

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

**Toksiin-antitoksiin süsteem *relBE* mõju *E. coli* rakkudele aminohappe nälja tingimustes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Anett Mäerand

Juhendajad MSc Toomas Mets  
PhD Niilo Kaldalu

TARTU 2018

# INFOLEHT

## **Toksiin-antitoksiin süsteem *relBE* mõju *E. coli* rakkudele aminohappe nälja tingimustes**

Toksiin-antitoksiin (TA) süsteemid on geneetilised elemendid, mis koosnevad toksiinist ja antitoksiinist. Toksiinid inhibeerivad neid tootva bakteri kasvu ja antitoksiinid neutraliseerivad toksiine. Arvatakse, et TA süsteemid aktiveeruvad stressi korral ning aitavad bakterite kasvu seisata. Antud töö eesmärk oli uurida kas *relBE*, *mazEF* ja *mqsRA* toksiin-antitoksiin süsteemid mõjutavad *Escherichia coli* (*E. coli*) kasvu ja valguekspressiooni aminohapete nälja korral. Nägime, et eemaldatud *relBE*-ga BW25113 tüvi kasvas aminohappe näljas paremini kui metsiktüüpi tüvi. MG1655 ja Keio kolleksioonist pärit BW25113  $\Delta$ RelE tüves samas efekt puudus. MazF ja MqsR meie katse tingimustes aminohappe näljas kasvu ei mõjutanud. Aminohapete nälja tingimustes *relBE* rolli mõistmiseks on vaja täiendavaid katseid.

**Märksõnad:** toksiin-antitoksiin süsteem, *relBE*, *E. coli*, aminohapete nälg

**CERCS:** B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

## **Effects of the *relBE* toxin-antitoxin system on *E. coli* cells during amino acid starvation**

Toxin-antitoxin (TA) systems are genetic elements that are made up of a toxin and an antitoxin. Toxins inhibit the growth of bacteria, whereas antitoxins neutralize the toxic effect of toxins. It is thought that TA systems are activated by stress and help to stop the growth of bacteria. The aim of this work was to analyze whether TA systems *relBE*, *mazEF* ja *mqsRA* influence the growth and protein expression of *Escherichia coli* (*E. coli*) when there is not enough amino acid. We observed that *E. coli* strain BW25113, where *relBE* was removed ( $\Delta$ *relBE*), grew better in amino acid starvation than the wild type bacteria. In *E. coli* strains MG1655 and BW25113 with deleted toxin *RelE* gene, we did not see a similar effect. The removal of toxins MazF and MqsR did not alter bacterial growth in our experimental conditions. Further experiments are needed in order to understand the role of TA system *relBE* in amino acid starvation.

**Keywords:** toxin-antitoxin system, *relBE*, *E. coli*, amino acid starvation

**CERCS:** B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

<b>INFOLEHT</b> .....	2
<b>SISUKORD</b> .....	3
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	4
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	5
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	6
1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid.....	6
1.1.1 Toksiini-antitoksiini süsteemide ülevaade .....	6
1.1.2 Tüüp II TA süsteemid.....	7
1.1.3 Tüüp II TA süsteemide toksiinide sihtmärgid .....	8
1.2 Toksiin-antitoksiin süsteemide funktsioonid .....	9
1.2.1 Plasmidsed süsteemid .....	9
1.2.2 Kromosomaalsed TA süsteemid .....	10
1.3 <i>relBE</i> mõjust <i>E. coli</i> kasvule ja valgu ekspressioonile .....	12
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA</b> .....	14
2.1 Töö eesmärgid.....	14
2.2 Materjal ja meetodika.....	14
2.2.1 Tüved.....	14
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine .....	15
2.2.3 Transformatsioon.....	15
2.2.4 DMSO säilituskultuuri valmistamine .....	15
2.2.5 Kultuuri kasvatamine ning kasvu ja fluorestsentsi mõõtmine .....	16
2.3 Tulemused ja arutelu.....	16
2.3.1 BW25113 (wt) ja BW25113 $\Delta relBE$ kasvu võrdlus ( $\Delta relBE$ mõjutab bakteri kasvu).....	16
2.3.2 Kontrollid GFP ja IPTG mõju kohta .....	19
2.3.3 <i>mqsRA</i> , <i>mazEF</i> deletsioonide mõju raku kasvule.....	21
2.3.4 <i>relBE</i> mõju teisele bakteritüvele .....	22
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	23
<b>RESUME</b> .....	24
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	25
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID</b> .....	28

## KASUTATUD LÜHENDID

AH - aminohapped

DMSO - dimetüülsulfoksiid

GFP - roheline fluorestseeruv valk (*green fluorescent protein*)

IPTG - isopropüül- $\beta$ -tio-galaktopüranosiid

LB - *Lysogeny broth*

MOPS - 3-N(morfoliino)propaansulfoonhape

MUP - mupirotsiin

OD - optiline tihedus (*optical density*)

RPM- pööret minutis (*revolutions per minute*)

SOB - *super optimal broth*

SXT - seriinhüdoksamaat

TA - toksiin-antitoksiin

## SISSEJUHATUS

Viimastel aastakümnetel on üha enam tähelepanu pööratud toksiin-antitoksiin (TA) süsteemide uurimisele. Toksiin-antitoksiin süsteemiks nimetatakse toksilisest valgust ja seda neutraliseerivast antitoksiinist (valk või mittekodeeriv RNA) koosnevat süsteemi. Toksiinide aktiivsus on üldiselt antitoksiinide poolt inhibeeritud ja toksiinid ründavad neid tootva raku kasvu. TA süsteemide toksiinid mõjutavad bakteriraku füsioloogiat rünnates replikatsiooni, translatsiooni, rakukesta biosünteesi või rakumembraani terviklikkust (Unterholzner jt., 2013). Sage TA süsteemide märklaud on mRNA. Algselt avastati TA süsteemid plasmiididelt, aga tänaseks on neid hulgaliselt leitud ka kromosomaalsest DNAST.

TA süsteemide rollis bakterile ei olda kindlad. Plasmiidsetel TA süsteemidel arvatakse olevat stabiliseeriv roll (Ogura ja Hiraga, 1983) ja need suurendavad plasmidi säilimise tõenäosust (Van Melder ja Saavedra De Bast, 2009). Kromosomaalsed süsteemid võivad olla rämp-DNA, isekad alleelid (Magnuson, 2007) või plasmiidsete TA süsteemide sõltuvuse vastased mehhanismid (Van Melder ja Saavedra De Bast, 2009). Arvatakse, et toksiin-antitoksiin süsteemid aktiveeruvad stressi korral ja pidurdavad bakterite kasvu (Christensen jt., 2001).

Antud töö üldeesmärk oli uurida, kas toksiinid RelE (*relBE* süsteemi osa), MazF (*mazEF* süsteemi osa) ja MqsR (*mqsRA* süsteemi osa) võivad aktiveeruda aminohappe nälja korral. Uurimiseks kasutasime optilise tiheduse ja GFP tootmise jälgimist.

Töö on läbi viidud ja koostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudis.

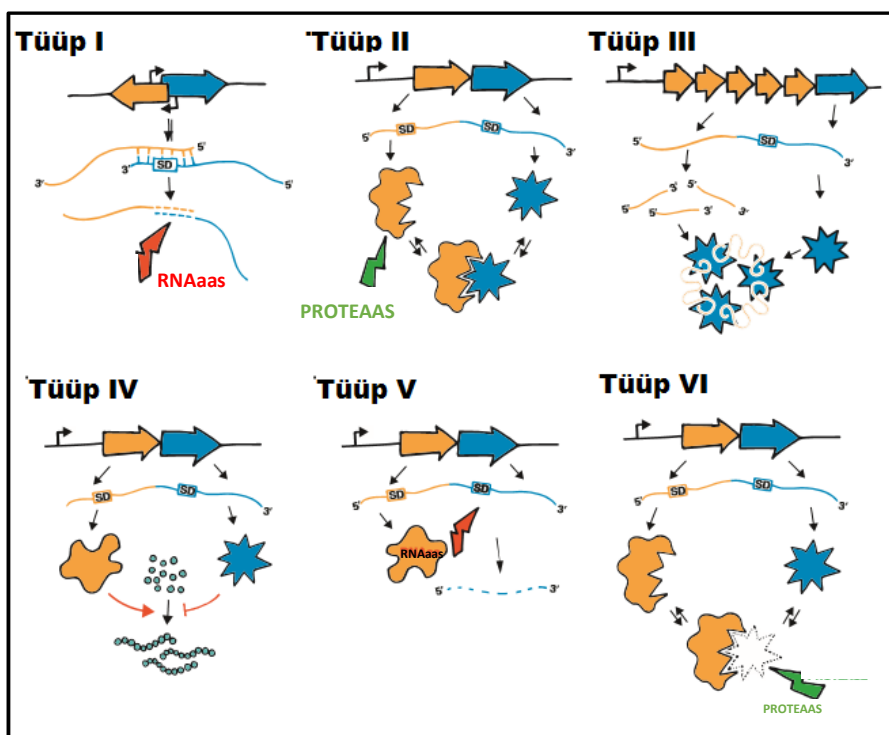
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid

### 1.1.1 Toksiini-antitoksiini süsteemide ülevaade

Toksiin-antitoksiin süsteemid koosnevad toksilisest valgust ja seda neutraliseerivast antitoksiinist, mis võib olla kas valk või mittekodeeriv RNA. Toksiin mõjutab seda tootva raku kasvu rünnates replikatsiooni, translatsiooni, rakukesta biosünteesi või rakumembraani terviklikkust. (Unterholzner jt., 2013)

TA süsteemi aktiveerimiseks peab suurenema toksiini ekspressioon või vähenema antitoksiini võimekus toksiini inhibeerida. Toksiini toimimiseks on vaja antitoksiin lagundada. Selle tulemusena vabastatakse stabiilne toksiin antitoksiini mõju alt ja saab hakata raku toimima. TA süsteemid ei ole rakukasvuks vajalikud, kuid vaatamata sellele esineb neid bakteritel ja arhedel laialdaselt (Yamaguchi jt., 2011). TA süsteemide gene leidub bakterites nii plasmiidides kui ka kromosomaalses DNAs. Toksiin-antitoksiin süsteemid on jaotatud kuude klassi erinevate toksiini neutraliseerimise mehhanismide järgi (Joonis 1) (Page ja Peti, 2016).



