

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

Karl Jürgenstein

**Armastus kolme aminohappe vastu: geeni *mpl* mõju *Pseudomonas putida*
fenotüübile**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad MSc Mari Tagel

prof Maia Kivisaar

TARTU 2016

Infoleht

Armastus kolme aminohappe vastu: geeni *mpl* mõju *Pseudomonas putida* fenotüübile

Peptidoglükaan on bakterirakule elutähtis struktuur, mis kaitseb rakku osmootselt rõhust põhjustatud surve tõttu lüüsumise eest. Peptidoglükaanis viiakse läbi ohtralt ümberkorraldusi, et võimaldada bakteril kasvada ning paljuneda, mistõttu lagundatakse pidevalt suurel hulgal olemasolevat peptidoglükaani. Energia kokku hoidmiseks taaskasutavad bakterid lagundatud materjali. Valk Mpl aitab rakul taaskasutada peptidoglükaani kuuluvaid peptiidahelaid ning seeläbi säästa energiat, kuid bakteris *Pseudomonas putida* on Mpl-il näidatud ka mõju mutatsioonisagedusele. Käesolevas töös on iseloomustatud Mpl-mutantse *P. putida* fenotüüpi ning näidatud, et *mpl*-geeni puudumisel tõuseb mutatsioonisagedus.

Märksõnad: *mpl*, mureiini-peptiidi ligaas, peptidoglükaani taaskäitlus, tripeptiid

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The love for tripeptides: *mpl* and its effect on the phenotype of *Pseudomonas putida*

Peptidoglycan is a vital polymeric structure found in the bacterial cell wall. It shields the inner membrane from the osmotic pressure and thus helps to preserve the structural integrity of the cell. As bacteria grow and divide, constant reorganizing of the peptidoglycan layer is necessary, resulting in significant degradation of existing peptidoglycan. Bacteria have developed a pathway to reutilize the degradation products in order to conserve energy and resources. Mpl, an enzyme in charge of recycling peptidoglycan-originating peptides, has been shown to have an effect on the mutation rate in *Pseudomonas putida*. The current work characterizes the phenotype of Mpl-mutants and confirms the link between Mpl-deficiency and the increased rate of mutations in *P. putida*.

Keywords: *mpl*, murein-peptide ligase, peptidoglycan recycling, tripeptide

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht.....	2
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Peptidoglükaan.....	7
1.2 Grampositiivsed ja –negatiivsed bakterid	8
1.3 Peptidoglükaani süntees	10
1.4 Peptidoglükaani lagundamine ja taaskäitlus	13
1.5 Mureiini-peptiidi ligaas ehk Mpl	17
2. Eksperimentaalne osa	19
2.1 Töö eesmärgid.....	19
2.2 Materjal ja meetodika	20
2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid.....	20
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja bakterirakkude elektroporatsioon	21
2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	22
2.2.4 Plasmidi eraldamine ja restriksioonanalüüs.....	23
2.2.5 Geelelektroforees	24
2.2.6 Kloonimine	24
2.2.7 <i>Mpl</i> -defektsete tüvede konstrueerimine.....	24
2.2.8 Bakterite konjugatsioon	25
2.2.9 Uuritavate tüvede rifampitsiini resistentsete (Rif^r) mutantide tekkesageduse leidmine	25
2.2.10 Uuritavate tüvede kasvukõverate mõõtmine ja generatsiooniaja arvutamine	26
2.2.11 Fluorestsentsmikroskoopia uuritavate tüvede rakkudest.....	26
2.2.12 Lävivoolutsütomeetria uuritavate tüvede rakupopulatsioonidest	27

2.2.13	Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramine	27
2.3	Tulemused	28
2.3.1	<i>P. putida</i> <i>mpl</i> -defektsete tüvede konstrueerimine.....	28
2.3.2	Spontaansete mutatsioonide teke <i>mpl</i> -defektsete tüvede eksponentsiaalse faasi rakkudes	29
2.3.3	<i>mpl</i> -defektsete bakterite kolooniate suuruse võrdlus metsiktüve kolooniatega.....	30
2.3.4	<i>mpl</i> -defektsete bakteriüvede kasvukiirus võrreldes metsiktüvega.....	31
2.3.5	<i>mpl</i> -defektsete tüvede bakterite raku kuju ja suurus.....	32
2.3.6	<i>mpl</i> -defektsete tüvede rakupopulatsioonide analüüs läbivoolutsütomeetriaga.....	33
2.3.7	<i>mpl</i> -defektsete tüvede tundlikkus peptidoglükaani mõjutavatele antibiootikumidele	34
2.4	Arutelu.....	35
	Kokkuvõte	38
	Summary.....	39
	Tänuõnad.....	40
	Kasutatud kirjandus	41
	Kasutatud veebilehed.....	44

Kasutatud lühendid

Amp - ampitsilliin

AnhNAM – anhüdro-N-atsetüül-muraamhape

Bp – bensüülpenitsilliin

CAA – kaseiini hüdrolysaat (ingl k – *casamino acids*)

CFU – kolooniat moodustav ühik (ingl k – *colony forming unit*)

CPaas – karboksüpeptidaas

Glc – glükoos (ingl k – *glucose*)

GN – gramnegatiivne

GP – grampositiivne

GTAas – glükosüültransferaas

IR – pöördkordusjärjestused (ingl k – *inverted repeats*)

Km – kanamütsiin

m-DAP – *meso*-diaminopimelaat

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (ingl k – *minimal inhibitory concentration*)

NAG – N-atsetüülglükoosamiin

NAM – N-atsetüül-muraamhape

PBP – penitsilliini siduv valk (ingl k – *penicillin binding protein*)

PG – peptidoglükaan

PI – propiidiumjodiid

Rif – rifampitsiin

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl k – *reactive oxygen species*)

TPaas – transpeptidaas

wt – metsiktüvi (ingl k – *wild-type*)

Sissejuhatus

Bakterite kasvukeskkonna tingimused muutuvad pidevalt ning see seab rakud osmootse pingega alla, millega bakterite membraan ei suudaks üksi toime tulla. Osmootsest rõhust tingitud surve eest kaitseb bakterirakku rakukest, mille kõige olulisem komponent on polümeerse ehitusega peptidoglükaan. Peptidoglükaan annab rakukestale mehhaanilise tugevuse, mistõttu on ta bakterile eluks ülioluline struktuur. See omakorda muudab peptidoglükaani sihtmärgiks mitmesugustele antibakteriaalsetele kemikaalidele.

Kuna bakterid kasvavad ja poolduvad pidevalt, siis ei saa peptidoglükaan olla staatiline struktuur, vaid peab kasvama samas tempos bakteriga. Samaaegselt peab peptidoglükaan siiski täitma ka oma funktsiooni, seega on peptidoglükaani süntees väga hoolikalt reguleeritud protsess, eriti gramnegatiivsetes bakterites, kus peptidoglükaan on sageli vaid ühekihiline. Peptidoglükaani süntees on omapärane, kuna uue materjali lisamisel peptidoglükaankihti lagundatakse suur hulk olemasolevat peptidoglükaani. Selline käitumine oleks rakule suur ressursside ja energia raiskamine, mistõttu on bakterites välja arenenud võimalused lagundatud materjali taaskasutada.

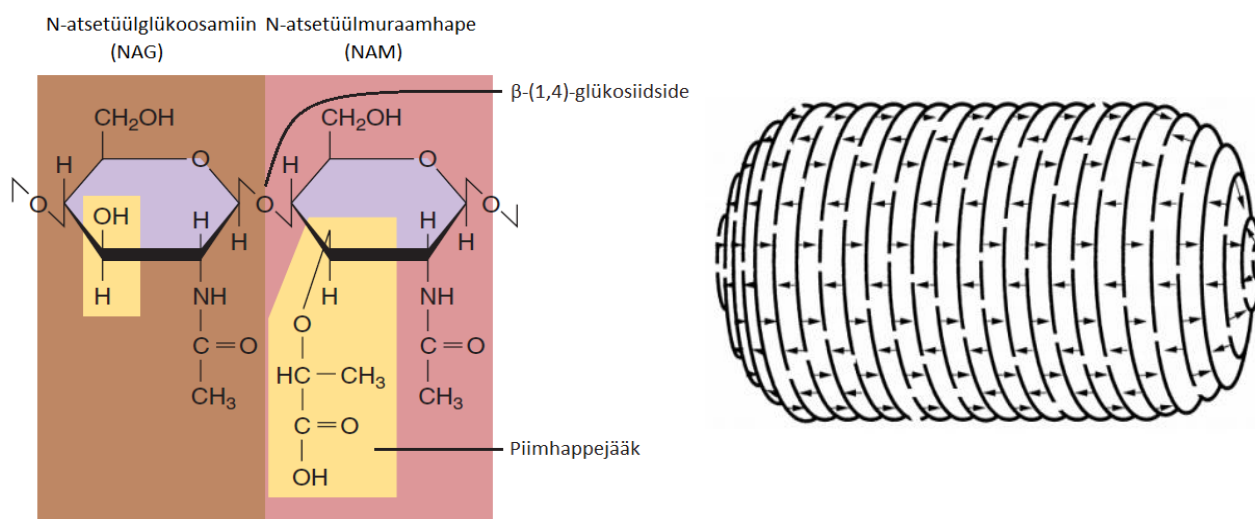
Meie laboris uuritakse mutatsiooniprotsesse bakteris *Pseudomonas putida* ning varasemate uuringute käigus avastati, et geen *mpl*, mis kodeerib peptidoglükaani taaskäitlusrajas olulist ensüümi, mõjutab *P. putida* mutatsioonisagedust. Peptidoglükaani sünteesi või taaskäitlusega seotud valkude seos mutatsiooniprotsessidega ei ole selge, aga selle uurimine võib anda aimu näiteks antibiootikumide vastu resistentsuse tekkimisele bakteris. Sellest tulenevalt sai minu eesmärgiks uurida Mpl-i seost mutatsioonisagedusega ning püüda kirjeldada selle valgu mõju *P. putida* fenotüübile.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Peptidoglükaan

Peptidoglükaan (PG; ka mureiin) on makromolekulaarne heteropolümeer, mis kuulub kõigi bakterite rakukesta koosseisu (Litzinger ja Mayer, 2010). PG-d ei leidu vaid *Mycoplasma* perekonna bakterites, kuna viimastel rakukest puudub (Jeske jt., 2015). PG ümbritseb kotitaolise struktuurina tsütoplasmaatilist membraani ning annab rakule mehhaanilise tugevuse rakusisese osmootse rõhuga toimetulekuks (Vollmer jt., 2008). Siiski pole tegemist jäiga struktuuriga: PG peab säilitama ka teatud dünaamilised omadused, et võimaldada rakul kasvada ning poolduda. On näidatud, et PG-kiht suudab purunemata taluda kuni kolmekordset pindala suurenemist (Koch ja Woeste, 1992). Samuti määrab ning säilitab PG raku kuju. Lisaks leiti, et näiteks pulkbakteris *Escherichia coli* esineb aktiinilaadne valk MreB, mis mõjutab omakorda PG kuju (Osborn ja Rothfield, 2007).

PG koosneb suhkrujääkidest ning aminohapetest. Vaheldumisi esinevad suhkrujäägid N-atsetüülglükoosamiin (NAG) ja N-atsetüülmuraamhape (NAM) on omavahel seotud β -1,4-glükosiidsidemega ning moodustavad jäiga ketilaadse glükaanahela (Joonis 1). NAM-i 3. positsioonis paikneva piimhappe jäägi külge kinnitub peptiidahel, mis koosneb reeglina kolmest kuni viiest aminohapetest, kuid täpne koostis erineb liigiti. Erinevad glükaanahelad seotakse nende peptiidahelate vahele moodustuvate ristsidemete või peptiidsildade abil ühtseks võrgustikuks (Joonis 2) (Vollmer jt., 2008).



Joonis 1. Glükaanahela ehituskivid N-atsetüülglükoosamiin (NAG) ning N-atsetüülmuraamhape (NAM). Joonisel on välja toodud ka NAM 3. Positsioonis asuv piimhappejääk, mille külge kinnitub peptiidahel. (Muudetud, Tortora jt., 2012)

Joonis 2. Lihtsustatud skeem glükaanahelate paiknemisest pulkbakteris. Paralleelsed jooned kujutavad glükaanahelaid ning nooled peptiidahelaid. (Holtje, 1998)

PG ei takista ainete liikumist raku sise- ja väliskeskkonna vahel, kuna tänu PG võrgulaadsele struktuurile on rakukestas umbes 2 nm diameetriga poorid, millest mahuvad vabalt läbi kuni 50 kDa suurused valgud. Suuremate valkude, nagu näiteks viburi ja piili komponentide läbi PG transportimine nõuab ajutisi ümberkorraldusi PG struktuuris. Selle eest hoolitsevad hüdrolaasid, mis lagundavad PG-d lokaalselt (Demchick ja Koch, 1996, Dijkstra ja Keck, 1996).

1.2 Grampositiivsed ja –negatiivsed bakterid

Tsütoplasmaatilist membraani ümbritsevate struktuuride erinevuse järgi eristatakse kahte suurt bakterite klassi: grampositiivsed (GP) ja gramnegatiivsed (GN) bakterid. Nimi tuleneb Taani mikrobioloogi Hans Christian Grami nimest, kes 19. sajandi lõpul töötas välja bakterite värvimise tehnoloogia, mis võimaldas eristada paksu PG-kihiga baktereid (grampositiivsed) õhukese PG-kihiga bakteritest (gramnegatiivsed). Meetod põhines faktil, et paks PG-kiht suudab etanooliga töötlemisel paremini säilitada esialgsel värvimisel kasutatud aluselist värvi, mis GN bakterite õhukesest PG-kihist lihtsasti välja pestakse (Litzinger ja Mayer, 2010). Grampositiivsed bakteriperekonnad on näiteks *Bacillus*, *Staphylococcus* ja *Streptococcus* ning gramnegatiivsed on näiteks *Escherichia* ning *Pseudomonas*. Viimasesse perekonda kuulub ka käesolevas töös uuritud bakter *P. putida*.

GN bakterite ümbris koosneb kolmest kihist: tsütoplasmaatiline ehk sisemembraan, peptidoglükaan- ehk mureiinkiht ja välismembraan. Sisemembraan koosneb fosfolipiidide kaksikkihist ning on barjääriks sise- ja väliskeskkonna vahel, reguleerides ainete liikumist raku ning rakust välja. Kuna bakteritel puuduvad rakusisesed organellid, siis täidab sisemembraan ka kõiki membraanseoselisi funktsioone, nagu näiteks energia tootmine. Samuti paiknevad sisemembraanis rakukesta sünteesi ensüümid (Silhavy jt., 2010). Sisemembraani ümbritseb geeljas periplasma, kus paikneb PG-kiht, mis GN bakteritel on 1–10 nm paksune. Näiteks *E. coli*-s on PG-kiht maksimaalselt 7 nm paksune, kuid *Pseudomonas aeruginosa*-s vaid 3 nm paksune. *E. coli*-l on ka näidatud, et PG-kiht on ühekihiline 75–80% ulatuses ning 20–25% ulatuses kolmekihiline (Labischinski jt., 1991, Matias jt., 2003). Kokku moodustab PG *E. coli* kuivkaalust vaid 3–10% (Litzinger ja Mayer, 2010). Välismembraan on PG-ga seotud lipoproteiini kaudu, mis kinnitub kovalentselt peptiidahelale PG-s. Välismembraanis esineb lisaks fosfolipiididele ka hulgaliselt lipopolüsahhariide, millel on imetaja organismi sattudes tugev antigeenne mõju. Bakterile pakub välismembraan kaitset antibiootikumide ja muude ohtlike kemikaalide vastu ning aitab kaudset ka sisemembraani stabiliseerida (Silhavy jt., 2010).

GP bakteritel välismembraan puudub ning seetõttu vajavad sellised bakterid paksu PG-kihti, mis toestaks nende plasmamembraani. Seetõttu on GP bakterites esinev PG alati mitmekihiline ning 20–80 nm paksune. Selline PG annab bakterile võimaluse taluda kuni 50 atm osmootset rõhku, samas kui GN bakterid suudavad taluda vaid 5 atm. PG moodustab GP raku kuivkaalust 20–60% (Litzinger ja Mayer, 2010, Reith ja Mayer, 2011). Välismembraani puudumise tõttu on GP bakterid märkimisväärselt tundlikumad ka antibiootikumidele (Silhavy jt., 2010).

