

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

Maris Mehike

Redundantsed katehooli 2,3-dioksügenaasid

***Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüves C70**

Bakalaureusetöö 12 EAP

Juhendaja Ph.D. Merike Jõesaar

TARTU 2016

INFOLEHT

Redundantsed katehhooli 2,3-dioksügenaasid *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüves C70

Tüvi C70 omab fenooli ja naftaleeni lagundamiseks kahte *meta*-rada. Radade võtmeensüümid, katehhooli 2,3-dioksügenaasid (C23O) vastutavad aromaatses tuuma lõhustamise eest. Töös uuriti tüve C70 redundantsete C23O geenide (*pheB* ja *nahH*) rolli fenooli ja salitsülaadi lagundamisel. Selleks konstrueeriti *pheB* geeni katkestusmutant ja võrreldi metsik- ja mutanttüve kasvukineetikat, geenide ekspressiooni ning substraatide lagundamist ja vaheühendite kogunemist. Metsiktüve kasvukiirus fenoolil oli suurem kui salitsülaadil, fenooliga indutseerides oli ekspresseeritud *pheB* ja salitsülaadiga *nahH*. Katehhooli kogunemist täheldati vaid tüvede kasvatamisel salitsülaadil. Substraatide segul suutis mutanttüvi lagundada ka fenooli, üksiksubstraadil aga mitte, seega kahe *meta*-raja omamine annab tüvele eelise just substraatide segul kasvatamisel.

Märksõnad: katehhooli 2,3-dioksügenaas, redundantusus, aromaatsed ühendid, operon, mutantide konstrueerimine.

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Redundant catechol 2,3-dioxygenases of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain C70

Strain C70 harbours two *meta* pathways for degradation of phenol and naphthalene. The key enzymes (C23O) of these pathways are responsible for the cleavage of aromatic rings. In this study the role of redundant C23O genes (*pheB* ja *nahH*) in the degradation was studied. In order to establish that the *pheB* gene disruption mutant was constructed and growth kinetics, gene expression, substrate degradation and intermediate accumulation of *wt*- and mutant strains were compared. The growth rate of *wt* strain on phenol was bigger than on salicylate, *pheB* and *nahH* were expressed when induced by phenol and salicylate, respectively. Accumulation of catechol was detected only while grown on salicylate. On the mixture of substrates the mutant strain could also degrade phenol, on a single substrate it was not able to do that, therefore we can conclude that possessing two *meta* pathways gives the strain an advantage on the mixture.

Keywords: catechol 2,3-dioxygenase, redundancy, aromatic compounds, operon, constructing mutants.

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Aromaatsete ühendite bakteriaalse lagundamise üldised põhimõtted	7
1.2. Fenooli aeroobsed katabolismirajad	9
1.3. Naftaleeni aeroobsed katabolismirajad	11
1.4. Katehhooli 2,3-dioksügenaaside mitmekesisus	15
1.5. Katehhooli dioksügenaaside redundantsus	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1. TÖÖ EESMÄRGID	18
2.2. MATERJAL JA METOODIKA	19
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid	19
2.2.2. Bakteritüvede kasvuparameetrite määramine	19
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR	19
2.2.4. Geelelektroforees	21
2.2.5. Järjestuste analüüs ja fülogeneesipuu konstrueerimine	21
2.2.6. Plasmiidse DNA eraldamine	21
2.2.7. Kompetentsete rakkude valmistamine	21
2.2.8. Ligeerimine ja elektroporatsioon	22
2.2.9. Katkestatud C23O kodeeriva geeniga mutanttüve konstrueerimine	22
2.2.9.1. Tüve C70 C23O katkestusmutantide konstrueerimine	22
2.2.9.2. Bakterite kolmikristamine	23
2.2.10. qRT-PCR	24
3. TULEMUSED JA ARUTELU	25
3.1. <i>P. pseudoalcaligenes</i> C70 kataboolsete operonide ja C23O-de fülogeneetiline analüüs ...	
3.1.1. Tüve C70 fenooli raja operoni ja naftaleeni raja alumise operoni analüüs	25
3.1.2. Tüve C70 C23O fülogeetiline analüüs	26
3.2. Tüve C70 katkestusmutantide konstrueerimine	28
3.3. <i>wt</i> - ja mutanttüvede kasvukineetika	29
3.4. <i>wt</i> - ja mutanttüvede C23O ekspressioon fenoolil, salitsülaadil ja nende segul	31
3.5. Salitsülaati ja/või fenooli sisaldava kasvukeskonna HPLC analüüs	32

KOKKUVÕTE	36
Resume	38
KASUTATUD KIRJANDUS	40
Lisa 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.....	49
Lisa 2. Operonide analüüs	51

KASUTATUD LÜHENDID

Ah - aminohape

Amp - ampitsilliin

Amp^r – ampitsilliini resistentsusgeen

Bp – bensüülpenitsilliin

Bp^s - tundlik bensüülpenitsilliinile

CAT - katehool

C12O – katehooli 1,2-dioksügenaas

C23O – katehooli 2,3-dioksügenaas

Gm – gentamütsiin

Gm^r – gentamütsiini resistentsusgeen

HPLC - kõrgsurvevedelikkromatograafia (high-pressure liquid chromatography)

Km – kanamütsiin

Km^r – kanamütsiini resistentsusgeen

LB - Luria-Bertani sööde

nah operon - naftaleeni raja operon

OD - optiline tihedus (Optical Density)

ORF - avatud lugemisraam (Open Reading Frame)

PAH – polütsükklilised aromaatsed ühendid

PH – fenooli hüdroksülaas

PHE - fenool

phe operon - fenooli raja operon

SAL - Na-salitsülaas

sal operon - naftaleeni raja alumine operon

U - ühik

wt – metsiktüvi

SISSEJUHATUS

Industriaalse tegevuse tõttu satub keskkonda palju saasteaineid, mis on elusloodusele väga ohtlikud ja toksilised, kuna neid on raske lagundada ning nad püsivad looduses kaua. Nende vähendamiseks keskkonnas kasutatakse biodegradatsioonil põhinevat tehnoloogiat ehk bioremediatsiooni. Bioremediatsioon põhineb ekstreemsetes tingimustes vastupidavamate tüvede ja degradatsiooniks vajalikke ensüüme kodeerivate geenide avastamisel, uurimisel ja kasutamisel.

Ühed kõige tuntumad aromaatsete ühendite lagundajad kuuluvad perekonda *Pseudomonas* ja enam iseloomustatud kataboolsed geenid on katehhooli dioksügenaasid. Nende ensüümide puhul esineb erinevates bakteritüvedes geenide redundantsus, mis tähendab, et sama funktsiooniga genee on tüves vähemalt kaks ning arvatakse, et see aitab kaasa geneetilisele kohandumisele ja uute biokeemiliste funktsioonide loomisele.

Käesoleva töö üldeesmärgiks on uurida, kuidas mõjutab *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70 kahe redundantse katehhooli 2,3-dioksügenaasi (C23O) omamine.

Antud töös antakse ülevaade bakteriaalsest aromaatsete ühendite aeroobsest lagundamisest, lagundamisel osalevatest kataboolsetest geenidest ja nende geenide redundantsusest. Eksperimentaalses osas uuritakse spetsiifiliselt *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüves C70 esinevat kahte redundantset C23O, mille abil uuritav tüvi suudab lagundada fenooli ja naftaleeni. Selleks analüüsitakse kõigepealt uuritava tüve mõlema ühendi biodegradatsiooni radade operone ning jälgitakse C23O-de ekspressiooni, kasvukineetikat, substraatide lagundamist ja vahemetaboliitide kuhjumist fenoolil, Na-salitsülaadil (teksti lihtustamiseks kasutatakse edaspidi väljendit salitsülaat) ja nende segul. Konstrueeritakse C23O katkestusmutandid ning vaadeldakse, kas ja kuidas ühe kataboolse geeni välja löömine mõjutab mutanttüve kasvu ja kataboolsete geenide ekspressiooni.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Aromaatsete ühendite bakteriaalse lagundamise üldised põhimõtted

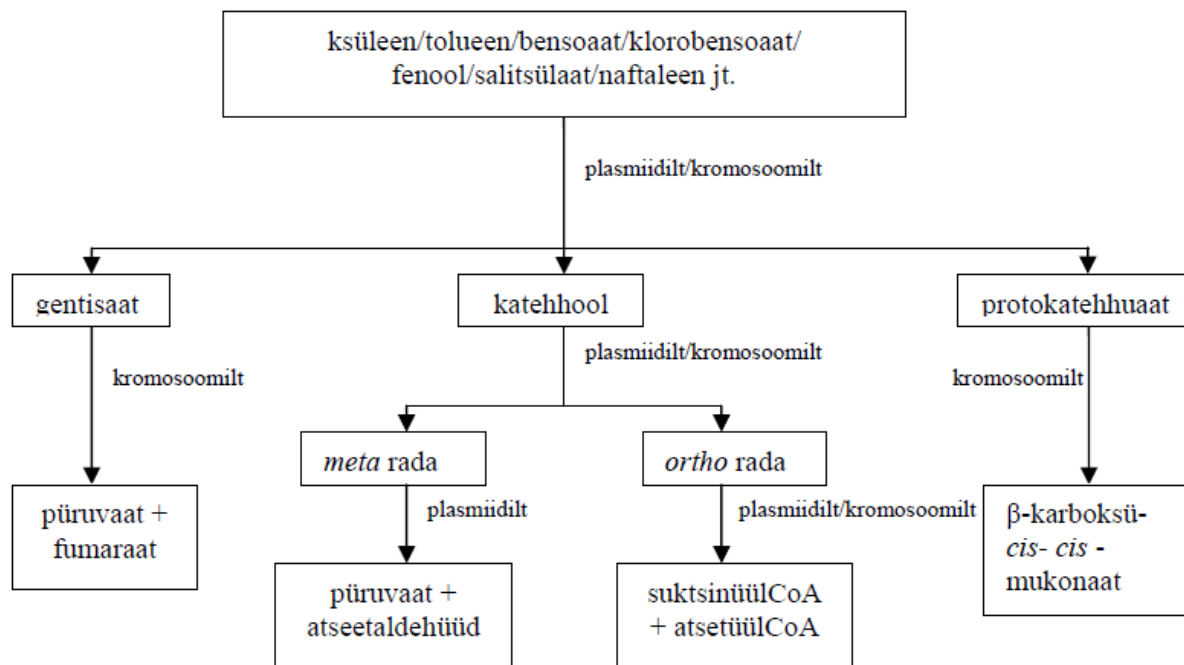
Aromaatsed ühendid sisaldavad ühte või mitut aromaatsset tuuma, mida nimetatakse benseenituumaks. On olemas kolm peamist aromaatsete ühendite rühma: polütsükliilised (PAH-id), heterotsükliilised ja asendusrühmi sisaldavad aromaatsed ühendid. Aromaatsed ühendid on saasteainete seas ühed püsivamad ja laialdaselt levinumad (Li *et al.*, 2009) nii tööstuslikus heitvees kui ka reostunud pinnases (Pessione *et al.*, 2001).

Tööstusliku tegevuse tõttu keskkonda sattuvad aromaatsed ühendid omavad funktsionaalrühmadena tihti alküül-, halogeen-, kloro- ja nitrorühmi (Li *et al.*, 2009). Antropogeensed aromaatsed ühendid on toksilised, mutageensed ja kantserogeensed ehk tervisele ohtlikud (Habe ja Omori, 2003) ning nende esinemine looduskeskkonnas on ühiskonnale suur probleem, kuna antud ühendid on raskesti lagundatavad (Harayama ja Rekik, 1989). PAH-id on toornafta, asfaldi ja kivisöe tõrva peamised koostisosad, mis võivad sattuda keskkonda fossiilkütuste põletamisel, gaasi ja kivisöe tootmisel, puidu töötlemisel või kütuste väärkäitlemisel (Peng *et al.*, 2008).

Tänu sellele, et aromaatsed ühendid on mürgised ja suurendavad vähiriski, kontrollitakse nende sisaldust keskkonnas pidevalt ja neile on riiklikult kehtestatud piirmäärad. Vähendamaks antud ainete hulka keskkonnas on kasutusele võetud mitmeid erinevaid tehnoloogiaid, mis põhinevad peamiselt biodegradatsioonil (Cao *et al.*, 2009). Biodegradatsiooniradade ning nendes osalevate võtmeensüüme kodeerivate geenide uurimine lubab välja selekteerida ekstreemsetes tingimustes vastupidavad ja kõrgema biodegradatsiooni efektiivsusega tüved, kasutamaks neid bioremediatsioonis (Jõesaar, 2009; Dejonghe *et al.*, 2001).

Aromaatne tuum on biokeemiliselt inertne ja seepärast tuleb aromaatsed ühendid kõigepealt aktiveerida oksüdeerimise teel, lisades hapniku aatomeid hüdroksüül- või karboksüülrühmadena. Seda protsessi viivad läbi erinevad ensüümid, mis jaotatakse monooksügenaasideks ja dioksügenaasideks. Dioksügenaasid katalüüsivad hapniku mõlema aatomi lisamist substraadile ja monooksügenaasid ühe aatomi lisamist (Harayama ja Rekik, 1989).

Ensüüme, mida erinevates aromaatsete ühendite lagundamisradades kasutatakse, on mitmesuguseid, aga aromaatsed ühendid muudetakse siiski piiratud hulgaks vaheproduktideks, nagu näiteks katehool, protokatehhuat ja gentisaat (Joonis 1) (van der Meer *et al.*, 1992).



Joonis 1. Aromaatsete ühendite lagundamise rajad bakterites (Lal *et al.*, 1995, modifitseeritud).

Aromaatsete ühendite lagundamise võib üldiselt jagada 3 etappi (William ja Sayers, 1994):

I - Aromaatne substraat läbib rea muutusi, kuni tekib dihidroksüleeritud aromaatne vaheprodukt (N: katehool ja tema derivaadid),

II - tekkinud vaheprodukti benseenituumaa lõhkumine dioksügenaaside poolt. Aromaatse tuuma avamisega lõhuvad dioksügenaasid ühe C-C sideme ning lisavad kaks hapniku aatomit, mille tulemusena tekib küllastamata alifaatne hape,

III - ensüümid töötlevad vaheprodukte kuni tekivad madala molekulmassiga alifaatsed ühendid, mille edasine katabolism toimub põhilistes ainevahetuslikes protsessides.

Aromaatset tuuma avavad dioksügenaasid jagatakse kahte klassi: intradioolsed ehk *ortho*-tüüpi ja ekstradioolsed ehk *meta*-tüüpi dioksügenaasid. Intradioolse ensüümi (Fe^{3+} -sõltuvad) poolt läbi viidud reaktsioonis lagundatakse aromaatses tuumas C-C-side kõrvuti asuvate hüdroksüülrühmade vahelt (van der Meer *et al.*, 1992; Williams ja Sayers, 1994). Ensüümi

substraadiks on kas katehool või protokatehhuat. Katehool ehk 1,2-dihüdrosübenseen on põhiline metaboliit, mis moodustub paljude aromaatsete ühendite degradatsiooniradades ning mis lagundatakse edasi katehooli 1,2-dioksügenaasi (C12O) poolt *cis*, *cis*-mukoonhappeks ja edasiste reaktsioonide käigus konverteeritakse lõpuks suktsinaadiks ja atsetüülCoA-ks (van der Meer *et al.*, 1992; Mishra *et al.*, 2001, Pessione *et al.*, 2001). Intradioolsete dioksügenaaside perekonda kuuluvad protokatehhuadi 3,4-dioksügenaasid, C12O-d ja klorokatehooli 1,2-dioksügenaasid. Üldiselt paiknevad *ortho*-raja geenid kromosoomis (van der Meer *et al.*, 1992). Ekstradioolse ensüümi, nt katehooli 2,3-dioksügenaasi (C23O; Fe²⁺-sõltuvad) poolt läbi viidud reaktsioonis substraadi, tavaliselt katehooli, aromaadne tuum lõhutakse hüdroksüülrühmade kõrvalt ning tekib 2-hüdrosümukonosemialdehüüd, mis lõpuks konverteeritakse püruvaadiks ja atseetaldehüüdiks (Williams ja Sayers, 1994). Arhetüüpne ekstradioolse dioksügenaasi esindaja on C23O. Kokkuvõtlikult võib öelda, et mõlema ensüümi puhul transformeeritakse toksilised aromaatsed ühendid bakterite poolt metaboliitideks, mis liiguvad edasi põhiainevahetuse radadesse (Pessione *et al.*, 2001).