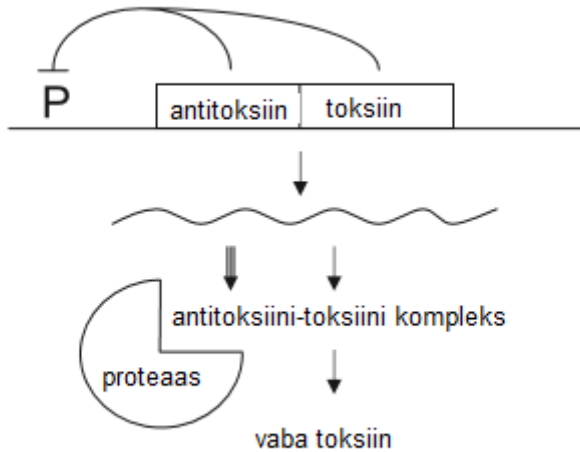
**Joonis 1:** TA süsteemi tüübid I-VI. Toksiinid on näidatud sinisega ja antitoksiinid kollasega. SD=Shine-Dalgarno ribosoomi seondumise koht. (Kohandatud joonis Hall jt., 2017)

Tüüp I süsteemis on antitoksiiniks antisense RNA, mis paardub toksiini mRNA-ga ja takistab translatsiooni ning tekkinud RNA dupleks lagundatakse ribonukleaaaside abil. Tüüp II korral on nii toksiin kui ka antitoksiin valgud ja antitoksiin takistab toksiini aktiivsust sellega otseselt seondudes. TA kompleks surub alla ka TA geenide transkriptsiooni. Tüüp III puhul on antitoksiiniks mittekodeeriv RNA, mis inhibeerib toksiini sellega seondudes. Tüüp IV antitoksiin on valk, mis võistleb toksiiniga seandumiskoha pärast. Antitoksiin kaitseb sihtmärki seondudes sinna toksiini asemel. Tüüp V süsteemis on antitoksiiniks RNAas, mis lagundab toksiini mRNA. Tüübi VI antitoksiini molekulid käituvad kui proteaasid, mis lagundavad toksiini. (Hall jt., 2017)

### 1.1.2 Tüüp II TA süsteemid

Bakterite hulgas on tüüp II TA süsteemid enim uuritud. Toksiin ja antitoksiin moodustavad stabiilse valk-valk kompleksi, kus toksiin on inaktiivne. Antitoksiin on rakus ebastabiilsem kui toksiin, seega peab seda tootma pidevalt, et ennetada toksiini tekitavaid kahjustusi (Unterholzner jt., 2013). Peaaegu kõiki tüüp II süsteeme kodeerib kahest geenist koosnev operon. Tavaliselt kattuvad need geenid mõne aluspaari ulatuses või on teineteisest vaid mõne aluspaari kaugusel (Yamaguchi ja Inouye, 2009). Antitoksiini geenid asuvad enamasti ülesvoolu temale vastava toksiini geenidest, mis aitab ennetada toksiini tootmist ilma antitoksiinita (Joonis 2). Kuigi on ka erandeid, nt. *E. coli higBA* TA süsteem, kus toksiinigeen *higB* on ülesvoolu antitoksiinigeenist *higA* (Tian jt., 2001).

Tavaliselt on tüüp II TA süsteemi operoni transkriptsioon autoreguleeritud antitoksiini ja TA kompleksi seandumisega promootorile (Bukowski jt., 2011). TA kompleks toimib TA operoni transkriptsioonile kui repressor, seondudes promootoralal palindroomsele järjestusele. Kui TA komplekside kontsentratsioon rakus on vähenenud, aktiveerub uuesti TA operoni ekspressioon, et toota rohkem toksiini ja antitoksiini (Kędzierska jt., 2007; Marianovsky jt., 2001).



**Joonis 2:** Antitoksiini ja toksiini paiknemine tüüp II TA süsteemis ja vaba toksiini teke. (Joonis kohandatud Magnuson, 2007)

On näidatud, et *Escherichia coli*-s lagundavad tüüp II TA süsteemide vabu antitoksiine proteaasid Clp ja Lon. Selle tagajärjel ei avane uutel rakus toodetavatel toksiinidel võimalust moodustada kompleksi antitoksiiniga ja tulemuseks on rakukasvu pidurdumine või rakusurm. (Unterholzner jt., 2013)

### 1.1.3 Tüüp II TA süsteemide toksiinide sihtmärgid

Enamasti on rakus tüüp II TA süsteemide sihtmärkideks konserveerunud protsessid nagu DNA replikatsioon ja translatsioon. Replikatsiooni häiriva süsteemi näiteks on *ccdAB*. Toksiin CcdB takistab DNA güraasi tööd ja replikatsioon peatub (Bernard jt., 1993).

Translatsiooni inhibeerib näiteks *hipBA* TA süsteemi toksiin HipA, mis lülitab fosforüleerides välja glutamüül-tRNA süntetaasi. Tulemuseks on aminohappe nälg ja poomisvastus. (Kaspy jt., 2013). Sagedamini kasutavad translatsiooni takistavad TA süsteemi toksiinid märklauana mRNA-d. mRNA lõikamine viib translatsiooni inhibeerimiseni, sest mRNA on katki ja ribosoom ei saa edasi transleerida. mRNA lõikamisel põhinevad süsteemid on jaotatud kaheks selle põhjal, kuidas need mRNA-d lõikavad. On ribosoomsõltumatud (nt. MazF, MqsR), mis suudavad mRNA-d lõigata vabalt ilma ribosoomi juuresolekuta ja ribosoomsõltuvad (nt. RelE), mis töötavad ainult ribosoomiga seondunult ja lõikavad parasjagu transleeritavat mRNA-d. (Yamaguchi ja Inouye, 2009; Yamaguchi jt., 2011).



Ribosoomist sõltumatutest toksiinidest on enim uuritud *E. coli* MazF toksiin (osa *mazEF* TA süsteemist). See on järjestusespetsiifiline endoribonukleas, mis tunneb ära ACA järjestuse ja lõikab RNAd ACA järjestuse eest ülesvoolu. MazF aktiivsuse tagajärjel valgusüntees peatub, sest katkise mRNA pealt valku sünteesida ei saa. (Zhang jt., 2005)

Ribosoom sõltuvate toksiinide näiteks on eelpoolmainitud RelE. *relBE* süsteemis takistab antitoksiin RelB toksiin RelE aktiivsust otsese valk-valk interaktsiooniga ja summutab *relBE* transkriptsiooni. RelE on *relBE* korepressor. (Gotfredsen ja Gerdes, 1998) RelE takistab translatsiooni lõigates ribosoomiga seondunud mRNA-d pidevalt umbes esimese 100 koodoni jooksul lugemisraamist sõltumata. Hurley rühm leidis, et harva lõigatakse peale 100 koodoni täitumist ja veelgi harvem 3' otsa lähedal. (Hurley jt., 2011)

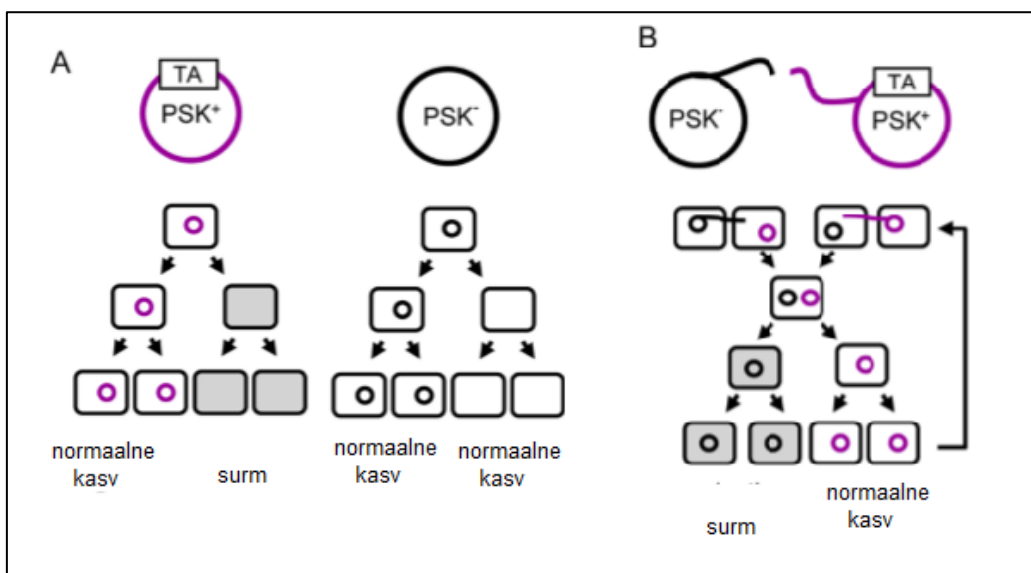
Ribosoomid jäävad lõigatud RNA peale seisma, sest sellel puudub stoppkoodon. 3' otsas kinnijäänud ribosoomi aitab tmRNA, mis sisaldab tRNA sarnast- ja mRNA sarnast domeeni. tmRNA seondub ribosoomidega nagu tRNA ja lisabalaniini valmis sünteesitud polüpeptiidahelale. Seejärel sünteesib ribosoom tmRNA poolt kodeeritud peptiidi, jõuab stoppkoodonini ja kaasab vabastavad faktorid, mis lasevad ribosoomi taas ringlusesse viia. (Hayes ja Sauer, 2003)

