

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Hübriidse *m*-kresooli lagundamisraja efektiivsust suurendavad mutatsioonid bakteri
Pseudomonas putida laboratoorses evolutsioneerumiskatses**

Magistritöö

Lõputöö maht 30 EAP

Ingrem Metsik

Juhendajad Ph.D. Maia Kivisaar

M. Sc. Tanel Ilmjärv

TARTU 2017

Hübriidse *m*-kresooli lagundamisraja efektiivsust suurendavad mutatsioonid bakteri *Pseudomonas putida* laboratoorses evolutsioneerumiskatses

Ingrem Metsik

Järjest enam satub inimtegevuse tõttu keskkonda toksilisi aromaatsed ühendid ehk ksenobiootikume. Oma võõra struktuuri ja keemilise stabiilsuse tõttu püsivad ksenobiootikumid looduses väga pikka aega. Mikroorganismide võime kiiresti kohaneda uute keskkonnatingimustega on seotud uute kataboolsete radade evolutsioneerumisega, võimaldades kasutada keskkonnas esinevaid aromaatsed ühendeid süsiniku- ja energiaallikana. Käesolevas töös selgitasime geneetilisi muutusi bakteripopulatsioonides, mis olid läbinud adaptiivse laboratoorse evolutsioneerumise katse (ALE) ~300 põlvkonna vältel *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas.

Märksõnad: adaptiivne laboratoorne evolutsioon, *m*-kresool, aromaatsed ühendid

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Mutations that increase the efficiency of the hybrid *m*-cresol degradation pathway in laboratory-evolved *Pseudomonas putida*

Ingrem Metsik

Due to human activities there are more and more toxic aromatic compounds called xenobiotics in the environment. Xenobiotics are persistent in the nature for a very long time because of their foreign structure and chemical stability. Microbial ability to rapidly adapt to new environmental conditions contributes to the evolution of new catabolic pathways which enables to use new aromatic compounds as an energy and carbon source. In this thesis we identified the genetic alterations that lead to improved *m*-cresol degradation in populations that had evolved ~300 generations in the presence of *m*-cresol.

Keywords: adaptive laboratory evolution, *m*-cresol, aromatic compounds

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Aromaatsed ühendid keskkonnas	7
1.1.1 Aromaatsete ühendite lagundamine	7
1.1.1.1 Aeroobne lagundamine	8
1.1.1.2 Anaeroobne lagundamine	9
1.1.2 Aromaatsete ühendite toksilisus ja kaitsevastused mikroorganismides	9
1.2 Fenoolsed ühendid	10
1.2.1 <i>m</i> -kresooli lagundamine	10
1.3 Adaptiivne laboratoorne evolutsioon	11
1.3.1 ALE-s kasutatavad organismid	12
1.3.2 Meetodid ALE läbiviimiseks	12
1.3.3 Mutaatorfenotüübi esinemine adapteerumise jooksul	12
1.3.4 ALE kestvus	13
1.3.5 ALE bakteriga <i>E. coli</i>	13
2. Eksperimentaalosa	15
2.1 Töö eesmärk	15
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid	16
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	17
2.2.3 Geelelektroforees	19
2.2.4 Bakterite elektroporatsioon	19
2.2.5 Evolutsioneerunud tüvede fenotüübilise stabiilsuse määramine	19
2.2.6 Plasmiidse DNA eraldamine	20
2.2.7 Bakterite konjugatsioon	20
2.2.8 Rakulüsaadi valmistamine	20
2.2.9 Katehhooli-2,3-dioksügenaasi eriaktiivsuse määramine	21
2.2.10 Katehhooli-1,2-dioksügenaasi eriaktiivsuse määramine	21
2.2.11 Fenooli monooksügenaasi eriaktiivsuse määramine	21
2.2.12 Rakuvabast lüsaadist totaalvalgu kontsentratsiooni mõõtmine	22
2.2.13 Sekveneerimine	22

2.3 Tulemused.....	24
2.3.1 Evolutsioneerunud puhaskultuuride saamine.....	24
2.3.2 Evolutsioneerunud tüvede fenotüübiline stabiilsus mitteselektiivsetes tingimustes	25
2.3.3 <i>m</i> -kresooli lagundamist võimaldavate võtmeensüümide aktiivsuste määramine evolutsioneerunud tüvedes	26
2.3.4 Cre ⁺ fenotüübiga tüvede rekonstrueerimine.....	28
2.3.5 <i>m</i> -kresooli lagundamist võimaldavate võtmeensüümide aktiivsuste määramine rekonstrueeritud tüvedes	30
2.3.6 Muutused evolutsioneerunud tüvede geeni <i>pheA</i> järjestuses võrreldes CRE6 Cre ⁻ tüvega	33
2.3.7 <i>pheBA</i> operonis paikneva ensüümi katehhooli-1,2-dioksügenaas aktiivsuse määramine evolutsioneerunud ja rekonstrueeritud tüvedes	33
2.3.8 Muutused evolutsioneerunud tüvede geeni <i>pheB</i> järjestuses võrreldes CRE6 Cre ⁻ tüvega	35
2.4 Arutelu	37
Kokkuvõte	41
Resume	42
Tänuõnad.....	44
Kasutatud kirjandus	45

Kasutatud lühendid

ALE – adaptiivne laboratoorne evolutsioon

Amp – ampitsilliin

Bp – bensüülpenitsilliin

C12O – katehhooli-1,2-dioksügenaas

C23O – katehhooli-2,3-dioksügenaas

CAA – *casamino acids*

CoA – koensüüm A

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

EDTA – etüleen-diamiin-tetra atsetaat

FAD – flaviin adeniin dinukleotiid

Glc – glükoos

Km – kanamütsiin

LB – lüsogeenne sööde

m-Cre – *m*-kresool

MMR – DNA valepaardumise reparatsioonisüsteem

m-Tol – *m*-toluaat

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

Phe – fenool

PMO – fenooli monoooksügenaas

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid

Sissejuhatus

Järjest enam leidub keskkonnas aromaatsed ühendeid, mis on oma keemilise struktuuri tõttu väga stabiilsed ning püsivad seetõttu keskkonnas väga pikka aega. Kuna enamik neist aromaatsetest ühenditest sisaldavad võõraid struktuure, puuduvad mikroobides nende lagundamiseks vajalikud kataboolsed rajad. Aromaatsed ühendid on enamasti ka mikroobidele toksilised, akumulierudes rakumembraani ning põhjustades metaboliitide ja ionide lekkimist väliskeskkonda. Siiski on nende toksiliste aromaatsete ühendite lagundamise keskmes mikroobid. Bakterite metaboolne mitmekülgus ja võime kohaneda muutuvate keskkonnatingimustega soodustavad neis uute kataboolsete radade tekkimist, mis võimaldab aromaatsed ühendeid kasutada süsiniku- ja energiaallikana. Mikroobide adapteerumist uue süsinikuallikaga seostatakse tihti horisontaalse geeniülekanedega, mille abil kanduvad bakterirakkudesse erinevad kataboolsed plasmiidid, mis kannavad endas gene aromaatsete ühendite lagundamiseks (Jutkina jt., 2011).

Suur osa keskkonda sattuvatest aromaatsetest ühenditest on fenool ja selle derivaadid, mida peetakse üheks peamiseks keskkonna saasteaineteks (Krastanov jt., 2012). Keskkonnast on isoleeritud mitmeid erinevaid mikroobe, kes suudavad lagundada ühendeid, mida on peetud mitte-lagundatavateks. Näiteks perekonna *Pseudomonas* liikide seas on nähtud laialdast lagundamisvõimekust (Silby jt., 2011).

Käesolevas töös on antud ülevaade aromaatsetest ühenditest, nende lagundamisest ja aromaatsetest ühenditest tulenevast toksilisusest mikroobidele. Lisaks on antud ülevaade ka adaptiivsest laboratoorsest evolutsioonist (ALE). Töö eksperimentaalses osas selgitasime *m*-kresooli lagundamisvõime võimalikke põhjuseid ALE katse käigus saadud evolutsioneerunud segapopulatsioonidest isoleeritud tüvedes ning algses *m*-kresooli lagundavas Cre⁺ tüve.

Märksõnad: bakterite kataboolsete radade evolutsioneerumine, aromaatsed ühendid, *m*-kresool, adaptiivne laboratoorne evolutsioon ALE

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Aromaatsed ühendid keskkonnas

Looduses esineb palju saasteaineid, millest levinumateks on aromaatsed ühendid (Guzik jt., 2011).

Aromaatsed ühendid on orgaanilised ühendid, mis sisaldavad oma molekulaarstruktuuris benseeniringi (Yang, H jt., 2005), mis annab aromaatsel ühendile nii struktuurse kui ka keemilise stabiilsuse tänu sümmeetrilisele π -elektronsüsteemile (Ladino-Orjuela jt., 2016). Aromaatsed ühendid leidub kõikides organismides kolme aromaatsel aminohappe kujul (fenüülalaniin, türosiin ja trüptofaan). Lisaks moodustavad aromaatsed ühendid veerandi maismaataimede biomassist, mis tuleneb peamiselt aromaatsel polümeeri ligniini arvelt, mis moodustub fenüülpropani ühikutest (Fuchs jt., 2011).

Keskkonnas esinevad aromaatsed ühendid jagunevad kaheks: looduslikeks, mis tekivad elusorganismide metaboolse aktiivsuse tagajärjel, ning ksenobiootikumideks, mis tekivad peamiselt tööstuslike protsesside või muu inimtegevuse tagajärjel. Enamik ksenobiootikume sisaldavad struktuure, mis tavaliselt ei esine looduslikes aromaatsel ühendites, mistõttu on nad väga raskesti lagundatavad (Roldan jt., 2008). Kuigi enamus aromaatsel ühendeid on taimse päritoluga, puuduvad taimedel vajalikud lagundamisrajad, et kasutada neid ühendeid süsinikuallikatena. Ka loomadel on selles osas piiratud lagundamisvõime, välja arvatud aromaatsel aminohapped ja mõned üksikud ühendid (Fuchs jt., 2011).

Keskkonnas esinevaid aromaatsel ühendeid lagundavad peamiselt aeroobsed ja anaeroobsed bakterid ning aeroobsed seened (Fuchs jt., 2011). Bakteritel, mis tekkisid juba rohkem kui kolm miljardit aastat tagasi, on välja kujunenud strateegiad, kuidas omastada energiat peaaegu kõikidest ühenditest. Bakterite rohkus, nende kiire kasv ja võimalus horisontaalseks geeniulekandeks võimaldab neil evolutsioneeruda kiiresti ning adapteeruda muutuvate keskkonnatingimustega, sealhulgas ka ekstreemsete tingimustega, mis ei võimalda teiste elusorganismide kasvu (Diaz, 2004). Tänu mikroorganismide evolutsioonilisele potentsiaalile ja geneetilisele paindlikkusele on bakteritel välja kujunenud uued kataboolsed rajad ksenobiootikumide lagundamiseks (Rieger jt., 2002).

1.1.1 Aromaatsel ühendite lagundamine

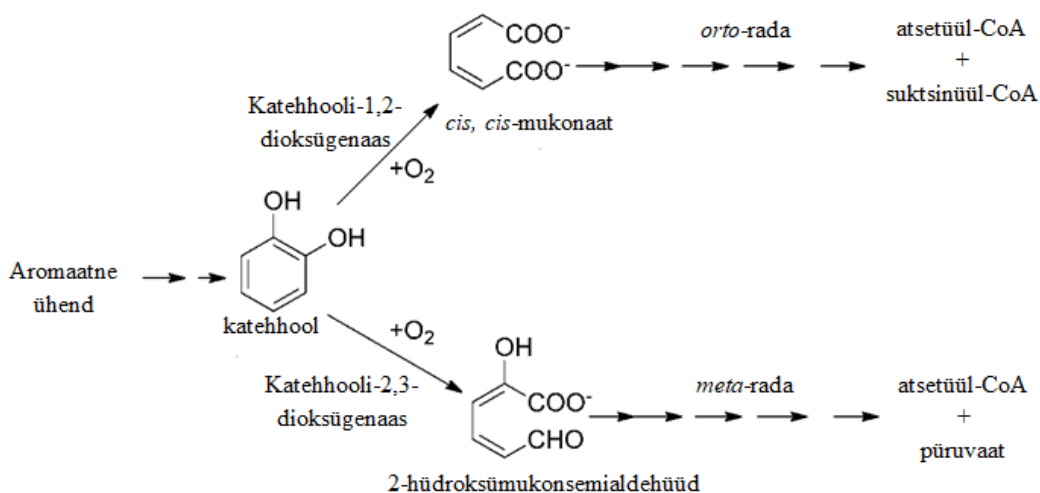
Aromaatsel ühendi lagundamisvõimet kirjeldati esimest korda 1908. aastal, mil isoleeriti bakter *Bacillus hexacarbovorum*, mis suudab kasvada tolueni ja ksüleen sisaldavas

keskkonnas (Phale jt., 2007). Selleks, et lagundada aromaatsid ühendeid kas aeroobselt või anaeroobselt, tuleb esmalt lõhkuda benseeniring. Nii aeroobselt kui ka anaeroobselt aromaatsete ühendite lagundamine on jaotatud kaheks etapiks: ülemine rada, kus aromaatsed ühendid lõhustatakse aromaatsiks vaheühendiks, ning alumine rada, kus tekkinud metaboliidid suunduvad tsentraalsesse metabolismiradadesse.

1.1.1.1 Aeroobne lagundamine

Aeroobsetes tingimustes on esimeseks etapiks aromaatsed ühendid oksüdatsioon, mida viib läbi monooksügenaas (hüdrosülaas) või dioksügenaas (Ladino-Orjuela jt., 2016). Oksüdatsiooni tulemusena tekib dihidroksü aromaatsed vaheühendid, nagu näiteks katehhool, prokatehhuaat, gentisaat. Need vaheühendid on substraadiks benseenituumaga lagundavatele ensüümidele, mis kasutavad molekulaarset hapnikku, et avada aromaatsed rõngas kahe hüdrosüülrühma vahelt (*orto*-lõikusrada) või proksimaalselt ühe hüdrosüülrühma juurest (*meta*-lõikusrada) (Diaz, 2004).

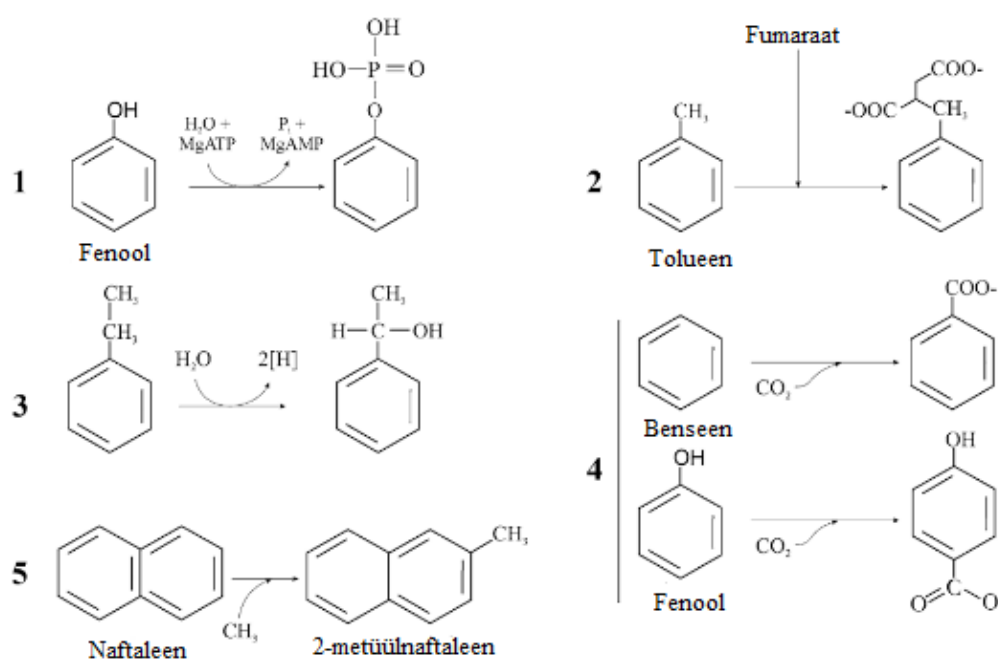
orto-lõikusrada ehk β -ketoadipaadi lõikusrada katalüüsivad intradioolsed dioksügenaasid, nagu näiteks katehhooli-1,2-dioksügenaas, mille tulemusena tekib katehhoolist *cis,cis*-mukonaat. *meta*-lõikusraja puhul aga ekstradioolsed dioksügenaasid, nagu näiteks katehhooli-2,3-dioksügenaas, kus tekib 2-hüdrosüümukonsemialdehüüd (Ladino-Orjuela jt., 2016). Aromaatsete ühendite aeroobne lagundamine lõpeb Krebse tsükli vaheühendite tekkimisega (Joonis 1) (Diaz, 2004).