Grampositiivsete ja –negatiivsete bakterite PG-d erinevad ka koostiselt. Mõlemal puhul moodustab PG selgroo NAM-NAG glükaanahel, kuid erinevused seisnevad NAM-le kinnituva peptiidahela koostises ning peptiidahelate sidemete tüübis. GN bakteris esineb kõige enam peptiidahel L-Ala-D-Glu-m-DAP-D-Ala-(D-Ala). Enamikes GP bakterites on peptiidahela kolmanda positsiooni *meso*-diaminopimelaat (m-DAP) asendatud L-Lys-ga või näiteks spiroheetides L-Orn-ga. Variatsioone esineb ka teistes positsioonides. Näiteks on enamikes grampositiivsetes bakterites teises positsioonis D-Glu asendunud D-Gln-ga. Lisaks on täheldatud liigispetsiifilisi variatsioone. Näiteks viienda positsiooni D-Ala, mille eemaldamisel vabaneb ristsideme loomiseks vajalik energia, võib osadel liikidel olla asendunud Gly, D-Ser või D-piimhappe molekuliga. Muutused viiendas positsioonis on seostatud resistentsuse tekkimisega vankomütsiini vastu (Vollmer jt., 2008, Litzinger ja Mayer, 2010). GP bakterites tekivad peptiidahelate vahelised ristsidemed tavaliselt 1–7 aminohappelise peptiidsilla abil, kuid GN bakterites peptiidsilla ei esine, ning ristside tekib otseselt kahe peptiidahela aminohapete vahele. Mõlemal juhul tekib side neljandas positsioonis paikneva D-Ala ja kolmandas positsioonis paikneva m-DAP-i (GN bakterid) või L-Lys (GP bakterid) vahele (Vollmer jt., 2008). GN bakterites on ristseotud alla 50% peptiidahelatest, kuid GP bakterites on näidatud, et ristseotud on kuni 90% peptiidahelatest (Vollmer ja Höltje, 2004, Litzinger ja Mayer, 2010).

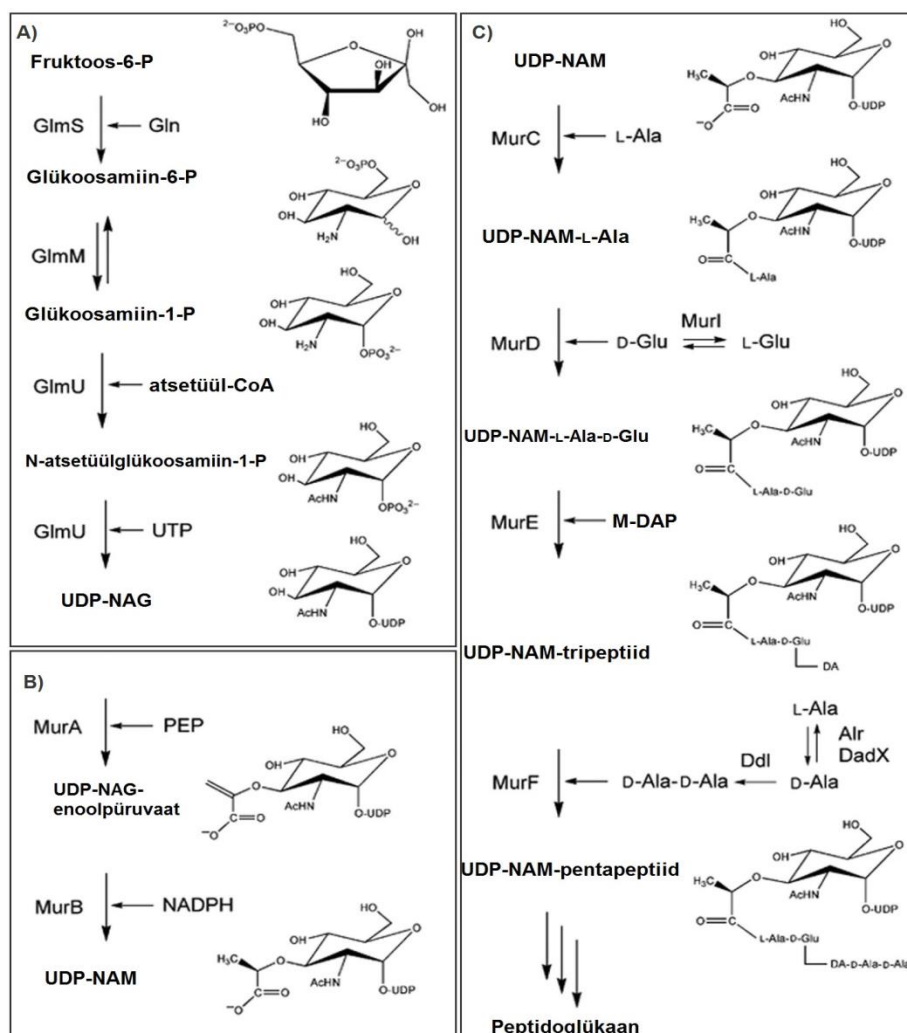
Glükaanahelate pikkuses esineb samuti liigiti suuri erinevusi, kuid märkimist väärib, et ahela pikkus pole korrelatsioonis PG paksusega. Nii näiteks on grampositiivsete *Bacillus* perekonna bakterite glükaanahela pikkus 50–250 kaksiksuhkru ühikut (NAM-NAG), aga samuti grampositiivse *Staphylococcus aureus*-e glükaanahelate keskmine pikkus on vaid 18 kaksiksuhkru molekuli (Ward, 1973). GN bakterites leidub samuti nii pikki (50 ühikut *Morganella morganii*-s) kui ka lühikesi (<10 ühikut *Helicobacter pylori*-s) glükaanahelaid (Costa jt., 1999, Vollmer jt., 2008). Lisaks kuuluvad GP bakterite PG-sse ka teihhuhapped, mida GN bakterite rakuseinas ei esine. Need on glütserool-fosfaatide või ribitool-fosfaatide polümeerid, mis kinnituvad PG-sse (seinateihhuhapped) või plasmamembraani

(lipoteihhuhapped) külge. Arvatakse, et teihhuhapete funktsiooniks on laetud osakeste transport läbi PG (Neuhaus ja Baddiley, 2003). Seinateihhuhapped esinevad GP bakteri PG-s väga tihedalt ning moodustavad kuni 50% rakukesta massist (Litzinger ja Mayer, 2010).

1.3 Peptidoglükaani süntees

Peptidoglükaanist „kott“ peab suurenema, et võimaldada bakteril kasvada. Selle protsessi käigus toodavad süntetaasid pidevalt juurde uusi PG-ahelaid, kuid samaaegselt töötavad ka hüdrolaasid, mis tekitavad olemasolevasse PG-sse lõikeid, kuhu värskelt sünteesitud glükaanahelad sisestada. Ilma hüdrolaaside tööta saaksid uued molekulid liituda vaid vabade peptiidahelate külge ning mitte vanade PG-ahelate vahele ning PG-kiht kasvaks ainult paksemaks. Seega on tegemist täpset regulatsiooni vajava protsessiga, sest liiga aeglane PG tootmine pärsiks bakteri kasvu, kuid liialt suur hüdrolaaside aktiivsus seaks ohtu rakukesta terviklikkuse (Typas jt., 2012).

PG biosünteesiga seotud protsessid võib nende toimumise asukohast lähtuvalt jagada kolmeks: tsütoplasmas, sisemembraanis ning periplasmas toimuvad reaktsioonid. Kõigepealt toimub tsütoplasmas PG nukleotiidseoseliste prekursorimolekulide ning peptiidahela süntees. Esmalt konverteeritakse kolme ensüümi (GlmS, GlmM ning GlmU) abil fruktoos-6-fosfaat uridiindifosfaat-N-atsetüülglükoosamiiniks (UDP-NAG) (Joonis 3A). Seejärel muudetakse ensüümide MurA ning MurB abil osa UDP-NAG-st uridiindifosfaat-N-atsetüülmuraamhappeks (UDP-NAM) (Joonis 3B). Viimaks lisatakse ligaaside abil UDP-NAM-i piimhappe jäägi külge aminohapped. Bakteris *E. coli* on nendeks L-Ala (ensüüm MurC), D-Glu (MurD), m-DAP (MurE) ning dipeptiid D-Ala–D-Ala (MurF). D-aminohappeid toodavad L-aminohapetest ratsemaasid (MurI, Alr, DadX) ning dipeptiidi D-Ala–D-Ala ligaas (Ddl) (Joonis 3C) (Barreteau jt., 2008). MurE ligaasi substraadi spetsiifilisus varieerub liigiti. Näiteks suudab *E. coli* MurE (mille eelistatud substraat on m-DAP) siduda L-Lys-i väga nõrgalt, kusjuures sellise peptiidahela lülitamine PG-sse põhjustab bakterirakkude lüüsumise. Samas ei suuda *S. aureus*-e MurE m-DAP-d üldse siduda ning lülitab ahelasse vaid GP bakterile omaselt L-Lys-i (Mengin-Lecreulx jt., 1999, Barreteau jt., 2008). Kõik eelpool mainitud Mur ligaasid on bakterile eluks hädavajalikud, sest PG-sse saab lisada vaid korrektse ning täieliku peptiidahelaga molekule. Seega on Mur ligaasid potentsiaalseteks sihtmärkideks antimikroobsetele ühenditele. Praegu kasutusel olevatest ühenditest on selline näiteks fosfomütsiin, mis seondub kovalentselt MurA-ga ning inaktiveerib ensüümi (El Zoeiby jt., 2003).

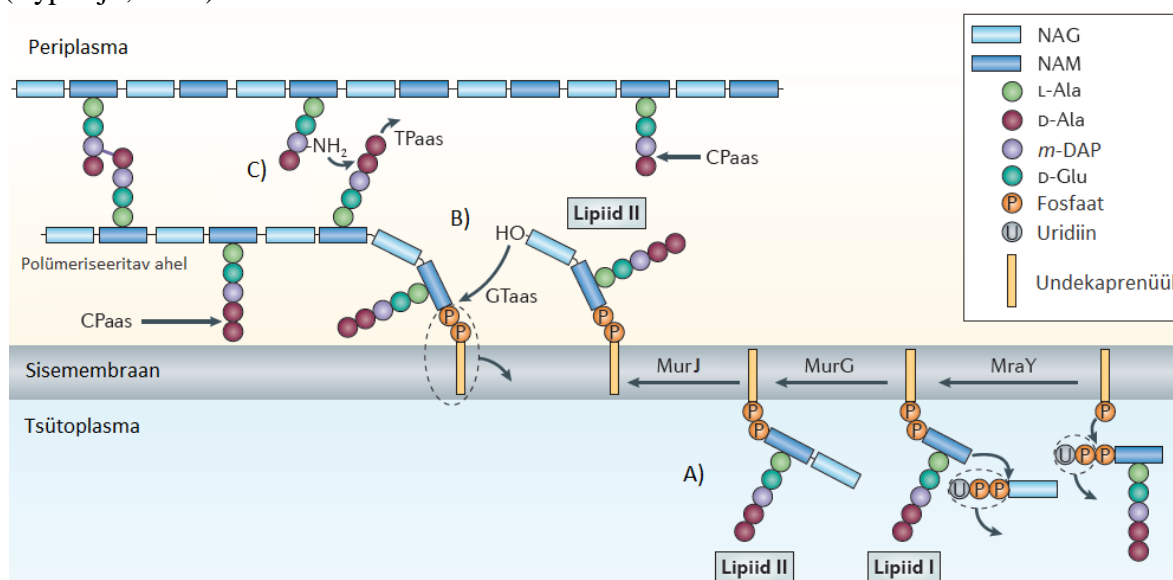


Joonis 3. PG prekursorite biosüntees. A) Fruktoos-6-P konverteerimine UDP-NAG-ks. B) UDP-NAG konverteerimine UDP-NAM-ks. C) UDP-NAM-le peptiidahela lisamine. Iga reaktsiooni juures on näidatud produkti keemiline struktuur. (Muudetud, Barreteau jt., 2008)

Järgmine oluline etapp PG sünteesil toimub sisemembraanis, mille sisemisel küljel toimub esialgu nukleotiidiseoseliste prekursorite liitmine lipiidse kandjaga ning seejärel viiakse need läbi sisemembraani (Joonis 4A). Lipiidse kandjaga liitumine on vajalik seetõttu, kuna tsütoplasmas sünteesitud PG prekursorid on hüdrofiilsed ning ei suuda hüdrofoobset sisemembraani iseseisvalt läbida. Selle jaoks katalüüsib valk *MraY* UDP-NAM-pentapeptiidi liitumist sisemembraani ankurdatud lipiidile undekaprenüül-fosfaat mille tulemusena tekkiwat produkti (undekaprenüül-P-P-NAM-pentapeptiid) nimetatakse lipiidiks I. Edaspidi katalüüsib *MurG* UDP-NAG-st NAG liitumist lipiid I-le, mille tulemusena tekib undekaprenüül-P-P-NAM(-pentapeptiid)-NAG, või lihtsustatult lipiid II. Lipiidide I ja II tekkimisega vabaneb mõlemal juhul ka UMP (Bouhss jt., 2008). Hiljuti avastati *E. coli*-s flipaas *MurJ*, mis transpordib lipiid II sisemembraani tsütoplasmaatiliselt periplasmaatilisele küljele (Sham jt., 2014). Lipiid I ja II ning nende sünteesi ning transpordiga seotud ensüümid on bakterile elutähtsad ning seega samuti potentsiaalseteks sihtmärkideks antibakteriaalsetele ühenditele

(Bouhss jt., 2008). MurG ning MraY puhul on näidatud nende interakteerumist pulkbakteri pikkusesse kasvu reguleeriva valguga MreB-ga. See võimaldab bakteril vajadusel kontrollida PG sünteesi kiirust, et soodustada bakterit kasvu või alustada raku jagunemist (Mohammadi jt., 2007).

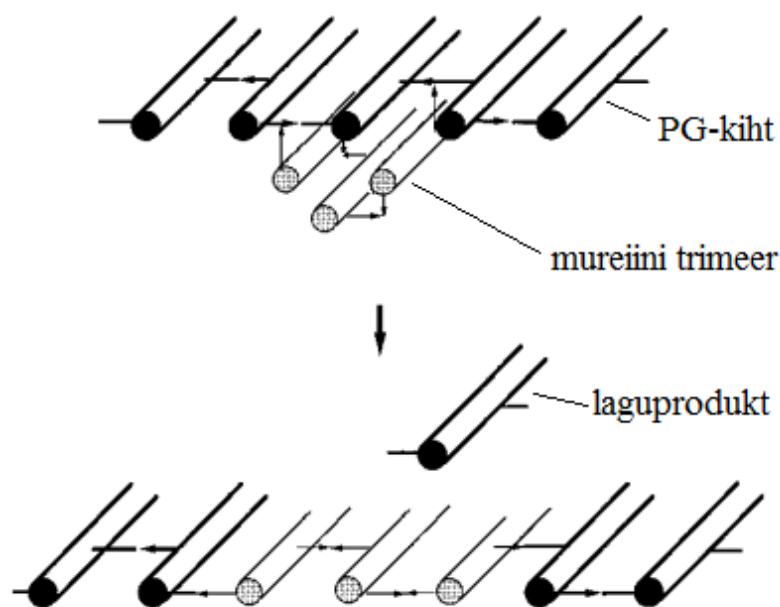
Viimane kompleksne reaktsioon leiab aset periplasmas ning hõlmab endas peamiselt kahte tüüpi reaktsioone: glükaanahelate polümeriseerimine ning peptiidahelate ristsidumine (Typas jt., 2012). Polümeriseeritav glükaanahel on alati seotud lipiidse kandjaga viimati lisatud NAM-NAG kaudu. Glükosüültransferaas (GTaas) katalüüsib uue lipiid II NAG 4. positsiooni hüdroksüülrühma ning polümeriseeritava ahela viimase NAM 1. positsiooni süsiniku vahele glükosiidsideme tekkimist, mille tagajärjel vabaneb NAM lipiidse kandja küljest (Joonis 4B) (van Heijenoort, 2007). Paralleelselt toimuv peptiidahelate ristsidumine toimub transpeptidaasi (TPaas) abil, mis katalüüsib transpeptidatsiooni reaktsiooni, mille korral lõigatakse doonor peptiidahelast välja 5. positsiooni aminohape ning selle tagajärjel tekkivat energiat kasutatakse peptiidsideme loomiseks teise peptiidahelaga (Joonis 4C) (Holtje, 1998). Bakterites leidub mitmeid ensüüme, mis omavad nii GTaas kui ka TPaas aktiivsust. Nende hulka kuuluvad mitmed nn penitsilliini siduvad valgud (ingl. k *penicillin binding protein* – PBP), mille nimi tuleneb sellest, et need avastati nende omaduse tõttu siduda penitsilliini, mille käigus muutub antud ensüüm inaktiivseks ning peatub PG süntees. See omakorda viib rakud lüüsumiseni. Hiljem on näidatud, et PBP-dele mõjuvad sarnaselt kõik β -laktaamsed antibiootikumid (Spratt, 1983). Ristsidumata peptiidahelatel kärpivad karboksüpeptidaasid (CPaas) ära viienda ning mõningatel juhtudel ka neljanda aminohappe (Typas jt., 2012).