## **1.2 Toksiin-antitoksiin süsteemide funktsioonid**

### **1.2.1 Plasmiidsed süsteemid**

Esimest TA süsteemi *ccdAB* kirjeldati *E. coli*-l üle 30 aasta tagasi kui moodulit, mis stabiliseerib F-plasmiidi (Ogura ja Hiraga, 1983). Hiljem on kirjeldatud veel mitmeid TA süsteeme, millel on sarnane plasmiide stabiliseeriv omadus (Unterholzner jt., 2013). TA süsteemid suurendavad plasmiidi levimust kasvavates bakteri-populatsioonides, sest takistavad elulemust tütarakkudes, mis ei pärinud raku jagunemisel plasmiidi koopiat. Kui tütarakkudest on plasmiid kadunud, ei toodeta TA valke juurde. Antitoksiin on ebastabiilsem kui toksiin ja selle hulk väheneb kiiremini kui toksiooni oma. Toksiinid vabanevad ja surmavad plasmiidi mittedisaldavad rakud või pidurdavad nende kasvu. (Gerdes jt., 1986; Jaffé jt., 1985). Joonis 3A näitab vertikaalset plasmiidi ülekannet. TA süsteemid suurendavad plasmiidi olemasolemise tõenäosust kasvavates bakteripopulatsioonides jagunemisjärgse tapmise (post-segregational killing) kaudu. Kui TA süsteem puudub, kasvavad nii plasmiidiga kui ka plasmiidita rakud normaalselt. Joonisel 3B on kujutatud horisontaalne ülekanneplasmiid-plasmiid konkurents. Kuna plasmiidid on võimelised konjugeeruma, saavad

sobivatel tingimustel tekkida rakud, kus on nii TA-ga kui ka TA-ta plasmiid olemas. Kui plasmiidid kuuluvad samasse mittesobivusgruppi võib üks plasmiididest kaduda. TA plasmiidiga rakud kasvavad normaalselt, aga ilma TA plasmiidita surevad. Kui konjugatsiooni toimub mitmeid kordi, paraneb TA plasmidi kohasus. (Van Melderer ja Saavedra De Bast, 2009)



**Joonis 3:** Plasmiid-kodeeritud TA süsteemid. (A) Vertikaalne ülekanne. (B) Horisontaalne ülekanne. PSK=post-segregational killing e jagunemisjärgne surm. Lillal plasmiidil on TA moodul sees, mustal ei ole. (Joonis kohandatud Van Melderer ja Saavedra De Bast, 2009)

## 1.2.2 Kromosomaalsed TA süsteemid

Kromosomaalses DNAs paiknevate TA süsteemide rollis ei olda siiani täiesti kindlad. On välja käidud mitmeid erinevaid ideid, mis nende ülesandeks võiks olla. Nullhüpotees on, et sellised TA süsteemid kuuluvad täielikult rämps-DNA hulka. Aga mitmed autorid on välja pakkunud erinevaid funktsioone, mis neil tegelikult olla võib. Üks võimalik funktsioon on TA süsteemid kui isekad alleelid. Need on genoomiosad, mis rakus olles ei anna bakterile otseselt midagi ega tekita bakterile kahju, kuid neil on selektiivne väärtus. Kui parasiitne geen kaob osadest bakteritest populatsioonis, siis võib nende bakterite kasv olla pärssitud ja bakterid teises populatsiooni osas, kellele jääb geen alles, kasvavad ilma geenita bakteritest üle. Parasiitsetest geenidest vabanemine on bakterile keerukas. Enamus testitud toksiid on olnud kasvu pärssivad. Kui mutatsioon leiab aset toksiinigeenis, siis võib süsteem muteeruda või kaduda ja ka toksiini aktiivsuse kadu on sage. (Magnuson, 2007)

Samas ei ole kõik hüpoteesid nii tagasihoidlikud: üks levinud teooria on, et TA süsteemid osalevad kasvu kontrollimises stressi tingimustes. Eri TA süsteeme mõjutavad erinevad stressorid. Kui aminohapete või glükoosi nälg aktiveerivad *yafNO* ja *mqsRA* süsteemid, siis *mqsRA* süsteemi stimuleerivad oksüdatiivne stress ja ampitsilliini kasutamine (Wang jt., 2013). *mazEF* süsteem aktiveerub lühiajalise stressi tagajärjel nt. aminohapete nälg, antibiootikumiga töötlemine, DNA-d kahjustavad ained, oksüdatiivne stress (Tsilibaris jt., 2007). Toitainete puudusest põhjustatud stressi korral nagu glükoosi nälg ja aminohapete nälg kutsutakse esile *hicA* ekspressioon (Jørgensen jt., 2009).

On välja pakutud, et TA süsteemid *relBE*, *mazEF* ja ilmselt ka teised kromosomaalsed TA süsteemid on kasvuregulaatorid, sest Gerdes jt. näitasid, et *relBE* ja *mazEF* aktivatsioon aminohapete näljas inhibeerib valgusünteesi raku elujõulisust mõjutamata. Ka Christensen jt. näitasid, et RelE inhibeerib aminohappe nälja korral translatsiooni. (Christensen jt., 2001)

Sõltuvuse vastane mudel (anti-addiction model) pakub välja, et kromosomaalsete TA süsteemide ülesandeks bakteris on toota antitoksiini, mis neutraliseerib plasmiidse toksiini. Üldjuhul, kui plasmiid rakust kaob, siis antitoksiin laguneb esimesena, toksiin aktiveerub ning rakk sureb. Antud sõltuvuse vastases mudelis aga rakk ei sure, sest kromosomaalne TA süsteem suudab ise toota sobivaid toksiini neutraliseerivaid antitoksiine. Plasmiidid on bakteritele lisanduv metaboolne koormus, seega on kromosomaalset TA süsteemi omaval peremehel eelis, sest on võimalus toksiiniga plasmiidist vabaneda. (Van Melder ja Saavedra De Bast, 2009)

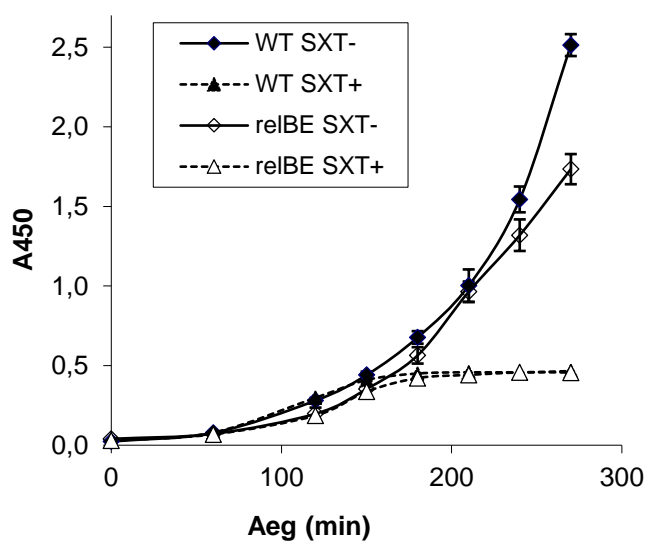
Ka on hüpotees, et TA süsteemid aitavad stabiliseerida erinevaid mobiilseid geneetilisi elemente (transposoom, profaag) bakteri genoomis, hoides neid sarnaselt jagunemisejärgse tapmisega populatsioonis alles (Wozniak ja Waldor, 2009). Lisaks võib rakkudes ilmned ka TA süsteemide faagide vastane funktsioon. Bakteriofaagid saavad sekkuda peremeesraku transkriptsiooni ja translatsiooni ning võivad sellega TA süsteeme aktiveerida. Osa TA süsteeme võib faagitootmist takistama hakata, kui faag just peremeesraku antitoksiini lagundavaid proteaase ei inhibeeri, toksiini ei neutraliseeri või ei lahku rakust enne toksiini aktiveerumist. (Magnuson, 2007). Oluliseks on peetud ka seost persistoritega, mis on uinunud ainevahetusega antibiootikumitolerantsed bakterid. Katsetest *Salmonellaga* märgati, et suurem osa 14 testitud TA moodulist aitas kaasa persistorite tekkele, kui need ükshaaval deleteeriti. (Helaine jt., 2014).

### 1.3 *relBE* mõjust *E. coli* kasvule ja valgus ekspressioonile

TA süsteem *relBE* mõju *E. coli* kasvule ja valgus ekspressioonile on testitud ka enne käesolevat tööd. Meie laboris tehti eelkatse, milles uuriti *relBE* toksiin-antitoksiin süsteemi mõju *E. coli* kasvule ja valgus ekspressioonile. Kasutati *E. coli* tüve BW25113 ja *relBE* deletsiooni mutanti BW25113  $\Delta relBE$ . Valgusünteesi võrdlemiseks viidi bakteritesse rohelist fluorestseeruvat valku (GFP) kodeeriv plasmiid pET-GFPmut2.

