

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Kristiina Vind

***Escherichia coli* tundmatu kasvufaktori keemiline  
iseloomustus**

Magistritöö

Juhendaja vanemteadur Arvi Jõers

TARTU 2015

## Sisukord

Kasutatud lühendid .....	3
Sissejuhatus .....	5
1. Kirjanduse ülevaade .....	6
1.1 Bakterite signaalmolekulide struktuur .....	6
1.1.1 Peptiidsed autoinduktorid .....	7
1.1.2. Madalmolekulaarsed autoinduktorid .....	9
1.2. Signaalmolekulide toimemehhanismid .....	12
1.2.1 Peptiidsete signaalmolekulide toimemehhanismid .....	12
1.2.2 Madalmolekulaarsete autoinduktorite toimemehhanismid .....	14
1.3. Signaalmolekulide roll bakterite bioloogias ja meditsiinis .....	16
1.4 Puhastamismeetodid .....	19
2. Eksperimentaalosa .....	21
2.1 Töö eesmärk .....	21
2.2 Materjal ja meetodika .....	22
2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed ja plasmiidid .....	22
2.2.2 Söötme konditsioneerimine .....	23
2.2.3 Faktor X-i sisalduse määramise meetodika .....	25
2.2.4 Faktor X-i pH-taluvuse katse .....	27
2.2.5 Faktor X-i kuumutamiskatse .....	27
2.2.6 Ekstraktsioonid orgaaniliste solventidega .....	27
2.2.7 Kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) .....	28
2.2.8 Ioonvahetuskromatograafia .....	28
2.2.9 Autoinduktor-2 test .....	29
2.2.10 Mass-spektromeetria (LC-MS) .....	29

2.3 Tulemused.....	30
2.3.1 Faktor X on väike molekul .....	30
2.3.2 Faktor X on keemiliselt stabiilne.....	31
2.3.3 Faktor X-i ei saa vesilahusest mittepolaarsete lahustitega ekstraheerida.....	33
2.3.4 Faktor X-i saab ekstraheerida lüofiliseeritud söötimest erinevate alkoholidega .....	34
2.3.5 Metoodika faktor X-i esmaseks puhastamiseks.....	35
2.3.6 Faktor X ei seonu pöördfaasi C18 kolonniga .....	37
2.3.7 Faktor X ei seonu tugeva katioon- ega anioonvahetusmaatriksiga. ....	38
2.3.8 Faktor X ei ole autoinduktor 2.....	40
2.3.9 HPLC C18 pöördfaasikolonnil 3. minutil läbi jooksnud fraktsioonide mass-spektromeetiline (MS) võrdlus.....	42
2.4 Arutelu .....	44
Kokkuvõte .....	49
Summary.....	50
Kasutatud kirjandus .....	51
Tänuõnad.....	57
Lihtlitsents .....	58

## Kasutatud lühendid

AHL	atsüülhomoseriinlaktoon
AI-2	autoinduktor 2 ( <i>autoinducer 2</i> )
AIP	autoinduktorpeptiid ( <i>autoinducing peptide</i> )
Amp	ampitsilliin
ara	arabinoos
CAI-1	<i>Vibrio cholerae</i> autoinduktor 1
Cam	klooramfennikool
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diklorometaan
CHCl <sub>3</sub>	kloroform
CSF	kompetentsust stimuleeriv faktor ( <i>competence stimulating factor</i> )
CSP	kompetentsust stimuleeriv peptiid ( <i>competence stimulating peptide</i> )
DSF	difundeeruv signalisatsioonifaktor ( <i>Diffusible Signal Factor</i> )
EF-G	elongatsioonifaktor G ( <i>elongation factor G</i> )
FX	faktor X, <i>E. coli</i> tundmatu kasvufaktor
EtOAc	etüülatsetaat
FACS	läbivoolutsütomeetria ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
Glt	glükonaat
Gly	glütserool
IPTG	isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid ( <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> )
Kan	kanamütsiin
kntrl	kontrollsööde
kond	konditsioneeritud sööde

MOPS	3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape ( <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> )
MS	mass-spektromeetria ( <i>mass spectrometry</i> )
NMR	tuumamagnetresonants ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PQS	Pseudomonaadide kvoorunitunnetusmolekul ( <i>Pseudomonas Quorum Sensing molecule</i> )
Rpf	kasvamahakkamist soodustav valk ( <i>resuscitation promoting factor</i> )
rpm	pöördeid minutis ( <i>revolutions per minute</i> )
R-THMF	R-2-metüül-2,3,3,4-tertahüdroksü-tertafuraan, AI-2 boorita vorm
S-THMF-boraat	S-2-metüül-2,3,3,4-tetraüdroksütetrafuraan-boraat, AI-2 boreeritud vorm

