

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

***Pseudomonas putida* GraA antitoksiini lagundava proteaasi otsingul**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Nils Joonas Kristian Saar

Juhendajad MSc Andres Ainelo

PhD Rita Hõrak

TARTU 2017

## Infoleht

### ***Pseudomonas putida* GraA antitoksiini lagundava proteaasi otsinguil**

Toksiin-antitoksiin süsteemid on bakterites laialt levinud kahekomponendilised moodulid, mida seostatakse üldise stressivastuse regulatsiooni, faagivastase kaitse ja biofilmi moodustamisega. Toksiin-antitoksiin süsteemid mõjutavad raku kasvu toksiini aktiivsuse vahendusel. Normaalse kasvu juures on toksiin seotud temale vastava antitoksiiniga ja toksiini aktiivsus on seeläbi neutraliseeritud. Üks *Pseudomonas putida* toksiin-antitoksiin süsteemidest on GraTA, kus GraA on antitoksiin ja GraT on toksiin. GraT aktiveerimiseks lagundatakse GraA toksiin-antitoksiin süsteemidele ebatavaliselt endoproteolüütiliselt. Käesolevas töös otsisin transposoonmutageneesiga geeni, mis kodeerib GraA-d lagundavat proteaasi. Kuna mul ei õnnestunud ühtegi sellist geeni identifitseerida, viitab see, et GraA-d lagundav proteaas on rakule elutähtis. Siiski õnnestus uudsete leidudena identifitseerida GacS/GacA süsteemi ja energiametabolismi seosed GraTA regulatsiooniga.

Märksõnad: toksiin-antitoksiin süsteem, stressivastus, GraTA, *Pseudomonas putida*.

CERCS: B220 – geneetika, tsütogeneetika

B230 - mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Searching for the *Pseudomonas putida* GraA antitoxin degrading protease**

Toxin-antitoxin systems are widely spread molecular mechanisms in bacteria which are associated with stress response regulation, protection from bacteriophages and biofilm formation. Toxin-antitoxin systems work by influencing cellular growth through the activity of the toxin molecule. At normal growth conditions the toxin is coupled with the complementary antitoxin to neutralise its activity. One of the toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* is named GraTA, where GraT is the toxin and GraA the antitoxin. To activate GraT, one must degrade the GraA antitoxin – unusually for antitoxins, the degradation of GraA is endoproteolytic. The aim of this thesis was to find a gene responsible for GraA degradation by using transposon mutagenesis. Unfortunately, as I did not manage to identify the protease gene responsible for GraA degradation, the protease of interest seems to be essential for *P. putida*. Nevertheless, I managed to find a novel connection between the GacS/GacA system, the electron transport chain and the GraTA system.

Keywords: toxin-antitoxin system, stress-response, GraTA, *Pseudomonas putida*.

CERCS: B220 - Genetics, cytogenetics

B230 - Microbiology, bacteriology, virology, mycology

## Sisukord

Infoleht .....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid.....	7
1.2 Tüüp II TA süsteemid.....	8
1.3 Kromosomaalsed TA süsteemid.....	9
1.4 Antitoksiinide lagundamine ja TA süsteemide aktiveerumine.....	11
1.5 <i>Pseudomonas putida</i> GraTA süsteem .....	13
2. Eksperimentaalne osa .....	17
2.1 Töö eesmärk .....	17
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed.....	18
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) .....	19
2.2.3 Arb-PCR .....	20
2.2.4 Geelelektroforees .....	20
2.2.5 DNA sekveneerimine .....	21
2.2.6 DNA sekvenside analüüs .....	21
2.2.7 Bakterite elektroporatsioon.....	21
2.2.8 Transposoonmutagenees .....	22
3. Tulemused .....	23
4. Arutelu.....	25

Kokkuvõte .....	28
Summary.....	30
Tänuõnad.....	32
Kirjanduse loetelu.....	33
Kasutatud veebiaadressid .....	37

## Kasutatud lühendid

IPTG	<b>I</b> sopropüül- <b>β</b> - <b>tio</b> -galaktopüranosiid
TA-süsteemid	<b>t</b> oksiin- <b>a</b> ntitoksiin süsteemid
Arb-PCR	<i><b>A</b>rb</i> itrarily primed <i><b>P</b>CR</i> – kōdupraimeritega polümeraasi ahelreaktsioon
GraA	<i><b>G</b>rowth rate affecting <b>a</b>ntitoxin</i> – raku kasvukiirust mõjutav antitoksiin
GraT	<i><b>G</b>rowth rate affecting <b>t</b>oxin</i> – raku kasvukiirust mõjutav toksiin

## Sissejuhatus

Baktereid leidub kõikjal meie ümber ja meie sees: ühes grammis mullas võib bakterirakke olla miljonist kuni kahe miljardini (Whitman jt., 1998). Elu mullas tähendab seega elu pidevas konkurentsisis ja vajadust taluda mitmeid erinevaid stressitingimusi. Viimastel aastatel on palju diskuteeritud, et ühe stressivastase mehhanismina toimivad paljudes bakterites esinevad toksiin-antitoksiin (TA) süsteemid.

TA süsteemid avastati esmalt plasmiidide koosseisust (Ogura ja Hiraga, 1983), kuid praeguseks on avastatud, et neid leidub paljude koopiadena pea kõikides bakterigenoomides. Hoolimata sagedasest esinemisest ei ole nende tähtsus bakterile siiani päris selge. Plasmiidsete süsteemide rolli on lihtsam põhjendada: tegemist on plasmiididele konkurentsieelist tagavate süsteemidega, kus surmatakse tütarakk, kellesse TA-süsteemi kandvat plasmidi ei pärandunud. Kromosomaalseid TA süsteeme on seostatud mitmete ülesannetega: üldise stressivastuse regulatsiooniga, faagivastase kaitsega, genoomsete mobiilsete elementide stabiliseerimisega ja biofilmi regulatsiooniga (Gerdes jt., 2005, Wang ja Wood, 2011, Samson jt., 2013), kuid nende täpne funktsioon on jäänud tänaseni ebaselgeks.

*Pseudomonas putidas* leiduv GraTA süsteem koosneb kahest valgust ja tavaolekus on GraT toksiin antitoksiini GraA poolt neutraliseeritud (Tamman jt., 2014). GraA sarnaneb struktuuri poolest antitoksiinile HigA ning GraTA süsteem kuulub HigBA perekonna TA süsteemide sekka. Genoomsed TA süsteemid aktiveeruvad, kui proteaasid lagundavad rakust antitoksiine. Me ei tea täpselt, millised proteaasid vastutavad GraA ja HigA lagundamise eest, kuid me teame, et GraA puhul on tõenäoliselt tegemist endoproteaasiga ja mitte Lon või Clp proteaasidega (Tamman jt., 2016), mis tüüpiliselt antitoksiine lagundavad (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013). Selle proteaasi tuvastamine on oluline tema suure tähtsuse pärast GraTA süsteemi aktivatsioonil ning kui me seda proteaasi teaksime, saaksime me uurida, millised tingimused seda aktiveerida võiksid.

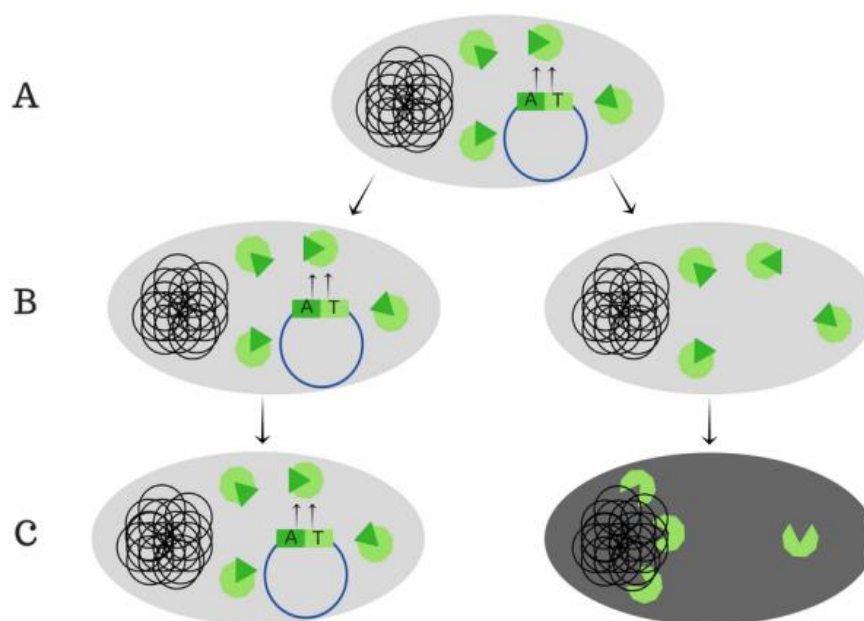
Käesoleva töö kirjanduse ülevaate osas käsitlen TA süsteeme üldisemalt ja kirjeldan GraTA süsteemi. Praktilise töö eesmärk on leida GraA lagundamise eest vastutav proteaas.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid

Toksiin-antitoksiin (TA) süsteemid on bakterite maailmas laialt levinud ja koosnevad, nagu nimigi viitab, kahest komponendist: toksiinist ja antitoksiinist. Toksiin on rakule toksiline, kuid kuna tavaliselt on rakus ka antitoksiin, mis toksiini mõju neutraliseerib, on TA süsteemid bakterirakus inaktiveeritud (Jensen ja Gerdes, 1995, Yamaguchi ja Inouye, 2009, Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013).

TA süsteemid avastati algselt plasmiidide koosseisus (Van Melder ja De Bast, 2009). Plasmiidis paiknevate TA süsteemide roll on plasmidi stabiliseerimine, sest toksiin surmab või inhibeerib nende tütarakkude kasvu, kellesse ei ole jagunemisel plasmidi pärandunud. Antitoksiin laguneb rakus kiiremini kui toksiin ning kui tütarakku plasmidi ei pärandu, siis ei toodeta rakus juurde antitoksiini, mis toksiini inaktiveeriks (Ogura ja Hiraga, 1983) (joonis 1).