Joonis 4. Peptidoglükaani sünteesi reaktsioonid sisemembraanis ning periplasmas. A) Lipiid II moodustumine. B) Glükaanahelate polümeriseerimine GTaasi toimetel. C) Peptiidsidemete tekkimine polümeriseeritava ahela ja PG-kihi ahela vahele TPaasi toimetel. Lisaks on näidatud CPaasi peptiidahelate kärpimist. Lihtsuse mõttes pole välja toodud kõiki peptiidahelaid. (Muudetud, Typas jt., 2012)

1.4 Peptidoglükaani lagundamine ja taaskäitlus

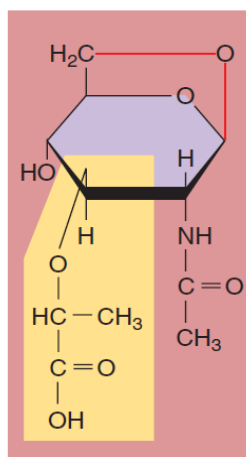
Värskest sünteesitud glükaanahelate lisamine olemasoleva PG-kihi vabade peptiidahelate külge suurendaks vaid PG-kihi paksust, kuid ei võimaldaks bakteriraku kasvu pikkusesse. Seetõttu leidub rakus erinevaid hüdrolyütilisi ensüüme, mis erineval moel glükaanahelate vahelisi sidemeid lõhuvad. *E. coli*-s on leitud 14 erinevat PG-d lagundavat hüdrolaasi, millest osad võivad täita sama ülesannet ehk lõhkuda sama sidet (Vollmer, 2012). Täpse mehhanismi kohta, kuidas glükaanahelaid PG-kihti lisatakse, on erinevaid teooriaid. GP bakterites arvatakse see järgivat nn „loo-siis-lõhu“ põhimõtet, kus uued ahelad sünteesitakse pinge all oleva kihi alla ning ristseotakse juba seal. Seejärel lõhuvad endopeptidaasid pinge all olevas kihis peptiidsidemed ning vanad ahelad vabanevad periplasmasse, mille tagajärjel „tõmmatakse“ uus kiht pingule. GN bakterite puhul on pakutud välja nn „kolm-ühe-vastu“ mehhanism, mille puhul sünteesitakse glükaanahelate trimeer, millega asendatakse üks glükaanahel PG-kihis (Joonis 5) (Holtje, 1998). *E. coli*-s on näidatud, et 30% raku pooldumise ajal moodustunud PG-st lagundatakse lühikese perioodi jooksul pärast pooldumist. Arvatakse, et seda põhjustab see, et raku pooldumise jaoks sünteesitavas rakuvaheseinas ehk septumis luuakse PG kolmekihilisena, millest keskmine lagundatakse rakkude eraldamiseks (Park ja Uehara, 2008). PG-d lagundatakse lokaalselt ka viburi ja sekretsioonisüsteemide kokkupanekul (Nambu jt., 1999, Zahrl jt., 2005).



Joonis 5. „Kolm-ühe-vastu“ mehhanism, millega GN bakterites lisatakse PG-kihti glükaanahelaid. Vanad glükaanahelad on kujutatud otsast mustade torudena, lisatavad glükaanahelad on otsast hallid. Peptiidahelad nende vahel on kujutatud nooltega. (Muudetud, Holtje, 1998).

Nagu eelpool mainitud, lõhuvad endopeptidaasid peptiidahelate vahelisi ristsidemeid, mille tulemusena glükaanahelad vabanevad üksteise küljest. Samaaegselt katalüüsivad glükaanahelates glükosiidsidemete lõhkumist lüsotsüümid, vabastades NAM-NAG, ja lüütilised transglükosülaasid, mille tulemusena vabaneb anhüdro-NAM-NAG (anh-NAM-NAG) (Joonis 6). Anh-NAM-NAG roll pole täpselt teada, kuid on arvatud, et seeläbi on bakteris selgelt eristatavad PG-st väljalõigatud ning alles sünteesimisjärgus glükaanahelad. Mõlemal juhul võib PG-st väljalõigatud molekuliga seotud olla veel erinev hulk peptiide (Holtje, 1998, Park ja Uehara, 2008). On näidatud, et ühes generatsioonis lagundatakse kuni 50% bakteri PG-st. Sellise koguse rakumaterjali kaotamine tähendaks bakterile suurt energiakadu, kuid näiteks *E. coli*-s eraldub kasvukeskkonda vaid 6–8% lagundatud PG komponentidest. Seega oletati, et lagundatud komponente taaskasutatakse. Hüpootees leidis kinnitust ning praeguseks on kirjeldatud rajad, kuidas GN bakterid erinevaid produkte taaskäidelda suudavad (Goodell, 1985, Park ja Uehara, 2008). GP bakterites on samuti täheldatud kuni 50% ulatuses PG lagundamist. Samas arvati algselt, et GP bakterid ei taaskäitle PG laguprodukte, sest välismembraani puudumine võimaldab lagundatud produktidel hõlpsasti kasvukeskkonda difundeeruda ning bakterites puudub taaskäitluse võtmeensüüm AmpG. Hiljuti on näidatud, et GP bakterites esineb siiski üksikute taaskäitlusraja ensüümide ortolooge, mis annab alust arvata, et GP bakterid suudavad siiski mingil moel taaskasutada PG laguprodukte, kuid täpset rada ei ole praeguseks kirjeldatud (Reith ja Mayer, 2011). Laboritingimustes rikkal söötmel kasvades ei ole PG taaskäitus bakterile elutähtis, kuid toitainete vähenemisel kasvukeskkonnas võib see osutada vajalikuks raku jagunemise lõpule viimiseks ning sisenemiseks statsionaarsesse faasi (Park ja Uehara, 2008).

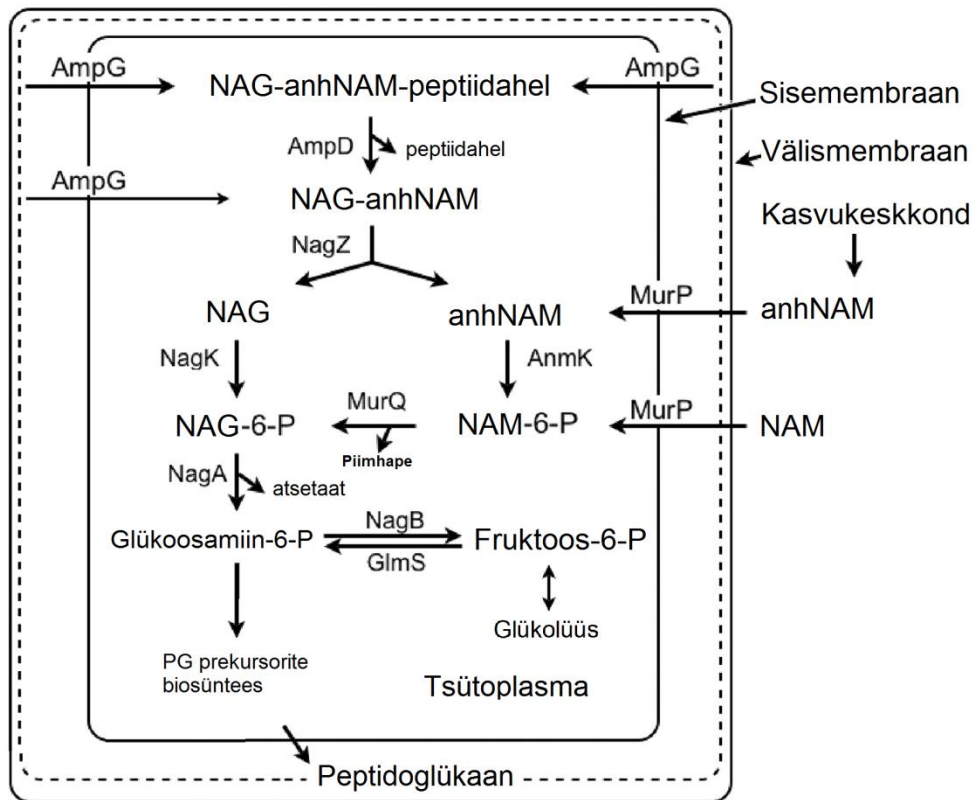
Anhüdro-N-atsetüül-muraamhape
(anhNAM)



Joonis 6. Anhüdro-N-atsetüül-muraamhape struktuurivalem. Punasega on märgitud anhüdroiidside. AnhNAM võib olla seotud NAG-ga 4. positsiooni hapniku kaudu. Kollasel taustal on piimhappejääk, mille külge võib olla kinnitunud peptiidahel. (Muudetud, Tortora jt., 2012)

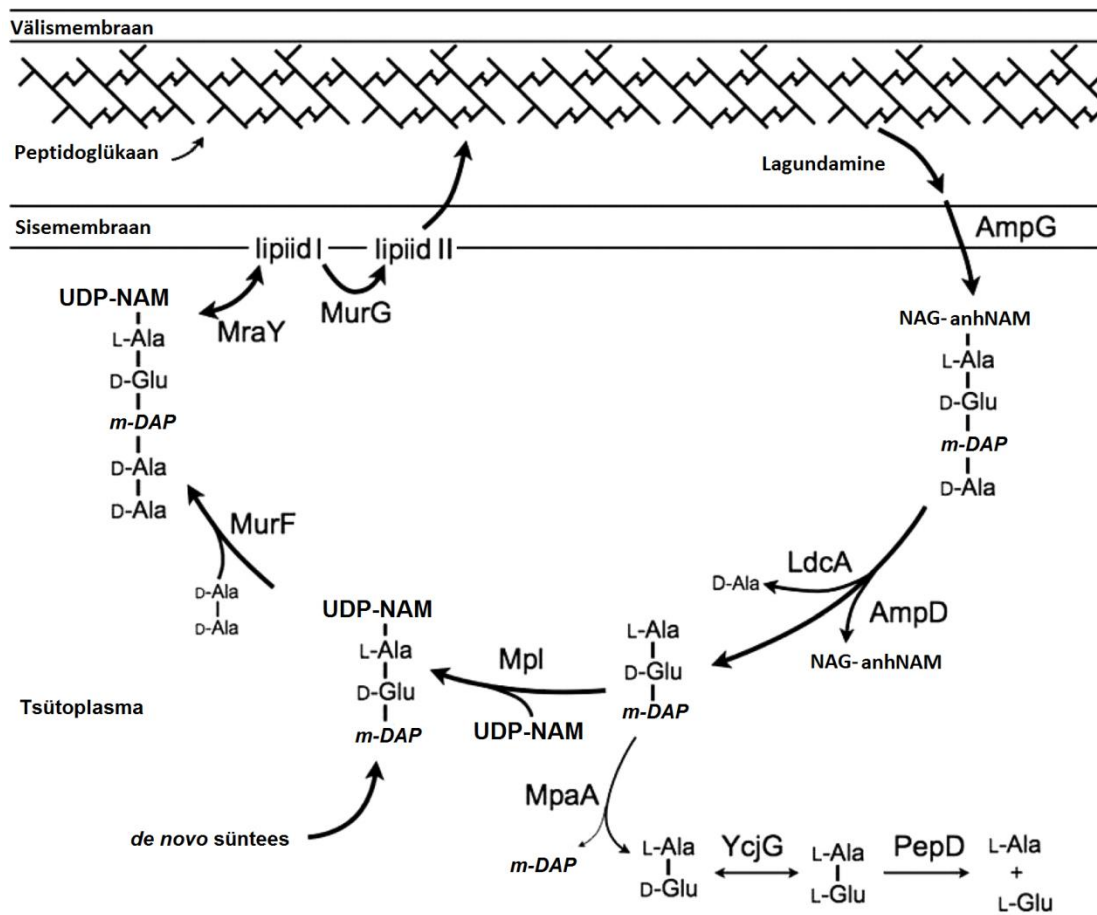
PG lagundamisel lüütiliste transglükosülaasidega tekivad anhüdro-muropeptiidid (Anh-NAM-NAG + peptiidahel), mis transporditakse periplasmast tsütoplasmasse sisemembraanil paikneva permeaasi AmpG kaudu. AmpG on taaskäitlusraja võtmeensüümiks, selle puudumisel suudab rakk taaskasutada vaid tühist osa PG laguproduktidest, mis jõuavad tsütoplasmasse läbi sekundaarsete transporterite (Park ja Uehara, 2008). AmpG on küllaltki spetsiifiline substraadi suhtes, suutes siduda üksikut või peptiidahelaga seotud anh-NAM-NAG-d, kuid mitte NAM-NAG-d, üksikuid aminosuhkruid või eraldiseisvaid peptiidahelaid (Cheng ja Park, 2002). AmpG on oluline, kuna enamik taaskäitlusraja ensüüme paikneb tsütoplasmas. Anhüdro-muropeptiidide sattumisel tsütoplasmasse katalüüsib NagZ anhüdro-NAM ja NAG vahelise sideme katkemist. AmpD katkestab omakorda sideme peptiidahela ja anh-NAM vahel. NagZ ja AmpD puhul ei ole oluline, mis järjekorras nad töötavad, kuid nende kahe ensüümi tulemusena vabanevad kolm produkti: anh-NAM, NAG ning peptiidahel, mis sõltuvalt substraadist võib koosneda 3-5 peptiidist (Park ja Uehara, 2008). Terve bakteri PG-s on enamik peptiidahelaid tri- või tetrapeptiidid, liiga suur pentapeptiidide osakaal viitab sellele, et PG-s on inhibeeritud PBP-de töö ehk ristsidemete loomine. Arvatakse, et suurel hulgal pentapeptiidide esinemine taaskäitlusrajas indutseerib β -laktamaasi tootmist, mis inaktiveerib β -laktaamsed antibiootikumid ning peatab PBP-de tegevuse inhibeerimise. Seeläbi võimaldab taaskäitlusrada bakteril omada ülevaadet PG seisundist (Litzinger ja Mayer, 2010).

Edasi jaguneb taaskäitlusrada kaheks: aminosuhkrute taaskasutus (Joonis 7) ning peptiidahelate taaskasutus (Joonis 8). Aminosuhkrute taaskasutuses toimub esmalt nii NAG kui ka anhNAM-i fosforüleerimine ning anhNAM-i puhul ka anhüdriidsideme katkestamine. Neid reaktsioone viivad läbi kinaasid NagK (substraat NAG) ning AnmK (anhNAM). Tulemuseks on vastavalt NAG-6-P ning NAM-6-P. Mõneti üllatuslikult konverteeritakse ensüümi MurQ abil NAM-6-P piimhappejäägi eemaldamise kaudu NAG-6-P-ks, mis tähendab, et bakteris puudub võimalus anhNAM-ist otse uue NAM-i tootmise võimalus. Järgnevalt deatsetüleerib NagA NAG-6-P ning vabaneb glükoosamiin-6-P, mis on juba PG biosünteesi vaheühend (Joonis 3A) (Johnson jt., 2013). Glükoosamiin-6-P-d suudab bakter NagB abil vajadusel konverteerida fruktoos-6-P-ks, mis on glükolüüsi vaheühendiks ja see tähendab, et PG lagundamisel vabanenud aminosuhkruid võib bakter ka otseselt energia tootmisel kasutada. On näidatud, et tänu transferaasile MurP, mis suudab NAM-i ka kasvukeskkonnast tsütoplasmasse transportida, võib bakter kasvada ka söötmel, kus ainsaks süsiniku- ja energiallikaks on NAM (Dahl jt., 2004).



