarnastel süsinikuallikatel. Glükoosil kasvavates rakkudes tõuseb PHA sisaldus 24 tunniga  $12,8 \pm 0,4\%$ -ni, oktanoaadil  $44,8 \pm 3,8\%$ -ni raku kuivmassist. Glükoosil jääb PC17 teistele kasvuseoselistele PHA sünteesijatele alla, kuid oktanoaadil saavutatud tulemus on madalam ainult *B. mycoides*'e ja *A. vinelandii* omast. Autor on seisukohal, et kasvatustingimusi optimeerides on PHA sisaldust PC17 rakkudes võimalik kindlasti tõsta.

Nii glükoosil kui ka oktanoaadil hakkab PHA sisaldus PC17 rakkudes tõusma peale 6 tunni möödumist kasvatusel algusest. Kuna glükoosil kestab eksponentsiaalne kasvufaas 9, oktanoaadil 12 tundi (joonised 7B ja 8B), näitab see, et oluline on just nimelt kasvatusel algusest möödunud, mitte eksponentsiaalse kasvufaasi lõpuni jäänud ajavahemik. Ka *P. denitrificans*'is PHA sisaldus esimese kuue tunni vältel langes, siis aga hakkas tõusma (Yamane *et al.*, 1996). *A. vinelandii*'s ja *B. mycoides*'es algas PHA süntees vastavalt peale 10. (Page ja Knosp, 1989) ja peale 5. tundi (Thakur *et al.*, 2001).

Mittelimiteerivates tingimustes sünteesib PC17 oktanoaadist 3,5 korda rohkem PHA-d kui glükoosist, samas kui limiteerivates tingimustes on need avud ligikaudu võrdsed (vastavalt 62% ja 65% raku kuivmassist; Ots, 2004). Mingil põhjusel vajab PHA

süntees glükoosist limiteerivaid tingimusi rohkem kui oktanoaadi puhul. Üheks põhjuseks võib siin olla rasvhapete biosünteesiraja vaheühendeid mcl-PHA süntaasile vahendava *phaG* ebapiisav induktsioon. *P. aeruginosa*'s ja *P. putida*'s on näidatud *phaG* ekspresioonitaseme tõusu lämmastiku limitatsiooni korral (Hoffmann ja Rehm, 2004), ehk kehtib sama ka PC17-s. Teisalt on glükoosil kasvades esimene võimalik substraat PHA sünteesiks AcCoA, mis on üks raku keskseid metaboliite ning substraadiks ka mitmetele teistele biosünteesilistele radadele, millega konkureerides PHA biosünteesirada ehk alla jääb.

Kasvuseoseliselt ja limitatsioonis sünteesitud PHA monomeerses koostises seevastu suuri erinevusi ei esine – glükoosil on ikka peamine monomeer 3HB, oktanoaadil 3HO. Scl-PHA ja mcl-PHA süntaaside suhteline panus on seega nii limiteerivates kui ka mittelimiteerivates tingimustes ühesugune.

Kirjanduses on kasvuseoselist PHA sünteesi põhjendatud kas tüve metaboolsete iseärasustega, mis mõjutavad PHA prekursorimolekulide hulka raku, või häirega PHA sünteesi regulatsioonis. PC17-s on tõenäolisem esimene variant. Esmalt viitab sellele asjaolu, et eksponentsiaalses kasvufaasis on aktiivsed mõlema klassi süntaasid, mis asuvad erinevates operonides ning on kirjanduse andmeil ka erinevalt reguleeritud. Kui kasvuseoseline PHA süntees PC17-s oleks põhjustatud regulatsioonihäirest, peaksid mõlemad süsteemid muteerunud olema, mis pole küll võimatu, kuid siiski vähetõenäoline.