**Joonis 1:** TA süsteemi roll plasmidi säilitamisel bakteripopulatsioonis. (A) Vanemrakk, mis sisaldab TA süsteemi kandvat plasmidi; (B) Ebahühtlase plasmiidide jagunemise korral jäävad tütarakkudesse nii toksiin kui ka antitoksiin, kuid plasmiidita rakus neid enam juurde ei toodeta (C) Antitoksiin laguneb rakus kiiremini kui toksiin ning toksiin muutub plasmidi mitte pärinud rakkudes aktiivseks, inhibeerides või surmates need. Sellest tulenevalt saavad populatsioonis ülekaalu tütarakud, kes pärisid TA süsteemi kandva plasmidi (kohandatud (Goeders ja Van Melder, 2014) järgi)

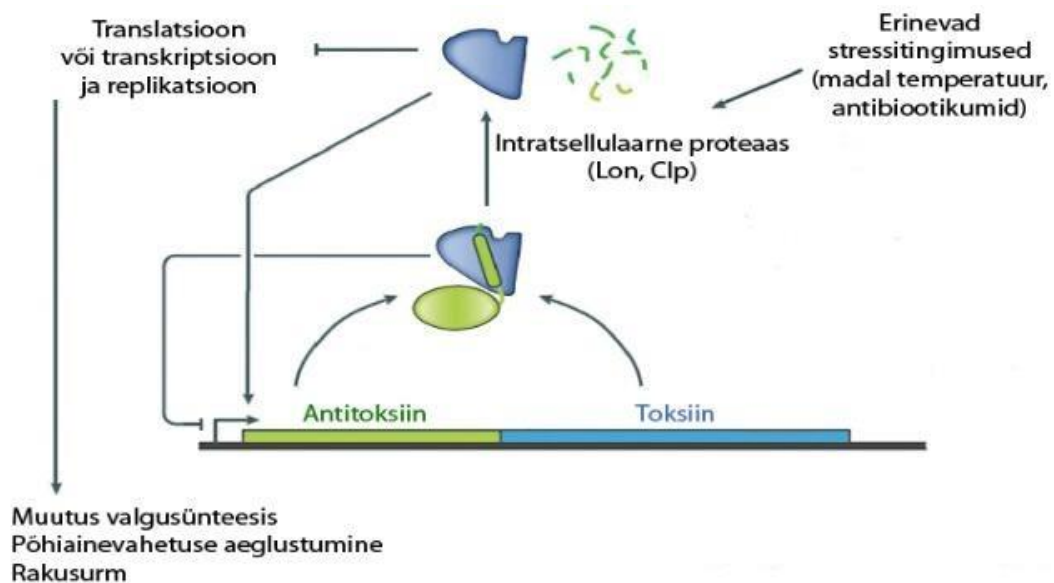
Näitena võib tuua *E. coli*-s esineva F plasmidi *ccd* (*control of cell death*) lookuse, mis sisaldab gene *ccdA* ja *ccdB*. Need geenid kodeervad CcdA antitoksiini ja CcdB toksiini, mille poolestusajad on vastavalt 1h ja enam kui 2h (Van Melder, 2010). Kui tütarrakku TA süsteemi kandvat F-plasmiid ei pärandu ja ebastabiilne CcdA antitoksiin lagundatakse, siis jääb rakk pikema elueaga CcdB toksiini meelevalda. CcdB toksilisus väljendub DNA-güraasi komplekside ründamises, seondudes güraasiga ja indutseerides DNA-s ATP-sõltuvalt katkete tegemise, mis peatab replikatsiooni (Bernard jt., 1993).

## 1.2 Tüüp II TA süsteemid

TA süsteemid jagatakse antitoksiini olemuse ja toimemehhanismi alusel 6 gruppi (Page ja Peti, 2016). Mina keskendun oma bakalaureusetöös ennekõike tüüp II süsteemidele, mis avastati 1980-tel ja on bakterite seas laialt levinud (Pandey ja Gerdes, 2005, Guglielmini jt., 2008, Ramage jt., 2009). Neile süsteemidele on omased valgulised antitoksiin ja toksiin ning toksiini aktiivsust inhibeerib seondumine antitoksiiniga (Gerdes ja Maisonneuve, 2012).

Tüüp II TA süsteemidel on mitmeid sarnaseid jooni: (i) toksiin ja antitoksiin paiknevad genoomis operonina, mida kontrollib ühine promootorala (**Joonis 2**); (ii) antitoksiin ja/või TA kompleks toimib operoni autorepressorina; (iii) toksiin on alati antitoksiinist stabiilsem (Gerdes ja Maisonneuve, 2012).

Tüüp II süsteemide operonis on antitoksiini geen tavaliselt esimene ja sellele järgneb toksiini geen (**Joonis 2**). Arvatakse, et selline järjekord tagab antitoksiini tootmise suuremas hulgas kui toksiini (Pandey ja Gerdes, 2005). Vastupidine geenide järjekord esineb aga näiteks HigBA süsteemil, kus saavutatakse antitoksiini suurem tootmine lisapromootoriga *higA* antitoksiini geeni ees (Tian jt., 1996).



**Joonis 2:** Tüüp II TA süsteem. Toksiini ja antitoksiini geenid paiknevad genoomis kõrvuti, asudes samas operonis. Tavatingimustel moodustavad toksiini ja antitoksiini valgud stabiilse kompleksi. Stressitingimustes lagundatakse antitoksiin Lon või Clp proteaaside poolt ning toksiin muutub aktiivseks, inhibeerides transkriptsiooni, replikatsiooni või translatsiooni. See aeglustab raku kasvu või surmab raku (kohandatud (Garcia-Pino jt., 2010) järgi)

### 1.3 Kromosomaalsed TA süsteemid

Lisaks plasmiididele leidub TA süsteeme ka bakterite kromosoomides. Näiteks on *E. coli* genoomist leitud vähemalt 33 TA süsteemi ning *Mycobacterium tuberculosis*-e genoomist enam kui 60 TA süsteemi (Yamaguchi jt., 2011). Kromosomaalsete TA süsteemide sagedasus on viinud teadusliku aruteluni TA süsteemide mitmekesisuse ja funktsionaalsuse üle prokarüootides, kuid tänaseni ei ole nende süsteemide roll bakteri elus üheselt selge (Van Melder, 2010, Chan jt., 2016). Sellegipoolest on kromosomaalsetele TA süsteemidele omistatud mitmeid olulisi funktsioone, millest annan järgnevalt põgusa ülevaate.

Bakterid võivad moodustada ekstratsellulaarsest DNA-st, valkudest ja polüsahhariididest koosnevat maatriksist ümbritsetud kooslusi ehk biofilmi, mis võimaldab keskkonnatingimustega paremini kohaneda. Arvatakse, et TA süsteemid võivad osaleda biofilmi moodustamise regulatsioonis (Wang ja Wood, 2011). Nimelt mõjutavad mõned TA süsteemid *E. coli*-s (näiteks MqsRA, RelBE, ChpB, MazEF) bakteri piilide ekspressiooni (Kim jt., 2009, Soo ja Wood, 2013), kontrollides sellega bakteri mobiilsust ja biofilmi moodustamise võimet.

Lisaks viitavad hiljutised leiud ka TA süsteemide suurele tähtsusele faagivastases kaitses (Samson jt., 2013). Kui bakterirakk nakatub bakteriofaagiga, käivitatakse raku mitmed stressivastused. Näitena võib tuua *E. coli* RnIAB süsteemi, kus faagiga nakatumise korral lagundatakse RnIB antitoksiin ja aktiveeritakse RnIA toksiin, mis viib faagi mRNA lagundamiseni (Koga jt., 2011). Faagidel on omakorda süsteemid, millega toksiinide toimest kõrvale hiilida. Näiteks T4 faag kodeerib RnIA-ga seonduvat antitoksiini Dmd, mis võimaldab vältida faagi mRNA lagundamist (Otsuka ja Yonesaki, 2012).

Vastusena stressitingimustele aeglustub bakterite kasv ning arvatakse, et TA süsteemid osalevad bakterite kasvukiiruse kontrollimisel. Mõnikord on toksiini mõju nii tugev, et raku kasv peatub täielikult (Pedersen jt., 2002). Raku kasvu peatamist toksiinide abil on seostatud persistorrakkude tekkega. Persistorrakud on metaboolselt inaktiivsed bakterid, kes jäävad pärast antibiootikumidega töötlemist ellu, säilitades raku populatsiooni taastudes samasuguse tundlikkuse antibiootikumide suhtes nagu algne tüvi. Persistorrakud panustavad suurel määral antibiootikumikuurijärgsele tagasilangusele (Aldeyab jt., 2014) ning selle probleemi lahendamiseks on TA süsteemide ja persistorrakkude seoseid põhjalikult uuritud (Dörr jt., 2010, Page ja Peti, 2016). Samas tuleb rõhutada, et paljud tulemused on vastuolulised ja TA süsteemide roll persistorite regulatsioonis pole kaugeltki selge.

TA süsteeme seostatakse persistoritega suuresti Kenn Gerdesi grupi tööde tõttu, kus võrreldi üksikute TA süsteemide deletsioonide mõju mitme TA süsteemi deleteerimisel esineva kumulatiivse mõjuga (Maisonneuve jt., 2011). Üksiku TA loomuse deletsioon *E. coli*-s ei muutnud antibiootikumitundete persistorrakkude hulka, kuid deleteerides 10 endoribonukleaasid TA süsteemi, mille toksiinid lagundavad mRNA-sid, vähenes persistorrakkude moodustamine ligi 200-kordselt. Lisaks leidsid autorid, et persistorrakkude moodustamine sõltub guanosiin-tetrafosfaadist (ppGpp), mis inhibeerib polüfosfaadi (polyP) lagundamist, mis seejärel omakorda saab seonduda Lon proteaasile ja seega suunata selle antitoksiini lagundama (Maisonneuve jt., 2013). Kahjuks lähevad need tulemused otsesesse vastuollu sama töögrupi varem avaldatud andmetega (Christensen jt., 2001, Christensen ja Gerdes, 2003), kus nad tõestasid, et RelB ja MazE antitoksiinide lagundamine sõltub Lon proteaasist, kuid ei sõltu ppGpp-st ja polyP-st. Neid lahkkelisid ei ole hilisemates artiklites arutatud. Hiljuti näitasid Ramisetty ja kaasautorid, et kümne TA süsteemi deletsiooniga bakter on madalama kohasuse ja suurenenud antibiootikumitundlikkusega kui algne *E. coli* tüvi, mistõttu võib selle tüvega tehtud katsetest persistorrakkude moodustamise hulga kohta järelduste tegemine olla eksitav (Ramisetty jt., 2016). Lisaks võib teiste samal teemal kirjutatud artiklite põhjal järeldada, et ppGpp ja endoribonukleaasid toksiinid ei oma persistorrakkude moodustamisel nii tähtsat rolli nagu eelnevalt arvatud (Lioy jt., 2012, Wood

ja Wood, 2016). Näiteks on ühe olulise molekulaarse mehhanismina näidatud erinevate ATP kontsentratsioonide mõju persistorakkude moodustamisele läbi antibiootikumide märklaudade aktiivsuse vähendamise rakus (Shan jt., 2017).

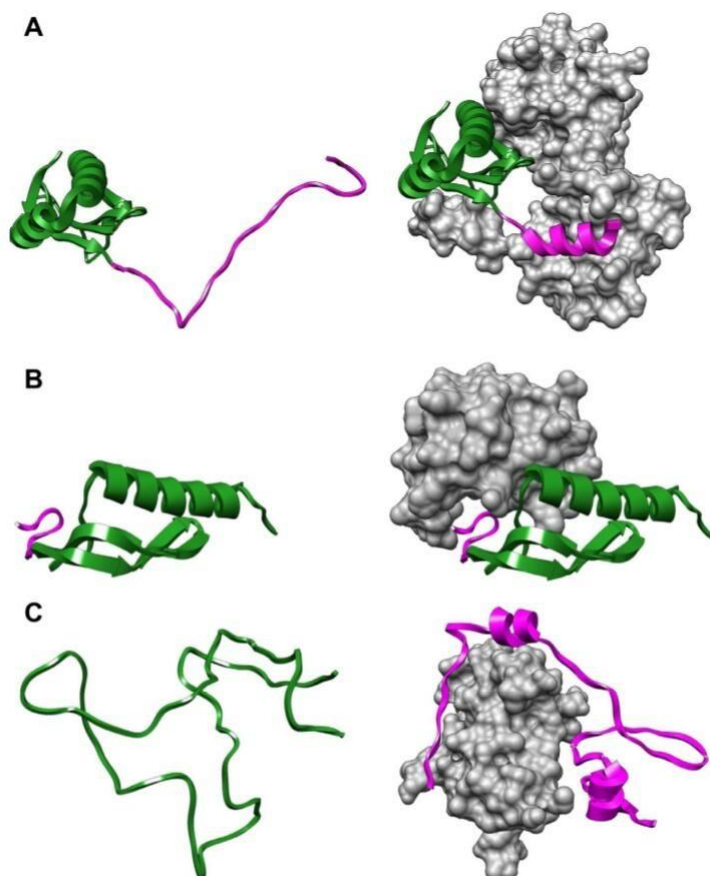
TA süsteemide efekti persistorite hulgal on näidatud siiski ka teistes bakterites nagu näiteks *Salmonella Typhimuriumis*, kus analüüsiti 14 erinevat TA süsteemide üksikdeletanti ja nähti, et üksikute TA süsteemide puudumisel on luuüdi makrofaagide bakteripopulatsiooni persistorite hulk 40 kuni 90% madalam kui loodusliku tüve puhul (Helaine jt., 2014).