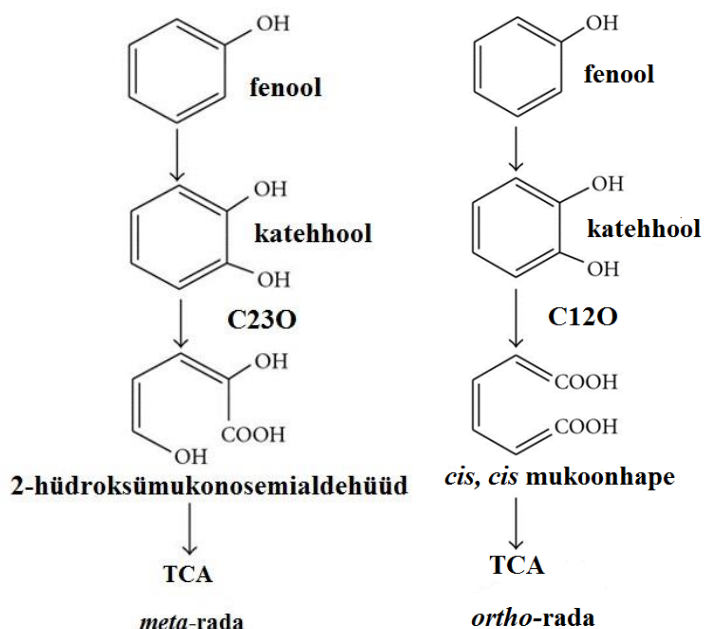
1.2. Fenooli aeroobsed katabolismirajad

Fenool on aromaadne süsivesinik, mille benseenituuma küljes asub hüdroksüülrühm (OH). Benseenituum on üks enamlevinum keemiline struktuur looduses ja paljud antud tuuma omavad ühendid on viidud loodusesse ka inimese kaasabil. On leitud mikroorganisme, kes suudavad taluda keskkonnas fenooli ja kasutada seda energia- ja süsinikuallikana. Mikroorganismid lagundavad fenooli kas aeroobselt või anaeroobselt, tavaliselt on aeroobne protsess eelistatud. Aeroobsed mikroorganismid on soositud, sest harilikult muudavad nad orgaanilise ühendi anorgaaniliseks, kasvavad kiiremini ja aeroobse protsessi energiakulud on väiksemad. Tuntumad bakteritest fenoolilagundajad kuuluvad perekonda *Pseudomonas* (Al-Khalid ja El-Naas, 2012). Fenooli suudavad degradeerida veel näiteks perekondadesse *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. ja *Achromobacter* sp. kuuluvad bakterid (Nair *et al.*, 2008). Paljude seeneliikide puhul, *Candida tropicalis*, *Fusarium flocciferium* ja *Trichosporon cutaneum*, on samuti märgatud võimet kasutada fenooli kui põhilist energia- ja süsinikuallikat. Viimasel ajal on uuritud ka tsüanobakterite ja eukariootsete vetikate võimet lagundada fenooli aeroobsetel tingimustel (Al-Khalid ja El-Naas, 2012).

Fenooli aeroobsel lagundamisel on esimeseks etapiks hüdroksüülrühma lisamine olemasoleva hüdroksüülrühma kõrvale fenooli hüdroksülaasi (PH) poolt (Joonis 2). Tekkinud katehool

lagundatakse mööda kahte alternatiivset rada: *ortho*-rada mööda C12O abil või *meta*-rada mööda C23O abil. PH-d jaotatakse oma ehituse poolest kahte rühma: ühe- ja mitmekomponendilised ensüümid, kusjuures looduses on rohkem levinud mitmekomponentsed PH-d (Peters *et al.*, 1997; Hino *et al.*, 1998; Merimaa *et al.*, 2006).

Ühekomponendilise ensüümi puhul on ensüümiks flavoproteiin (Neujahr ja Gaal, 1973; Enroth *et al.*, 1994), mis kasutab kosubstraatidena molekulaarset hapnikku ja NAD(P)H-d (Pessione *et al.*, 1999). Geene, mis kodeerivad flavoproteiinseid hüdroksülaase (monooksügenaase), on kirjeldatud sellistes mikroorganismides, nagu näiteks *Pseudomonas pickettii* PK01 (*tbuD*) (Kukor ja Olsen, 1992) ja *Pseudomonas sp.* EST1001 (*pheA*) (Nurk *et al.*, 1991).



Joonis 2. Fenooli lagundamine mööda *meta*- ja *ortho*-rada (Mahiuddin *et al.*, 2012, modifitseeritud).

Mitmekomponentsed aromaatsed monooksügenaasid koosnevad vähemalt kahest komponendist: oksügenaasist, mis seob substraadi ja hapniku, ning reduktaasist, mis vastutab elektroni ülekande eest NAD(P)H-lt oksügenaasile. Bakteris *Bacillus thermoglucosidasius* A7 toimub fenooli metaboliseerimine katehhooliks kahe valgu poolt: flaviin reduktaas, mida kodeeritakse geen *pheA1* poolt, ja flaviin-sõltuv monooksügenaas, mida kodeeritakse geen *pheA2* poolt (Duffner ja Müller; 1998).

Bakterite *Pseudomonas* sp. CF600 ja *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 fenooli hüdroksülaasidel on olemas veel kolmas regulatsiooni komponent, mis reguleerib teise kahe eelpool toodud komponendi interaktsioone ja on hädavajalik fenoolist katehhooli saamiseks (Powlowski ja Shingler, 1990; Ehrt *et al.*, 1995; Griva *et al.*, 2003). Antud mitmekomponentsetel PH-del on sarnane struktuur, nad koosnevad 6 alaühikust, millest suurimas asub kataboolne tsester. Antud ensüümid võivad omada erinevaid funktsionaalseid rühmi sisaldavate fenoolide suhtes erinevat substraadispetsiifilisust (Teramoto *et al.*, 1999).

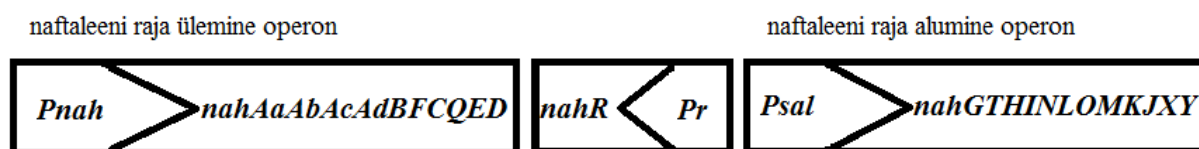
Mitmekomponentsed PH-d jaotatakse kahte rühma sõltuvalt operonide geneetilisest organisatsioonist (Hino *et al.*, 1998): *dmp*-tüüpi, milles esinevad lisaks PH-d kodeerivatele geenidel ka geenid ferredoksiini ja C23O kodeerimise jaoks ning tekkiv katehhool lagundatakse mööda *meta*-rada (Shingler *et al.*, 1989) ja *mop*-tüüpi, milles esineb geen C12O kodeerimise jaoks, aga puudub ferredoksiinile sarnane geen (Ehrt *et al.*, 1995) ning katehhool lagundatakse mööda *ortho*-rada. *Pseudomonas* sp. CF600 mitmekomponendiline *dmp*-tüüpi PH on kõige esimene kirjeldatud kompleksne PH (Nordlund *et al.*, 1990). Tuntuimaks *mop*-tüüpi PH esindajaks on *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 (Ehrt *et al.*, 1995).

1.3. Naftaleeni aeroobsed katabolismirajad

Naftaleen on suletud bitsükliline aromaadne süsivesinik, mida leidub naftas ja selle produktides. Naftaleen on ka kõige lihtsam ja PAH-idest kõige paremini vees lahustuv, seetõttu kasutatakse seda ka mudelühendina uurimaks bakterite võimet degradeerida PAH-e. Paljud isoleeritud bakteritest, kes kasutavad naftaleeni kui ainsat süsiniku- ja energiaallikat, kuuluvad perekondadesse *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* ja *Streptomyces* (Li *et al.*, 2009).

Enamasti lagundatakse naftaleen üle salitsülaadi, kuid Fuenmayor ja tema kaastöölised (1998) on näidanud salitsülaadi lagundamist ka gentisaadiks salitsülaad-5-hüdroksülaasi abil (Joonis 4). Esmakordselt kirjeldati naftaleeni degradatsiooni perekonnas *Pseudomonas* Davies'e ja Evans'i poolt (1964). Tuntuim üle salitsülaadi toimiv naftaleeni lagundamise rada paikneb *Pseudomonas putida* tüve G7 plasmiidil pNAH7. Naftaleeni lagundamise ensüümid asuvad kahes operonis: naftaleeni lagundamise ülemises operonis paiknevad geenid, mis kodeerivad ensüüme naftaleeni

konverteerimiseks salitsülaadiks (*nah* operon - *nahAaAbAcAdBCDEF*), alumises operonis paiknevad geenid kodeerivad aga ensüüme, mis on vajalikud salitsülaadi edasiseks konverteerimiseks põhiainevahetuse vaheühenditeks üle *meta*-raja (*sal* operon - *nahGTHINLJKM*) (Joonis 3, 4) (Yen ja Gunsalus 1982). Kõik need kataboolsed geenid asuvad 30 kb suurusel NAH7 plasmidi fragmendil (Li *et al.*, 2009). Süntees mõlemalt operonilt toimub ühes ja samas suunas ning on positiivselt reguleeritud LysR-tüüpi transkriptsiooni aktivaatori NahR valgu poolt (Joonis 3) (Yen ja Gunsalus, 1985). Kui regulaatorvak NahR seostub indutseerijaga, milleks on salitsülaat, aktiveerib see transkriptsiooni mõlemalt *nah* operonilt (Schell ja Poser, 1989).

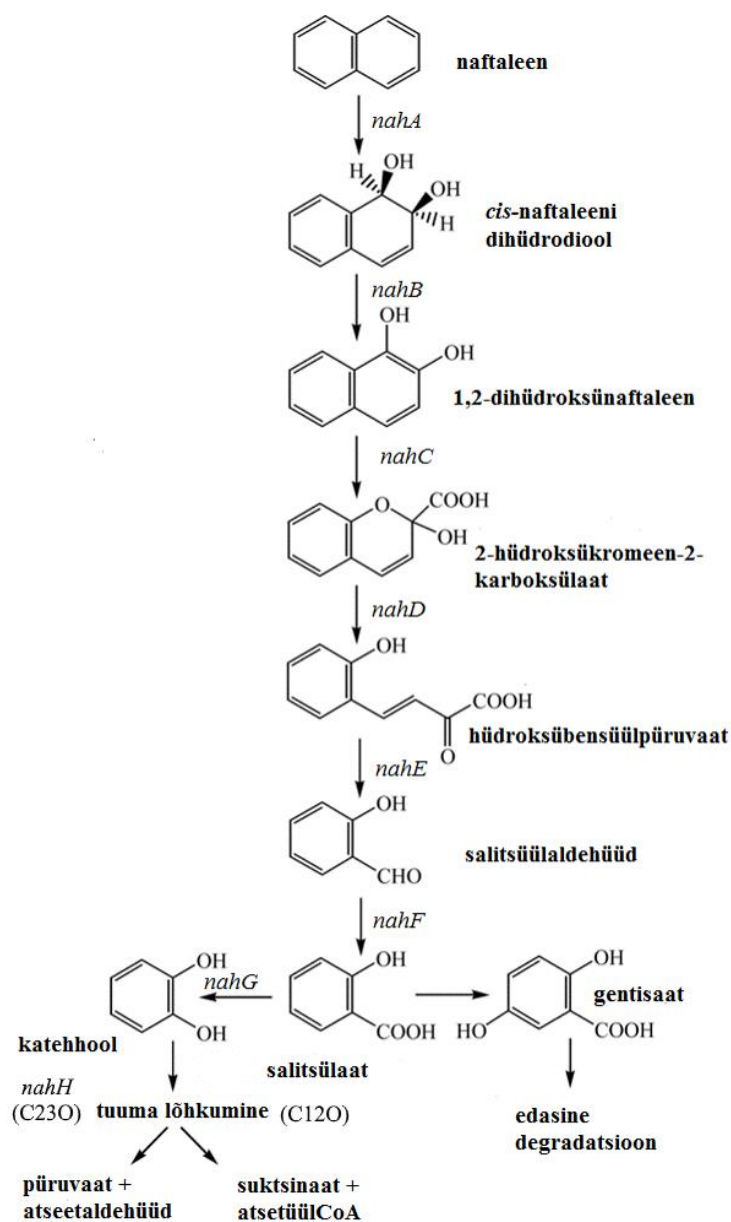


Joonis 3. Naftaleeni degradatsiooni ülemise ja alumise operoni struktuur *P. putida* G7 plasmidis pNAH7. Naftaleeni lagundamise raja ülemise operoni (*nah* operon) geenid, mis on *Pnah* promootori kontrolli all: *nahA* - naftaleeni dioksügenaas; *nahB* - *cis*-dihüdrodiol dehüdrogenaas; *nahF* - salitsüülaldehüüdi dehüdrogenaas; *nahC* - 1,2-dihüdroksünaftaleeni dioksügenaas; *nahQ* - dibensotiofeeni oksüdatsiooni valk; *nahE* - 2-hüdroksübensüülpüruvaadi aldolaas; *nahD* - 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaadi isomeraas. Naftaleeni lagundamise raja alumise operoni (*sal* operon) geenid, mis on *Psal* promootori kontrolli all: *nahR* - LysR-tüüpi transkriptsiooni aktivaator; *nahG* - salitsülaadi 1-hüdroksülaas; *nahT* - kloroplast-tüüpi ferredoksiin; *nahH* - katehooli 2,3-dioksügenaas; *nahI* - 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi dehüdrogenaas; *nahN* - 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi hüdrolaas; *nahL* - 2-oksopent-4-enoaadi hüdrataas; *nahO* - atseetaldehüüdi dehüdrogenaas; *nahM* - 4-hüdroksü-2-oksovaleraadi aldolaas; *nahK* - 4-oksalokrotonaadi dekarboksülaas; *nahJ* - 4-oksalokrotonaadi tautomeraas; *nahX* - oletatav valk; *nahY* - metüül-aktsepteeriv kemotaksise valk.

