

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Ingrem Metsik

**Bakteripopulatsioonide evolutsioneerumine *m*-kresooli sisaldavas  
keskkonnas**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Ph.D. Maia Kivisaar

M.Sc. Tanel Ilmjärv

TARTU 2015

## Sisukord

Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	5
1. Kirjanduse ülevaade .....	6
1.1 Muutused bakteris aromaatsete ühenditega kokkupuutel.....	6
1.2 Fenoolsed ühendid.....	6
1.2.1 <i>m</i> -kresooli lagundamine.....	7
1.3 Mutatsioonid ja nende tekkemehhanismid .....	8
1.4 Adapteerumine ja stressiga toimetulek.....	9
1.4.1 SOS-vastus.....	10
1.4.2 Üldine stressivastus .....	10
1.4.3 „Poomisvastus“ .....	10
1.5 Oksüdatiivne stress.....	11
1.5.1 Oksüdatiivse stressi vastus .....	12
1.6 Adaptiivne laboratoorne evolutsioon .....	12
2. Eksperimentaalosa .....	15
2.1 Töö eesmärgid .....	15
2.2 Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1 Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid .....	17
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	18
2.2.3 Geelelektroforees .....	18
2.2.4 Bakterite elektroporatsioon.....	19
2.2.5 Bakterite konjugatsioon .....	19
2.2.6 <i>m</i> -kresooli (Cre <sup>+</sup> ) lagundaja konstrueerimine ja selekteerimine.....	19
2.2.7 Cre <sup>+</sup> tüve fenotüübilise stabiilsuse määramine .....	20
2.2.8 Evolutsioneerumise katse .....	20
2.2.9 Glükoosi tarbimise mõõtmine.....	21
2.2.10 <i>m</i> -kresooli tarbimise mõõtmine .....	21
2.2.11 Aromaatsete ühendite lagundajate osakaalu määramine populatsioonis.....	22
2.2.12 Rakulüsaadi valmistamine .....	22
2.2.13 Katehooli-2,3-dioksügenaasi eriaktiivsuse määramine .....	23
2.2.14 <i>P. putida</i> Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine .....	23
2.2.15 <i>m</i> -kresooli kontsentratsiooni taluvuse määramine.....	24
2.3 Tulemused .....	25

2.3.1 <i>m</i> -kresooli lagundaja konstrueerimine .....	25
2.3.2 Cre <sup>+</sup> tüve fenotüübiline stabiilsus mitteselektiivsetes tingimustes .....	26
2.3.3 Cre <sup>+</sup> tüvede evolutsioneerumise katse <i>m</i> -kresooli sisaldavas kasvukeskkonnas .....	27
2.3.4 Muutused <i>m</i> -kresooli ja glükoosi lagundamise võimekuses evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides.....	28
2.3.5 Muutused <i>meta</i> -raja ekspressioonitasemes evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides.....	31
2.3.6 Fenooli, <i>m</i> -toluaadi ja <i>m</i> -kresooli lagundajate osakaal evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides.....	32
2.3.7 2,5 mM ja 5 mM <i>m</i> -kresooli sisaldavas keskkonnas evolutsioneerunud bakteripopulatsioonide <i>m</i> -kresooli kontsentratsiooni taluvus .....	33
2.3.8 <i>m</i> -kresooli mõju mutatsioonisagedusele evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides.....	34
2.4 Arutelu .....	37
Kokkuvõte .....	41
Resume .....	43
Kasutatud kirjandus .....	45

## Kasutatud lühendid

ALE – adaptiivne laboratoorne evolutsioon

Amp – ampitsilliin

Bp – bensüülpenitsilliin

C23O – katehhooli-2,3-dioksügenaas

CAA – *casamino acids*

CoA – koensüüm A

dNTP – tähistab nelja desoksüribonukleotiidi: dATP, dTTP, dGTP, dCTP

EDTA – etüleen-diamiin-tetra atsetaat

Glc – glükoos

GO ehk 8-oxoG – 8-oksoguaaniin

Km – kanamütsiin

LB – lüsogeenne sööde

Cre – *m*-kresool

MMR – DNA valepaardumise reparatsioon (ingl. k. *mismatch repair*)

Tol – *m*-toluaat

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

Phe – fenool

Pol – polümeraas

ppGpp – guanosiintetrafosfaat

Rif – rifampitsiin

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid

SOD – superoksiid dismutaas

## Sissejuhatus

Inimtegevuse tõttu vabaneb ökosüsteemi erinevaid saasteaineid, mis suurtes kontsentratsioonides on elusorganismidele toksilised. Erinevad ksenobiootikumid ehk mittelooduslikud reoained on biosfäärile võõra keemilise struktuuriga, mistõttu võivad nad muutuda organismidele toksiliseks. Ksenobiootikumide eemaldamine keskkonnast toimub füüsikalise-keemiliste ja bioloogiliste protsesside abil aeglaselt. Seega on peamine strateegia saasteainete hulga vähendamiseks elusorganismide kasutamine ja detoksifitseerimise võimalustega manipuleerimine (bioremediatsioon) (Diaz, 2004). Kuna enamasti on need aromaatsed ühendid uudsed, puuduvad paljudes bakterites nende lagundamiseks vajalikud kataboolsed rajad. Kokkupuude aromaatsete ühenditega võib kahjustada bakteri membraani, mis põhjustab bakterites oksüdatiivset stressi. Membraani kahjustuste tõttu suureneb rakus reaktiivsete hapnikuühendite hulk, mis võivad DNA-d oksüdeerides põhjustada mutatsioone või letaalseid kahjustusi. Tekkivad mutatsioonid võivad olla bakterile kahjulikud, neutraalsed või vähesel määral kasulikud, millest viimased võivad anda bakterile uues keskkonnas eelise ja soodustada kiiremat kohanemist.

Suurenenud mutatsioonisagedus võib olla põhjustatud kas teatud DNA reparatsioonisüsteemide defektsusest (stabiilsed mutaatorid) või DNA kahjustusi tekitavatest kemikaalidest või kiirgusest (indutseeritud mutaatorfenotüüp). Mutaatorite hulk suureneb populatsioonis olukorras, kus bakterid on tugeva selektiivse surve all ning kus saavad eelise rakud, milles on toimunud mitu mutatsiooni. Seda on näidatud kroonilisi infektsioone põhjustavate bakterite puhul. Kas sama kehtib ka saasteaineid lagundavate bakterite evolutsioneerumise puhul, ei ole seni uuritud.

Käesolevas töös on antud ülevaade aromaatsete ühendite lagundamisest ja sellega seotud stressist bakterites. Samuti on käsitletud stressiga seotud mutatsiooniprotsesse. Töö eksperimentaalses osas uurisime bakteripopulatsioonide evolutsioneerumise mehhanisme bakteritele toksilist aromaatsset ühendit *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas. Viisime läbi laboratoorse evolutsioneerumise katse, kus võrdlesime bakteri *Pseudomonas putida* populatsioonides toimunud muutusi, kus ühel juhul olid bakteritesse viidud *m*-kresooli lagundamiseks vajalikud geenid ning teisel juhul need puudusid. Lisaks selgitasime, kuidas mõjutab *m*-kresooli olemasolu keskkonnas mutaatorite esinemist evolutsioneeruvates bakteripopulatsioonides.

Märksõnad: evolutsioneerumine, aromaatsed ühendid, mutatsiooniprotsessid, ALE

## 1. Kirjanduse ülevaade

### 1.1 Muutused bakteris aromaatsete ühenditega kokkupuutel

Bakterid puutuvad elu jooksul kokku erinevate toksiliste ühenditega. Aromaatsed ühendid ehk areenid on termodünaamiliselt stabiilsed ja seetõttu keskkonnas püsivad (Diaz, 2004). Kokkupuude ksenobiootikumidega võib bakteritele tekitada stressi, mille tulemusena toimuvad erinevad biokeemilised ja molekulaarsed muutused, mis soodustavad uute tingimustega kohanemist. Enamasti on vastuseks muutused geenide ekspressioonitasemes. Aktiveeritakse gene, mille produktid aitavad bakteril toime tulla füüsikalis-keemilise stressiga (Ramos jt., 2001). Geenid, mille ekspressioonitase sõltub aromaatsete ühendite hulgast, võib jaotada kahte gruppi. Esimese grupi moodustavad geenid, mis kodeerivad aromaatsete ühendite vastaste kaitsemehhanismidega seotud valke, ning teise grupi geenid, mis on seotud toksiliste ühendite lagundamisega (Ramos jt., 2009). Paljud aromaatsed ühendid on mikroorganismidele toksilised, kuna võivad seonduda rakkudega ja seeläbi muuta membraanide struktuuri ja funktsionaalsust.

Aromaatsete ühendite ja teiste toksiliste solventide akumulatsiooni vältimiseks muudavad bakterid lisaks membraani komponentidele ja hüdrofoobsusele ka membraani voolavust (küllastunud/küllastumata rasvhapete suhe ja *cis-trans* isomerisatsioon) (Ramos jt., 2001). Kirjanduses on näidatud, et teatud liigid (näiteks *P. putida* DOT-T1E) on võimelised kasvama kõrge kontsentratsiooniga aromaatses ühendi juuresolekul, mis teistel takistab kasvu. Aromaatses ühendi tolereerimiseks on sellistel bakteritel väljavoolu (ingl. k. *efflux*) pumbad, mis väljutavad orgaanilisi lahusteid. Lisaks sellele suureneb aromaatses ühendi juuresolekul ka kemotaksisega seotud valkude ekspressioonitase (Diaz jt., 2013).

### 1.2 Fenoolsed ühendid

Fenoolsed ühendid on ühed peamised aromaatsed keskkonnasaastajad, mida tekib paljude tööstuslike protsesside tagajärjel, nagu näiteks õli ja õliproduktide, terase, lõhkeainete ja värvi tootmisel. Lisaks on nende allikaks ka kummisaaduste tootmine ja ümbertöötlemine ning tekstiilitööstus. Fenoolsed ühendid on enamike mikroorganismide jaoks toksilised ning kõrgetes kontsentratsioonides võivad inhibeerida ka aromaatses ühendeid lagundavate mikroobide kasvu (Krastanov jt., 2012).

Üheks paljudest fenoolsetest ühenditest, mida võib keskkonda sattuda, on *m*-kresool ehk 3-metüülfenool. Viimane tekib näiteks söe gaasistamisest ja petrooleumijääkidest, kuid samas ka paljude sünteetiliste protsesside tagajärjel. Kuigi on leitud, et *m*-kresool on üheks põhjavee

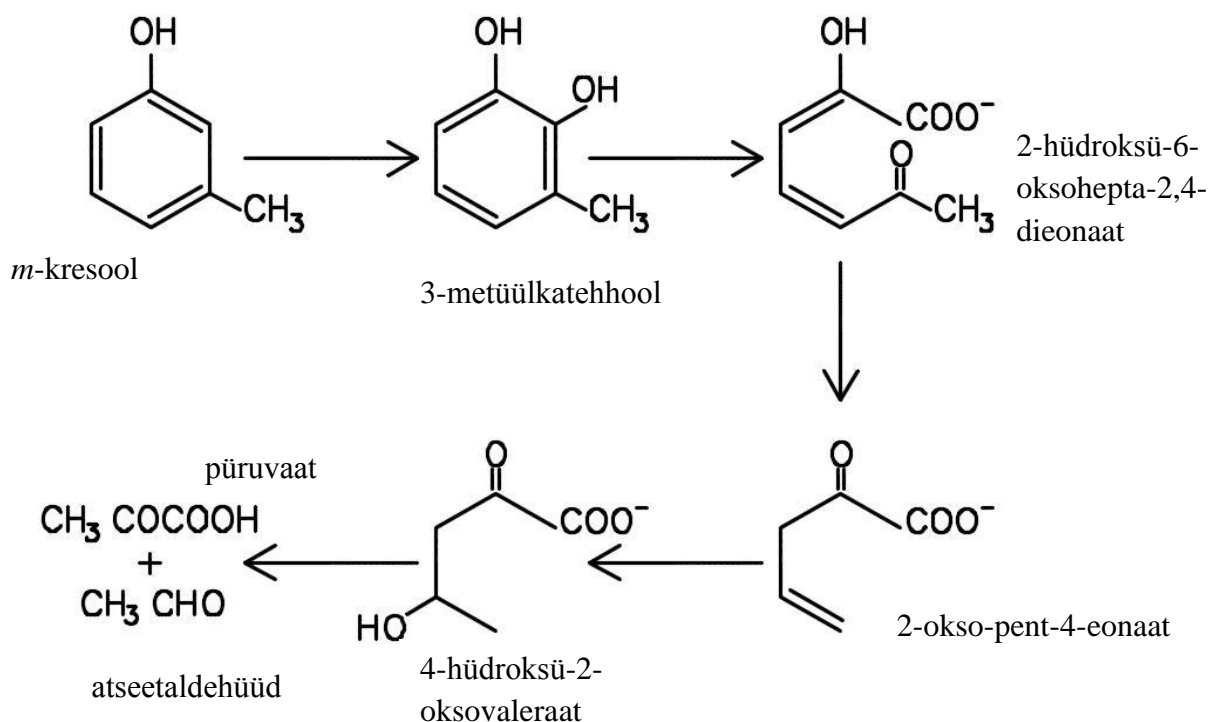
saastajaks, kasutatakse seda näiteks sünteetilise vitamiin E ja pestitsiidide tootmisel (Müller jt., 1999).

### 1.2.1 *m*-kresooli lagundamine

Kirjanduses on näidatud, et *m*-kresooli lagundavad mitmed erinevad elusorganismid, nagu näiteks seened (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* jt.), pärm *Candida tropicali*, bakteritest perekonna *Pseudomonas* liigid ning ka paljud teised bakterid nagu näiteks *Alcaligenes faecalis*, *Desulfobacterium cetonicum* (Ren jt., 2014; Yao jt., 2011).

*m*-kresooli on võimalik lagundada nii anaeroobselt kui ka aeroobselt. Anaeroobsel lagundamisel arvatakse olevat kaks erinevat võimalust: 1) metüülgrupi hüdroksüleerimine, mille tagajärjel tekib 3-hüdroksübensüülalkohol, mis omakorda oksüdeeritakse 3-hüdroksübensoaadiks ja 2) *para*-karboksülatsioon, kus moodustub 4-hüdroksü-2-metüülbensoaat. Anaeroobse lagundamise heaks näiteks on *Desulfobacterium cetonicum*, kes suudab oksüdeerida *m*-kresooli, kui elektronaktseptoriks on sulfaat. Lagundamine sarnaneb anaeroobsele tolueni lagundamisele. Esmalt lagundatakse 3-metüülfenool 3-hüdroksübensüülsuktsinaadiks. Arvatakse, et selleks on vajalik fumaraat, mis aktiveerib metüülrühma. Seejärel konverteeritakse tekkinud vaheühend 3-hüdroksübensüülCoA-ks. Selleks on vajalik NAD(P), FAD ja CoA doonori olemasolu, milleks võib olla suktsinüül-CoA (Müller jt., 1999).

*m*-kresooli aeroobne lagundamine algab selle hüdroksüleerimisest 3-metüülkatehhooliks, milleks on vaja molekulaarse hapniku ja NADPH osalust (Sala-Trepat jt., 1972). 3-metüülkatehhooli edasiseks oksüdeerimiseks on bakteritel *orto*- ja *meta*-rada. Kuna 3-metüülkatehhooli lagundamisel *orto*-raja kaudu tekivad toksilised vaheühendid, mida edasi ei lagundata, toimub *m*-kresooli lagundamine peamiselt *meta*-rada mööda. Lagundamise lõppproduktidena tekivad Krebssi tsükli vaheühendid (Diaz, 2004; Ren jt., 2014). Aeroobselt suudab 3-metüülfenooli lagundada näiteks *Pseudomonas putida* tüvi NCIB 10015 (tuntud ka kui *P. putida* U), mis lõpeb püruvaadi ja atseetaldehüüdi tekkimisega. *Meta*-raja võtmeensüümiks on katehhooli-2,3-dioksügenaas, mis viib läbi aromaatses tuuma avamisetappe (Hopper jt., 1974; Sala-Trepat jt., 1972). *m*-kresooli lagundamise etapid on täpsemalt toodud Joonisel 1.



**Joonis 1.** *m*-kresooli lagundamine *meta*-rada mööda (Sala-Trepat jt., 1972, modifitseeritud)

2009. aastal kirjeldas Y. Ren tüve, mis suudab *m*-kresooli lagundada ka läbi *orto*-raja. *Citrobacter farmeri* SC01 lagundab *m*-kresooli läbi tüüpiliste *orto*-lõikusraja metaboliitide (3-hüdroksübensoehape, *cis,cis*-mukonaat ja mukonlaktoon) (Ren jt., 2009; Ren jt., 2014). Kuigi *orto*-lõikusraja tagajärjel tekivad ühendid on toksilised, võib olla bakteris kujunenud lisarada nende ühendite lagundamiseks.