Joonis 7. Aminosuhkrute taaskäitlusrada. (Muudetud, Park ja Uehara 2008)

Vabade peptiidahelate taaskasutus algab peptidaasi LdcA-ga, mis eemaldab tetrapeptiididelt D-Ala. Vabaneva tripeptiidi (L-Ala-D-Glu-m-DAP) suudab ligaas Mpl lülitada otse UDP-NAM külge, tekitades UDP-NAM-tripeptiidi, mis on juba PG biosünteesi raja vaheühend (Joonis 3C) (Park ja Uehara, 2008). LdcA tegevus on ülioluline, kuna Mpl suudab substraadina lisaks tripeptiidile kasutada ka tetrapeptiidi, kuid kuna peptiidahela pikendamisel liidetakse 4. ja 5. aminohape korraga 3. positsiooni m-DAP-i külge, jääks tetrapeptiid pikendamata. Sellise peptiidahelaga glükaanahelate lülitamisel PG-sse, ei ole nende vahel võimalik luua ristsidemeid ning PG struktuur nõrgeneb. On näidatud, et *ldcA* geeni deleteerimisel on bakterid hilises kasvufaasis suurema läbimõõduga ja ovaalsed ning paljud rakud lüüesuvad (Templin jt., 1999). *E. coli*-s on *ldcA* ainuke taaskäitlusraja geen, mille mutatsioonil on selge efekt bakteri fenotüübile (Park ja Uehara, 2008). *E. coli*-s kasutab Mpl üle 90% tsütoplasmas leiduvast tripeptiidist, kuid siiski on olemas ka alternatiivne võimalus, mille puhul lagundatakse tripeptiid üksikuteks aminohapeteks (Mengin-Lecreulx jt., 1996, Park ja Uehara, 2008). Seda viivad läbi kolm ensüümi: MpaA, mille tulemusena vabaneb m-DAP ja dipeptiid L-Ala-D-Glu; YcjG, mis konverteerib dipeptiidi L-Ala-L-Glu-ks ning viimaks PepD, et lahutada dipeptiidi aminohapped omavahel. Kui ülejäänud taaskäitlusraja ensüümidele on PG-d taaskäitlevates GN bakterites ortoloogid olemas, siis MpaA ja YcjG ortolooge esineb vähem (Park ja Uehara, 2008).



Joonis 8. Peptiidahela taaskäitlusrada. (Muudetud, Park ja Uehara, 2008)

1.5 Mureiini-peptiidi ligaas ehk Mpl

Juba varased uuringud PG taaskäitluse kohta näitasid, et uue PG sünteesimiseks kasutatakse kuni 30% ulatuses tsütoplasmas leiduvat tripeptiidi ilma, et seda rohkem lagundataks. Sellest lähtuvalt eeldati, et eksisteerib vastav ligaas (Goodell, 1985, Mengin-Lecreulx jt., 1996). Eialgu arvati, et ligaasina võiks toimida MurC, mille kohta oli teada, et ta suudab UDP-NAM-ile lisada üksiku L-Ala ehk tripeptiidi esimese lüli (Joonis 3C). Hüpoteesi kontrollimisel aga leiti, et MurC-l puudub igasugune võime tripeptiidi substraadina kasutada (Liger jt., 1995). Siiski, kuna oli teada, et erinevad Mur-ligaasid omavad teatud sarnaseid motiive, otsiti *E. coli* kromosoomist veel sarnaseid järjestusi ning avastati, et ühe avatud lugemisraami produktil YjfG-1 on 28,7% sarnasus MurC aminohappejärjestusega. YjfG geeni katkestamisel lakkasid bakterid tripeptiidi kasutamast, kuid selle geeni üleekspressiooni tulemusena suurenes tripeptiidide kasutamine bakteris. Sellest järeldati, et leitud geen kodeeribki otsitud ligaasi ning vastav geen nimetati ümber *mpl*-ks (Mengin-Lecreulx jt., 1996).

Mpl on taaskäitlusrajas oluline ensüüm ning selle nimi – mureiini-peptiidi ligaas – on tuletatud tema substraatidest. Täpsemalt on tema substraatideks UDP-NAM ning m-DAP-i

sisaldav peptiidahel. Valdavalt on selliseks peptiidahelaks bakteris taaskäitlusraja tripeptiid L-Ala-D-Glu-m-DAP, kuid Mpl suudab efektiivselt siduda ka tetra- ja pentapeptiidi. Lys-i sisaldavaid peptiidahelaid seob Mpl nõrgalt ning see võib olla põhjuseks, miks Mpl-i ortolooge GP bakterites, kus peptiidahela kolmandas positsioonis on just Lys, ei esine (Hervé jt., 2007). Mpl-defektsus ei ole bakterile letaalne ega põhjusta muutusi PG struktuuris ega koguses. Mpl-i üleekspressioon ei suuda asendada MurC-defektsust ning on rakkudele pigem kahjulik, põhjustades häireid morfoloogias ning lüüsumist eksponentsiaalses kasvufaasis (Mengin-Lecreulx jt., 1996).

Meie laboris on Heili Ilves välja töötanud testsüsteemi lac-lsc, mis võimaldab *Pseudomonas*-e perekonna bakterites avastada uusi mutatsioonisagedust mõjutavaid gene. Kombineerides testsüsteemi lac-lsc transposoonmutageneesiga, õnnestus bakteris *P. putida* detekteerida arvukalt gene, mille varasemat seost mutatsioonisagedusega pole näidatud. Üllatuslikult kuulus ka *mpl* nende geenide hulka, mille juhuslik katkestus minitransposooniga võimaldas detekteerida muutusi mutatsioonisageduses. Esialgsed katsed *mpl* transposoonmutandiga näitasid, et antud geeni katkestus suurendab eksponentsiaalse ja statsionaarse faasi mutantide tekkesagedust bakteris *P. putida*. (Tagel jt., 2016; avaldamata)

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Terviklik peptidoglükaan on bakterirakule ülioluline, kaitstes baktereid osmootselt rõhust tingitud võimaliku lüüsumise eest ning hoides bakteriraku kuju. Kuna bakterit ümbritsev keskkond võib pidevalt muutuda, siis ei saaks sellist ülesannet täita staatiline struktuur. PG säilitab dünaamilised omadused tänu pidevatele sünteesidele ja lagundamistele, mis peavad olema täpselt reguleeritud, et nende käigus ei satuks ohtu PG mehaaniline tugevus. Lagundatud produktide kaotamine tähendaks rakule suurt ressurside kadu. Selle vältimiseks on eelkõige GN bakterites arenenud välja nn PG taaskäitlus, mille abil suudab bakter taaskasutada PG laguprodukte uute PG ahelate sünteesiks. Selliste protsesside kaudu säästab bakter lisaks ressursidele ka energiat, kuna taaskasutatakse *de novo* sünteesiraja vaheprodukte.

Mõneti üllatuslikult ilmnes meie labori varasemates katsetes, et PG taaskäitlusraja olulise geeni *mpl* katkestamine *Pseudomonas putida* rakkudes tõstis mutatsioonide tekkesagedust. Nende tulemuste paikapidavuse kinnitamiseks ning Mpl-i funktsioonide täpsemaks väljaselgitamiseks bakteris *P. putida* said minu töö eesmärkideks seatud:

- konstrueerida *P. putida* tüved, milles geen *mpl* oleks deleteeritud
- võrrelda saadud tüvede mutatsioonisagedust varasemalt isoleeritud *mpl*-i defektse transposoonmutandiga
- kirjeldada geeni *mpl* defektsusest tulenevaid fenotüübilisi iseärasusi *P. putida* rakkudes

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Bakterite kasvatuseks kasutati LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöödet (Miller, 1992) või M9-glükoos-CAA söödet (edaspidi glc CAA), mille valmistamiseks lisati M9 puhvrise (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl) mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 µM MgO, 50 µM CaCO₃, 40 µM FeSO₄, 12,5 µM ZnSO₄, 12,5 µM MnSO₄, 2,5 µM CuSO₄, 2,5 µM, CoSO₄, 1,9 µM H₃BO₄), glükoosi (glc; lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ning kaseiini hüdroolüsaati (CAA; ingl k *casamino acids*; lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Bakterite kasvatamisel vedelsöötmes aereeriti kultuure loksutil. Tardsöötme valmistamiseks lisati söötmesse agarit 1,5 g/l.

Selektsioonimarkeritena kasutati järgmisi antibiootikume: kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml), bensüülpenitsilliin (Bp; 1,5 mg/ml) ja rifampitsiin (Rif; 100 µg/ml). *P. putida* rakke kasvatati temperatuuril 30 °C ning *E. coli* rakke temperatuuril 37 °C. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyr A96 thi-1 relA1</i>	(Miller, 1992)
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rspE rpo B argE (Apm)</i>	(Herrero jt., 1990)
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (rB⁺mB⁻) recA13proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1 -1</i>	(Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
PaW85 mpl::Tn5Km	PaW85 tüvest, <i>mpl</i> (PP_0547) katkestatud positsioonis 719 mini-Tn5-ga, Km ^r	(Tagel jt., 2016)
PaW85 Δmpl::Km	PaW85 tüvest, -4–1125 positsioonides <i>mpl</i> deleteeritud, Km ^r	Käesolev töö
PaW85 mpl::Km	PaW85 tüvest, <i>mpl</i> katkestatud positsioonis 396, Km ^r	Käesolev töö

Plasmiidid		
pRK2013	Konjugatiivset ülekannet abistav plasmiid, Km ^r	(Figurski ja Helinski, 1979)
pBluescript KS	<i>E. coli</i> kloonimisvektor, Amp ^r	Stratagene
pUTKm1	<i>Km</i> -geeni sisaldav plasmiid	(De Lorenzo jt., 1990)
pKS/impl1	pBluescript KS, kuhu on <i>mpl</i> -geen koos eelneva ja järgneva alaga kloonitud Ecl136II/HincII saitide vahele	Käesolev töö
pKS/impl1::Km ^r	pKS/impl1, mille <i>mpl</i> -i sees paiknevate HincII saitide vahele on kloonitud <i>km</i> -geen (deleteerides ~1100 bp <i>mpl</i> -geenist)	Käesolev töö
pGP704L	Konjugatiivne plasmiid, Amp ^r	(Pavel jt., 1994)
pGP704L/impl1::Km ^r	pGP704L, mille XbaI ja KpnI saitide vahele on kloonitud impl1::Km ^r fragment	Käesolev töö
pKS/impl2	pBluescript KS, kuhu on <i>mpl</i> -geen koos eelneva ja järgneva alaga kloonitud SmaI saiti	Käesolev töö
pKS/impl2::Km ^r	pKS/impl2, mille <i>mpl</i> -i sees paiknevasse SmaI saiti (<i>mpl</i> -geeni postitsioonis 396) on kloonitud <i>km</i> -geen	Käesolev töö
pGP704L/impl2::Km ^r	pGP704L, mille XbaI ja Eco32I saitide vahele on kloonitud impl2::Km ^r fragment	Käesolev töö

2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja bakterirakkude elektroporatsioon

P. putida kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes. 250 µl üleöökultuuri tsentrifuugiti söötimest välja (1 min 12100 x g) ning pesti 3 korda 750-1000 µl 300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeeriti 50-100 µl 300 mM sahharoosi lahuses.

E. coli kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes. Üleöökultuur lahjendati 4 ml-sse värskesse LB vedelsöötmesse optilise tiheduseni 0,1 (OD₅₈₀) ning kasvatati loksutil veel 2 tundi. Seejärel tsentrifuugiti kogu

rakukultuur kokku (1 min 12100 x g) ning pesti 3 korda 750-1000 µl 10% glütserooli lahusega. Rakud suspendeeriti 50-100 µl 10% glütseroolis. Rakke ja töölahuseid hoiti pidevalt jääl.

Plasmiidse DNA viimiseks kompetentsetesse rakkudesse kasutati elektroporatsiooni. Kompetentsetele rakkudele lisati ~100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning viidi elektroporatsiooniküvetti. Elektroporatsioon viidi läbi pingel 2,5 kV, kasutades firma *BioRad* elektroporaatorit „*E. coli* pulser“. Elektroporeerimise järgselt lisati rakkudele 800 µl LB söödet ja pesti küvetist välja. Seejärel kasvatati rakke loksutil 1 tund temperatuuril 30 °C (*P. putida*) või 37 °C (*E. coli*), mille järgselt plaaditi rakud selektiivsöötmele.

2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i kasutati tüvede ning konstruktide õigsuse kontrollimiseks. PCR reaktsioonisegu lõppmahuks oli 20 µl, mis sisaldas 1x PCR-puhvrit (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 10 mM tartrasiin; 0,5% Ficoll 400), 10 pmol kumbagi praimerit; 0,5 U Taq DNA polümeraasi ja matriits-DNA-d. Lõppmahuni viidi reaktsioonisegu destilleeritud veega. Töös kasutatud praimerid on toodud tabelis 2.

PCR tsükkel koosnes kolmest osast: DNA denaturatsioon temperatuuril 96 °C 30–60 sekundit; praimerit seondumine matriits-DNA-le temperatuuridel 53–58 °C (sõltuvalt praimerist); DNA süntees temperatuuril 72 °C 30–90 sekundit (sõltuvalt amplifitseeritava fragmendi pikkusest, Taq polümeraasi puhul põhimõttel 1000 bp – 60 sekundit). Tsükleid korrati 25 korda. Esimesele tsüklile eelnes 120-sekundiline eelkuumutus temperatuuril 96 °C rakkude lõhkumiseks. Viimasele tsüklile järgnes 2–4 minuti pikkune järelsüntees temperatuuril 72 °C, mil sünteesiti lõpuni kõik pooleli olevad fragmendid.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Praimer	Primeri järjestus (restriktaasi lõikesait allajoonitud)	Iseloomustus
Mpl-ees- <u>XbaI</u>	5'-AATCTAGAGCTCGCATTCTAACTGGCCAG-3'	Kasutati <i>mpl</i> -geeni ja sellega kõlgnivate alade amplifitseerimiseks
Mpl- <u>EcoRI</u> -ubiD	5'-AGAATTCAGCTTGAGCATGTTTTCCAG-3'	
KmSac	5'-CAGGAGCTCGTTCGATTTATTCAACAAAGCC-3'	<i>Km</i> -geeni amplifitseerimiseks (lõikesait <u>Ecl136II</u>)
Fw	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Plasmiidi pBluescript KS universaalprimerid
Rev	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	
Mpl-ees-alum- <u>XhoI</u>	5'-TACTCGAGATAGACGTTGGCGTCAGA-3'	Kasutati konstrukti kontrolliks Seondub <i>mpl</i> -geeni algusesse, suunaga geenist välja
Km0	5'-GTGCAATGTAACACTAGAGATTTT-3'	Kasutati konstrukti kontrolliks Seondub <i>km</i> -geeni ette, suunaga geenist välja
Km4	5'-AATTGGTTGTAACACTGGCAGA-3'	Kasutati konstrukti kontrolliks Seondub pärast <i>km</i> -geeni lõppu, suunaga geenist eemale
Mpl-start- <u>SalI</u>	5'-GAGGTCGACCATGCATATTCA-3'	Kasutati konstrukti kontrolliks Seondub <i>mpl</i> -geeni algusesse, suunaga geeni poole
Mpl-lõpp- <u>SalI</u>	5'-TATGTCGACTCACTTCAGCGCCTCGGC-3'	Kasutati konstrukti kontrolliks Seondub <i>mpl</i> -geeni lõppu, suunaga geeni poole

2.2.4 Plasmiidi eraldamine ja restriksioonanalüüs

Rakkudest plasmidse DNA eraldamiseks kasutati firma *Favorgen* plasmidieraldus komplekti *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*, järgides tootja etteantud protokollit.

DNA restriksiooniks kasutati firma *Thermo Scientific* restriktase, järgides tootja etteantud tingimusi.

2.2.5 Geelektroforees

PCR-i produktide ja restriktiaasidega lõigatud DNA-d analüüsiti geelektroforeesil. Restriksioonsegule lisati geelektroforeesi värvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis), PCR-produktile värvi ei lisatud, kuna kasutatud PCR-puhver juba sisaldab värvi (10 mM tartrasiin). Proovid kanti 1% agarosgeelile 1 x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. DNA fragmentide umbkaudseks võrdlemiseks kasutati firma *Thermo Scientific* DNA markerit. Elektroforees viidi läbi pingel 120–150 V. Tulemused visualiseeriti UV valguses.