Sellele, et kasvuseoselise PHA sünteesi põhjust PC17-s võiks otsida raku metabolismi tasandilt viitab ka asjaolu, et nii glükoosil kui ka oktanoaadil kasvavates rakkudes tõuseb PHA hulk eksponentsiaalses või statsionaarses kasvufaasis olevates rakkudes erineva kiirusega (joonised 7C ja 8C). Sama täheldatakse ka *P. denitrificans*'i puhul (Yamane *et al.*, 1996). Põhjuseks on arvatavasti eksponentsiaalse ja statsionaarse kasvufaasi rakkude erinev metaboolne aktiivsus ja väiksem võimalus metaboolsete pudelikaelade tekkimiseks statsionaarse faasi rakkudes.

Igal juhul on PC17 näol tegu väga huvitava mikroorganismiga ja seda nii teaduslikus kui ka rakenduslikus mõttes. PHA tootmine organismiga, kes teeb seda rakujagunemisega paralleelselt on palju mugavam, kuna puudub vajadus viia kasvatus läbi kahes faasis – esmalt biomassi produktsioon mittelimiteerivates tingimustes ning seejärel PHA süntees limiteerivates tingimustes. Lisaks pakub scl-mcl-PHA segu palju laiemaid rakendusvõimalusi kui puhas PHB, kuna ta on palju elastsem (Madison ja Huisman, 1999).

## KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli iseloomustada *Pseudomonas mandelii* PC17 PHA sünteesi mittelimeerivates tingimustes, võrrelda seda PHA sünteesiga limiteerivates tingimustes ning välja selgitada, kas harvaesineva võime eest sünteesida scl-mcl-PHA segu vastutavad ebataavaliselt laia substraadispetsiifikaga klass II PHA süntaasid või on PC17 genoomis ka scl-monomeeridele spetsiifiline süntaas. Kokkuvõtvalt on töö tulemused järgmised:

- PC17 poolt sünteesitud scl-mcl-PHA segu fraktsioneerimine asetoonis näitas, et tegu ei ole kopolümeeriga, kus scl- ja mcl-monomeerid on omavahel kovalentselt seotud, vaid kahe erineva polümeeri seguga.
- Lisaks varem isoleeritud klass II PHA süntaasidele on PC17 genoomis ka 567 aminohappe pikkune PHA süntaas, mis sarnaneb kõige rohkem klass I PHB süntaasidele organismidest *Pseudomonas* sp. 61-3 (83%), *Pseudomonas* sp. HJ-2 (72,8%) ja *Pseudomonas* sp. 14-3 (72,3%).
- Glükoosil kasvades algab PHA süntees PC17 rakkudes peale kuue tunni möödumist kasvatusel algusest, eksponentsiaalse kasvufaasi lõpus. 24 h pikkuse kasvatusel lõpuks on PHA sisaldus raku kuivmassis  $12,78 \pm 0,35\%$ , sealjuures on esindatud nii scl- kui ka mcl-monomeerid.
- Ka oktanoaadil on PC17 PHA süntees kasvuseoseline, alates samuti peale kuue tunni möödumist kasvatusel algusest. 24 tundi kestva kasvatusel lõpuks moodustab PHA  $44,8 \pm 3,41\%$  raku kuivmassi, sisaldades samuti nii scl- kui ka mcl-monomeere.
- Limiteerivates või mittelimeerivates tingimustes sünteesitud PHA monomeerne koostis on väga sarnane, mis lubab oletada, et nii limiteerivates kui ka mittelimeerivates tingimustes on kummagi klassi PHA süntaaside panus ühesugune. Kasvuseoseliselt sünteesis PC17 oktanoaadist 3,5 korda rohkem PHA-d kui glükoosist, samas kui limiteerivates tingimustes saavutatud polümeerisisaldused olid glükoosil ja oktanoaadil peaaegu võrdsed.
- Pöördtranskriptaas-PCR analüüsiga näidati, et nii glükoosil kui ka oktanoaadil kasvades ekspresseeruvad PC17-s mõlemad, nii klass I kui ka klass II PHA süntaasid. Viimaseid omavahel võrreldes selgub, et mõlemal süsinikuallikal ekspresseeritakse *phaC1*-te rohkem kui *phaC2*-te.