## Sissejuhatus

Bakterite elu võib tinglikult jagada kaheks, geeniekspressiooni mõttes täiesti erinevaks perioodiks: individuaalse käitumise ja grupiviisiliste käitumiste perioodiks (Rutherford et al. 2011). Et koordineerida ühist käitumist, kasutavad nad sekreteeritavaid signaalmolekule. On nii liigispetsiifilisi kui liikideülest suhtlust vahendavaid signaale. Signaalmolekulide abil on bakteritel võimalik näiteks ajastada virulentsusgeenide ekspressiooni, võtta vastu rakuvälist DNA-d ja väljuda soikeolekust (Ng & Bassler 2009). Seoses antibiootkumiresistentuste probleemiga on viimasel ajal päevakorra kerkinud hulgatunnetuses osalevate molekulide ja signalisatsiooniradade ära kasutamine meditsiinis, näiteks võiks olla võimalik virulentsuse teket ära hoida patogeenide vahelise suhtluse piiramise abil.

Annan oma magistritöö teoreetilises osas ülevaate bakterite signaalmolekulide struktuuridest, toimimismehhanismidest, bioloogilistest funktsioonidest ja võimalikust rollist meditsiinis.

Magistritöö eksperimentaalse osa eesmärgiks on keemiliselt iseloomustada *Escherichia coli* kasvufaktorit, mis kiirendab bakterikultuuri väljumist statsionaarsest faasist. Kirjeldasin seda faktorit oma bakalaureusetöös (Tüür 2013). Magistritöö praktilises osas uurin võimalusi selle faktori puhastamiseks, et tulevikus oleks võimalik selle faktori keemiline struktuur kindlaks teha.

## **1. Kirjanduse ülevaade**

Annan oma magistr töö referatiivses osas ülevaate bakterite signaalmolekulidest: mis need on, milline on nende keemiline struktuur, milliste mehhanismide läbi nad toimivad, milleks bakterid neid kasutavad ja kuidas nendest meditsiinis kasu võiks tõusta. Kuna keskendun magistr töö praktilises osas tundmatu signaalmolekuli puhastamisele, on oluline osa kirjanduse ülevaatest see, kuidas praeguseks teadaolevate signaalmolekulide struktuurideni jõutud on.

Signaalmolekulid on keemilised ühendid, mis vahendavad mitmesugust infot. Kitsamas tähenduses on signaalmolekul keemiline ühend, mida organism toodab selleks, et anda edasi mingit infot. Laiemas mõttes võib signaalmolekulidena vaadata ka mitmeid elutegevuse kõrvalprodukte, mis kannavad endas infot, kuid mida ei ole otseselt signaliseerimise eesmärgil toodetud. Näiteks vabanevad Gram-positiivsete bakterite elutegevuse käigus keskkonda väikesed rakukesta fragmendid, muropeptiidid, mis kannavad endas soodsa elukeskkonna sõnumit (Keep et al. 2006). Toitainetest eristab signaalmolekule kolm põhilist omadust: esiteks, neid toodavad organismid ise, teiseks, nad on aktiivsed väga madalates kontsentratsioonides ning kolmandaks, nende metabolism ei ole rakule hädavajalik (Mukamolova et al. 1998).

### **1.1 Bakterite signaalmolekulide struktuur**

Signaalmolekulid, mida bakterid suhtlemiseks kasutavad, on väga mitmekesise struktuuriga (Joonis 1). Kõigi nende ühiseks jooneks võib pidada suhteliselt väikest molekulmassi. On leitud, et Gram-positiivsed bakterid kasutavad enamasti peptiidseid signaale, samas kui Gram-negatiivsed sünteesivad pigem muid madalmolekulaarseid aineid (Ng & Bassler 2009). Oligopeptiidsete signaalmolekulide mass jääb enamasti alla 2000 Da ning need võivad olla nii lineaarsed kui tsüklilise struktuuriga. Mittepeptiidsete signaalmolekulid võib jaotada hüdrofoobseteks ja hüdrofiilseteks. Enamus teadaolevaid signaalmolekule on hüdrofoobsed, hüdrofiilse struktuuriga on vaid üks, kuid see-eest väga oluline signaalmolekul, autoinduktor 2.



leitud paljudest kõrge GC sisaldusega Gram-positiivsetest bakteritest (sh streptomütseedid, korünebakterid, mükobakterid) (Keep et al. 2006).