Joonis 1. Aromaatsed ühendid aeroobne lagundamine mööda *orto*- ja *meta*-rada (muudetud kujul, Singh jt., 2015).

1.1.1.2 Anaeroobne lagundamine

Aromaatsete ühendite lagundamine anaeroobsetes tingimustes algab nende redutseerumisega, mida katalüüsivad süntaasid, dehüdrogenaasid ja karboksülaasid. On leitud viis moodust, kuidas anaeroobsetes tingimustes toimub aromaatsi ühendi aktivatsioon: fosforüleerimine, fumaraadi lisamine, O₂-sõltuv hüdroksüleerimine, karboksüleerimine ning metülatsoon (Joonis 1). Anaeroobse lagundamise puhul on kirjeldatud erinevaid vaheühendeid, millest enam levinud on bensoüül-CoA, millel on 2-amino, 3-hüdroksü- ja 3-metüül-derivaadid. Järgneb vaheühendite dearomatiseerimine (Ladino-Orjuela jt., 2016).



Joonis 2. Aromaatsi ühendi inaktivatsioon anaeroobsetes tingimustes: 1) fosforüleerimine; 2) fumaraadi lisamine; 3) O₂-sõltuv hüdroksüleerimine; 4) karboksüleerimine ja 5) metülatsoon (muudetud kujul, Ladino-Orjuela jt., 2016).

1.1.2 Aromaatsi ühendite toksilisus ja kaitsevastused mikroorganismides

Aromaatsed ühendid võivad olla mikroorganismidele toksilised sõltuvalt ühendi enda omadustest ning bakteriiliigi ja -tüve kaitsemehhanismidest. Benseen, toluen, ksüleenid ja stüreen on äärmiselt toksilised, kuna nad akumulatsioonivad bakterite tsütoplasmamembraani, seeläbi lõhkudes rakumembraani struktuuri. Rakumembraani peamiseks ülesandeks on moodustada rakule läbilaskev barjäär, mis reguleerib lahuste liikumist raku ja väliskeskkonna vahel. Kahjustades rakumembraani, nõrgendavad aromaatsed ühendid rakule eluks vajalikke funktsioone, nagu näiteks pH gradiendi ja elektrokeemilise potentsiaali muutused. Lisaks

võivad aromaatsed ühendid ka inhibeerida membraanivalkude funktsioone, millele võib järgneda rakulüüs (Ramos jt., 2002). Aromaatsete ühendite toksilisus tuleneb ka nende bioloogilisest aktivatsioonist, mille tagajärjel tekivad vaheühendid, nagu näiteks epoksiid ja katehhooli derivaadid. Need vaheühendid on aga äärmiselt reaktiivsed ning tekitavad reaktiivseid hapnikuradikaale (*reactive oxygen species*; ROS) (Phale jt., 2007).

Vältimaks aromaatsete ühendite ja teiste toksiliste solventide akumulatsiooni muudetakse bakterites membraanikomponente ning rakupinna hüdrofoobsust. Lisaks kohandatakse ka membraani voolavust läbi *cis-trans* isomerisatsiooni, küllastunud/küllastumata rasvhapete suhte ning fosfolipiidide „pea“ asendi muutmisega. Näiteks *Pseudomonas putida* DOT-T1E puhul on näidatud, et *cis-trans* isomeraas (Cti) on oluline faktor ärahoidmaks esialgset rakukahjustumist (Ramos jt., 2001).

Bakterite kaitsevastus aromaatsetele ühenditele ja teistele toksilistele solventidele on tihti aga mitmekülgne, kus lisaks eelnevalt kirjeldatule käivituvad bakterirakus ka üldised stressivastused. Aromaatsed ühendid lahustuvad rakumembraanis mõjudes denatureerivate ühenditena, mille tulemusena hakkavad bakterirakus kuhjuma vabad hapnikuradikaalid ja vesinikperoksiid. Kaitsevastusena indutseeritakse bakterirakus mitmeid chaperone, suureneb katalaaside, glutatioon S-transferaaside ja peroksüdaaside töö, et vähendada hapnikuradikaalide tekitatud kahju (Ramos jt., 2009).

1.2 Fenoolsed ühendid

Fenool ja fenoolsed ühendid on ühed paljudest aromaatsetest saasteainetest, mida leidub nii tööstuslikes kui ka olmejäätmete heitvetes. Fenoolsed ühendid on toksilised mikroorganismidele kõrgetes kontsentratsioonides, mistõttu on neid keeruline lagundada (Chen jt., 2015). Lisaks võib kõrge kontsentratsioon inhibeerida ka mikroobide kasvu (Krastanov jt., 2012).

Tööstuslikes heitvetes esineb tavaliselt üheaegselt rohkem kui üks fenoolne ühend, kus üsnagi tavaline on fenooli ja *m*-kresooli (3-metüülfenool) kooseksisteerimine (Chen jt., 2015). *m*-kresool tekib näiteks sünteetiliste protsesside tagajärjel ja petrooleumijääkidest. Lisaks on leitud, et 3-metüülfenool on üks peamisi põhjavee saastajatest (Müller jt., 1999).

1.2.1 *m*-kresooli lagundamine

m-kresooli lagundamist on täheldatud mitmete erinevate organismide puhul, nagu näiteks pärm *Candida tropicali*, bakterid (perekonna *Pseudomonas* liigid, *Alcaligenes faecalis*,

Desulfobacterium cetonicum) ja seened (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* jt.) (Ren jt., 2014).

m-kresooli lagundatakse nii aeroobselt kui ka anaeroobselt. *m*-kresooli aeroobse lagundamise esimeseks etapiks on selle hüdroksüleerimine 3-metüülkatehooliks molekulaarse hapniku ja NADPH juuresolekul (Sala-Trepat jt., 1972). Tekkinud vaheühendi edasiseks lagundamiseks on bakteritel *meta*- ja *orto*-rada, kus esimene on eelistatud lagundamisrajaks bakterites. *orto*-raja puhul tekivad lagundamise käigus toksilised vaheühendid, mida bakterid ei suuda edasi metaboliseerida. *m*-kresooli lagundamise lõpp-produktidena tekivad Krebse tsükli vaheühendid (Diaz, 2004; Ren jt., 2014). 1972. aastal kirjeldas Sala-Trepat aeroobset *m*-kresooli lagundamise rada bakteris *Pseudomonas putida* NCIB 10015, kus 3-metüülfenool degradeeriti mööda *meta*-rada, mille tulemusena moodustusid atsetaldehyid ja püruvaat (Sala-Trepat jt., 1972).

Kirjanduses on näidatud, et *m*-kresooli anaeroobset lagundamist initsieeritakse kahel viisil. Esimesel juhul hüdroksüleeritakse metüülgrupp, mille tulemusena moodustub 3-hüdroksübensüülalkohol, mis edasi oksüdeeritakse 3-hüdroksübensoaadiks. Sellist lagundamist on nähtud just denitriifitseerivate ja sulfaati redutseerivate bakterite puhul. Teisel juhul toimub *para*-karboksülatsoon 4-hüdroksü-2-metüülbensoadi moodustumisega, mida on kirjeldatud metanogeensete ja sulfidogeensete konsortsiumite puhul. Arvatakse, et fermenteerivad bakterid lagundavad 3-metüülfenooli hoopiski sellist rada mööda, kus ei moodustu 3-hüdroksübensüülsuktsinaati, et vältida energeetiliselt kulukat oksüdatsiooni suktsinaadist fumaraati. Anaeroobset *m*-kresooli lagundamist on kirjeldatud bakteri *Desulfobacterium cetonicum* näitel, mis suudab 3-metüülfenooli oksüdeerida siis, kui elektronaktseptoriks on sulfaat. *D. cetonicum*'i puhul sarnaneb *m*-kresooli lagundamine tolueni anaeroobsele lagundamisele. Kõigepealt lagundatakse *m*-kresool 3-metüülhüdroksübensüül suktsinaadiks, kus on vajalik fumaraadi osalus metüülgrupi aktiveerimiseks. Tekkinud vaheühend konverteeritakse edasi 3-hüdroksübensoüül-CoA-ks (Müller jt., 1999).

1.3 Adaptiivne laboratoorne evolutsioon

Adaptiivne laboratoorne evolutsioon ehk ALE (ingl. k. *adaptive laboratory evolution*) on meetod, mis võimaldab uurida molekulaarset evolutsiooni ja adaptiivseid muutuseid mikroobipopulatsioonis. Lisaks on ALE abil võimalik seostada fenotüübilist ja geneetilisi muutusi konkreetse kasvukeskkonnaga (Dragosits jt., 2013).

1.3.1 ALE-s kasutatavad organismid

Evolutsioonikatsetes kasutatakse erinevaid mikroorganisme, nagu näiteks bakterid ja viirused, lisaks ka vetikad ning seened (Elena jt., 2003). Adaptiivse laboratoorse evolutsiooni läbiviimisel on eelistatud need organismid, millel on teada genoomi nukleotiidne järjestus, geenide funktsioonid ja vähemalt osaliselt ka geenide reguleeriv võrgustik (Mozhayskiy jt., 2012). ALE katsetes kasutatakse sageli baktereid nende kiire ja asekuaalse paljunemise tõttu. Lisaks on baktereid kerge säilitada ning hiljem võrrelda algset ja evolutsioneerunud populatsiooni ja seal toimunud muutusi üksikraku tasandil (Elena jt., 2003). Kõige rohkem on ALE katseid viidud läbi bakteriga *E. coli* (Mozhayskiy jt., 2012).

1.3.2 Meetodid ALE läbiviimiseks

Adaptiivse laboratoorse evolutsiooni läbiviimiseks kasutatakse peamiselt kahte meetodit: 1) mittepidev ehk *batch* kultiveerimine ja 2) pidev kultiveerimine. Mittepidevat kultiveerimist viiakse läbi kolbides, mis hõlmab järjestikust paralleelkultuuride lahjendamist (Dragosits jt., 2013). Pidevat kultiveerimist rakendatakse kemostaatides, mis võimaldab väga täpselt kontrollida keskkonnatingimusi (pH, temperatuur, toitainete rohkus). Kuna kemostaadis on võimalik muuta keskkonnatingimusi soovitud ajavahemikuks, on võimalik kemostaadis uurida evolutsiooni muutuvates keskkonnatingimustes.

Kemostaadi kasutamine on aga kulukas ning nõuab mitmeid anumaid korraga erinevate paralleelide ja kontrolligruppide jaoks. Seetõttu on rohkem kasutatud mittepidevat kultiveerimist. Samas on mittepideva kultiveerimise puhul keskkonnatingimused vähem kontrollitavad. Mittepidev kultiveerimine võimaldab küll kontrollida temperatuuri ja hapniku kontsentratsiooni, kuid paljud teised keskkonnatingimused, nagu näiteks pH, toitainete kontsentratsioon, rakutihedus, varieeruvad suuresti iga järgmise lahjenduse puhul (Mozhayskiy jt., 2012).

1.3.3 Mutaatorfenotüübi esinemine adapteerumise jooksul

Kuna enamus mutatsioone on kahjulikud, on mutatsioonisagedus bakterites nii madal kui võimalik. Selleks on bakterites kujunenud välja hulgaliselt DNA reparatsiooni süsteeme. Mutatsioonid annavad aga aluse populatsiooni mitmekesisusele ja evolutsioneerumisele ning suurenenud mutatsioonisagedus (mutaatorfenotüüp) kiirendab bakteripopulatsiooni evolutsioneerumist. Kiirem evolutsioneerumine tuleneb sellest, et seoses mutatsioonisageduse suurenemisega suureneb ka tõenäosus kasulike mutatsioonide tekkeks, mis võimaldavad bakteritel antud keskkonnaga paremini kohastuda (adaptiivsed mutatsioonid).

Mutaatorfenotüübi tagab bakteritele enamasti defektne DNA valepaardumise reparatsioonisüsteem (ingl. k. *mismatch repair system*, MMR). Mutaatorite akumulatsioonid genoomis mitmed mutatsioonid, mis on neutraalsed või kasulikud ühes keskkonnas samas kui mõnes teises keskkonnas on need mutatsioonid hoopiski kahjulikud. Juurde tekib ka üldiselt kahjulikke mutatsioone. Selline mutatsioonide akumulatsioon populatsioonis takistab aga populatsiooni edasist adapteerumist samas või mõnes teises keskkonnas (Giraud jt., 2001).

1.3.4 ALE kestvus

Adaptiivse laboratoorse evolutsiooni pikkust hinnatakse generatsioonide arvu järgi, mille jooksul adaptiivne mutatsioon tõuseb populatsioonis esile. Enamasti kestavad ALE eksperimentide mõnest nädalast mõne kuuni, mille jooksul möödub 100-2000 generatsiooni (Dragosits jt., 2013).

1.3.5 ALE bakteriga *E. coli*

Tuntuim näide adaptiivsest laboratoorsest evolutsioonist on *E. coli* adaptatsioon glükoosi süsinikuallikana sisaldavas söötmes, kus on jälgitud 12 paralleelpopulatsiooni evolutsioneerumist. See katse on praeguseks toimunud juba peaaegu 30 aastat, mille jooksul on bakterid läbinud üle 66 000 generatsiooni (Lenski, 2017). Seda katset on läbi viidud mittepideva kultiveerimise teel, kus iga päev kantakse 1% populatsioonist üle uude värskesse söötmesse, kus rakud kasvavad seni, kuni süsinikuallikas saab otsa. Ühe päeva jooksul läbivad rakud keskmiselt 6,7 generatsiooni. Selle ALE katse puhul on selgitatud mitmeid evolutsioonimehhanisme. Näiteks selgitati adapteerumise dünaamikat, mida mõjutab looduslik valik; kas adapteerumine on alati aeglane ja ühtlane või esineb siiski perioode, kus toimuvad järsud muutused ning kui kaua saab kohasus suurendada; kas kõik paralleelpopulatsioonid evolutsioneeruvad mööda sama rada või on evolutsioneeruvates bakteripopulatsioonides erinevaid võimalusi samasuguste keskkonnatingimuste üleelamiseks.