## SUMMARY

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable bioplastics synthesized by a wide variety of bacteria as intracellular carbon and energy storage material. PHAs are divided into short-chain-length (scl) PHAs with monomers comprising of 4-5 carbon atoms and medium-chain length (mcl) PHAs with monomers of 6-16 carbon atoms. PHAs are normally accumulated when carbon is available in excess and some nutrient, such as nitrogen, phosphate, oxygen, magnesium or sulfur, limits growth.

Depending on substrate, intermediates for mcl-PHA formation can be generated via *de novo* fatty acid synthesis and  $\beta$ -oxidation pathways. *De novo* fatty acid biosynthesis is involved during growth on non-related carbon sources such as glucose and gluconate, which are first metabolized to acetyl-CoA. PHA precursors from related carbon sources such as fatty acids are generated via  $\beta$ -oxidation pathway.

The object of the current study was a bacterium *Pseudomonas mandelii* PC17, who is previously shown to synthesize a mixture of scl- and mcl-PHA and to do that on both, related and nonrelated carbon sources. The aims of the work were to characterize PHA synthesis in nonlimiting conditions, compare it to the PHA synthesis in limiting conditions and to find, whether the ability to synthesize a mixture of scl-mcl-PHA comes from type II PHA synthases with unusually broad substrate specificity or is there a scl-PHA synthase in PC17's genome. Data obtained during this research were as follows:

- Acetone fractionation of PHA synthesized by PC17 showed that it is a blend of scl- and mcl-PHA.
- In addition to previously isolated class II PHA synthases PC17 also possesses a class I PHB synthase which is the most similar to respective proteins from *Pseudomonas* sp. 61-3 (83%), *Pseudomonas* sp. HJ-2 (72,8%) and *Pseudomonas* sp. 14-3 (72,3%).
- When grown on glucose, PHA synthesis in PC17 starts at the end of the exponential phase. The polymer accounts for  $12,78 \pm 0,35\%$  of the cell dry weight after 24 h of cultivation and consists of both scl- and mcl-monomers.
- When grown on octanoate, PHA synthesis in PC17 starts also during the exponential phase and after 24 h of cultivation constitutes  $44,8 \pm 3,41\%$  of the cell dry weight, containing also both scl- and mcl-monomers.

- Comparing the composition of PHA synthesized in limiting or in nonlimiting conditions shows, that these are quite similar. It suggests that in both limiting and nonlimiting conditions the contribution of scl- and mcl-PHA synthases into the synthesis of PHA in PC17 is the same. On octanoate the amount of growth-associatedly synthesized PHA is 3,5 times bigger than the amount on glucose. On the other hand, in nonlimiting conditions both carbon sources contribute to synthesis of comparable amount of PHA. It suggests that PHA synthesis from nonrelated carbon sources is more dependent on limitation.
- Scl-PHA as well as mcl-PHA synthases are transcribed on both glucose and octanoate. In both cases *phaC1* gave stronger signal than *phaC2*.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, M. H.** (1959) Bacteriophages. Interscience Publisher Inc., New York; lk 445-447
- Ackermann, J.-U. ja Babel, W.** (1997) Growth-associated synthesis of poly(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of an internal bottleneck. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**: 144-149.
- Aldor, I. S. ja Keasling, J. D.** (2003) Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 475-483.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. ja Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. ja Foglia, T. A.** (2002) The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanolic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 147-153.
- Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Ruiz, J. A. ja Lopez, N. I.** (2004) A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Curr Microbiol* **49**: 170-174.
- Beachop, T., ja Elsdén, S. R.** (1960) The growth of microorganism in relation of their energy supply. *J Gen Microbiol* **23**: 469-477
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. ja Fuller, R. C.** (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1977-1982.
- Burns, D. G., Janssen, P. H., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z., Jensen, G., Rodriguez-Valera, F., Bolhuis, H. ja Dyll-Smith, M. L.** (2007) *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 387-392.
- Conte, E., Catara, V., Greco, S., Russo, M., Alicata, R., Strano, L., Lombardo, A., Di Silvestro, S. ja Catara, A.** (2006) Regulation of polyhydroxyalkanoate synthases (*phaC1* and *phaC2*) gene expression in *Pseudomonas corrugata*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 1054-1062.