#### **1.4 Antitoksiinide lagundamine ja TA süsteemide aktiveerumine**

Antitoksiinid on tavaliselt väga ebastabiilsed valgud ning nende poolestusaeg on umbes 15 minutit (Ning jt., 2011, Hansen jt., 2012), mille tõttu on toksiini neutraliseerimiseks vaja pidevalt antitoksiine juurde toota. Antitoksiinis on tavaliselt eristatavad kaks funktsionaalset domääni: N-terminaalne domään vastutab DNA-ga seondumise ja C-terminus toksiiniga seondumise eest, nii on see näiteks valkude Phd ja RelB-3 puhul (Gerdes jt., 2005, Garcia-Pino jt., 2010). Tüüp II TA süsteemide antitoksiinidele on omased tavaolekus voltumata domäänid (Yamaguchi jt., 2011) ja väljaulatuvad polüpeptiidahela fragmendid, mis tavaliselt on valgu sees peidus (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013). Nende omaduste tõttu on antitoksiinid hästi struktureeritud toksiinimolekulidega võrreldes ebastabiilsed ja sobivaks substraadiks proteaasidele (Gazit ja Sauer, 1999, Yamaguchi ja Inouye, 2009). Tavaliselt algab valkude lagundamine valgu sekundaarstruktuuri lahti harutamiseega (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013). Lisaks on antitoksiinid tihti väga happelised, mis koos mitteorganiseeritud struktuuriga võimaldab konformatsioonilisi muutusi C-terminuses või kogunisti terves antitoksiinis, et toksiiniga tugevalt seonduda (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013).

TA komplekside moodustamine võib antitoksiini kaitsta kolmel viisil: (i) antitoksiini C-terminuse konformatsioon muutub ning proteaasid ei saa seda enam lagundada (joonis 3 A). Näiteks on MazE antitoksiin vabas olekus suuresti mittestruktureeritud ja tõenäoliselt seetõttu proteaaside poolt kergesti lagundatav (Loris jt., 2003). Mittestruktureeritud MazE C-terminuse seondumisel MazF toksiiniga suureneb MazE stabiilsus (Kamada jt., 2003); (ii) toksiiniga seondudes varjab toksiin antitoksiini ebastabiilse osa (joonis 3 B). Näiteks on HipB antitoksiini C-terminus vabas olekus mittestruktureeritud ja paindub (Schumacher jt., 2009), mis on kriitilise tähtsusega HipB proteolüütilisel lagundamisel Lon proteaasiga (Hansen jt., 2012). Erinevalt mitmetest teistest antitoksiinidest ei omanda HipB C-terminus HipA toksiiniga seondudes korrastatud struktuuri (Schumacher jt., 2009) vaid HipA katab HipB C-

terminuse, blokeerides Lon proteaasi juurdepääsu (Brzowska ja Zielenkiewicz, 2013); (iii) toksiiniga seondudes omandab mittestruktureeritud antitoksiin korrapärase struktuuri, mis kaitseb teda proteolüüsi eest (joonis 3 C). Oletatakse, et arhe *Pyrococcus horikoshii* RelB antitoksiin on vabas olekus mittestruktureeritud ja omandab temale vastava toksiiniga seondudes helikaalse struktuuri (Takagi jt., 2005).



**Joonis 3.** Antitoksiini struktuuri muutumine toksiiniga seandumisel. Antitoksiinid on esitatud joonistatud kujul (rohelised), toksiinid molekulaarse pinnana (hall). Antitoksiinide osad, mis on olulised käsitletud struktuursete muudatuste esitlemiseks, on värvitud roosaks (A) Mittestruktureeritud C-terminus omandab korrastatud struktuuri, (B) mittestruktureeritud C-terminus jääb mittestruktureerituks, kuid varjatakse proteaaside eest toksiini poolt, (C) mittestruktureeritud antitoksiin omandab korrastatud struktuuri (kohandatud (Brzowska ja Zielenkiewicz, 2013) järgi).

Antitoksiinide lagundamise initsieerivad erinevad stressitingimused, nagu näiteks toitainetevaegus, erinevad antibiootikumid, rünnak bakteriofaagide poolt või oksüdatiivne stress (Ramage jt., 2009, Christensen-Dalsgaard jt., 2010, Otsuka ja Yonesaki, 2012). Tavaliselt lagundatakse antitoksiin kas Lon või ClpP proteaaside poolt (Brzowska ja Zielenkiewicz, 2013). *E. coli*-s on TA süsteemide proteolüütilist regulatsiooni põhjalikult uuritud ning kokku on leitud 16 TA süsteemi, kus antitoksiini lagundab Lon proteaas ja 8

mille puhul Clp proteaas (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013). CcdA antitoksiini lagundavad lisaks Lon proteaasile ka TldD ja TldE proteaasid (Allali jt., 2002). Lon ja Clp proteaasid aktiveeritakse alarmooni (p)ppGpp poolt, mille tase tõuseb rakus stressitingimustes (Germain jt., 2015). (p)ppGpp tootmist kontrollitakse rakus kahe ensüümiga: RelA aktiveerub ja sünteesib (p)ppGpp-d vastusena aminohappenäljale (Hauryliuk jt., 2015) ja SpoT arvatakse olevat olulisem mitmete teiste stressitingimuste, näiteks süsiniku, raua või rasvhapete näljaga toime tulemiseks (Xiao jt., 1991, Vinella jt., 2005). Lisaks aktiveeruvad mitmed tüüp II TA süsteemid SOS vastuse korral, näiteks MazEF (Christensen-Dalsgaard jt., 2010) ja kokkupuutel mitmete antibiootikumidega, näiteks HigBA, HicAB ja RelBE (Kohanski jt., 2007, Christensen-Dalsgaard jt., 2010).

Aktiivsed proteaasid lagundavad antitoksiini, kuid kui proteaaside aktiivsus väheneb, siis taastatakse antitoksiini kogus toksiini inhibeerimiseks vaja mineva tasemeni (Loris ja Garcia-Pino, 2014). Antitoksiinid on DNA-ga seonduvad valgud ja nii antitoksiin üksi kui ka paljudel juhtudel toksiin-antitoksiin kompleks pärsivad TA süsteemi operoni ekspressiooni (Overgaard jt., 2008). Paljude TA süsteemide regulatsioonis võib toksiin, sõltuvalt tema hulgast antitoksiini suhtes, toimida kas transkriptsiooni korepressorina (kui toksiini on vähem või võrdselt antitoksiiniga) või ka derepressorina (kui toksiini on antitoksiini suhtes ülehulgas) (Gerdes jt., 2005).

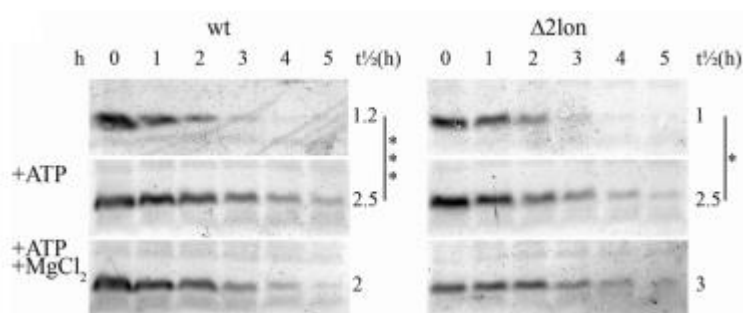
## 1.5 *Pseudomonas putida* GraTA süsteem

TA süsteemide arv varieerub perekonnas *Pseudomonas* neljast *P. aeruginosa* PAO1-s 19-ni *P. syringae* pv. tomato DC3000-s (Makarova jt., 2009, Shao jt., 2011). *P. putida* KT2440 genoomist on erinevate uuringute järgi leitud 8 (Pandey ja Gerdes, 2005), 12 (Makarova jt., 2009) või lausa 15 TA süsteemi (Shao jt., 2011). Perekonna *Pseudomonas* esindajad elavad väga erinevates keskkondades: *P. aeruginosa* on inimpatogeen, *P. putida* elab mullas ja *P. syringae* on taimepatogeen. *P. putida* mitmekülgne metabolism võimaldab tal kasvada mitmesugustes stressitingimustes ja lagundada toksilisi aineid, mistõttu arvatakse, et teda on võimalik kasutada bioremediatsiooniks (Belda jt., 2016).

Meie laboris uuritav GraTA süsteem sai oma nime sõnadest *growth rate affecting* (kasvukiirust mõjutav) (Tamman jt., 2014). GraA ja GraT valkudega kõige sarnasemad varem uuritud valgud on *Vibrio cholerae* HigBA süsteemi valgud (Budde jt., 2007), millede järjestused on identsed vastavalt 38% ja 37% ulatuses (Tamman jt., 2014) ning seetõttu arvatakse GraTA süsteem HigBA perekonna toksiin-antitoksiin süsteemide hulka. Erinevalt paljudest teistest varem kirjeldatud toksiinidest on GraT mõju raku kasvule tagasihoidlik ning

GraA deleteerimine *P. putida* genoomist ei oma optimaalsetel kasvutingimustel (30 kraadi) nähtavat efekti (Tamman jt., 2014). Samas on GraT temperatuuritundlik toksiin, mille mõju avaldub enam madalal temperatuuril. Lisaks raku kasvukiiruse mõjutamisele suurendab GraT membraani läbilaskvust, muutes raku mõnede kemikaalidele tundlikumaks (nt. NaCl ja parakvaat). Teisalt aga suurendab GraT tolerantsust mitmete teiste antibiootikumide suhtes nagu näiteks streptomütsiin, kanamütsiin ja tsiproflaksiin (Tamman jt., 2014). GraTA süsteem on paljudes *Pseudomonas*-e liikides konserveerunud.

GraA on ebatavaliselt stabiilne antitoksiin, mis on ilmselt seletatav sellega, et ta on hästi struktureeritud valk (Tamman, 2016). GraA lagunemist on mõõdetud erinevates kasvufaasides ja kõige kiirem on antitoksiini lagunemine üleminekul logaritmilisest kasvufaasist statsionaarsesse kasvufaasi – poolestusaeg ligikaudu 1h (joonis 4). Varajases logaritmilises kasvufaasis on GraA poolestusaeg ligi 4h ja 25h vanuste rakkude lüsaadis ei ole antitoksiini lagundamine enam tuvastatav (Tamman jt., 2016).

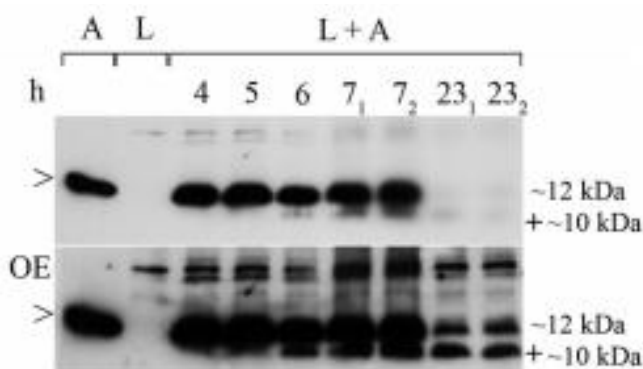


**Joonis 4:** GraA stabiilsuse immunoblot analüüs *P. putida* algse tüve ja Lon proteaaside suhtes defektse tüve rakulüsaadis. Antitoksiin tuvastati GraA-vastase antikehaga. Piltide kohal olevad numbrid tähistavad reaktsiooniaegu tundides ja paremal olevad numbrid tähistavad GraA poolestusaegu ( $t_{1/2}$ ). Kahel alumisel reaktsioonil on lisatud vastavalt ATP või ATP koos  $MgCl_2$ -ga, juhuks kui antitoksiini lagundav proteaas neid vajab (Tamman jt., 2016).