### 1.3 Mutatsioonid ja nende tekkemehhanismid

Mutatsioonid on muutused DNA nukleotiidses järjestuses ja seega geneetilise varieeruvuse allikad, mis võimaldavad organismidel areneda ja uute keskkonnatingimustega kohaneda. Mutatsioonid võivad olla organismile kasulikud, neutraalsed või kahjulikud (Barrick ja Lenski, 2013) ning jaotuvad vastavalt oma tekkemehhanismile kahte rühma: spontaansed ja indutseeritud.

Spontaansed mutatsioonid tekivad peamiselt DNA replikatsiooni vigade tõttu, mis jäävad DNA reparatsioonisüsteemide poolt parandamata. Lisaks põhjustavad spontaanseid mutatsioone ka endogeensed DNA-d kahjustavad tegurid, nagu näiteks reaktiivsed hapnikuühendid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ), mis võivad põhjustada DNA oksüdatiivseid kahjustusi.

Indutseeritud mutatsioonid tekivad mutageenide toimel, mille toimemehhanismid varieeruvad, ja põhjustavad nii asendus- kui ka raaminihkemutatsioone. Mutageenidena



toimivad UV-kiirgus, alküülivad ühendid (näiteks etüülmetaansulfonaat, EMS), lämmastikaluste analoogid (näiteks 5-bromouratsiil) ja interkaleeruvad ühendid (Najafi jt., 2013).

#### **1.4 Adapteerumine ja stressiga toimetulek**

Looduslikus keskkonnas peavad bakterid kohanema pidevalt muutuva/uue keskkonnaga, mis tihtipeale põhjustab stressi ja suunab bakterid statsionaarsesse faasi. Stressi põhjuseks võib olla toitainete puudus, liiga kõrge või madal temperatuur ning muutlik pH (Babu, 2006; Kivisaar, 2010; Nyström, 2004).

Kohanemine stressitingimustega võib toimuda kas läbi reguleeritud adapteerumise või mutageneesi abil. Sattudes uude keskkonda, toimuvad kõigepealt adaptiivsed muutused, mis võimaldavad bakteritel stressitingimused üle elada. Need muutused on peamiselt seotud reguleeritud mehhanismidega, mis mõjutavad geenide ekspressiooni (Hottes jt., 2013; Ryall jt., 2012).

Stressitingimused indutseerivad bakterites ka genoomseid muutuseid, mille tagajärjel tõusevad aeg-ajalt esile kohasemad (ingl. k. *fitter*) mutandid (Kivisaar, 2010). Stressis olevatel bakteritel võib esineda mutatsioonisageduse tõusu, mis üldjoontes kiirendab adapteerumist, kuna suureneb ka võimalike kasulike mutatsioonide hulk (Ryall jt., 2012). Muutlikus keskkonnas võidakse eelistada sellised baktereid, kellel on konstitutiivselt kõrge mutatsioonisagedus (Bjedov, 2003). Sageli on kõrge mutatsioonisagedus seotud mõne DNA reparatsiooniraja defektsusega. Näiteks DNA valepaardumise reparatsiooniraja (ingl. k. *mismatch repair*, MMR) defektsus võib tõsta mutatsioonisagedust rohkem kui 100 korda (Ryall jt., 2012). Mutaatorite osakaal suureneb populatsioonis olukorras, kus bakterid on tugeva selektiivse surve all ja kus eelise saavad rakud, milles on toimunud mitu mutatsiooni. Seda on näidatud kroonilisi infektsioone põhjustavate bakterite puhul. Näiteks 30-lt tsüstilise fibroosi patsiendilt isoleeritud 128-st *P. aeruginosa* isolaadist olid 19,5% mutaatorfenotüübiga. Enamasti oli tegemist mutatsioonidega *mutS* geenis, mis osaleb MMR rajal, kuid leiti ka *mutY* defektseid tüvesid, kus ei toimi DNA oksüdatiivsete kahjustuste reparatsioon (Oliver jt., 2000). Teisalt, kuna enamik mutatsioone on kahjulikud, siis suure hulga mutatsioonide akumulatsioon võib vähendada organismide kohasust (ingl. k. *fitness*) ja seetõttu ei ole kõrge mutatsioonisagedus kasulik adapteerunud populatsioonis (Jayaraman, 2011; Galhardo jt., 2007).

Lisaks konstitutiivsetele mutaatoritele, esineb looduslikus keskkonnas ka baktereid, kelle mutatsioonisageduse tõus on ajutine ning indutseeritud vastusena stressile. Stressivastused on näiteks SOS-vastus, üldine stressivastus ja „poomisvastus“ (ingl. k. *stringent response*) (Ryall jt., 2012). Alljärgnevalt kirjeldan erinevaid stressivastuseid täpsemalt.

#### 1.4.1 SOS-vastus

DNA kahjustuse korral indutseeritakse bakteris SOS-vastus. SOS-vastuse üheks aktiveerijaks on DNA kahjustused, mis peatavad DNA replikatsiooni ja seeläbi tekivad üksikahelalised DNA (ssDNA) piirkonnad, mille tunneb ära bakteriaalne rekombinaas RecA. ssDNA ja RecA moodustavad nukleoproteiinse kompleksi, mis aktiveerib LexA repressori autoproteolüüsi. LexA lagunemise tõttu lõppeb SOS operoni kuuluvate geenide vaigistamine. SOS-vastuse kontrolli all on palju gene, millelt kodeeritavad ensüümid on seotud DNA parandamise, rekombinatsiooni ja kahjustustest ülesünteesiga (ingl. k. *translesion DNA synthesis*, TLS). Lisaks paljudele teistele geenidele indutseeritakse DNA kahjustuse korral bakteris *E. coli* kolm stressispetsiifilist DNA polümeraasi. Kahel neist (Pol IV ja Pol V) puudub vigu korrigeeriv 3'-5' eksonukleasne aktiivsus ja seetõttu on nende poolt läbiviidav replikatsioon vigaderohke (Foster, 2007; Kivisaar, 2010; Ryall jt., 2012).

#### 1.4.2 Üldine stressivastus

Statsionaarses faasis või toitainete puuduses indutseeritakse üldine stressivastus, mida kontrollib RNA polümeraasi sigma faktor RpoS. Statsionaarses faasis suureneb rakus aktiivse RpoS hulk järsult, mille tulemusena suureneb transkriptsiooni tase spetsiifiliselt RpoS poolt ära tuntavatelt promootoritelt ning transkribeeritakse stresstingimustes ellujäämiseks vajalikke gene. Bakteris *E. coli* suurendab RpoS-sõltuv üldine stressivastus spontaansete mutatsioonide tekkesagedust kahel moel: veaalti (ingl. k. *error-prone*) DNA polümeraasi Pol IV ja Pol V ekspressiooniga ning MMR ensüümide repressiooniga. Kuigi MMR on aktiivne ka statsionaarse faasi rakkudes, on geenide *mutL* ja *mutS* ekspressioon madalam võrreldes eksponentsiaalse faasi rakkudega ja seega parandatakse DNA sünteesil tekkivaid vigu väiksema efektiivsusega (Foster, 2007).

#### 1.4.3 „Poomisvastus“

Aminohapete puuduses kutsutakse bakterites esile „poomisvastus“, mida vahendab guanosiintetrafosfaat (ppGpp). „Poomisvastusega“ kaasneb stabiilse RNA (rRNA ja tRNA-d) ja valgu sünteesi repressioon ning aktiveeritakse aminohapete biosüntees. ppGpp reguleerib transkriptsiooni seondudes RNA polümeraasiga. „Poomisvastuse“ induktsioon põhjustab

DNA replikatsiooni peatumise. Pikaajalise DNA replikatsiooni seisaku tõttu bakterid taaskäivitavad replikatsiooni, milles võivad osaleda veaaltid DNA polümeraasid (Foster, 2007).

### 1.5 Oksüdatiivne stress

Oksüdatiivne stress on aeroobse metabolismi vältimatu tagajärg ning seda põhjustavad mitmed endogeensed ühendid (Freidberg jt., 2006; Kim jt., 2014). Tüüpilised oksüdatiivset stressi põhjustavad endogeensed ühendid on reaktiivsed hapnikuühendid (ingl. k. *reactive oxygen species*, ROS), mis tekivad kõrvalproduktina aeroobses metabolismis (Freidberg, 2006; Kivisaar, 2010). Oksüdatiivset stressi võib põhjustada ka kokkupuude aromaatsete ühenditega, nagu näiteks toluen ja fenool, mille tagajärjel kahjustub bakteri rakumembraan (Domínguez-Cuevas jt., 2006; Kivisaar, 2010). Peale selle indutseerivad endogeenset oksüdatiivset stressi ka aromaatsete ühendite lagundamisel toimuvad defektsed oksüdatsiooni reaktsioonid (Kim jt., 2014). Lisaks on täheldatud, et bakterite kokkupuude antibiootikumidega tõstab ROS-ide produktsiooni rakus. Näiteks, bakteritsiidsed antibiootikumid stimuleerivad hüdroksüülradikaalide moodustumist rakus (Kohanski jt., 2007).

ROS-id on kahjulikud ühendid, mis põhjustavad spontaanseid kahjustusi rakusisestele makromolekulidele, nagu näiteks DNA, valgud, lipiidid ja süsivesikud. Reaktiivseteks hapnikuühenditeks on superoksiid anioon ( $\text{O}_2^-$ ), vesinikperoksiid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ja hüdroksüülradikaal ( $\text{OH}^\cdot$ ) (Freidberg jt., 2006).  $\text{O}_2^-$  kahjustab biomolekule kaudselt, mille märklauaks on valkude aktiivtsentris asuv dehüdrataasi [4Fe-4S] klaster. Viimase oksüdeerimise tõttu vabaneb klastrist raua aatom ning ensüüm muutub inaktiivseks.  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksüdeerib valkude tsüsteinüül- ja metioniini jääke. Lisaks sellele reageerib  $\text{H}_2\text{O}_2$  vaba  $\text{Fe}^{2+}$  ionidega, moodustades  $\text{OH}^\cdot$  radikaali. Oma kõrge reaktiivsuse tõttu ei difundeeru hüdroksüülradikaal oma tekkekohast kaugemale. Kuna nukleiinhapped seovad hästi rauda, on nad heaks märklauaks  $\text{OH}^\cdot$  radikaalidele (Imlay, 2013). DNA oksüdatsioon hüdroksüülradikaaliga põhjustab mutatsioone või kahjustusi, mis on rakule letaalsed (Kim jt., 2014).

Reaktiivsed hapnikuühendid võivad „rännata“ lämmastikaluseid ja suhkrujääke, mille tagajärjel võivad tekkida DNA ühe- ja kaheaheelised katked. Lisaks soodustavad ROS-id ristsidemete teket teiste molekulidega, lämmastikaluste modifikatsioone ning kahjustusi, mis blokeerivad replikatsiooni (Cabiscol jt., 2000).

Oksüdatiivsed DNA kahjustused on olulised mutatsioonide allikad. Üheks sagedasemaks oksüdatiivseks kahjustuseks, mis tekitab mutatsioone bakteris *E. coli* ja ka teistes bakterites, nagu näiteks pseudomonaadides, on 8-oxoG (või GO) (Kivisaar, 2010). Põhjustades muutusi bakteri genoomis, võimendab ROS bakterite evolutsiooni (Kim jt., 2014).

### 1.5.1 Oksüdatiivse stressi vastus

Vältimaks oksüdatiivset stressi, on bakteritel väljakujunenud mitmeid kaitsemehhanisme, et detoksifitseerida ROS-e. Tüüpiliselt on bakterites selleks spetsiifilised ensüümid, nagu näiteks superoksiidi dismutaasid (SOD), katalaasid ja peroksüdaasid.

SOD-id on metalloensüümid, mis katalüüsivad superoksiidi muundumist hapnikuks ja vesinikperoksiidiks. SOD-id jagunevad vastavalt kofaktoritele: Cu-Zn klastriga SOD, Fe-SOD, Mn-SOD ja Ni-SOD (Kim jt., 2014). Bakteris *E. coli* on kolm SOD-i: tsütoplasmaatilised Mn-SOD ja Fe-SOD ning periplasmaatiline Cu-Zn klastriga SOD. Viimast sünteesitakse ainult siis, kui rakud sisenevad statsionaarsesse faasi (Imlay, 2013). Enamikel *P. putida* tüvedel on kahte tüüpi SOD-e: Mn-SOD ja Fe-SOD. SOD-ide abil tekkinud vesinikperoksiidi redutseerivad edasi katalaasid ja peroksüdaasid, mille tulemusena moodustub H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-st vesi ja hapnik (Kim jt., 2014).

Oksüdatiivse stressi vastust reguleerivad bakteris *E. coli* kaks regulaatorit SoxR ja OxyR. SoxR on transkriptsiooniline aktivaator, reguleerides nende geenide ekspressiooni, mis on vajalikud oksüdatiivse stressi vastuses, nagu näiteks *sodA*, *fpr*, *nfo* (Imlay, 2013). Bakteris *P. putida* ei osale SoxR oksüdatiivse stressi vastuse geenide indutseerimisel (Kim jt., 2014). OxyR on ka transkriptsiooniline aktivaator, mis on enamasti inaktiivne, kuid kui rakus suureneb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tase, aktiveerib OxyR oksüdatiivse stressi vastuse gene (Imlay, 2013). Näiteks reguleerib OxyR katalaasi geenide ekspressiooni, mida on bakteris *E. coli* kahte tüüpi. Bakteris *P. putida* kontrollib OxyR lisaks katalaaside ekspressioonile ka peroksiredoksiini ekspressiooni (Kim jt., 2014).

### 1.6 Adaptiivne laboratoorne evolutsioon

Adaptiivne laboratoorne evolutsioon (ALE) on meetod, mida kasutatakse molekulaarse evolutsiooni ja adaptiivsete muutuste uurimiseks mikroobipopulatsioonis. ALE võimaldab seostada fenotüübilist ja ka geneetilisi muutusi konkreetse kasvukeskkonnaga (Dragosits jt., 2013).

ALE läbiviimiseks kasutatakse baktereid, viiruseid, ainurakseid vetikaid ja seeni. Mikroorganismide kasutamisel on mitmeid eeliseid, nagu näiteks kiire ja aseksuaalne paljunemine, võimalus säilitada ja hiljem võrrelda eellast ja adapteerunud organismi ning söötmekomponentide lihtsus rakkude kultiveerimisel (Dragosits jt., 2013; Elena ja Lenski, 2003).

ALE saab teostada mitmeti, kuid peamiselt kasutatakse kas mittepidevat (*batch*) või pidevat kultiveerimise meetodit. *Batch*-kultiveerimist rakendatakse kolbides, mis võimaldab ALE viia läbi paralleelselt mitmete kordustena. Mittepidev kultiveerimine hõlmab endas järjestikust paralleelkultuuride lahjendamist, kus regulaarse intervalli tagant kantakse väike osa kultuurist uude kolbi, et võimaldada mikroobikultuuri edasikasvu ja uute põlvkondade teket. Tihtipeale tehakse lahjendus enne, kui populatsioon jõuab statsionaarsesse faasi. *Batch*-kultiveerimine võimaldab küll kontrollida temperatuuri ning ruumilist kultuuri homogeensust, kuid populatsiooni tihedus ja kasvumäär (ingl. k. *growth rate*) varieerub. Lisaks ei ole võimalik kontrollida ka keskkonnatingimusi, nagu näiteks keskkonna pH ja lahustunud hapniku osakaal. *Batch*-kultiveerimise kõrval kasutatakse ka pidevat kultiveerimise meetodit, mida rakendatakse bioreaktori anumades (kemostaadis), kus mikroorganismide kasvumäär ja populatsiooni tihedus on konstantne.

ALE kestvust hinnatakse generatsioonide arvuga, mille jooksul adaptiivne mutatsioon tõuseb populatsioonis esile. Tüüpiline ALE eksperiment kestab mõnest nädalast mõne kuuni, mille jooksul populatsioon läbib 100-2000 generatsiooni (Dragosits jt., 2013).