*relBE* mõju uuriti aminohappenälja tingimustes, mis tekitati seriinhüdrosamaadi (SXT) lisamisega kultuurile. See inaktiveerib ensüümi, mis lisab tRNAle seriini. Ilma seriinita tRNAd jõuavad ribosoomi ja tekitavad poomisvastuse (stringent response). (Tosa ja Pizer, 1971). Baktereid kasvatati AB söötmes (Clark ja Maaløe, 1967).

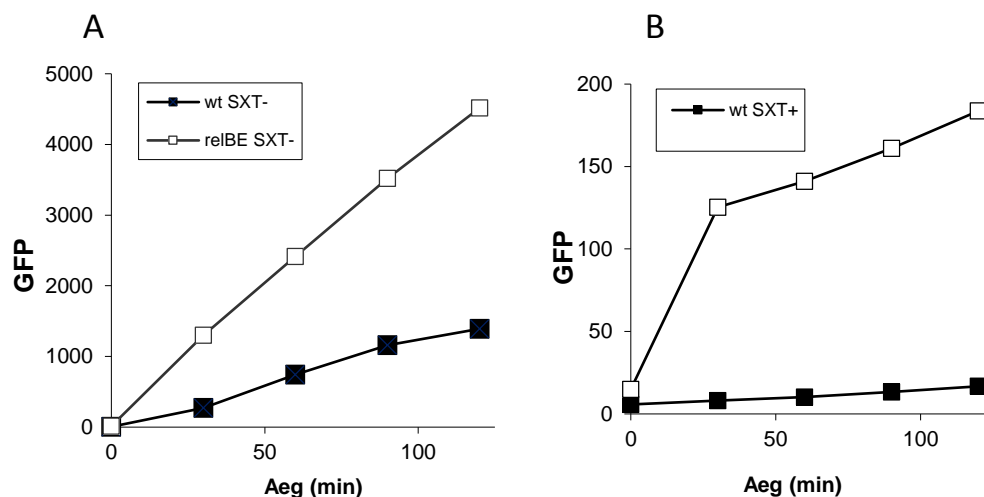
Eelkatse ei näidanud, et *relBE* mõjutaks bakterite kasvu. Mõlemad tüved kasvasid AB söötmes sarnase kiirusega. Kui bakteritel tekitati aminohappenälg, siis mõlema tüve kasv pidurdus (Joonis 4).



**Joonis 4:** Bakterite kasv AB söötmes mõõdetuna kultuuri optilise tiheduse järgi (A450) ilma aminohappe nälga tekitamata (SXT-) ja aminohappenälja tingimustes (SXT+). Võrreldud on tüvesid BW25113 (WT) ja BW25113  $\Delta relBE$ . Esitatud on kolme sõltumatu katse keskmine, veajooned näitavad standardhälvet.

Bakterite fluorestsentsi analüüsiti voolutsütomeetriga. Kasvavas bakterikultuuris, kus aminohappenälga polnud, oli GFP ekspressioonitase  $\Delta relBE$  tüves ligi kaks korda kõrgem kui metsiktüüpi tüves (Joonis 5A). Aminohappenälja tingimustes kasvas see erinevus ligi sajakordseks (Joonis 5B).

Üldiselt on teada, et bakterite kasvukiirus on võrdeline valgusünteesi kiirusega. Kui *relBE* süsteem bakterite kasvukiirust ei mõjutanud, miks oli GFP valgu süntees tüvedes nii erinev? Katse tulemust tõlgendades tuleb arvestada, et GFP ei raporteeri kogu valgusünteesi efektiivsust bakterirakus, vaid on kõigest üks paljudest toodetavatest valkudest. Arvatavasti on GFP mRNA RelE toksiini suhtes väga tundlik, seega ei iseloomusta GFP tootmine selles katses niivõrd kogu valgusünteesi produktiivsust bakteris, vaid seda valku kodeeriva mRNA katkilõikamist RelE poolt.



**Joonis 5:** GFP tootmine bakterites mõõdetuna rohelise fluorestsentsi keskmise taseme järgi. Võrreldi *E. coli* tüvesid BW25113 (wt) ja BW25113  $\Delta relBE$  (*relBE*) ilma aminohapete näljata (A) ja aminohapetenälja tingimustes (B). Esitatud on kolme sõltumatu katse keskmine, veajooned näitavad standardhälvet.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eesmärk oli uurida kas *relBE* toksiin-antitoksiin süsteem mõjutab *E. coli* kasvu ja valguekspressiooni aminohapete nälja korral. Kasvu hinnati optilise tiheduse (OD) abil ja valguekspressiooni jälgimiseks kasutati raku viidud GFP plasmidi ning mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Tüved

Töös kasutatud *Escherichia coli* tüved on esitatud Tabelis 1. Tüvedesse BW25113  $\Delta$ *ygiUT*, BW25113  $\Delta$ *mazEF*, viidi pETgfpmut2-AGGAGG plasmiid (pGFP) (Roostalu, 2006), mis kodeerib GFPd. GFP geen on tac promootori kontrolli all ja selle induktor on IPTG.

**Tabel 1:** Kasutatud *Escherichia coli* tüved

Tüvi	Iseloomustus	Päritolu
BW25113	<i>lacIq rrnB3 lacZ4787 hsdR514 <math>\Delta</math>(araBAD)567 <math>\Delta</math>(rhaBAD)568 rph-1</i>	(Haldimann ja Wanner, 2001)
BW25113 $\Delta$ <i>ygiUT</i>	BW25113 $\Delta$ <i>mqsR::kan</i>	(Baba jt., 2006)
BW25113 $\Delta$ <i>relE</i> (Keio)	BW25113 $\Delta$ <i>relE::kan</i>	(Baba jt., 2006)
BW25113 $\Delta$ <i>mazEF</i>	BW25113 $\Delta$ <i>mazEF::kan</i>	Villu Kasari (Kasari jt., 2010)
BW25113 $\Delta$ <i>relBE</i>	BW25113 $\Delta$ <i>relBE</i>	H. Luidalepp (Kasari jt., 2010)
MG1655	<i>F- <math>\lambda</math>- ilvG rfb-50 rph-1</i>	(Blattner jt., 1997)
MG1655 $\Delta$ <i>relBE</i>	<i>F- <math>\lambda</math>- ilvG rfb-50 rph-1 <math>\Delta</math><i>relBE</i></i>	(Blattner jt., 1997)

## 2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine

Üleöökultuuri alustati kolooniast 3 ml LB söötmega katseklaasi ja kasvatati 16-18 tundi ning seejärel lahjendati 200x SOB söötmesse, mida oli kolvis 20 ml. Kultuuri kasvatati 125 ml kolvis, 37°C juures loksutil kuni OD<sub>600</sub> oli vahemikus 0,4-0,6.

Kompetentide tegemiseks kasutati Douglas Hanahani kirjeldatud meetodit (Hanahan, 1983). Võeti 20ml rakukultuuri ning hoiti seda 15 min jääl. Seejärel tsentrifugeeriti 15 min 3000rpm 4°C (Sigma 4K15C rootor 11150/13350), võeti sade üles 6,6 ml RF1s, hoiti 15 min jääl ja tsentrifugeeriti 15 min 4°C juures ning uus sade suspendeeriti 0,8 ml jääkülmas RF2 lahuses, jaotati 0,1 ml kaupa tuubidesse ja külmutati vedelas lämmastikus. RF1 koostises on 100mM KCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 Mm kaaliumatsetaati, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glütserooli. RF2 koostis on 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glütserooli. (Hanahan, 1983)

## 2.2.3 Transformatsioon

Transformatsiooniks sulatati 100 µl kompetentseid rakke jääl ning lisati 1,5 µl pGFP DNAd (80 ng/µl). Segati tasakesi ja hoiti 30 minutit jääl. 42°C juures anti kultuurile minut ja 30 sekundit kestev kuumašokk ning rakud jahutati jääl. Lisati 1 ml LB söödelt ja rakke hoiti 45 minutit 37°C juures. Rakud plaaditi plasmidi seleksiooniks kanamütsiini (25µg/ml) sisaldavale tardsöötmele ja inkubeeriti üleöö 37°C juures.

## 2.2.4 DMSO säilituskultuuri valmistamine

Kolooniast alustati üleöökultuuri 3ml LB söötmesse katseklaasis ja kasvatati üleöö 37°C loksutil (*Sanyo Orbital Incubator*), kiirusel 220 rpm. Üleöökultuuri lahjendati 100x ja kasvatati samadel tingimustel kuni OD<sub>600</sub> oli ~0,6. Kultuurile lisati DMSO, mille lõppkontsentratsioon lahuses oli 8%. Kultuur jaotati 0,1 ml kaupa tuubidesse ja külmutati vedelas lämmastikus. Rakukultuure hoiti -80°C juures.

## 2.2.5 Kultuuri kasvatamine ning kasvu ja fluorestsentsi mõõtmine

Bakterite kasvatamiseks kasutati Lysogeni Broth (LB), Super Optimal Broth (SOB) (Russell ja Sambrook, 2001) ja MOPS (Neidhardt jt., 1974) söötmeid. 1xMOPS söötmele lisati 9,52mM NH<sub>4</sub>Cl, 1,32 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4% glükoosi ja 20 aminohappe segu, nii et iga üksiku aminohappe kontsentratsioon söötmes oli 25 µg/ml.