2.2.6 Kloonimine

Kloonimisel kasutati DNA restriksiooniks, ligeerimiseks ja vektori aluselise fosfataasiga töötlemiseks firma *Thermo Scientific* ensüüme, järgides tootja etteantud tingimusi. Kloonimisel kasutatud restriksioonisegud, PCR-i produktid ja ligaasisegud sadestati, lisades 2,5-kordses mahus 96% etanooli ja 0,1-kordses mahus 5 M NaCl lahust. DNA-d sadestati temperatuuril –20 °C 10 minuti jooksul, mille järel sadet tsentrifugeeriti temperatuuril 4 °C (10 minutit 12 000 g) ning pesti kaks korda 75% etanooliga. Saadud sade kuivatati temperatuuril 37 °C ning suspendeeriti 10 µl destilleeritud vees.

2.2.7 *Mpl*-defektsete tüvede konstrueerimine

P. putida Δ *mpl*::Km tüve konstrueerimiseks amplifitseeriti esmalt PCR-il *mpl*-geen koos sellele eelneva ja järgneva alaga (praimerid toodud tabelis 2). Plasmiid pBluescript KS avati *Ecl136II* ja *HincII* saitidest, kuhu sisestati tömpide otstega PCR-i produkt. Tulemuseks saadi plasmiid pKS/*mpl1*, milles paikneva *mpl*-geeni orientatsiooni kontrolliti PCR-ga. Kanamütsiini geen amplifitseeriti pUTKm1 plasmiidilt KmSac praimeriga, PCR-i produkti lõigati *Ecl136II*-ga ning *km*-geen klooniti pKS/*mpl1* vektorisse *mpl*-geeni ees ja geeni lõpus paiknevate *HincII* saitide vahele, deleteerides ~1100 bp osa *mpl*-geenist. Tulemuseks saadi pKS/*mpl1*::Km^r, millest lõigati *XbaI* ning *Acc65I* abil välja *km*-geeniga katkestatud *mpl*-i konstrukti. Saadud geenikassett klooniti pGP704L vektori *XbaI* ja *KpnI* saitidesse (*Acc65I* ja *KpnI* ensüümid lõikavad sama järjestust) ning saadi konstrukti pGP704L/*mpl1*::Km^r.

P. putida *mpl*::Km tüve konstrueerimiseks viidi ka eelneva tüve puhul kasutatud amplifitseeritud *mpl*-geeni PCR-i produkt pBluescript KS-vektorisse, mis oli avatud *SmaI* saidist, saades konstrukti pKS/*mpl2*. *Mpl*-i orientatsiooni kontrolliti PCR-i abil. *Km*-geeni PCR produkt klooniti pKS/*mpl2* vektorisse *mpl*-geeni 396. positsioonis paiknevasse *SmaI* saiti, mis andis tulemuseks pKS/*mpl2*::Km^r. Sellest konstrukti lõigati *XbaI* ja *Eco32I* abil välja *km*-geeniga katkestatud *mpl*-geen, mis klooniti pGP704L *XbaI* ja *Eco32I* saitide vahele

ning saadi konstrukt pGP704L/mpi2::Km^r. Saadud konstruktid õigsust kontrolliti DNA sekveneerimisega.

Kõik eelpool kirjeldatud kloonimised viidi läbi *E. coli* rakkudes.

2.2.8 Bakterite konjugatsioon

Eelmises peatükis kirjeldatud lõppkonstruktid põhinesid pGP704L plasmiidil, mis on võimeline replitseeruma ainult *E. coli* CC118λpir rakkudes (doonortüvi). Konjugatsiooni teel viidi konstruktid *P. putida* rakkudesse (retsipienttüvi), kus konstrukt sisenes homoloogilise rekombinatsiooni teel kromosoomi. Selleks kasvatati vastava antibiootikumi juuresolekul LB-söötmes üleöö CC118λpir rakke, millesse oli elektroporatsiooniga sisse viidud vastav lõppkonstrukt; helperplasmidi sisaldavat tüve HB101 (helpertüvi) ning retsipienttüve. Üleöö kasvatamise järgselt lahjendati kultuure 20 korda 5 ml-sse värskesse antibiootikumivabasse LB-sse. Ristamissegude tegemiseks kasvatati värskeid kultuure 2,5 tundi, mille möödudes võeti 100 µl doonor- ja helpertüve kultuuri ning 200 µl retsipienttüve kultuuri, mis segati kokku ning saadud segu pipeteeriti LB tassile ja inkubeeriti temperatuuril 30 °C. Järgmisel päeval kraabiti ¼–½ saadud segust üles, suspendeeriti 100 µl-s M9 puhvril ning saadud segu plaaditi Km minimaalsöötmele. Kolooniade teket jälgiti kuni 4 päeva jooksul.

2.2.9 Uuritavate tüvede rifampitsiini resistentsete (Rif^r) mutantide tekkesageduse leidmine

Spontaansete mutatsioonide detekteerimiseks *P. putida* eri tüvedes kasutati Rif^r/rpoB testsüsteemi. Rakke kasvatati esialgu 6-7 tundi glc CAA söötmes temperatuuril 30 °C. Seejärel tehti kultuuridest 10⁵-kordne lahjendus värskesse glc CAA söötmesse ning rakud jagati 2,3 ml kaupa katseklaasidesse ning kasvatati 18-22 tundi temperatuuril 30 °C. Kasvamise järgselt plaaditi 500 µl vedelkultuuri Rif-i sisaldavale LB söötmele ja inkubeeriti temperatuuril 30 °C kokku 2 päeva. Rif^r kolooniaid loendati 24 tunni ja 48 tunni möödudes.

Mutantide tekkesageduse arvutamiseks rakupopulatsioonis määrati üleöö kultuurist elusrakkude arvukus CFU (ingl *colony forming unit*) põhjal. Selle jaoks tehti M9 puhvril lahjenduste rida ning lahjendatud rakukultuurist pipeteeriti 5 µl tilk LB tassile. Tilgast kasvanud rakukolooniad loendati pärast üleöö inkubeerimist temperatuuril 30 °C. Elusrakkude hulk 1 ml-s üleöökultuuris arvutati tilgast kasvanud kolooniate ja rakukultuuri lahjenduste põhjal. Teades plaaditud rakukultuuri elumust ning ning selektiivsöötmele ilmunud Rif^R kolooniate arvu, leiti mutantide sagedus valemi järgi:

$$\text{mutantide sagedus} = \frac{\text{mutantide arv (ml kohta)}}{\text{CFU (ml kohta)}}$$

2.2.10 Uuritavate tüvede kasvukõverate mõõtmine ja generatsiooniaja arvutamine

Uuritavate tüvede kasvukiiruste leidmiseks kasvatati rakke üleöö glc CAA söötmes temperatuuril 30 °C. Üleöö kasvanud kultuuri rakkudega inokuleeriti värsket glc CAA söödetti, et arvutuslikult uue söötme optiline tihedus oleks 0,1 (OD₅₈₀). Rakke kasvatati mikrotiiterplaadil 100 µl mahus temperatuuril 30 °C *POLARstar Omega* spektrofotomeetris, mis mõõtis optilist tihedust iga 10 minuti tagant vähemalt 9 tunni jooksul. Saadud andmete põhjal koostati kasvukõver. Logaritmitud kasvukõveral määrati iga tüve puhul eksponentsiaalse kasvufaasi pikkus. Selle põhjal arvutati iga tüve rakkude generatsiooniaeg kasutades järgmist valemit:

$$G = \frac{t}{3,3 \log \frac{a}{A}}$$

G – generatsiooniaeg minutites

t – eksponentsiaalse kasvufaasi pikkus minutites

a – rakukultuuri optiline tihedus (OD₅₈₀) eksponentsiaalse kasvufaasi alguses

A - rakukultuuri optiline tihedus (OD₅₈₀) eksponentsiaalse kasvufaasi lõpus

2.2.11 Fluorestsentsmikroskoopia uuritavate tüvede rakkudest

Uuritavate tüvede vedelkultuuri ja tardsöötmele kasvanud rakke vaadeldi fluorestsentsmikroskoobis. Selle jaoks kasvatati vedelkultuuri rakke 24 tundi LB või glc CAA söötmes, tardsöötmele kasvanud rakkude uurimiseks kraabiti üleöö inkubeeritud LB täissöötme või glc minimaalsöötme tassilt rakumassi, mis suspendeeriti 1 ml-s M9 puhvril. Järgnevalt pipeteeriti 5 µl üleöö kasvanud vedelkultuuri või suspendeeritud rakke tardsöötmele alusklaasil olevale agarsöötme tükikesele ning lisati samas mahus firma *Thermo Scientific* LIVE/DEAD *BacLight* komplekti fluorestseeruvate värvide SYTO 9 ja propiidiumjodiid (PI) segu 100-kordset lahjendust. SYTO 9 on roheline fluorokroom, mis suudab siseneda rakkudesse läbi sisemembraani. PI on punane fluorokroom, mis suudab siseneda vaid kahjustatud membraaniga rakkudesse. Mõlemad värvid interakteeruvad DNA-ga. Värvide lisamise järgselt asetati rakkudega agaritükki kandev alusklaas pimedasse ning lasti rakkudel värvuda 30 minutit, mille järel asetati rakkudele kateklaas ning vaadati fluorestsentsmikroskoobis 1000-kordse kogusuurendusega, kasutades filtrit, mis võimaldas üheaegselt näha mõlema värvide fluorestsentsi.

2.2.12 Lävivoolutsütomeetria uuritavate tüvede rakupopulatsioonidest

Lävivoolutsütomeetrial kasutati rakkude värvimiseks samuti firma *Thermo Scientific* LIVE/DEAD *Baclight* komplekti fluorestseeruvaid värve PI ja SYTO 9. Rakke kasvatati 18 tundi temperatuuril 30 °C glc CAA söötmes. Seejärel lahjendati rakukultuure filtreeritud M9 puhvrit kasutades nii, et proovi optiline tihedus oleks 0,03 (OD₅₈₀) ja sisaldaks vähemalt 10 000 rakku. Seejärel lisati 75 µl proovile 3,75 µl värvisegu (3% SYTO 9 ja 3% PI filtreeritud M9 puhvris) ning lasti rakkudel pimedas 30 minuti jooksul värvuda.

Saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi Flowing Software 2.5.1

2.2.13 Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramine

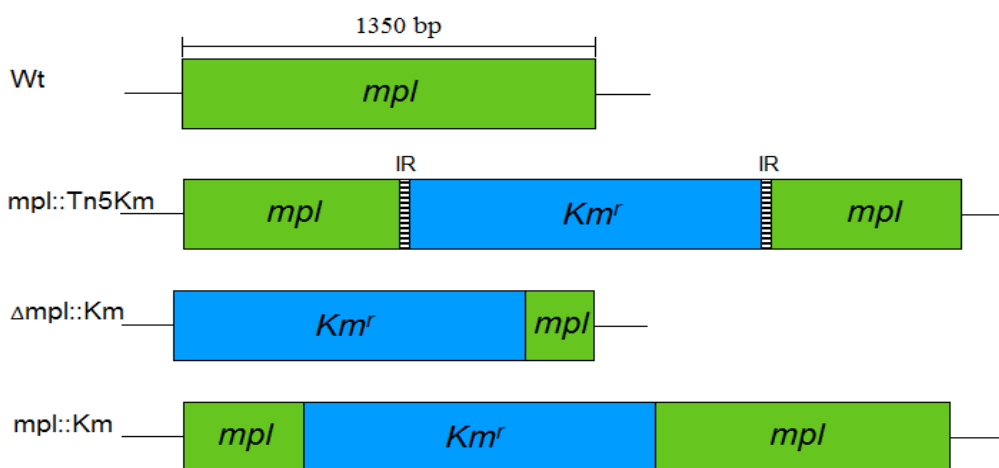
Võrdlemaks erinevate tüvede tundlikkust erinevate antibiootikumide suhtes sai määratud antibiootikumide minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (MIC; ingl – k *minimal inhibitory concentration*), mille juuresolekul ei olnud bakteritüved enam suutelised kasvama. Selleks kasvatati tüvesid glc CAA söötmes üleöö temperatuuril 30 °C. Mikrotiiterplaadil tehti glc CAA söötmesse antibiootikumidest lahjenduste rida. Bensüülpenitsilliini puhul oli maksimaalne kontsentratsioon 1000 µg/ml, fosfomütsiini puhul 2000 µg/ml. Seejärel lisati mikrotiiterplaadile üleööökultuuri 100-kordset lahjendust ning inkubeeriti üleöö temperatuuril 30 °C. Inkubeerimise järgselt mõõdeti bakterikultuuride optiline tihedus (OD₅₈₀) spektrofotomeetri *TECAN Sunrise* abil.

2.3 Tulemused

2.3.1 *P. putida* *mpl*-defektsete tüvede konstrueerimine

Kuna transposoonmutandid on isoleeritud rakkude pikaajalise selektiivsöötmel inkubeerimise käigus, siis ei saa kindel olla, et lisaks *mpl*-i katkestusele pole nendel mutantidel tekkinud spontaansed mutatsioonid ka mujal genoomis, mis võivad mängida rolli varasemates eksperimentides *mpl*-defektsusele omistatud nähtustes. Seega osutus vajalikuks konstrueerida uuesti *mpl*-defektsed *P. putida* tüved, milles *mpl*-i geen oleks deleteeritud. Bakteris *P. putida* on geen *mpl* (PP_0547) 1350 aluspaari pikkune, kodeerides 450 aminohappe suurust valku. Valk Mpl koosneb 3 domeenist: N-terminaalne domeen (aminohapped 2–103), mis seob UDP-NAM-i; valgu keskmine domeen (aminohapped 108–281), mis seob ATP-d; ning C-terminaalne domeen (aminohapped 311–371), mis seob tripeptiidi (on võimeline siduma ka tetra- ja pentapeptiidi) (Winsor jt., 2016; www.pseudomonas.com).

Meie laboris kasutatakse uuritavate geenide täielikuks deleteerimiseks rutiinselt meetodit, mis põhineb deleteeritavat geeni sisaldava regiooni asendamisel homoloogilise rekombinatsiooni teel regiooniga, mis koosneb antud geenile eelnevast ja järgnevast alast (Martínez-García ja de Lorenzo, 2011). Kahjuks ei õnnestunud meil antud meetodil *mpl*-i täisdeletsioontüve konstrueerida. Küll aga õnnestus suitsiidplasmidi ning homoloogilise rekombinatsiooni meetodeid kasutades saada 2 tüve, milles *mpl*-i geen on katkestatud kanamütsiini resistentsust (Km^r) kodeeriva geeniga. Esimesel juhul saadi osalise deletsiooniga tüvi, milles *mpl*-i geenist on säilinud vaid ligikaudu 200 aluspaari ning ülejäänud osa geenist on asendatud Km^r geeniga. Selline tüvi on edaspidi tähistatud kui $\Delta mpl::Km$ (Joonis 9). Teise tüve puhul on *mpl*-i geeni 396. positsiooni sisestatud Km^r geen. Selline tüvi on edaspidi tähistatud kui $mpl::Km$.