Tuntuim näide ALE-st on bakteri *E. coli* adaptatsioon glükoosiga, mida viidi läbi 12 paralleelpopulatsiooniga. Evolutsioneerumise katse pikkuseks oli rohkem kui 10 000 generatsiooni, mille eesmärgiks oli analüüsida evolutsioonilise adapteerumise dünaamikat ning identifitseerida fenotüübilised muutused, mis parandavad kohasust. Pärast 10 000 generatsiooni möödumist oli adapteerunud kultuuridel kohasus suurenenud ~50% võrreldes eellastega. Eksperimentaalsest evolutsioneerumise katsest ilmnest ka, et adapteerunud kultuuridel oli märgatavalt lühem lag-faas ning kõrgem maksimaalne kasvukiirus. Lisaks uuriti ka muutuseid raku suurustes, kus leiti, et pärast 10 000 generatsiooni möödumist olid kohanenumatel kultuuridel umbes 2 korda suuremad rakud, kuigi nende arvukus oli väiksem võrreldes eellastega. Kuna spontaansed mutatsioonid on geneetilise varieeruvuse aluseks, mis on omakorda vajalik evolutsiooniliseks muutuseks, uuriti ka mutatsioonisageduse muutust eellaste ja adapteerunud kultuuride vahel. Eksperimendist selgus, et 9 kultuuril oli sarnane mutatsioonisagedus eellastega ( $10^{-10}$  aluspaari generatsiooni kohta). Ülejäänud kolmel

adapteerunud kultuuridel oli mutatsioonisagedus 2 suurusjärku kõrgem. Leiti, et mutaator fenotüüp ilmnes 8000 generatsiooni jooksul (Lenski jt., 1998).

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1 Töö eesmärgid

Viimastel aastakümnetel on suurenenud huvi bioremediatsiooni protsesside vastu eesmärgiga vähendada aromaatsete ühendite osakaalu keskkonnas. Aromaatsete ühendite lagundamises omavad väga olulist rolli mikroorganismid. Bakterite geneetiline plastilisus ja metaboolne mitmekülgus soodustavad erinevate kataboolsete radade arendamist, mis võimaldavad kasutada aromaatsed ühendeid energia- ja süsinikuallikana (van der Meer ja Sentschilo, 2003).

Looduslikust keskkonnast on isoleeritud mitmeid bakteritüvesid, kes on suutelised lagundama aromaatsed ühendeid. Üheks perekonnaks, kelle esindajatel on nähtud laialdast lagundamisvõimekust, on perekond *Pseudomonas*. Viimase liigid asustavad erinevaid keskkondi, mis tuleneb nende mitmekülgsest metabolismist ja võimest kohaneda muutuvate keskkonnatingimustega (Silby jt., 2011). Seda, kuidas toimub looduses uute kataboolsete radade evolutsioneerumine ja bakterite adapteerumine toksiliste aromaatsete ühenditega saasteainet sisaldavas keskkonnas, on püütud selgitada võrreldes loodusest isoleeritud bakteritüvedes nende ühendite kataboolseid radu ja vastavaid geeniklastreid ning neis toimunud muutuseid. Samas laboratoorne evolutsioneerumise katse võimaldab jälgida kontrollitud tingimustes evolutsioneerumise protsessi lühemas ajaskaalas (tavaliselt vahemikus 100-1000 generatsiooni) ja iseloomustada bakteripopulatsioonides toimuvaid muutuseid reaalses ning selgitada evolutsioneerumise katse läbinud bakterite genoomide resekveneerimise teel evolutsioneerumise molekulaarseid mehhanisme.

Minu bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli selgitada bakteripopulatsioonide evolutsioneerumise mehhanisme laboratoorses evolutsioneerumise katses ~300 põlvkonna vältel *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas. Selleks, et selgitada populatsioonide evolutsioneerumist tingimustes, kus bakterid on kultiveeritud neile toksilise aromaatses ühendi *m*-kresooli juuresolekul, olid võrdluskatses bakterid, kuhu olid viidud *m*-kresooli lagundamiseks vajalikud geenid, ning bakterid, kus need geenid puudusid. Sellest lähtuvalt oli minu ülesandeks konstrueerida *Pseudomonas putida* tüvi, kuhu on sisse viidud *m*-kresooli lagundamise rajaks vajalikud erineva päritoluga geenid ning isoleerida *m*-kresooli lagundavad ( $Cre^+$ ) bakterid. Seejärel oli minu ülesandeks viia läbi evolutsioneerumise katse saadud  $Cre^+$  tüvedega CRE5 ja CRE13 ning *m*-kresooli mittelagundava *P. putida* tüvega PaW85 ning võrrelda nendes populatsioonides toimunud muutuseid *m*-kresooli taluvuse osas ning tüvede CRE5 ja CRE13 puhul muutuseid *m*-kresooli lagundamisvõime osas.

Kokkupuude ksenobiootikumidega võib bakterites esile kutsuda mitmeid stressivastuseid, mille tulemusena võib suurenda mutatsioonide tekkesagedus. Seetõttu oli minu töö teiseks eesmärgiks selgitada uue kataboolse raja evolutsioneerumise võimalikke seoseid mutatsiooniliste protsessidega ning seda, kuidas mõjutab *m*-kresooli olemasolu keskkonnas mutaatorite esinemist evolutsioneeruvates bakteripopulatsioonides. Ka siin olid võrdluseks *m*-kresooli lagundavad ja mittelagundavad bakterid.



## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Söötmena kasutasime LB söödet (Miller, 1972) või M9 minimaalsöödet (Adams, 1959), mis sisaldas lisaks M9-le mikroelementide lahust 2,5 ml/l (Bauchop ja Elsdén, 1960) ning süsinikuallikana glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Aromaatsetest ühenditest kasutasime süsinikuallikatena *m*-kresooli (Cre) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM või 5 mM, *m*-toluaati (Tol) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM või fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. M9 + glükoos vedelsöötmesse lisasime kaseiini hüdroolüsaati (CAA) lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Tardsöötme saamiseks lisasime vedelsöötmele agarit (15g/l).

Bakteritüve ja plasmidi seleksiooniks kasutasime järgmisi antibiootikume: bensüülpenitsilliin (Bp; 1-3 mg/ml), kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml), rifampitsiin (Rif; 100 µg/ml).

*Pseudomonas putida* rakke kasvasime temperatuuril 30°C ning *Escherichia coli* rakke temperatuuril 37°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil 180 pööret/min.

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi või plasmiid	Iseloomustus	Allikas
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (rB-mB-) recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1-1</i>	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
<b><i>Pseudomonas putida</i></b>		
PaW1	<i>P. putida</i> mt-2, sisaldab TOL plasmidi pWW0	Williams jt., 1974
PaW85	<i>P. putida</i> PaW1-st saadud plasmidivaba tüvi	Bayley jt., 1977
CRE6	<i>P. putida</i> PaW1, millele on juurde viidud plasmiid pEST1412	Käesolev töö
<b>Plasmiidid</b>		
pRK2013	Abiplasmiid konjugatsioonil (Km <sup>r</sup> )	Figurski ja Helinski, 1979
pEST1412	<i>pheBA</i> geenikassetti sisaldav plasmiid (Amp <sup>r</sup> )	Nurk jt., 1991

### 2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR reaktsioonimaht oli 20 µl. Reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente: 1 x PCR-i puhver (10-kordse puhvri koostis: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Triton X 100, 0,5% Ficoll 40, 1 mM tartrasiin, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP-d), 0,5 ühikut professor Juhan Sedmani laboris puhastatud Taq polümeraasi, 10 pmol primereid ja destilleeritud H<sub>2</sub>O-d lõppmahuni 20 µl. PCR-i segule lisasime bakterirakke.

Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 2. PCR-i teostasime firma „Eppendorf“ PCR-i masinatega järgnevatel tingimustel:

1. DNA denaturatsioon temperatuuril 96°C 30 sekundit
2. Praimeri seondumine matriits-DNA-le temperatuuril 56-58°C 35 sekundit
3. DNA süntees temperatuuril 72°C 0,5-1 minut

Tsüklitele eelnes reaktsioonisegu paariminutiline kuumutamine temperatuuril 96°C ja järgnes 1-1,5 minuti pikkune lisasüntees temperatuuril 72°C, mille käigus sünteesiti lõpuni veel pooleli olevad fragmendid. Reaktsioon toimus kokku 25 tsükli.

**Tabel 2.** Töös kasutatud oligonukleotiidid.

Nimetus	Järjestus	Seondumiskoht
pheABamei	5'-AAGGCGGCTCCCGTAAGACA-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni -40 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geeni sisse
pheAtsII	5'-GTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geenis alaga positsioonides 295 kuni 313 nukleotiidi allapoole translatsiooni stardikoodonist ATG

### 2.2.3 Geelelektroforees

Saadud PCR produkte analüüsisime geelelektroforeesil. Proovid kandsime horisontaalsele 1%-sele agarosgeelile TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Lisaks sisaldas geel etiidiumbromiidi 0,4 µg/ml. Geelelektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 10-15 V/cm ja 10 minuti jooksul. Geeli pildistasime ultravioletvalguses. DNA fragmentide pikkuste määramiseks kasutasime firma „Fermentas“ markerit „ZipRuler Express DNA Ladder 2“.

## 2.2.4 Bakterite elektroporatsioon

*E. coli* rakkude elektroporatsiooniks kasutasime Sharma ja Schimke meetodit (Sharma ja Schimke, 1996). Selleks kasvasime *E. coli* tüve DH5 $\alpha$  üleöö LB vedelsöötmes. Kompetentsete rakkude saamiseks lahjendasime üleöö kasvanud kultuuri värskesse LB vedelsöötmesse ja kasvasime 37°C juures ~2 tundi. Rakud tsentrifugisime söötimest põhja 12110 x g 30 sekundi jooksul firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ ja eemaldasime supernatandi. Seejärel pesime *E. coli* rakke kaks korda 700  $\mu$ l 10%-se glütserooliga ja seejärel suspendeerisime rakud 60  $\mu$ l 10%-ses glütseroolis. Tsentrifugimisel kasutasime külmsentrifuugimist (4°C) ning tsentrifugimise vahepeal hoidsime rakke jääl.

Elektroporatsiooniks lisasime *E. coli* rakkudele ligikaudu 0,3  $\mu$ g plasmiidset DNA-d. Seejärel pipeteerisime rakud elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooni teostasime firma „BioRad“ elektroporaatoriga „*E. coli* Pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisasime rakkudele 1 ml LB vedelsöödet ja kasvasime ligikaudu tund aega loksutil temperatuuril 37°C. Seejärel tsentrifugisime rakud söötimest põhja, eemaldasime supernatandi, suspendeerisime ~150  $\mu$ l LB söötmes ja plaatisime selektiivsöötmele.

## 2.2.5 Bakterite konjugatsioon

Konjugatsiooni läbiviimiseks kasvasime üleöö LB vedelsöötmes doonortüve *E. coli* DH5 $\alpha$ , mis sisaldas ülekantavat plasmidi pEST1412, helperplasmidi pRK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101 ja *P. putida* retsipienttüve. Plasmidi seleksiooniks lisasime LB vedelsöötmele antibiootikume – doonortüvele ampitsilliini (Amp) ja helpertüvele kanamütsiini (Km). Üleöö kasvanud kultuuridest tegime 25-kordsed lahjendused antibiootikumideta LB vedelsöötmetesse ning seejärel kasvasime 2 tundi loksutil. Ristamissegu jaoks võtsime *E. coli* kultuuridest (doonor- ja helpertüvi) 50  $\mu$ l ja *P. putida* kultuurist (retsipienttüvi) 100  $\mu$ l, mille segasime kokku ning pipeteerisime LB tardsöötmele. Konjugatsioon toimus üleöö temperatuuril 30°C. Üleöö kasvanud ristamissegust võtsime üles pool ristamissegu mahust ja suspendeerisime 1 ml-s 1 x M9 lahuses. Saadud suspensioonist 100  $\mu$ l plaatisime selektiivsöötmele, kus on võimalised kasvama vaid transkonjugandid.

## 2.2.6 *m*-kresooli (Cre<sup>+</sup>) lagundaja konstrueerimine ja selekteerimine

*m*-kresooli lagundaja saamiseks konstrueerisime tüve, mis sisaldas lisaks TOL plasmiidile pWW0 (*m*-toluaadi lagundamine *meta*-raja kaudu) fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* plasmiidis pEST1412. Varasemast on teada, et *pheA* poolt kodeeritud fenooli monooksügenaas on laia substraadispetsiifilisusega, võimaldades lisaks fenoolile ka

kresoolide (metüülfenoolid) lagundamist katehooliks (Nurk jt., 1991). Kõigepealt elektroporeerisime plasmidi pEST1412 *E. coli* tüvesse DH5 $\alpha$  ja seejärel kontrollisime PCR meetodil plasmidi olemasolu, kasutades primereid pheAtsII ja pheABamei. Järgnevalt viisime plasmidi pEST1412 konjugatsiooni teel TOL plasmidi sisaldavasse *P. putida* tüvesse PaW1. Transkonjugantide teket jälgisime selektiivsöötmele, mis sisaldas süsinikuallikana *m*-toluaati ja plasmidi pEST1412 selektsiooniks bensüülpenitsilliini. Moodustunud kolooniaid külvasime paralleelselt fenooli ja *m*-toluaati sisaldavatele söötmetele, et kontrollida *phe* geenikasseti ja TOL plasmidi (pWW0) olemasolu rakkudes. Fenooli sisaldavalt söötmelt valisime välja ühe paremini kasvava koloonia, mida kasvasime üleöö vedelsöötmes, mis sisaldas glükoosi, CAA-d, *m*-toluaati ning bensüülpenitsilliini. Üleöö kultuurist plaatisime 250  $\mu$ l ja 500  $\mu$ l kogustes bakterikultuuri tardsöötmele, mis sisaldas ainsa süsinikuallikana *m*-kresooli lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. *m*-kresooli sisaldavalt tardsöötmelt selekteerisime *m*-kresooli lagundajad.

### 2.2.7 Cre<sup>+</sup> tüve fenotüübilise stabiilsuse määramine

Selleks, et määrata plasmiidide pWW0 ja pEST1412 stabiilsust konstrueeritud tüvedes, külvasime selektsiooni tulemusel saadud Cre<sup>+</sup> tüved CRE5 ja CRE13 tardsöötmele, mis sisaldas süsinikuallikana nii glükoosi kui ka 2,5 mM *m*-kresooli. Glükoosi ja *m*-kresooli sisaldaval söötmel kasvanud rakud viisime üksikkolooniateks glükoosi sisaldavale tardsöötmele, kust külvasime üksikkolooniaid edasi paralleelselt tardsöötmetele, mis sisaldasid süsinikuallikana kas fenooli, *m*-toluaati, 2,5 mM *m*-kresooli või glükoosi. Plasmiidsete tunnuste stabiilsusi määrasime protsendina kõikidest edasi külvatud kolooniatest.

### 2.2.8 Evolutsioneerumise katse

Evolutsioneerumise katse läbiviimiseks kasvasime *P. putida* tüvesid PaW85, CRE5 ja CRE13 esmalt 1 ml-s M9 puhvriga vedelsöötmes, mis sisaldas lisaks CAA-d ja glükoosi, 6 tundi temperatuuril 30°C. Seejärel tegime kasvatatud kultuuridest 10<sup>4</sup>-kordsed lahjendused 20 ml M9 minimaalsöötmesse 100 ml kolvis, kuhu oli lisatud süsinikuallikana lisaks glükoosile (Glc) ka *m*-kresool (Cre) lõppkontsentratsioonidega 2,5 mM ja 5 mM (M9-Glc-Cre). Igat tüve kasvasime 3 paralleelkultuurina. 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga M9-Glc-Cre söötmest tegime 10<sup>4</sup>-kordse lahjenduse uude 20 ml M9-Glc-Cre söötmesse iga 2 päeva tagant ning 5 mM lõppkontsentratsiooniga M9-Glc-Cre söötmest iga 4 päeva tagant.

Mõlema kontsentratsiooni puhul viisime evolutsioneerumise katset läbi 40 päeva, mille lõpus arvutasime iga paralleelkultuuri generatsioonide arvu. Selleks leidsime iga 2 või 4 päeva kasvanud vedelkultuurides olevate rakkude arvukuse. Kultuuridest tegime lahjenduste rea 1 x M9-sse ja kandsime LB söötmele.

Generatsioonide arvu leidsime järgmise valemi järgi (Lee jt, 2011):

$$n = \frac{\log \frac{N}{N_0}}{\log 2},$$

kus  $n$  – generatsioonide arv;

$N$  – lõpp rakkude arvukus ja

$N_0$  – algne rakkude arvukus.