Muropeptiidid on väikesed rakukesta fragmendid, mis ristseovad peptidoglükaani ja mis koosnevad neljast aminohappest. Muropeptiidid tekivad bakterite elutegevuse käigus kui Gram-positiivsed bakterid, kes erinevalt Gram-negatiivsetest bakteritest ei suuda kasvamise ja jagunemise käigus oma rakukesta jääke efektiivselt taaskasutada, eraldavad kasvamise ja jagunemise käigus rakuvälisesse keskkonda hulgaliselt peptidoglükaanifragmente. *B. subtilis*'e spoorid on võimelised muropeptiide ära tundma spetsiifiliste retseptorite abil ning hakkavad vastusena idanema. (Shah et al. 2008)

Lisaks muropeptiididele kasutab *B. subtilis* veel kaht peptiidset autoinduktorit: ComX (Joonis 1A) reguleerib kompetentsuse saavutamist ja CSF (Joonis 1A) spooride moodustamist. Erinevalt muropeptiididest, mis on rakkude elutegevuse kõrvalsaaduseks, on need faktorid toodetud spetsiaalselt geeniekspressiooni reguleerimiseks. ComX on kümnest aminohappest koosnev modifitseeritud oligopeptiid ning CSF on pentapeptiid. *Streptococcus pneumoniae* kasutab kompetentsuse saavutamiseks CSP-d (*competence stimulating peptide*), mis on 17 aminohappe pikkune. Nii ComX, CSF kui CSP saadakse pikema prekursorpeptiidi lõikamise tulemusena. (Miller & Bassler 2001)

*S. aureus* ja teised stafülokokid kasutavad virulentsusgeenide ekspressiooni reguleerimiseks väikesi tsüklilisi peptiide, AIP-e (Joonis 1A). Need on oktapeptiidid, mille aminohappeline järjestus võib varieeruda, kuid mis alati sisaldavad tiolaktoonrõngast. AIP-id on *S. aureus*'e tüvespetsiifilised ning jaotatakse selle alusel nelja gruppi. Iga AIP indutseerib virulentsusgeenide ekspressiooni nendes tüvedes, kes seda sünteesivad, ning inhibeerivad samas ülejäänud kolme gruppi kuuluvate tüvede virulentsust. (Miller & Bassler 2001)

*M. xanthus* moodustab nälja korral viljakehasid, mille teket reguleerib A-signaaliga, mis koosneb aminohapete segust ja proteolüütilise aktiivsusega valkudest (Plamann et al. 1992; Kuspa et al. 1992) *P. aeruginosa* ja mitmed teised Gram-negatiivsed bakterid kasutavad suhtlemiseks tsüklilisi dipeptiide, mis on näidatud Joonis 1A. (Holden et al. 1999)

### 1.1.2. Madalmolekulaarsed autoinduktorid

See grupp signaalmolekule on struktuurilt väga mitmekesine. Struktuuri alusel võib neid jagada tsükleid sisaldavateks ja lineaarseteks molekulideks. Tsüklilise struktuuriga ühendid jagunevad laktoonrõngast sisaldavateks ja muid tsükleid sisaldavateks signaalmolekulideks. Laktoonrõngast sisaldavad N-atsüülhomoseriinlaktoonid (AHL), autoinduktor 2 (AI-2) ja  $\gamma$ -butürolaktoonid, muude tsüklilise ahelaga signaalide näiteks on *Pseudomonas aeruginosa* kvoorumitunnetuse molekul (PQS), bradüoksetiin ja püroonid. Lineaarse ahelaga on näiteks *Vibrio cholerae* autoinduktor 1 (CAI-1), 3-hüdropalmitiinhappe metüülester, Diffusible Signal Factor (DSF).

#### 1.1.2.1 Laktoonrõngast sisaldavad signaalmolekulid

Laktoonrõngast sisaldavate signaalide hulka kuulub kolm põhiklassi: AHL, AI-2 ja  $\gamma$ -butürolaktoonid (Joonis 1B).

N-atsüülhomoseriinlaktoonid on kahtlemata kõige tuntum näide kvoorumitunnetuses osalevatel signaalmolekulidest. Need avastati kalmaar *Euprymna scolopes*'e valgusorganeid koloniseeriva bioluminesseeruva bakteriga *Vibrio fischeri* kultuuri supernatandist. AHL-id olid üheks esimeseks bakterite signaalmolekulide klassiks, mille struktuur ja reguleerivad rajad kindlaks tehti (Eberhard et al. 1981). Kõik atsüülhomoseriinlaktoonid koosnevad nõrgalt hüdrofiilsest homoseriinlaktoonrõngast ja hüdrofoobsest atsüülahelast, mille pikkus, küllastatus ja asendusrühmad on erinevate bakteriliikide puhul erinevad. AHL amfipaatsus võimaldab neil molekulidel passiivselt rakust välja ja tagasi raku sisse difundeeruda, välja arvatud väga pika ja hüdrofoobse atsüülahelaga AHL puhul, mille korral kasutavad bakterid *efflux*-pumpade abi (Pearson et al. 1999). Atsüülahela erinevustest tingituna toimivad AHL-id liigispetsiifiliste signaalmolekulidena (Fuqua et al. 2001).