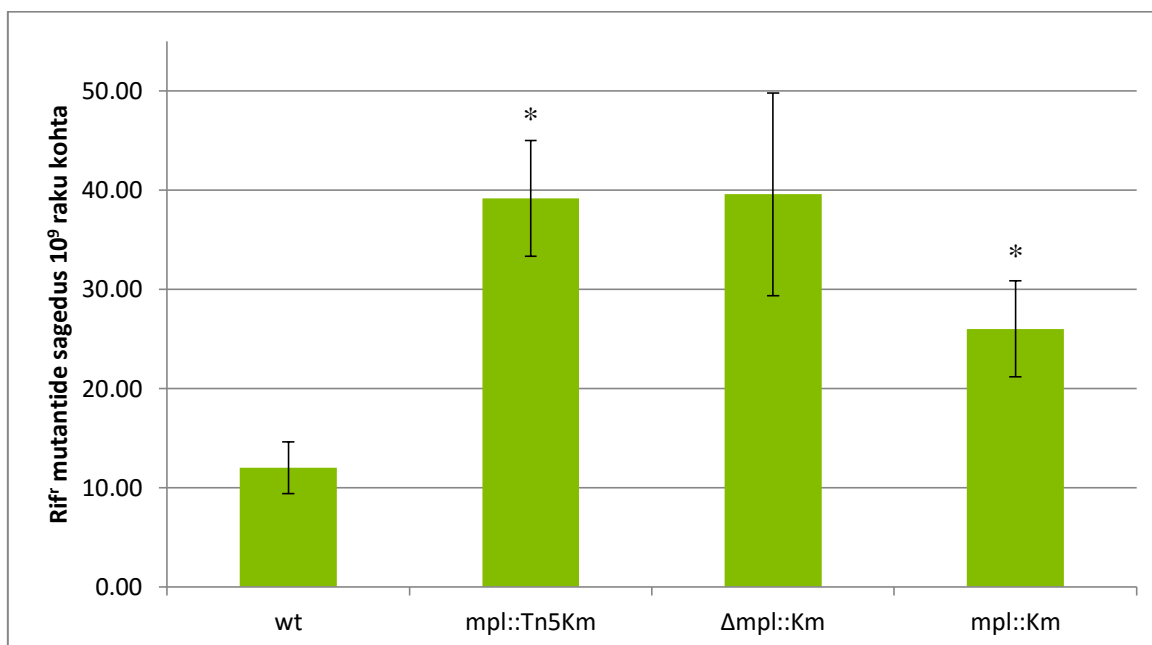


Joonis 9. Metsiktüve *mpl* geen ja selle katkestused uurimistöös kasutatud tüvedes. Wt – metsiktüvi, Km^r – kanamütsiini resistentsusgeen, IR – minitransposooni pöördkordusjärjestused.

Järgnevat katsetes võrreldi saadud tüvesid varem isoleeritud transposoonmutandiga, kus *mpl* geeni 719. positsiooni on sisenenud Km^r geeni kandev Tn5 baasil konstrueeritud minitransposoon (edaspidi *mpl*::Tn5Km).

2.3.2 Spontaansete mutatsioonide teke *mpl*-defektsete tüvede eksponentsiaalse faasi rakkudes

Võrdlemaks erinevates *mpl*-defektsetes tüvedes spontaanset mutatsioonisagedust, kasutati Rif^r/*rpoB* testsüsteemi, millega saab detekteerida antibiootikumile rifampitsiin (Rif) resistentsuse omandanud mutantide teket. Rif on antibiootikum, mis seondub RNA polümeraasi β -subühikule, mille tulemusena peatub transkriptsioon pärast 2–3 nukleotiidi pikkuse RNA sünteesi. Rif-resistentsus (Rif^r) tekib selliste mutatsioonide tagajärjel RNA polümeraasi β -subühikut kodeerivasse geeni *rpoB*, mis takistavad Rif seondumist antud valgule. Kuna erinevaid võimalikke mutatsioone *rpoB* geenis, mis Rif resistentsuse tekkimist võimaldaks, on palju, siis on Rif^r/*rpoB* testsüsteem mutatsioonide detekteerimiseks küllaltki tundlik ning peegeldab raku üldist mutatsioonide tekkesagedust (Jatsenko jt., 2010). Kuna Rif on bakteriotsiidne antibiootikum, siis jäävad seda antibiootikumi sisaldavale söötmele viimisel ellu ainult need rakud, kus Rif^r mutatsioon on juba tekkinud. Seega võimaldab antud testsüsteem tuvastada eelkõige kasvavates rakkudes tekkivaid mutatsioone.



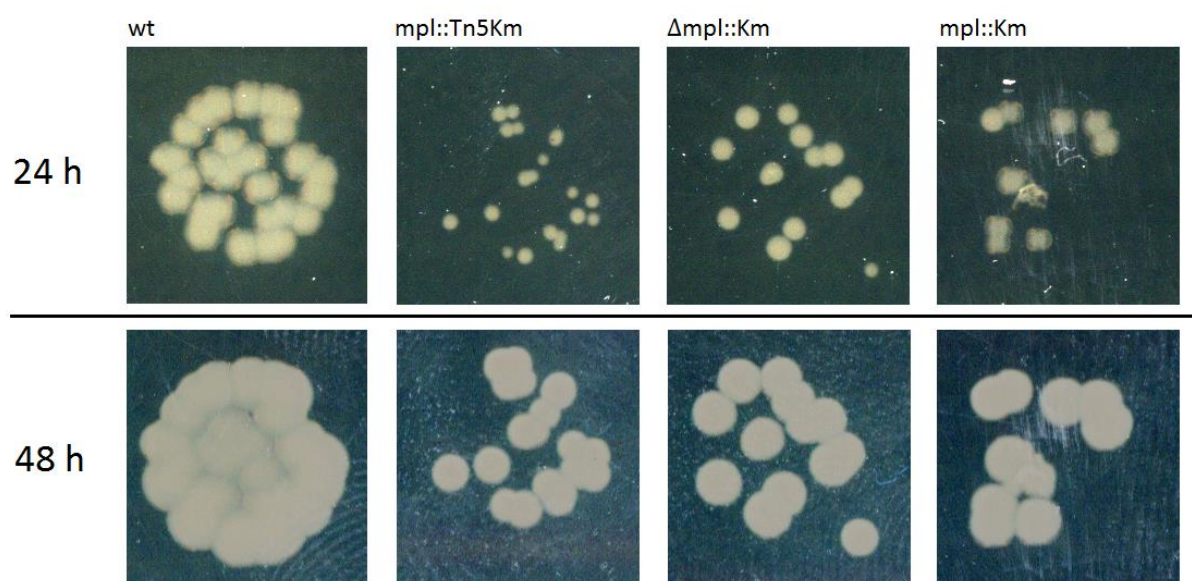
Joonis 10. Spontaansete Rif^r mutantide tekkimine metsiktüves PaW85 (wt) ja erinevates *mpl*-defektsetes *P. putida* tüvedes. Δ *mpl*::Km puhul on toodud 2 sõltumatu katse tulemused, kõigi ülejäänud tüvede puhul 5–9 sõltumatu katse tulemused, koos 95% usalduspiiridega. *Mpl*::Tn5Km ning *mpl*::Km tüvede Rif^r mutantide tekkesagedusi on võrreldud metsiktüve tulemustega, kasutades Studenti T-testi. * tähistab p-väärtust <0,001.

Minu katse tulemused on esitatud joonisel 10. Tulemustest on näha, et kõigis *mpl*-defektsetes tüvedes on Rif^r spontaansete mutantide tekkesagedus märgatavalt suurem kui metsiktüvel, mis kinnitab laboris varasemaid *mpl* transposoonmutandiga saadud tulemusi. Lähtudes transposoonmutandi ja *mpl::Km* tüvede tulemustest, on mutatsioonisagedus võrreldes metsiktüvega kasvanud isegi kuni 4 korda. Δ *mpl::Km* tüve puhul on esitatud andmed ainult kahe katse kohta ja seetõttu ei kaasatud selle tüve andmeid statistilisse analüüsi. Ülejäänud tüvede mutatsioonisageduse erinevus metsiktüve mutatsioonisagedusest on statistiliselt oluline. Samas on oluline märkida, et kõikide *mpl*-defektsete tüvede tulemused on omavahel võrreldavas vahemikus.

2.3.3 *mpl*-defektsete bakterite kolooniate suuruse võrdlus metsiktüve kolooniatega

Rif^r mutantide tekkesageduse mõõtmiseks bakteripopulatsioonis määrati vedelsöötmes kasvavate rakkude arvukus CFU põhjal. Selleks pipeteeriti tardsöötmele lahjendatud rakukultuuri tilgad, mis võimaldas inkubeerimise järgselt eristada üksikkolooniaid.

mpl-defektsete tüvede kolooniad olid üleöö LB tardsöötmel inkubeerimise järel märgatavalt väiksemad kui metsiktüve kolooniad (Joonis 11). 48 tunni möödudes olid *mpl*-defektsete tüvede kolooniad saavutanud 24 tunni vanuse metsiktüve koloonia suuruse. Samuti oli näha, et metsiktüvi oli võrreldes uuritud tüvedega kuni kaks korda kõrgema elumusega. Sama efekt säilis ka minimaalsöötmel (andmeid pole esitatud).

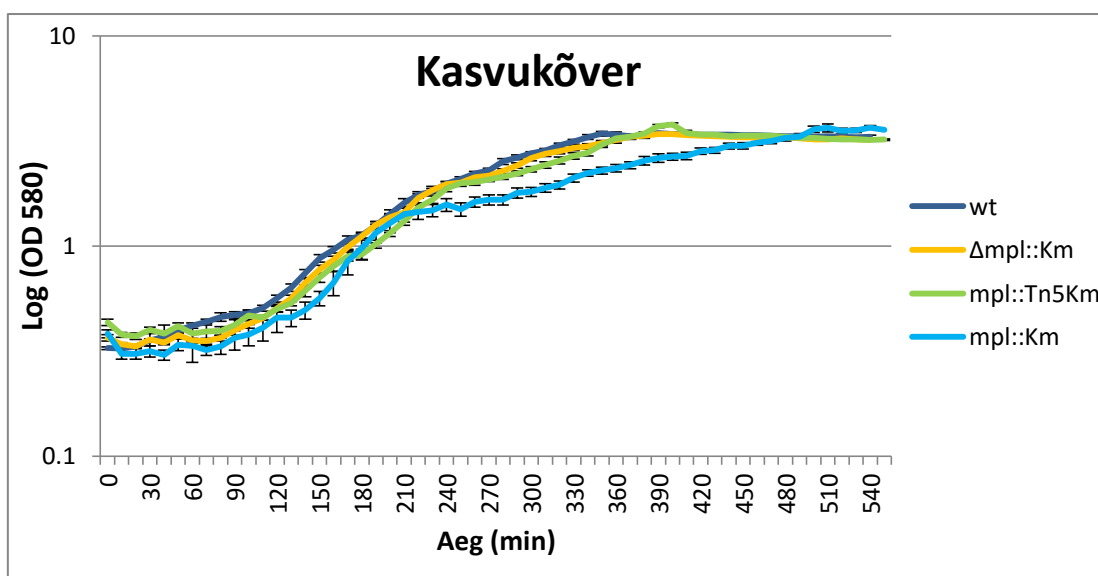


Joonis 11. LB tardsöötmele kasvanud (metsiktüve) wt ja *mpl*-defektsete rakkude kolooniate suurus 24 ja 48 tunnise inkubeerimise järel.

2.3.4 *mpl*-defektsete bakteriüvede kasvukiirus võrreldes metsiktüvega

Lähtudes üksikkolooniate suuruse erinevusest metsiktüvel ja *mpl*-defektsetel mutantidel sai püstitatud hüpotees, et *mpl*-defektsus pärsib rakkude kasvukiirust. Hüpoteesi toetas fakt, et rakkude kasvamiseks peab suurenema ka PG-ümbris, kuid *mpl*-defektsuse tõttu võib uute PG-ahelate süntees võtta rohkem aega ning energiat, sest kõik ahelad tuleb sünteesida *de novo*. See omakorda võib limiteerida eksponentsiaalses kasvufaasis bakterite kasvukiirust.

Bakterite kasvukiiruse mõõtmiseks jälgiti 9 h jooksul rakukultuuri optilise tiheduse muutumist (Joonis 12). Kasvukõveralt on aga näha, et vedelsöötme puhul kasvavad eksponentsiaalses kasvufaasis *mpl*-defektsed tüved sama kiirusega kui metsiktüvi. Seda kinnitavad ka eksponentsiaalsest kasvufaasist arvatud generatsiooniajad (Tabel 3), mis varieeruvad usalduspiiride raames. Küll aga on näha, et tüve *mpl*::Km rakukultuur ei saavuta statsionaarses faasis antud tingimustes maksimaalset optilist tihedust sama kiiresti kui ülejäänud tüvede kultuurid.



Joonis 12. Metsiktüve (wt) ja *mpl*-defektsete tüvede rakukultuuride optilised tihedused glc CAA vedelsöötmes temperatuuril 30 °C 9 tunni vältel. Iga tüve puhul on toodud vähemalt 3 sõltumatu katse kultuuride optilised tihedused lainepikkusel 580 nm koos 95% usalduspiiridega.

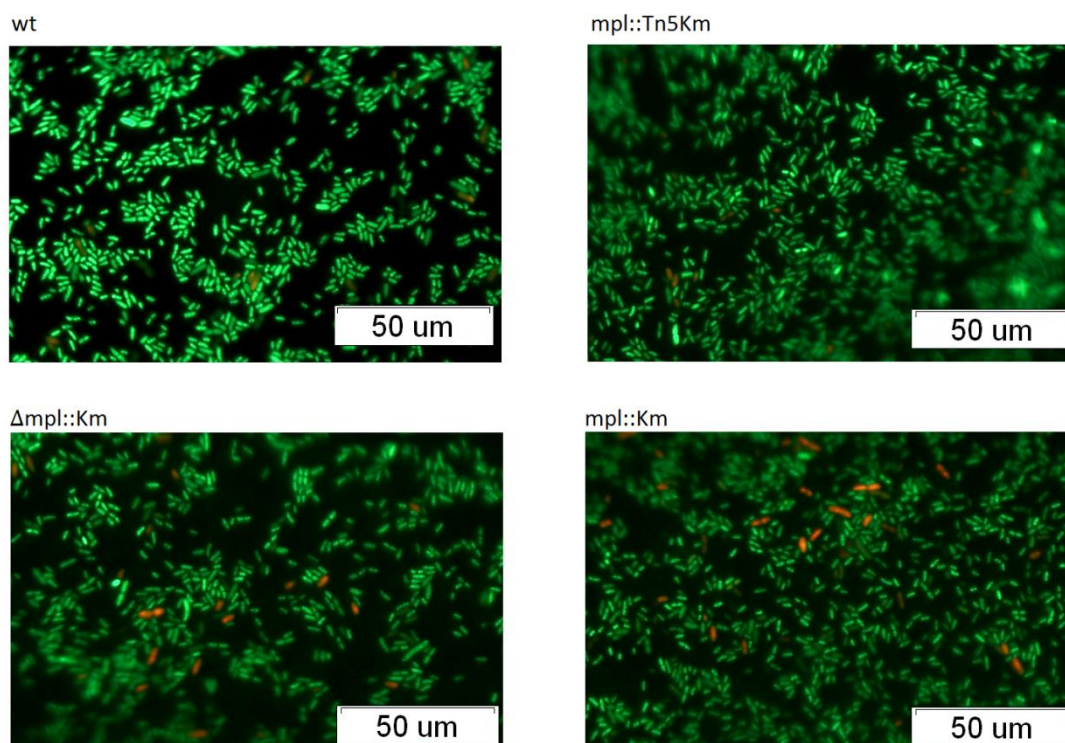
Tabel 3. Metsiktüve (wt) ning *mpl*-defektsete tüvede generatsiooniaeg minutites, kus rakud on kasvanud glc CAA vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Sulgudes on esitatud 95% usalduspiirid.

Tüvi	wt	<i>mpl</i> ::Tn5Km	Δ <i>mpl</i> ::Km	<i>mpl</i> ::Km
Generatsiooniaeg	71,9 (+/- 2,5)	71,7 (+/- 2,2)	69,0 (+/- 1,4)	66,6 (+/- 2,2)

2.3.5 *mpl*-defektsete tüvede bakterite raku kuju ja suurus

Kontrollimaks, kas PG taaskäitluse häirimine mõjutab üksikute rakkude morfoloogiat või suurust, värviti baktereid DNA-ga seonduvate fluorestseeruvate värvidega SYTO 9 ja PI (propiidiumjodiid). Roheliselt fluorestseeruv SYTO 9 suudab siseneda kõikidesse rakkudesse, punaselt fluoresteeruv PI vaid rakkudesse, mille membraani läbilaskvus on suurenenud ning sellised rakud on enamasti surnud. Seega võimaldab fluorestsentsmikroskoopia visuaalselt hinnata läbilaskva membraaniga rakkude osakaalu tervetest rakkudest.