Ülemise operoni mitmekomponentse ensüümi, naftaleeni dioksügenaasi (*nahA*) osalusel moodustub *cis*-(1R, 2S)-dihüdroksü-1,2-dihüdro-naftaleen ehk *cis*-naftaleeni dihüdrodiol (Joonis 4) (Habe ja Omori, 2003). Antud naftaleeni dioksügenaasi süsteem koosneb kolmest

komponendist: ferredoksiini reduktaasist, ferredoksiinist ja raud-väävel valgust, mis koosneb omakorda kahest mitteidentses subühikust, α ja β (sünteesitud *nahAc* ja *nahAd* geenidelt) (Habe ja Omori, 2003). Elektrontransport indutseeritakse ferredoksiini reduktaasis kahe elektroni ülekandega NAD(P)H-lt FAD-ile, tekib täielikult redutseeritud FAD. Iga redutseeritud FAD-i molekul annab ühe elektroni ferredoksiini [2Fe-2S] klastrile. Lõpuks kantakse elektronid üle raud-väävel valgule ja kasutatakse ära selle aktiivsaidis, et aidata kaasa hapniku molekuli lisamisele naftaleenile (Habe ja Omori, 2003). Naftaleeni lagundamise käigus tekkinud *cis*-naftaleeni dihidrodiool dehüdrogeenitakse 1,2-dihüdroksünaftaleeniks *cis*-dihüdriool dehüdrogenaasi (*nahB*) poolt. Järgnevalt 1,2-dihüdroksünaftaleen *meta*-lagundatakse 1,2-dihüdroksünaftaleeni dioksügenaasi (*nahC*) poolt 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaadiks, mis omakorda lagundatakse hüdroksübensüülpüruvaadiks 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaadi isomeraasi (*nahD*) poolt. Seejärel tekkinud ühend lagundatakse 2-hüdroksübensüülpüruvaadi aldolaasi (*nahE*) abil salitsüülaldehüüdiks ja püruvaadiks. Salitsüülaldehüüd lagundatakse edasi salitsülaadiks salitsüülaldehüüdi dehüdrogenaasi (*nahF*) abil. Tavaliselt dekarboksüleeritakse salitsülaad naftaleeni raja alumises operonis katehooliks, mis hiljem lagundatakse kas *meta* - või *ortho*-rada mööda (Goyal ja Zylstra, 1997).

Pseudomonas putida tüvest NCIB 9816-4 eraldatud 81 kb suurusel naftaleeni plasmiidil pDTG1 paiknevad naftaleeni kataboolsed geenid samuti kahes operonis, kuid süntees *nah* ja *sal* operonidelt toimub erinevates suunades (You *et al.*, 1988). Katehool lagundatakse selles tüves üle *ortho*-raja, kuna *meta*-rada on inaktiveeritud selle ette inserteerunud IS element poolt (Heinaru *et al.*, 2009).



Joonis 4. Naftaleeni lagundamine üle salitsülaadi tekke ja edasine lagundamine mööda katehhooli- või gentisaadi rada (Seo *et al.*, 2009, modifitseeritud). Joonisel on toodud reaktsioone läbiviivate geenide nimed, täispikad nimed leiab Jooniselt 3.

P. stutzeri tüves AN10 asuvad naftaleeni lagundamise operonid kromosoomis ning nende geneetiline organisatsioon on sarnane NAH7 plasmiidile, kuid antud tüvel on lisaks veel üks salitsülaadi 1-hüdroksülaas, NahW (Bosch *et al.*, 1999).

1.4. Katehhooli 2,3-dioksügenaaside mitmekesisus

C23O geenid on kõige enam iseloomustatud kataboolsed geenid, mis osalevad aromaatsete ühendite biodegradatsioonis (Widada *et al.*, 2002). Harayama ja Rekik (1989) tegid algselt ettepaneku, et ekstradioolsed dioksügenaasid võiks jagada kahte perekonda: bitsüklilist ja monotsüklilist substraati eelistavad ensüümid. Bitsükliliste substraatide puhul toimub kõigepealt ühe aromaatses tuuma struktuuri lõhustamine ja siis vaheühendite tekkimine, mis omakorda alluvad nn. teistkordsele tuuma lõhkumisele. Selletüübilist tuuma degradatsiooni katalüüsivad omavahel suguluses olevad, kuid mitte samad ensüümid (Harayama ja Rekik, 1989; Williams ja Sayers, 1994). Igal juhul on samast perekonnast pärit dioksügenaaside sarnasus suurem kui erinevatest perekondadest pärit dioksügenaasidel (Candidus *et al.*, 1994). Siiski avastati nende samade autorite poolt, et *Rhodococcus rhodochronas* tüves CTM paikneb C23O, mis lagundab nii monotsüklilisi kui ka bitsüklilisi substraate.

Eltis ja Bolin (1996) jagasid C23O-d 5 perekonda: I.1 sisaldab ühe-domäänseid ensüüme, mis jagunevad 2 alamperekonnaks; I.2 ja I.3 koosnevad kahe-domäänsest rauda sisaldavatest ensüümidest, mis omakorda jagunevad viieks alamperekonnaks (A, B, C, D, E). Looduses domineerivad I.2A perekonda kuuluvad C23O-d. Perekondadest I.4 ja I.5 on leitud vaid üksikud ensüümid.

Evolutsiooniline analüüs näitab, et C23O-d võib jagada 5 alamperekonda. Suuremas osas need alamperekonnad vastavad ka taksonoomilistele rühmadele 16S rRNA geenijärjestuse põhjal. See omakorda viitab sellele, et C23O geenid on arenenud koos bakteriaalse lahknemisega. Erandjuhtumitena on mõned C23O-d jagatud teistsugustesse alamperekondadesse võrreldes nende taksonoomilise rühmitusega, mille põhjuseks võib olla horisontaalne C23O geenide ülekanne. (Kasuga *et al.*, 2007)

Enim uuritud C23O on kodeeritud *xyIE* geeni poolt, mis osaleb tolueni ja ksüleeni lagundamisel ja asub TOL plasmiidis pWW0 (Mishra *et al.*, 2001). Tuntud ekstradioolsete C23O-de hulka kuuluvad veel näiteks *P. putida* G7 plasmiidil NAH7 paiknev NahH, bifenuüli lagundavas *Pseudomonas* sp. tüves IC BphE ning nitrobenseeni degradeerivas *Comamonas* sp. tüves JS765 CdoE (Dunn ja Gunsalus, 1973; Nishino ja Spain, 1995). Fenooli lagundav *Pseudomonas* sp. CF600 omab C23O, mida kodeerib *dmpB* (Bartilson ja Shingler, 1989). DmpB kuulub koos

arhetüüpsete C23O-dega (XylE ja NahH) ekstradioolsete dioksügenaaside I.2.A alamperekonda ning on aminohappelise järjestuse poolest antud ensüümidega identne 83-87%. Kuigi ekstradioolised ensüümid on palju tavalisemad biodegradatsiooni radades kui intradioolised ensüümid, teatakse nende struktuursete ja funktsionaalsete aspektide kohta veel vähe (Broderick, 1999).

1.5. Katehhooli dioksügenaaside redundantsus

Geenide redundantsus põhineb sellel, et kaks või rohkem geeni täidavad sama funktsiooni ja kui üks nendest geenidest inaktiveerida, siis see ei mõjuta organismi fenotüüpi üldse või mõjutab seda väga vähe (Nowak *et al.*, 1997). Osa baktereid omab kataboolseid redundantseid gene, et hakkama saada lagundamisel tekkinud vaheühendite toksilisusega. Arvatakse, et geenide redundantsus aitab lihtsustada geneetiliste kohastumiste teket või luua uusi biokeemilisi funktsioone (Jiménez *et al.*, 2014; George ja Hay, 2011).

Mitmed uurimisgrupid on näidanud redundantsete katehhooli dioksügenaaside olemasolu erinevates bakterites (Aoki *et al.*, 1984; Keil *et al.*, 1985; O'Donnell and Williams, 1991; Kim *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1999; Pessione *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2014). Jiménez kaastöötajatega (2014) tõestas katsetega, et *P. putida* mt-2 omades kahte C12O, millest üks on kodeeritud *catA* ja teine *catA2* poolt, aitab *catA2* hoida toksilise katehhooli rakusisest kontsentratsiooni madalana. On näidatud, et katehhool on organismidele toksiline ning võib inhibeerida ka katehhooli dioksügenaaside tööd (George ja Hay, 2011). Arvatavasti on *catA2* omandatud eraldi *catA* geenist horisontaalse geeniülekanne kaudu. *Acinetobacter lwoffii* K24 omab samuti kahte C12O, mis omavad erinevat substraadi spetsiifikat ning on valgu N-terminaalses osas üksteisest aminohappelise järjestuse poolest erinevad (Kim *et al.*, 1997). *Frautiersia* sp. ANA18 paikneb üks C12O kromosoomis ja teine plasmiidis. Kahe C12O omamine aitab samuti ära hoida toksilise katehhooli kogunemise antud tüves, mistõttu toimub aniliini metaboliseerimine kiiremini kui teistes aniliini lagundavates bakterites (Murakami *et al.*, 1999). *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) on võimeline lagundama 3-klorobensoati, mille lagundamise käigus tekib 3- ja 4-klorokatehhool, mis lagundatakse klorokatehhooli 1,2-dioksügenaasi poolt (*tfdC*) ning lagundatakse edasi *tfdDEF* geenide kodeeritud ensüümide poolt. Geeniklaster *tfdCDEF* on uuritud tüves duplitseerunud ning kui ainult üks *tfdCDEF* klaster on

funktsionaalne, siis koguneb toksiline klorokatehhool, aga kui funktsioneerivad mõlemad geeniklastrid, siis klorokatehhooli kogunemist ei toimu (Pérez-Pantoja *et al.*, 2003).

Keil ja tema kaastöötajad (1985) ning Chatfield ja Williams (1986) on näidanud, et mõned looduslikult esinevad TOL plasmidi kandvad tüved omavad kahte C23O geeni ja mitut *meta*-rada. Redundantsed operonid võivad anda looduslikus keskkonnas plasmiididele eelise üksiku operoni koopiaga plasmiidide ees (O'Donnell ja Williams, 1991). TOL plasmiid pWW15 omab kahte funktsionaalset *meta*-raja operoni: täielikku *meta*-raja operoni; homoloogset, aga mittetäielikku *meta*-raja operoni, ja veel lisaks kolmandat C23O kodeerivat geeni, mis pole ühegi senini leitud C23O-ga (*xyleE*) sarnane. Antud operonid asuvad üksteisest märkimisväärselt kaugel (Keil *et al.*, 1985; O'Donnell ja Williams, 1991). TOL plasmiid pWW53 kannab kahte homoloogset *meta*-raja operoni, mis on funktsionaalsed aromaatsed karboksüülhappe metabolismis (Gallegos *et al.*, 1997).

P. aeruginosa JI104 omab kolme C23O (*Xyle*_{JI04-1}, *Xyle*_{JI04-2}, *Xyle*_{JI04-3}) ja suudab kasutada mitmeid aromaatsid ühendeid. Leiti, et *Xyle*_{JI04-1}-le on substraadiks ainult katehhool aga *Xyle*_{JI04-2}-le ja *Xyle*_{JI04-3}-le on substraadiks lisaks katehhoolile ka 3- ja 4-metüül- ning 4-klorokatehhool. Arvatakse, et need isofunktsionaalsed ensüümid koeksisteerivad tänu geeni duplitseerumisele ja sellele järgnevale lahknemisele, mis on omakorda tekkinud selektiivsetest piirangutest vabadele duplitseeritud geenidele mutatsioonide kuhjumisest (Kitayama *et al.*, 1996).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. TÖÖ EESMÄRGID

Pseudomonas pseudoalcaligenes tüvi C70 on eraldatud Läänemere pinnaveest Kirde-Eesti ranniku lähedalt Narva lahest (Vedler *et al.*, 2013), TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituudi teaduri Eeva Heinaru poolt. Antud tüve täisgenoomi nukleotiidsed järjestused assambleeris TÜ molekulaar- ja rakubioloogia vanemteadur Eve Naanuri. Saadud tulemused näitasid, et uuritaval tüvel on kolm geneetiliselt erinevat 16S rRNA geeni järjestust. Üks järjestustest on kõige lähedasem bakterile *P. pseudoalcaligenes* ja ülejäänud kaks järjestust bakterile *P. mendocina*. *rpoB* geeni järjestuse ja tüve fenotüüpiliste tunnuste põhjal klassifitseeriti tüvi C70 kui liik *P. pseudoalcaligenes* (Jutkina *et al.*, 2011; Vedler *et al.*, 2013). Tüvi C70 on võimeline lagundama fenooli, naftaleeni ja salitsülaati, kuid ei kasuta bensoaati ega toluuaati. Täisgenoomi järjestuse analüüsist selgus, et uuritaval tüvel on kromosoomis kaks katehhooli *meta*-rada fenoolist ja naftaleenist tekkiva katehhooli lagundamiseks. Kirjanduses on näidatud, et kahe (või enama) katehhooli dioksügenaasi omamine annab eelise bakterile võrreldes bakteriga, kes omab ainult ühte ensüümi.

Tulenevalt sellest on käesoleva töö eesmärkideks:

- 1) analüüsida *P. pseudoalcaligenes* C70 fenooli raja operoni ja naftaleeni raja alumist operoni,
- 2) konstrueerida C23O geenide katkestusmutandid,
- 3) iseloomustada C23O-de ekspressiooni,
- 4) määrata *wt* tüve ja katkestusmutantide kasvuparameetrid fenoolil, salitsülaadil ning nende segul ning substraatide ja vaheühendite kontsentratsioonid kasvukeskkonnas.

2.2. MATERJAL JA METOODIKA

2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

P. pseudoalcaligenes tüve C70 kasvatati 30 °C juures M9 minimaalsöötmel (Adams, 1959), mis sisaldas lisaks veel mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960) ning fenooli või salitsülaati (mõlemat lõppkontsentratsiooniga 1,3 mM). Mutanttüve $\Delta pheB$ kasvatati kanamütsiini (Km) (50 $\mu\text{l ml}^{-1}$) sisaldaval LB-söötmel ja Km (50 $\mu\text{l ml}^{-1}$) või bensüülpenitsilliiniga (Bp) (1,5 mg ml^{-1}) minimaalsöötmel naftaleeni aurudes 30 °C juures. *E. coli* tüve DH5 α , mis sisaldab plasmidi pTZ57R/T, kasvatati ampitsilliiniga (Amp) (150 $\mu\text{l ml}^{-1}$) LB-söötmel 37 °C juures. *E. coli* DH5 α pTZ57R Δ C70nahH::gm konstruktiga ja *E. coli* CC118 λ pir pGP704 Δ C70nahH::gm konstruktiga kasvatati gentamütsiiniga (Gm) (10 $\mu\text{l ml}^{-1}$) ning *E. coli* DH5 α pTZ57R Δ C70pheB::km konstruktiga ja *E. coli* CC118 λ pir pGP704 Δ C70pheB::km konstruktiga Km (50 $\mu\text{l ml}^{-1}$) LB-söötmel. Töös kasutatud tüved ja plasmiidid on toodud Lisas 1. Puhaskultuure säilitati 30% glütseroolis -80 °C juures.

2.2.2. Bakteritüvede kasvuparameetrite määramine

Bakterikultuure kasvatati 150 ml Erlenmeyeri kolbides, millest igauks sisaldas 45 ml destilleeritud vett, 5 ml 10x M9, 125 μl 400x mikroelementide lahust ja substraadina 3 mM lõppkontsentratsiooniga fenooli, salitsülaati või nende kahe aine segu. Inokuleerimiseks kasutati üleöö samal substraadil kasvatatud (30 °C, 180 pööret min^{-1}) bakterirakke (lõpptihedusega $\text{OD}_{580} = 0,02$). Kasvu jälgiti spektrofotomeetriliselt 580 nm juures ning kultuuride spetsiifiline kasvukiirus (μ_{max}) arvutati välja kasutades Richardi mudelit (Dalgaard ja Koutsoumanis, 2001). Substraatide kasutamist ja vaheühendi katehhooli kogunemist määrati Signe Viggori poolt kasutades HPLC meetodit. Vaheühendi, 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi, kogunemist kasvukeskkonnas jälgiti spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 375 nm.