Kõiki mainitud *E. coli* tüvesid kasvatati 37°C juures Infors HT Multitron loksutil kiirusel 190 rpm. Üleöökuultuure kasvatati LB ja katseid tehti MOPS söötmes. Üleöökuultuuri alustati kas kolooniast või 0,1 ml DMSO (dimetüülsulfoksiid) säilituskultuurist 3ml LB söötmesse ja kasvatati 16-18h. Tüvedel BW25113  $\Delta ygiUT$ , BW25113  $\Delta relE$  (Keio) ja BW25113  $\Delta mazEF$  alustati üleöökuultuuri kolooniast, aga tüvedel BW25113, BW25113  $\Delta relBE$ , MG1655 ja MG1655  $\Delta relBE$  kasutati üleöökuultuuride tegemisel DMSO kultuure. Üleöökuultuurist võeti 0,2 ml kultuuri ja pandi hommikul kasvama 20 ml MOPS söötmesse, kuni optiline tihedus oli umbes 0,6. Enne plaadile kandmist tekitati poolele kultuurile aminohapete nälga mupirotsiini lisades. Kasutati MUP lõppkontsentratsiooniga 30µg/ml. GFP mõõtmise katsetes lisati ka IPTG lõppkontsentratsiooniga 1M. Kultuurid pipeteeriti 96-augulisele plaadile. Plaadi igasse auku kanti 0,1 ml kultuuri. Kultuuri ei kantud plaadi äärmistele ridadele, sest sealne temperatuur võib olla jahedam kui ülejäänud plaadil ja mõjutada bakterite kasvu. Seal kasutati kultuuri asemel 0,2 ml vett.

Kultuuri kasvu pidevalt pikema aja jooksul mõõtmiseks kasutati BioTek Synergy Mx Microplate Reader mikrotiiter plaadilugejat, mis mõõtis 18 tunni kestel intervalliga 15 minutit kultuuride optilist tihedust (OD<sub>600</sub>) ja fluorestsentsi (ergastus 485nm) ja emissioon 510nm). Plaati kasvatati 37°C ning 96-augulist plaati loksutati pidevalt masina seadetest valitud keskmisel kiirusel.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 BW25113 (wt) ja BW25113 $\Delta relBE$ kasvu võrdlus ( $\Delta relBE$ mõjutab bakteri kasvu)

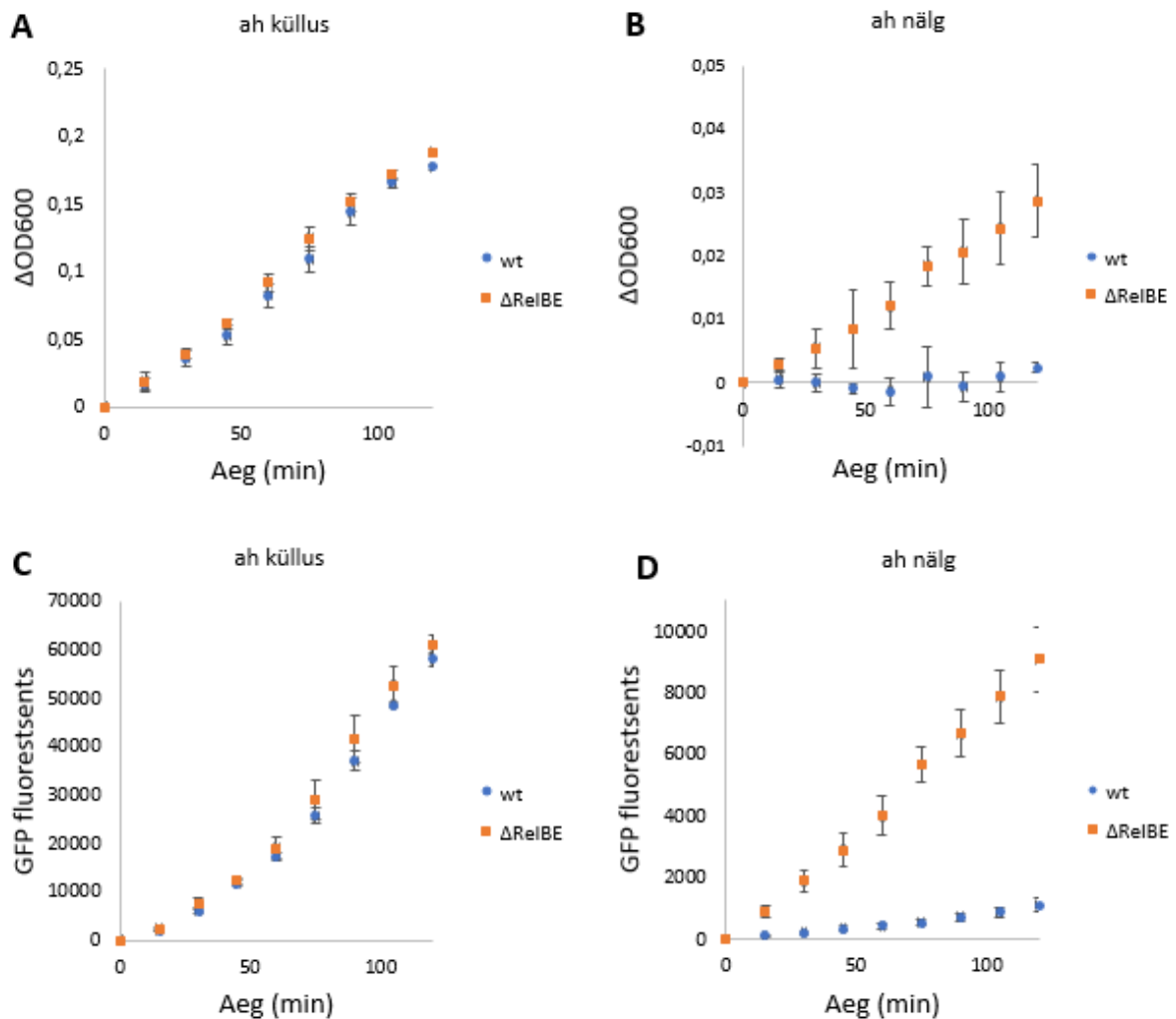
Eelkatsed ei olnud optimaalsed, sest nälja indutseerimiseks kasutati SXT, mis on ebastabiilne, laguneb kiiresti ja kipub söötmes välja sadenema ning seda ei saa paljudele söötmetele lisada. Taheti vahetada SXT välja MUP vastu ja antud töös kasutati aminohappe nälja indutseerimiseks stabiilsemat mupirotsiini. Mupirotsiin seondub isoleutsüül-tRNA süntetaasile ja takistab tRNA laadimist isoleutsiiniga, tekitades aminohappe nälja (Drugbank,



2018). Mupirotsiini kasutades korraldi katseid ja nähti, et eelkatsete efekt, kus GFP ekspressioonitase  $\Delta relBE$  tüves oli ligi kaks korda kõrgem kui metsiktüüpi tüves püsib ka uues testsüsteemis (joonis 6).

Eelkatsetes kasvasid wt ja  $\Delta relBE$  tüvi aminohappe näljatingimustes sama kiirusega, aga GFP ekspressiooni tase oli  $\Delta relBE$  tüves kõrgem. See viitas, et aminohapete nälja korral tekkinud stressi tingimustes võidakse GFP mRNA lagundada eelistatult. *relBE* toksiin-antitoksiin süsteem võib mõjutada *E. coli* kasvu ja valguekspressiooni. Kui toksiinid näljas aktiveeruksid ja lagundaksid GFP mRNA, siis peaks wt-s olema vähem GFP ekspressiooni, nii nagu nähti katsetes.

Tüved, mida kasutati on BW25113 ja BW25113  $\Delta relBE$ , mis sisaldavad plasmidi GFP ekspressiooniks. Metsiktüve ja *relBE* deletsioonmutandi kasvu võrreldi optilise tiheduse alusel ( $OD_{600}$ ) nii aminohapete külluses kui ka nälja tingimustes. Kasutatavatest tüvedest tehti DMSO kultuurid, sest need tagavad ühtlasema üleökultuuri. Sellest tulenevalt saadi kultuuride kasvu erinevusi paremini võrrelda. Paralleelselt mõõdeti ka valguekspressiooni, mida jälgiti GFP fluorestsentsi kaudu (joonis 6).



**Joonis 6:** BW25113 (wt) ja BW25113 $\Delta relBE$  ( $\Delta relBE$ ) kasvu ja GFP signaali võrdlus. A: OD mõõdetud aminohapete külluses. B: OD mõõdetud aminohapete näljas. C: GFP fluorestsents mõõdetud aminohapete külluses. D: GFP fluorestsents mõõdetud aminohapete näljas. Igast OD ajapunktist on lahutatud esimese ajapunkti OD väärtus. Bioloogilisi replikaate oli 3, tehnilisi 2. Veajooned näitavad bioloogiliste replikaatide standardhälvet.

Kui bakteritel ei olnud aminohapete nälga, siis kasvasid mõlemad tüved võrdse kiirusega (joonis 6A). Aminohapete nälja korral aga kasvas *relBE* deletant kiiremini (joonis 6B). GFP fluorestsentsi mõõtmisel aminohapete külluses käitusid wt ja *relBE* sarnaselt (joonis 6C) ning aminohapete puuduses sünteesis *ΔrelBE* tüvi rohkem GFP-d (joonis 6D).