Pärast 2000 generatsiooni möödumist nähti, et adapteerunud populatsiooni kohasus oli suurenenud ~30%, mis sarnanes suure homogeense aseksuaalse populatsiooni dünaamikaga (Lenski ja Travisano, 1994). Pärast 50 000 generatsiooni möödumist oli adapteerunud populatsiooni kohasus suurenenud ~70% võrreldes eellastega. Pooltes populatsioonides tõusis esile hüpermutaator fenotüüp. Kuigi need populatsioonid saavutasid kiiremini kohasuse, toimusid neis populatsioonides hiljem muutused, kus mutatsioonisagedus oli jällegi vähenenud. Bakter *E. coli* ei suuda kasutada tsitraati kui süsinikuallikat hapniku juuresolekul.

Pärast 31 000 generatsiooni möödumist oli tekkinud aga ühel populatsioonil 12-st võime kasutada lissüsinikuallikana tsitraati, mis on üks söötme komponentidest (Lenski 2017).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärk

Inimtegevuse tagajärjel satub keskkonda elusorganismidele toksilisi saasteaineid. Paljud neist on aromaatsed tuumaga ja raskesti lagundatavad. Saasteainete eemaldamisel keskkonnast on oluline roll mikroorganismidel, kes on võimelised neid ühendeid lagundama ja kasutama süsinikuallikana. Mikroorganismide kasutamist saasteainete kõrvaldamisel keskkonnast nimetatakse bioremediatsiooniks (Diaz, 2004). Kuigi enamasti puuduvad bakterites uude aromaatsed ühendid lagundamiseks vajalikud kataboolsed geenid, soodustab bakterite metaboolne mitmekülgus ja võime kiiresti evolutsioneeruda uute kataboolsete radade tekkimist. Sageli tekib võime aromaatsed ühendi lagundamiseks uue kataboolse plasmidi ülekande tulemusel.

Selleks, et selgitada looduses toimuvaid evolutsiooniprotsesse, mis on seotud bakterite adapteerumisega uutele kasvusubstraatidele, kasutatakse adaptiivset laboratoorset evolutsiooni ehk ALE-i. Viimane võimaldab uurida evolutsioneerumise käigus toimuvaid muutusi igal soovitud ajahetkel kontrollitud tingimustes.

Minu magistritöö eesmärgiks oli selgitada geneetilisi muutusi bakteripopulatsioonides, mis olid läbinud adaptiivse laboratoorse evolutsioneerumise katse (ALE) ~300 põlvkonna vältel *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas. Evolutsioonikatsesse oli võetud *m*-kresooli lagundav *P. putida* tüvi, kuhu oli sisse viidud kaks katabolismiraja blokki: plasmiidis pEST1412 olev geen *pheA* ja TOL-plasmidi pWW0 *meta*-rada. Selleks, et hinnata, miks ei piisanud vaid *m*-kresooli lagundamiseks vajalike geenide kokku viimisest ühte rakku ning millised muutused põhjustasid *m*-kresooli lagundamisvõime paranemist ALE katse läbinud populatsioonides, isoleerisime evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest puhaskultuurid, mis kasvasid võrreldes algse tüvega paremini *m*-kresooli süsinikuallikana sisaldaval minimaalsöötmel. Töö täpsemaks eesmärgiks oli evolutsioneerunud populatsioonidest isoleeritud bakteritüvede puhul välja selgitada, millised neis toimunud geneetilised muutused on seotud *m*-kresooli lagundamisvõime paranemisega.

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 süsinikuallikana *m*-kresooli (*m*-Cre) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM või 5 mM, *m*-toluaati (*m*-Tol) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM või fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. M9+glükoos vedelsöötmesse lisasime kaseiini hüdrolysaati (CAA) lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Tardsöötme saamiseks lisasime vedelsöötmele agarit (15 g/l).

Bakteritüve ja plasmidi seleksiooniks kasutasime järgmisi antibiootikume: bensüülpenitsilliin (Bp; 1-3 mg/ml) ja kanamütsiini (Km; 50 µg/ml).

Pseudomonas putida rakke kasvasime temperatuuril 30°C ning *Escherichia coli* rakke temperatuuril 37°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil 180 või 100 pööret/min.

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi või plasmiid	Iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
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
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW1	<i>P. putida</i> mt-2, sisaldab TOL plasmiidid pWW0	Williams jt., 1974
PaW85	<i>P. putida</i> PaW1-st saadud plasmiidivaba tüvi	Bayley jt., 1977
PaW85km	<i>P. putida</i> PaW85, mis sisaldab Km ^R geeni	Tark jt., 2005
CRE6	<i>P. putida</i> PaW1, millele on juurde viidud plasmiid pEST1412, Cre ⁻ tüvi	Metsik, 2015
CRE5	algne Cre ⁺ tüvi	Metsik, 2015
E1	ALE katse lõpust saadud segapopulatsioon, millest isoleeriti tüved E1.1, E1.2, E1.3, E1.4 ja E1.5	Metsik, 2015, käesolev töö
E2	ALE katse lõpust saadud segapopulatsioon, millest isoleeriti tüved E2.1, E2.2, E2.3, E2.4 ja E2.5	Metsik, 2015, käesolev töö
Plasmiidid		
pRK2013	Abiplasmiid konjugatsioonil (Km ^r)	Figurski ja Helinski, 1979

pEST1412	<i>pheBA</i> geene sisaldav plasmiid Amp ^r algne	Nurk jt., 1991
pEST1412E	<i>pheBA</i> geene sisaldav plasmiid Amp ^r , evolutsioneerunud	Käesolev töö
pWW0E	TOL-plasmiid, evolutsioneerunud	Käesolev töö

Rekonstruktsioonikatsete käigus konstrueerisime veel 12 *P. putida* tüve RE1-RE12, mille konstrueerimine ja iseloomustus on esitatud kokkuvõtva tabelina töö tulemuste osas.

2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR reaktsioonimaht oli 20µl. Reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente: 1 x PCR-i puhver (10-kordse puhvri koostis: 75 mM Tris-Hcl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,01% Triton X 100, 0,5% Ficoll 40, 1 mM tartasiin, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-d), 10 pmol praimereid, 0,5 ühikut professor Juhan Sedmani laboris puhastatud Taq polümeraasi ja destilleeritud H₂O-d lõppmahuni. 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

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

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid.

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

ORF2	5'-GGGCTAGAAAAGGTAAGATT-3'	pärast <i>pheA</i> geeni lõppu positsioonides +107 kuni +87 stopkoodon TAG-st; <i>pheA</i> geeni amplifitseerimine ja sekveneerimine
pheAFw	5'-AGCCACACCCAAGACGATAA-3'	<i>pheA</i> geenile positsioonides 523 kuni 542; <i>pheA</i> geeni sekveneerimine
pheARev	5'-CTCCGCAATATCATGGGTGG-3'	<i>pheA</i> geenile positsioonides 1502 kuni 1521; <i>pheA</i> geeni sekveneerimine
yrghind	5'-CCAAAGCTTTGTTTACGATCCAGGC-3'	komplementaarne <i>pheB</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -311 kuni -286 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geenist välja; <i>pheB</i> geeni amplifitseerimine ja sekveneerimine
ARBpheA2	5'-TCAAGATTATCATTACGCTGTG-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni positsioonidega 29 kuni 8; <i>pheB</i> geeni amplifitseerimine
pheBsisse	5'-CAATGCTCGATGGGAATACAT-3'	komplementaarne <i>pheB</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -34 kuni -54 initsiaatorkoodonist ATG-st, suunaga geeni poole; <i>pheB</i> geeni sekveneerimine
pheBalum	5'-TGACTTTCTTGTGACTCGCTTTC-3'	pärast <i>pheB</i> geeni lõppu positsioonides +17 kuni +39 stoppkoodon TAA-st, suunaga geenist välja; <i>pheB</i> geeni sekveneerimine
ruvABylemine	5'-CATAATGCACGCGCCTCAGCCTAGGT TCC-3'	<i>ruvA</i> geeni ette positsioonides -122 kuni -140; pWW0 plasmiidiga rakkude selekteerimine
ruvAHindIII	5'-AAGCTTACACATGCTTGGTCAAGTC-3'	<i>ruvA</i> geeni initsiaatorkoodon ATG-st positsioonides +294 kuni +313, suunaga geenist välja; pWW0 plasmiidiga rakkude selekteerimine
pKTSma	5'-GATCCCCGGGAAAACAGC-3'	Km geenile positsioonides 300 kuni 317; uue retsipienttüve seleksioon
KmVan	5'-TGGTATCGGTCTGCGATTCC-3'	Km geenile positsioonides 660 kuni 679; uue retsipienttüve seleksioon

2.2.3 Geelektroforees

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

2.2.4 Bakterite elektroporatsioon

P. putida puhul kasutasime elektroporatsiooniks Choi jt. (2006) meetodit. Selleks kasvasime *P. putida* rakke üleöö LB vedelsöötmes. Kompetentsete rakkude saamiseks tsentrifugisime 500 µl vedelsöötmet põhja 12110 x g 30 sekundi jooksul firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“. Seejärel eemaldasime supernatandi ja pesime rakke kaks korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeerisime üles ~100 µl 100 mM sahharoosi lahuses.

Elektroporatsiooniks lisasime *P. putida* rakkudele ligikaudu 0,3 µg plasmiidset DNA-d ja 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 30°C. Seejärel tsentrifugisime rakud söötmet põhja, eemaldasime supernatandi, suspendeerisime ~150 µl LB söötmes ja plaatisime selektiivsöötmele.

2.2.5 Evolutsioneerunud tüvede fenotüübilise stabiilsuse määramine

Selleks, et määrata plasmiidide pWW0 ja pEST1412 stabiilsust bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüvedes, külvasime selektsiooni tulemusel saadud tüved 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.

2.2.6 Plasmiidse DNA eraldamine

m-kresooli lagundajate rekonstrueerimiseks eraldasime plasmiidse DNA evolutsioneerunud tüvedest. Selleks kasutasime „FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit“ kitti. Eelnevalt kasvasime plasmidi sisaldavaid *P. putida* rakke üleöö 5 ml-s LB-söötmes plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi juuresolekul. Seejärel tsentrifugeerisime rakud põhja 30 sekundi jooksul ja suspendeerisime 200 µl FAPD1 puhvril (RNAasA-d sisaldav lahus). Kõikide tsentrifugeerimiste puhul kasutasime firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugi „Mini Spin“ maksimumpööratel (12110 x g). Rakkude lüüsimiseks lisasime suspensioonile 200 µl FAPD2 puhvrit (lüsotsüümi lahus) ja seejärel hoidsime suspensiooni toatemperatuuril 2 minutit pidevalt segades. Seejärel lisasime 300 µl FAPD3 puhvrit (neutraliseeriv lahus), segasime ning tsentrifugeerisime lüüsinud rakud ja kromosoom-vaalkompleksid 5 minuti jooksul põhja. Edasi kandsime supernatandi kolonni ja tsentrifugeerisime 30 sekundit, mille jooksul DNA seondub kolonni maatriksile. Soolade eemaldamiseks pipeteerisime esialgu kolonni 400 µl W1puhvrit ning seejärel pesime 600 µl pesupuhvriga, millele oli lisatud etanool. Seejärel tsentrifugeerisime lisa 3 minutit, et eemaldada täielikult vedelik kolonnist ning elueerisime DNA 60 µl kuumutatud H₂O-s 1 minuti jooksul.

2.2.7 Bakterite konjugatsioon

Konjugatsiooni läbiviimiseks kasvasime üleöö LB vedelsöötmes *P. putida* doonortüve, mis sisaldas ülekantavat plasmidi pWW0, helperplasmidi pRK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101 ja *P. putida* retsipienttüve PaW85km. Plasmidi selektsiooniks lisasime nii helper- kui ka retsipienttüve LB vedelsöötmele antibiootikumi kanamütsiin (Km). Üleöö kasvanud kultuuridest tegime 25-kordsed lahjendused antibiootikumideta LB vedelsöötmetesse ning seejärel kasvasime 2 tundi loksutil. Ristamissegu jaoks võtsime *E. coli* ja *P. putida* kultuuridest (doonor- ja helpertüvi) 50 µl ja *P. putida* kultuurist (retsipienttüvi) 100 µl, 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 1 µl plaatisime *m*-toluaati ja kanamütsiini sisaldavale selektiivsöötmele, kus on võimelised kasvama vaid transkonjugandid.

2.2.8 Rakulüsaadi valmistamine

Rakulüsaadi valmistamiseks kasvasime *P. putida* rakke üleöö M9 minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud süsinikuallikana glükoos. Üleöö kasvatatud kultuuridest tegime 3-kordsed

lahjendused 10 mM glükoosi sisaldavasse minimaalsöötmesse, kuhu vajadusel lisasime ka kas *m*-toluaati lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM, *m*-kresooli lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM, fenooli lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM ning aereerisime kultuure loksutil 3 tundi. Seejärel tsentrifuugisime rakke tsentrifuugisime 12110 x g juures 45 sekundit ja suspendeerisime 2 korda 1 ml-s jääl hoitud 100 mM stabiliseerivas fosfaatpuhvril (1 mM merkaptoetanol, 2 µM FAD, 0,1 mM EDTA; pH 7,5) ning purustasime sonikeerimisega jääl 3 x 10 sekundit. Sonikeerimist teostasime „Cole-Parmer 4710 Series Ultrasonic Homogenizer“ sonikaatoriga. Purustamata jäänud rakud ja rakukesad eemaldasime külmsentrifuugimise (4°C) teel 16060 x g juures 20 minuti jooksul. Saadud supernatanti kasutasime rakuvaba lüsaadina ensüümide katehooli-2,3-dioksügenaas, katehooli-1,2-dioksügenaas ja fenool monooksügenaas aktiivsuste määramisel.

2.2.9 Katehooli-2,3-dioksügenaasi eriaktiivsuse määramine

Katehooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) aktiivsust määrasime Feist ja Hegeman kohandatud meetodika põhjal (Feist ja Hegeman, 1969) spektrofotomeetriliselt 2-hüdroksümukonsemialdehüüdi tekkimise järgi lainepikkusel 375 nm ($\epsilon_{375 \text{ nm}} = 14,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reaktsioonisegu mahuks oli 2 ml, kus 100 mM stabiliseerivasse fosfaatpuhvrilise (pH 7,5) oli lisatud 0,3 mM katehool ja rakuvaba lüsaati (~5 µg/µl).

C23O eriaktiivsust väljendasime µmol min⁻¹ mg⁻¹ valgu kohta.

2.2.10 Katehooli-1,2-dioksügenaasi eriaktiivsuse määramine

Katehooli-1,2-dioksügenaasi (C12O) aktiivsust määrasime Hegeman kohandatud meetodika põhjal (Hegeman, 1966) spektrofotomeetriliselt *cis,cis*-mukonaadi tekkimise järgi lainepikkusel 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm}} = 5,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reaktsioonisegu mahuks oli 2 ml, kus 100 mM stabiliseerivasse fosfaatpuhvrilise (pH 7,5) oli lisatud 0,3 mM katehool ja rakuvaba lüsaati (~5 µg/µl). Kui rakuvaba lüsaat andis tulemust ka C23O määramisel, surmasime selle 10 µl 3 mM H₂O₂-ga.

C12O eriaktiivsust väljendasime µmol min⁻¹ mg⁻¹ valgu kohta.

2.2.11 Fenooli monooksügenaasi eriaktiivsuse määramine

Fenooli monooksügenaasi (PMO) aktiivsust määrasime Beadle ja Smith kohandatud meetodika põhjal (Beadle, Smith, 1982) spektrofotomeetriliselt NADPH oksüdeerimise järgi lainepikkusel 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reaktsioonisegu mahuks oli 2 ml, kus 100 mM

stabiliseerivasse fosfaatpuhvrise (pH 7,5) oli lisatud 0,3 mM NADPH, rakuvaba lüsaati (~5 µg/µl) ja 0,1 mM substraati, milleks oli kas fenool või *m*-kresool.