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR

Geenifragmentide amplifitseerimiseks kasutati PCR meetodit. PCR-i reaktsioonisegu, üldmahuga 25 μl , sisaldas: 1x PCR puhver [75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% Tween 20], 0,2 mM lõppkontsentratsiooniga dNTP-d (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl_2 , 10 pmol praimereid (Tabel 1), 0,5 U termostabiilset Taq DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific), bakteri rakke ning lõppmahuni destilleeritud vett. Reaktsioon viidi läbi Eppendorf Masterscycler PCR masinas.

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid

Praimer	Nukleotiidne järjestus (5'→3')	Temp era- tuur (°C)	Aeg (min)	Viide
C70aF C70aR C70bF C70bR	TGGAGCGGGATCTGACGGCA CGGGATTGACCTCATTCACA TCACCGAGGACCTGCTCAAC CCGGGTTGACCTCGGCCAAG	58	0,75	Käesolev töö
polAXhoyl ev polAXhoall	GGGGCAGAACGCCAAGTACG TCTGCGCCAGGCTGTCCAT	58	0,75	Sidorenko <i>et al.</i> , 2011
C70a1F C70a2R C70b1F C70b2R	CAAACCAATAACAAGAGTTCG ACGCCGTAGTTGAGTGCACC CACCACCCTGATGCAAGGTCG ATCTCGAAGGCTTCGGTG	53 54	2-3	Käesolev töö
GmY GmA	CGAATTGACATAAGCCTGTTC CGGCTTGAACGAATTGTTAG	54	2	Sidorenko <i>et al.</i> , 2011
KmSac KmOc	CAGGAGCTCGTTCGATTTATTC AACAAAGCC TCGAGCAAGACGTTTCCC	54	2	Hörak <i>et al.</i> , 2004 Saumaa <i>et al.</i> , 2006

Reaktsiooni toimumise tingimused:

1. DNA esialgne denaturatsioon 96 °C 3 min
2. DNA kaksikahelate denaturatsioon 94 °C 2 min
3. Praimerite seondumine DNA-ga 53 °C-58 °C 45 s sõltuvalt praimerist (Tabel 1)
4. DNA süntees 72 °C 45 s 1- 3 min sõltuvalt produkti suurusest

Etappe 2-4 korrati 32 korda.

5. Lõppekstensioon 72 °C 10 min

2.2.4. Geelelektroforees

Läbiviidud PCR-i tulemuste kontrollimiseks ja analüüsimiseks kasutati geelelektroforeesi. Selleks kanti reaktsioonisegud etiidiumbromiidi ($0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$) sisaldavale 0,8% agarosgeelile, mis valmistati 1x TAE puhvrts (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Enne geelile kandmist lisati 5 μl proovile 1 μl foresivärvi (0,04% broomfenooli lahus 50% glütseroolis). Produktide pikkuste määramiseks kasutati GeneRuler 1kb DNA ladder DNA molekulmassi markerit (Thermo Fisher Scientific). Elektroforees toimus 100 V juures 1x TAE puhvrts 15 minuti jooksul. Geeli pildistati ultravioletvalgust tootvate lampidega varustatud valguslaual, et kontrollida produktide olemasolu ja pikkust.

2.2.5. Järjestuste analüüs ja fülogeneesipuu konstrueerimine

Fenooli raja operoni (*phe*) ja naftaleeni raja alumist operoni (*sal*) analüüsiti NCBI ORF Finder ja BLAST programmide abil, kasutades Eve Naanuri poolt assambleeritud järjestusi. Tüve C70 *sal* ja *phe* operonide nukleotiidsed järjestused sisestati GenBank andmebaasi registreerimisnumbritega vastavalt KU695544 ja KU695543. C23O-de ennustatavate aminohappeliste järjestuste põhjal konstrueeriti fülogeneesipuu, kasutades MEGA6 programmi (Tamura *et al.*, 2013).

2.2.6. Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati *Axygen AxyPrep™ Plasmid Miniprep* kitti järgides tootja etteantud protokoll.

2.2.7. Kompetentsete rakkude valmistamine

Elektroporatsiooni kasutati plasmiidse DNA sisestamiseks rakkudesse. Kompetentsete rakkude (*E.coli* DH5 α või CC118 λ pir) saamiseks tehti ümberkülv üleöö LB-vedelsöötmes kasvanud rakkudest uude LB-vedelsöötmesse ja pandi 37 °C juurde 2 tunniks kasvama. Seejärel eraldati söötmes olevad rakud tsentrifuugimisega (12000 x g, 1 min, „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“). Järgnevalt pesti sadet 2 korda 500 μl külma mQ ja 2 korda 200 μl külma 10%-se glütserooliga ning suspendeeriti 50 μl 10%-ses glütseroolis.

2.2.8. Ligeerimine ja elektroporatsioon

Ligeerimise reaktsioonisegu, üldmahuga 10 µl, sisaldas lisaks PCR-i produktile ja vektorile, 1 mM lõppkontsentratsiooniga ATP-d, 10x ligaasipuhvrit ning 0,5 ühikut ligaasi. Reaktsiooni toimumiseks hoiti segu üleöö temperatuuril 20 °C. Ligaasisegu sadestamiseks kasutati 2 µl 5 M NaCl ja 50 µl külma 96% etanooli lahust, sadestamissegu hoiti -20 °C juures 20 minutit. Segu tsentrifuugiti (12000 x g, 15 min), saadud sadet pesti 2 korda 150 µl 70% etanooliga. Sade kuivatati ja seejärel võeti üles 5 µl mQ vees.

Kompetentsed rakud (p.2.2.7) (50 µl) ja 2,5 µl ligaasisegu pipeteeriti elektroporatsiooni küveti. Elektroporeerimine toimus BioRad elektroporaatoriga 2500 V suurusel pingel. Pärast elektroporeerimist kanti segu 1 ml LB-söötmega katseklaasi ja pandi 37 °C juurde loksutite üheks tunniks kasvama. Kasvanud rakud eraldati söötmest tsentrifuugimise teel, eemaldati osa supernatanti. Alles jäeti umbes 100 µl söödet, milles rakud suspendeeriti ning plaaditi seejärel selektiivsöötmele (p.2.2.1) ja kasvatati temperatuuril 37 °C.

2.2.9. Katkestatud C230 kodeeriva geeniga mutanttüve konstrueerimine

2.2.9.1. Tüve C70 C230 katkestusmutantide konstrueerimine

Naftaleeni ja fenooli lagundamise eest vastutavate geenide katkestusmutantide konstrueerimiseks amplifitseeriti C230 kodeerivate *nahH* ja *pheB* geenide vastavad DNA regioonid PCR-i abil (p.2.2.3) *P. pseudoalcaligenes* tüvest C70. *nahH* ja *pheB* geenide amplifitseerimiseks kasutati vastavalt C70a1F-C70a2R ja C70b1F-C70b2R praimereid (Tabel 1). Amplifitseeritud PCR produktid, *nahH* ja *pheB*, ligeeriti seejärel pTZ57R/T vektorisse ning elektroporeeriti (2.2.8) kompetentsetesse *E.coli* DH5α rakkudesse. Ligeerimise tulemusena tekkisid C70nahH/pTZ57R ja C70pheB/pTZ57R konstruktid. Elektroporeeritud rakud külvati selektiivsöötmele (p.2.2.1) ja vektorisse kloneeritud fragmentide õigsust kontrolliti PCR meetodi abil *nahH* ja *pheB* spetsiifiliste praimeritega (Tabel 1). Õigetest kloonidest eraldati *nahH* või *pheB* gene sisaldavad vektorid (p.2.2.6). Katkestusmutantide edasiseks konstrueerimiseks restrikteeriti *nahH* geen vektorist C70nahH/pTZ57R *AatII* ja *NotI* restriктаasidega ja *pheB* geen vektorist C70pheB/pTZ57R restriктаasiga *EcoI30I*. Restriksioonidel kasutati firma Thermo Fisher Scientific restriктаase. Restrikteeritud *nahH* ja *pheB* geenid asendati vastavalt Gm^r ja Km^r geenidega. Selleks amplifitseeriti eelnevalt Gm^r geen PCR-i abil pBK-miniTn7-ΩGm

plasmiidilt, kasutades praimereid GmY ja GmA (Tabel 1) ja Km^r geen pUTmini-Tn5 Km2 plasmiidilt, kasutades KmSac praimerit (Tabel 1). Amplifitseeritud Gm^r ja Km^r geenide fragmente lõigati *Ecl36II* ja *DpnI* restriктаasidega. Enne ligeerimist tehti lõigatud vektoritele Klenowi töötlus. Klenowi töötluks lisati reaktsioonisegule 1µl 1 mM dNTP-d ja 1 U Klenowi fragmenti (Thermo Fisher Scientific), seejärel hoiti segu 30 minutit 37 °C juures. Lõigatud Km^r ja Gm^r fragmentidele tehti aluselise fosfataasi töötlus fosfataasiga FastAP (Thermo Fisher Scientific), et vältida avatud kloneerimisvektori kokku ligeerumist. Selleks lisati restriksioonisegule 1 U ensüümi FastAP ning inkubeeriti 15 minutit temperatuuril 37 °C. FastAP inaktiveeriti, hoides proovi 10 minutit temperatuuril 75 °C. Lõigatud vektorid ning Gm^r ja Km^r geenifragmendid sadestati ning ligeeriti nagu eelnevalt kirjeldatud (p.2.2.8). Saadud pTZ57RΔC70nahH::gm ja pTZ57RΔC70pheB::km konstruktid elektroporeeriti kompetentsetesse *E. coli* DH5α rakkudesse. Elektroporeeritud rakud külvati selektiivsöötmele (p.2.2.1) ning pTZ57RΔC70nahH::gm ja pTZ57RΔC70pheB::km konstruktide kontrollimiseks kasutati PCR meetodit, kasutades vastavalt C70b1F ja KmOc ning C70a1F ja GmA (Tabel 1) praimereid. Kontrollitud pTZ57RΔC70nahH::gm ja pTZ57RΔC70pheB::km konstruktidest lõigati *KpnI-PaeI* restriктаasidega välja C70nahH::gm ja C70pheB::km ning ligeeriti suitsiidvektorisse pGP704 L, mis avati samade restriктаasidega ning elektroporeeriti kompetentsetesse *E. coli* CC118λpir rakkudesse. Elektroporeeritud rakud külvati jällegi selektiivsöötmele (p.2.2.1) ja tekkinud pGP704ΔC70nahH::gm ja pGP704ΔC70pheB::km konstrukte kontrolliti PCR-i abil.

2.2.9.2. Bakterite kolmikristamine

Konstruktid, pGP704ΔC70nahH::gm ja pGP704ΔC70pheB::km, viidi edasi *E. coli* CC118λpir tüve rakkudest *P. pseudoalcaligenes* tüve C70 rakkudesse konjugatsiooni ehk kolmikristamise teel. Konjugatsioonis kasutati kolme tüve: *E. coli* CC118λpir vastava konstruktiga, *P. pseudoalcaligenes* C70 ja helpertüvi *E. coli* HB101, mis sisaldas helperplasmidi pRK2013. Rakke kasvatati LB-vedelsöötmes, kuhu oli lisatud plasmidi seleksiooniks vajalik antibiootikum Km (50 µg ml⁻¹) või Gm (10 µl ml⁻¹), 37 °C juures ning retsipienttüve (*P. pseudoalcaligenes* tüve C70) rakke 30 °C juures üleöö. Igast üleöö kasvanud tüvest lahjendati rakukultuurid LB-söötmesse tiheduseni A₅₈₀ = 0,1 ja kasvatati eksponentsiaalsesse kasvufaasi tiheduseni A₅₈₀=0,6-0,8.

Seejärel segati helper-, doonor- ja retsipienttüved kokku (100 µl igat tüve) 1,5; 2; 2,5 tunni möödumisel ümberkülvist ning kanti LB-tardsöötmele ühte laiku ja kasvatati üleöö temperatuuril 30 °C. Üleöö kasvanud biomass suspendeeriti üles 1 ml 1x M9 lahuses ning sellest plaaditi 140 µl minimaalsöötmele, mis sisaldas Gm (10 µg ml⁻¹) ja fenooli või Km (50 µg ml⁻¹) ja naftaleeni graanuleid. Tekkinud transkonjugandid plaaditi kontrolliks edasi Bp (1,5 mg ml⁻¹) ja fenooli või naftaleeni graanuleid sisaldavale selektiivsöötmele. Transkonjugante kontrolliti ka PCR meetodi abil, kasutades KmOc, C70b1F, GmA, C70a1F praimereid ja ka *nahH* ja *pheB* sisemisi C70aF ja C70aR ning C70bF ja C70bR praimereid (Tabel 1).

2.2.10. qRT-PCR

Geenide *nahH* ja *pheB* ekspressiooni hindamiseks eraldati RNA *P. pseudoalcaligenes* C70 eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest, kasutades NucleoSpin RNA II kitti vastavalt tootja etteantud protokollile (Macherey-Nagel). Rakke kasvatati selleks R2A, R2A ja 2,5 mM salitsülaadil või R2A ja 2,5 mM fenooli vedelsöötmes. Saadud RNA proove töödeldi täiendavalt ensüümiga Dnaas I (Thermo Fisher Scientific), et vältida DNA kontaminatsiooni. Eraldatud RNA kontsentratsiooni ja puhtuse määramiseks kasutati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit (Thermo Fisher Scientific). qRT-PCR-i jaoks kasutati QIAGEN Group masinat RotorGene ja Superscript III Platinum SYBR green one-step qRT-PCR kitti (Invitrogen), järgides tootja etteantud protokollit. Reaktsioonisegu, üldmahuga 10 µl, sisaldas 10 ng RNA-d. *nahH* ja *pheB* geene amplifitseeriti kasutades vastavalt C70aF ja C70aR ning C70bF ja C70bR praimereid. Referentsgeeninina kasutati *polA* geeni, mis amplifitseeriti kasutades polAXhoylev ja polAXhoall praimereid (Tabel 1). Proove amplifitseeriti kolmes korduses ja samadel tingimustel.

qRT-PCR koosnes järgnevatest etappidest:

1. 50 °C 3 min
2. 95 °C 5 min
3. 95 °C 15 s; 58 °C 30 s; 72 °C 20 s (korrati 40 korda)
4. 40 °C 1 min
5. Sulamisköver 72 - 95 °C, 0,35 kraadi kaupa, masin ootas 3 s enne järgmist etappi.

Tulemusi analüüsiti, kasutades RotorGene 2.02 (Qiagen) programmi ja mRNA hulgad arvutati välja, kasutades LinRegPCR 2013.0 programmi (Ruijter *et al.*, 2009).