### 2.2.9 Glükoosi tarbimise mõõtmine

Bakterite kasvatamistingimused oli sarnased evolutsioneerumise katsele. *P. putida* tüvesid kasvasime üleöö 1 ml-s M9 minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud süsinikuallikana nii glükoosi kui ka *m*-kresooli lõppkontsentratsioonidega 2,5 mM ja 5 mM (M9-Glc-Cre), temperatuuril 30°C. Üleöö kultuuridest tegime 10<sup>4</sup>-kordsed lahjendused 20 ml M9-Glc-Cre söötmesse.

Bakterite glükoosi tarbimise määramiseks mõõtsime söötmes sisalduvat glükoosi hulka iga 24 tunni tagant kahe või nelja päeva jooksul vastavalt *m*-kresooli lõppkontsentratsioonile (2,5 mM lõppkontsentratsiooniga söötme puhul 2 päeva ja 5 mM lõppkontsentratsiooniga 4 päeva). Mõõtmiseks kasutasime supernatanti, mis saadi 1 ml kultuuri tsentrifuugimisega 12110 x g juures 45 sekundi jooksul. Glükoosi kontsentratsiooni määramiseks kasutasime „GLUCOSE liquicolor“ reaktiivi (Human GmbH, Saksamaa). Segasime kokku 10 µl supernatanti või selle lahjendust ja 1 ml glükoosi reaktiivi ning hoidsime 10 minutit toatemperatuuril. Reaktsioonisegu optilist tihedust mõõtsime lainepikkusel 500 nm. Glükoosi kontsentratsiooni määrasime vastavalt eelnevalt standardlahuse baasi tehtud kaliibergraafikule.

### 2.2.10 *m*-kresooli tarbimise mõõtmine

*m*-kresooli kontsentratsiooni mõõtmise viisime läbi paralleelselt glükoosi kontsentratsiooni mõõtmisega, mille protokoll on kirjeldatud eelnevas peatükis. *m*-kresooli kontsentratsiooni määramiseks kasutasime järgnevaid reagente: NH<sub>4</sub>Cl+NH<sub>4</sub>OH (pH 10), 2% aminoantipüriin, 8% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Segasime kokku 1 ml supernatanti või selle lahjendust, 20 µl

$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NH}_4\text{OH}$ , 20  $\mu\text{l}$  2% aminoantipüriini ja 20  $\mu\text{l}$  8%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Saadud reaktsioonisegu hoidsime 15 minutit toatemperatuuril, mille optilist tihedust mõõtsime lainepikkusel 510 nm. *m*-kresooli kontsentratsiooni määrasime vastavalt eelnevalt standardlahuse baasil tehtud kaliibergraafikule.

### 2.2.11 Aromaatsete ühendite lagundajate osakaalu määramine populatsioonis

Selleks, et määrata erinevate aromaatsete ühendite lagundajate osakaalu 2,5 mM ja 5 mM *m*-kresooliga adapteerunud populatsioonides, kasutasime taustarakkudega (rakud, mis ei lagunda fenooli, *m*-kresooli ega *m*-toluaati) plaatimist. Taustarakke kasutasime selleks, et selgemalt eristada aromaatseid ühendeid süsinikuallikana kasutavate bakterite kolooniaid. Aromaatsetest ühenditest testisime fenooli, *m*-kresooli ja *m*-toluaadi lagundamisvõimet. Esmalt kasvasime vastavaid kultuure kas 2 või 3 päeva sõltuvalt *m*-kresooli kontsentratsioonist (2,5 mM puhul 2 päeva ja 5 mM puhul 3 päeva) 1 ml-s M9 minimaalsöötmes, mis sisaldas süsinikuallikatena glükoosi ja *m*-kresooli. Taustarakkudena kasutasime *P. putida* tüve PaW85, mida kasvasime üleöö 30 ml-s samas söötmes. 2 või 3 päeva kasvanud kultuuridest tegime lahjenduste rea 1 x M9-sse. 20 ml *P. putida* PaW85 rakke tsentrifuugisime söötimest põhja 2469 x g juures 5 minuti jooksul ning seejärel suspendeerisime 10 ml-s 1 x M9-s. Erinevatele tardsöötmetele plaatisime 125  $\mu\text{l}$  taustarakke üleöö kasvanud kultuurist ning 10  $\mu\text{l}$  uuritavate bakteripopulatsioonide lahjendusi. Lisaks plaatisime rakke ka glükoosi sisaldavale tardsöötmele, kuhu lisasime taustarakkude asemel 125  $\mu\text{l}$  1 x M9. Aromaatsete ühendite lagundajate osakaalu arvutasime glükoosile tekkinud kolooniate suhtes.

### 2.2.12 Rakulüsaadi valmistamine

Rakulüsaadi valmistamiseks kasvasime *P. putida* rakke üleöö 5 ml-s M9 minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud süsinikuallikana glükoos. Üleöö kasvatatud kultuuridest tegime 3-kordsed lahjendused induktorit sisaldavasse söötmesse ning kasvasime ~3 tundi. Induktoriteks olid: *m*-toluaat lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM, *m*-kresool lõppkontsentratsioonidega 2,5 mM või 5 mM ning glükoos lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Rakke tsentrifuugisime 12110 x g juures 30 sekundit ja suspendeerisime 1 ml-s jääl hoitud 100 mM fosfaatpuhvrts (pH 7,5). Eelnevat etappi kordasime ja seejärel resuspendeerisime rakud 300  $\mu\text{l}$  100 mM fosfaatpuhvrts (pH 7,5) ning purustasime sonikeerimisega jääl 3 x 10 sekundit. Sonikeerimist teostasime „Cole-Parmer 4710 Series Ultrasonic Homogenizer“ sonikaatoriga. Purustamata jäänud rakud ja rakukestad eemaldasime külmsentrifuugimise (4°C) teel 16060 x g juures 20 minuti jooksul.

Saadud supernatanti kasutasime rakuvaba lüsaadina ensüümi katehhooli-2,3-dioksügenaasi aktiivsuse määramisel.

### **2.2.13 Katehhooli-2,3-dioksügenaasi eriaktiivsuse määramine**

Katehhooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) aktiivsust määrasime Feist ja Hegeman kohandatud meetodika põhjal (Feist ja Hegeman, 1969) spektrofotomeetriliselt 2-hüdroksümukonsemialdehüüdi tekkimise järgi lainepikkusel 375 nm ( $\epsilon_{375 \text{ nm}} = 14,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Reaktsioonimaht oli 2 ml, mis koosnes 0,3 mM katehhoolist, 100 mM fosfaatpuhvrist (pH 7,5) ja rakuvabast lüsaadist.

C23O eriaktiivsuse arvutamiseks määrasime optilise tiheduse muutust minutis valgu hulga ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) kohta reaktsioonisegus. Totaalvalgu kontsentratsiooni määramiseks kasutasime Bradfordini meetodit (Bradford, 1976).

C23O eriaktiivsust väljendasime  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  valgu kohta.

### **2.2.14 *P. putida* Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine**

Spontaansete ja indutseeritud mutatsioonide tekkesageduse määramiseks *P. putida* rakkudes leidsime Rif resistentsete (Rif<sup>r</sup>) mutantide tekkesageduse. Selleks kasvasime rakke 6 tundi temperatuuril 30°C M9 minimaalsöötmes, millele oli lisatud CAA ja süsinikuallikana glükoos. Seejärel tegime bakterikultuurist 10<sup>5</sup>-kordse lahjenduse ja jagasime 2,3 ml kaupa katseklaasidesse. 20-24 tundi kasvanud sõltumatutest kultuuridest plaatisime 500  $\mu\text{l}$  kultuuri rifampitsiini sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeerisime temperatuuril 30°C. Tekkinud kolooniaid loendasime kolmel järjestikusel päeval.

Üleöö kasvanud vedelkultuuridest leidsime elusarakkude arvukuse. Selleks tegime kultuuridest lahjenduste rea 1 x M9-sse ja kandsime LB söötmele. Lähtudes LB söötmele tekkinud kolooniate arvust ja tehtud lahjendustest arvutasime rakkude hulga 1 ml üleöö kasvanud kultuuri kohta.

Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks mutatsioonisageduste vahel kasutasime statistikapaketti STATISTICA 10. Tüvede mutatsioonisageduse tulemusi analüüsisime ühepoolse (ingl. k. *one-way*) ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. Väljalöövide tuvastamiseks kasutasime Grubbs' testi. P-väärtuste leidmiseks logaritmisime andmed, et viia need normaaljaotusesse. Enne logaritmitmist liitsime kõigile andmetele juurde 1, et vältida logaritmi võtmist nullist. P-väärtused leidsime logaritmitud andmetele Bonferroni testiga programmis Post Hoc.

### **2.2.15 *m*-kresooli kontsentratsiooni taluvuse määramine**

Selleks, et määrata nii algsete kui ka evolutsioneerunud populatsioonide *m*-kresooli kontsentratsiooni taluvust, kasvatasime vastavaid kultuure üleöö 1 ml-s M9 minimaalsöötmes, mis sisaldas süsinikuallikana glükoosi. Üleöö kasvanud kultuuridest tegime lahjenduste rea, kust kandsime lahjendused 10 µl tilkadena erinevate *m*-kresooli kontsentratsioonidega glükoosi sisaldavale tardsöötmele, et näha rakkude arvukust, kes taluvad konkreetset *m*-kresooli kontsentratsiooni. Lisaks kandsime lahjendusi 10 µl kaupa ka glükoosi sisaldavale tardsöötmele, kuhu ei olnud lisatud *m*-kresooli, et näha rakkude üldist arvukust.

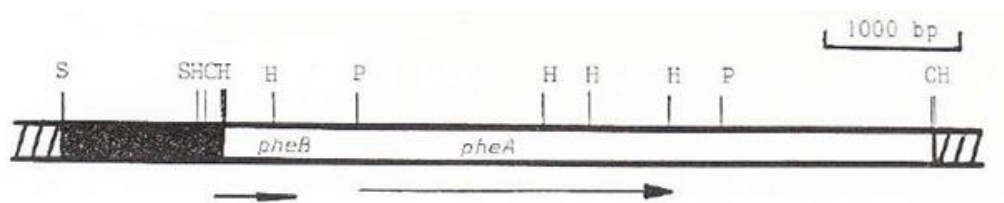


## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 *m*-kresooli lagundaja konstrueerimine

Selleks, et uurida aromaatsete ühendite kataboolsete radade evolutsioneerumist bakterites ja selle seost mutatsiooniprotsessidega, otsustasime konstrueerida hübriidse katabolismiraja *m*-kresooli lagundamiseks. *m*-kresooli katabolismiks vajalikud geenid paiknesid erinevates plasmiidides pEST1412 ja pWW0. *m*-kresooli lagundaja konstrueerimine on põhjalikult kirjeldatud „Materjal ja meetodika“ osa peatükis 2.2.6.

Plasmiid pEST1412 (Joonis 2) sisaldab gene *pheA* ja *pheB*, mis kodeerivad vastavalt ensüüme fenooli monooksügenaas (PMO) ja katehhooli-1,2-dioksügenaas (C12O) (Nurk jt., 1991). Fenooli monooksügenaas on flavoproteiin, mis kasutab elektronidoonorina NADPH-d, et oksüdeerida fenool katehhooliks, mis on fenooli lagundamise esimeseks etapiks. Lisaks fenoolile on fenooli monooksügenaas võimeline oksüdeerima ka *m*- ja *p*-kresooli vastavalt 3- ja 4-metüülkatehhooliks (Nurk jt., 1991).



**Joonis 2.** Fenooli lagundamist määravad geenid plasmiidis pEST1412 (Nurk jt., 1991).

Metüülkatehhooli lagundamine võib toimuda *meta*-raja kaudu, mille geenid paiknevad TOL plasmiidis pWW0. TOL plasmiid pWW0 kodeerib ensüüme, mis lagundavad tolueni atsetaldehyüdiks ja püruvaadiks (Burlage jt., 1989). Lagundamiseks vajalikke ensüüme kodeerivad gene nimetatakse *xyl* geenideks, mis asuvad kahes operonis – ülemine ja alumine ehk *meta*-operon. Ülemine operon koosneb 7-st geenist – *xylUWCMAB*, mis vastutavad tolueni lagundamise eest bensoadiks. Alumine operon koosneb 13-st geenist – *xylXYZLTEGFJQKIH*. Vastavad geenid lagundavad bensoadi üle katehhooli atsetaldehyüdiks ja püruvaadiks (Greated jt., 2002). Katehhooli lagundamine toimub *meta*-raja kaudu, kus võtmeensüümiks on katehhooli-2,3-dioksügenaas, mida kodeerib geen *xylE*. Katehhooli-2,3-dioksügenaas viib läbi benseenituumade lõhkumise etappi hüdroksüülrühmade kõrvalt (Burlage jt., 1989).

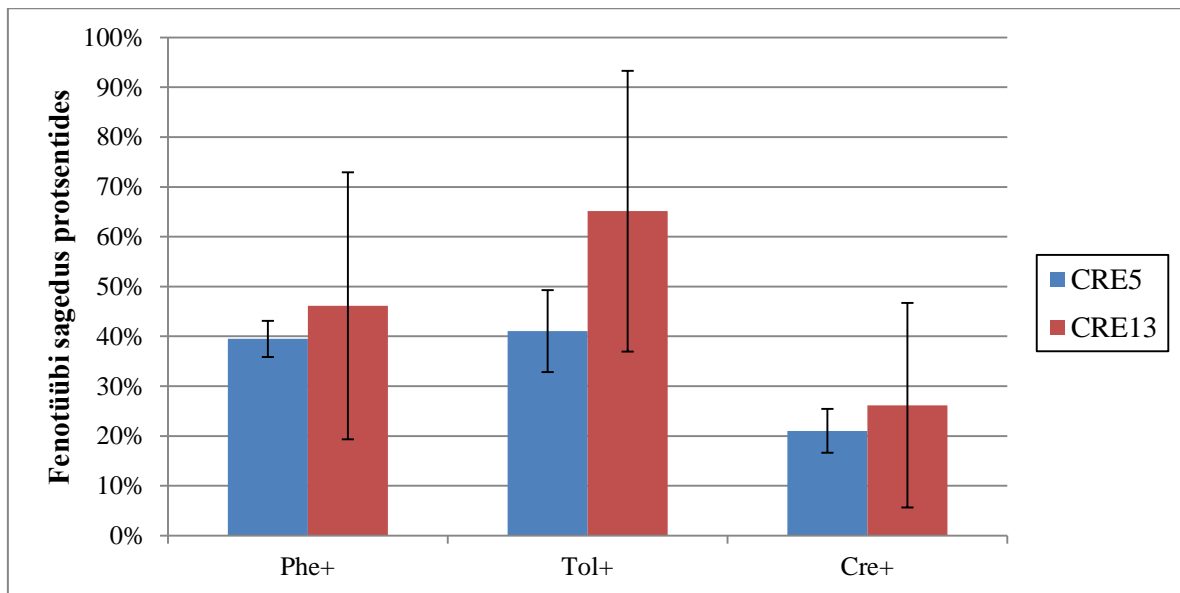
Selgus, et *m*-kresooli lagundamiseks ei piisanud ainult selle raja geenide kokkuviimisest samasse raku. Sel viisil saadud bakteritüve CRE6 rakkude edasikülvamisel 2,5 mM *m*-

kresooli kui ainsa süsinikuallikana sisaldavale söötmele nad ei kasvanud. Küll aga tekkisid sellele söötmele hiljem üksikkolooniad, mille edasikülv näitas, et kolooniatest pärit bakterid on võimelised *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel kasvama ( $Cre^+$  fenotüüp). Nii selekteerisime algselt  $Cre^-$  tüve CRE6 baasil, kuhu oli kokku viidud plasmiidid pEST1412 ja pWW0, bakterite inkubeerimisel *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel 7 päeva möödudes  $Cre^+$  tüved CRE5 ja CRE13.

### 2.3.2 $Cre^+$ tüve fenotüübiline stabiilsus mitteselektiivsetes tingimustes

Meil oli plaanis viia läbi laboratoorne evolutsioneerumise katse, kus eelpool kirjeldatud *m*-kresooli lagundavate tüvede CRE5 ja CRE13 rakke kasvatatakse ~300 generatsiooni *m*-kresooli sisaldavas vedelsöötmes. Seetõttu uurisime evolutsioneerumise katsesse võetavate  $Cre^+$  tüvede puhul kõigepealt seda, kui stabiilselt püsivad neis plasmiidide pEST1412 ja pWW0 abil sisse viidud *m*-kresooli katabolismiraja blokid ning  $Cre^+$  fenotüüp mitteselektiivsetes tingimustes, kui bakteritel ei ole vajadust *m*-kresooli lagundada. Selleks kasvasime baktereid glükoos+2,5 mM *m*-kresool söötmel ja isoleerisime üksikkolooniad ainult glükoosi süsinikuallikana sisaldaval söötmel. Järgnevalt külvasime üksikkolooniad 3 erinevat aromaatsset ühendit (fenool, *m*-toluaat ja *m*-kresool) sisaldavatele tardsöötmetele. Kasv fenooli sisaldaval minimaalsöötmel viitas *m*-kresooli lagundamisraja esimese etapi püsimisele plasmiidis pEST1412 asuva *pheA* geeni tõttu, kasv *m*-toluaati sisaldaval minimaalsöötmel plasmidi pWW0 asuvate *meta*-raja geenide püsimisele ning kasv *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel kõigi *m*-kresooli lagundamiseks vajalike geenide koospüsimisele samas rakus.