PMO aktiivsuse määramisel mõõtsime ka endogeense NADPH oksüdatsiooni taseme, kus ei lisatud substraadina fenooli või *m*-kresooli.

PMO eriaktiivsust väljendasime µmol min⁻¹ mg⁻¹ valgu kohta.

2.2.12 Rakuvabast lüsaadist totaalvalgu kontsentratsiooni mõõtmine

Totaalvalgu kontsentratsiooni määramiseks rakuvabas lüsaadis kasutasime trüptofaani fluorestseerumise meetodit. Selleks kandsime 200 µl 8M urea/100 mM Tris (pH 7,5) puhvrit mustale mikrotiiterplaadile. Seejärel lisasime 3 µl ja 6 µl trüptofaani kalibratsiooni lahuseid kontsentratsioonidega 0,01 µg/µl ja 0,1 µg/µl kolmes korduses urea/Tris puhvrile kaliibergraafiku jaoks. Järgnevalt lisasime 200 µl urea/Tris puhvrile 6 µl rakuvaba lüsaati ning stabiliseerivat puhvrit kolmes korduses.

Totaalvalgu kontsentratsiooni mõõtmisel kasutati mikrotiiterplaadi lugejat TECAN Infinite 200 Pro ning programmi Tecan i-control.

Totaalvalgu kontsentratsiooni mõõtmine toimus järgmistel tingimustel:

1. 10 sekundit mikrotiiterplaadi segamine
2. Ergastuslainepikkus 295 nm ja emissiooni lainepikkus 350 nm

Totaalvalgu kontsentratsiooni arvutamisel lähtusime sellest, et 1 µg trüptofaani võrdub ~ 91 µg *E. coli* rakkudega.

2.2.13 Sekveneerimine

Sekveneeritavaid PCR-i produkte töötlesime 2,5 U *E. coli* eksonukleasiga ExoI ja 1 U aluselise fosfataasiga (FastAP) 30 minuti jooksul temperatuuril 37°C ning ensüümid inaktiveeriti 15 minuti jooksul temperatuuril 80°C.

Seejärel valmistasime sekveneerimisproovid kasutades firma Applied Biosystems „BigDye Terminator v3.1“ sekveneerimiskomplekti. Reaktsiooni lõppmaht oli 10 µl, mille jaoks segasime kokku 2 µl 5 x lahjendustpuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂), 1,6 pmol praimerit, 0,7 µl premix'i (BigDye PR-100 *mix* v3.1), 1 µl sekveneeritavat PCR-i ja lõppmahuni H₂O.

Sekveneerimisreaktsioon toimus 30 tsükli järgmistel tingimustel:

1. 15 sek temperatuuril 95°C;
2. 10 sek temperatuuril 50°C;
3. 45 sek temperatuuril 60°C.

Reaktsioonile järgnevalt sadestasime DNA-d 2 µl dekstraani ja 30 µl 96% etanooliga 15 minutit temperatuuril -20°C. Edasi tsentrifugisime sademe põhja temperatuuril 4°C 16 100 x g juures 15 minuti jooksul ning pesime kaks korda 100 µl 75% etanooliga ning lasime sademel kuivada. DNA võtsime üles 10 µl-is 100% formamiidis ja säilitasime sekveneerimiseks temperatuuril -20°C.

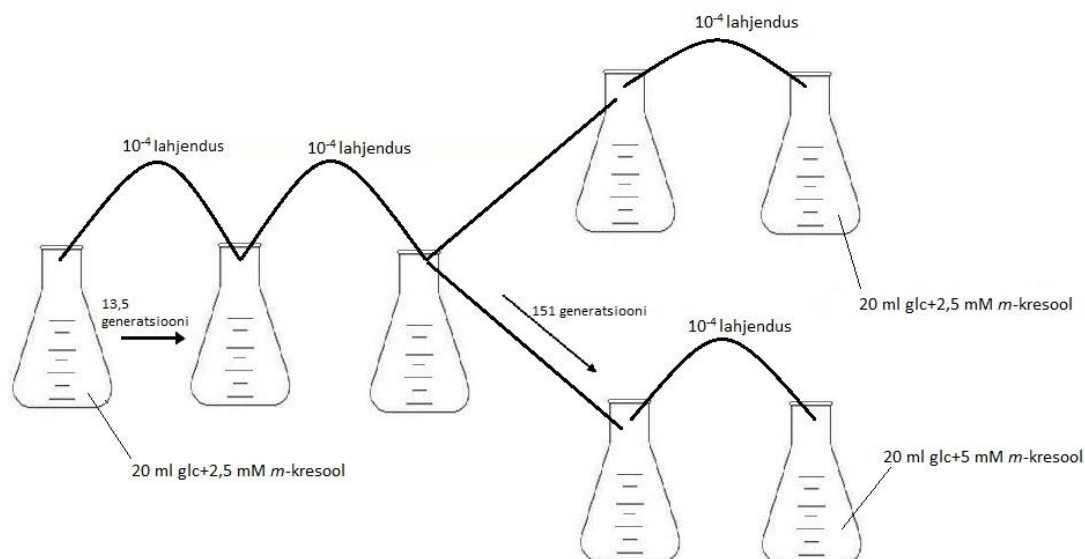
2.3 Tulemused

2.3.1 Evolutsioneerunud puhaskultuuride saamine

Käesolevas töös on jätkatud bakalaureusetöös alustatud katseid. Bakalaureusetöös konstrueerisime hübriidse katabolismiraja *m*-kresooli lagundamiseks, kus katabolismiks vajalikud geenid paiknesid kahes plasmiidis pEST1412 ja pWW0. Plasmiid pEST1412 sisaldab *pheBA* operoni, mis koosneb ensüümi fenooli monooksügenaasi kodeerivast geenist *pheA* ja katehhooli-1,2-dioksügenaasi kodeerivast geenist *pheB* (Nurk jt., 1991). Geeni *pheA* on vaja fenooli (ja *m*-kresooli) katehhooliks lagundamisel. Katehhooli *meta*-raja kaudu lagundamise geenid asuvad aga TOL-plasmiidis pWW0.

Kuna *m*-kresooli lagundaja konstrueerimisel selgus, et ei piisanud vaid nende vajalike geenide kokkuviiemisest ühte rakku, külvasime saadud Cre⁻ fenotüübiga tüve CRE6 rakud *m*-kresooli ainsa süsinikuallikana sisaldavale selektiivsöötmele. Mõne päeva jooksul hakkas selektiivsöötmele ilmuma *m*-kresooli lagundavaid üksikkolooniaid. Sel viisil isoleerisime Cre⁺ fenotüübiga tüve, mida on käesolevas töös nimetatud CRE5 (algne Cre⁺) tüveks.

Selleks, et selgitada mehhanisme, mis mõjutavad bakteripopulatsioonide evolutsioneerumist *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas, viisime läbi laboratoorse evolutsioneerumise katse (ALE katse) saadud CRE5 tüvega. Katseskeem on toodud joonisel 3. Evolutsioneerumise katse kestis 40 päeva, kus 151 generatsiooni möödudes hakkasime katset läbi viima paralleelselt kahe erineva *m*-kresooli kontsentratsiooniga (2,5 ja 5 mM) vedelsöötmetes. Lisaks *m*-kresoolile sisaldas vedelsööde ka 10 mM glükoosi, et saavutada maksimaalne generatsioonide arv. Kuna 20 päeva järgselt selgus, et 2,5 mM *m*-kresool ei olnud piisavalt selektiivne keskkond *m*-kresooli lagundajate tekkeks ning püsimiseks, viisime järgnevat 20 päeva ALE katset läbi 5 mM *m*-kresooli juuresolekul. Evolutsioonikatse lõpuks saime kaks segapopulatsiooni, mis olid evolutsioneerunud ~300 generatsiooni *m*-kresooli juuresolekul (Metsik, 2015).



Joonis 3. Laboratoorse evolutsioneerumise katseskeem (Metsik, 2015).

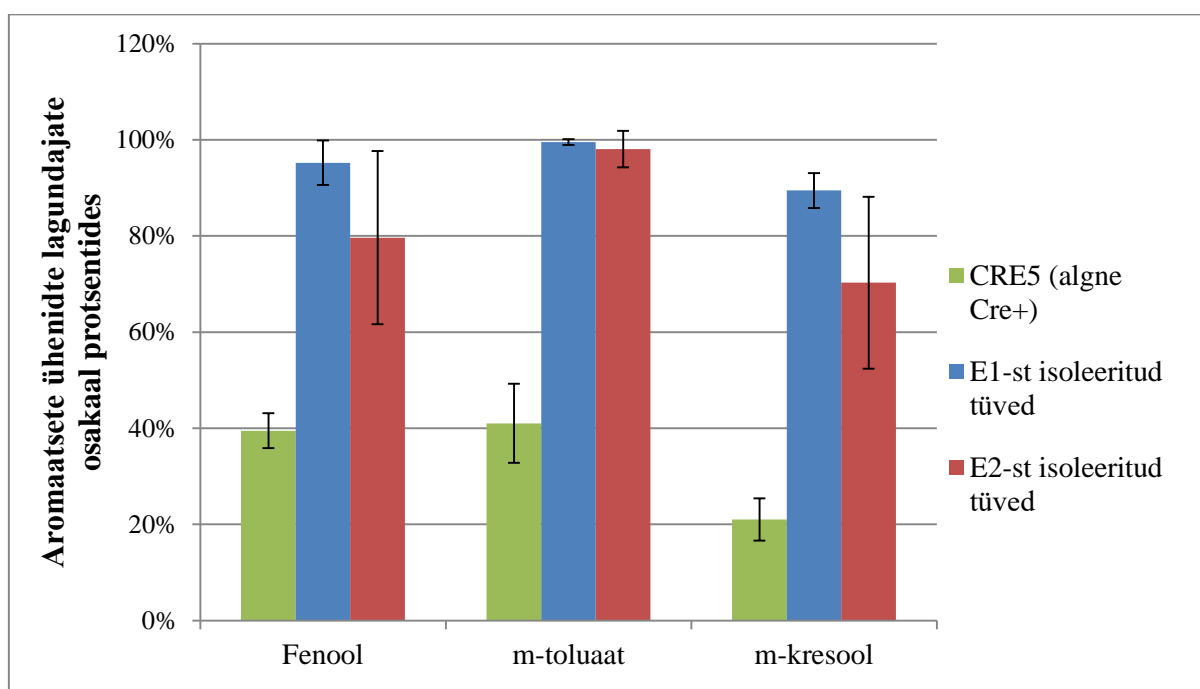
Bakalaureusetöös läbi viidud katsete tulemusel kirjeldasime evolutsioneerumise jooksul toimunud muutusi heterogeensetes populatsioonides, kuid meie peamine eesmärk käesolevas töös oli selekteerida välja evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest *m*-kresoolil kõige paremini kasvavad variandid ja selgitada neis toimunud geneetilisi muutusi. Selleks isoleerisime evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 puhaskultuurid, mille kasvu hindasime *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel. Visuaalse vaatluse tulemusel valisime mõlemast evolutsioneerunud kultuurist 5 üksikkolooniat, mille edasikülvamisel oli kasv *m*-kresooli ainsa süsinikuallikana sisaldaval söötmel kõige tugevam. Saadud evolutsioneerunud tüvesid bakteripopulatsioonist E1 nimetame käesolevas töös E1.1, E1.2, E1.3, E1.4, E1.5 ja bakteripopulatsioonist E2 nimetame neid E2.1, E2.2, E2.3, E2.4, E2.5.

2.3.2 Evolutsioneerunud tüvede fenotüübiline stabiilsus mitteselektiivsetes tingimustes

Varasemates katsetes nägime algse CRE5 tüve puhul fenotüübilist ebastabiilsust. Sellest lähtuvalt viisime läbi stabiilsuskatse, et hinnata evolutsioneerunud tüvede fenotüübilist stabiilsust. Selleks uurisime, kui stabiilselt püsivad isoleeritud evolutsioneerunud tüvedes *m*-kresooli lagundamiseks sisse viidud vajalikud plasmiidid pWW0 ja pEST1412 ning Cre⁺ fenotüüp mitteselektiivsetes tingimustes võrreldes CRE5 algse Cre⁺ tüvega. Stabiilsuskatse jaoks kasvasime baktereid söötmel, mis sisaldas süsinikuallikana nii glükoosi kui ka 2,5 mM *m*-kresooli ning seejärel isoleerisime üksikkolooniad ainult glükoosi sisaldaval söötmel. Edasi külvasime isoleeritud üksikkolooniad kolme erinevat süsinikuallikat (fenool, *m*-toluaat või *m*-kresool) sisaldavale söötmele. Kasv fenooli sisaldaval minimaalsöötmel viitab plasmiidis pEST1412 asuva geeni *pheA* olemasolule, kasv *m*-toluaati sisaldaval

minimaalsöötmel TOL-plasmiidis pWW0 paikneva *meta*-raja geenide olemasolule ning kasv *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel *m*-kresooli lagundamiseks vajalike geenide olemasolule samas rakus.

Katsetulemustest selgus, et evolutsioneerunud tüvede puhul on *m*-kresooli lagundamisvõimekus oluliselt stabiilsem võrreldes algse Cre⁺ tüvega CRE5. Evolutsioneerunud populatsioonist E1 isoleeritud tüvede puhul on näha, et Cre⁺ fenotüübi osakaal on suurenenud ~4 korda ja E2-st isoleeritud tüvede puhul ~3 korda võrreldes algse Cre⁺ tüvega (Joonis 4).



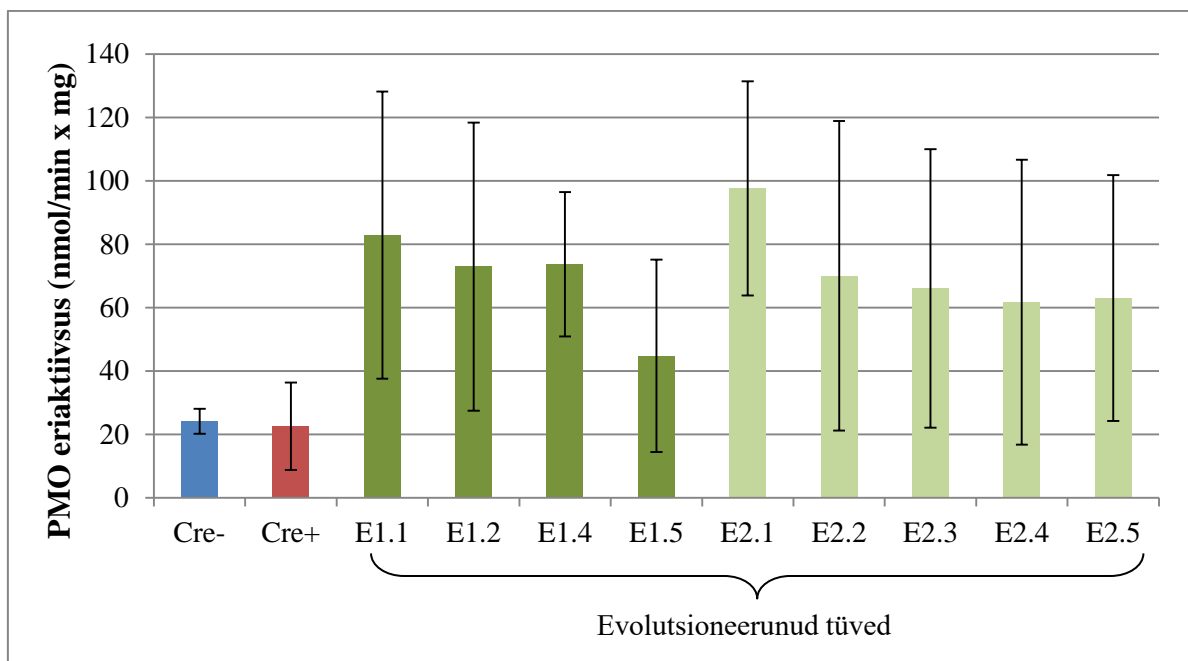
Joonis 4. Phe⁺, *m*-Tol⁺ ja *m*-Cre⁺ fenotüüpide stabiilsus evolutsioneerunud populatsioonides isoleeritud evolutsioneerunud tüvedel võrreldes algse Cre⁺ tüvega CRE5. Joonisel on toodud E1-st ja E2-st isoleeritud viie evolutsioneerunud tüvede fenotüüpide osakaalude keskmised. Algse Cre⁺ tüve CRE5 tulemused on võetud bakalaureusetööst (Metsik, 2015).