3. TULEMUSED JA ARUTELU

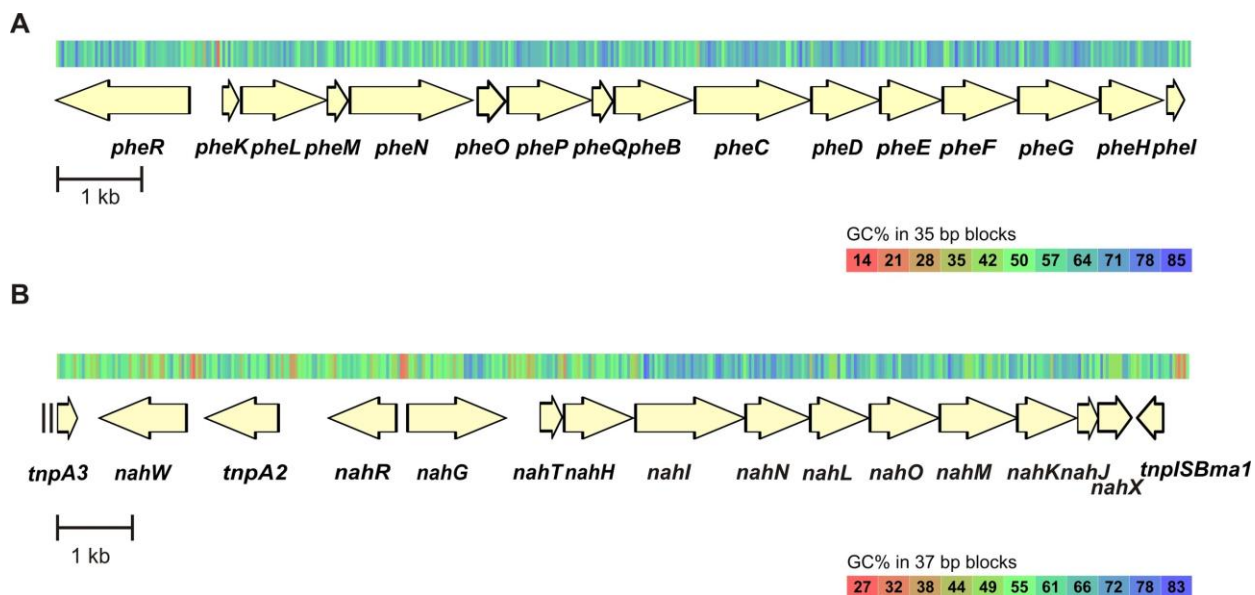
3.1. *P. pseudoalcaligenes* C70 kataboolsete operonide ja C23O-de fülogeneetiline analüüs

3.1.1. Tüve C70 fenooli raja operoni ja naftaleeni raja alumise operoni analüüs

Täisgenoomi eskiisversiooni järjestuse analüüsist selgus, et *P. pseudoalcaligenes* tüvel C70 on kromosoomis kaks katehhooli *meta*-rada, üks neist asub samas operonis koos multikomponentse fenooli hüdroksülaasi ja teine salitsülaadi hüdroksülaasidega. Operonide analüüsil leitud ORF-id (Open Reading Frame), nende arvatav funktsioon ehk mis valku lagundamiseks transleeritakse ja ORF-i identsus referentstüvega on välja toodud Lisas 2 ning operonide struktuure on graafiliselt kujutatud Joonisel 5.

Analüüsides blastx programmiga *sal* operoni järjestusi selgus, et 16 ORF-st koosnev operon on struktuurselt sarnane *P. stutzeri* AN10 kirjeldatud *sal* operoniga (identsus 97-100%) (Bosch *et al.*, 2000). Sarnaselt tüvega AN10, omab uuritav tüvi C70 kahte salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (NahW ja NahG). Tüve C70 NahW asub transposoonide (TnpA3 ja TnpA2) vahel ning on 100% identne tüve AN10 vastava valguga (Lisa 2, Joonis 5B). Operon on reguleeritud LysR perekonna transkriptsiooni aktivaatori (NahR) poolt ja mõlema tüve (*P. pseudoalcaligenes* C70 ja *P. stutzeri* AN10) regulatoorse valgu omavahelise aminohappelise järjestuse identsus on 100%. Kõige suurem erinevus leiti tüvede C70 ja AN10 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi hüdrolaasi (NahN) ja 2-oksopent-4-enoaadi hüdrataasi (NahL) aminohappeliste järjestuste võrdlemisel (identsus mõlemal juhul 97%). Kahe tüve C23O-de (NahH) identsus on 99,7%.

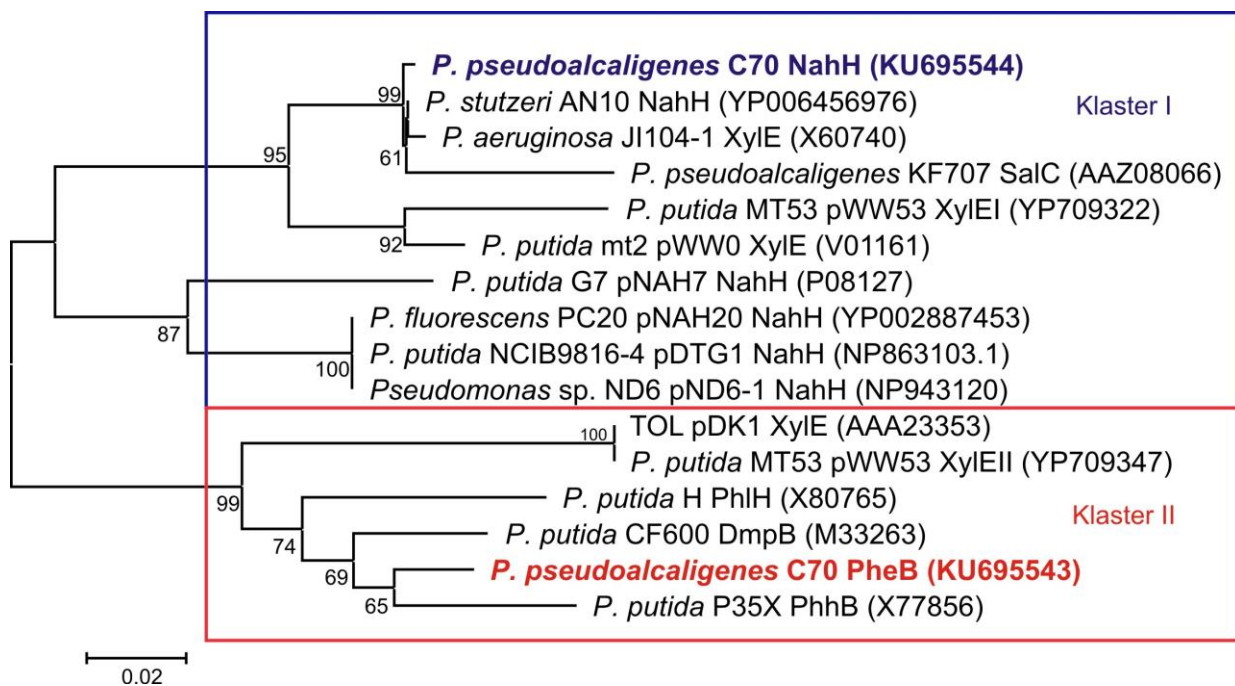
Fenooli lagundamise rada kodeeriv operon koosneb samuti 16 ORF-st ning on struktuurselt sarnane *Pseudomonas* sp. CF600 *dmp* operoniga (Shingler *et al.*, 1992) (Lisa 2, Joonis 5A). Tüve C70 fenooli raja operon *pheRKLMNOPQBCDEFGHI* koosneb XylR-tüüpi regulaatorist (*pheR*), multikomponentsest fenooli hüdroksülaasist (*pheKLMNOP*) ja katehhooli *meta*-raja geenidest (*pheQBCDEFGHI*). C23O kodeerib *pheB* geen. Uuritava tüve fenooli operoni järjestused ei ole nii sarnased (identsus 85-100%) tüve CF600 *dmp* operoni järjestustega kui on *sal* operonil tüve AN10 vastava operoniga.



Joonis 5. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 fenooli raja operoni (A) ja naftaleeni lagundamise alumise raja operoni (B) struktuurid. Geenide nimetused on toodud Lisas 2.

3.1.2. Tüve C70 C23O fülogeetiline analüüs

Bakterid võivad omada redundantseid gene, et väheneks lagundamisel tekkivate vaheühendite toksilisust, aidata kaasa uute geneetiliste kohastumiste või biokeemiliste funktsioonide loomisele (vt peatükk 1.5). Antud töö eesmärgiks oli uurida mõlema *meta*-raja esimeste geenide, *pheB* ja *nahH*, mis kodeerivad C23O-d, rolli fenooli ja salitsülaadi lagundamisel. Selleks konstrueeriti kõigepealt fülogeneetiline puu uuritud tüve C70 C23O-de (307 ah) ning neile kõige sarnasemate geenipangast (GenBank) saadud järjestuste põhjal (Joonis 6).



Joonis 6. Tüve C70 ning GenBank andmebaasist leitud referentstüvede C23O-de ennustatavate aminohappeliste järjestuste (307 ah) põhjal koostatud fülogeneetiline dendrogramm. Dendrogrammi hargnemispunktides on näidatud bootstrap analüüsi (1000 replikaati) väärtused, mis on suuremad kui 50%. Mõõtskaala pikkus võrdub 0,02 asendusega aminohappe kohta.

Fülogeneesipuul on näha, et tüve C70 C23O-d (PheB ja NahH) klasterdusid aminohappelise järjestuse põhjal kahte erinevasse rühma. PheB klasterdus samasse gruppi referentstüvede fenooli operonides paiknevate C23O-dega (klaster II) ja NahH vastavalt *sal* operonidest pärit C23O-dega (klaster I). Tüve C70 PheB oli kõige lähedasem tüvede *P. putida* P35X PhhB ja *Pseudomonas* sp. CF600 DmpB ennustatavate aminohappeliste järjestustega. Uuritava tüve naftaleeni raja alumises operonis paiknev NahH oli kõige sarnasem *P. stutzeri* AN10 NahH ja *P. aeruginosa* JI104-1 XylE ennustatavate aminohappeliste järjestustega.

P. stutzeri AN10 ja C70 NahH omavaheline identsus on 99,7% (Lisa 2), erinevad need kaks valku ainult ühe aminohappe poolest, histidiini asemel on tüvel C70 positsioonis 218 türosiin. Tüve C70 kahe C23O (NahH ja PheB) omavahelise ennustatava aminohappelise järjestuse identsus on 85%, ka neil on erinevus 218 positsioonis - NahH omab antud positsioonis türosiini, aga PheB fenüülalaniini. *Pseudomonas* sp. CF600 DmpB omab, samuti nagu C70 PheB, selles positsioonis fenüülalaniini.

Kirjanduses on näidatud, et kasvõi ühe aminohappe erinevus võib mõjutada C23O katalüütilisi omadusi, nimelt on pseudomonaadidel, kelle C23O aminohappelise järjestuse positsioonis 218 on türosiin, kõrge afiinsus katehhooli suhtes ning nad on eraldatud kas kõrge või keskmise reostusega aladelt. Samas tüvedel, kelle C23O aminohappelise järjestuse positsioonis 218 on histidiin, on madal afiinsus katehhooli suhtes ja enamasti on nad pärit väga saastunud piirkondadest. (Junca *et al.*, 2004, Suenaga *et al.*, 2009). See väide peab hästi paika *P. stutzeri* AN10 korral, mis on isoleeritud Vahemere reostunud meresetetest (García-Valdés *et al.*, 1988) ning kaudselt ka meie uuritava tüvega, mis on eraldatud Soome lahe lõunarannikult tiheda laevaliiklusega ja mitme suure sadamaga piirkonnast.

3.2. Tüve C70 katkestusmutantide konstrueerimine

Käesoleva töö järgmiste eesmärkide täitmiseks konstrueeriti kõigepealt mutanttüvi, kus fenooli operoni kuuluv C23O kodeeriv *pheB* geen on inaktiveeritud. Mutandi tegemiseks konstrueeriti doonortüvesse *E. coli* CC118λpir konstrukt pGP704ΔC70*pheB*::km (vt metoodika 2.2.9.1), mis viidi kolmikristamisel (retsipienttüve *P. pseudoalcaligenes* C70 ja *helper*-tüvi *E. coli* HB101 konjugatsiooni abistava plasmiidiga pRK2013, vt metoodika 2.2.9.2) tüvesse C70.

Ristamisest tehti esmalt külvid kanamütsiini (Km) sisaldavatele naftaleeni-minimaalsöötmetele selekteerimaks rakke, kus homoloogilise rekombinatsiooni tagajärjel on kromosoomis asuv C23O kodeeriv *pheB* geen asendatud Km^r resistentsusgeeniga.

Saadud kolooniatest tehti paralleelselt külvid Km kui ka Bp sisaldavatele naftaleeni-minimaalsöötmetele. Viimati nimetatud söötmel kasvavad vaid need Km^r kolooniad, milles oli terve pGP704L/C70*pheB*::Km plasmiid genoomi lülitunud ning seega eristuvad nad Δ*pheB* kolooniatest. Selekteerimaks Km^r Bp^s kolooniate hulgast neid, kus *pheB* geeni asemele on sisestatud Km^r geen, kasutati PCR meetodit, rakendades reaktsioonides vastavalt praimeripaare C70bF/C70bR ja C70bF/KmOc (vt metoodika 2.2.3). Lisaks kontrolliti mutandi Δ*pheB* õigsust 16S rRNA geeni ja teiste *wt* tüve kataboolsete geenide amplifitseerimise ja sekveneerimisega (töö teostas Merike Jõesaar). Katkestusmutandi Δ*pheB* saamiseks analüüsiti umbes 2000 kolooniat, mis saadi erinevatest kolmikristamiste katsetest.

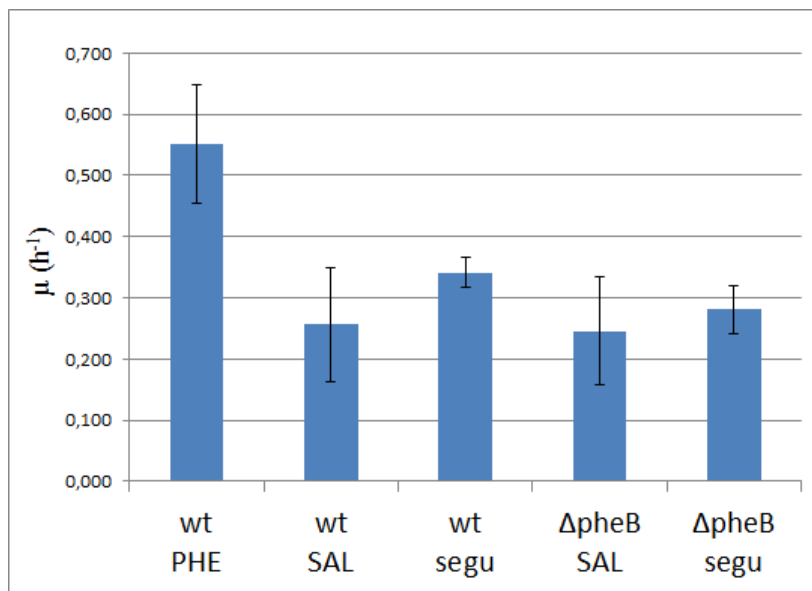
Mutanti $\Delta nahH$, kus naftaleeni alumise operoni koosseisu kuuluva C23O kodeeriv *nahH* geen on välja löödud, ei õnnestunud vaatamata korduvatele katsetele ülalkirjeldatud meetodil konstrueerida. Merike Jõesaar (2016) kasutas ka Martínez-Garcia ja de Lorenzo (2011) väljatöötatud meetodit, kuid mutantset tüve kätte saada ei õnnestunud. Ebaõnnestunud mutantide konstrueerimisest on teatanud ka teised töörühmad, näiteks bakteritüve *C. necator* JMP134 C23O-de mutantide ebaõnnestumist põhjustas tüves esinev redundantsus (Pérez-Pantoja *et al.*, 2008).

Järgnevates katsetes kasutati *P. pseudoalcaligenes* C70 *wt* tüve ja mutanti $\Delta pheB$ saamaks informatsiooni C23O-de funktsioneerimise kohta.