- Delamarre, S. C., Chang, H. J. ja Batt, C. A.** (2005) Identification and characterization of two polyhydroxyalkanoate biosynthesis loci in *Pseudomonas* sp. strain 3Y2. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 293-303.
- Dias, J. M., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G., Ramos, A. M., Oliveira, R. ja Reis, M. A.** (2006) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol Biosci* **6**: 885-906.
- Fiedler, S., Steinbuchel, A. ja Rehm, B. H.** (2002) The role of the fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. *Arch Microbiol* **178**: 149-160.
- Fukui, T. ja Doi, Y.** (1997) Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol* **179**: 4821-4830.
- Garrett, R. H., ja Grisham, C. M.** (1995) Biochemistry. Saunders College Publishing; lk 229-232 ja lk 739-744
- Genser, K. F., Renner, G. ja Schwab, H.** (1998) Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis genes from *Alcaligenes latus* DSM1124. *J Biotechnol* **64**: 125-135.
- Gorenflo, V., Steinbuchel, A., Marose, S., Rieseberg, M. ja Scheper, T.** (1999) Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 765-772.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M. ja Jendrossek, D.** (2001) A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *J Biol Chem* **276**: 36215-24.
- Hang, X., Lin, Z., Chen, J., Wang, G., Hong, K. ja Chen, G. Q.** (2002) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1. *FEMS Microbiol Lett* **212**: 71-5.
- Hein, S., Paletta, J. R. ja Steinbuchel, A.** (2002) Cloning, characterization and comparison of the *Pseudomonas mendocina* polyhydroxyalkanoate synthases Phac1 and PhaC2. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 229-236.

- Hoffmann, N. ja Rehm, B. H.** (2004) Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **237**: 1-7.
- Hoffmann, N. ja Rehm, B. H.** (2005) Nitrogen-dependent regulation of medium-chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes in pseudomonads. *Biotechnol Lett* **27**: 279-282.
- Hoffmann, N., Steinbuchel, A. ja Rehm, B. H.** (2000) Homologous functional expression of cryptic *phaG* from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 665-670.
- Huang, R. ja Reusch, R. N.** (1996) Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 22196-22202
- Huijberts, G. N., de Rijk, T. C., de Waard, P. ja Eggink, G.** (1994) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J Bacteriol* **176**: 1661-1666.
- Huijberts, G. N., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G. W. ja Witholt, B.** (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl Environ Microbiol* **58**: 536-544.
- Jendrossek, D. ja Handrick, R.** (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* **56**: 403-432.
- Jurasek, L. ja Marchessault, R. H.** (2004) Polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* cells: a computer simulation. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**: 611-617.
- Kasuya, K., Mitomo, H., Nakahara, M., Akiba, A., Kudo, T. ja Doi, Y.** (2000) Identification of a marine benthic P(3HB)-degrading bacterium isolate and characterization of its P(3HB) depolymerase. *Biomacromolecules* **1**: 194-201.
- Keenan, T. M., Nakas, J. P. ja Tanenbaum, S. W.** (2006) Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**: 616-626.
- Kessler, B. ja Witholt, B.** (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol* **86**: 97-104.
- Kim, T. K., Jung, Y. M., Vo, M. T., Shioya, S. ja Lee, Y. H.** (2006) Metabolic engineering and characterization of *phaC1* and *phaC2* genes from *Pseudomonas*