2.3.3 *m*-kresooli lagundamist võimaldavate võtmeensüümide aktiivsuste määramine evolutsioneerunud tüvedes

Kuna isoleeritud evolutsioneerunud tüvede kasv *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel oli võrreldes tüvega CRE5 paranenud, otsustasime selgitada lähemalt, mis võimaldab neil tüvedel paremat kasvu. Oletasime, et tugevamat kasvu *m*-kresooli sisaldaval söötmel võimaldab *m*-kresooli lagundamiseks vajalike võtmeensüümide ekspresioonitaseme suurenemine. Kuna eelnevalt olime näinud, et *m*-kresool ei indutseeri ei fenooli monooksügenaasi ega *meta*-raja geenide transkriptsiooni, määrasime eriaktiivsusi glükoos minimaalsöötmes, et hinnata võtmeensüümide basaalsel aktiivsust (vt. peatükk 2.2.9 ja 2.2.11 töö „Materjal ja meetodika“

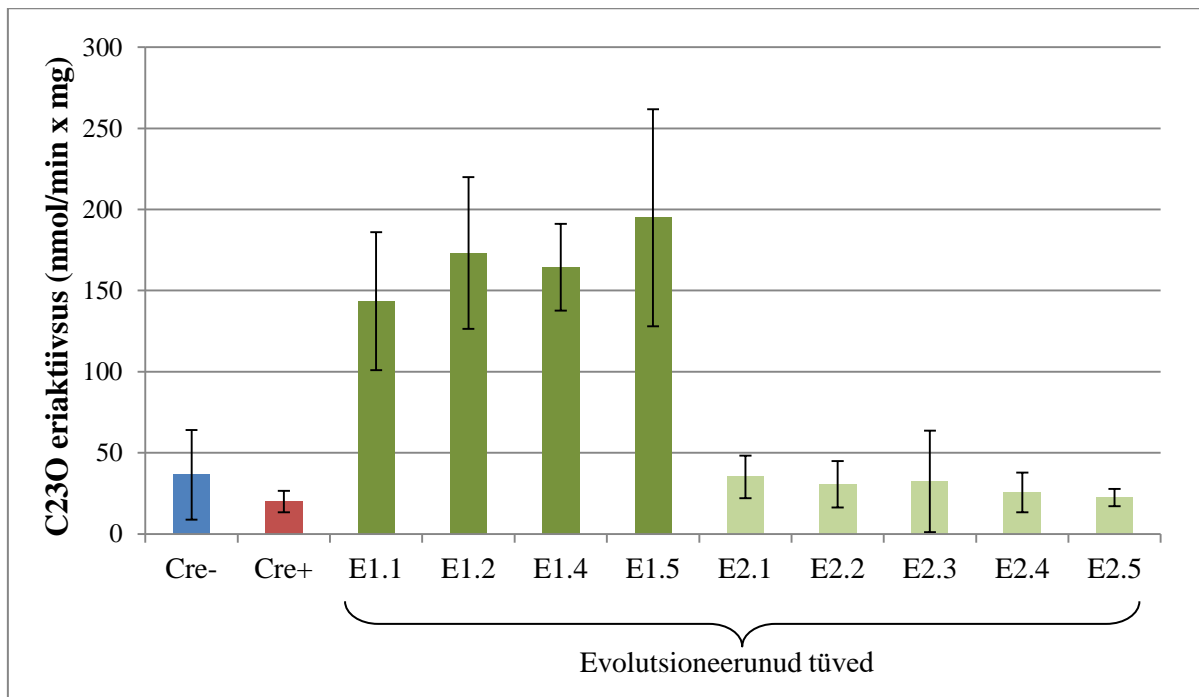
osas). Ensüümiaktiivsused määrasime järgmistes tüvedes: Cre⁻ tüves CRE6, algse Cre⁺ tüves CRE5 ning evolutsioneerunud tüvedes, v.a. E1.3 (neis katsetes ei suutnud see tüvi enam kasvada glükoosi ja 2,5 mM *m*-kresooli sisaldaval söötmel).

Esmalt määrasime fenooli monooksügenaasi eriaktiivsuse, millest selgus, et evolutsioneerunud populatsioonidest isoleeritud tüvedes on eriaktiivsus ~3 korda suurenenud evolutsioneerunud tüvedes võrreldes tüvedega CRE6 ja CRE5 (Joonis 5).



Joonis 5. Fenooli monooksügenaasi (PMO) eriaktiivsus tüvedel CRE6 (Cre⁻ tüvi), CRE5 (algse Cre⁺ tüvi) ja evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüved. Üleöö kasvatatud bakterikultuuridest tehti 3-kordne lahjendus ning seejärel kultiveeriti rakke 3 tundi Glc minimaalsöötmes. Joonisel on toodud vähemalt 3 sõltumatu katse tulemused 3 paralleeliga, v.a CRE6, kus on toodud 2 sõltumatu katse tulemused. Antud on 95% usalduspiirid.

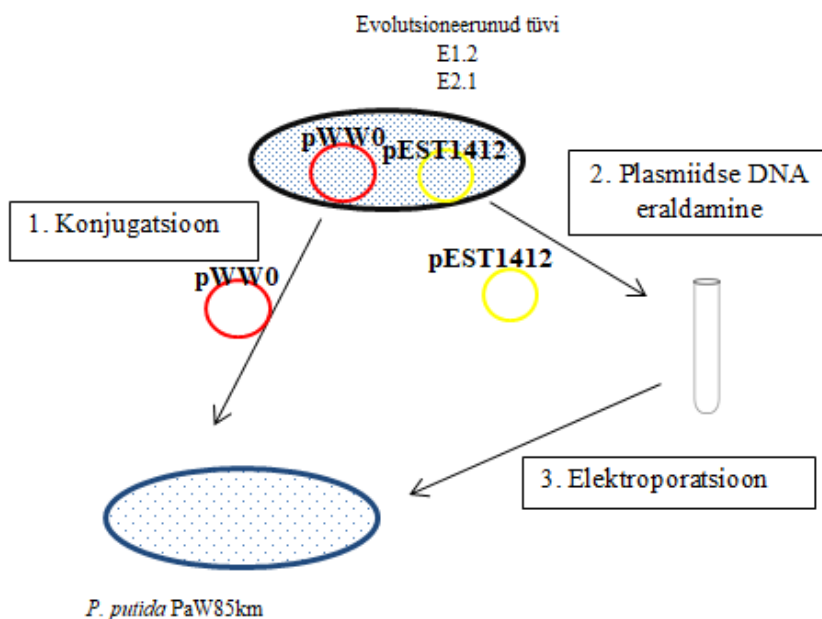
Katehooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) eriaktiivsuse hindamisel nägime, et C23O eriaktiivsus on märgatavalt suurenenud evolutsioneerunud bakteripopulatsioonist E1 isoleeritud tüvedes võrreldes algse Cre⁺ tüvega CRE5. Samas oli evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest E2 isoleeritud tüvedes C23O eriaktiivsus võrreldav Cre⁻ tüve ja algse Cre⁺ tüve eriaktiivsustega (Joonis 6).



Joonis 6. Katehhooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) eriaktiivsus tüvedel CRE6 (Cre⁻ tüvi), CRE5 (algne Cre⁺ tüvi) ja evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüved. Üleöö kasvatatud bakterikultuuridest tehti 3-kordne lahjendus ning seejärel kultiveeriti rakke 3 tundi Glc minimaalsöötmes. Joonisel on toodud vähemalt 3 sõltumatu katse tulemused 3 paralleeliga, v.a CRE6, kus on toodud 2 sõltumatu katse tulemused. Antud on 95% usalduspiirid.

2.3.4 Cre⁺ fenotüübiga tüvede rekonstrueerimine

Selleks, et näha, kas *m*-kresooli lagundamisvõime tagavad plasmiidides toimunud muutused, rekonstrueerisime *m*-kresooli lagundavad Cre⁺ fenotüübiga tüved. Rekonstrueerimist teostasime kolmes etapis, kus esmalt kandsime konjugatsiooni teel evolutsioneerunud tüvedest E1.2 ja E2.1 TOL-plasmidi pWW0 plasmiidivabasse tüvesse *P. putida* PaW85km. Seejärel eraldasime evolutsioneerunud tüvedest E1.2 ja E2.1 plasmidi pEST1412 ning elektroporatsiooni abil viisime eraldatud plasmidi TOL-plasmidi kandva tüve *P. putida* PaW85km rakkudesse (Joonis 7).



Joonis 7. Rekonstrueerimise skeem.

Rekonstrueerimise jaoks valisime evolutsioneerunud tüved vastavalt nende kasvu tugevusele *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel. Lisaks konstrueerisime ka tüved, kuhu viisime vaid evolutsioneerunud plasmiidi pEST1412 kas *P. putida* tüvesse PaW85 või *P. putida* tüvesse PaW1, mis sisaldab algset TOL-plasmiidi pWW0, mis ei ole evolutsioonikatset läbinud. Kokku konstrueerisime 12 tüve (Tabel 3).

Tabel 3. Rekonstrueeritud tüved.

Nr (RE)	Retsipient	Plasmiidid	Kasvu tugevus <i>m</i> -kresool minimaalsöötmes ^a
1	<i>P. putida</i> PaW85km	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E1.2	+++
		evolutsioneerunud pWW0 tüvest E1.2	
2	<i>P. putida</i> PaW85km	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E1.2	+
		evolutsioneerunud pWW0 tüvest E2.1	
3	<i>P. putida</i> PaW85km	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E2.1	+++
		evolutsioneerunud pWW0 tüvest E1.2	
4	<i>P. putida</i> PaW85km	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E2.1	++
		evolutsioneerunud pWW0 tüvest E2.1	
5	<i>P. putida</i> PaW85km	evolutsioneerumata pEST1412 (algne)	-
		evolutsioneerunud pWW0 tüvest E1.2	
6	<i>P. putida</i> PaW85km	evolutsioneerumata pEST1412 (algne)	*
		evolutsioneerunud pWW0 tüvest E2.1	
7	<i>P. putida</i> PaW1	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E1.2	*
		retsipient sisaldab algset plasmiidi pWW0	

8	<i>P. putida</i> PaW1	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E2.1	-
		retsipient sisaldab algset plasmii pWW0	
9	<i>P. putida</i> PaW1	evolutsioneerumata pEST1412 (algne)	-
		retsipient sisaldab algset plasmii pWW0	
10	<i>P. putida</i> PaW85	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E1.2	-
		puudub plasmiiid pWW0	
11	<i>P. putida</i> PaW85	evolutsioneerunud pEST1412 tüvest E2.1	-
		puudub plasmiiid pWW0	
12	<i>P. putida</i> PaW85	evolutsioneerumata pEST1412 (algne)	-
		puudub plasmiiid pWW0	

^aKasvu hinnati *m*-kresooli sisaldaval söötmel järgmiselt: + nõrk kasv, ++ keskmine kasv, +++ tugev kasv, - kasv puudub, * tekivad üksikud mutandid.

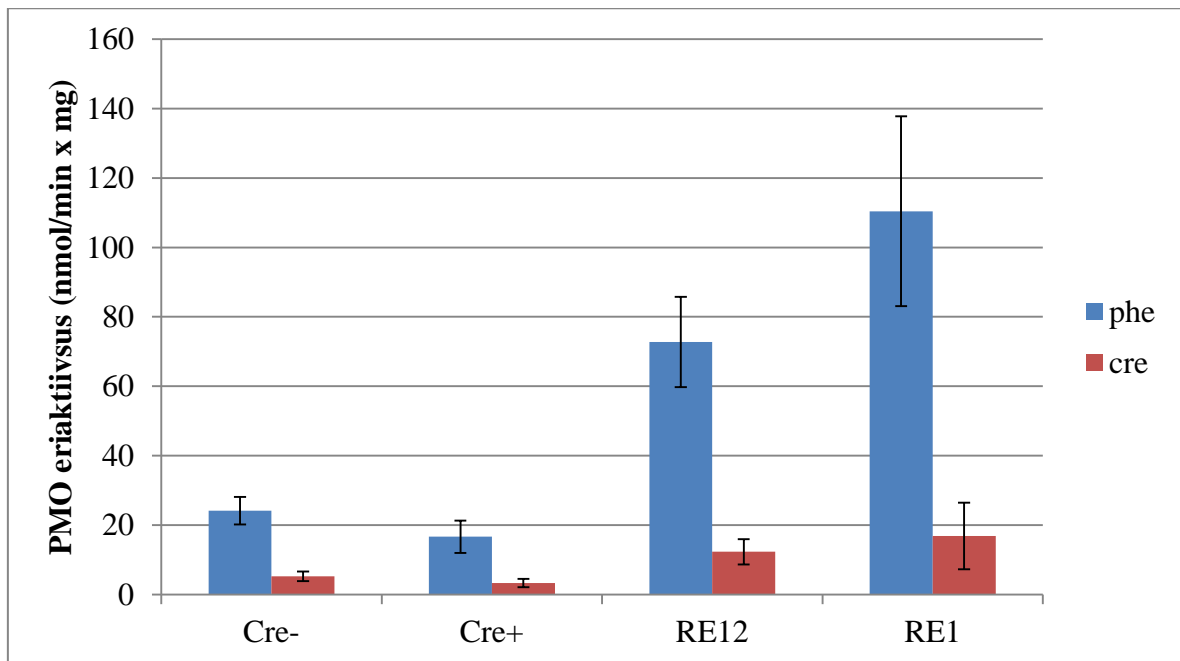
Konstrueeritud tüvede kasvu tugevus *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel on toodud tabelis 1. Juhul kui *m*-kresooli lagundamiseks vajalikud olulised muutused oleksid toimunud kas ainult või osaliselt kromosoomis, peaks evolutsioneerunud tüvi suutma efektiivsemalt kasvada *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel võrreldes evolutsioneerunud plasmiiide sisaldavate rekonstrueeritud tüvedega, kui aga erinevusi ei ole, on muutused toimunud ainult plasmiiidides. Külvates rekonstrueeritud tüvede RE1 ja RE3 ning evolutsioneerunud tüvede E1.2 ja E2.1 rakke *m*-kresool minimaalsöötmele selgus aga, et nii evolutsioneerunud tüved kui ka evolutsioneerunud plasmiiide sisaldavad rekonstrueeritud tüvede võime kasvada *m*-kresooli süsinikuallikana sisaldaval söötmel on võrreldav. Sellest võib järeldada, et *m*-kresooli lagundamiseks vajalikud muutused on toimunud plasmiiidides. Lisaks nägime, et kui viia evolutsioneerunud tüvest E1.2 plasmiiid pEST1412 *P. putida* tüvesse PaW1, mis sisaldab evolutsioneerumata TOL-plasmiiidi pWW0, tekivad terve külvihoone ulatuses üksikud mutandid ja esineb nõrk kasv *m*-kresool minimaalsöötmel (tüvi RE7). Samas, kui viia aga algne pEST1412 ja evolutsioneerunud TOL-plasmiiid tüvest E2.1 *P. putida* tüvesse PaW85km (RE6), tekivad külvihoone vaid üksikud juhuslikud mutandid, kuid nõrka kasvu ei esine. Need tulemused viitavad sellele, et *m*-kresooli lagundamisvõime paranemiseks oli vaja muutusi plasmiiidis pEST1412. Samas aga pidid olema toimunud muutused ka TOL-plasmiiidis, sest võrreldes rekonstrueeritud tüvedega RE1 ja RE3 oli tüvel RE7 kasv *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel siiski nõrgem.