Katsetulemustest selgus, et 40% tüvel CRE5 analüüsitud kolooniatest oli säilinud fenooli ja/või *m*-toluaadi lagundamisvõime ( $Phe^+$  ja  $Tol^+$  fenotüüp) ning 21% lagundasid ka *m*-kresooli ( $Cre^+$ ). Tüve CRE13 puhul saime sarnased tulemused: analüüsitud kolooniatest oli  $Phe^+$  ja  $Tol^+$  kolooniaid 42% ning 26% olid ka  $Cre^+$  (Joonis 3). Võimalik, et lagundamisvõimekuse kadumine on tingitud plasmiidide ebastabiilsusest, mistõttu oli pEST1412 või pWW0 osadest rakkudest kaduma läinud.



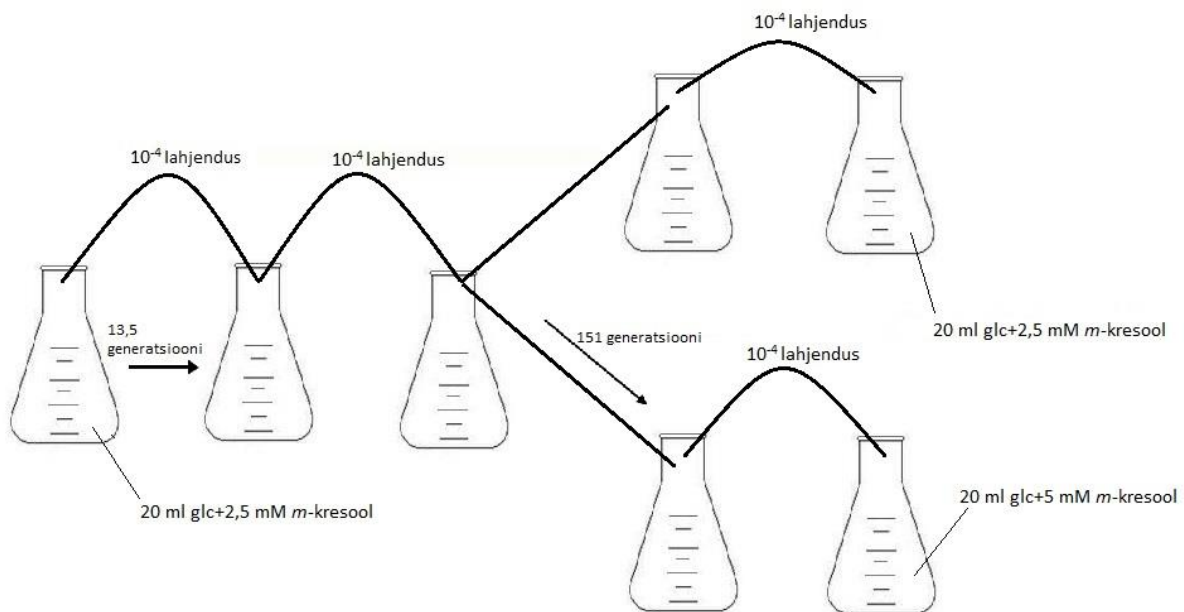
**Joonis 3.** Phe<sup>+</sup>, Tol<sup>+</sup> ja Cre<sup>+</sup> fenotüüpide stabiilsus konstrueeritud tüvedes. Joonisel on esitatud 3 sõltumatu katse tulemused 65 üksikkolooniaga ja 95% usalduspiirid.

### 2.3.3 Cre<sup>+</sup> tüvede evolutsioneerumise katse *m*-kresooli sisaldavas kasvukeskkonnas

Selleks, et selgitada mehhanisme, mis mõjuvad bakteripopulatsioonide evolutsioneerumisele keskkonnas, mis sisaldavad rakkudele toksilisi aromaatsid ühendeid (antud juhul *m*-kresool), viisime evolutsioneerumise katse läbi käesolevas töös konstrueeritud tüvedega CRE5 ja CRE13 ning võrdluseks võtsime katsesse *P. putida* tüve PaW85, millel pole *m*-kresooli lagundamise rada sisse viidud. *P. putida* PaW85 valisime katsesse seetõttu, et näha, kuidas toimub adapteerumine bakteris, kus puudub *m*-kresooli lagundamise rada. Evolutsioneerumise katse toimus iga tüve puhul 3 paralleelkultuuriga (populatsiooniga). Evolutsioneerumise katse skeem on toodud Joonisel 4 ning katse ülesehitus ja kasvatamise tingimused on täpsemalt selgitatud „Materjal ja meetodika“ osas peatükis 2.2.8. Kuna ainult *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel kasvavad bakterid aeglaselt ja vajavad suuremat alginokulumi, oleks soovitud generatsioonide arvu (~300) saamiseks kulunud väga kaua aega. Seega otsustasime lisada bakterite kasvukeskkonda lisaks 2,5 mM *m*-kresoolile ka 10 mM glükoosi, et saavutada maksimaalne generatsioonide arv. Edasikülvi tegime iga kahe päeva tagant ning selle käigus moodustus keskmiselt 13,5 generatsiooni. Katse käigus võtsime perioodiliselt proove rakukultuuridest, mida säilitame sügavkülmas, et oleks hiljem võimalik täpsemalt kirjeldada evolutsioneeruvates populatsioonides toimunud muutuseid.

40 päeva möödudes oli sõltuvalt kultuurist läbitud 305-310 generatsiooni. Evolutsioneerumise katse vahepeal tegime väljakülve fenooli, *m*-toluaati või *m*-kresooli sisaldavatele söötmetele, et hinnata evolutsioneerunud bakteripopulatsioonides nende ühendite lagundajate osakaalu ja

lagundamisvõimekust. Tehtud väljakülvidest selgus, et 2,5 mM *m*-kresool ei ole piisavalt selektiivne keskkond ning seetõttu hakkasime ~151 generatsiooni möödudes evolutsioneerumise katset läbi viima paralleelselt kahes söötmes, kus lisaks glükoosile oli kas 2,5 mM või 5 mM *m*-kresool. Kuna 5 mM *m*-kresool põhjustas bakteritele suuremat stressi, ei suutnud sellises keskkonnas kasvada enam tüve CRE13 kolm paralleeli ega üks *P. putida* PaW85 paralleel. Seetõttu jätkasime evolutsioneerumise katset ainult nende populatsioonidega, kus edasikülvamisel bakterid kasvasid 5 mM *m*-kresooli juuresolekul. Katse lõpuks (40 päeva möödudes) olid 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonid läbinud keskmiselt 141-146 generatsiooni.



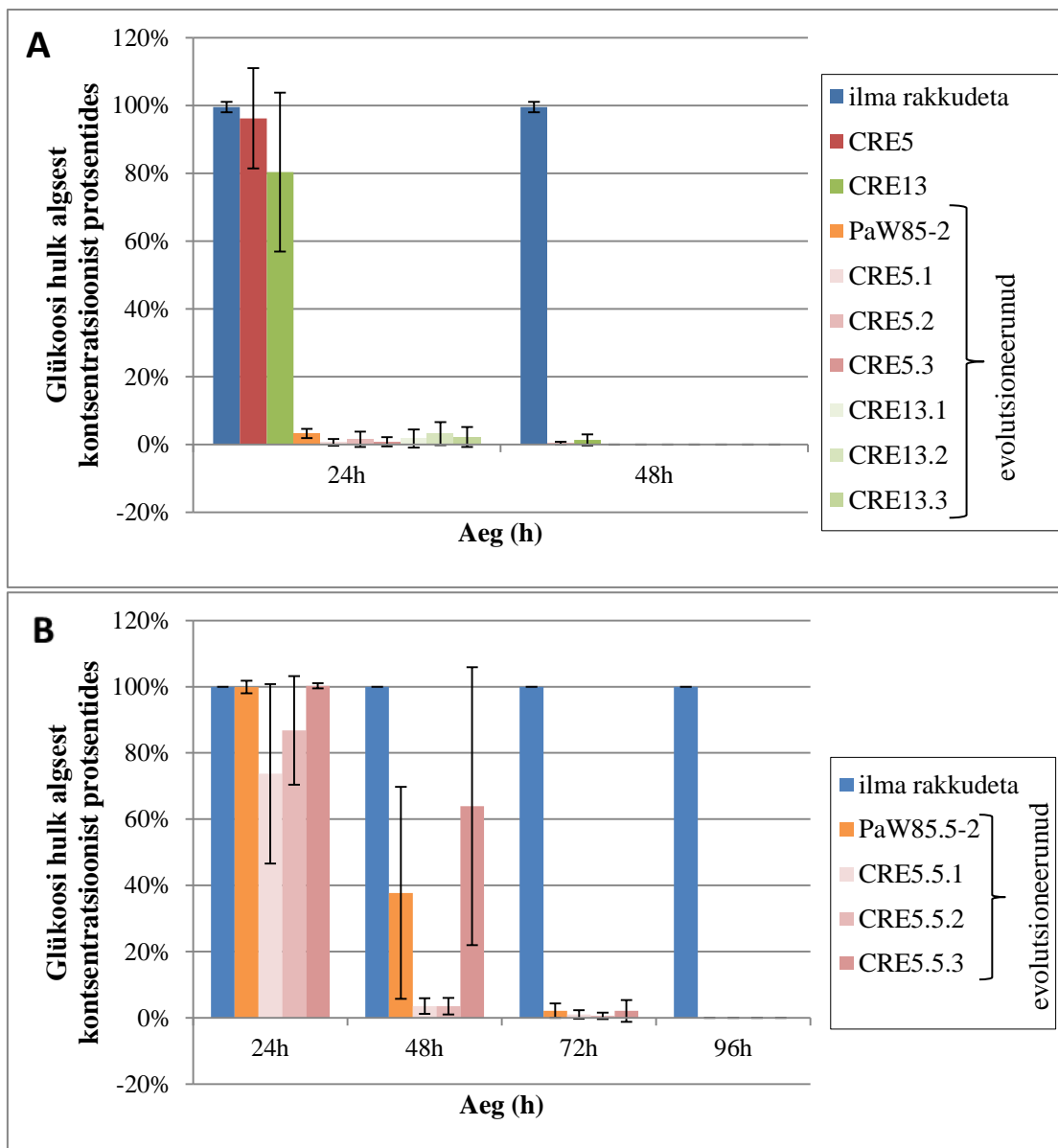
**Joonis 4.** Evolutsioneerumise katse skeem.

### 2.3.4 Muutused *m*-kresooli ja glükoosi lagundamise võimekuses evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides

Evolutsioneerumise katse jooksul toimunud muutuste analüüsimiseks uurisime, kui kiiresti tarbivad *m*-kresooli ja glükoosi sisaldava keskkonnaga evolutsioneerunud populatsioonid söötimest glükoosi ja *m*-kresooli võrreldes algsete populatsioonidega. Katsetingimused glükoosi kontsentratsiooni mõõtmiseks on toodud „Materjal ja meetodika“ osas peatükis 2.2.9. Glükoosi kontsentratsiooni vähenemist söötmes mõõtsime iga 24 tunni tagant. Saadud väärtused on toodud Joonisel 5 ja esitatud protsentidena glükoosi kontsentratsioonist katse algusest.

Mõõtmistulemustest selgus, et kõigi 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonide glükoosi lagundamisvõime on kiirem võrreldes algsete populatsioonidega.

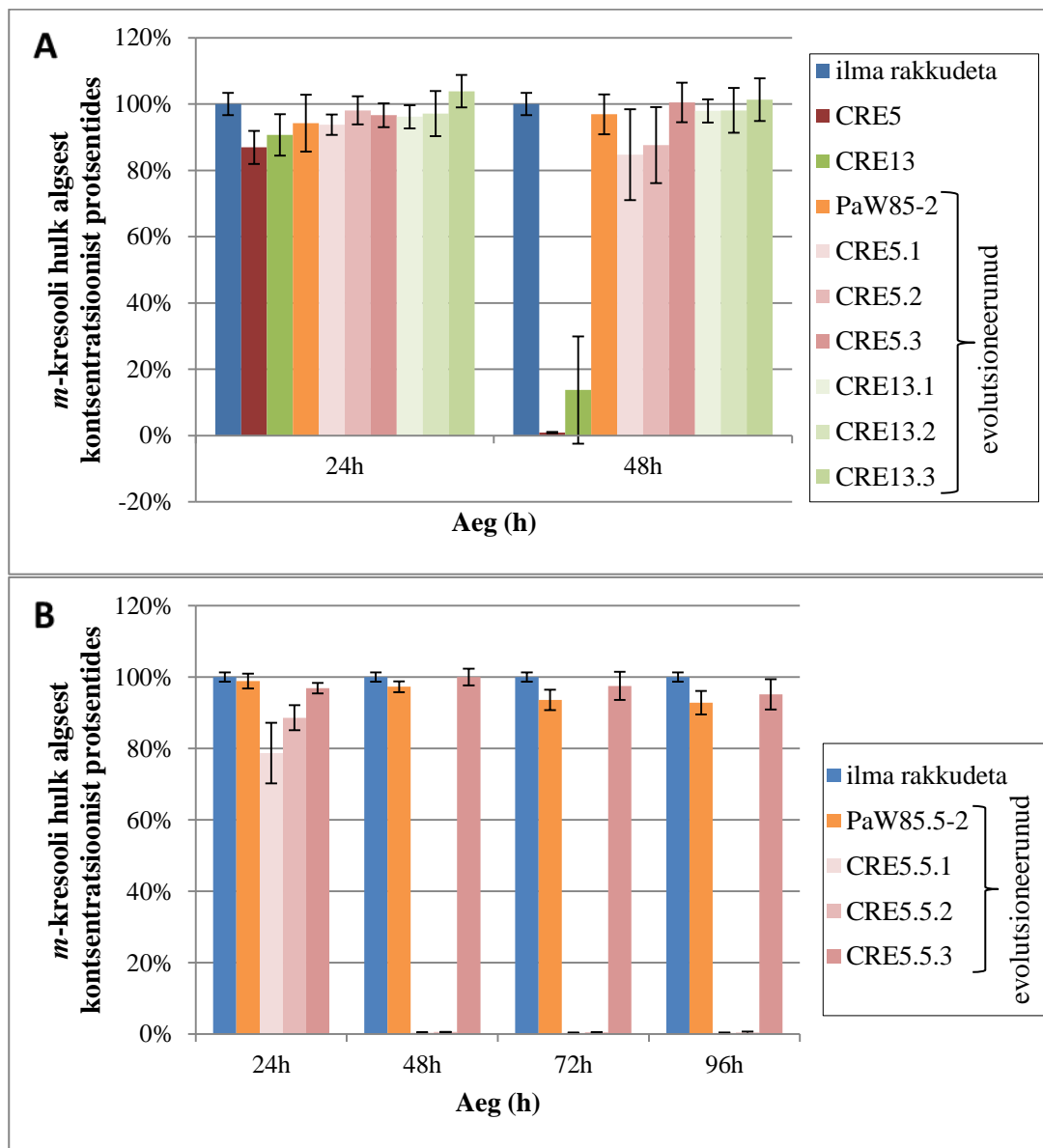
Joonisel 5B esitatud tulemuste põhjal võib aga öelda, et 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud Cre<sup>+</sup> tüvede populatsioonid suudavad glükoosi lagundada kiiremini võrreldes sama *m*-kresooli kontsentratsiooni juuresolekul evolutsioneerunud Cre<sup>-</sup> tüve *P. putida* PaW85 populatsiooniga. Võimalik, et glükoosi aeglasemat lagundamist PaW85 populatsioonis põhjustab *m*-kresool, mida selle tüve rakud ei lagunda.



**Joonis 5.** Evolutsioneerumiskatse läbinud bakteritüvede populatsioonide võime lagundada glükoosi. **A.** Algseid ja 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonid. **B.** 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonid. Joonisel on märgitud 95% usalduspiirid.