3.3. *wt*- ja mutanttüvede kasvukineetika

Aromaatsete ühendite ja nende vahemetaboliitide kõrge kontsentratsioonid kasvukeskkonnas võivad olla bakterile toksilised. Salitsülaadi toksilisust bakteritele on tõestatud Pomposiello ja kaastöölise poolt (2001) kui nad avastasid, et *Escherichia coli* kasvu LB-söötmele inhibeeris 5 mM salitsülaadi lisamine kasvukeskkonda. Samuti märkasid salitsülaadi inhibeerivat omadust Lee ja tema kaastöölised (2005) kui nad kasvasid bakterit *Burkholderia cepacia* fenantreenil ning salitsülaadil inhibeeris kasvu juba 1,25 mM madalamal kontsentratsioonil.

Lanfranconi kaastöötajatega (2009) näitas, et tüvi *P. stutzeri* AN10 omades redundantseid geene andis tüvele võime kasvada kõrgetel kuni 25 mM salitsülaadi kontsentratsioonidel. Kuna uuritava tüve C70 *sal* operon on peaaegu identne AN10 *sal* operoniga, prooviti ka tüve C70 kasvatada 3 mM salitsülaadil ja fenoolil ning mõlema substraadi segul uurimaks *wt*- ja mutanttüvede kasvukineetikat (Joonis 7). Segasubstraat valiti juurde, kuna looduses esinevad aromaatsed ühendid segudena, mitte puhaste substraatidena.



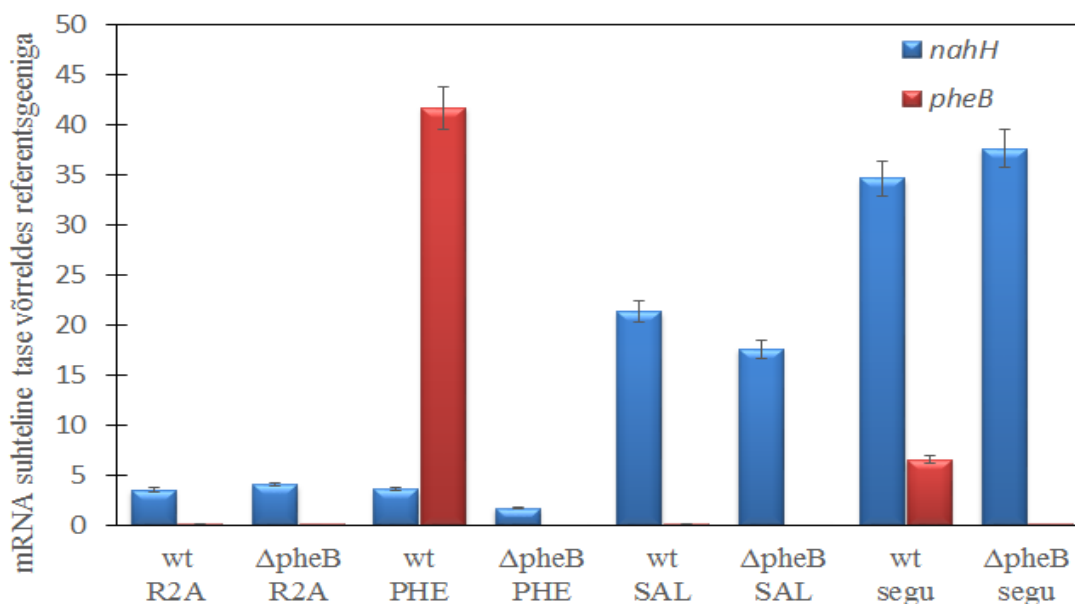
Joonis 7. *wt*- ja mutanttüvede ($\Delta pheB$) kasvukiirused fenoolil (PHE, 3 mM) ja salitsülaadil (SAL, 3 mM) ning nende segul. Katse viidi läbi kolmes korduses ja vead on antud standardhälvena.

Jooniselt 7 on näha, et kõige suurem on kasvukiirus *wt* tüvel fenoolil kasvatades - $0,55 \text{ h}^{-1}$. Samas on salitsülaadil nii *wt*- kui ka mutanttüvede kasvukiirused sarnased - vastavalt $\mu_{wt} = 0,26 \text{ h}^{-1}$ ja $\mu_{mut} = 0,25 \text{ h}^{-1}$, fenooli ja salitsülaadi segul aga $\mu_{wt} = 0,34 \text{ h}^{-1}$ ja $\mu_{mut} = 0,28 \text{ h}^{-1}$. Mutanttüvi, kellel on fenooli raja C23O kodeeriv geen (*pheB*) välja löödud, ei suuda enam fenoolil kasvada. Salitsülaadil kasvatades muutusid nii *wt*- kui ka mutanttüvede kasvukeskkond tumepruuniks. Kirjanduses on väidetud, et tumeda värvuse põhjustavad pigmendid on kinoonsete vaheühendite polümeersed agregaadid, mis tekivad lahuses spontaanselt pärast katehooli oksüdeerimist. Pigmentide teke sõltub katehooli kontsentratsioonist ning on toksiline isegi katehooli lagundajatele (Park *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2014). Sellest võib järeldada, et ka käesolevas töös kaasneb salitsülaadi lagundamisega kasvu limiteerivate ühendite kogunemine keskkonda. Kuna täheldati erinevusi tüvede kasvukineetikas, vaadati järgmiseks, kuidas on C23O ekspresseeritud vastavate substraatide juuresolekul nii *wt*- kui ka mutanttüvedes qRT-PCR meetodiga.

3.4. *wt*- ja mutanttüvede C23O ekspressioon fenoolil, salitsülaadil ja nende segul

Järgmiseks töö ülesandeks oli uurida ja võrrelda C23O-de ekspressiooni sõltuvust indutseerijast (fenool, salitsülaad või mõlemad) *wt*- ja mutanttüvedes ($\Delta pheB$) kasutades qRT-PCR meetodit (vt metoodika 2.2.8) (Joonis 8). Katsest selgus, et *wt* tüves vastutab C23O ekspressiooni eest fenooliga indutseerides *pheB* ja salitsülaadiga *nahH*. Salitsülaadi poolt indutseeritud *nahH* geeni ekspressioonitasemed olid *wt*- ja mutanttüvedes sarnased. Erinevalt *pheB* geeni ekspressioonist on *nahH* geen ekspresseeritud fenooliga indutseerimisel ja ka induktorite puudumisel (R2A-sööde), millest võib järeldada, et *nahH* on konstitutiivselt ekspresseeritud. *wt* tüves oli *pheB* ekspressiooni tase kaks korda kõrgem kui salitsülaadi poolt indutseeritud *nahH* tase. *wt*- ja mutanttüvede induktsioonil substraatide seguga on *nahH* geeni ekspressioonitase kõrgem kui ainult salitsülaadiga indutseerides. Samas *pheB* geeni ekspressioonitase substraatide segul on *wt* tüves kaheksa korda madalam kui ainult fenooliga indutseerides. Pessione koos kaastöölisega (2001) näitas samuti, et geenide ekspressioon on sõltuv kasvukeskkonnast, uurides *Acinetobacter radioresistens* tüve S13 kahe C12O isoensüümide ekspressiooni. Iso A on rohkem ekspresseeritud kui süsinikuallikaks on fenool ning Iso B kui kasvu substraadiks on bensoaat.

C23O-de ekspressioonitasemete määramise katsete tulemustest selgus, et *nahH* ekspressioon on inhibeeritud salitsülaadiga induktsioonil ning kasvukineetika katses nähti salitsülaadi lagundamisel keskkonna pruunistumist ning oletati toksiliste vahemetaboliitide kogunemist. Katehoolsed substraadid võivad C23O inaktiveerida suitsiidinhibitsiooni nime all tuntud protsessi läbi ning samas C23O inhibitsioon põhjustab katehooli kuhjumist ja limiteerib organismile kasvuks vajalike substraatide kättesaadavust (George ja Hay, 2011). Juang ja Tsai (2006) on näidanud, et bakteris *Pseudomonas putida* on salitsülaadi inhibeeriv efekt kasvule tugevam kui fenoolil. George ja tema kaastöölised (2011) avastasid, et C23O inaktivatsioon on põhiline faktor, mis takistab *Pseudomonas putida* tüvel F1 kasvamist stüreenil. Oma töös näitasid nad, et lagundamise rajast (*tod*) pärit C23O (TodE) inaktivatsioon põhjustas 3-vinüülkatehooli kogunemist, toksilisust ja rakusurma.



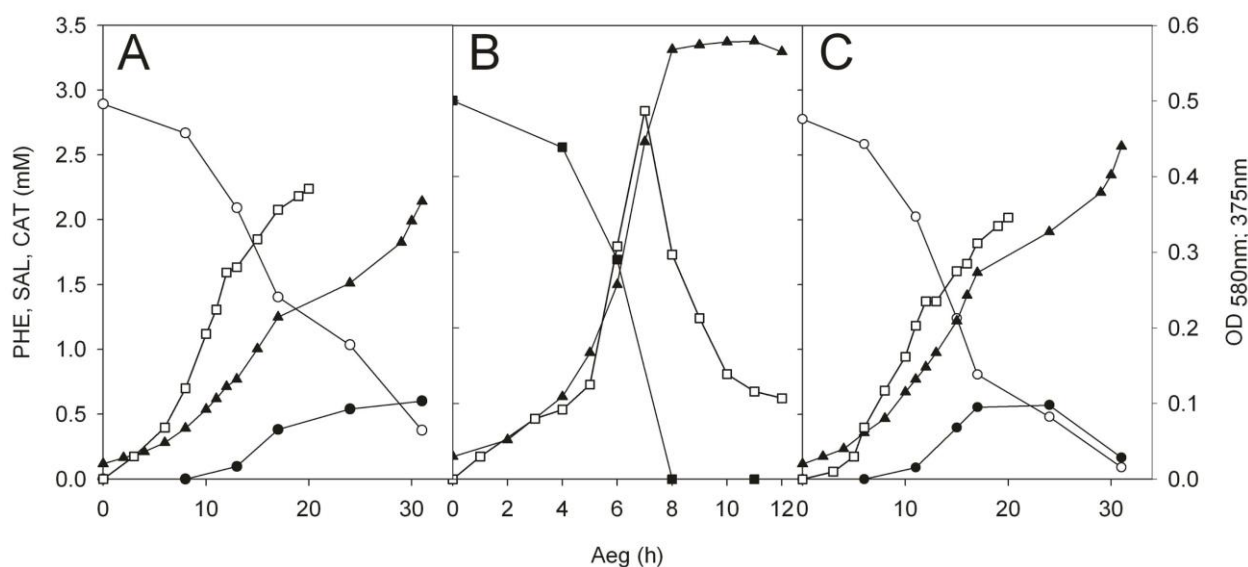
Joonis 8. *wt* tüve ja konstrueeritud Δ *pheB* mutanttüve *nahH* ja *pheB* geenide mRNA transkriptide analüüs, kasutades qRT-PCR-i. Rakke indutseeriti (PHE), salitsülaadiga (SAL) ja nende kahe seguga. Võrdluseks on toodud indutseerimata ekspresioonitasemed R2A-l. Suhtelised ekspresioonitasemed (y-telg) arutati protsentidena referentsgeeni *polA* ekspresioonitasemest tüves C70.

3.5. Salitsülaati ja/või fenooli sisaldava kasvukeskkonna HPLC analüüs

Aromaatsete ühendite lagundamisel *wt*- ja mutanttüvede kasvukeskkonda (salitsülaadil või fenoolil kasvades) kogunevate vahemetaboliitide tuvastamiseks analüüsiti rakuvaba supernatanti kasutades kõrgsurvevedelikkromatograafi (töö teostas Signe Viggor) ja spektrofotomeetrit. Joonise 9 A ja B paneelidelt on näha, et *wt* tüve bakterikultuuri optiline tihedus salitsülaadil on madalam (0,37 OD ühikut) kui fenoolil (0,58 OD ühikut), mis omakorda viitab vahemetaboliitide kogunemisele. Kogunevateks vahemetaboliitideks salitsülaadi lagundamisel on katehhool (CAT) ja 2-hüdroksümukonosemialdehüüd (Joonis 9 A). Samas fenoolil kasvatades katehhooli kogunemist ei tuvastatud ja kogunenud 2-hüdroksümukonosemialdehüüd kasutatakse bakteri poolt ära (Joonis 9 B). Salitsülaadil kasvava mutanttüve puhul on näha, et katehhooli kontsentratsioon kasvukeskkonnas väheneb 24 tunni inkubeerimise järel (Joonis 9 C), mida võib seletada katehhooli autooküdatsiooni ning polümerisatsiooniga (Park *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2014). Kasvukõveratel (Joonis 9 A, C) nähtav optilise tiheduse (580 nm) tõus

pärast 15 tundi inkubatsiooni salitsülaadil ei ole ilmselt põhjustatud biomassi suurenemisest, vaid katehhooli kogunemisest ja tumedate pigmentide tekkest, mis segavad neeldumise täpset määramist.

Park ja tema kaastöölised (2004) pakkusid välja, et katehhooli kuhjumine bakteritüves *P. putida* NCIB 9816-4 võib olla põhjustatud *nahH* geeni madalast ekspresioonitasemest. Käesolevas töös saadi qRT-PCR-il samasugune tulemus, *nahH* ekspresioonitase oli *wt* tüves madalam kui *pheB* tase (Joonis 8) ning salitsülaadi lagundamisega kaasnes ka katehhooli kuhjumine (Joonis 9 A). Muñoz ja tema kaastöölised (2007) näitasid, et katehhooli kogunemine keskkonda vähendab oluliselt benseeni lagundamise efektiivsust ning bakterite elumust. Lisaks suitsiidinhibitsioonile võivad katehhoolid põhjustada toksilisust erinevate molekulaarmehhanismide kaudu, reaktiivsete hapnikuühendite tootmisest kuni otseste valgukahjustuseni (Schweigert *et al.*, 2001).

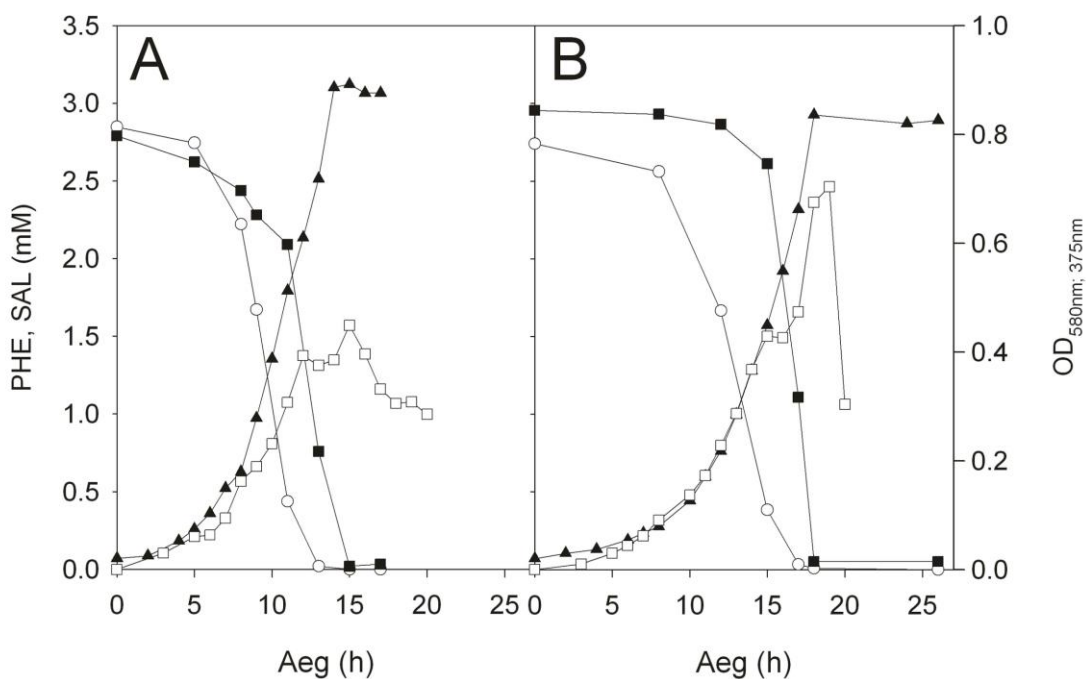


Joonis 9. *wt*- (A, B) ja mutanttüvede ($\Delta pheB$) (C) kasv (▲) fenoolil (■) ja salitsülaadil (○) ning vaheühendite, katehhooli (●) ja 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi (□), kogunemine kultiveerimisel üksiksubstraatidel (algkontsentratsioon 3 mM). Joonisel on toodud 3 katse esinduskasvukõver.