2.3.5 *m*-kresooli lagundamist võimaldavate võtmeensüümide aktiivsuste määramine rekonstrueeritud tüvedes

Kuna rekonstrueerimise katsest selgus, et plasmiiidides toimuvad muutused on *m*-kresooli lagundamisvõime aluseks, mõõtsime rekonstrueeritud tüves RE1 võtmeensüümide PMO ja C230 eriaktiivsusi (vt. peatükk 2.2.9 ja 2.2.11 töö „Materjal ja meetodika“ osas).

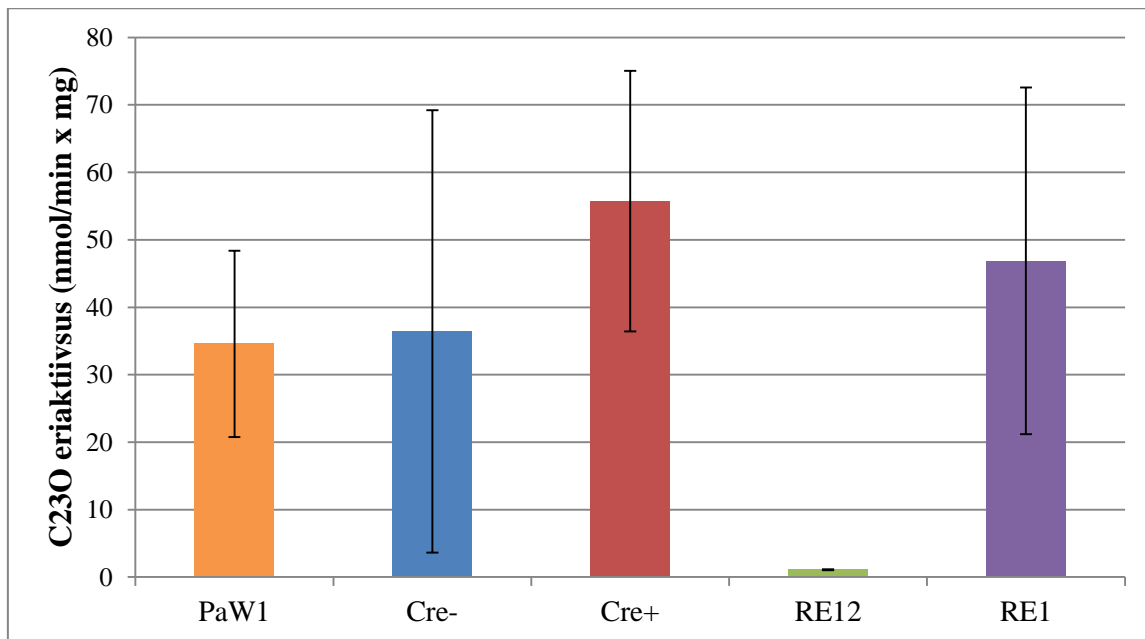
Eriaktiivsused määrasime bakterirakkudes, mida oli kasvatatud glükoos minimaalsöötmes, et hinnata nende ensüümide basaalsel aktiivsust. Ensüümide eriaktiivsusi võrdlesime Cre⁻ tüves CRE6, algse Cre⁺ tüves CRE5, tüves RE12, mis on saadud algse plasmidi pEST1412 sisseviimisel *P. putida* tüvesse PaW85, ning rekonstrueeritud tüves RE1, kus on nii TOL-plasmid pWW0 kui ka plasmid pEST1412 pärit evolutsioneerunud tüvest E1.2. Tüve PaW1 puhul, mis sisaldab algset plasmidi pWW0, mõõtsime ainult C23O eriaktiivsust.

Varasema uurimustöö käigus saadud tulemuste põhjal (Metsik, 2015) oli näha, et muutused, mis viisid *m*-kresooli lagundamisvõime paranemisele evolutsioneerunud populatsioonides, ei olnud seotud sellega, et *m*-kresool indutseeriks TOL-plasmidis asuvaid *meta*-raja geene. Samas jäi selgitamata, kas muutused võiksid olla seotud PheA eriaktiivsuse suurenemisega *m*-kresooli suhtes. Nimelt on algse PheA eriaktiivsus *m*-kresooli suhtes ainult 34% eriaktiivsusest fenooli suhtes (Nurk jt., 1991). Seetõttu uurisime käesolevas töös, kas rekonstrueeritud tüves RE1 on PheA eriaktiivsus suurenenud *m*-kresooli suhtes. Määrasime fenooli monooksügenaasi (PMO) eriaktiivsust kahes erinevas reaktsioonisegus, kus ühel juhul oli substraadiks fenool ja teisel juhul *m*-kresool. Katsetulemustest selgus, et rekonstrueeritud tüves RE1 on PheA eriaktiivsus *m*-kresooli suhtes 15% eriaktiivsusest fenooli suhtes (Joonis 8). Cre⁻ tüve CRE6 PheA eriaktiivsus *m*-kresooli suhtes oli meie katses hoopiski ainult 20% fenooli eriaktiivsusest. Samas oli märgatavalt suurenenud üldine PheA eriaktiivsus. Nimelt suurenes PheA eriaktiivsus rekonstrueeritud tüves RE1 ~10 korda võrreldes algse Cre⁺ tüvega ning tüves RE12 ~3 korda võrreldes Cre⁻ tüvega CRE6. Saadud tulemused viitasid sellele, et *m*-kresooli lagundamisvõime paranemine ei ole põhjustatud muutustest PheA substraadispetsiifikas *m*-kresooli suhtes, vaid suurenenud on hoopis *pheA* geeni ekspressioonitase. Samas aga nägime, et rekonstrueeritud tüves RE12 on PheA eriaktiivsus suurenenud samuti suurem võrreldes tüvedest CRE6 ja CRE5 mõõdetud eriaktiivsusele, mistõttu pigem on erinevused võrreldes tüvega RE1 põhjustatud hoopis sellest, et tüvedes CRE6 ja CRE5 on plasmid pEST1412 ebastabiilsem ja osadest rakkudest kaotsi läinud. pEST1412 kaotamine osadest rakkudest võib tuleneda sellest, et nendes tüvedes on korraka kaks plasmidi, mis muudab ühe neist, antud juhul pEST1412, püsimise ebastabiilsemaks. Võimalik, et evolutsioneerumise käigus on aga toimunud plasmidis pEST1412 muutused, mis võimaldavad plasmidil pEST1412 ja TOL-plasmidil stabiilsemalt koos püsida.



Joonis 8. Fenooli monoooksügenaasi (PMO) eriaktiivsus tüvedel CRE6 (Cre⁻ tüvi), CRE5 (algne Cre⁺ tüvi) ja rekonstrueeritud tüved. RE1 tähistab rekonstrueeritud tüve, kus *P. putida* tüvesse PaW85km on kokku viidud evolutsioneerunud plasmiidid pWW0 ja pEST1412 evolutsioneerunud tüvest E1.2. RE12 tähistab aga rekonstrueeritud tüve, kus *P. putida* tüvesse PaW85, millel puudub TOL-plasmiid, on viidud algne plasmiid pEST1412. Üleöö kasvatatud bakterikultuuridest tehti 3-kordne lahjendus ning seejärel kultiveeriti rakke 3 tundi Glc minimaalsöötmes. Joonisel on toodud vähemalt 2 sõltumatu katse tulemused 3 paralleeliga ja antud on 95% usalduspiirid.

Katehooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) eriaktiivsuse määramisel nägime, aga et *meta*-raja geenide ekspressioon on rekonstrueeritud tüves RE1 võrreldav algse Cre⁺ tüvega CRE5. Samas on aga graafikult näha, et rekonstrueeritud tüve RE1 C23O eriaktiivsus on tõusnud vaid ~1,3 korda võrreldes C23O eriaktiivsusega tüves *P. putida* PaW1, milles on evolutsioneerumata TOL-plasmiid pWWO (Joonis 9). Saadud tulemus viitab sellele, et TOL-plasmiidil paiknevates *meta*-raja geenide ekspressioonitasemes ei ole toimunud olulisi muutuseid *m*-kresooli lagundamiseks.



Joonis 9. *meta*-raja ensüümi katehhooli-2,3-dioksügenaasi (PMO) eriaktiivsus tüvedel *P. putida* PaW1, milles on evolutsioneerumata TOL-plasmiid pWW0, CRE6 (Cre⁻ tüvi), CRE5 (algne Cre⁺ tüvi) ja rekonstrueeritud tüved. RE1 tähistab rekonstrueeritud tüve, kus *P. putida* tüvesse PaW85km on kokku viidud evolutsioneerunud plasmiidid pWW0 ja pEST1412 evolutsioneerunud tüvest E1.2. RE12 tähistab aga rekonstrueeritud tüve, kus *P. putida* tüvesse PaW85, millel puudub TOL-plasmiid, on viidud algne plasmiid pEST1412. Üleöö kasvatatud bakterikultuuridest tehti 3-kordne lahjendus ning seejärel kultiveeriti rakke 3 tundi Glc minimaalsöötmes. Joonisel on toodud vähemalt 2 sõltumatu katse tulemused 3 paralleeliga ja antud on 95% usalduspiirid.

2.3.6 Muutused evolutsioneerunud tüvede geeni *pheA* järjestuses võrreldes CRE6 Cre⁻ tüvega

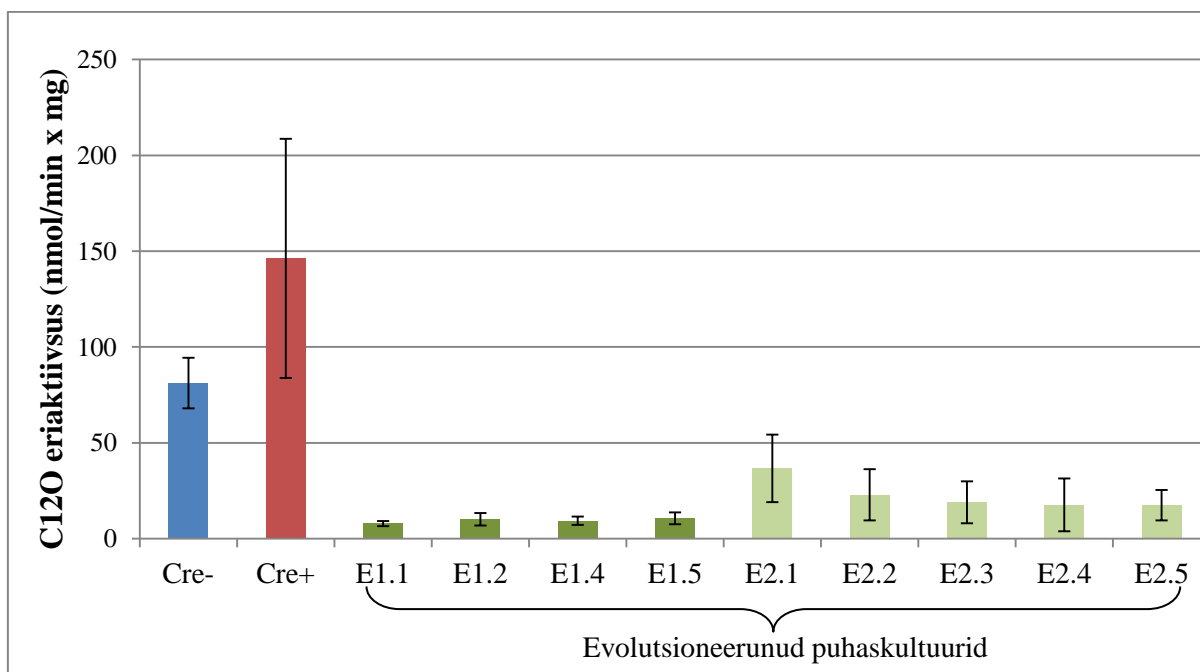
Kuna me nägime, et fenooli monoooksügenaasi eriaktiivsus on evolutsioneerunud tüvedes suurenenud, otsustasime sekveneerida plasmiidis pEST1412 paikneva geeni *pheA*. Sekveneerimise tulemustest selgus, et evolutsioneerunud tüvede, Cre⁻ ja algse Cre⁺ tüvede vahel me *pheA* järjestuses erinevusi ei tuvastanud. Sekveneerimistulemustest järeldub, et fenooli monoooksügenaasi eriaktiivsuse suurenemine isoleeritud evolutsioneerunud tüvedes ei ole tingitud mutatsioonidest *pheA* geenis, vaid pigem muutustest geeniekspressiooni tasemes. Selle kinnituseks oleks edaspidi vaja läbi viia reaalaja kvantitatiivne PCR, mille abil hinnata geeni *pheA* ekspressiooni taset.