GraA-le kõige sarnasema antitoksiini HigA lagundamist läbi viivat proteaasi ei ole otseselt valgu tasemel tõestatud (Brzowska ja Zielenkiewicz, 2013), ent kaudselt on näidatud Lon ja väikesel määral ka Clp proteaaside seotust *E. coli* HigA lagundamisega (Christensen-Dalsgaard jt., 2010). Kuna Lon ja Clp proteaasid on seotud ka väga mitmete teiste antitoksiinide lagundamisega, on nende osalust GraA lagundamises kontrollitud ka meie laboris. *P. putida* genoomis on kaks Lon proteaasi kodeerivat geeni PP1443 (*lon1*) ja PP 2302 (*lon2*) ning üks Clp kodeeriv geen PP2300. Nimetatud geenide deleteerimisel ei muutunud antitoksiini lagundamise kiirus (joonis 4, esitatud vaid *lon*-defektsete tüvede tulemused), mis viitab sellele, et Lon ja Clp ei ole seotud GraA lagundamisega (Tamman jt., 2016).

Lagundamiskatsed tehti *in vitro* rakulüsaadis ja võimalike ATP-sõltuvate proteaaside aktiivsuse säilitamiseks lisati lüsaadile ATP-d. Mõnevõrra üllatuslikult stabiliseeris ATP lisamine GraA-d veelgi (joonis 4)(Tamman jt., 2016). Need tulemused viitavad sellele, et GraA-d ei lagundata ATP-sõltuvate eksoproteaasidega, mille hulka kuuluvad ka Lon ja Clp (Sauer ja Baker, 2011).

GraA stabiilsust uurides nähti ligi 12 kDa suuruse His<sub>6</sub>-GraA molekuli lagunemisel mõnikord ebastabiilse 10 kDa suuruse GraA fragmendi teket (joonis 5). See viitab, et lagundamist viib läbi endoproteaas, mis lõikab antitoksiini spetsiifiliselt 80. aminohappe piirkonnas, nii et tekib kaks ebavõrdset osa (Tamman jt., 2016). Kooskõlas selle tulemusega mõjutavad asendusmutatsioonid GraA 79. ja 80. positsioonides märgatavalt GraA stabiilsust. GraA<sub>R80A</sub> on tunduvalt stabiilsem ( $t_{1/2} = 3,3$  h) ning GraA<sub>L79A</sub> tunduvalt ebastabiilsem valk ( $t_{1/2} = 12$  min) kui algne GraA. Teiste lähedalasuvate positsioonide asendusmutatsioonid GraA lagundamise kiirust ei muutnud (Tamman jt., 2016).

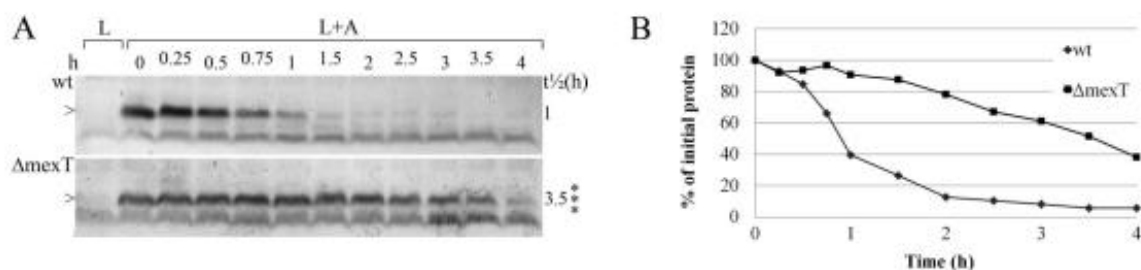


**Joonis 5:** GraA Immuunoblot analüüs. Alumine pilt on üleeksponeeritud versioon ülemisest. A, GraA antitoksiin; L, rakulüsaat; L+A, lüsaadile on lisatud GraA, et hinnata antitoksiini lagundamise kiirust. Antitoksiin tuvastati His<sub>6</sub>-peptiidi-vastase reagendiga. Pildi kohal olevad numbrid tähistavad reaktsiooniaegu tundides. Paremal olevad numbrid tähistavad täispikka (12 kDa) ja osalist (~10 kDa) GraA-d. 7 ja 23 tunni proovid kanti geelile kordustena (Tamman jt., 2016).

*P. putida*-s on GraA-d lagundavat proteaasi otsitud transposoonmutageneesi abil (Tamman jt., 2016). Katses lähtuti hüpoteesist, et transposoonmutageneesil on võimalik transposooni juhuslikul insertioonil rikkuda antitoksiini lagundava proteaasi geen. Kuna GraA on väga stabiilne antitoksiin, kasutati katseks labiilsema antitoksiiniga  $\Delta graA-tac-graA_{L79A}$  tüve (lühendatult  $\Delta A-tac-A_{L79A}$ ).  $\Delta A-tac-A_{L79A}$  tüves puudub natiivne *graA* geen ning genoomi on viidud *tac*-promootori kontrolli all olev asendusmutatsiooniga antitoksiini geen *graA\_{L79A}*, millelt ekspresseerub 0,5 mM IPTG juuresolekul piisavalt antitoksiini, et toksiini

aktiivsust neutraliseerida. Kuna GraA<sub>L79A</sub> on tunduvalt ebastabiilsem kui metsiktüüpi GraA, on juba 0,3 mM IPTG-ga indutseerimine ebapiisav toksiooni neutraliseerimiseks ning 20°C juures kolooniaid ei moodustu (Tamman jt., 2016). Eeldati, et kui insertioon toimub otsitava proteaasi geeni, ei toodeta proteaasi, mis lagundaks antitoksiini. Seetõttu suureneks antitoksiini eluiga, võimaldades efektiivselt neutraliseerida toksiinist põhjustatud külmatundlikkuse ning transposoonmutant suudab 20 °C juures koloonia moodustada.

Selles mutageneesi katses vaadati ligi 250 000 transkonjugandi seas GraT mõju kaotanud ja GraA<sub>L79A</sub> ekspressioonist sõltuvate mutantide hulka (Tamman jt., 2016). Selleks kasvatati neid 20 °C juures glükonaat-minimaal tassidel, millele oli lisatud 0,3 mM IPTG. Esialgu tuvastati 460 klooni, millel oli kadunud GraT-st tingitud kasvupeetus 20 °C juures. Edasi valiti välja kolooniad, mille kasvuks oli vaja GraA<sub>L79A</sub> ekspressiooni. Selleks tehti 20 °C juures paralleelkõlv glükonaadi tassidele, millest ühele oli lisatud 0,3 mM IPTG ja teisele mitte. Viis klooni, kes kasvasid 0,3 mM IPTG induksiooniga kuid ei kasvanud ilma IPTG induksioonita läksid edasi sekveneerimisele. Selgus, et kõigis viies kloonis oli transposoon rikkunud transkriptsioonifaktori *mexT* geeni. Edasised kontrollid kinnitasid, et MexT mõjutab GraA stabiilsust (joonis 6), kuid kuna tegemist on transkriptsiooni regulaatorvalguga, on MexT mõju GraA stabiilsusele ilmselgelt kaudne (Tamman jt., 2016).



**Joonis 6:** *mexT* deleteerimine stabiliseerib GraA-d. (A) *P. putida* algse tüve (wt) ja *mexT* deletandi ( $\Delta$ mexT) rakulüsaatides tehti immuunoblot GraA-vastaste antikehadega. Pildi kohal olevad numbrid tähistavad reaktsiooniaegu ja paremal olevad numbrid tähistavad GraA poolestusaegu ( $t_{1/2}$ ). L, rakulüsaat; L+A, lüsaadile on lisatud antitoksiin, et hinnata lagundamise kiirust. (B) Immuunobloti tulemuste kvantifikatsioon (kohandatud (Tamman jt., 2016) järgi).

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärk

Toksiin-antitoksiin süsteemi aktiveerimine toimub läbi antitoksiini lagundamise, mida tavaliselt teevad Lon ja Clp perekonna proteaasid (Brzozowska ja Zielenkiewicz, 2013). Meie laboris on uuritud *P. putida* GraTA toksiin-antitoksiin süsteemi, mis kuulub *higBA* perekonna toksiin-antitoksiin süsteemide hulka. HigA antitoksiine lagundavad proteaasid ei ole otseselt tuvastatud. Kaudselt on näidatud, et *E. coli* HigA-d lagundab Lon proteaas (Christensen-Dalsgaard jt., 2010), kuid meie teame, et *P. putida* GraA-d Lon ei lagunda (Tamman jt., 2016).

Varasemalt on proovitud GraA-d lagundavat proteaasi leida, kuid katsetega tuvastati ainult insertioone transkriptsioonifaktori *mexT* geeni (Tamman jt., 2016). On võimalik, et meie otsitav proteaas on rakule elutähtis ning seda ei saagi transposooniga katkestada. Teisalt võis katses kasutatud selektsioon olla liiga range, kuna analüüsist jäeti kõrvale kõik kolooniad, kes ei vajanud 20 °C juures kasvamiseks antitoksiini induktsiooni (Tamman jt., 2016). Kui otsitav proteaas omab antitoksiini lagundamisel võtmerolli, võib proteaasi geeni tabamisel transposooniga GraA lagundamine täielikult peatuda. Kuna antitoksiin GraA<sub>L79A</sub> on rakus *tac*-promootori kontrolli all, millel on ka ilma induktsioonita teatav aktiivsus, võib antitoksiini lagunemise puudumisel sellest vähesest antitoksiini tootmisest piisata, et neutraliseerida GraT mõju ja võimaldada kasvu ilma IPTG induktsioonita. See tähendab, et selles katses võidi proteaasimutant edasisest uurimisest kõrvale heita.

Võttes arvesse kõiki seniseid teadmisi, sai minu töö eesmärgiks korrata katset GraA-d lagundava proteaasi kodeeriva geeni leidmiseks. Minu katse erines varasemast selle poolest, et ma hakkasin teise selektsiooniringi asemel kohe kõiki madalal temperatuuril üles kasvanud kolooniaid lähemalt uurima.

## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed

Söötmetena kasutati LB (*lysogeny broth*) söödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl) või M9 minimaalsöödet (42 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19 mM NH<sub>4</sub>Cl, 9 mM NaCl), millele lisati mikroelementide lahust (667,5 µM MgO, 50 µM CaCO<sub>3</sub>, 40 µM FeSO<sub>4</sub>, 12,5 µM ZnSO<sub>4</sub>, 12,5 µM MnSO<sub>4</sub>, 2,5 µM CuSO<sub>4</sub>, 2,5 µM CoSO<sub>4</sub>, 1,9 µM H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>) ja süsinikuallikana glükoosi lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Seleksiooniks kasutati antibiootikume: ampitsilliini (Amp; 100 µg/ml), streptomüsiini (Sm; 300 µg/ml), kanamüsiini (Km; 50 µg/ml) ja gentamüsiini (Gm; 10 µg/ml). Antitoksiini üleekspressiooniks lisati söötmesse IPTG-d (isopropüül-β-tio-galaktopüranosiid) lõppkontsentratsiooniga 0,3 mM. Kui pole mainitud teisiti, kasvatati *Escherichia coli* rakke 37 °C juures. *Pseudomonas putida* rakke kasvatati 20 °C, 30 °C või 37 °C juures (vastavate katsete juures välja toodud). Vedelsöötmetes kasvasid kultuurid loksutil. Töös kasutatud bakteritüved on välja toodud tabelis 1:

**Tabel 1: kasutatud bakteritüved**

<i>Escherichia coli</i>	Kirjeldus	Viide
CC118λpir	Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galK phoA20 thi-1 rspE rpo B argE (Am)	(De Lorenzo jt., 1990)
HB101[pRK2013]	subE44 subF58 hsdS3 (rB-mB-) recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rps20 xyl-5 mt1-1 (Km <sup>r</sup> )	(Boyer ja Roulland-dussoix, 1969)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
ΔA	PaW85 ΔPP1585 ehk Δ <i>graA</i>	(Tamman, 2012, Tamman jt., 2014)
ΔA- <i>tac-A</i> <sub>L79A</sub>	PaW85 Δ <i>graA</i> , mis sisaldab <i>lacI<sup>q</sup>-P<sub>tac</sub>-graA<sub>L79A</sub></i> ekspressioonikasseti (Gm <sup>r</sup> )	(Tamman jt., 2016)
Plasmiid		
pUTmini-Tn5Sm/Sp	Plasmiid mini-Tn5Sm/Sp transpordiks genoomi (Amp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> )	(De Lorenzo jt., 1990)

## 2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i (*Polymerase Chain Reaction*) reaktsioonidel kasutati matriitsina bakterirakke. Reaktsioonimaht oli 20 µl ja lisaks matriits-DNA-le sisaldas reaktsioonisegu 1 x PCR-i puhvrit (75 mM Tris pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP; 0,5 ühikut Taq DNA polümeraasi ja praimereid (10 pmol kumbagi praimerit ühe reaktsiooni kohta). Kasutatud praimerid (oligonukleotiidid) on esitatud tabelis 2.

PCR viidi läbi järgmistel tingimustel:

- 96 °C, 1 minut
- 25 kordust:
  - 96 °C, 30 sekundit
  - 55 °C, 30 sekundit
  - 72 °C, ~1 minut (sõltuvalt amplifitseeritava DNA fragmendi pikkusest, arvestusega 1000 nukleotiidi minutis)
- 72 °C, 5 minutit

**Tabel 2: Oligonukleotiidid**

Oligonukleotiidi nimi	Nukleotiidne järjestus	Milleks kasutati
SacIPP2827	5'-TGA GCT CAA TAT CAT CGA CCC CTT CAC C-3'	<i>mexT</i> lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine
<i>gacASaba</i>	5'-GGA CTC GAG GTT TTA CAG GCT TGC GT-3'	<i>gacA</i> lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine
IEArb1	5'-CCT AGG CGG CCA GAT CTG AT-3'	Lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine; Arb-PCR
<i>gacSXba</i>	5'-TGA TCT AGA CTT GAC GGC ATC CAG GCA C-3'	<i>gacS</i> lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine
<i>gacSAlg</i>	5'-CAA CGG CGC ATA ACA CGT AC-3'	<i>gacS</i> lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine
<i>gacARev</i>	5'-ACG AAG CTT TGA ACA CGG ATG AGT CCG-3'	<i>gacA</i> lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine
XbaIPP2825	5'-CCT CTA GAG GTC GAC ATC TTC CCA GC-3'	<i>mexT</i> lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine
tldDBam	5'-ATG GAT CCT GCG CAT ACC TCG GAG TG-3'	<i>tldD</i> lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine
OEInt	5'-ACT TGT GTA TAA GAG TCA G-3'	Lookusspetsiifiline PCR, Tn-insertsiooni tuvastamine; sekveneerimine; Arb-PCR
SmSplopp	5'-GCT GAT CCG GTG GAT GAC CT-3'	Arb-PCR
Arb2	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'	Arb-PCR
Arb6	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN ACG CC-3'	Arb-PCR

### 2.2.3 Arb-PCR

Transposooni insertiooni asukohta tuvastamiseks kasutati Arb-PCR-i (*Arbitrarily primed PCR* ehk kōdupraimeritega polūmeraasi ahelreaktsioon), mis toimus kahe järjestikuse PCR-ina. Reaktsioonimaht oli mõlemal juhul 20 µl ja reaktsioonisegu sisaldas 1 x PCR-i puhvrit (75 mM Tris pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP; 1 ühiku Taq DNA polūmeraasi ja praimereid (10 pmol kumbagi praimerit ühe reaktsiooni kohta). Esimeses PCR-is (Arb1) kasutati DNA matriitsina bakterirakke, ühe praimerina kōdupraimerit Arb6, mille 3'-otsas on 5 nukleotiidi pikkune ankurjärjestus ja järgnevad 10 nukleotiidi on juhuslike nukleotiidide järjestus ning teise praimerina transposooni külge seonduvat praimerit SmSplopp. Teises PCR-is (Arb2) kasutati DNA matriitsina 0,5 µl Arb1-PCR-i produkti ning praimereid Arb2 ja OEint, millest esimene seondub kōdupraimeri Arb6 5' otsaga ja teine transposooni otsaga.

PCR-id viidi läbi järgmistel tingimustel:

- Arb1
  - 96 °C, 1 minut
  - 6 kordust:
    - 96 °C, 30 sekundit
    - 30 °C, 30 sekundit
    - 72 °C, 1 minut 30 sekundit
  - 35 kordust:
    - 96 °C, 30 sekundit
    - 45 °C, 30 sekundit
    - 72 °C, 2 minutit
  - 72 °C, 5 minutit
- Arb2
  - 25 kordust:
    - 96 °C, 1 minut
    - 54 °C, 1 minut
    - 72 °C, 1 minut

### 2.2.4 Geelelektroforees

PCR-produktide visualiseerimiseks kasutati agaros-geelelektroforeesi. Geelile kandmiseks värviti 5 µl PCR-produkti 2 µl geelelektroforeesi värviga (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). Kasutatud 1% agarosgeel sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. Proovide voolutamiseks asetati agarosgeel 1 x TAE puhvrise (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2) ning rakendati pinget 120-135 V. DNA suuruste võrdlemiseks kasutati *Thermo Scientific* DNA markerit. Geelid visualiseeriti UV valguses.

### 2.2.5 DNA sekveneerimine

Arb-PCR produktide sekveneerimiseks töödeldi neid 30 min 37°C juures 2,5 ühiku eksonukleas I (ExoI, *Thermo Scientific*) ja 1 ühiku aluselise fosfataasiga (FastAP, *Thermo Scientific*). Töötuse järel inaktiveeriti ensüümid 80 °C juures 15 minuti jooksul. Sekveneerimiseks valmistati inaktiveeritud ensüümidega proovid ette *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*-iga (*Applied Biosystems*). Proovid saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.

### 2.2.6 DNA sekventsidi analüüs

Eesti Biokeskuse tuumiklaboris sekveneeritud Arb-PCR-i järjestusi vaadeldi tarkvara „*BioEdit*“ abil ja analüüsimiseks kasutati programmi BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tuvastatud järjestusi võrreldi *P. putida* KT2440 genoomiga, kes on nukleotiidselt järjestuselt meie laboris uuritava PaW85 tüvega identne. Samasse geeni toimunud insertsioonide järjestused joondati sõltumatus kontrolliks samuti „*BioEdit*“-i abil. *P. putida* genoomi sirvimiseks kasutati andmebaasi „*Pseudomonas Genome Database*“ veebiaadressiga [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (Winsor jt., 2016).

### 2.2.7 Bakterite elektroporatsioon

*E. coli*-st elektroporatsiooniks kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml LB vedelsöötmes. Üleöökuultuurist inokuleeriti 150 µl värskesse 5 ml LB vedelsöötmesse ning rakke kasvatati 2 tundi. Seejärel jätkus töö bakterikultuuridega jääl. Rakud tsentrifugeeriti kokku (1 minut, 16100 x g, 4 °C) ning pesti kaks korda 1 ml deioniseeritud veega ning üks kord 200 µl 10% glütserooliga. Seejärel suspendeeriti rakud 80 µl 10% glütseroolis. Rakkudele lisati 0,3 µl plasmiidset DNA-d ning segu tõsteti elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsioon viidi läbi pingel 2500 V. Küvetist pesti rakud välja 1 ml LB söötmega ning kasvatati (lasti taastuda) 45-60 minutit 37 °C juures. Seejärel tsentrifugeeriti rakud põhja ja külvasi antibiootikume sisaldavatele selektiivtassidele.

### 2.2.8 Transposoonmutagenees

Transposoonmutageneesiks viisin mini-Tn5Sm kandva suitsiidplasmidi kolmikristamise teel muteeritavasse retsipienttüttesse. Ristamiseks kasvatati antibiootikumi juuresolekul üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes:

- doonortüvena *E. coli* tüve CC118 $\lambda$ pir, kuhu oli viidud ampitsilliini resistentsusgeeni kandev ja mini-Tn5Sm transposooni sisaldav plasmid (söötmesse lisati Sm ja Amp);
- retsipient-tüvena *P. putida*  $\Delta A-tac-A_{L79A}$  (kasvas 37 °C juures, söötmesse lisati Gm);
- helpertüvena *E. coli* HB101[pRK2013] (söötmesse lisati Km).

Üleöö 37 °C juures kasvanud kultuurist tõsteti värskendamiseks 150  $\mu$ l edasi 5 ml-sse antibiootikume mittesisaldavasse LB-sse. Pärast 2; 2,5 ja 3 tunnist kasvamist 37 °C juures võeti igast bakterikultuurist 100  $\mu$ l, segati kokku ning pipeteeriti 100  $\mu$ l saadud segu LB-tassile. Baktereid kasvatati üleöö 37 °C juures. Seejärel kraabiti ühe valitud ajapunkti ristamissegust  $\frac{1}{2}$  rakkudest tassilt kokku, suspendeeriti 100  $\mu$ l-s M9 puhvrts ja külvati streptomütsiini ning 0,3 mM IPTG sisaldavatele glükoos-minimaalsöötmetele, et kasvatada 20 °C juures. Transposoonmutantide arvukuse hindamiseks kasvatati rakke paralleelselt ka 37 °C juures, külvates erinevatele tassidele 0,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l ja 10  $\mu$ l rakususpensiooni.

### 3. Tulemused

GraA-d lagundava proteaasi geeni otsimiseks tegin transposoonmutageneesi *P. putida* tüvega  $\Delta A-tac-A_{L79A}$ , selekteerides külmatundetuid transposoonmutante 20 °C juures. Transposoonina kasutasin mini-Tn5Sm transposooni, mis inserteerub genoomi juhuslikesse positsioonidesse. Selleks, et transposoon  $\Delta A-tac-A_{L79A}$  tüvesse inserteerida, tuli mini-Tn5Sm transposooni kandev plasmiid esmalt *E. coli* CC118 $\lambda$ pir tüvesse transformeerida. Sealt kandsin plasmidi kolmikristamisega *E. coli* helpertüve HB101[pRK2013] abil *P. putida* tüvesse  $\Delta A-tac-A_{L79A}$ . Kuna transposoon kannab Sm<sup>r</sup> geeni, saab Sm söötmel selekteerida neid baktereid, kelles on toimunud mini-Tn5Sm transpositsioon genoomi. Transposooni kandnud plasmiid läheb protsessi käigus kaotsi, kuna ta ei ole võimeline *P. putida*'s replitseeruma. Kokku tegin kolm sõltumatut ristamist, mida kasvasin eraldi tassidel.