Lisaks glükoosi tarbimisele selgitasime ka seda, kas ja kui kiiresti lagundatakse evolutsioneerumise katse alguses ja selle läbinud populatsioonide poolt ära söötmes sisalduv *m*-kresool, mille kontsentratsiooni mõõtmise protokoll on kirjeldatud „Materjal ja meetodika“ peatükis 2.2.10.

Joonisel 6A esitatud tulemustest nägime, et 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonidel oli *m*-kresooli lagundamisvõime hoopis vähenenud. 48 tunni jooksul suutsid vaid tüvede CRE5 ja CRE13 algsed populatsioonid lagundada *m*-kresooli. Samas toimus lagundamine aeglaselt, eriti kui võrrelda seda 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonidega (välja arvatud CRE5.5.3), mis suutsid efektiivselt *m*-kresooli söötmest lagundada 48 tunniga (Joonis 6B). Selles katses ei mõõdetud tüvede CRE5 ja CRE13 algsete populatsioonide *m*-kresooli tarbimist 5 mM kontsentratsiooni puhul, kuna selline kontsentratsioon inhibeeris bakterite kasvu märgatavalt.

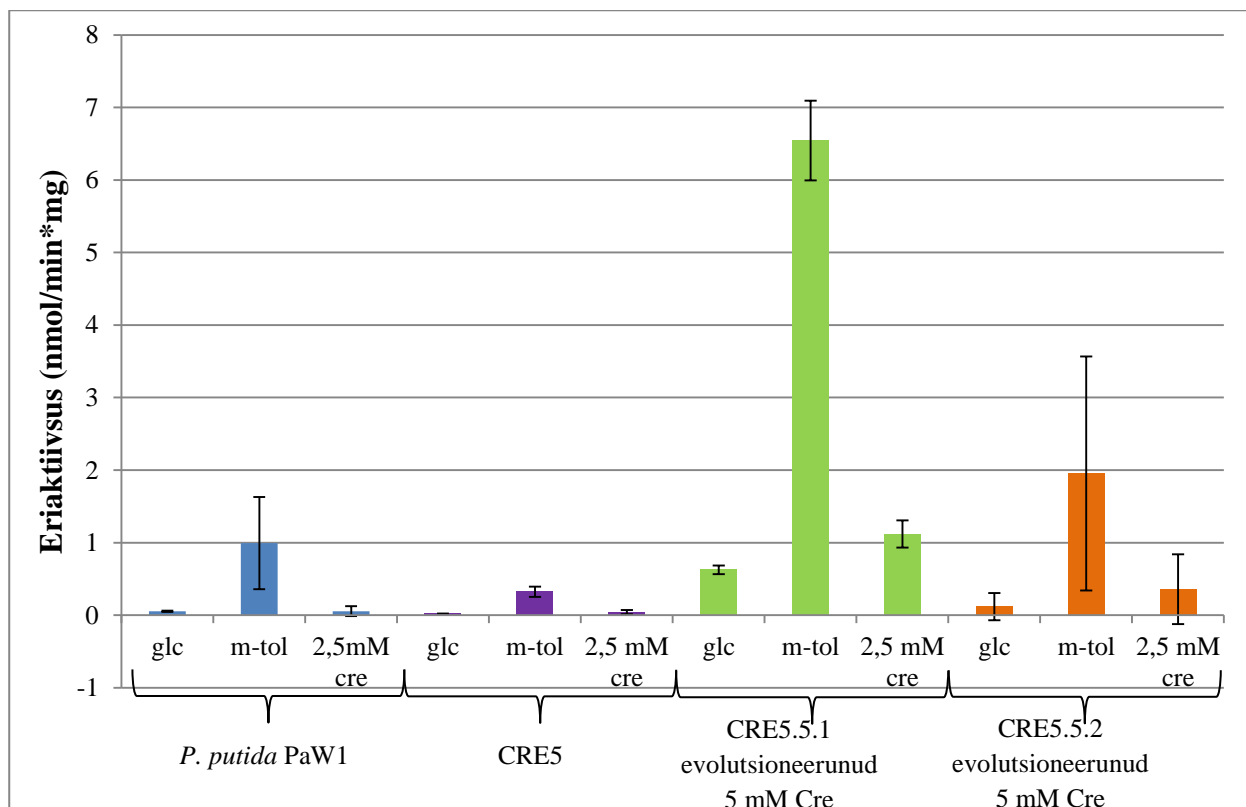


**Joonis 6.** Evolutsioneerumise katse läbinud bakteritüvede populatsioonide võime lagundada 2,5 mM või 5 mM *m*-kresooli. **A.** Algset ja 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonid. **B.** 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonid. Joonisel on märgitud 95% usalduspiirid.

### 2.3.5 Muutused *meta*-raja ekspressioonitasemes evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides

*m*-kresooli lagundaja konstrueerimisel pärinesid katehhooli lagundamise *meta*-raja geenid TOL plasmiidist pWW0. Kirjandusest on teada, et selles plasmiidis olevate *meta*-raja geenide transkriptsiooni indutseerib *m*-toluaat (Worsey ja Williams, 1975), kuid puuduvad andmed selle kohta, kas ka *m*-kresool võiks indutseerida nende geenide tööd. Sellest lähtuvalt soovisime teada, kas *m*-kresool võiks samuti olla *meta*-raja induktoriks. Selleks, et selgitada, kas ja millisel tasemel ekspresseerub TOL plasmiidis asuv *meta*-raja geenide operon *m*-kresooli olemasolul, viisime läbi induktsioonkatse, kus määrasime *meta*-raja võtmeensüümi katehhooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) eriaktiivsust (vt. peatükk 2.2.13 töö „Materjal ja meetodika“ osas). C23O eriaktiivsust määrasime bakterites, mida oli kasvatatud kas ainult glükoosi sisaldavas söötmes või söötmes, kuhu oli lisatud *m*-toluaati või *m*-kresooli. Kuna eelnevatest *m*-kresooli kontsentratsiooni mõõtmiskatsesest selgus, et 2,5 mM *m*-kresool ei ole piisav selektsioon, et populatsioonis püsiks *m*-kresooli lagundajad, viisime katsed läbi järgmiste tüvedega: *P. putida* PaW1, mis sisaldas TOL plasmidi pWW0, tüvi CRE5, mis ei olnud veel evolutsioneerumise katset läbinud ning selle tüve 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonid CRE5.5.1 ja CRE5.5.2.

Induktsioonkatsesest selgus, et tüve PaW1 puhul ei indutseeri *m*-kresool *meta*-rada erinevalt *m*-toluaadist, mis on *meta*-raja induktoriks. Samas on Joonisel 7 esitatud tulemustest näha, et tüve CRE5 puhul on *meta*-raja ensüümi C23O ekspressiooni basaalne tase 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides ~10 korda suurenenud.



**Joonis 7.** *meta*-raja ensüümi katehhooli-2,3-dioksügenaasi eriaktiivsus *m*-toluaadiga ja *m*-kresooliga indutseerimisel. Joonisel on toodud 95% usalduspiirid.

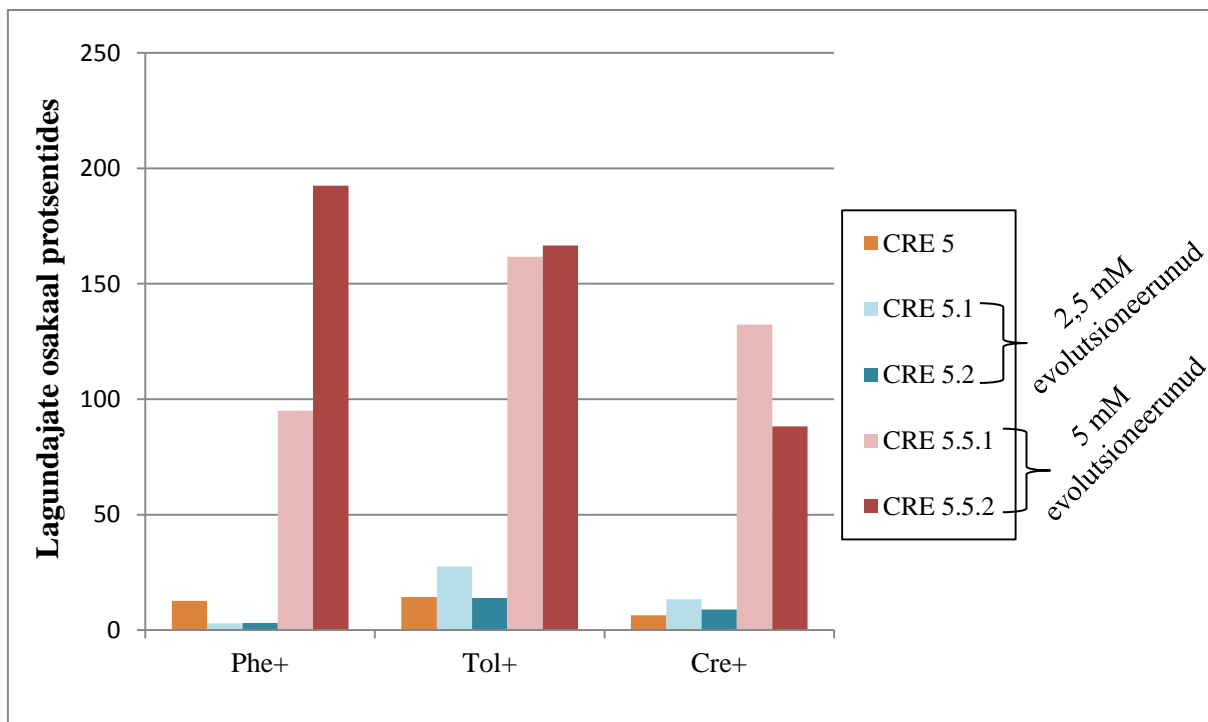
### 2.3.6 Fenooli, *m*-toluaadi ja *m*-kresooli lagundajate osakaal evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides

Kuna bakterite kasvukeskkonnast *m*-kresooli kontsentratsiooni määramisel selgus, et tüvest CRE5 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonide puhul *m*-kresooli kontsentratsioon enam märgatavalt ei langenud ning sama nägime ka populatsiooni CRE5.5.3 puhul, mis oli evolutsioneerunud 5 mM *m*-kresooli juuresolekul (Joonis 6), viisime läbi katse erinevate aromaatsete ühendite lagundajate osakaalu määramiseks evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides (vt. peatükk 2.2.11 „Materjal ja meetodika“ osas). Aromaatsete ühendite lagundamisvõime puhul testisime fenooli, *m*-toluaati ja *m*-kresooli sisaldavatel söötmetel bakterite kasvamist. Lisaks plaatsime rakke ka glükoosi sisaldavale tardsöötmele, et määrata üldist rakkude arvukust evolutsioneerunud populatsioonides. Katsesse valisime ainult osa evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonidest (Joonis 8).

Katsetulemustest selgus, et aromaatsete ühendite lagundajate osakaal on suurem 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonide puhul võrreldes 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonidega (Joonis 8). 2,5 mM *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas evolutsioneerunud populatsioonide vähene võimekus lagundada erinevaid aromaatsed ühendeid võis tuleneda sellest, et tegemist oli heterogeense populatsiooniga, kus



paljustest rakkudest olid kaduma läinud sisseviidud plasmiidid. Kuna Joonisel 8 esitatud tulemused 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonide puhul ületab 100% piiri, võib oletada, et kõik glükoosile tekkinud kolooniad lagundavad nii fenooli, *m*-toluaati kui ka 5 mM *m*-kresooli. 100% ületavad tulemused võisid tekkida nii lahjendusvea kui ka kolooniate lugemisvea tõttu.

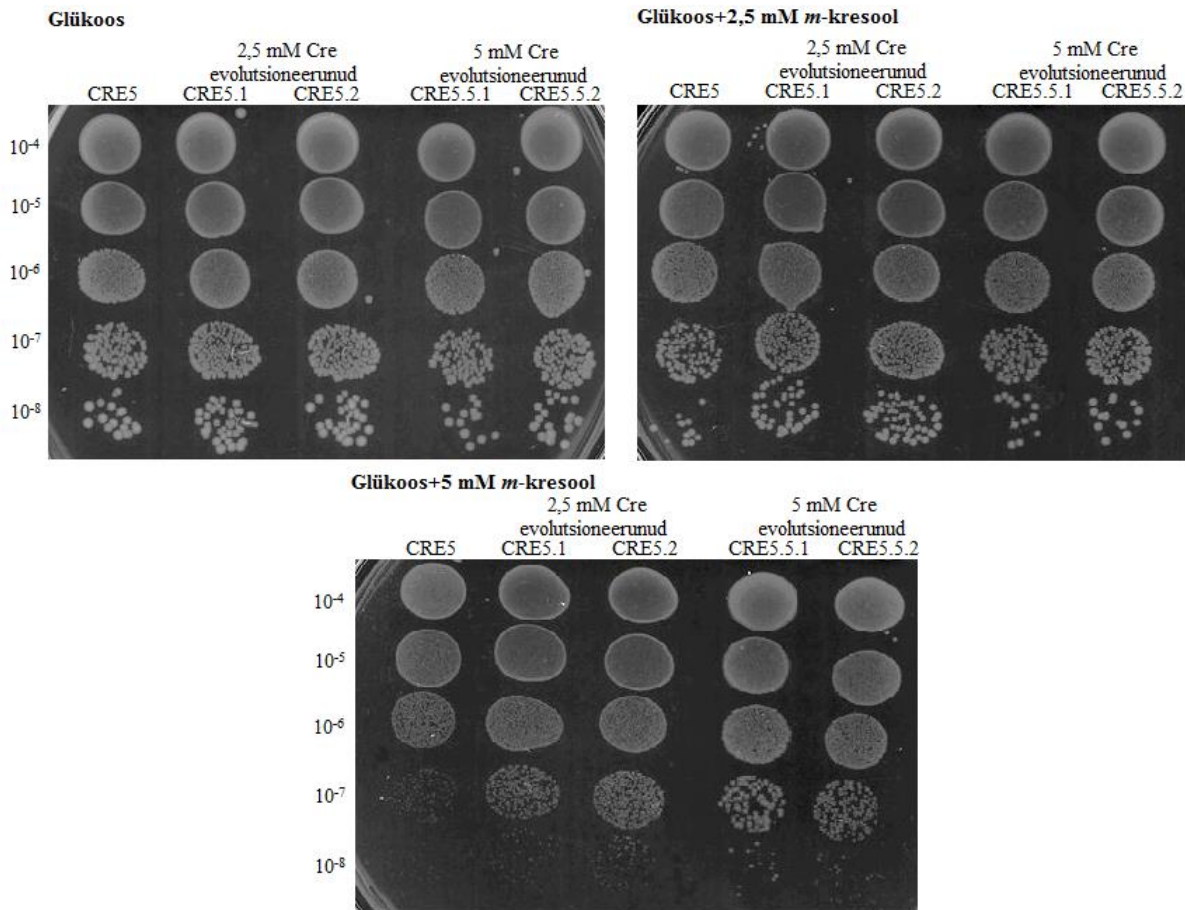


**Joonis 8.** Fenooli, *m*-toluaadi ja *m*-kresooli lagundajate osakaal evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides protsentides. Joonisel on toodud tüve CRE5 algse populatsiooni ning 2,5 mM ja 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides leitud aromaatsete ühendite lagundajate osakaal glükoosi lagundavate rakkude suhtes. Joonisel on esitatud 2 sõltumatu katse tulemused, mistõttu ei ole joonisel toodud 95% usalduspiire, kuid mõlema katse puhul käitusid populatsioonid sarnaselt.

### 2.3.7 2,5 mM ja 5 mM *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas evolutsioneerunud bakteripopulatsioonide *m*-kresooli kontsentratsiooni taluvus

Eelnevatest katsetest selgus, et 5 mM *m*-kresool on piisavalt selektiivne keskkond selleks, et populatsioonis tõuseksid esile selle lagundajad. Selleks, et võrrelda tüve CRE5 algse populatsiooni ja evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonide võimet kasvada erinevatel *m*-kresooli kontsentratsioonidel, viisime läbi *m*-kresooli taluvuskatse (vt. peatükk 2.2.15 „Materjal ja meetodika“ osas). Katse tulemused on esitatud Joonisel 9, millelt on näha, et nii algsed kui ka evolutsioneerunud populatsioonid taluvad võrdselt 2,5 mM *m*-kresooli kontsentratsiooni. Bakterikultuuridest tehtud lahjendustest kasvama hakanud kolooniate arvukus ja suurus *m*-kresooli sisaldaval söötmel oli võrreldav glükoosi tassil tekkinud kolooniatega. Samas oli selgelt näha, et tüve CRE5 algse populatsiooni rakud ei talunud 5

mM *m*-kresooli kontsentratsiooni nii hästi nagu rakud, mis olid pärit evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonidest. Võrreldes glükoosi tassile tekkinud kolooniatega olid 5 mM *m*-kresooli sisaldavale tardsöötmele tekkinud kolooniad väiksemad, mis võis tuleneda ka rakkude aeglasemast kasvukiirusest.