2.3.7 *pheBA* operonis paikneva ensüümi katehhooli-1,2-dioksügenaas aktiivsuse määramine evolutsioneerunud ja rekonstrueeritud tüvedes

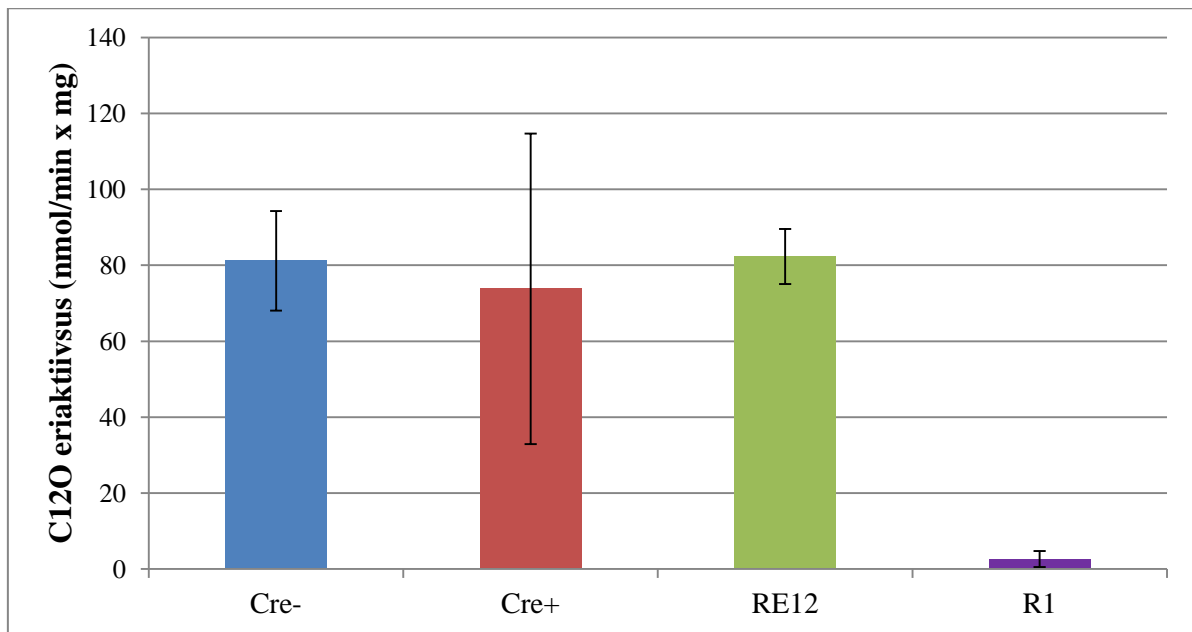
Kuna geeni *pheA* sekveneerimistulemustest selgus, et geenis pole toimunud mutatsioone, mis suurendaksid fenooli monoooksügenaasi eriaktiivsust, oletasime, et ehk on tekkinud promootor, mis tõstab *pheA* transkriptsiooni taset rakus. Selle võimaluse kontrollimiseks

otsustasime mõõta katehhooli-1,2-dioksügenaasi (C12O) eriaktiivsust, kuna nii *pheA* kui ka *pheB* asuvad mõlemad ühes opronis *pheBA* ning nende transkriptsiooni lähtub samalt promootorilt (vt. peatükk 2.2.10 töö „Materjal ja meetoodika“ osas). Eriaktiivsused määrasime bakterirakkudes, mida oli kasvatatud glükoos minimaalsöötmes selleks, et hinnata PheB basaalsel taset. Ensüümiaktiivsused määrasime tüvedes: CRE6, CRE5 ning evolutsioneerunud tüvedes. Lisaks määrasime ensüümiaktiivsuseid ka rekonstrueeritud tüvedes RE1 ja RE12 (vt. peatükk 2.3.4 töö „Tulemused“ osas).

Katehhooli-1,2-dioksügenaasi (C12O) eriaktiivsuse määramisel selgus, et evolutsioneerunud bakteripopulatsioonist E1 isoleeritud tüvedes on C12O ~15 korda madalam võrreldes CRE5 tüvega ning E2-st isoleeritud tüvedes ~8 korda (Joonis 10). Sama efekti nägime ka rekonstrueeritud tüve RE1 puhul, kus tüvesse *P. putida* PaW85km olid viidud evolutsioneerunud plasmiidid tüvest E1.2. Selgus, et võrreldes algse Cre⁺ tüvega oli rekonstrueeritud tüve C12O eriaktiivsus ~24 korda madalam (Joonis 11). Saadud tulemus viitab sellele, et geen *pheB* on toimunud mutatsioonid, mis on viinud geeni inaktivatsioonini või geeni kas osalisele või täielikule deleteerumisele



Joonis 10. Katehhooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) eriaktiivsus tüvedel CRE6 (Cre⁻ tüvi), CRE5 (algne Cre⁺ tüvi) ja evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüved. Üleöö kasvatatud bakterikultuuridest tehti 3-kordne lahjendus ning seejärel kultiveeriti rakke 3 tundi Glc minimaalsöötmes. Joonisel on toodud vähemalt 3 sõltumatu katse tulemused 3 paralleeliga, v.a CRE6, kus on toodud 2 sõltumatu katse tulemused. Antud on 95% usalduspiirid.



Joonis 11. Katehhooli-1,2-dioksügenaasi (C12O) eriaktiivsus tüvedel CRE6 (Cre⁻ tüvi), CRE5 (algne Cre⁺ tüvi) ja rekonstrueeritud tüved. RE1 tähistab rekonstrueeritud tüve, kus *P. putida* tüvesse PaW85km on kokku viidud evolutsioneerunud plasmiidid pWW0 ja pEST1412 evolutsioneerunud tüvest E1.2. RE12 tähistab aga rekonstrueeritud tüve, kus *P. putida* tüvesse PaW85, millel puudub TOL-plasmiid, on viidud algne plasmiid pEST1412. Üleöö kasvatatud bakterikultuuridest tehti 3-kordne lahjendus ning seejärel kultiveeriti rakke 3 tundi Glc minimaalsöötmes. Joonisel on toodud vähemalt 2 sõltumatu katse tulemused 3 paralleeliga ja antud on 95% usalduspiirid.

Kuna C12O eriaktiivsuse mõõtmisel nägime, et evolutsioneerunud tüvedes on eriaktiivsus märgatavalt vähenenud, testisime PCR-i teel, kas *pheB* geen on plasmiidis pEST1412 olemas. PCRi teostasime järgnevat tüvedes: Cre⁻, algne Cre⁺ tüvi ning evolutsioneerunud tüved. Selgus, et geen *pheB* on kõigis nendes tüvedes olemas ning sama pikkusega nagu algse plasmiidis pEST1412.

2.3.8 Muutused evolutsioneerunud tüvede geeni *pheB* järjestuses võrreldes CRE6 Cre⁻ tüvega

Kuna me PCR-i teel märgatavaid erinevusi *pheB* geeni pikkuses ei tuvastanud, otsustasime sekveneerida geeni *pheB*. Sekveneerimise tulemustest selgus, et evolutsioneerunud tüvedes on toimunud *pheB* geenis mutatsioonid, mis on põhjustanud valgu tasemel aminohappelisi asendusi võrreldes Cre⁻ tüvega ja algse Cre⁺ tüvega. Evolutsioneerunud bakteripopulatsioonist E2 isoleeritud tüvedes on positsioonis 409 C nukleotiid asendunud G nukleotiidiga, mille tagajärjel on histidiin (His; H) asendunud aspargiinhappega (Asp; D). Populatsioonist E1 isoleeritud tüvedes on aga positsioonis 484 G asendunud T-ga. Selle ühenukleotiidise erinevuse tagajärjel on aminohape glütsiin (Gly; G) asendunud aminohappega trüptofaan (Try; W) (Joonis 12).

```

          130          140          150          160          170
.. |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
Cre- PDTDGETMWLHGQVRDTAGKPIPGAKVEIWHCNSKGGYSFFDKSQTP
Cre+ PDTDGETMWLHGQVRDTAGKPIPGAKVEIWHCNSKGGYSFFDKSQTP
E1   PDTDGETMWLHGQVRDTAGKPIPGAKVEIWHCNSKWGYSFFDKSQTP
E2   PDTDGETMWLDGQVRDTAGKPIPGAKVEIWHCNSKGGYSFFDKSQTP
Clustal Consensus *****.*****

```

Joonis 12. Geeni *pheB* nukleotiidsel järjestusel põhjal tuletatud aminohappeline järjestus Cre⁻, algses Cre⁺ tüvedes ja evolutsioneerunud tüvedes. Joonisel on märgitud evolutsioneerunud populatsioonist E1 isoleeritud evolutsioneerunud tüved tähisega E1, kuna kõigis E1-st isoleeritud evolutsioneerunud tüvedes esines sama mutatsioon samas positsioonis. E2-st isoleeritud evolutsioneerunud tüved on märgitud tähisega E2, kuna sama mutatsioon esines samas kohas. Joonisel on halliga tähistatud aminohappeline asendus positsioonides 137 ja 162. Tärid tähistavad konsensusjärjestust.

2.4 Arutelu

Looduses on mitmeid inimtekkelise päritoluga võõra keemilise struktuuriga ühendeid ehk ksenobiootikume, mis on tihtipeale toksilised mikroobidele. Bakterite geneetiline plastilisus ja võime evolutsioneeruda soodustab bakterites uute kataboolsete radade tekkimist aromaatsete ühendite lagundamiseks. Sageli on tekkinud kataboolsed rajad hübriidsed, kus on ühte bakterirakku kokku sattunud horisontaalse geeniülekanega erinevad plasmiidid, millede geenid võimaldavad uutset ühendit kasutada süsinikuallikana. Selleks, et mõista adapteerumise käigus toimuvaid fenotüübilisi muutuseid kasutatakse järjest enam adaptiivset laboratoorset evolutsiooni (ALE), mis võimaldab jälgida ning hinnata toimuvaid muutuseid igas ajapunktis eraldi. Varasemalt konstrueerisime tüve, kuhu viisime kokku erineva päritoluga geenid, et hinnata *m*-kresooli lagundamisvõimet, kuid selgus, et ei piisa selle raja geenide kokku viimisest ühte bakterirakku, vaid selleks on tarvis mutatsioone. Kuigi esmase selektsiooni käigus isoleerisime mutante, mis suutsid kasvada *m*-kresoolil, polnud nende lagundamisvõime märkimisväärne. Paremate *m*-kresooli lagundajate saamiseks oli tarvis läbi viia ALE katse ning seejärel isoleerida evolutsioonikatse läbinud bakteripopulatsioonidest puhaskultuurid. Käesolevas töös uurisime *m*-kresooli lagundamise tagamaid algse Cre⁺ tüves CRE5 ning ALE katse läbinud bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüvedes.

Varasemates katsetes nägime, et kui kasvatada algse Cre⁺ tüve CRE5 bakterirakke mitteselektiivsetes tingimustes ning seejärel külvata neid bakterirakke *m*-kresooli sisaldavale minimaalsöötmele suutsid 65-st üksikkolooniast ainult ~20% lagundada *m*-kresooli. Käesolevas töös hindasime evolutsioneerunud bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüvede fenotüübilist stabiilsust, millest selgus, et mitteselektiivsetes tingimustes kasvatades on *m*-kresooli lagundamisvõime säilinud ~70-80% kolooniatest. Saadud tulemustest võiks järeldada, et evolutsioneerumise katse käigus on toimunud muutused, mis võimaldavad *m*-kresooli lagundamisega seotud gene sisaldavatel plasmiididel stabiilsemalt koos püsida.

On teada, et toitainete stressi korral suureneb bakterirakkudes osade geenide ja ensüümide ekspressioonitase, mis aitab bakteritel kiiremini adapteeruda uue süsinikuallikaga (Lopez-Maury jt., 2008). Kuna isoleeritud evolutsioneerunud tüvede lagundamisvõime *m*-kresooli suhtes on suurenenud võrreldes tüvega CRE5 (algne Cre⁺), otsustasime hinnata *m*-kresooli lagundamiseks vajalike võtmeensüümide basaalselt aktiivsust isoleeritud evolutsioneerunud tüvedes. Fenooli monooksügenaasi (PMO) määramisel oli näha, et evolutsioneerunud tüvedes on PMO eriaktiivsus märgatavalt suurenenud (Joonis 5), mis võib tuleneda suurenenud geeniekspressiooni tasemest. ALE katse jooksul kultiveerisime bakteripopulatsioone

vedelsöötmes, mis sisaldas lisaks glükoosile ka *m*-kresooli, millest võis tuleneda bakteritel suurenenud vajadus ensüümi järgi, mille abil kiiremini lagundada keskkonnas olev *m*-kresool 3-metüülkatehhoolik.

TOL-plasmiidi pWW0 puhul reguleerib *meta*-raja geende transkriptsiooni regulaatorvalk XylS ning teades, et *meta*-raja induktoriks on *m*-toluaat (Ramos ja Marques, 1997; Worsey ja Williams, 1975), oleme varem uurinud, kas lisaks *m*-toluaadile võiks ka *m*-kresool olla XylS-i efektoriks ja indutseerida ensüümi katehhooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) ekspressiooni. Minu bakalaureusetöös läbiviidud katsetest selgus, et *m*-kresooli juuresolekul ei suurene C23O ekspressioonitase, mis viitab sellele, et *meta*-raja geenide regulaatorispetsiifikas ei ole midagi muutunud (Metsik, 2015). Seega jäi võimalus, et *m*-kresooli lagundamiseks on suurenenud *meta*-raja geenide basaalne ekspressioonitase. Sellest lähtuvalt mõõtsime C23O basaalselt eriaktiivsust bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüvedes. Selgus, et bakteripopulatsioonist E1 isoleeritud evolutsioneerunud tüvedes on C23O basaalne aktiivsus suurenenud ~10 korda võrreldes algse Cre⁺ tüvega (Joonis 6). C23O basaalse aktiivsuse suurenemine võib olla tingitud muutustest TOL-plasmiidi pWW0 promootoris, mille tagajärjel on tõusnud *meta*-raja geenide transkriptsiooni tase. Samas aga näeme, et evolutsioneerunud bakteripopulatsioonist E2 isoleeritud tüvede eriaktiivsus on võrreldav tüvega CRE5 (Joonis 6). Erinevus isoleeritud tüvede vahel võib tuleneda sellest, et ALE katse jooksul on bakteripopulatsioonides E1 ja E2 adapteerumine läinud mööda erinevaid radu. Samas võisid erinevad basaalsed aktiivsused isoleeritud tüvede vahel tuleneda ka asjaolust, et bakteripopulatsioonist E1 isoleeritud tüvedes on suurenenud TOL-plasmiidi koopiaarv, mis tagab kõrgema ekspressioonitaseme. Võimalikku plasmiidi koopiaarvu muutust on kavas edaspidi testida. Kindlasti vajab aga ka C23O eriaktiivsuse mõõtmine isoleeritud tüvedes rohkema hulga korduste tegemist.

Kuna nägime, et ALE katse läbinud bakteripopulatsioonidest isoleeritud tüvedel on Cre⁺ fenotüübi püsimine populatsioonis muutunud oluliselt stabiilsemaks, tahtsime näha, kas *m*-kresooli lagundamisvõime paranemine on põhjustatud muutustest plasmiidis või kromosoomis. Selleks konstrueerisime *m*-kresooli lagundavad Cre⁺ fenotüübiga tüved. Selgus, et bakteripopulatsioonidest isoleeritud tüved ja rekonstrueeritud tüved, kus viisime evolutsioneerunud plasmiidid tüvesse, mis ei olnud evolutsioonikatset läbinud, on võrreldava kasvutugevusega *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel. See näitab, et valdavalt on toimunud muutused plasmiidides. Samas nägime, et kui viia evolutsioneerunud plasmiid pEST1412 tüvesse, kus on evolutsioneerumata TOL-plasmiid, tekivad terve külvihoone ulatuses üksikud Cre⁺ mutandid. Viimaste teke viitab aga sellele, et *m*-kresooli lagundamiseks

peavad toimuma muutused mõlemas plasmiidis. Kui rakus on juba üks muteerunud plasmiid, mis soodustab kasvu *m*-kresooli sisaldaval minimaalsöötmel, võimaldab see vähesel määral rakkude kasvu, millega kaasnev DNA replikatsioon aitab tõenäoliselt kaasa ka teise sama olulise mutatsiooni tekkele.

Kuna rekonstrueerimise katsest selgus, et *m*-kresooli lagundamisvõime aluseks on plasmiidides toimuvad muutused, tahtsime näha, kas need muutused võiksid olla rekonstrueeritud tüves, kus *P. putida* tüvesse PaW85km oli viidud mõlemad evolutsioneerunud plasmiidid tüvest E1.2, seotud fenooli monooksügenaasi (PMO) eriaktiivsuse suurenemisega *m*-kresooli suhtes. Käesolevas töös selgus, et PheA eriaktiivsus *m*-kresooli suhtes ei ole suurenenud rekonstrueeritud tüves võrreldes Cre⁻ tüvega CRE6 ja Cre⁺ tüvega CRE5 (Joonis 8). Samas nägime, et üldine PheA eriaktiivsus oli rekonstrueeritud tüvedes märgatavalt suurenenud.