- putida* KCTC1639 for overproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Biotechnol Prog* **22**: 1541-1546.
- Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlic, A. ja Braunegg, G.** (2007) Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromol Biosci* **7**: 218-226.
- Lee, S. Y., Choi, J., Han, K. ja Song, J. Y.** (1999) Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2762-2764.
- Lee, E. Y., Jendrossek, D., Schirmer, A., Choi, C. Y. Steinbüchel, A.** (1995) Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 901-909
- Liebergessell, M., Rahalkar, S. ja Steinbüchel, A.** (2000) Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 186-194.
- Madison, L. L. ja Huisman, G. W.** (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 21-53.
- Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T. ja Doi, Y.** (2002) A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *J Bacteriol* **184**: 3992-4002.
- Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T. ja Doi, Y.** (1998) Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J Bacteriol* **180**: 6459-6467.
- McCool, G. J., ja Cannon, M. C.** (1999) Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* **181**: 585-592
- Meikar, O.** (2004) *Pseudomonas mandelii* PC17 ja tema polühüdrosüalkanoaadi metabolism. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Miller, J. H.** (1972) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- Miller, E. M. ja Nickoloff, J. A.** (1995) *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol Biol* **47**: 105-113.

- Misra, S. K., Valappil, S. P., Roy, I. ja Boccaccini, A. R.** (2006) Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* **7**: 2249-2258.
- Mothes, G., Ackermann, J. U. ja Babel, W.** (1998) Regulation of poly(beta-hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum* MB 126 growing on methanol or fructose. *Arch Microbiol* **169**: 360-363.
- Ots, M.** (2004) *Pseudomonas mandelii* PC17 polühüdoksüalkanoaat ja polühüdoksüalkanoadi depolümeraas. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Page, W. J. ja Knosp, O.** (1989) Hyperproduction of Poly-beta-Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl Environ Microbiol* **55**: 1334-1339.
- Peoples, O. P. ja Sinskey, A. J.** (1989) Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J Biol Chem* **264**: 15298-15303.
- Potter, M. ja Steinbuchel, A.** (2005) Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* **6**: 552-560.
- Prieto, M. A., Buhler, B., Jung, K., Witholt, B. ja Kessler, B.** (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J Bacteriol* **181**: 858-868.
- Qi, Q., Rehm, B. H. ja Steinbuchel, A.** (1997) Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 155-162.
- Reddy, C. S., Ghai, R., Rashmi ja Kalia, V. C.** (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol* **87**: 137-146.
- Rehm, B. H.** (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J* **376**: 15-33.
- Rehm, B. H.** (2006) Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnol Lett* **28**: 207-213.
- Rehm, B. H., Kruger, N. ja Steinbuchel, A.** (1998) A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The *PHAG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. *J Biol Chem* **273**: 24044-24051.

- Salehizadeh, H. ja Van Loosdrecht, M. C.** (2004) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol Adv* **22**: 261-279.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., ja Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schubert, P., Kruger, N. ja Steinbuchel, A.** (1991) Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. *J Bacteriol* **173**: 168-175.
- Solaiman, D. K. ja Ashby, R. D.** (2005) Genetic characterization of the poly(hydroxyalkanoate) synthases of various *Pseudomonas oleovorans* strains. *Curr Microbiol* **50**: 329-333.
- Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Steinbuchel, A., ja Lütke-Eversloh, T.** (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Eng J* **16**: 81-96
- Steinbuchel, A., ja Wiese, S.** (1992) A *Pseudomonas* strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 691-697
- Sudesh, K., Abe, H., ja Doi, Y.** (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **25**: 1503-1555
- Sun, J., Peng, X., Van Impe, J. ja Vanderleyden, J.** (2000) The *ntrB* and *ntrC* genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Appl Environ Microbiol* **66**: 113-117.
- Zhang, G., Hang, X., Green, P., Ho, K. P. ja Chen, G. Q.** (2001) PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett* **198**: 165-170.
- Zinn, M., Witholt, B. ja Egli, T.** (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev* **53**: 5-21.