Ka varem on sarnast katset tehtud, näiteks Van Meldereni grupp uuris TA süsteemide osa stressivastuses, kus *relBE* süsteem oli üks uuritavatest TA süsteemidest (Tsilibaris jt., 2007). Aminohapete külluses ja aminohapete näljas metsiktüübi ja TA-süsteemi deletandi kasvu võrreldes erinevust ei nähtud, aga antud katsetes erinevus ilmnes. Seekordses katsekorraldus erines Tsilibaris jt. omast mitmel põhjusel. Kasutati aminohappe nälja tekitamiseks seriinhüdroksamaadi asemel mupirotsiini. Baktoreid kasvas Tsilibaris kolvis ja LB söötmes,

samas antud töös valiti MOPS sööde ja mikrotiiterplaat, mis sisestati BioTek Synergy Mx Microplate Reader mikrotiiter plaadilugejasse, et mõõta baktereid kasvamise ajal stabiilselt iga 15 minuti järel. Eelnevast tulenevalt mõõtsid Tsilibaris jt. bakterite kasvu selle järgi mitu pesa moodustavat ühikut milliliitris söötmes oli, siin töös aga mõõdeti bakterite optilist tihedust.

Antud katsete käigus taheti teada, kas toksiinide olemasolu mõjutab GFP tootmist aminohapete näljas. Jälgiti ribonukleaasete toksiinide võimalikku GFP mRNA lõikamist, aga kuna ekspressioon korreleerus väga hästi OD tasemega (seega ka raku kasvu kiirusega), ei saa kindlalt väita, et toksiinid mõjuvad GFP mRNAle (GFP mRNA-d ei analüüsitud). GFP taset mõjutab negatiivselt ka bakterite aeglasem kasv ja GFP taseme langus ei pruugi olla tingitud GFP mRNA degradatsioonist toksiini poolt. Edaspidistes katsetes otsustati GFPd mitte kasutada ja vaadati ainult kasvu.

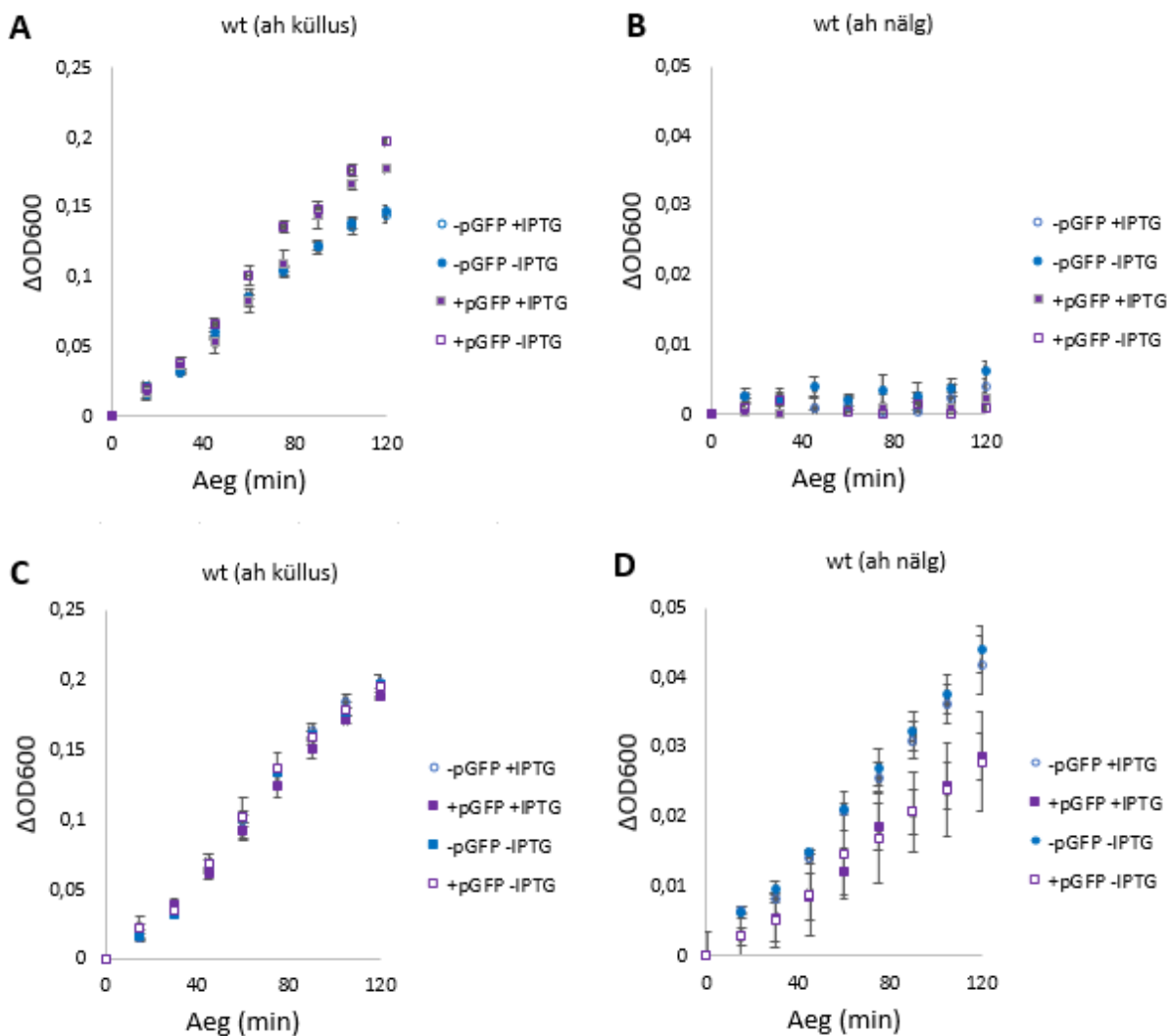
### 2.3.2 Kontrollid GFP ja IPTG mõju kohta

Kontrolliti, kas plasmiid, GFP tootmine ja IPTG mõjutavad bakterite kasvu uues testsüsteemis. Tehti kontrollid nii IPTG kui ka GFP mõju kohta bakterite kasvule (joonis 7). Nii  $\Delta relBE$  kui ka metsiktüvi testiti läbi neljas versioonis:

- 1) pGFP ja IPTG olid olemas,
- 2) pGFPd ega IPTGd ei olnud,
- 3) pGFP oli, aga IPTGd ei olnud,
- 4) pGFPd ei olnud, aga IPTG oli.

Kontrollid näitavad, et IPTG ei mõjuta ühelgi uuritud tingimustest bakterite kasvu. Plasmidi mõju hindamine on keerulisem. Aminohapete külluses kasvavad pGFP plasmiidiga bakterid paremini (joonis 7A). Positiivset mõju on keeruline seletada, aga antud uurimuses ei ole see väike efekt määrav. Ilma aminohapete näljata ei mõjuta pGFP või IPTG lisamine  $\Delta relBE$  kultuuride kasvu (joonis 7C). Metsiktüüpi tüve, mis on kasvanud aminohapete näljas (joonis 7B) ei mõjuta IPTG ega pGFP olemasolu. Vastupidiselt mõjutab aga plasmidi lisamine  $relBE$  deletandi kasvu aminohapete nälja korral negatiivselt (joonis 7D). Negatiivne mõju aminohapete näljas olevale  $\Delta relBE$  tüvele on seletatav võimaliku energeetilise kuluga plasmidi replitseerimisele. Aga kuna 6D joonisel kasvab  $\Delta relBE$  paremini kui metsiküvi, siis plasmidi väikene kasvu pärssiv efekt ei ole mitte selle efekti seletuseks, vaid pigem vähendab

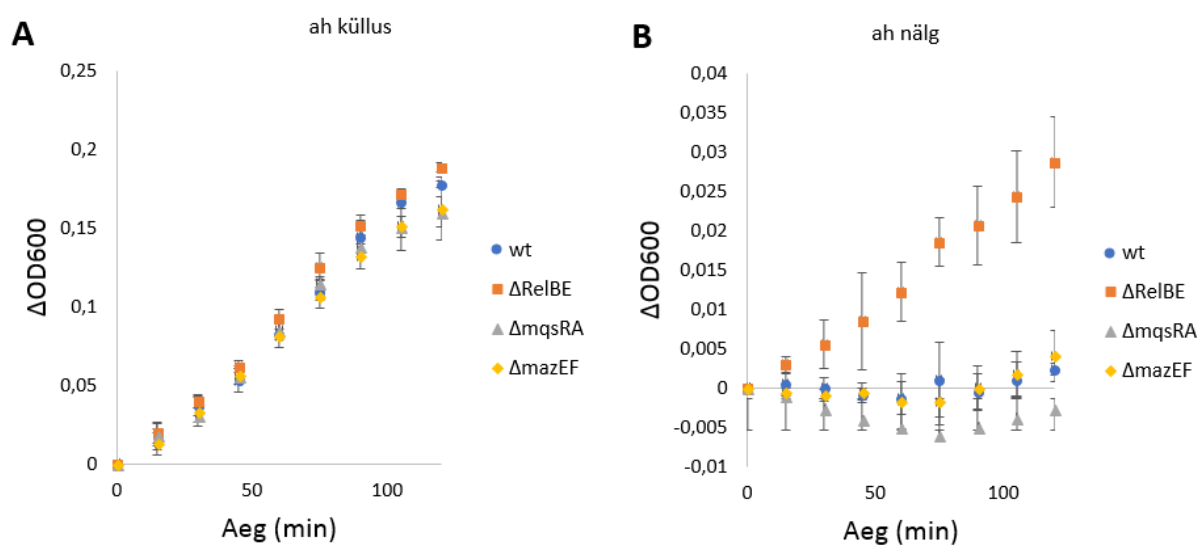
*ΔrelBE* kasvueelisel. Samas võib negatiivne mõju antud töös tuleneda plasmidi antibiootikumi markerist, mitte DNA sünteesil energia kulutamisest, sest plasmid ei kontrolli raku replikatsiooni. Tänu plasmidile oli võimalik katsetele lisada antibiootikumi. Plasmidne antibiootikumi resistentsuse geen teeb antibiootikumi bakteri jaoks kahjutuks, kuid aminohapete näljas on resistentsuse valgu juurde tootmine ka häiritud (mRNA-d lõigatakse ja valku jääb vähemaks) ja bakteri kasvukiirus väiksem.