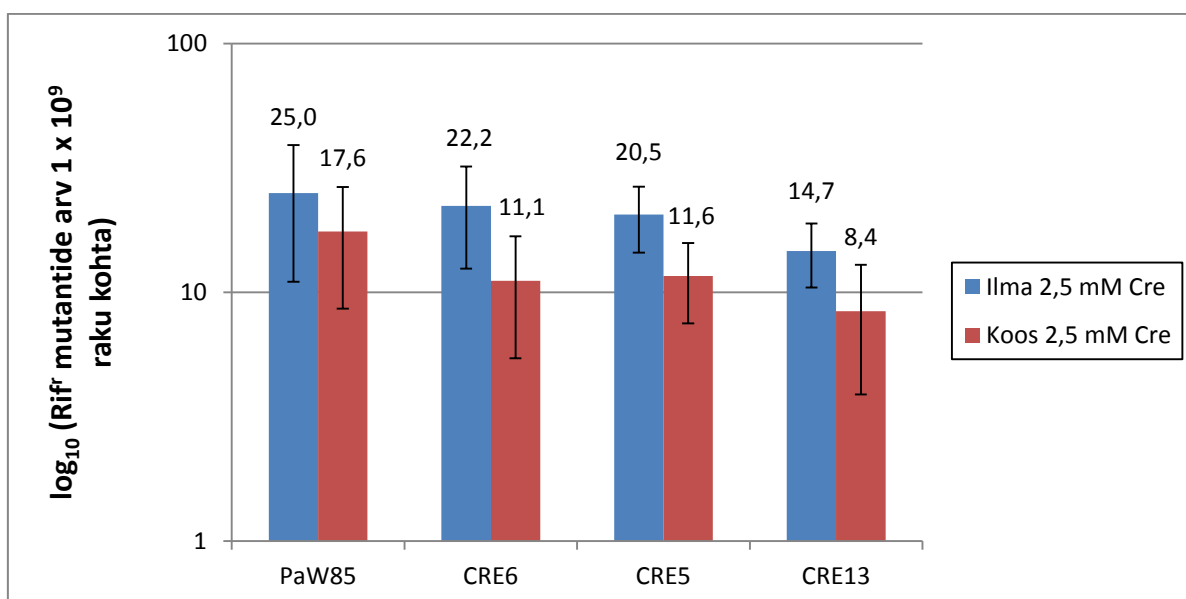


**Joonis 9.** *m*-kresooli kontsentratsiooni taluvuse määramine tüve CRE5 algse populatsiooni ja evolutsioneerumise katse läbinud rakupopulatsioonide puhul, mis on evolutsioneerunud 2,5 mM ja 5 mM *m*-kresooli juuresolekul. Bakterikultuuride lahjendusi on söötmele pipeteeritud 10 µl.

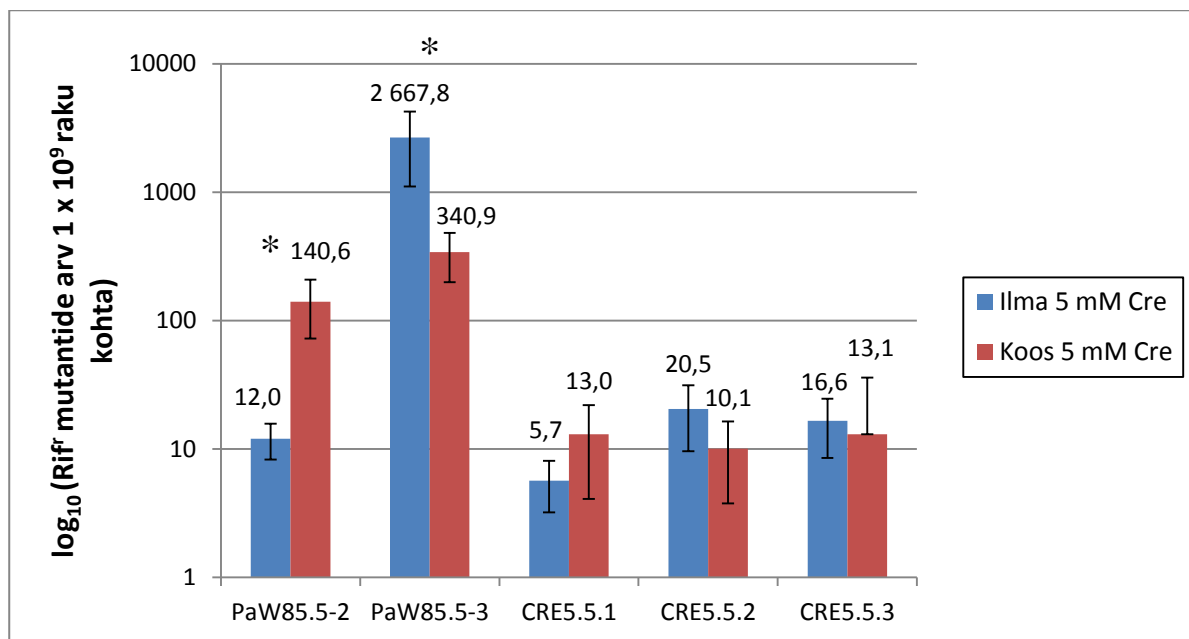
### 2.3.8 *m*-kresooli mõju mutatsioonisagedusele evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides

Kuna bakterite kokkupuude *m*-kresooliga võib kahjustada rakke, põhjustades näiteks oksüdatiivseid kahjustusi, oli üheks uurimustöö eesmärgiks ka selgitada, kuidas mõjutab *m*-kresool nii algsetes kui ka evolutsioneerumise katse läbinud bakteripopulatsioonides mutatsioonisagedust. Meie tööhüpoteesiks oli, et *m*-kresoolist põhjustatud stress võiks soodustada populatsioonis mutaatorite osakaalu suurenemist. Stressirohkes keskkonnas on suurenenud mutatsioonisageduse puhul suurem tõenäosus, et tekib ka rohkem kasulikke mutatsioone, mis suurendavad neid mutatsioone kandvate bakterite kohasust võrreldes ülejäänud populatsiooni liikmetega.

Lisaks selgitasime välja, kas *m*-kresool võiks sarnaselt mõnedele teistele kemikaalidele põhjustada indutseeritud mutageneesi. Selle võimaluse testimiseks viisime läbi rifampitsiini resistentsuse tekkel (Rif<sup>r</sup>) põhineva katse (vt. peatükk 2.2.14 „Materjal ja meetodika“ osas). Rif-katsesse valisime järgmised tüved: *P. putida* tüve PaW85, kus puuduvad *m*-kresooli lagundamiseks vajalikud geenid, *pheA* geeni ja *meta*-raja operoni sisaldav Cre<sup>-</sup> tüvi CRE6, Cre<sup>+</sup> tüved CRE5 ja CRE13. Samuti võtsime katsesse tüvede PaW85, CRE5 ja CRE13 populatsioonid, mis olid läbinud evolutsioneerumise katse 5 mM *m*-kresooli juuresolekul. 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonide katsetulemuste andmed ei ole esitatud.



**Joonis 10.** Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesageduse keskmised väärtused  $1 \times 10^9$  raku kohta tüvedes *P. putida* PaW85, CRE6 ning Cre<sup>+</sup> tüvedes CRE5 ja CRE13, mis ei ole veel läbinud evolutsioneerumise katset. Iga tüve puhul on esitatud vähemalt 14 sõltumatu katse keskväärtused koos 95% usalduspiiridega.



**Joonis 11.** Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesageduse keskmised väärtused  $1 \times 10^9$  raku kohta 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides PaW85.5-2, PaW85.5-3, CRE5.5.1, CRE5.5.2 ja CRE5.5.3. Iga tüve puhul on esitatud vähemalt 7 sõltumatu katse keskvaartused koos 95% usalduspiiridega. Tärn tüve kohal näitab, et spontaansete mutatsioonide tekkesagedus on statistiliselt oluliselt erinev indutseeritud mutatsioonide tekkesagedusest ( $P$ -väärtus  $< 0,05$ ).

Joonisel 10 on näha, et 2,5 mM *m*-kresooliga indutseerimisel ei olnud mõju erinevate tüvede Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedusele populatsioonides, mis ei olnud evolutsioneerumise katset läbinud: sel juhul ei näinud me statistiliselt olulisi erinevusi võrreldes spontaansete Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedusega. Samal ajal selgus, et 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonide puhul oli Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedus suurenenud tüve PaW85 populatsioonide puhul (Joonis 11). Ühel juhul suurendas *m*-kresooli lisamine söötmesse ligikaudu 10 korda Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedust, kusjuures spontaanse mutantide tekkesagedus ei olnud suurenenud (populatsioon PaW85.5-2). Samas oli teise populatsiooni (PaW85.5-3) puhul suurenenud rohkem kui 100 korda spontaanse Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedus ning *m*-kresooli lisamisel oli Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedus võrreldes PaW85 algse populatsiooni rakkudega samuti ligikaudu 20 korda suurem, kuid samas märgatavalt madalam võrreldes sellega, kui *m*-kresooli ei lisatud. Üllatuslikult ei esinenud statistiliselt olulist erinevust Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesageduses ei *m*-kresooliga indutseerides ega ka ilma, kui bakteritesse oli sisseviidud *m*-kresooli lagundamisrada (populatsioonid CRE5.5.1, CRE5.5.2, CRE5.5.3 Joonisel 11). Saadud tulemustest võib järeldada, et *m*-kresooli efekt mutaatorite tekkel on suurem bakterite puhul, kus puudub *m*-kresooli lagundamisvõime.

## 2.4 Arutelu

Looduses on mitmeid inimtegevuse tagajärjel tekkinud aromaatsid ühendeid, mille lagundamine sõltub mikroobidest. Tihtipeale on need ühendid bakterite jaoks uued ja isegi toksilised, mistõttu peavad mikroobid kõigepealt adapteeruma uue keskkonnaga. Adaptatsioon on tihti järk-järguline protsess, mille käigus võivad areneda bakterites uued kataboolsed rajad, mis võimaldavad aromaatsid ühendit lagundada. Selleks, et paremini mõista evolutsiooniliste protsesside tulemusel toimunud fenotüübiliste muutuste tagamaid, kasutatakse järjest rohkem adaptiivset laboratoorset evolutsiooni (ALE). Käesolevas töös uurisime, missugused muutused on toimunud uue katabolismirajaga evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides võrreldes algsete populatsioonidega, kus baktereid oli kultiveeritud ~300 generatsiooni vältel glükoosi sisaldavas vedelsöötmes, kuhu oli lisatud ka kas 2,5 mM või 5 mM *m*-kresool. Lisaks uurisime ka, missugused muutused toimuvad tüves (*P. putida* PaW85), kus puudus *m*-kresooli lagundamiseks vajalik rada.

Meie katsetest algsete Cre<sup>+</sup> tüvede CRE5 ja CRE13 fenotüübilise stabiilsuse analüüsil selgus, et lühiajaliselt mitteselektiivsetes tingimustes kasvatades on vaid ~20% kolooniatest säilitanud *m*-kresooli lagundamisvõimekuse. Eelnevast võiks järeldada, et plasmidid pEST1412 või pWW0 on rakkudest oma ebastabiilsuse tõttu kaduma läinud. Kuna antud katset viisime läbi segapopulatsioonidega, võisid mitteselektiivsed tingimused lisaks soodustada muutuseid plasmiidides. Samas peab ka silmas pidama seda, et *m*-kresooli lagundaja saamiseks ei piisanud vaid hübriidse raja saamiseks vajalike plasmiidide samasse bakterisse kokku viimisest, vaid tuli selekteerida mutante, mis suudavad lagundada *m*-kresooli (Cre<sup>+</sup> fenotüüp). Kuna siiani pole selge, missugused muutused *m*-kresooli lagundamisvõime tagasid, on ka raske selgitada, miks Cre<sup>+</sup> fenotüüp on ebastabiilne. Kindlasti on edaspidi plaanis selgitada võimalikke muutuseid plasmiidides ja mujal genoomis.

Kirjanduses on viiteid sellele, et tugeva selektiivse surve all areneb bakterite aromaatsid ühendi lagundamisvõimekus (Timmis ja Pieper, 1999), mis on kooskõlas ka meie katsete tulemustega. Evolutsioneerumise katse jooksul ja lõpus läbiviidud erinevate aromaatsid ühendite lagundajate määramisel tüve CRE5 algses ning 2,5 mM ja 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides selgus, et 5 mM *m*-kresool on piisavalt selektiivne selleks, et säilitada ja tõsta lagundajate osakaalu populatsioonis (Joonis 8). Sama efekti nägime ka *m*-kresooli kontsentratsiooni mõõtmisel, kus *m*-kresooli lagundasid kõige kiiremini just 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud Cre<sup>+</sup> fenotüübiga populatsioonid (Joonis 6B). 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul adapteerunud populatsioonide

vähemast võimekusest lagundada *m*-kresooli võib põhjendada populatsioonisisese heterogeensusega. Lisaks võib põhjuseks olla ka asjaolu, et 2,5 mM *m*-kresool ei ole rakkudele piisavalt toksiline, et tekiks vajadus hakata seda keskkonnast lagundama ning evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonid spetsialiseerusid pigem glükoosi lagundamisele.

Kirjandusest on teada, et kui kasvukeskkonnas esineb kaks erinevat süsinikuallikat (näiteks glükoos ja laktoos), tekib bakteris *E. coli* kataboliitse repressiooni efekt, mille tulemusena eelistatakse algul glükoosi (Rojo, 2010). Erinevalt *E. coli*'st on *P. putida* puhul glükoosi vahendatud kataboliitse repressiooni efekt väga nõrk. Näiteks, *P. putida* KT2440 puhul on nähtud, et kui keskkonnas on nii glükoos kui ka tolupeen, toimub nende metaboliseerimine samaaegselt (Castillo ja Ramos, 2007). Ka meie uurimustöö tulemusena selgus, et 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonid (välja arvatud CRE5.5.3) lagundavad nii glükoosi kui ka *m*-kresooli samaaegselt (Joonised 5B ja 6B). 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides sellist efekti ei esinenud (Joonised 5A ja 6A), mida võib jällegi põhjendada liiga madala kontsentratsiooniga, mis ei selekteerinud *m*-kresooli lagundajaid. Kuigi 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides oli *m*-kresooli lagundamine vähenenud, oli glükoosi lagundamisvõime nende populatsioonide poolt muutunud kiiremaks (Joonis 5A). Sellest tulenevalt soovisime teada, kas glükoosi lagundamisvõime on paranenud tänu muutustele glükoosi katabolismis või suudavad evolutsioneerunud populatsioonid taluda kasvukeskkonnas esinevat *m*-kresooli paremini võrreldes tüve CRE5 algse populatsiooniga. Selle selgitamiseks viisime läbi kasvukiiruse mõõtmise süsinikuallikana ainult glükoosi ja glükoos+2,5 mM *m*-kresooli sisaldavates vedelsöötmetes. Katsesse võtsime ka metsiktüve ja evolutsioneerumise katse läbinud PaW85.5-2. Katsetulemused ei ole töös esitatud, kuid esialgsete tulemuste põhjal ilmnes, et 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud PaW85.5-2 suudab glükoosil kasvatatuna lag-faasist kiiremini väljuda võrreldes metsiktüvega (*P. putida* PaW85). 2,5 mM *m*-kresooli juuresolekul ilmnes teatavat fluktuendumist, mis võis tuleneda populatsiooni heterogeensusest. Kuna kasvukiiruse mõõtmist viisime läbi ainult ühe korra, tuleb tulevikus kindlasti antud katset korrata, et näha kas saadud tulemused korduvad.