- Thakur, P. S., Borah, B., Baruah, S. D. ja Nigam, J. N.** (2001) Growth-associated production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus mycoides*. *Folia Microbiol (Praha)* **46**: 488-494.
- Timm, A. ja Steinbuchel, A.** (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3360-3367.
- Timm, A. ja Steinbuchel, A.** (1992) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem* **209**: 15-30.
- Tsuge, T., Fukui, T., Matsusaki, H., Taguchi, S., Kobayashi, G., Ishizaki, A. ja Doi, Y.** (2000) Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 193-198.
- Wang, Z., Itoh, Y., Hosaka, Y., Kobayashi, I., Nakano, Y., Maeda, I., Umeda, F., Yamakawa, J., Nishimine, M., Suenobu, T., Fukuzumi, S., Kawase, M. ja Yagi, K.** (2003) Mechanism of enhancement effect of dendrimer on transdermal drug permeation through polyhydroxyalkanoate matrix. *J Biosci Bioeng* **96**: 537-540.
- Witholt, B. ja Kessler, B.** (1999) Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 279-285.
- Xi, J., Wu, Q., Yan, Y., Zhang, Z., Yu, P. H., Cheung, M. K., Zhang, R. ja Chen, G. Q.** (2000) Hyperproduction of polyesters consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**: 43-49.
- Yamane, T., Chen, X. ja Ueda, S.** (1996) Growth-Associated Production of Poly(3-Hydroxyvalerate) from n-Pentanol by a Methylophilic Bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 380-384.
- Yao, J., Zhang, G., Wu, Q., Chen, G. Q. ja Zhang, R.** (1999) Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**: 345-349.

## LISA 1

*Pseudomonas mandelii* PC17 PHB polümeraasi geeni nukleotiidne järjestus (ülemine rida) ja selle põhjal tuletatud valgujärjestus (alumine rida). Transleerimiseks kasutati programmi *Bioedit*. Kastiga on tähistatud oletatav lipaasboks.