**Joonis 7:** pGFP ja IPTG mõju bakterite kasvule. Wt tüvi on graafikutel A (aminohapete küllus) ja B (aminohapete nälg). Mõju *ΔrelBE* tüvele on graafikutel C (aminohapete küllus) ja D (aminohapete nälg). + tähistab olemasolu, - puudumist. Igast OD ajapunktist on lahutatud esimese ajapunkti OD väärtus. Bioloogilisi replikaate 3, tehnilisi replikaate 2. Veajooned näitavad bioloogiliste replikaatide standardhälvet.

### 2.3.3 *mqsRA*, *mazEF* deletsioonide mõju raku kasvule

See, et BW25113  $\Delta relBE$  kasvas aminohapete näljas metsiktüübist erinevalt, tekitas küsimuse, kas ka teistel ribonukleasist toksiiniga TA süsteemide deletsioonimutantidel on aminohappe nälja eksperimendi tingimustes sarnane kasvueelis või on see pigem *relBE* süsteemi spetsiifiline. Otsustati testida kahte paremini uuritud toksiooni MazF ja MqsR. Lisaks eelpool mainitud BW25113, BW25113  $\Delta relBE$  tüvedele mõõdeti ka BW25113  $\Delta RelE$ , BW25113  $\Delta mqsRA$  ja BW25113  $\Delta mazEF$  kasvu. (Joonis 8).

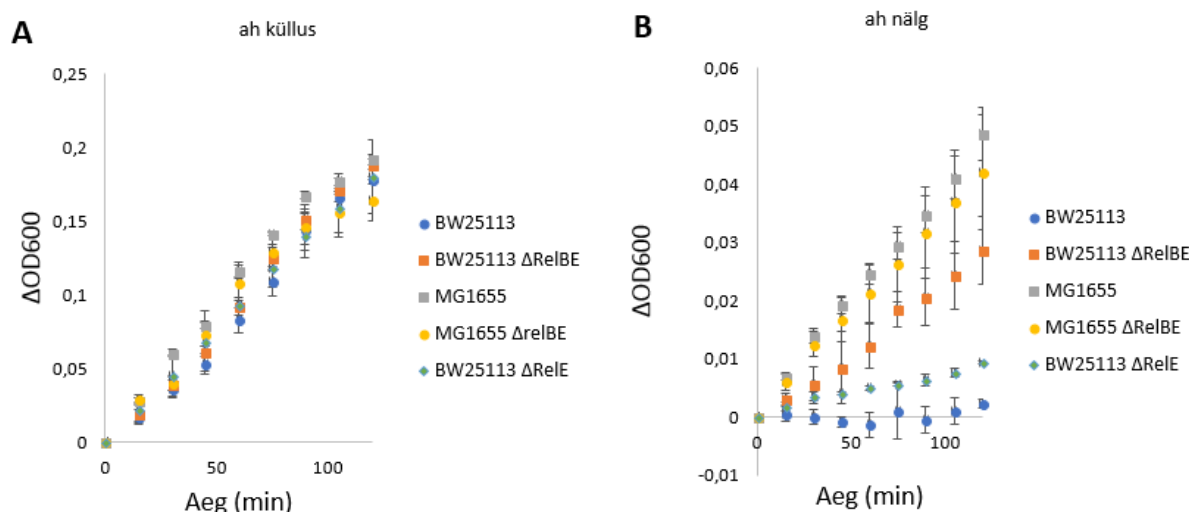


**Joonis 8:** *mqsRA*, *mazEF* ja *RelE* deletsioonide mõju raku kasvule. A: mõõdetud on OD ilma aminohapete näljata. B: mõõdetud on OD aminohapetenälja korral. Igast OD ajapunktist on lahutatud esimese ajapunkti OD väärtus. Kasutatud tüved: BW25113, BW25113  $\Delta relBE$  (bioloogilisi replikaate 3 tehnilisi 2);  $\Delta mqsRA$  (bioloogilisi replikaate 3, tehnilisi 3);  $\Delta mazEF$  (3 bioloogilist replikaati, tehnilisi 5). Veajooned näitavad bioloogiliste replikaatide standardhälvet.

Aminohapete olemasolul kasvasid kõik tüved sarnaselt. Nälja tingimustes langes kõikide tüvede kasvukiirus sama võrra. Antud katsetest tundub, et kasvueelis, mis ilmneb  $\Delta relBE$  tüvel võib olla *relBE* süsteemi spetsiifiline, sest efekt, et  $\Delta relBE$  kasvab aminohapete näljas erinevalt, kordus. Teistel TA süsteemidel ei paista antud eksperimentaalsüsteemis suurt mõju olevat, kuid see võib tuleneda sellest, et testtingimused ei ole sobivad teiste TA süsteemide aktiivsuseks või sellisel viisil tekitatud aminohapete nälj ei aktiveeri neid.

### 2.3.4 *relBE* mõju teisele bakteritüvele

Katseid tehti MG1655 ja MG1655  $\Delta relBE$  tüvesid kasutades, et uurida, kas aminohappe nälja korral on kasv *relBE* süsteemist sõltuv. Kasutades *E. coli* MG1655 ei nähtud aminohapete külluses ja aminohapete näljas olulist kasvuerinevust wt ja  $\Delta relBE$  vahel ja tundub, et Roostalu tüvi sisaldavat mutatsioone, mis sellise fenotüübi annavad. Jääb ka võimalus, et RelB regulatsioon on BW25113 spetsiifiline, aga kuna need tüved on väga sarnased, on see kaheldav. Kõikidele tüvedele ei sobi samad testtingimused. Paremate kasvunäitajate saamiseks võib muuta kasvutingimusi ja vaadata, kas *relBE* süsteem mõjutab baktereid stressitingimustes teistsuguses testsüsteemis.



**Joonis 9:** *relBE* süsteemi mõju teistele *E. coli* tüvedele. A aminohapete küllus. B aminohapete nälg. Igast OD ajapunktist on lahutatud esimese ajapunkti OD väärtus. Kasutatud tüved: BW25113 ja BW25113  $\Delta relBE$ ; MG1655 ja MG1655  $\Delta relBE$ ; BW25113  $\Delta RelE$  (bioloogilisi replikaate 3, tehnilisi 2). Veajooned näitavad bioloogiliste replikaatide standardhälvet.

Kontrolliti ka teist, Keio kollektsioonist saadud, RelE defektset tüve, et välistada spontaansete mutatsioonide tekkevõimalus ja artefakti esinemine. Selgus, et Keio kollektsiooni RelE annab ainult väikese kasvueelise võrreldes Roostalu konstrueeritud *relBE* tüvega. Antud tulemused näitavad, et tegemist ei pruugi olla *relBE* sõltuva kasvuga, vaid Roostalu tüvi võib sisaldada mutatsioone, mis sellise fenotüübi annavad. Sellest erinevusest tulenevalt ei saa hetkel kindlalt väita, et RelE takistab aminohapetenälja tingimustes bakterite kasvu.

## KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli uurida kas *relBE* toksiin-antitoksiin süsteem mõjutab *E. coli* kasvu ja valguekspressiooni aminohapete nälja korral. Kasvu hinnati optilise tiheduse (OD) abil ja valguekspressiooni jälgimiseks mõõdeti rakku viidud GFP plasmidi fluorestsentsi intensiivsust. Kuna nähti ka kasvu erinevust, siis otsustati esialgu testida võimalikku kasvuerinevust ja ei kasutanud GFP-d kui valgusünteesi reporterit.

Aminohapete nälja korral suutis  $\Delta relBE$  edukamalt kasvada kui metsiktüvi. See andis alust eeldada, et TA süsteemid osalevad *E. coli* stressivastuses ning mõjutavad stressi korral bakterite kasvu. Alguses lootust andev fenomen, kus aminohappe näljast tingitud stressi tingimustes TA süsteem *relBE* aktiveerus ja inhibeeris bakterite kasvu, ei leidnud kinnitust teist *E. coli* tüve testides.

Lisaks testiti ka erinevat RelE defektset tüve, kus selgus, et tegemist ei pruugi olla *relBE* sõltuva kasvuerinevusega, vaid esialgne kasutatud tüvi võib sisaldada mutatsioone, mis sellise fenotüübi annavad.

## Effects of the *relBE* toxin-antitoxin system on *E. coli* cells during amino acid starvation

Anett Mäerand

### RESUME

The aim of this work was to analyze whether TA system *relBE* influences the growth and protein expression of *E. coli* when there are not enough amino acids. The growth of the bacteria was analyzed by measuring the optical density (OD) and protein expression was measured using expression of green fluorescent protein (GFP) and analyzing the fluorescence intensity. Because we observed the difference in the bacterial growth rate in addition to GFP changes in one strain, we decided to only analyze the growth and did not measure the protein expression using GFP in the other strains.

*E. coli* BW25113  $\Delta$ *relBE* could grow better than the wild-type BW25113 in amino acid starvation. Thus, we proposed that TA system *relBE* takes part in *E. coli* stress response and inhibits the growth of *E. coli* in amino acid starvation. The inhibiting effect of *relBE* on bacterial growth in the conditions of amino acid starvation was not however confirmed in another *E. coli* strain.