Mõlema tüve kasvukiirused substraatide segul olid samal tasemel (Joonis 7). Järgmisena uuriti *wt*- ja mutanttüvede substraatide kasutamist ja vaheühendite kogunemist samuti fenooli ja salitsülaadi segul. Segu valiti lisaks kuna, mõlema substraadi puhul on nii *phe* kui ka *sal* operoni

C23O ekspressioon indutseeritud. Samuti sisaldavad reostatud ökosüsteemid tavaliselt orgaaniliste ühendite heterogeenseid segusid. Joonisel 10 on näha, et substraatide segul kasvatades on biomassi saagis mõlemal tüvel sarnane (*wt* 0,88 OD ühikut ja mutanttüvi 0,83 OD ühikut), millest saab järeldada, et ka mutanttüvi suudab fenooli lagundada (üksiksubstraadina ei suutnud). Kuigi mutanttüves on fenooli degradatsioonirajas paiknev C23O kodeeriv geen (*pheB*) välja löödud, on tänu salitsülaadi olemasolule segus aktiivne *sal* operonis paiknev C23O kodeeriv geen (*nahH*). Seega toimub fenoolist tekkinud katehhooli lagundamine *sal* operoni meta-rajaga C23O (NahH) poolt ning 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi edasine lagundamine võib toimuda juba mööda mõlemat *meta*-rada.

Kasvukeskkonna HPLC analüüs näitas mõlema tüve puhul, et salitsülaadi lagundamist alustati enne fenooli ning katehhooli kuhjumist ei tuvastatud ja kogunenud 2-hüdroksümukonosemialdehüüd kasutati uuesti ära (Joonis 10). Mõnedes aromaatsete ühendite lagundamissüsteemides suudetakse katehhooli toksilisust vältida, suurendades katehhooli tarbimise, mitte tootmise reaktsioone tänu C23O kodeerivate geenide duplitseerumisele (George ja Hay, 2011). *Cupriavidus pinatubonensis* tüves JMP134 (pJP4) (endine *Ralstonia eutropha* JMP134) oli vaja mitmeid *tfdC* (klorokatehhooli 1,2-diokügenaas) geeni koopiaid, et kogunenud 3-klorokatehhool ära kasutada ja et tüvi saaks kasvada 3-klorobensoehappel. Samal viisil on võimalik vältida katehhooli vahemetaboliitide kogunemist ja toksilisust (Laemmli *et al.*, 2000; Pérez-Pantoja *et al.*, 2003; Trefault *et al.*, 2004). Uuritav tüvi C70 ja mutanttüvi suudavad arvatavasti samuti tänu kahele *meta*-rajale katehhooli kogunemist substraatide segul vältida. Kuigi mutanttüvel PheB ei kodeerita, on siiski ülejäänud *meta*-rada aktiivne.



Joonis 10. *wt-* (A) ja mutanttüvede ($\Delta pheB$) (B) kasv (▲) fenooli (■) ja salitsülaadi (○) segul ning 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi (□) kogunemine kultiveerimisel segasubstraatidel (algkontsentratsioon 3 mM).

Käesolevas töös tüve C70 uurimisel saadud tulemuste põhjal võib oletada, et kahe *meta*-raja omamine annab tüvele eelise just substraatide segul kasvatamisel, kui kaks *meta*-rada töötavad koos ning bakter tuleb toime suhteliselt kõrgete aromaatsete ainete kontsentratsioonide lagundamisega.

KOKKUVÕTE

Pseudomonas pseudoalcaligenes tüvi C70 on isoleeritud Läänemerest Narva lahest ning ta omab kromosomaalselt paiknevaid redundantseid katehhooli *meta*-raja ensüüme kodeerivaid gene.

Käesoleva töö eesmärkide saavutamiseks viidi eksperimentaalses osas kõigepealt läbi *wt* tüve fenooli raja ja naftaleeni alumise raja operonide analüüs ning konstrueeriti fülogeneesipuu. Järgmiste eesmärkide - ekspressiooni tasemete, kasvuparameetrite ning substraatide ja vaheühendite kontsentratsioonide määramise - täitmiseks oli vaja konstrueerida C23O geenide (*pheB* ja *nahH*) katkestusmutandid. Konstrueeriti $\Delta pheB$ mutanttüvi, kuigi *nahH* geeni katkestusmutandi konstrueerimine ei õnnestunud, üritame leida meetodikat selle teostamiseks. Kasvuparameetrite ja kontsentratsioonide määramiseks kasvatati *wt*- ja mutanttüvede ($\Delta pheB$) fenoolil, salitsülaadil ja nende segul, ekspressiooni iseloomustamiseks indutseeriti tüvesid samade substraatidega.

Töö tulemused ja järeldused saab kokku võtta järgnevalt:

1. *wt* tüve kasvukiirus on fenoolil suurem kui salitsülaadil; *wt*- ja mutanttüvede kasvukiirused on sarnased nii salitsülaadil kui ka kahe substraadi segul; mutanttüvi fenoolil (üksiksubstraadina) kasvada ei suuda;
2. *wt* tüves on fenooliga indutseerides ekspresseeritud *pheB* ja salitsülaadiga indutseerides *nahH*; *wt* tüves on *nahH* geeni ekspressioonitase madalam kui *pheB*;
3. *nahH* geeni ekspressioonitase substraatide seguga indutseerides on kaks korda kõrgem kui ainult salitsülaadiga ja seda nii *wt*- kui mutanttüvedes;
4. salitsülaadi ja fenooli lagundamisel koguneb kasvukeskkonda 2-hüdroksümukonosemi-aldehüüd, mida salitsülaadil kasvatamisel ära ei kasutata; salitsülaadil kasvatamisel kasvukeskkond pruunistub katehhooli kogunemise tõttu;
5. vahemetaboliitide kogunemine inhibeerib C23O;
6. substraatide segul kasvades ei määratud kummagi tüve puhul katehhooli kogunemist kasvukeskkonda ning tekkinud 2-hüdroksümukonosemi-aldehüüdi kasutatakse ära.

Kokkuvõttes võib teha järelduse, et redundantsete geenide ja kahe *meta*-raja omamine aitab uuritud tüvel C70 looduskeskkonnas paremini hakkama saada ning vältida vahemetaboliitide toksilisust, kuna looduses eksisteerivad orgaanilised ühendid samuti segudena.

Redundant catechol 2,3-dioxygenases of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain C70

Resume

Maris Mehike

There is a lot of pollutants in the environment due to industrial activity and unfortunately those pollutants are hazardous, toxic and very resistant. To cope with pollutants, bioremediation based on biodegradation is used. For developing better bioremediation technologies bacteria who can survive in extreme conditions are studied. The best known degraders of aromatic pollutants belong to the genus *Pseudomonas*. In this study, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain C70 was analyzed. Strain C70 harbours redundant chromosomally located genes for coding catechol *meta* pathway enzymes

To achieve the aims of this study, firstly the analysis of the operons of the phenol and the naphthalene lower pathways of the *wt* strain and the construction of the phylogenetic tree were carried out in the experimental part. Construction of C23O genes (*pheB* ja *nahH*) knock-out mutants was needed to accomplish the following aims: evaluation of expression level, growth kinetics and concentrations of substrates and intermediates. Unfortunately, the construction of *nahH* gene disruption mutant failed. To evaluate growth kinetics and concentrations, *wt*- and mutant strains (Δ *pheB*) were grown on phenol, salicylate and mixture of substrates, to describe expression level both strains were induced with the same substrates.

The results and conclusions of this study can be summarized as follows:

1. The growth rate of *wt* strain was bigger on phenol than on salicylate; the growth rates of the *wt*- and mutant strains were similar on salicylate and on the mixture of substrates; the mutant strain could not grow on phenol as a single substrate;
2. when induced by phenol and salicylate the *pheB* and *nahH* genes were expressed, respectively in the *wt* strain; the expression level of *nahH* gene was lower than of *pheB* gene in the *wt* strain;
3. the expression level of *nahH* gene was two times higher when induced by the mixture of substrates than by salicylate only in *wt*- and mutant strains;

4. during the degradation of salicylate and phenol 2-hydroxymuconic semialdehyde accumulates in the growth medium and it is not used by the strain while grown on salicylate; during the growth on salicylate the medium darkens due to the accumulation of catechol;
5. the accumulation of intermediates inhibits C23O;
6. while grown on the mixture of substrates, catechol did not accumulate in both strains and accumulated 2-hydroxymuconic semialdehyde was used by both strains.

As a conclusion of this study it can be said that owning redundant genes and two *meta* pathways helps the strain C70 cope with the natural environment better and avoid the toxicity of intermediates since in nature organic compounds also exist as mixtures.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, M. H.** 1959. Bacteriophages, p. 445-447. In Interscience Publishers Inc. New York.
- Al-Khalid, T. and El-Naas, M. H.** (2012). Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 42: 1631–1690.
- Aoki, K., Konohana, T., Shinke, R. and Nishira, H.** (1984). Two catechol 1,2-dioxygenases from aniline-assimilating bacterium, *Frateuria* species ANA-18. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2097-2104.
- Bartilson, M. and Shingler, V.** (1989). Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol catabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene* 85: 233–238.
- Bauchop, T. and Elsdén, S. R.** (1960). The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* 23: 457-469.
- Bosch, R., Moore, E. R. B., Carcia-Valdès, E. and Pieper, D. H.** (1999). NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* 181: 2315-2322.
- Bosch, R., Carcia-Valdès, E. and Moore, E. R. B.** (2000). Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* 245: 65-74.
- Boyer, H. W. and Roulland-Dussoix, D.** (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Broderick J. B.** (1999). Catechol dioxygenases. *Essays in Biochem.* 34: 173-189.
- Candidus, S., van Pèe, K.-H. and Lingens, F.** (1994). The catechol 2,3-dioxygenase gene of *Rhodococcus rhodochrous* CTM: nucleotide sequence, comparison with isofunctional dioxygenases and evidence for an active – site histidine. *Microbiol.* 140: 321-330.
- Cao, B., Nagarajan, K. and Loh, K.-C.** (2009). Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 207-228.
- Chatfield, L. K. and Williams, P. A.** (1986). Naturally occurring TOL plasmids in *Pseudomonas* strains carry either two homologous or two nonhomologous catechol 2,3-oxygenase genes. *J. Bacteriol.* 168: 878-885.
- Dalgaard, P. and Koutsoumanis, K.** (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical model. *J. Microbiol. Meth.* 43: 183-196.

- Davies, J. I. and Evans, W. C.** (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *J. Biochem.* 91: 251-261.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E. M. and Verstraete, W.** (2001). Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ. Microbiol.* 3: 649-657.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N.** (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.
- Duffner, F. M. and Müller, R.** (1998). A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 161: 37-45.
- Dunn, N. W. and Gunsalus, I. C.** (1973). Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 114: 974-979.
- Ehrt, S., Schirmer, F. and Hillen, W.** (1995). Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Mol. Microbiol.* 18: 13-20.
- Eltis, L. D. and Bolin, J. T.** (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* 178: 5930-5937.
- Enroth, C., Huang, W., Waters, S., Neujahr, Y. L. and Schneider, G.** (1994). Crystallization and preliminary X-ray analysis of phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*. *J. Mol. Biol.* 238: 128-130.
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R.** (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *PNAS* 76: 1648-1652.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L. and Williams, P. A.** (1998). A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J. Bacteriol.* 180: 2522-2530.
- Gallegos, M.-T., Williams, P. A. and Ramos, J. L.** (1997). Transcriptional control of the multiple catabolic pathways encoded on the TOL plasmid pWW53 of *Pseudomonas putida* MT53. *J. Bacteriol.* 179: 5024-5029.
- García-Valdés, E., Cozar, E., Rotger, R., Lalucat, J. and Ursing, J.** (1988). New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2478-2485.

- George, K.W., Kagle, J., Junker, L., Risen, A. and Hay, A.G.** (2011). Growth of *Pseudomonas putida* F1 on styrene requires increased catechol-2,3-dioxygenase activity, not a new hydrolase. *Microbiol.* 157: 89-98.
- George, K. W. and Hay, A. G.** 2011. Bacterial strategies for growth on aromatic compounds, p.1-33. In A. I. Laskin, S. Sariaslani and G. M. Gadd (ed.), *Advances in Applied Microbiology*, vol.74. Elsevier Inc.
- Goyal, A. K. and Zylstra, G. J.** (1997). Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 401-407.
- Griva, E., Pessione, E., Divari, S., Valetti, F., Cavaletto, M., Rossi, G. L. and Giunta, C.** (2003). Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. Isolation and characterization of the regulatory component. *Eur. J. Biochem.* 270: 1434-1440.
- Habe, H. and Omori T.** (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 225-243.
- Harayama, S. and Rekik, M.** (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* 264: 15328-15333.
- Heinaru, E., Vedler, E., Jutkina, J., Aava, M. and Heinaru, A.** (2009). Conjugal transfer and mobilization capacity of the completely sequenced naphthalene plasmid pNAH20 from multiplasmid strain *Pseudomonas fluorescens* PC20. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70: 563-74.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. and Timmis, K. N.** (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6557-6567.
- Hino, S., Watanabe, K. and Takahashi, N.** (1998). Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. *Microbiol.* 144: 1765-1772.
- Hõrak, R., Ilves, H., Pruunsild, P., Kuljus, M. and Kivisaar, M.** (2004). The ColR–ColS two-component signal transduction system is involved in regulation of Tn4652 transposition in *Pseudomonas putida* under starvation conditions. *Mol. Microbiol.* 54: 795–807.
- Jiménez, J. I., Pérez-Pantoja, D., Chavarria, M., Diaz, E. and de Lorenzo, V.** (2014). A second chromosomal copy of the *catA* gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol. *Environ. Microbiol.* 16: 1767-1778.
- Juang, R.-S. and Tsai, S.-Y.** (2006). Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate. *Biochem. Eng. J.* 31: 133-140.