1	ATG	GAC	AAT	TAC	GCA	CAC	ACA	TTC	AAC	ACC	TTC	TGG	TCC	GGC	CAG	45
1	M	D	N	Y	A	H	T	F	N	T	F	W	S	G	Q	15
46	GTT	CCG	TTC	GTT	GCC	TCT	TTT	GCA	GTG	CAA	CAG	TTA	CGT	CTG	TGG	90
16	V	P	F	V	A	S	F	A	V	Q	Q	L	R	L	W	30
91	GTC	GCT	ACC	AAT	CCG	TGG	TTC	ACC	GGG	CAA	GAC	CAT	GAC	GCC	TGG	135
31	V	A	T	N	P	W	F	T	G	Q	D	H	D	A	W	45
136	TTC	GAC	GTG	CCA	CGC	AGC	ACC	CTG	GAC	AGC	CTT	CAG	TCG	GAT	TAT	180
46	F	D	V	P	R	S	T	L	D	S	L	Q	S	D	Y	60
181	CAT	CAG	CAA	TGG	GCT	GAA	CTC	GGC	CAG	CGT	TTG	CTG	ACT	GGA	CAG	225
61	H	Q	Q	W	A	E	L	G	Q	R	L	L	T	G	Q	75
226	GCC	TTT	ACC	TTC	GAC	GAC	CGC	CGG	TTC	GCC	AGC	GGT	AAC	TGG	AGC	270
76	A	F	T	F	D	D	R	R	F	A	S	G	N	W	S	90
271	CAG	CCG	TTG	TTT	GGT	TCC	CTC	GCC	GCG	TTT	TAC	CTG	CTC	AAT	GCC	315
91	Q	P	L	F	G	S	L	A	A	F	Y	L	L	N	A	105
316	GGT	TTT	CTG	CTG	AAG	CTG	CTC	GAC	CTG	CTG	CCG	ATC	GAG	GAC	AAG	360
106	G	F	L	L	K	L	L	D	L	L	P	I	E	D	K	120
361	AAA	CCA	CGT	CAG	CGT	CTG	TTG	TAT	CTG	GTG	GAG	CAA	GCG	ATC	GCC	405
121	K	P	R	Q	R	L	L	Y	L	V	E	Q	A	I	A	135
406	GCC	GCT	GCC	CCG	AGC	AAT	TTC	CTG	GCC	AGC	AAT	CCC	GAC	GCG	CTG	450
136	A	A	A	P	S	N	F	L	A	S	N	P	D	A	L	150
451	CAA	CGG	CTG	GTC	GAC	ACC	CAG	GGC	AGC	AGC	CTG	GTC	ACC	GGT	CTG	495
151	Q	R	L	V	D	T	Q	G	S	S	L	V	T	G	L	165
496	ATG	CAC	CTG	GCC	GCC	GAC	CTG	CAG	GAA	GGC	AAG	ATG	CGC	CAG	TGC	540
166	M	H	L	A	A	D	L	Q	E	G	K	M	R	Q	C	180
541	GAC	GCC	GCT	GCT	TTC	AAA	GTG	GGT	GTC	GAC	CTG	GCC	AAT	ACC	CCT	585
181	D	A	A	A	F	K	V	G	V	D	L	A	N	T	P	195
586	GGC	GAA	GTG	GTC	TTC	GAG	AAC	GAA	CTG	TTC	CAG	CTT	CTC	CAG	TAC	630
196	G	E	V	V	F	E	N	E	L	F	Q	L	L	Q	Y	210
631	TAT	CCG	CAA	AGC	GAA	ACC	CAA	TAC	CGG	CGC	CCG	GTG	TTT	ATC	GTG	675
211	Y	P	Q	S	E	T	Q	Y	R	R	P	V	F	I	V	225
676	CCG	CCA	GCG	ATC	AAC	AAG	TTC	TAC	ATC	CTC	GAC	CTG	CGT	CCG	GAC	720
226	P	P	A	I	N	K	F	Y	I	L	D	L	R	P	D	240
721	AAC	TCG	ATG	GTT	CGC	CAT	CTG	TTG	CAG	CAG	GGC	CAC	CCG	GTG	TTC	765
241	N	S	M	V	R	H	L	L	Q	Q	G	H	P	V	F	255
766	CTG	ATG	TCC	TGG	CGC	AAC	TTC	GAC	CCG	GCA	CAC	GCC	GGC	ACC	ACC	810
256	L	M	S	W	R	N	F	D	P	A	H	A	G	T	T	270
811	TGG	GAT	GAC	CTG	GTC	GAA	ACC	GGC	ATT	ATC	AAA	GGC	TTG	CAG	GTG	855
271	W	D	D	L	V	E	T	G	I	I	K	G	L	Q	V	285