Katehooli-2,3-dioksügenaasi (C23O) määramisel nägime, et rekonstrueeritud tüve ja *P. putida* PaW1 C23O eriaktiivsused on võrreldavad (Joonis 9). Bakteripopulatsioonist E1 isoleeritud tüve E1.2 puhul nägime, et C23O basaalne aktiivsus on märgatavalt suurenenud algse tüve CRE5 suhtes (Joonis 6). Rekonstruktsiooni puhul, kuhu oli viidud isoleeritud tüvest E1.2 eraldatud plasmiidid, me sellist efekti aga ei näinud. See erinevus võib tuleneda veast katse läbi viimisel. Rekonstrueerimise käigus võis kogemata tüve E1.2 TOL-plasmiidi asemel sattuda konjugatsiooni hoopis tüve E2.1 TOL-plasmiid. Viga võis tuleneda ka sellest, et rekonstrueerimise käigus konstrueerisime ainult ühe sellise variandi. Lisaks kuna valisime rekonstrueerimise käigus ainult ühe koloonia katsesse, võis sattuda just selline koloonia, kus on üks koopiat TOL-plasmiidist. Kindlasti tuleks uuesti rekonstrueerida tüvi, mis sisaldab plasmide tüvest E1.2 ning seekord teha mitu sellist varianti, et vaadata kas sama tulemus kordub.

Selleks, et teada saada, kas bakteripopulatsioonidest E1 ja E2 isoleeritud tüvede fenooli monooksügenaasi eriaktiivsuse suurenemise põhjuseks on muutused geeni nukleotiidses järjestuses, sekveneerisime plasmiidis pEST1412 asuva geeni *pheA*. Evolutsioneerunud tüvede *pheA* järjestuse määramiseks sekveneerisime võrdluseks *pheA* geeni ka algsest plasmiidist pEST1412 (Cre⁻ tüve CRE6), mis ei olnud evolutsioonikatset läbinud. Selgus, et võrreldes GenBank andmetega on meie kasutatavas algse plasmiidis mõningaid erinevusi, mis võivad olla ka varasemad sekveneerimisvead, mitte aga Cre⁻ tüves tekkinud muutused. Nimelt selgus, et Cre⁻ tüves on positsioonide 651 ja 652 vahel 30 nukleotiidi pikkune insertioon. Lisaks on positsioonis 731 erinevus ühes nukleotiidis, kus G nukleotiid on

asendunud A nukleotiidiga, kuid see ei muuda aminohapet, ning positsioonis 976 on G nukleotiid asendunud T nukleotiidiga, mistõttu aminohape tsüsteiin (Cys) on asendunud aminohappe fenüülalaniiniga (Phe). Juhul kui vahepeal on *pheA* geen plasmiidis pEST1412 aga siiski evolutsioneerunud, võivad need leitud erinevused olla põhjuseks, miks meie töös kasutatud Cre⁻ tüves CRE6 on PheA eriaktiivsus *m*-kresooli suhtes madalam võrreldes Nurk jt. näidatud artiklis oleva eriaktiivsusega. Evolutsioneerunud tüvede, Cre⁻ tüve CRE6 ja algse Cre⁺ tüve CRE5 nukleotiidsete järjestuste vahel ei tuvastanud me erinevusi, mistõttu ei saanud ma ka näha rekonstrueeritud tüves PheA eriaktiivsuse suurenemist *m*-kresooli suhtes. Kuna evolutsioneerunud tüvede geeni *pheA* järjestuses ei tuvastanud me võrreldes Cre⁻ tüve CRE6 oleva *pheA* geeniga mutatsioone, oletasime esialgu, et suurem PMO ekspressioonitase võiks olla põhjustatud muutustest geeniekspressiooni tasemes ning sellest lähtudes eeldasime, et ka katehhooli-1,2-dioksügenaasi (C12O) eriaktiivsus on samamoodi tõusnud, kuna nende transkriptsioon lähtub samalt promootorilt ning et mutatsiooni(de) tulemusena on tekkinud uus promootor, mis tõstab nende geenide ekspressioonitaset. C12O basaalse aktiivsuse hindamisel nägime aga hoopis vastupidist efekti, kus C12O eriaktiivsus oli evolutsioneerunud tüvedes ning ka rekonstrueeritud tüvedes kordades madalam võrreldes algse Cre⁺ tüvega (Joonis 10 ja Joonis 11). Sellest lähtuvalt arvasime, et ensüümi C12O kodeerivas geenis *pheB* on mutatsiooni(de) tagajärjel toimunud geeni inaktivatsioon või hoopiski osaline või täielik geeni deleteerumine. *pheB* geeni sisaldava ala PCR teel amplifitseerimisel aga nägime, et geen *pheB* on meie uuritavates tüvedes alles ning õige pikkusega. Sekveneerimise tulemustest selgus aga üllatuslikult, et geeni nukleotiidsetes järjestustes on evolutsioneerunud tüvedes toimunud mutatsioonid. Nimelt on nukleotiidi positsioonides 409 ja 484 toimunud asendusmutatsioonid, mille tagajärjel on muutunud valgu PheB aminohappeline järjestus, muutes selle valgu inaktiivseks. Need asendusmutatsioonid on toimunud geeni *pheB* sees kohtades, kus neid ei anna kuidagi seostada uue promootori tekkega *pheA* transkriptsiooniks, sest antud piirkondades olev DNA nukleotiidne järjestus ei sisalda potentsiaalseid -35 ja -10 promootorelemente. PheB inaktivatsiooni põhjuseks võib olla see, et *m*-kresooli lagundamisel tekkiv 3-metüülkatehhool suunatakse *meta*-raja asemel hoopis *orto*-ratta. Kirjanduses on näidatud, et kui 3-metüülkatehhool lagundatakse mööda *orto*-rada, tekib bakterirakkudele toksiline vaheühend 2-metüülmukonlaktoon (Dobslaw ja Engesser, 2014). Seega võib geeni *pheB* inaktivatsioon olla põhjustatud metaboolsest konfliktist, et vältida toksiliste vaheühendite kuhjumist rakku.

Kokkuvõte

Järjest enam satub inimtegevuse tõttu keskkonda toksilisi aromaatsaid ühendid ehk ksenobiootikume. Oma võõra struktuuri ja keemilise stabiilsuse tõttu püsivad ksenobiootikumid looduses väga pikka aega. Vaatamata sellele on aga loodusest isoleeritud baktereid, kes suudavad neid ühendeid lagundada. Mikroorganismide võime kiiresti kohaneda uute keskkonnatingimustega on seotud uute kataboolsete radade evolutsioneerumisega, võimaldades kasutada keskkonnas esinevaid aromaatsaid ühendeid süsiniku- ja energiaallikana.

Magistritöö teoreetilises osas andsin ülevaate aromaatsete ühendite lagundamisest aeroobsetes ja anaeroobsetes tingimustes ning sellega seotud stressist bakterites. Lisaks kirjeldasin laboratoorseid evolutsioneerumiskatseid, mis võimaldavad uurida bakteripopulatsioonide evolutsioonimehhanisme.

Töö eksperimentaalses osas isoleerisin bakalaureusetöös ALE katsest saadud bakteripopulatsioonidest 10 puhaskultuuri, et selgitada neis geneetilisi muutusi, mille tagajärjel *m*-kresooli lagundamisvõime paranes. Algne *m*-kresooli lagundav tüvi, millega oli läbi viidud ALE katse, sisaldas kahte plasmidi: pEST1412, millel paikneb *m*-kresooli hüdroksüleerimiseks vajaminev geen *pheA* ja TOL-plasmiid pWW0, millel paiknevad *meta*-raja geenid tekkinud 3-metüülkatehhooli lagundamiseks Krebsi tsükli vaheühenditeks. Määrasin isoleeritud evolutsioneerunud tüvedes *m*-kresooli lagundamiseks oluliste võtmeensüümide ekspresioonitaseme, et näha, kas nende ekspresioonitase on võrreldes algse *m*-kresooli lagundava tüvega paranenud. Lisaks rekonstrueerisin Cre⁺ fenotüübiga tüved, viies sinna plasmidid, mis pärinesid evolutsioneerunud tüvedest, et näha, kas *m*-kresooli lagundamisvõime on tingitud muutustest plasmiidides või hoopis kromosoomis.

Käesoleva töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. *m*-kresooli lagundamisvõime aluseks on plasmiidides toimuvad muutused, kuid need olulised muutused peavad olema toimunud mõlemas plasmiidis.
2. *m*-kresooli lagundamisvõime paranemine ei ole seotud muutustest PheA substraadispetsiifikas *m*-kresooli suhtes.
3. Evolutsioneerunud tüvedes on *pheB* geen inaktiveeritud tõenäoliselt sel põhjusel, et vältida *m*-kresooli lagundamist *orto*-rada mööda, kus tekiks rakkudele toksilised vaheühendid

Mutations that increase the efficiency of the hybrid *m*-cresol degradation pathway in laboratory-evolved *Pseudomonas putida*

Resume

Ingrem Metsik

Due to human activities there are more and more toxic aromatic compounds called xenobiotics in the environment. Xenobiotics are persistent in the nature for a very long time because of their foreign structure and chemical stability. Despite of that there has been isolated many bacterial strains that are capable to degrade aromatic compounds. Microbial ability to rapidly adapt to new environmental conditions contributes to the evolution of new catabolic pathways which enables to use new aromatic compounds as an energy and carbon source.

In the literature review of this study I gave an overview of the degradation of aromatic compounds under aerobic and anaerobic conditions and of the stress related to aromatic compounds in bacteria. Also, I described laboratory evolution experiments that allow exploring evolution mechanisms in bacterial populations.

The aim of the experimental part was to identify the genetic alterations that lead to improved *m*-cresol degradation. For that I isolated ten homogeneous cultures from the bacterial populations which had evolved ~300 generations in the presence of *m*-cresol. The initial strain that could degrade *m*-cresol carries two plasmids: pEST1412 (the gene *pheA* for the hydroxylation of *m*-cresol) and TOL-plasmid pWW0 (the genes for *meta*-pathway for the degradation of 3-methylcatechol to Krebs' cycle intermediates). I determined the level of expression of key enzymes for the degradation of *m*-cresol in evolved strains to see if the degradation of *m*-cresol has improved compared to the initial strain. Also, I reconstructed strains with Cre⁺ phenotype. For that I introduced plasmids derived from evolved strains to original plasmid-free *P. putida* to see if the ability to degrade *m*-cresol is a result of the changes in plasmids or in the chromosome.

The results of this study can be summarized as follows:

1. The ability to degrade *m*-cresol has improved due to mutations which occurred in both plasmids.
2. Improved *m*-cresol degradation is not related to changes in PheA substrate specificities towards *m*-cresol.

3. We hypothesize that the gene *pheB* has been inactivated in evolved populations to avoid *m*-cresol degradations through *orto*-pathway which could result in accumulation of toxic intermediates in cells.

Tänuõnad

Soovin eelkõige tänada oma juhendajaid Maiat ja Tanelit väga hea juhendamise eest. Lisaks, soovin tänada ka oma laborikaaslaseid heade nõuannete ja õpetuste eest.

Kasutatud kirjandus

- Chen, Y., He, J., Wang, Y-Q., Kotsopoulos, T. A., Kaparaju, P., Zeng, R. J. (2015). Development of an anaerobic co-metabolic model for degradation of phenol, m-cresol and easily degradable substrate. *Biochemical Engineering Journal* 106(2016)19-25.
- Conrad, T. M., Lewis, N. E., Palsson B. Ø. (2011). Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Molecular Systems Biology* 7, 509
- Deatherage, D. E., Kepner, J. L., Bennett, A. F., Lenski, R. E., Barrick, J. E. (2017). Specificity of genome evolution in experimental populations of *Escherichia coli* evolved at different temperatures. *PNAS* vol. 114 no. 10, E1904-E1912
- Diaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol.* 2004 Sep;7(3):173-80.
- Dobslaw, D., Engesser, K-H. (2014). Degradation of toluene by *ortho* cleavage enzymes in *Burkholderia fungorum* FLU100. *Microbial Biotech* 8(1), 143-154
- Dragosits, M., Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories* 2013, 12:64
- Elena, S. F., Lenski, R. E. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet.* 2003 Jun;4(6):457-69
- Fuchs, G., Boll, M., Heider, J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* 2011 oct 3;9(11):803-16
- Giraud, A., Radman, M., Matic, I., Taddei, F. (2001). The rise and fall of mutator bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4:582-585
- Guzik, U., Gren, I., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D. (2011). Catechol 1,2-dioxygenase from the new aromatic compounds – Degrading *Pseudomonas putida* strain N6. *International Biodeterioration & Biodegradation* Volume 65, Issue 3, June 2011, pp 504-512
- Jutkina, J., Heinaru, E., Vedler, E., Juhanson, J., Heinaru, A. (2011). Occurrence of Plasmids in the Aromatic Degrading Bacterioplankton of the Baltic Sea. *Genes* 2, 853-868
- Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., de Silva, R., Salt, C., Parsons J. R. (2016). Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 237, pp 105-121

- Lenski, R. E., Travisano, M. (1994). Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6808-6814
- Lenski, R. E. (2017). Experimental evolution and the Dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. *The ISME Journal* doi: 10.1038/ismej.2017.69
- Lenski, R. E. (2017). What is adaptation by natural selection? Perspectives of an experimental microbiologist. *PLoS Genet* 13(4): e1006668
- Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., Whitlock, M. C. (2012). Experimental evolution. *Trends Ecol Evol.* 2012 Oct;27(10):547-60
- Krastanov, A., Alexieva, Z., Yemendzhiev, H. (2012). Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Engineering in Life Sciences* 12, 76-78
- Metsik, I. (2015). Bakteripopulatsioonide evolutsioneerumine *m*-kresooli sisaldavas keskkonnas. Bakalaureusetöö
- Mozhayskiy, V., Tagkopoulos, I. (2012). Microbial evolution *in vivo* and *in silico*: methods and applications. *Integr. Biol.*, 2013, 5, 262
- 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. *Arch of Microbiol* 172(5): 287-294
- 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*
- Phale, P. S., Basu, A., Majhi, P. D., Deveryshetty, J., Vamsee-Krishna, C., Shrivastava, R. (2007). Metabolic Diversity in Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *OMICS.* 2007 Fall;11(3):252-79
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M-T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., Teran, W., Segura, A. (2002). Mechanisms of Solvent Tolerance in Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002. 56:743-68.
- Ramos, J. L., Gallegos, M-T., Marques, S., Ramos-Gonzalez, M-I., Espinosa-Urgel, M., Segura, A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology* 4:166-171.

- Ren, Y., Peng, L-H., DEng, L-J., Wei, C-H. (2009). Isolation and characterization of *Citrobacter farmeri* SC01: 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
- Rieger, P-G., Meier, H-M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., Knackmuss, H-J. (2002). Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. J Biotechnol. 2002 Mar 14;94(1):101-23.
- Roldan, M. D., Perez-Reinado, E., Castillo, F., Moreno-Vivian, C. (2008). Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. FEMS Microbiol Rev 32 (2008) 474-500.
- 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 Microbol Rev 35(4): 652-80
- Singh, D., Mishra, K., Ramanathan, G. (2015). Bioremediation of Nitroaromatic Compounds, Wastewater Treatment Engineering, Associate Prof. Mohamed Samer (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61253
- Yang, H., Jiang, Z., Shi, Shaoqi. (2005). Aromatic compounds biodegradation under anaerobic conditions and their QSBR models. Science of the Total Environment 358 (2006) 265-276.

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

Hübriidse *m*-kresooli lagundamisraja efektiivsust suurendavad mutatsioonid bakteri *Pseudomonas putida* laboratoorses evolutsioneerumiskatses

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, 31.05.2017