Esimese sammuna hindasin väljakülviga Sm tassile (kasvatades baktereid 37 °C juures) kogurakkude hulka, kellesse oli mini-Tn5Sm transposoon sisenenud. Kolmest ristamisest sain arvestuslikult kokku umbes 64 000 Sm-resistentset klooni, millesse oli toimunud Tn-5Sm insertsioon. Võttes arvesse, et *P. putida* genoomis on KEGG andmebaasi järgi 5729 geeni (Kanehisa jt., 2017), katab selline klooni arv geenide arvu umbes 11-kordselt. Selektiivtassidel kasvas 20 °C juures üles 87 transposoonmutanti. Järgnevalt proovisin neis mutantides tuvastada transposooni insertsioonikohta, rakendades selleks Arb-PCR-i ja sekveneerimist. Esimeste Arb-PCR sekvenside järgi oli näha, et mitmetes külmatundetutes kloonides oli korduvaid ühesuguseid insertsioone *gacA*, *gacS* ning *mexT* geenidesse (Tabel 3), mistõttu kontrollisin enne sekveneerima asumist teadmata insertsioonikohaga kloonides nendesamade korduvate insertsioonide esinemist spetsiifilise PCR abil. Selleks kasutasin ühte transposoonile seonduvat ja ühte uuritava lookuse lähedale seonduvat praimerit. Kui koloonia andis sama pika spetsiifilise PCR-i produkti kui mõni teine koloonia, kus transposooni asukoht oli määratud Arb-PCR produkti sekveneerimisega, lugesin need sama insertsiooniga kolooniateks. 87-st transposoonmutandist oli korduvate insertsioonidega kloone kokku 68, kusjuures korduvaid sõltumatuid tabamusi sai 6 erinevat geeni (Tabel 3). Üksikuid sõltumatuid insertsioone tuvastasin 13 tükki (Tabel 4) ja insertsioonisaiti ei õnnestunud identifitseerida viies transposoonmutandis.

**Tabel 3: Mitu korda sõltumatult transposooniga tabatud geenid**

Geen	Valgu kirjeldus	Kloone kokku	Sõltumatuid tabamusi	ARB-PCR ja sekveneerimisega tuvastatud kloone	Lookusspetsiifilise PCR-i abil tuvastatud kloone
PP_0812 - <i>cyoA</i>	CyoA, tsütokroomi bo oksüdaasi subühik II	4	2	4	0
PP_1586 - <i>graT</i>	GraT, toksiin	4	2	4	0
PP_1650 - <i>gacS</i>	GacS, GacSA kahekomponentse süsteemi sensor	12	5	10	2
PP_2826 - <i>mexT</i>	MexT, transkriptsiooni faktor	17	5	9	8
PP_2895 - <i>lacI</i>	LacI, transkriptsiooni repressorvalk	3	2	3	0
PP_4099 - <i>gacA</i>	GacA, GacSA kahekomponentse süsteemi vastuse regulaator	28	3	9	19

**Tabel 4: Ühekordselt sõltumatult transposooniga tabatud geenid**

Geen	Valgu kirjeldus
PP_0813 - <i>cyoB</i>	tsütokroomi bo oksüdaasi subühik I
PP_0940 - <i>tldD</i>	mikrotsiin B17 lõikav proteaas
PP_1125	oletatav helikaas
PP_1385 - <i>ttgB</i>	väljutava pumba (efflux pump) membraanivalk TtgB
PP_1932	tundmatu funktsiooniga konserveerunud valk
PP_2009	1-aminotsüklopropan-1-karboksülaadi deaminaas
PP_2171	LysE perekonna transporter
PP_2176	transkriptsiooni regulaator LysR perekonnast
PP_2260	glütserool-fosfaat ABC transporter ATP-siduv valk
PP_2647 (2 klooni)	<i>MFS</i> transporter
PP_3957 - <i>betT-III</i>	koliini/karnitiini/betaiini transporter BetTC
PP_4130 - <i>nuoM</i>	NADH-kinoon oksüdüreduktaasi subühik M
PP_5101 - <i>yggW</i>	koproporfürinogeen/heterotsükliilise ühendi oksüdaas

#### 4. Arutelu

GraA<sub>L79A</sub> on algsest GraA-st lühema poolestusajaga antitoksiini variant, mis üleekspressiooni korral suudab siiski neutraliseerida GraT toksiini mõju (Tamman jt., 2016). Seda mutantset antitoksiini kasutasin transposoonmutageneesi katses, kus otsisin GraA stabiilsust mõjutavaid geene. *P. putida* tüvi  $\Delta A-tac-A_{L79A}$  ei kasva 20 °C juures juhul kui genoomis ei ole toimunud mutatsiooni kohas, kus see takistaks kas antitoksiini lagundamist või toksiini tootmist. Minu transposoonmutageneesi katse oli püstitatud Hedvig Tammani katse (Tamman jt., 2016) eeskujul, kuid erinevalt varasemast katsest kasutasin leebemat selektsiooni selles mõttes, et analüüsisin kõiki külmatundetuid transposoonmutante. See suurendas küll valepositiivsete kolooniate hulka, ent oleks pidanud võimaldama GraA lagundamises suurt rolli etendava proteaasi geeni leidmist.

Mina nägin enda katses transkonjugantide analüüsil ilmselgete valepositiivsete tulemustena 2 sõltumatut tabamust *graT* geeni ja 2 sõltumatut tabamust *lacI* geeni (Tabel 3). Kuna kolooniate selektsioon 20 °C juures baseerub GraT aktiivsusel, siis oli minu kasutatud leebe selektsiooni korral *graT* tabamuste tuvastamine oodatav. Toksiini katkestuse korral ei toodeta rakus funktsionaalset GraT-d ning rakk kasvab madalal temperatuuril sarnaselt algsele *P. putida* tüvele. LacI on transkriptsiooni regulaator, mis paikneb minu kasutatud tüves *lacI-tac-graA<sub>L79A</sub>* ekspresioonikasseti koosseisus. LacI represseerib *tac*-promootorit, inhibeerides seeläbi GraA<sub>L79A</sub> tootmist. *LacI* geeni katkestamisel transposooniga vabaneb *tac*-promootor repressioonist ja toodetakse suuremas koguses antitoksiini, mis võimaldabki transkonjugandil kasvada madalal temperatuuril.

Suurt huvi pakkusid mulle geenid, kuhu oli toimunud mitmeid sõltumatuid insertioone. Nende puhul on suurem tõenäosus, et nad mõjutavad kas GraA<sub>L79A</sub> stabiilsust või GraT toksilisust ja kasv madalal temperatuuril ei ole põhjustatud juhuslikust mutatsioonist mõnes teises genoomi piirkonnas.

Ootuspäraselt tuvastasin 5 sõltumatut insertiooni *mexT* geeni, mille mõju GraA lagunemisele on tõestatud (Tamman jt., 2016). MexT on transkriptsiooni regulaator, mis on tavaolekus rakus suhteliselt väheaktiivne, ent mida aktiveeritakse rakus oksüdatiivse stressi korral (Fargier jt., 2012). Varasemalt on näidatud, et MexT on GraA stabiilsuse negatiivne regulaator ning transposooni insertioon *mexT* geeni stabiliseerib GraA-d (Tamman jt., 2016). Kuigi insertioonid *mexT* geeni ei olnud uudsed, olid nad heaks kinnituseks, et minu katse tuvastas reaalselt GraA stabiilsust mõjutavaid geene.

Põneva avastusena tuvastasin 5 sõltumatut insertiooni *gacS* geeni ja 3 sõltumatut insertiooni *gacA* geeni (Tabel 3). Kuigi need geenid ei paikne genoomis lähedikkude, moodustavad nad ühiselt GacS/GacA kahekomponentse regulatsioonisüsteemi, kus GacS on membraanis paiknev sensorikinaas ja GacA on transkriptsiooni regulaator (Jimenez jt., 2012). GacS-i puhul ei teata täpselt, milliste signaalide vastusena ta autofosforüleerub, kuid on näidatud, et GacS/GacA signaalirada aktiveeritakse statsionaarse kasvufaasi alguses, kui bakterite kasvukiirus aeglustub või kui rakkude tihedus on piisavalt suur (Heeb ja Haas, 2001). GacS kannab autofosforüleerimise järel fosfaatjäägi üle GacA-le. *P. aeruginosa* GacA aktiveerib otseselt väikeste RNA-de RsmZ ja RsmY sünteesi, mis mõjutavad RsmA valgu kaudu erinevate sihtmärkgeenide translatsiooni (Brencic jt., 2009). Peamiselt on GacS/GacA süsteemi seostatud virulentsusfaktorite ja biofilmi tekkeks vajalike eksopolüsahhariidide sünteesi aktiveerimisega (Jimenez jt., 2012). Pärast minu katseid tehti meie laboris GacS/GacA transposoonmutantidega täiendavaid katseid. Mõningates sõltumatutes GacS/GacA insertiooniga kloonides sekveneeriti kontrolliks *graT* geen ja leiti, et seal ei ole mutatsioone tekkinud (R. Hõrak, avaldamata andmed), mis viitas, et GacS/GacA süsteem on tõesti seotud GraTA süsteemi regulatsiooniga.

Koheselt tekkis küsimus, kuidas GacS/GacA katkestamine GraT efekti kõrvaldab: kas GacA on vajalik antitoksiini lagundava proteaasi sünteesiks või hoopis GraT sünteesi aktiveerimiseks genoomselt lookuselt? Transposoonmutageneesis kasutatud tüves on *graA* natiivsest lookusest deleteeritud, mistõttu mõjutab *graTA* promootor ainult GraT hulka rakus. Mõõtes  $\Delta graTA$  ja  $\Delta graTA$  *gacA::Sm* tüvedes *graTA* promootori aktiivsust, täheldati *gacA* katkestusega tüves 2,2 korda väiksemat *graTA* promootori aktiivsust, mis viitab GacS/GacA süsteemi vajalikkusele *graTA* transkriptsioonil (A. Ainelu, avaldamata andmed). Seega on GacS/GacA-defektsete rakkude kasv madalal temperatuuril suure tõenäosusega tingitud mitte GraA lagunemise vähenemisest vaid GraT tootmise vähenemisest.

Ootamatult õnnestus mul transposoonmutageneesil katkestada ka mitu hingamisahela geeni. 2 sõltumatut insertiooni toimus *cyoA* geeni (Tabel 3) ja üks insertioon toimus *cyoB* geeni (Tabel 4), mis on *cyoABCDE* operoni kaks esimest geeni ning kodeerivad tsütokroom bo terminaalset oksüdaasi subühikuid. Lisaks tsütokroom bo rikkumisele oli ühes külmatundetus mutandis transposoonitabamuse saanud ka *nuoM* geen, mis kodeerib NADH-kinooni oksüdüreduktaasi subühikut M. Nii *cyoA*, *cyoB* kui ka *nuoM* on osa membraanis paiknevast elektrontransportahelast, mis algab NADH dehüdrogenaasiga ning lõpeb tsütokroomi oksüdaasiga (Lodish jt., 2001). Kuigi hingamisahela mutantide seos GraT toksilisuse leevendamisele on ilmselt kaudne, võib see viidata, et toksiin häirib raku

metabolismi homöostaasi ning mutatsioonid hingamisraja geenides võivad neid häiringuid tasakaalustada. Hetkel ei ole veel selge, milliste mehhanismide kaudu on hingamisahel GraTA süsteemiga seotud, kuid see väärrib kindlasti edasist uurimist.