Mikroskoobi all vaadati nii LB kui ka glc CAA tardsöötme ja vedelkultuuris kasvatatud rakke. Joonisel 13 on esitatud LB tulemused tardsöötme kasvatatud rakkudega, ülejäänud andmeid pole esitatud. Ilmnes, et ühegi söötme puhul ei olnud rakkude morfoloogias ega suures *mpl*-defektsetel tüvedel erinevusi võrreldes metsiktüvega, kuid preparaate ulatuslikumalt vaadeldes leidis PI-ga värvunud ning punaselt fluoresteeruvaid rakke hinnanguliselt rohkem *mpl*-defektsete tüvede preparaatides kui metsiktüve omas. Selle põhjal oletasime, et *mpl*-defektsus võiks põhjustada rakumembraani kahjustusi.

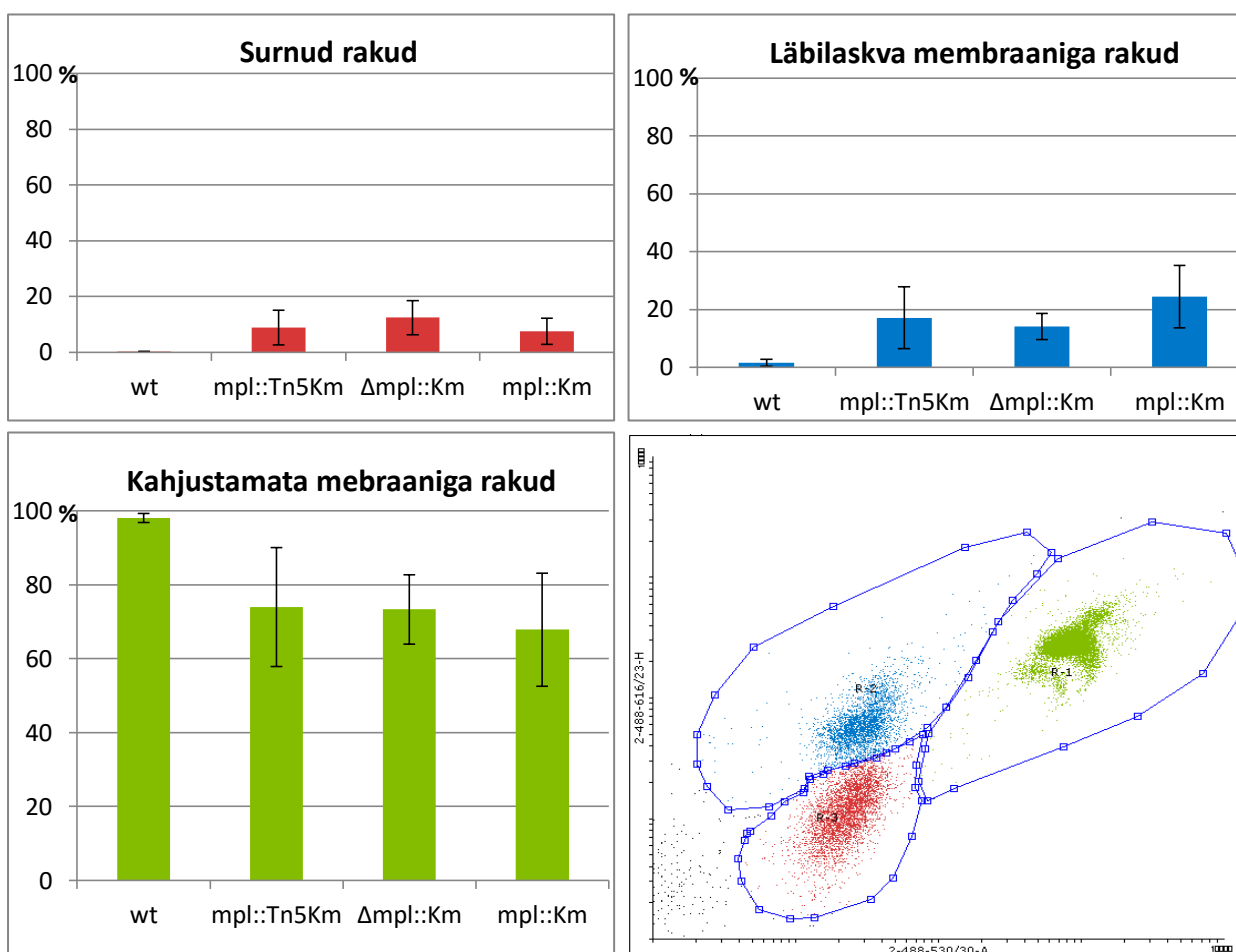


Joonis 13. Metsiktüve ja *mpl*-defektsete tüvede statsionaarse faasi rakud värvitud SYTO 9 ja PI-ga ja vaadeldud epifluorestsents mikroskoobiga. Rakud kasvasid 24 tundi LB tardsöötmele. Pildidel on 1000-kordne suurendus, valge joon tähistab mõõtkavas 50 μm.

2.3.6 *mpl*-defektsete tüvede rakupopulatsioonide analüüs läbivoolutsütomeetriaga

Läbivoolutsütomeetria võimaldab määrata elusate, surnute ning läbilaskva membraaniga rakkude hulka kogu rakupopulatsioonis. Kahjustatud membraaniga rakkude osakaalu määramiseks erinevate tüvede rakupopulatsioonides värviti üleöö vedelsöötmes kultiveeritud rakke jällegi SYTO 9 ja PI lahusega ning rakusorteri võimaldas mõõta iga üksiku raku fluorestsentsignaali. Rakkude populatsioonid defineeriti sarnaselt varem publitseeritud andmetele (Putrinš jt., 2010).

Tulemused on esitatud joonisel 14. Selgus, et kõigi *mpl*-defektsete tüvede puhul on märgatavalt suurenenud nii surnud rakkude kui ka läbilaskva membraaniga rakkude osakaal, kinnitades mikroskoopimise järgselt seatud hüpoteesi, et *mpl*-defektsuse puhul on rakukultuuris rohkem läbilaskva membraaniga ja surnud rakke.

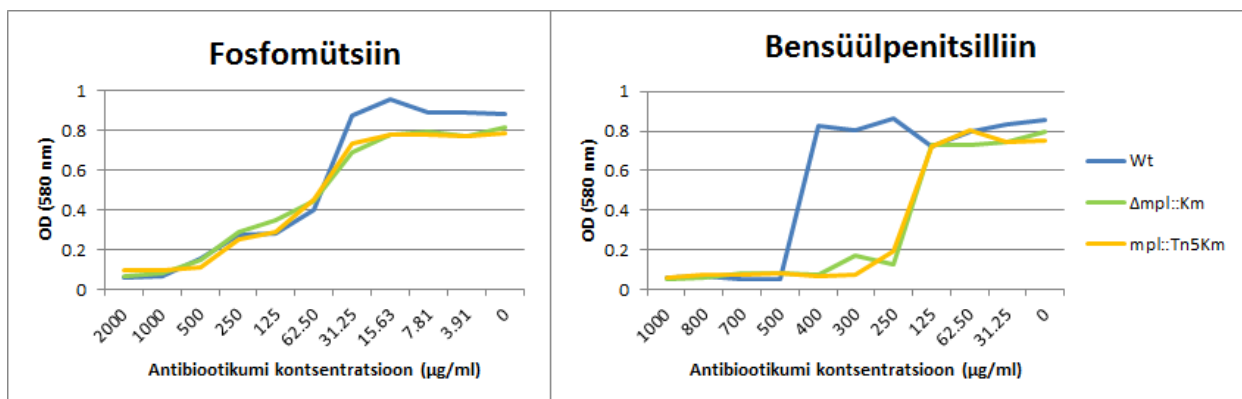


Joonis 14. Läbivoolutsütomeetrial mõõdetud erinevate rakupopulatsioonide osakaalud kogu populatsioonist. Välja on toodud vähemalt 3 katse keskmised väärtused 95% usalduspiiridega. Rakud kasvasid glc CAA vedelsöötmes. 100% peegeldab kõiki rakusorteri abil detekteeritud sündmusi. Viimasel joonisel on näidatud rakusorteri abil detekteeritud sündmused graafikul, mille x-teljel on PI ning y-teljel SYTO 9 fluorestsentsi signaalitugevus. Värvidele rakusorteri joonisel vastavad värvidele rakupopulatsioonide graafikutel.

2.3.7 *mpl*-defektsete tüvede tundlikkus peptidoglükaani mõjutavatele antibiootikumidele

PG ja selle süntees on levinud sihtmärgid antibiootikumidele, mis jällegi tõestab PG olulisust raku jaoks. Kõik β -laktaamsed antibiootikumid takistavad PBP-del ristsidemete loomist PG sünteesi viimases etapis. Samuti mõjutab PG sünteesi antibiootikum fosfomütsiin, mis inhibeerib MurA-l PG-prekursori UDP-NAG-enoolpüruvaadi sünteesi (Joonis 3B). Kuigi Mpl ei katalüüsi otseselt kumbagi reaktsiooni, on kirjanduses näidatud, et defektse PG taaskäitlusrajaga bakteritel on suurenenud tundlikkus antud antibiootikumidele (Borisova jt., 2014, Fisher ja Mobashery, 2014). Sellest lähtuvalt otsustasime uurida, kas *mpl*-defektsel peptiidahela taaskasutusrajal on mõju bakteri *P. putida* tundlikkusele antud antibiootikumide suhtes.

Muutunud tundlikkuse detekteerimiseks määrati antibiootikumide minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon ehk MIC. Tundlikkust testiti fosfomütsiini ja β -laktaamse antibiootikumi bensüülpenitsilliini suhtes. Tulemustest (Joonis 15) selgus, et fosfomütsiini puhul oli MIC väärtus (1000 $\mu\text{g/ml}$) *mpl*-defektsetel tüvedel võrreldav metsiktüvega. Samas bensüülpenitsilliini suhtes oli metsiktüübi puhul MIC väärtus 500 $\mu\text{g/ml}$, kuid *mpl*-defektsed tüved olid tundlikud juba kontsentratsioonile 250 $\mu\text{g/ml}$. Seega suurendab *mpl*-defektsus *P. putida* rakkude tundlikkust vähemalt osade β -laktaam-tüüpi antibiootikumide suhtes.



Joonis 15. Rakukultuuride tihedused pärast üleöö kultiveerimist temperatuuril 30 °C glc CAA söötmes erineva kontsentratsiooniga antibiootikumide juuresolekul. Fosfomütsiini puhul on toodud ühe katse, bensüülpenitsilliini puhul kolme katse tulemused.

2.4 Arutelu

Peptidoglükaani taaskäitlus ei ole laboritingimustes bakterile eluks vajalik protsess, mida näitab see, et taaskäitluse võtmeensüümi AmpG puudumisel suudavad bakterid siiski ellu jääda (Park ja Uehara, 2008). *E. coli*-s on võimalik *mpl* geen täielikult deleteerida ning *mpl*-i transposoonmutantide olemasolu *P. putida* puhul näitab, et Mpl ei ole bakterile elutähtis valk (Tagel jt., 2016). Saadud tulemused ei ole üllatavad, sest Mpl-i puhul ei ole teada, et sel oleks lisaks peptiidahela taaskäitlusele veel mingeid teisi funktsioone (Hervé jt., 2007). Sellest tulenevalt oli ootamatu, et *P. putida*-s *mpl* geeni suhtes täisdeletsioontüve konstrueerida ei õnnestunud, kuigi katkestusmutandi ja osalise deletsiooniga tüvede konstrueerimine oli võimalik. Seega võib mingi osa *P. putida mpl* geeni alast täita ka Mpl valgust sõltumatuid funktsioone. Näiteks võib seal paikneda mõni rakule elulise tähtsusega reguloorset RNA-d kodeeriv järjestus või mõni teise läheduses paikneva geeni reguloorne ala. *Pseudomonas*-e perekonnas on *mpl*-i sisaldav operon konserveerunud, sisaldades veel transkriptsiooni regulaatori geeni (*P. putida* puhul PP_0546), aromaatses happe dekarboksülaasi geeni (*ubiD*) ning ühte geeni (PP_0548), mis kodeerib valku, mille funktsioon ei ole teada. *P. aeruginosa* puhul on näidatud, et lisaks *mpl*-le on selles operonis paikneva transkriptsiooni regulaatori ja hüpotetilise valgu geene samuti võimalik transposooni insertiooniga katkestada, kuid *mpl*-i operonis paiknev aromaatses happe dekarboksülaasi geen on bakterile elutähtis (Kopec jt., 2011, Winsor jt., 2016). Kuna tegemist on *Pseudomonas*-e perekonnas konserveerunud operoniga, siis võib arvata, et ka *P. putida*-s on sama operoni poolt kodeeritud aromaatses happe dekarboksülaas bakterile eluks vajalik. Kuna antud geen paikneb *mpl*-st allavoolu, siis võib selle geeni reguloorne piirkond paikneda *mpl*-i geeni lõpus, mistõttu ei olegi võimalik *mpl*-i geeni täielikult deleteerida. *E. coli*-s, kus *mpl*-i geen on võimalik täielikult deleteerida, ei ole *mpl* operon sarnaselt konserveerunud (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/948752).

Minu tulemused kinnitavad varasemaid transposoonmutandiga saadud tulemusi, et Mpl-i puudumisel tõuseb *P. putida* rakkudes mutatsioonisagedus (Joonis 10). Mutatsioonisageduse suurenemise põhjus Mpl-i puudumisel on hetkel teadmata. Mpl on mureiini-peptiidi ligaas. Võimalik, et Mpl puudumisel kuhjuvad tsütoplasmas tema substraadid. Kuna üks substraatidest – UDP-NAM – on ka PG biosünteesiraja vaheühend (Joonis 3), siis võib oletada, et kuhjub peamiselt tripeptiid, mida võidakse küll lagundada edasi üksikuteks aminohapeteks peptidaasi MpaA abil. Samas on *E. coli* Mpl-mutandi tsütoplasmas tripeptiidi hulk siiski üle 10 korra suurem kui metsiktüves ning seega ei suuda vähemalt *E. coli*-s MpaA hoida ära tripeptiidi kuhjumist (Mengin-Lecreulx jt., 1996).

Võimalik, et tripeptiidi märkimisväärne kuhjumine rakus viib tasakaalust välja raku normaalse metabolismi, mis omakorda võib häirida mutatsioone kõrvaldavaid protsesse või suurendada vastuvõtlikkust erinevatele mutageenidele. See selgitaks mutatsioonisageduse tõusmist uuritud tüvedes.

Oma katsetes nägin ka seda, et tardsöötmel kasvavad Mpl-mutantide kolooniad metsiktüvega võrreldes aeglasemalt (Joonis 11), kuigi vedelkultuuris Mpl-mutantide ja metsiktüve kasvukiiruse vahel olulisi erinevusi ei esinenud (Joonis 12; Tabel 3). Samas arvutati vedekultuuris generatsiooniajad rakukultuuri optilise tiheduse põhjal, mis ei erista elusaid ja surnud rakke ning Mpl-mutantide elumus oli mõnedes teistes katsetes võrreldes metsiktüve elumusega vähenenud (Joonis 14). Kuigi koloonia suurus ei pruugi sõltuda ainult bakterite kasvukiirusest, on võimalik, et aeglast kasvu tardsöötmel võivad jällegi põhjustada tripeptiidi kuhjumisest tingitud häired bakteri metabolismis. Seda, kas tripeptiidid tõesti kuhjuvad, peaks näitama edaspidistes katsetes.

Varem on näidatud, et PG taaskäitluse ensüümidel võib olla mõju ka üksikraku morfoloogiale. Näiteks *E. coli*-s on LdcA puudumisel või Mpl-i üleekspressioonil üksikrakud suurenenud läbimõõduga (Mengin-Lecreulx jt., 1996, Templin jt., 1999). Mikroskoobi all *P. putida* *mpl*-defektseid rakke vaadeldes (Joonis 13) ilmnes, et Mpl-i puudumine üksikrakkude morfoloogiat ega suurust ei mõjutanud. Siiski oli samades tingimustes kasvanud Mpl-mutantide kultuurides rohkem kahjustatud membraaniga rakke kui metsiktüves.