In addition, another *E. coli* strain without antitoxin RelE was tested and no growth difference was noted in amino acid starvation. We are planning to test whether the *E. coli* strain BW25113 used in our experiment might have a additional mutation that leads to the previously noted growth difference.



## KASUTATUD KIRJANDUS

- Aizenman, E., H. Engelberg-Kulka, ja G. Glaser. 1996. "An Escherichia Coli Chromosomal 'Addiction Module' Regulated by Guanosine [Corrected] 3',5'-Bispyrophosphate: A Model for Programmed Bacterial Cell Death." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (12): 6059–63.
- Baba, Tomoya, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A. Datsenko, Masaru Tomita, Barry L. Wanner, ja Hirotada Mori. 2006. "Construction of Escherichia Coli K-12 in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection." *Molecular Systems Biology* 2 (1). <http://msb.embopress.org/content/2/1/2006.0008.abstract>.
- Bernard, Philippe, Katherine E. Kézdy, Laurence Van Melderen, Jan Steyaert, Lode Wyns, Martin L. Pato, Patrick N. Higgins, ja Martine Couturier. 1993. "The F Plasmid CcdB Protein Induces Efficient ATP-Dependent DNA Cleavage by Gyrase." *Journal of Molecular Biology* 234 (3): 534–41. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1609>.
- Blattner, Frederick R., Guy Plunkett, Craig A. Bloch, Nicole T. Perna, Valerie Burland, Monica Riley, Julio Collado-Vides, jt., 1997. "The Complete Genome Sequence of Escherichia Coli K-12." *Science* 277 (5331): 1453–1462.
- Bukowski, Michal, Anna Rojowska, ja Benedykt Wladyka. 2011. "Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems--the Role in Bacterial Physiology and Application in Molecular Biology." *Acta Biochimica Polonica* 58 (1): 1–9.
- Christensen, S. K., M. Mikkelsen, K. Pedersen, ja K. Gerdes. 2001. "RelE, a Global Inhibitor of Translation, Is Activated during Nutritional Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (25): 14328–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.251327898>.
- Gerdes, K, P B Rasmussen, ja S Molin. 1986. "Unique Type of Plasmid Maintenance Function: Postsegregational Killing of Plasmid-Free Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (10): 3116–20.
- Gotfredsen, M., ja K. Gerdes. 1998. "The Escherichia Coli RelBE Genes Belong to a New Toxin-Antitoxin Gene Family." *Molecular Microbiology* 29 (4): 1065–76.
- Haldimann, Andreas, ja Barry L. Wanner. 2001. "Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria." *Journal of Bacteriology* 183 (21): 6384–6393.
- Hall, Alexander MJ, Bridget Gollan, ja Sophie Helaine. 2017. "Toxin-antitoxin Systems: Reversible Toxicity." *Current Opinion in Microbiology* 36 (April): 102–10. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.003>.
- Hanahan, Douglas. 1983. "Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–580.
- Hayes, Christopher S., ja Robert T. Sauer. 2003. "Toxin-Antitoxin Pairs in Bacteria." *Cell* 112 (1): 2–4. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01282-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01282-5).
- Helaine, S., A. M. Cheverton, K. G. Watson, L. M. Faure, S. A. Matthews, ja D. W. Holden. 2014. "Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters." *Science* 343 (6167): 204–8. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>.
- Hurley, Jennifer M., Jonathan W. Cruz, Ming Ouyang, ja Nancy A. Woychik. 2011. "Bacterial Toxin RelE Mediates Frequent Codon-Independent mRNA Cleavage from the 5' End of Coding Regions *in Vivo*." *Journal of Biological Chemistry* 286 (17): 14770–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108969>.
- Jaffé, A., T. Ogura, ja S. Hiraga. 1985. "Effects of the Ccd Function of the F Plasmid on Bacterial Growth." *Journal of Bacteriology* 163 (3): 841–49.
- Jørgensen, Mikkel G., Deo P. Pandey, Milena Jaskolska, ja Kenn Gerdes. 2009. "HicA of Escherichia Coli Defines a Novel Family of Translation-Independent mRNA

- Interferases in Bacteria and Archaea.” *Journal of Bacteriology* 191 (4): 1191–99. <https://doi.org/10.1128/JB.01013-08>.
- Kasari, Villu, Kristi Kurg, Tõnu Margus, Tanel Tenson, ja Niilo Kaldalu. 2010. “The Escherichia Coli MqsR and YgiT Genes Encode a New Toxin-Antitoxin Pair.” *Journal of Bacteriology* 192 (11): 2908–2919.
- Kaspy, Ilana, Eitan Rotem, Noga Weiss, Irine Ronin, Nathalie Q. Balaban, ja Gad Glaser. 2013. “HipA-Mediated Antibiotic Persistence via Phosphorylation of the Glutamyl-TRNA-Synthetase.” *Nature Communications* 4 (December). <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>.
- Kędzierska, Barbara, Lu-Yun Lian, ja Finbarr Hayes. 2007. “Toxin–antitoxin Regulation: Bimodal Interaction of YefM–YoeB with Paired DNA Palindromes Exerts Transcriptional Autorepression.” *Nucleic Acids Research* 35 (1): 325–39. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1028>.
- Magnuson, R. D. 2007. “Hypothetical Functions of Toxin-Antitoxin Systems.” *Journal of Bacteriology* 189 (17): 6089–92. <https://doi.org/10.1128/JB.00958-07>.
- Marianovsky, I., E. Aizenman, H. Engelberg-Kulka, ja G. Glaser. 2001. “The Regulation of the Escherichia Coli MazEF Promoter Involves an Unusual Alternating Palindrome.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 5975–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008832200>.
- Neidhardt, Frederick C., Philip L. Bloch, ja David F. Smith. 1974. “Culture Medium for Enterobacteria.” *Journal of Bacteriology* 119 (3): 736–47.
- Ogura, T., ja S. Hiraga. 1983. “Mini-F Plasmid Genes That Couple Host Cell Division to Plasmid Proliferation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (15): 4784–88.
- Page, Rebecca, ja Wolfgang Peti. 2016. “Toxin-Antitoxin Systems in Bacterial Growth Arrest and Persistence.” *Nature Chemical Biology* 12 (4): 208–14. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>.
- Russell, David W., ja Joseph Sambrook. 2001. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual.” *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York* 1: 112.
- Tian, Qing Bao, Makoto Ohnishi, Takahiro Murata, Keisuke Nakayama, Yoshiro Terawaki, ja Tetsuya Hayashi. 2001. “Specific Protein–DNA and Protein–Protein Interaction in the Hig Gene System, a Plasmid-Borne Proteic Killer Gene System of Plasmid Rts1.” *Plasmid* 45 (2): 63–74. <https://doi.org/10.1006/plas.2000.1506>.
- Tosa, T., ja L. I. Pizer. 1971. “Biochemical Bases for the Antimetabolite Action of L-Serine Hydroxamate.” *Journal of Bacteriology* 106 (3): 972–82.
- Tsilibaris, V., G. Maenhaut-Michel, N. Mine, ja L. Van Melderen. 2007. “What Is the Benefit to Escherichia Coli of Having Multiple Toxin-Antitoxin Systems in Its Genome?” *Journal of Bacteriology* 189 (17): 6101–8. <https://doi.org/10.1128/JB.00527-07>.
- Unterholzner, Simon J, Brigitte Poppenberger, ja Wilfried Rozhon. 2013. “Toxin–antitoxin Systems: Biology, Identification, and Application.” *Mobile Genetic Elements* 3 (5): e26219. <https://doi.org/10.4161/mge.26219>.
- Van Melderen, Laurence, ja Manuel Saavedra De Bast. 2009. “Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities?” Edited by Susan M. Rosenberg. *PLoS Genetics* 5 (3): e1000437. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000437>.
- Wang, Xiaoxue, Dana M. Lord, Seok Hoon Hong, Wolfgang Peti, Michael J. Benedik, Rebecca Page, ja Thomas K. Wood. 2013. “Type II Toxin/Antitoxin MqsR/MqsA Controls Type V Toxin/Antitoxin GhoT/GhoS.” *Environmental Microbiology* 15 (6): 1734–44. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12063>.
- Wozniak, Rachel A. F., ja Matthew K. Waldor. 2009. “A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element.” Edited by Josep Casadesús. *PLoS Genetics* 5 (3): e1000439. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000439>.

- Yamaguchi, Yoshihiro, ja Masayori Inouye. 2009. "Chapter 12 MRNA Interferases, Sequence-Specific Endoribonucleases from the Toxin–Antitoxin Systems." In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 85:467–500. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)00812-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)00812-X).
- Yamaguchi, Yoshihiro, Jung-Ho Park, ja Masayori Inouye. 2011. "Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea." *Annual Review of Genetics* 45 (1): 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132412>.
- Zhang, Yonglong, Junjie Zhang, Hiroto Hara, Ikunoshin Kato, ja Masayori Inouye. 2005. "Insights into the MRNA Cleavage Mechanism by MazF, an MRNA Interferase." *Journal of Biological Chemistry* 280 (5): 3143–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411811200>.

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

Drugbank. 2018. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00410> (08.05.2018)

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

Mina Anett Mäerand (sünnikuupäev: 27.09.1995) annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

### **Toksiin-antitoksiin süsteem relBE mõju E. coli rakkudele aminohappe nälja tingimustes,**

mille juhendajad on Toomas Mets ja Niilo Kaldalu.

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

Tartus, 28.mai 2018