Minu katses tulid välja ka geenid, kuhu oli transposooni sõltumatu insertioon toimunud vaid ühel korral. Selliseid külmatundetuid transkonjugante kasvas üles 13 (Tabel 4) ning kuigi üksiku insertiooni puhul võib tõenäolisemalt olla tegu valepositiivse klooniga, ei tasu neid gene ennastlikult edasistest uuringutest kõrvaldada. Seda enam, et leitud 13-st geenist on kaks tükki otseselt hingamisahelaga seotud. Selleks, et üks kord tuvastatud geenitabamuste puhul välistada mutatsioonid toksiini geenis, sekveneriti pärast minu katseid neis kõigis *graT* lookus ning veenduti, et toksiin on kõikides kloonides terve (A. Ainelo, avaldamata andmed). Minu suuremat tähelepanu pälvis ühekordselt esinevate katkestuste seast lisaks hingamisahelaga seotud geenidele *tldD* geen, mis kodeerib mikrotsiin B17 proteaasi. Tegemist on ainukese proteaasi geeniga, mida mul transposooniga tabada õnnestus ning lootused olid kõrged, et *tldD* näol on tegemist GraA-d lagundava proteaasi geeniga. Edasisel uurimisel otsustasid minu juhendajad kontrollida, ega *tldD* insertiooniga kloonis ei ole muteerunud *lacI* geen. Selgus, et kuigi *lacI* geen ei ole tõesti mutatsioone, oli tekkinud ühenukleotiidine asendusmutatsioon *lac* operaatoris, kuhu LacI transkriptsiooni repressiooniks seondub (A. Ainelo, avaldamata andmed). Varasemalt on näidatud, et see mutatsioon (positsioonis -349 T→C) kõrvaldab LacI repressiooni (Juurik jt., 2012). Võib arvata, et seetõttu toodetakse antitoksiini konstitutiivselt suurtes kogustes ja transposooni insertioon *tldD* geeni ei ole külmatundlikkuse kadumise seisukohast oluline. Siiski ei saa me nende tulemuste põhjal ka välistada võimalust, et TldD osaleb GraA lagundamises. Samuti võivad mutatsioonid *lacI*-tac kassetis esineda ka teistes ühe korra tabamuse saanud geenides, kuna seda ei ole nendes kontrollitud. Seetõttu on võimalik, et katkestatud geenid ei mängi GraTA süsteemi regulatsioonis mitte mingit rolli.

Katse alguses ei olnud selge, kas Tamman ei leidnud GraA lagundamise eest vastutavat proteaasi selle tõttu, et see on GraA lagunemise peamine algataja ning ei läbinud seetõttu karmi selektsiooni või ehk on otsitav proteaas rakule elutähtis. Kuna isegi leebema selektsiooniga ja rohkemate transposoonmutantide analüüsil ei õnnestunud meil proteaasi tuvastada, võib oletada, et tegemist on rakule elutähtsa valguga, mida meie meetodikaga ei saagi tuvastada.

## Kokkuvõte

Bakterite genoomis leiduvad TA süsteemid aktiveeritakse proteaasidega, mis lagundavad antitoksiine ja muudavad seeläbi toksiinid aktiivseks. Toksiinid pärsvad rakkude kasvu ning võivad raku isegi surmata. Enamasti lagundavad antitoksiine ATP-sõltuvad eksoproteaasid Lon ja Clp, kuid kõiki antitoksiine lagundavad proteaasid ei ole tuvastatud. Kui me teame, milline proteaas antitoksiini lagundab, võime uurida, millistel tingimustel see toimub ning saame teavet selle TA süsteemi funktsiooni kohta bakterirakus. Üks *Pseudomonas putida* TA süsteemidest on GraTA, kus ei ole teada antitoksiini lagundav proteaas, kuid on nähtud, et GraA lagundamise algatab endoproteaas (Tamman jt., 2016). Minu töö keskendus GraA-d lagundava proteaasi otsimisele transposoonmutageneesil. Selleks, et suhteliselt stabiilse GraA lagunemist paremini uurida, kasutasime tüve, kust oli deleteeritud algne *graA* ning sisestatud lühema poolestusajaga antitoksiini tootev geen. Transposoonmutantide selektsiooniks kasutasime inkubatsiooni 20 °C juures, kus muteerimata tüvi GraT toksilisuse tõttu ei kasva.

Käesoleva töö tulemused on kokku võetud järgnevalt:

- 1) Mitme tabamuse identifitseerimine *mexT* geeni on kooskõlas varem sooritatud katsega ja kinnitab, et minu katse töötas. Lisaks tuvastasin ootuspäraselt mitu GraA lagundamise seisukohalt valepositiivset insertiooni *graT* ja *lacI* geenidesse.
- 2) Seni teadmata GraTA süsteemi mõjutava faktorina tuvastasin mitmeid insertioone *gacS* ja *gacA* geenidesse. Minu katsele järgnesid katsed, millega tehti kindlaks, et kuigi GacS/GacA süsteem ei mõjuta antitoksiini lagundamist, on tegemist *graTA* operoni transkriptsiooni reguleeriva süsteemiga.
- 3) Transposoonmutageneesiga õnnestus tabada kolme geeni, mis on seotud oksüdatiivse fosforüleerimise rajaga: *cyoA*, *cyoB* ja *nuoM*. See viitab hingamisahela seotusele GraTA süsteemiga ning kuigi hetkel ei ole veel täpselt teada, kuidas need omavahel seotud on, väärib see küsimus kindlasti edasist uurimist.
- 4) Ainukeses transkonjugandis, kus õnnestus tuvastada proteaasi kodeeriv geen, *tldD*, avastati hilisema kontrolli käigus mutatsioon *lac* operaatoris.

Geenid, milles tuvastasin korduvaid insertioone väärivad kindlasti edasist uurimist, et selgitada välja nende täpne mõju GraTA süsteemile. Tähelepanu tasub samuti pöörata ühekordselt esinenud insertioonidele, mille seas leidis ka ainukene proteaasi geen, mille tuvastasin. Kahjuks on mutatsioon *lac* operaatoris suure tõenäosusega põhjuseks, miks *tldD*

katkestusega koloonia oli kaotanud külmatundlikkuse ning me ei saa eeldada, et TldD puhul on tegemist GraA lagundamise eest vastutava proteaasiga. Samas ei välista minu tulemused TldD rolli GraA lagundamises. Kuna TldD puhul on tegemist endoproteaasiga, mis osaleb CcdA antitoksiini lagundamises (Allali jt., 2002), võiks see sobida GraA lagundamise mudelisse ning selle edasine uurimine oleks huvitav.

## Searching for the *Pseudomonas putida* GraA antitoxin degrading protease

Nils Joonas Kristian Saar

### Summary

Life in the soil is not easy for bacteria. They inhabit a multitude of different environments and have to cope with conditions of strong competition and stress. To remain competitive, bacteria have adapted different mechanisms to overcome stress. One solution might be the widely distributed toxin-antitoxin systems. Although first discovered in plasmids, the role of toxin-antitoxin systems in bacterial chromosomes has been receiving more and more attention and has also sparked debate.

The first TA system that was described in *Pseudomonas putida* is the GraTA toxin-antitoxin system. In normal conditions, the GraA antitoxin and the GraT toxin are bound together, forming a neutral complex (Tamman jt., 2014). When the GraA antitoxin is degraded, the toxin is freed from its neutralising effect, allowing growth inhibition by GraT. Intriguingly the GraT toxin becomes more active at lower temperatures. Also uncommonly for TA systems, the degradation of GraA seems to be endoproteolytic and not mediated by Lon and Clp proteases that usually degrade other antitoxins (Tamman jt., 2016). This thesis focused on identifying the protease responsible for GraA degradation using transposon mutagenesis. In order to hasten the whole experiment, we used a strain of *P. putida* where the *graA* gene had been deleted and a mutated, less stable antitoxin inserted under the IPTG-inducible *tac*-promoter. The insertion of the transposon into a gene responsible for coding a protease that degrades GraA should reduce the degradation rate of the antitoxin. This should allow the growth of the transconjugant at a temperature of 20 °C even without induction with IPTG.

The results of this work are concluded as follows:

- 1) Identifying several insertions into the *mexT* gene is in accordance with a previous experiment, assuring that my screen worked. Additionally I identified several expected false-positive insertions into the *graT* and *lacI* genes.
- 2) I managed to identify several insertions into the *gacS* and *gacA* genes, which implies them as a factor affecting the GraTA system. Previously unknown, the insertions raised interest in my supervisors and it was verified that although the GacS/GacA system does not affect the degradation of GraA, it regulates transcription of the *graTA* operon.
- 3) In my experiment I managed to identify insertions into three genes associated with the

oxidative phosphorylation pathway: *cyoA*, *cyoB* and *nuoM*. This refers to a connection between the electron transport chain and the GraTA system. Although the exact mechanism connecting the two systems is unknown, it is definitely worth researching.

- 4) The only transconjugant which presented an insertion into a protease gene *tldD* turned out to have a mutation in the *lac* operator when controlled later.

The genes in which I identified multiple independent transposone insertions definitely deserve further inspection to define the more precise methods with which they affect the toxin activity. Interest should be directed towards the single transposon insertions as well, for among them was the only identified protease encoding gene. Unfortunately, the mutation in *lacI* is most likely the reason why the transconjugant with the *tldD* insertion has lost its sensitivity to cold. Therefore we cannot presume that the TldD protease is responsible for degrading GraA. However, as TldD is an endoprotease which takes part in degrading the CcdA antitoxin (Allali jt., 2002), it could fit into the GraA degradation model, making it an interesting subject for future research.

## **Tänuõnad**

No mis ma siin ikka pikalt keerutan – suurim tänu kuulub kindlasti minu juhendajatele Andresele ja Ritale. See õhkkond, mis meie laboris valitseb on midagi enneolematut ja ma olen tohutult õnnelik teiega kohtumise üle. Kõik need lõbusad tunnid, mis said laboris veedetud ja isegi väikene ansabmlikene, mis sai kokku klopsitud jäävad minuga alati. Ning see huumor, mida laboris sai, püha ristivägi! See oli mulle alati toeks ning on ikka armas küll, kui kõik sõbralikult tögavad üksteist ning jätavad väikeseid meeneid laudadele, olgu see siis kumm või väikene pildikene Mari sulest.

Aitäh teile kõigile ja elagu TÛMRI paradiis!

## Kirjanduse loetelu

- Aldeyab, M. A., M. G. Scott, M. P. Kearney, Y. M. Alahmadi, F. A. Magee, G. Conlon & J. C. McElroy (2014). "Impact of an enhanced antibiotic stewardship on reducing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in primary and secondary healthcare settings." *Epidemiol Infect* 142(3): 494-500.
- Allali, N., H. Afif, M. Couturier & L. Van Melderen (2002). "The highly conserved TldD and TldE proteins of *Escherichia coli* are involved in microcin B17 processing and in CcdA degradation." *Journal of bacteriology* 184(12): 3224-3231.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy & P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." *Molecular and General Genetics MGG* 154(2): 203-204.
- Belda, E., R. G. van Heck, M. J. Lopez-Sanchez, S. Cruveiller, V. Barbe, C. Fraser, H. P. Klenk, J. Petersen, A. Morgat & P. I. Nikel (2016). "The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis." *Environmental microbiology*.
- Bernard, P., K. E. Kézdy, L. Van Melderen, J. Steyaert, L. Wyns, M. L. Pato, P. N. Higgins & M. Couturier (1993). "The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase." *Journal of molecular biology* 234(3): 534-541.
- Boyer, H. W. & D. Roulland-dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." *Journal of molecular biology* 41(3): 459-472.
- Brencic, A., K. A. McFarland, H. R. McManus, S. Castang, I. Mogno, S. L. Dove & S. Lory (2009). "The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs." *Molecular Microbiology* 73(3): 434-445.
- Brzozowska, I. & U. Zielenkiewicz (2013). "Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis." *Plasmid* 70(1): 33-41.
- Budde, P. P., B. M. Davis, J. Yuan & M. K. Waldor (2007). "Characterization of a higBA toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*." *Journal of bacteriology* 189(2): 491-500.
- Chan, W. T., M. Espinosa & C. C. Yeo (2016). "Keeping the wolves at bay: antitoxins of prokaryotic type II toxin-antitoxin systems." *Frontiers in molecular biosciences* 3.
- Christensen-Dalsgaard, M., M. G. Jørgensen & K. Gerdes (2010). "Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses." *Mol Microbiol* 75(2): 333-348.
- Christensen, S. K. & K. Gerdes (2003). "RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA." *Mol Microbiol* 48(5): 1389-1400.
- Christensen, S. K., M. Mikkelsen, K. Pedersen & K. Gerdes (2001). "RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(25): 14328-14333.
- De Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik & K. N. Timmis (1990). "Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria." *Journal of bacteriology* 172(11): 6568-6572.
- Dörr, T., M. Vulić & K. Lewis (2010). "Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*." *PLoS Biol* 8(2): e1000317.
- Fargier, E., M. Mac Aogáin, M. J. Mooij, D. F. Woods, J. P. Morrissey, A. D. Dobson, C. Adams & F. O'Gara (2012). "MexT functions as a redox-responsive regulator modulating disulfide stress resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of bacteriology* 194(13): 3502-3511.