Teades, et *m*-toluaat on *meta*-raja induktoriks (Worsey ja Williams, 1975), uurisime kas ka *m*-kresool indutseerib pWW0 plasmiidis asuvat *meta*-raja võtmeensüümi katehhooli-2,3-dioksügenaasi (C23O). *m*-kresooliga indutseerides oli näha C23O ekspressiooni taseme aktiivsuse tõusu vähesel määral ainult 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides (Joonis 7). Siiski võiks arvata, et *m*-kresool ei ole *meta*-raja geenide

induktoriks ka evolutsioneerunud populatsioonides. C23O aktiivsust võis tõsta mõnevõrra suurem *m*-kresooli lagundavate rakkude osakaal neis populatsioonides. Võrreldes tüve CRE5 algse populatsiooniga oli 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides C23O ekspressiooni basaalne tase ligikaudu 10 korda kõrgem. See vahe võis tuleneda erinevustest *meta*-raja geenide transkriptsioonitasemes või geeni *pheA* poolt kodeeritud fenooli monooksügenaasi väiksemast eriaktiivsusest *m*-kresooli suhtes algse CRE5 tüve puhul, mistõttu tekkis sel juhul vähem 3-metüülkatehhooli. Samas võis katsetulemusi tüve CRE5 puhul mõjutada jällegi ka populatsiooni heterogeensus, mistõttu võisid katsesse sattuda rakud, mis olid juba kaotanud oma võime lagundada *m*-kresooli. Sellest tulenevalt on tulevikus plaanis võrrelda fenooli monooksügenaasi eriaktiivsust *m*-kresooli suhtes CRE5 algsetes ja evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides ja viia läbi katseid fenotüübilt stabiilsemate puhaskultuuridega, mida on plaanis isoleerida katse läbinud populatsioonidest.

On teada, et stressitingimustes võib bakteritel tõusta mutatsioonisagedus, mis suurendab adaptiivsete mutatsioonide tekke tõenäosust. Kui populatsioon on sattunud uude keskkonda, võib tugeva selektsiooni korral populatsioonis kiiresti suureneva konstitutiivsete mutaatorite osakaal. Selline mutaatorfenotüüp võib olla tingitud näiteks MMR raja defektsusest (Matic, 2013; Oliver jt., 2000). Käesolevas töös läbiviidud spontaansete mutatsioonide tekkesageduse määramisest algsetes ja evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonides selgus, et *m*-kresool on mõjutanud mutatsioonide tekkesagedusi peamiselt populatsioonides, kus bakteritel puudus *m*-kresooli lagundamisrada (Joonis 11). Nagu ka teistes katsetes, nägime ka mutatsioonisageduste määramisel *m*-kresooli mõju vaid 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud populatsioonides. Kuna spontaansete mutatsioonide tekkesagedus oli PaW85.5-3 populatsioonis suurenenud umbes 100 korda võrreldes metsiktüvega, võib öelda, et selles populatsioonis on tekkinud konstitutiivne mutaator. Samas vastupidiselt populatsioonile PaW85.5-3 indutseeris *m*-kresooli lisamine populatsiooni PaW85.5-2 Rif<sup>r</sup> mutantide tekesagedust, millest võiks järeldada, et kõrge mutatsioonisagedus on tekkinud vastusena stressile. Teisalt enamikes indutseeritud mutageneesi katsetes, kus oleme testinud mutatsioonide induktrina aromaateid ühendeid, ja kus bakterid on kasvatatud potentsiaalse mutageeni juuresolekul üleöö, ei olnud mutatsioonisagedus võrreldes spontaanse mutatsioonisagedusega suurenenud (tulemused ei ole esitatud). Kuigi *P. putida* tüve PaW85 puhul ilmusid evolutsioneerumise katse populatsiooni mutaatorid, olid meile üllatuslikult *m*-kresooli lagundamisvõimelised populatsioonid säilitanud madala mutatsioonisageduse. Mutatsioonisagedused olid võrreldavad nii *m*-kresooli lisamisel kasvukeskkonda kui ka ilma ja olid võrreldavad ka mutatsioonisagedustega algsetes populatsioonides, mis ei olnud

evolutsioneerumise katset läbinud. Selle põhjal, et mutaatorid ilmusid evolutsioneerumise katses populatsiooni ainult siis, kui bakteritel puudus *m*-kresooli lagundamisrada, võib järeldada, et evolutsioneerumise katse käigus oli *m*-kresooli kataboolseid geene sisaldavate bakterite puhul *m*-kresoolist põhjustatud stress väiksem, kuna bakterid lagundasid keskkonda lisatud stressori. Samas läheb saadud tulemus vastuollu väitega, et aromaatsete ühendite lagundamine tõstab oksüdatiivse stressi taset (Domínguez-Cuevas jt., 2006; Kivisaar, 2010), seeläbi tõstes mutatsioonide tekkesagedust. Võimalik, et stressi tase sõltub ka lagundatavast ühendist ja selle ühendi katabolismiraja iseärasustest. Siinkohal peab aga kindlasti silmas pidama ka seda, et tekkinud muutuseid on analüüsitud segapopulatsiooni tasemel, mistõttu katsetulemused peegeldavad vaid keskmist mutatsioonisagedust populatsioonis. Edasipidi tuleks analüüsida mutatsioonide tekkesagedusi evolutsioneerumise katse läbinud populatsioonidest isoleeritud puhaskultuuride tasemel, mis iseloomustaks täpsemalt *m*-kresooli lagundamisrada sisaldavate rakkude mutatsioonisagedusi.



## Kokkuvõte

Bakterid elavad pidevalt muutuv keskkonnas, mis põhjustades stressi suunab bakterid statsionaarsesse faasi. Stressi tekitavad näiteks toitainete nälg ja kokkupuude rakkudele toksiliste aromaatsete ühenditega (näiteks fenool, toluen, *m*-kresool). Selleks, et stressitingimustes hakkama saada, peavad bakterid kohanema antud keskkonnaga, mida soodustavad rakusisesed reguleeritud muutused ja juhuslikult tekkinud kasulikud mutatsioonid.

Bakalaureusetöö teoreetilises osas andsin ülevaate aromaatsete ühendite lagundamisega seotud muutustest ja *m*-kresooli lagundamisest. Lisaks kirjeldasin põhjalikumalt bakterite evolutsioneerumist stressitingimustes ja andsin ülevaate ka adaptiivse laboratoorse evolutsiooni kohta.

Töö eksperimentaalses osas konstrueerisin *m*-kresooli lagundava *P. putida* tüve, kuhu oli sisseviidud kaks katabolismiraja blokki: plasmiidis pEST1412 olev geen *pheA* ning TOL plasmidi pWW0 *meta*-rada. Uurisin, missugused muutused toimuvad bakteripopulatsioonides laboratoorse evolutsioneerumise katse käigus ~300 generatsiooni vältel, kus võrreldavalt on glükoosi sisaldaval söötmel *m*-kresooli juuresolekul kultiveeritud *m*-kresooli lagundavaid baktereid ja baktereid, kus *m*-kresooli lagundamiseks vajalikud geenid puuduvad. Lisaks uurisin, kuidas mõjutab *m*-kresooli juuresolek algsete ja evolutsioneerumiskatse läbinud populatsioonides spontaansete ja indutseeritud mutatsioonide tekkesagedusi.

Käesoleva töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Võrreldes madalama kontsentratsiooniga (2,5 mM *m*-kresool) oli 5 mM *m*-kresool rakkudele piisavalt toksiline, et suurendada ja säilitada *m*-kresooli lagundajate osakaalu populatsioonis.
2. *m*-kresooli lagundamiseks vajaliku hübriidse raja saamiseks ei piisanud ainult selleks vajalike kataboolsete geenide kokkuviiemisest. Kuna *m*-kresool ei ole TOL plasmiidis pWW0 paikneva *meta*-raja induktoriks, tekkis *m*-kresooli lagundamisvõime alles mutatsioonide tagajärjel, mille päritolu on vaja veel selgitada.
3. *m*-kresool soodustas mutaatorfenotüübi tekkimist vaid neis populatsioonides, kus bakteritel puudusid *m*-kresooli lagundamiseks vajalikud geenid.
4. 5 mM *m*-kresooli juuresolekul evolutsioneerunud Cre<sup>+</sup> fenotüübiga bakterite populatsioonides ei esinenud statistiliselt olulist erinevust spontaansete ja indutseeritud mutatsioonide tekkesageduses ning mutatsioonide tekkesagedused olid

võrreldavad algsete populatsioonide omadega. Sellest võib järeldada, et sisseviidud *m*-kresooli lagundamise rada võimaldab bakteritel paremini taluda keskkonnas olevat *m*-kresooli ning sel juhul ei ole *m*-kresoolist põhjustatud stress piisav mutaatorite esiletulekuks evolutsioneeruvates populatsioonides.

## Evolution of bacterial populations in *m*-cresol-containing environment

### Resume

Ingrem Metsik

Bacteria are living in constantly changing environment, which causes stress and forces bacteria to enter stationary-phase. Stressors could be e.g. carbon starvation or exposure of bacteria to toxic aromatic compounds (e.g. phenol, toluene, *m*-cresol). To survive under stress conditions, bacteria must adapt to the changing environment that can be accelerated with intracellular regulatory changes and spontaneously occurred beneficial mutations.

In the literature review of this study I gave an overview of the changes related to degradation of aromatic compounds and an overview of *m*-cresol degradation. Also, I described bacterial evolution under stress conditions and gave an overview of adaptive laboratory evolution.

The aim of the experimental part was to examine what kinds of changes occur in bacterial populations throughout the laboratory evolution experiment during the 300 generations with bacteria that could degrade *m*-cresol and bacteria in which the necessary genes for *m*-cresol degradation were absent. To construct *m*-cresol-degrading *Pseudomonas putida* strain, the catabolic genes were originated from different source: on plasmid pEST1412 (the gene *pheA* for phenol monooxygenase) and on TOL plasmid pWW0 (the genes for *meta*-pathway of catechol degradation). In the laboratory evolution experiment bacteria were cultivated in glucose-containing medium in presence of *m*-cresol. Furthermore, I investigated how *m*-cresol could affect spontaneous and induced mutation frequencies of ancestral populations and populations that had evolved.

The results of my study can be summarized as follows:

1. 5 mM *m*-cresol was sufficiently toxic to cells to increase and maintain the proportion of bacteria that can degrade *m*-cresol in the population in contrast with the lower concentration (2.5 mM *m*-cresol).
2. When constructing bacteria with hybrid pathway for degradation of *m*-cresol, it was not sufficient to bring necessary catabolic genes together. Since, *m*-cresol did not induce *meta*-pathway genes on the plasmid pWW0, the ability to degrade *m*-cresol appeared only as a result of so far uncharacterized mutations.
3. *m*-cresol contributed to mutator phenotype generation only in populations that did not have necessary genes for *m*-cresol degradation.

4. We have shown that there is no statistically significant difference between the spontaneous and induced mutation frequencies in the bacterial populations with Cre<sup>+</sup> phenotype that had evolved in the presence of 5 mM *m*-cresol. Also, the mutation frequencies were similar to ancestral population mutation frequencies. These results suggest that new catabolic pathway for *m*-cresol degradation enabled bacteria to better tolerate *m*-cresol and for that reason the *m*-cresol-caused stress was not strong enough for the appearance of mutators in the evolving populations.

## **Kasutatud kirjandus**

- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. N. Y. p. 445-447.
- Babu, M. M., Aravind, L. (2006). Adaptive evolution by optimizing expression levels in different environments. Trends in Microbiol. 14: 11-14.
- Barrick, J. E., Lenski, R. E. (2013). Genome dynamics during experimental evolution. Nat Rev Genet 14(12): 827-39.
- Bauchop, T. and S. R. Elsdon (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. J Gen Microbiol 23: 457-469.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby jt (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. Mol Gen Genet 154(2): 203-204.
- Bjedov, I., Tenaillon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, V., Taddei, F., Matic, I. (2003). Stress-induced mutagenesis in bacteria. Science 300: 1404-1409.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J Mol Biol 41(3): 459-472.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Burlage, R. S., Hooper, S. W., Sayler, G. S. (1989). The TOL (pWWO) Catabolic Plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 55(6): 1323-1328.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, Joaquim. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Internatl Microbiol 3: 3-8.
- del Castillo, T., Ramos, J. L. (2007). Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways. Journal of Bacteriology p. 6602-6610.
- Diaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. International Microbiology 7: 173-180.
- Diaz, E., Jimenez, J. I., Nogales, J. (2013). Aerobic degradation of aromatic compounds. Current Opinion in Biotechnology 24: 431-442.

Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L., de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem* 281: 11981–11991.

Dragosits, M., Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact.* 12:64.

Elena, S. F., Lenski, R. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the Dynamics and genetics bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics* 4: 457-469.

Feist, C. F. and Hegeman, G. D. (1969). Regulation of the meta cleavage pathway for benzoate oxidation by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 100 (2), 1121-1123.

Foster, P. L. (2007). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42(5): 373–397.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., Ellenberger, T. (2006). *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington D.C, ASM Press.

Galhardo, R. S., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42(5): 399–435.

Gordo, I., Sousa, A. (2010). Mutation, selection and genetic interactions in bacteria. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P. A., Thomas, C. M. (2002). Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 4(12): 856-871.

Herrero, M., V. de Lorenzo jt (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172(11): 6557-6567.

Hopper, D. J., Taylor, D. G. (1974). Pathways for the degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 122(1): 1-6.

Hottes, A. K., Freddolino, P. L., Khare, A., Donnel, Z. N., Liu, J. C., Tavazoie, S. (2013). Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet* 9(7).

Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 11(7): 443–454.

- Jayaraman, R. (2011). Hypermutation and stress adaptation in bacteria. *J. Genet.* 90, 383–391.
- Kim, J., Park, W. (2014). Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 6933–6946.
- Kivisaar, M. (2010). Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads. *FEMS Microbiol Lett* 312(1): 1-14.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bacteriocidal antibiotics. *Cell* 130: 797–810.
- Krastanov, A., Alexieva, Z., Yemendzhiev, H. (2012). Microbiol degradation of phenol and phenolic derivates. *Engineering in Life Sciences* 13, 76-78.
- Lee, D-H., Feist, A. M., Barret, C. L., Palsson, B. (2011). Cumulative number of cell divisions as a meaningful timescale for adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 6(10): e26172.
- Lenski, R. E., Mongold, J. A., Sniegowski, P. D., Travisano, M., Vasi, F., Gerrish, P. J., Schmidt, T. M. (1998). Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: what makes one genotype a better competitor than another? *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(1): 35-47.
- Matic, I. (2013) *Stress-Induced Mutagenesis*, p. 1-20. Springer Science+Business Media New York.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbour Press, N.Y.
- van der Meer, J. R., Sentschilo, V. (2003). Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 14: 248–254.
- Müller, J. A., Galushko, A. S., Kappler, A., Schink, B. (1999). Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. *Archives of Microbiol.* 172(5): 287-294.
- Najafi, M. B. H, Pezeshki, P. (2013). Bacterial mutation; types, mechanisms and mutant detection methods: a review. *European Scientific Journal* ISSN: 1857 – 7881.
- Nurk, A., Kasak, L., Kivisaar, M. (1991) Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* 102(1): 13-8.

- Nyström, T. (2004). Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* 58: 161-81.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, R., Baquero, F., Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1253.
- Ramos, J. L., Gallegos, M-T., Marqués, S., Ramos-González, M-I., Espinosa-Urgel, M., Segura, A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology* 4: 166-171.
- Ramos, J. L., Krell, T., Daniels, C., Segura, A., Duque, E. (2009). Responses of *Pseudomonas* to small toxic molecules by a mosaic of domains. *Current Opinion in Microbiology* 12: 215-220.
- Ren, Y., Peng, L-H., Deng, L-J., Wei, C-H. (2009). Isolation and characterization of *Citrobacter farmeri* SCO1: a novel *m*-cresol-degrading strain. *Environmental Engineering Science*. 26(10): 1489-1495.
- Ren, Y., Peng, L., Zhao, G., Wei, C. (2014). Degradation of *m*-cresol via the ortho cleavage pathway by *Citrobacter farmeri* SC01. *Biochemical Engineering Journal* 88: 108-114.
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* 34(5): 658-84.
- Ryall, B., Eydallin, G., Ferenci, T. (2012). Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(3): 597-625.
- Sala-Trepat, J. M., Murray, K., Williams, P. A. (1972). The metabolic divergence in the *meta* cleavage of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015. *Eur. J. Biochem* 28(3): 347-356.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35(4): 652-80.
- Sharma, R. C. and R. T. Schimke (1996). "Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium." *Biotechniques* 20(1): 42-44.
- Williams, P. A., Murray, K. (1974). Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol.* 120(1): 416-423.



Worsey, M. J., Williams, P. A. (1975). Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. J Bacteriol 124(1): 7-13.

Yao, H., Ren, Y., Wei, C., Yue, S. (2011). Biodegradation characterisation and kinetics of *m*-cresol by *Lysinibacillus cresolivorans*. African Journals Online 37(1).

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Ingrem Metsik

(sünnikuupäev: 16.05.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

### **Bakteripopulatsioonide evolutsioneerumine *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas**

mille juhendajad on Maia Kivisaar ja Tanel Ilmjärv

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015