856	ACC	CGC	GAA	ATC	AGC	GGC	GAG	CAA	CGG	CCC	AAC	TGC	GTG	GGC	TTC	900
286	T	R	E	I	S	G	E	Q	R	P	N	C	V	G	F	300
901	TGC	ATC	GGC	GGC	ACG	CTG	CTG	GGT	TCG	GCG	CTG	GCC	GTA	TTG	GCG	945
301	C	I	G	G	T	L	L	G	S	A	L	A	V	L	A	315
946	GCC	CGC	GGC	GAC	AAG	GAC	ATC	GCC	AGC	GTC	AGC	CTG	CTG	ACC	ACT	990
316	A	R	G	D	K	D	I	A	S	V	S	L	L	T	T	330
991	TTC	CTC	GAT	TAC	CTC	GAT	ACC	GGT	CCG	ATC	GAT	ATC	TTC	GTC	GAC	1035
331	F	L	D	Y	L	D	T	G	P	I	D	I	F	V	D	345
1036	GAG	CAA	CTG	GTG	GCC	TAC	CGC	GAG	CGC	ACC	ATT	GGC	GGC	GTC	AAT	1080
346	E	Q	L	V	A	Y	R	E	R	T	I	G	G	V	N	360
1081	GGC	CCC	ATC	GGC	CTG	TTC	AAG	GGC	GAG	GAC	ATG	GGC	AAT	ACC	TTC	1125
361	G	P	I	G	L	F	K	G	E	D	M	G	N	T	F	375
1126	TCG	CTG	CTG	CGC	CCC	AAC	GAC	CTG	TGG	TGG	AAC	TAC	AAC	GTC	GAC	1170
376	S	L	L	R	P	N	D	L	W	W	N	Y	N	V	D	390
1171	AAA	TAC	CTC	AAG	GGG	CAG	AAA	CCG	ATC	CCG	CTG	GAT	CTG	CTG	TTC	1215
391	K	Y	L	K	G	Q	K	P	I	P	L	D	L	L	F	405
1216	TGG	AAC	AAC	GAC	AGC	ACC	AAC	CTG	CCA	GGG	CCG	ATG	TAC	TGC	TGG	1260
406	W	N	N	D	S	T	N	L	P	G	P	M	Y	C	W	420
1261	TAC	CTG	CGC	CAC	ACC	TAT	TTG	CAG	AAC	GAC	CTG	AAA	TCC	GGT	GAC	1305
421	Y	L	R	H	T	Y	L	Q	N	D	L	K	S	G	D	435
1306	CTG	GAT	TGC	TGC	GGG	GTC	AAG	CTG	GAC	CTG	CGC	GCT	ATC	GAT	GCC	1350
436	L	D	C	C	G	V	K	L	D	L	R	A	I	D	A	450
1351	CCG	GCC	TAC	ATC	CTC	GCC	ACC	CAT	GAC	GAC	CAC	ATC	GTG	CCA	TGG	1395
451	P	A	Y	I	L	A	T	H	D	D	H	I	V	P	W	465
1396	CGG	AGC	GCT	TAC	GCC	AGC	ACC	GAT	TTG	CTC	TCC	GGC	ACC	AAG	CGC	1440
466	R	S	A	Y	A	S	T	D	L	L	S	G	T	K	R	480
1441	TTC	GTG	CTT	GGT	GCC	TCG	GGG	CAT	ATC	GCC	GGC	GTG	ATC	AAT	CCA	1485
481	F	V	L	G	A	S	G	H	I	A	G	V	I	N	P	495
1486	CCG	GCC	AAG	GAA	AAA	CGC	CAC	TAC	TGG	ACC	AAC	GAC	CAG	GTC	AAC	1530
496	P	A	K	E	K	R	H	Y	W	T	N	D	Q	V	N	510
1531	CAG	GAC	CCG	GAA	AGC	TGG	TTC	GGC	AAT	GCC	AAA	CAG	CAT	CCA	GGC	1575
511	Q	D	P	E	S	W	F	G	N	A	K	Q	H	P	G	525
1576	AGC	TGG	TGG	AAC	GAT	TGG	TTC	GTA	TGG	CTG	GCC	GAT	CAG	GCC	GGG	1620
526	S	W	W	N	D	W	F	V	W	L	A	D	Q	A	G	540
1621	GAA	CGC	CAG	CCT	GCG	ATA	GCG	CAC	GCC	GGT	TAC	GAG	CAG	TAC	CCG	1665
541	E	R	Q	P	A	I	A	H	A	G	Y	E	Q	Y	P	555
1666	CCG	CTG	GAA	CCG	GCA	CCT	GGA	AGT	TAT	GTG	AAG	CAG	TGA			1704
556	P	L	E	P	A	P	G	S	Y	V	K	Q	*			567