- Garcia-Pino, A., S. Balasubramanian, L. Wyns, E. Gazit, H. De Greve, R. D. Magnuson, D. Charlier, N. A. van Nuland & R. Loris (2010). "Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity." *Cell* 142(1): 101-111.
- Gazit, E. & R. T. Sauer (1999). "Stability and DNA binding of the Phd protein of the phage P1 plasmid addiction system." *Journal of Biological Chemistry* 274(5): 2652-2657.
- Gerdes, K., S. K. Christensen & A. Løbner-Olesen (2005). "Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci." *Nature Reviews Microbiology* 3(5): 371-382.
- Gerdes, K. & E. Maisonneuve (2012). "Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci." *Annual review of microbiology* 66: 103-123.
- Germain, E., M. Roghanian, K. Gerdes & E. Maisonneuve (2015). "Stochastic induction of persister cells by HipA through (p) ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(16): 5171-5176.
- Goeders, N. & L. Van Melderen (2014). "Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems." *Toxins* 6(1): 304-324.
- Guglielmini, J., C. Szpirer & M. C. Milinkovitch (2008). "Automated discovery and phylogenetic analysis of new toxin-antitoxin systems." *BMC microbiology* 8(1): 104.
- Hansen, S., M. Vulić, J. Min, T.-J. Yen, M. A. Schumacher, R. G. Brennan & K. Lewis (2012). "Regulation of the Escherichia coli HipBA toxin-antitoxin system by proteolysis." *PLoS One* 7(6): e39185.
- Haurlyuk, V., G. C. Atkinson, K. S. Murakami, T. Tenson & K. Gerdes (2015). "Recent functional insights into the role of (p) ppGpp in bacterial physiology." *Nature Reviews Microbiology* 13(5): 298-309.
- Heeb, S. & D. Haas (2001). "Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(12): 1351-1363.
- Helaine, S., A. M. Cheverton, K. G. Watson, L. M. Faure, S. A. Matthews & D. W. Holden (2014). "Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters." *Science* 343(6167): 204-208.
- Jensen, R. B. & K. Gerdes (1995). "Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems." *Mol Microbiol* 17(2): 205-210.
- Jimenez, P. N., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool & W. J. Quax (2012). "The multiple signaling systems regulating virulence in Pseudomonas aeruginosa." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(1): 46-65.
- Juurik, T., H. Ilves, R. Teras, T. Ilmjärvi, K. Tavita, K. Ukkivi, A. Teppo, K. Mikkil & M. Kivisaar (2012). "Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of Pseudomonas putida." *PLoS One* 7(10): e48511.
- Kamada, K., F. Hanaoka & S. K. Burley (2003). "Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition." *Molecular cell* 11(4): 875-884.
- Kanehisa, M., M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato & K. Morishima (2017). "KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs." *Nucleic acids research* 45(D1): D353-D361.
- Kim, Y., X. Wang, Q. Ma, X.-S. Zhang & T. K. Wood (2009). "Toxin-antitoxin systems in Escherichia coli influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae." *J Bacteriol* 191(4): 1258-1267.
- Koga, M., Y. Otsuka, S. Lemire & T. Yonesaki (2011). "Escherichia coli rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system." *Genetics* 187(1): 123-130.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence & J. J. Collins (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." *Cell* 130(5): 797-810.

- Liroy, V. S., C. Machon, M. Tabone, J. E. Gonzalez-Pastor, R. Daugelavicius, S. Ayora & J. C. Alonso (2012). "The  $\zeta$  toxin induces a set of protective responses and dormancy." PLoS One 7(1): e30282.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore & J. Darnell (2001). Molecular Cell Biology W. H. Freeman and Company, 4th edition: 632-648.
- Loris, R. & A. Garcia-Pino (2014). "Disorder-and dynamics-based regulatory mechanisms in toxin-antitoxin modules." Chemical reviews 114(13): 6933-6947.
- Loris, R., I. Marianovsky, J. Lah, T. Laeremans, H. Engelberg-Kulka, G. Glaser, S. Muyltermans & L. Wyns (2003). "Crystal structure of the intrinsically flexible addiction antidote MazE." Journal of Biological Chemistry 278(30): 28252-28257.
- Maisonneuve, E., M. Castro-Camargo & K. Gerdes (2013). "(p) ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity." Cell 154(5): 1140-1150.
- Maisonneuve, E., L. J. Shakespeare, M. G. Jørgensen & K. Gerdes (2011). "Bacterial persistence by RNA endonucleases." Proceedings of the National Academy of Sciences 108(32): 13206-13211.
- Makarova, K. S., Y. I. Wolf & E. V. Koonin (2009). "Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes." Biology direct 4(1): 19.
- Ning, D., S. Ye, B. Liu & J. Chang (2011). "The proteolytic activation of the relNEs (ssr1114/slr0664) toxin-antitoxin system by both proteases Lon and ClpP2s/Xs of *Synechocystis* sp. PCC 6803." Current microbiology 63(5): 496.
- Ogura, T. & S. Hiraga (1983). "Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A 80(15): 4784-4788.
- Otsuka, Y. & T. Yonesaki (2012). "Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins." Molecular Microbiology 83(4): 669-681.
- Otsuka, Y. & T. Yonesaki (2012). "Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins." Mol Microbiol 83(4): 669-681.
- Overgaard, M., J. Borch, M. G. Jørgensen & K. Gerdes (2008). "Messenger RNA interferase RelE controls relBE transcription by conditional cooperativity." Mol Microbiol 69(4): 841-857.
- Page, R. & W. Peti (2016). "Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence." Nature chemical biology 12(4): 208-214.
- Pandey, D. P. & K. Gerdes (2005). "Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes." Nucleic Acids Res 33(3): 966-976.
- Pedersen, K., S. K. Christensen & K. Gerdes (2002). "Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins." Mol Microbiol 45(2): 501-510.
- Ramage, H. R., L. E. Connolly & J. S. Cox (2009). "Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution." PLoS Genet 5(12): e1000767.
- Ramisetty, B. C., D. Ghosh, M. R. Chowdhury & R. S. Santhosh (2016). "What Is the Link between Stringent Response, Endoribonuclease Encoding Type II Toxin-Antitoxin Systems and Persistence?" Frontiers in Microbiology 7.
- Samson, J. E., A. H. Magadán, M. Sabri & S. Moineau (2013). "Revenge of the phages: defeating bacterial defences." Nature Reviews Microbiology 11(10): 675-687.
- Sauer, R. T. & T. A. Baker (2011). "AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction." Annual Review of Biochemistry 80: 587-612.
- Schumacher, M. A., K. M. Piro, W. Xu, S. Hansen, K. Lewis & R. G. Brennan (2009). "Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB." Science 323(5912): 396-401.

- Shan, Y., A. B. Gandt, S. E. Rowe, J. P. Deisinger, B. P. Conlon & K. Lewis (2017). "ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia coli*." mBio 8(1): e02267-02216.
- Shao, Y., E. M. Harrison, D. Bi, C. Tai, X. He, H.-Y. Ou, K. Rajakumar & Z. Deng (2011). "TADB: a web-based resource for Type 2 toxin–antitoxin loci in bacteria and archaea." Nucleic acids research 39(suppl 1): D606-D611.
- Soo, V. W. & T. K. Wood (2013). "Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD." Scientific reports 3: 3186.
- Takagi, H., Y. Kakuta, T. Okada, M. Yao, I. Tanaka & M. Kimura (2005). "Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE–RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects." Nature structural & molecular biology 12(4): 327-331.
- Tamman, H. (2012). *Pseudomonas putida* kasvukiirust vähendav toksiin GraT supresseerib *colR* mutandi glükoosõltuvat lüüsi. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Tamman, H. (2016). The GraTA toxin-antitoxin system of *Pseudomonas putida*: regulation and role in stress tolerance. PhD, University of Tartu.
- Tamman, H., A. Ainelo, K. Ainsaar & R. Hõrak (2014). "A moderate toxin, GraT, modulates growth rate and stress tolerance of *Pseudomonas putida*." Journal of bacteriology 196(1): 157-169.
- Tamman, H., A. Ainelo, M. Tagel & R. Hõrak (2016). "Stability of the GraA Antitoxin Depends on Growth Phase, ATP Level, and Global Regulator MexT." Journal of bacteriology 198(5): 787-796.
- Tian, Q. B., T. Hayashi, T. Murata & Y. Terawaki (1996). "Gene Product Identification and Promoter Analysis of *hig* Locus of Plasmid Rts1." Biochem Biophys Res Commun 225(2): 679-684.
- Van Melderren, L. (2010). "Toxin–antitoxin systems: why so many, what for?" Current opinion in microbiology 13(6): 781-785.
- Van Melderren, L. & M. S. De Bast (2009). "Bacterial toxin–antitoxin systems: more than selfish entities?" PLoS Genet 5(3): e1000437.
- Wang, X. & T. K. Wood (2011). "Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response." Appl Environ Microbiol 77(16): 5577-5583.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman & W. J. Wiebe (1998). "Prokaryotes: the unseen majority." Proceedings of the National Academy of Sciences 95(12): 6578-6583.
- Vinella, D., C. Albrecht, M. Cashel & R. D'Ari (2005). "Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*." Mol Microbiol 56(4): 958-970.
- Winsor, G. L., E. J. Griffiths, R. Lo, B. K. Dhillon, J. A. Shay & F. S. Brinkman (2016). "Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database." Nucleic acids research 44(D1): D646-D653.
- Wood, T. L. & T. K. Wood (2016). "The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation." MicrobiologyOpen 5(3): 499-511.
- Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser & M. Cashel (1991). "Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations." Journal of Biological Chemistry 266(9): 5980-5990.
- Yamaguchi, Y. & M. Inouye (2009). "mRNA Interferases, Sequence-Specific Endoribonucleases from the Toxin–Antitoxin Systems." Prog Mol Biol Transl Sci 85: 467-500.
- Yamaguchi, Y., J.-H. Park & M. Inouye (2011). "Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea." Annual review of genetics 45: 61-79.

## **Kasutatud veebiaadressid**

Pseudomonas Genome Database: andmebaas *Pseudomonas* perekonna bakterigenoomide jaoks, <http://www.pseudomonas.com> (22.05.2017)

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST): andmebaas erinevate bioloogiliste järjestuste kõrvutamiseks ja hindamiseks, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (22.05.2017).

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

Mina, Nils Joonas Kristian Saar (sünnikuupäev: 22.09.1995) annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

***Pseudomonas putida* GraA antitoksiini lagundava proteaasi otsinguil,**

mille juhendajad on **Andres Ainelu ja Rita Hõrak,**

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, 29. mai 2017