- Junca, H., Plumeier, I., Hecht H.-J. and Pieper, D. H.** (2004). Difference in kinetic behaviour of catechol 2,3-dioxygenase variants from a polluted environment. *Microbiol.* 150: 4181-4187.
- Jutkina, J., Heinaru, E., Vedler, E., Juhanson, J. and Heinaru, A.** (2011). Occurrence of plasmids in the aromatic degrading bacterioplankton of the Baltic Sea. *Genes* 2: 853-868.
- Jõesaar, M.** (2009) Diversity of key catabolic genes at degradation of phenol and p-cresol in pseudomonads. TÜ väitekirjad alates 2004 – Theses, PhD, MSc, ETD.
- Jõesaar, M., Viggor, S., Heinaru, E., Vedler, E., Mehike, M., Leito, I. and Heinaru, A.** (2016). Redundant catechol 2,3-dioxygenases of hybrid indigenous *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain C70 ensure effective degradation of mixture of phenol and salicylate. (käsikiri)
- Kasuga, I., Nakajima, F. and Furumai, H.** (2007). Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61: 449-458.
- Keil, H., Lebens, M. R. and Williams, P. A.** (1985). TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. *J. Bacteriol.* 163: 248-255.
- Kim, S. I., Leem, S.-H., Choi, J.-S., Chung, Y. H., Kim, S., Park, Y.-M., Park, Y. K., Lee, Y. N. and Ha, K.-S.** (1997). Cloning and characterization of two *catA* genes *Acinetobacter lwoffii* K24. *J. Bacteriol.* 179: 5226-5231.
- Kitayama, A., Achioku, T., Yanagawa, T., Kanou, K., Kikuchi, M., Ueda, H., Suzuki, E., Nishimura, H., Nagamune, T. and Kawakami, Y.** (1996). Cloning and characterization of extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas aeruginosa* JI104. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 217-223.
- Koch, B., Jensen, L.E. and Nybroe, O.** (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J. Microbiol. Methods* 45: 187–195.
- Kukor, J. J. and Olsen, R. H.** (1992). Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol/cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and functional analysis of the encoded enzyme. *J. Bacteriol.* 174: 6518-6526.
- Laemmli, C. M., Leveau, J. H. J., Zehnder, A. J. B. and van der Meer, J. R.** (2000). Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 182: 4165-4172.

- Lal, R., Lal, S., Dhanaraj, P- S. Saxena, D. M.** (1995). Manipulations of catabolic genes for the degradation and detoxification of xenobiotics. *Adv. Appl. Microbiol.* 41: 55-95.
- Lanfranconi, M. P., Christie-Oleza, J. A., Martin-Cordona, C., Suárez-Suárez, L. Y., Lalucat, J., Nogales, B. and Bosch, R.** (2009). Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *FEMS Microbiol. Lett.* 300: 265-272.
- Lee, D. S., Lee, M. W., Woo, S. H., and Park, J. M.** (2005). Effects of salicylate and glucose on biodegradation of phenanthrene by *Burkholderia cepacia* PM07. *J. Microbiol. Biotechn.* 15: 859-865.
- Li, Q. X., Seo, J.-S., Keum, Y.-S.** (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6: 278-309.
- Mahiuddin, Md., Fakhruddin, A. N. M Mahin, A. A.** (2012). Degradation of phenol via *meta* cleavage pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. *ISRN Microbiol.* 2012: 1-6.
- Martínez-García, E. and de Lorenzo, V.** (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 13: 2702–2716.
- Merimaa, M., Heinaru, E., Liivak, M., Vedler, E. and Heinaru A.** (2006). Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Arch. Microbiol.* 186: 287-96.
- Mishra V., Lal, R. and Srinivasan.** (2001). Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 133-166.
- Muñoz, R., Díaz, L. F., Bordel, S. and Villaverde, S.** (2007). Inhibitory effects of catechol accumulation on benzene biodegradation in *Pseudomonas putida* F1 cultures. *Chemosphere* 68: 244-252.
- Murakami, S., Okuno, T., Matsumura, E., Takenaka, S., Shinke, R. and Aoki, K.** (1999). Cloning of a gene encoding hydroxyquinol 1,2-dioxygenase that catalyzes both intradiol and extradiol ring cleavage of catechol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 859-865.
- Nair, C. I., Jayachandran, K. and Shashidhar, S.** (2008). Biodegradation of phenol. *African J. Biotechn.* 7: 4951–4958.
- Neujahr, H. Y. and Gaal, A.** (1973). Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* 35: 386-400.

- Nishino, S. F. and Spain, J. C.** (1995). Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2308-2313.
- Nordlund, I., Powlowski, J. and Shingler, V.** (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 172: 6826-6833.
- Nowak M. A., Boerlijst M. C., Cooke J. and Smith J. M.** (1997). Evolution of genetic redundancy. *Nature* 388: 167-171.
- Nurk A., Kasak, L. and Kivisaar, M.** (1991). Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001 expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* 98: 15-20.
- O'Donnell, K. J. and Williams, P. A.** (1991). Duplication of both *xyl* catabolic operons on TOL plasmid pWW15. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2831-2838.
- Park, W., Jeon, C. O. and Madsen, E. L.** (2004). Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soil: toxicity of naphthalene and its metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 429-435.
- Pavel, H., Forsman, M. and Shingler, V.** (1994). An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on para-substituted methylphenols. *J. Bacteriol.* 176: 7550-7557.
- Peng, R. H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S. and Yao, Q.-H.** (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 927-955.
- Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Pieper, D. H. and Gonzalez, B.** (2003). Efficient turnover of chlorocatechols is essential for growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) in 3-chlorobenzoic acid. *J. Bacteriol.* 185: 1534-1542.
- Pérez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D. H. and González, B.** (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 736-794.
- Pessione, E., Divari, S., Griva, E., Cavaletto, M., Rossi, G. L., Gilardi, G. and Gilunta, C.** (1999). Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* is a multicomponent enzyme. Purification and characterization of the reductase moiety. *Eur. J. Biochem.* 265: 549-555.

- Pessione, E., Giuffrida, M. G., Mazzoli, R., Caposio, P., Landolfo, S., Conti, A., Giunta, C. and Gribaudo, G.** (2001). The catechol 1,2-dioxygenase system of *Acinetobacter radioresistens*: isoenzymes, inducers and gene localisation. *Biol. Chem.* 382: 1253-1261.
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A. and Nurk, A.** (1997). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4899–4906.
- Pomposiello, P. J., Bennik, M. H. J., and Demple, B.** (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J. Bacteriol.* 183: 3890-3902.
- Powlowski, J. and Shingler, V.** (1990). In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 172: 6834-6840.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. and Moorman, A. F.** (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucl. Acids Res.* 37: 45.
- Saumaa, S., Tarassova, K., Tark, M., Tover, A., Tegova, R. and Kivisaar, M.** (2006). Involvement of DNA mismatch repair in stationary phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. *DNA Repair* 5: 505–514.
- Schell, M. A. and Poser, E. F.** (1989). Demonstration, characterization, and mutational analysis of NahR protein binding to *nah* and *sal* promoters. *J. Bacteriol.* 171: 837-846.
- Schweigert, N., Zehnder, A. J. B. and Eggen, R. I. L.** (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* 3: 81-91.
- Seo, J. S., Keum, Y. S. and Li, Q. X.** (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6: 278-309.
- Shingler, V., Bagdasarian, M., Holroyd, D. and Franklin, F. C. H.** (1989). Molecular analysis of the plasmid encoded phenol hydroxylase of *Pseudomonas* CF600. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1083-1092.
- Shingler, V., Powlowski, J. and Marklund, U.** (1992). Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 174: 711-724.

- Sidorenko, J., Jatsenko, T., Saumaa, S., Teras, R., Tark-Dame, M., Hõrak, R. and Kivisaar, M.** (2011). Involvement of specialized DNA polymerases Pol II, Pol IV and DnaE2 in DNA replication in the absence of Pol I in *Pseudomonas putida*. *Mutat. Res.* 714: 63-77.
- Suenaga, H., Mizuta, S. and Miyazaki, K.** (2009). The molecular basis for adaptive evolution in novel extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69: 472-480.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S.** (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Teramoto, M., Futamata, H., Harayama, S. and Watanabe, K.** (1999). Characterization of a high-affinity phenol hydroxylase from *Comamonas testosteroni* R5 by gene cloning, and expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. *Mol. Gen. Genet.* 262: 552-558.
- Trefault, N., De la Iglesia, R., Molina, A. M., Manzano, M., Ledger, T., Pérez-Pantoja, D., Sánchez, M. A., Stuardo, M. and González, B.** (2004). Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ. Microbiol.* 6: 655-668.
- van der Meer, J. R., de Vos, W. M., Harayama, S. and Zehnder, A. J.** (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56: 677-694.
- Vedler, E., Heinaru, E., Jutkina, J., Viggor, S., Koressaar, T., Remm, M. and Heinaru, A.** (2013). *Limnobacter* spp. as newly detected phenol-degraders among Baltic Sea surface water bacteria characterised by comparative analysis of catabolic genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 525-532.
- Widada, J., Nojiri, H. and Omori, T.** (2002). Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 45-59.
- Williams, P. A. and Sayers, J. R.** (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegr.* 5: 195-217.
- Yen, K. M. and Gunsalus, I. C.** (1982). Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *PNAS* 79: 874-878.
- Yen, K. M. and Gunsalus, I. C.** (1985). Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* 162: 1008-1013.

You, I. S., Ghosal, D. and Gunsalus, I. C. (1988). Nucleotide sequence of plasmid NAH7 gene *nahR* and DNA binding of the *nahR* product. *J. Bacteriol.* 170: 5409-5415.

LISAMATERJALID

Lisa 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tüvi või plasmiid	Genotüüp või konstruktsioon	Allikas või viide
<i>P. pseudoalcaligenes</i>		
C70	Metsiktüvi	Vedler <i>et al.</i> , 2013
$\Delta pheB$	Mutanttüvi, millel puudub katehooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriv geen <i>pheB</i>	Käesolev töö
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 $\Delta lacU169$ ($\phi 80 lacZ \Delta M15$) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
CC118 λ pir	$\Delta(ara-leu)$ <i>araD $\Delta lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 \lambda pir$</i> faagi lüsogeen	Herrero <i>et al.</i> , 1990
Plasmiidid		
pTZ57R/T	Kloonimisvektor (Amp ^r)	MBI Fermentas
pUTmini-Tn5 Km2	mini-Tn5 Km2 üle kandev plasmiid (Amp ^r Km ^r)	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
PBK-miniTn7- Ω Gm	pUC191 põhinev miniTn7- Ω Gm üle kandev plasmiid (Amp ^r Gm ^r)	Koch <i>et al.</i> , 2001
pGP704 L	Homoloogilise rekombinatsiooni jaoks vajalik üle kandev plasmiid (Amp ^r)	Pavel <i>et al.</i> , 1994
pRK2013	Helperplasmiid pGP704 Li konjugatsiooniks (Km ^r)	Figurski ja Helinski, 1979

C70nahH/pTZ57R	pTZ57R/T, mis sisaldab PCRga amplifitseeritud <i>nahH</i> geeni tüve C70 <i>nah</i> operonist	Käesolev töö
C70pheB/pTZ57R	pTZ57R/T, mis sisaldab PCRga amplifitseeritud <i>pheB</i> geeni tüve C70 <i>phe</i> operonist	Käesolev töö
pTZ57RΔC70nahH::gm	Tüve C70 <i>nahH</i> geen vektoris pTZ57R/T lõigatuna <i>AatII</i> ja <i>NotI</i> , on katkestatud Gm ^r geeniga, mis on amplifitseeritud pACΩGmst	Käesolev töö
pTZ57RΔC70pheB::km	Tüve C70 <i>pheB</i> geen vektoris pTZ57R/T lõigatuna <i>Eco130I</i> , on katkestatud Km ^r geeniga pUTmini-Tn5 Km2 vektorist	Käesolev töö
pGP704ΔC70nahH::gm	ΔC70nahH::gm vektorist pTZ57RΔC70nahH::gm kloneritud plasmidi pGP704L restriктаasidega <i>KpnI-PaeI</i>	Käesolev töö
pGP704ΔC70pheB::km	ΔC70pheB::km vektorist pTZ57RΔC70pheB::km kloneritud plasmidi pGP704 L restriктаasidega <i>KpnI-PaeI</i> .	Käesolev töö

Km^r – kanamütsiini resistentsusgeen; Amp^r – ampitsilliini resistentsusgeen; Gm^r – gentamütsiini resistentsusgeen

Lisa 2. Operonide analüüs

ORF	Positsioon/ ahel	Funktsioon, valgu nimi (uuritava tüve)	Lähim vaste/Identsus% (referentstüvi)
<i>nah</i> alumine operon (<i>sal</i> operon)			
ORF1	2-244/+	Transposaasi sarnane valk, TnpA3	TnpA3/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF2	565- 1734/-	Salitsülaadi 1-hüdroksülaas, NahW	NahW/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF3	1981- 2961/-	Transposaas, TnpA2	TnpA2/98 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF4	3635- 4537/-	LysR perekonna transk- riptsiooni aktivaator, NahR	NahR/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF5	4693- 6006/+	Salitsülaadi 1-hüdroksülaas, NahG	NahG/99,7 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF6	6449- 6787/+	Kloroplast-tüüpi ferredoksiin, NahT	NahT/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF7	6784- 7707/+	Katehhooli 2,3- dioksügenaas, NahH	NahH/99,7 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF8	7742- 9202/+	2-hüdroksümukonosemi- aldehüüdi dehüdrogenaas, NahI	NahI/99 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF9	9214- 10077/+	2-hüdroksümukonosemi- aldehüüdi hüdrolaas, NahN	NahN/97 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF10	10074- 10859/+	2-oksopent-4-enoaadi hüdrataas, NahL	NahL/97 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF11	10874- 11797/+	Atseetaldehüüdi dehüdrogenaas, NahO	NahO/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF12	11809- 12849/+	4-hüdroksü-2-oksovaleraadi aldolaas, NahM	NahM/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF13	12846- 13640/+	4-oksalokrotonaadi dekarboksülaas, NahK	NahK/99 (<i>P. stutzeri</i> AN10)

ORF14	13689- 13880/+	4-oksalokrotonaadi tautomeraas, NahJ	NahJ/98 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF15	13911- 14351/+	Oletatav valk, NahX	NahX/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
ORF16	14476- 14808/-	Transposaas, ISBma1	ISBma1/100 (<i>P. stutzeri</i> AN10)
<i>phe</i> operon			
ORF1	23- 1714/-	σ^{54} -sõltuv NtrC perekonna transkriptsiooni aktivaator, PheR	DmpR/94 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF2	2132- 2401/+	Fenooli hüdroksülaas, PheK	DmpK/85 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF3	2367- 3449/+	Fenooli hüdroksülaas, PheL	DmpL/91 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF4	3453- 3725/+	Fenooli hüdroksülaas, PheM	DmpM/100 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF5	3737- 5290/+	Fenooli hüdroksülaas, PheN	DmpN/99 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF6	5358- 5717/+	Fenooli hüdroksülaas, PheO	DmpO/98 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF7	5728- 6789/+	Fenooli hüdroksülaas, PheP	DmpP/99,7 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF8	6798- 7136/+	Ferredoksiin, PheQ	DmpQ/94 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF9	7133- 8056/+	Katehhooli 2,3- dioksügenaas, PheB	DmpB/96 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF10	8093- 9553/+	2-hüdroksümukonosemi- aldehüüdi dehüdrogenaas, PheC	DmpC/99 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF11	9561- 10409/+	2-hüdroksümukonosemi- aldehüüdi hüdrolaas, PheD	DmpD/93 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)

ORF12	10421- 11206/+	2-oksopent-4-enoaadi hüdrataas, PheE	DmpE/95 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF13	11222- 12160/+	Atseetaldehüüdi dehüdrogenaas, PheF	DmpF/99 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF14	12172- 13206/-	4-hüdrosü-2-oksovaleraadi aldolaas, PheG	DmpG/86 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF15	13206- 14000/+	4-oksalkrotonaadi dekarboksülaas, PheH	DmpH/95 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)
ORF16	14055- 14246/+	4-oksalkrotonaadi tautomeraas, PheI	DmpI/87 (<i>Pseudomonas</i> sp. CF600)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maris Mehike

(sünnikuupäev: 04.05.1993)

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

Redundantsed katehhooli 2,3-dioksügenaasid *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüves C70

mille juhendaja on Merike Jõesaar,

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, 24.05.2016