Energia ning ressursside kokkuhoid pole PG taaskäitluse ainuke eesmärk. On näidatud, et tsütoplasmas esinevate taaskäitluse vaheproduktide kaudu saab rakk ülevaate oma PG struktuurset seisundist. On võimalik, et taaskäitluse blokeerimisel ei tunnetata rakk enam vigu PG-s. Selle tagajärjel võib väheneda PG mehaaniline tugevus, mis omakorda kahjustab ka sisemembraani, mis ei suuda defektse PG-ga enam osmootset rõhku taluda (Park, 1995). See seletaks minu katsetes läbivoolutsütomeetria nähtud efekti (Joonis 14), kus Mpl-mutantide rakupopulatsioonis oli võrreldes metsiktüvega rohkem läbilaskva membraaniga ning surnud rakke. Kuna bakteri sisemembraanis paikneb bakteri hingamisahel, siis võib selle töö Mpl-mutandis membraani kahjustuste tõttu olla häiritud. Selle tagajärjel võib suurendada reaktiivsete hapnikuradikaalide, ROS-ide (ingl k – *reactive oxygen species*) hulk rakus. Hapnikuradikaalid võivad aga kergesti reageerida nii otse DNA kui ka valkudega, mis Mpl-mutandi puhul seletaks nii vähenenud elumust kui ka suurenenud mutatsioonisagedust (Cabisco jt., 2010).

Samuti on näidatud, et PG taaskäitluse vaheühendid mängivad olulist rolli β -laktamaasi indutseerimisel. β -laktamaas on ensüüm, mis katkestab β -laktaam tsükli

β -laktaamsetes antibiootikumides, muutes bakterid selliste antibiootikumide suhtes resistentseks (Jacobs jt., 1994). Minu katse tulemustest on näha (Joonis 15), et Mpl-mutantsed *P. putida* tüved on β -laktaamsele antibiootikumile bensüülpenitsilliin tundlikumad kui metsiktüvi, mis viitab sellele, et Mpl või tripeptiid võib olla seotud β -laktamaasi indutseerimisega. Suurenenud tundlikkust β -laktaamsetele antibiootikumidele Mpl-mutandis on näidatud ka näiteks *Acinetobacter baylyi* puhul (Chakravorty jt., 2008). *E. coli* Mpl-mutantide puhul ei ole tundlikkus β -laktaamsetele antibiootikumidele suurenenud, mis on ootuspärane, sest *E. coli*-s puudub valk AmpR, mille kaudu taaskäitluse vaheühendid bakterites *P. putida* ja *A. baylyi* β -laktamaasi indutseerivad (Jacobs jt., 1994). Variatsioonid β -laktamaasi indutseerimises võimaldavad töötada välja liigispetsiifilisi antibiootikumide mõju võimendavaid keemilisi ühendeid, mille sihtmärgiks oleksid PG taaskäitluse ensüümid.

Kokkuvõte

Peptidoglükaani taaskäitlus võimaldab bakteril säästa nii ressursse kui ka energiat, mis võib piiratud toitainetega keskkonnas bakteri jaoks elulise tähtsusega olla. Nii on näiteks soolestikus elutsevatel bakteritel sageli täielik komplekt PG taaskäitluse ensüüme, mis toitainete otsa lõppemisel võimaldavad bakteritel lõpetada jagunemistsükli ning siseneda statsionaarsesse faasi. Kuna peptidoglükaan moodustab vaid väikese osa GN bakteri massist, siis võiks eeldada, et toitaineterikkas keskkonnas elava bakteri jaoks on PG taaskäitlus küllaltki ebavajalik protsess. On aga näidatud, et PG taaskäitluse rajal on veel alternatiivsed funktsioonid, näiteks võimaldab see rakul tunnetada oma PG seisundist ning avastada võimalikke häireid PG struktuuris. Kuna GN bakterites on PG reeglina vaid ühekihiline, siis on selge, et juba väikesed puudujäägid PG terviklikkuses võivad viia rakkude lüüsumiseni. Samuti on näidatud, et osades bakteriliikides indutseerivad PG taaskäitluse vaheühendid β -laktamaasi tootmist, mis muudab bakterid β -laktaamsete antibiootikumide suhtes resistentseks.

Meie laboris selgus, et PG taaskäitluse ensüümi kodeeriva geeni *mpl* suhtes defektses *P. putida* PaW85 bakteris on suurenenud mutatsioonisagedus, millest lähtuvalt otsustati ka uurida, kuidas *mpl*-geeni katkestamine mõjutab *P. putida* fenotüüpi ning püüti kirjeldada seost mutatsioonisagedusega.

Käesoleva töö käigus õnnestus näidata, et:

- Mpl valk ei ole bakteris *P. putida* elutähtis;
- minu konstrueeritud Mpl-mutantidel oli sarnaselt varasemalt uuritud transposoonmutandiga tõusnud mutatsioonisagedus eksponentsiaalses kasvufaasis;
- *mpl*-defektsete tüvede kolooniad on märgatavalt väiksemad kui metsiktüve kolooniad;
- Mpl-mutantide kasvukiirus vedelkultuuris ei erine metsiktüve kasvukiirusest;
- *mpl*-defektsus ei mõjuta raku kuju ja suurust;
- *mpl*-defektsus suurendab rakupopulatsioonis kahjustatud membraaniga ja surnud rakkude hulka;
- *mpl*-defektsus suurendab rakkude tundlikkust bensüülpenitsilliinile, kuid ei mõjuta tundlikkust fosfomütsiinile.

Summary

Ever-changing living conditions greatly affect a bacterial cell. Changes in the concentration of nutrients found in the environment of a growing bacterium can cause an increase of osmotic pressure within the cell. In order to withstand this pressure, the fragile bacterial cell membrane is supported by peptidoglycan, a polymer completely encasing the cell membrane and acting as a supporting element. However, constant alterations in peptidoglycan are necessary, in order to allow cells to grow and divide. This is accomplished by an intricate mechanism of synthesizing and attaching new material to the existing peptidoglycan, while simultaneously degrading some of the old peptidoglycan. This would result in a significant loss of resources. However, a pathway to reutilize the degradation products has been described. It has been shown that this peptidoglycan recycling pathway, although nonessential in laboratory conditions, has functions beyond the simple energy-efficient reutilization of degraded molecules, including providing cell with an overview of the state of peptidoglycan and inducing β -lactamase.

Mpl is an enzyme that joins the *de novo* synthesis and recycling of peptidoglycan. Although nonessential, *P. putida* cells lacking Mpl have been proven to:

- have an increased mutation rate in exponential growth phase compared to wild-type;
- form smaller colonies on solid medium than wild-type;
- have comparable growth rate in liquid medium to wild-type;
- do not differ from wild-type cells in shape and size;
- have an increased proportion of dead and permeable cells in their population in comparison to wild-type;
- be more susceptible to benzylpenicillin than wild-type, whereas Mpl-deficiency has no effect on susceptibility to fosfomycin.

Tänuõnad

Sooviksin tänada oma esimest juhendajat Kairit, kes õpetas mulle pooled minu laborioskused ning Marit, kes õpetas mulle ülejäänud pooled ning kelle tagant utsitamise, juhenduse ja toetuseta ei oleks töö kirjutamine olnud nii nauditav. Soovin tänada veel Maiat väga põhjaliku tagasiside eest, mida ei tulnud kunagi kaua oodata, aga võimaldas mul pidevalt areneda. Suur tänu ka kõigile laborikaaslastele, kelle tõttu ei olnud pikad päevad laboris kunagi igavad.

Kasutatud kirjandus

- Barreteau, H., A. Kovač, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec & D. Blanot (2008). "Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis." FEMS microbiology reviews **32**(2): 168-207.
- 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.
- Borisova, M., J. Gisin & C. Mayer (2014). "Blocking peptidoglycan recycling in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates intrinsic resistance to fosfomycin." Microbial drug resistance **20**(3): 231-237.
- Bouhss, A., A. E. Trunkfield, T. D. Bugg & D. Mengin-Lecreulx (2008). "The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates." FEMS microbiology reviews **32**(2): 208-233.
- 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.
- Cabiscol, E., J. Tamarit & J. Ros (2010). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." International Microbiology **3**(1): 3-8.
- Chakravorty, A., M. Klovstad, G. Peterson, R. E. Lindeman & L. A. Gregg-Jolly (2008). "Sensitivity of an *Acinetobacter baylyi* mpl mutant to DNA damage." Applied and environmental microbiology **74**(4): 1273-1275.
- Cheng, Q. & J. T. Park (2002). "Substrate specificity of the AmpG permease required for recycling of cell wall anhydro-muropeptides." Journal of bacteriology **184**(23): 6434-6436.
- Costa, K., G. Bacher, G. Allmaier, M. G. Dominguez-Bello, L. Engstrand, P. Falk, M. A. de Pedro & F. García-del Portillo (1999). "The Morphological Transition of *Helicobacter pylori* cells from Spiral to Coccoid Is Preceded by a Substantial Modification of the Cell Wall." Journal of bacteriology **181**(12): 3710-3715.
- Dahl, U., T. Jaeger, B. T. Nguyen, J. M. Sattler & C. Mayer (2004). "Identification of a phosphotransferase system of *Escherichia coli* required for growth on N-acetylmuramic acid." Journal of bacteriology **186**(8): 2385-2392.
- 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.
- Demchick, P. & A. L. Koch (1996). "The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." Journal of bacteriology **178**(3): 768-773.
- Dijkstra, A. J. & W. Keck (1996). "Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport." Journal of bacteriology **178**(19): 5555-5562.
- El Zoeiby, A., F. Sanschagrin & R. C. Levesque (2003). "Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors." Molecular microbiology **47**(1): 1-12.
- Figurski, D. H. & D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(4): 1648-1652.
- Fisher, J. F. & S. Mobashery (2014). "The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*." Bioorganic chemistry **56**: 41-48.
- Goodell, E. W. (1985). "Recycling of murein by *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **163**(1): 305-310.

- Herrero, M., V. de Lorenzo & K. N. Timmis (1990). "Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria." Journal of bacteriology **172**(11): 6557-6567.
- Hervé, M., A. Boniface, S. Gobec, D. Blanot & D. Mengin-Lecreulx (2007). "Biochemical characterization and physiological properties of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl- γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase." Journal of bacteriology **189**(11): 3987-3995.
- Holtje, J. V. (1998). "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 181-203.
- Jacobs, C., L. Huang, E. Bartowsky, S. Normark & J. Park (1994). "Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction." The EMBO Journal **13**(19): 4684.
- Jatsenko, T., A. Tover, R. Tegova & M. Kivisaar (2010). "Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **683**(1): 106-114.
- Jeske, O., M. Schüler, P. Schumann, A. Schneider, C. Boedeker, M. Jogler, D. Bollschweiler, M. Rohde, C. Mayer & H. Engelhardt (2015). "*Planctomyces* do possess a peptidoglycan cell wall." Nature communications **6**.
- Johnson, J. W., J. F. Fisher & S. Mobashery (2013). "Bacterial cell-wall recycling." Annals of the New York Academy of Sciences **1277**(1): 54-75.
- Koch, A. L. & S. Woeste (1992). "Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **174**(14): 4811-4819.
- Kopec, J., R. Schnell & G. Schneider (2011). "Structure of PA4019, a putative aromatic acid decarboxylase from *Pseudomonas aeruginosa*." Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications **67**(10): 1184-1188.
- Labischinski, H., E. Goodell, A. Goodell & M. Hochberg (1991). "Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study." Journal of bacteriology **173**(2): 751-756.
- Liger, D., A. Masson, D. Blanot, J. Heijenoort & C. Parquet (1995). "Over-production, Purification and Properties of the Uridine-diphosphate-N-Acetylmuramate: l-alanine Ligase from *Escherichia coli*." European Journal of Biochemistry **230**(1): 80-87.
- Litzinger, S. & C. Mayer (2010). The Murein Sacculus, Springer.
- Martínez-García, E. & V. de Lorenzo (2011). "Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440." Environmental microbiology **13**(10): 2702-2716.
- Matias, V. R., A. Al-Amoudi, J. Dubochet & T. J. Beveridge (2003). "Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of bacteriology **185**(20): 6112-6118.
- Mengin-Lecreulx, D., T. Falla, D. Blanot, J. van Heijenoort, D. J. Adams & I. Chopra (1999). "Expression of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-Acetylmuramoyl-l-Alanyl-d-Glutamate: l-Lysine Ligase in *Escherichia coli* and Effects on Peptidoglycan Biosynthesis and Cell Growth." Journal of bacteriology **181**(19): 5909-5914.
- Mengin-Lecreulx, D., J. van Heijenoort & J. T. Park (1996). "Identification of the *mpl* gene encoding UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate

- ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglycan." Journal of bacteriology **178**(18): 5347-5352.
- Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria.
- Mohammadi, T., A. Karczmarek, M. Crouvoisier, A. Bouhss, D. Mengin-Lecreulx & T. Den Blaauwen (2007). "The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*." Molecular microbiology **65**(4): 1106-1121.
- Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab & K. Kutsukake (1999). "Peptidoglycan-Hydrolyzing Activity of the FlgJ Protein, Essential for Flagellar Rod Formation in *Salmonella typhimurium*." Journal of bacteriology **181**(5): 1555-1561.
- Neuhaus, F. C. & J. Baddiley (2003). "A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria." Microbiology and Molecular Biology Reviews **67**(4): 686-723.
- Osborn, M. J. & L. Rothfield (2007). "Cell shape determination in *Escherichia coli*." Current opinion in microbiology **10**(6): 606-610.
- Park, J. T. (1995). "Why does *Escherichia coli* recycle its cell wall peptides?" Molecular microbiology **17**(3): 421-426.
- Park, J. T. & T. Uehara (2008). "How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan)." Microbiology and Molecular Biology Reviews **72**(2): 211-227.
- Pavel, H., M. Forsman & V. Shingler (1994). "An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on para-substituted methylphenols." Journal of bacteriology **176**(24): 7550-7557.
- Putriņš, M., H. Ilves, L. Lilje, M. Kivisaar & R. Hörak (2010). "The impact of ColRS two-component system and TtgABC efflux pump on phenol tolerance of *Pseudomonas putida* becomes evident only in growing bacteria." BMC microbiology **10**(1): 1.
- Reith, J. & C. Mayer (2011). "Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria." Applied microbiology and biotechnology **92**(1): 1-11.
- Sham, L.-T., E. K. Butler, M. D. Lebar, D. Kahne, T. G. Bernhardt & N. Ruiz (2014). "MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis." Science **345**(6193): 220-222.
- Silhavy, T. J., D. Kahne & S. Walker (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**(5): a000414.
- Spratt, B. G. (1983). "Penicillin-binding Proteins and the Future of β -Lactam Antibiotics: The Seventh Fleming Lecture." Microbiology **129**(5): 1247-1260.
- Tagel, M., Tavita, K., Hörak, R., Kivisaar, M. & H. Ilves (2016). "A novel papillation assay for the identification of genes affecting mutation rate in *Pseudomonas putida* and other pseudomonads." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Käsikiri avaldamisel.
- Templin, M. F., A. Ursinus & J. V. Höltje (1999). "A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*." The EMBO Journal **18**(15): 4108-4117.
- Tortora, G. J., B. R. Funke & C. L. Case (2012). Microbiology an Introduction 11th Ed, Benjamin Cummings.

Typas, A., M. Banzhaf, C. A. Gross & W. Vollmer (2012). "From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology." Nat Rev Microbiol **10**(2): 123-136.

van Heijenoort, J. (2007). "Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan." Microbiology and Molecular Biology Reviews **71**(4): 620-635.

Vollmer, W. (2012). "Bacterial growth does require peptidoglycan hydrolases." Molecular microbiology **86**(5): 1031-1035.

Vollmer, W., D. Blanot & M. A. De Pedro (2008). "Peptidoglycan structure and architecture." FEMS microbiology reviews **32**(2): 149-167.

Vollmer, W. & J.-V. Höltje (2004). "The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer?" Journal of bacteriology **186**(18): 5978-5987.

Ward, J. B. (1973). "The chain length of the glycans in bacterial cell walls." Biochemical Journal **133**(2): 395-398.

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.

Zahrl, D., M. Wagner, K. Bischof, M. Bayer, B. Zavec, A. Beranek, C. Ruckenstein, G. E. Zarfel & G. Koraimann (2005). "Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems." Microbiology **151**(11): 3455-3467.

Kasutatud veebilehed

www.pseudomonas.com

www.ncbi.nlm.nih.gov

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Karl Jürgenstein (29.06.1994),

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

„Armastus kolme aminohappe vastu: geeni mpl mõju *Pseudomonas putida* fenotüübile“, mille juhendajateks on Mari Tagel, MSc ja prof Maia Kivisaar

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.16