Bassler et al. näitasid, et *V. harveyi*'l on lisaks eeltoodud AHL-reguleeritud kvoorumitunnetuse süsteemile ka teine signaalsüsteem, mistõttu sai signaalmolekuli nimeks autoinduktor 2 (AI-2) (Bassler et al. 1994). Erinevalt AHL-signaalidest, mis on väga liigispetsiifilised, on AI-2 laialt levinud, seda suudavad toota ja ära tunda paljudesse eri taksonitesse kuuluvad bakterid. AI-2 võib esineda kahes vormis: S-2-metüül-2,3,3,4-tetrahydroksütetrafüraan-boraat (S-THMF-boraat) (Chen et al. 2002) või R-2-metüül-2,3,3,4-tertahydroksü-tertafüraan (R-THMF), mille struktuurid on ära toodud Joonis 1 (Miller et al. 2004). Nii S-THMF-boraat kui R-THMF tekivad

spontaanselt samast prekursor-molekulist. Boori juuresolekul tekib S-THMF-boraat, kui boori pole, tekib R-THMF. Arvatakse, et see võimaldab bakteritel aru saada, millises keskkonnas nad parasjagu viibivad: boori kontsentratsioonid on vesikeskkonnas palju kõrgemad kui maismaa elukeskkondades (Carrano et al. 2009; Pereira et al. 2013; Miller et al. 2004). AI-2 eristab kõikidest teistest madalmolekulaarsetest signaalmolekulidest see, et tegu on hüdrofiilse molekuliga.

Veel üks perekond signaalmolekule, mis sarnaselt AHL ja AI-2 tüüpi molekulidele laktoonrõngast sisaldab, on  $\gamma$ -butürolaktoonid. Need avastati juba 1967. aastal kui Khokhlov ja kolleegid näitasid, et *Streptomyces griseus*'e streptomütsiini tootmiseks ja sporulatsiooniks vajalik A-faktor on struktuurilt  $\gamma$ -butürolaktoon (Kholokhov et al. 1967). Hiljem identifitseeriti  $\gamma$ -butürolaktoonide mitmeid struktuurseid variante (Anisova et al. 1984; Efremenkova et al. 1985).

#### 1.1.2.2 Muud tsüklilise ahelaga signaalmolekulid

Tsüklilise, aga mitte homoseriinlaktoonrõngast sisaldavate signaalmolekulide hulka kuuluvad PQS, bradüroksetiin, püroonid, dialküülresortsinool ja indool (Joonis 1C).

1999. aastal avastati, et *P. aeruginosa* toodab lisaks AHL-tüüpi signaalmolekulile veel üht signaalmolekuli, mis on struktuurilt 2-heptüül-3-hüdroksüül-4-kinoloon (Pesci et al. 1999). Vastavalt seda sekreteerivale organismile sai molekul nimeks PQS – *Pseudomonas Quorum Sensing molecule*. Hiljem leiti ka teisi sarnaseid molekule, mis erinesid esimesena avastatud kinoloonist alküülahelate pikkuse ja hüdroksüülrühma paigutuse osas. (Ilangovan et al. 2013)

Bradüroksetiin on signaalmolekul, mida toodab sojaoa sümbiont, juuremügaraid tekitav bakter *Bradyrhizobium japonicum* (Joonis 1C). Selleks, et aktiveerida nodulatsiooniks vajalikud geenid optimaalse rakutiheduse juures, toodab *B. japonicum* bradüroksetiini. Selle signaalmolekuli keemiline struktuur identifitseeriti aastal 2002. (Loh et al. 2002)

Seda, et paljud nii Gram-positiivsed kui Gram-negatiivsed bakterid indooli sünteesida suudavad, on teada juba üle sajandi, kuid alles suhteliselt hiljuti leiti, et bakterid kasutavad indooli signaalmolekulina nii liigisiseses (Gerth et al. 1993) kui liikidevahelises suhtluses (Lee & Lee 2010). Indool on struktuurilt aromaadne heterotsükliline molekul, koosnedes benseenituumast ja pürroolrõngast.

2013. aastal avastas Ralf Heermanni uurimisrühm Saksamaalt, et *Photobacterium luminescens* kasutab signaalmolekulina  $\alpha$ -püroone (Joonis 1C). Leiti kaheksa erinevat püroonsükli sisaldavat signaalmolekuli, mis erinesid üksteisest püroonsükli 6. süsiniku küljes oleva alküülahela pikkuse ja harunemise poolest (Joonis 1C). (Brachmann et al. 2013)

Sama uurimisrühm avastas äsja, et inimestele patogeenne *Photobacterium asymbiotica* kasutab kvoorumitunnetuses dialküülresortsinoole (Joonis 1C). Need koosnevad kas benseenituumast ja erineva pikkusega alifaatsetest kõrvalahelatest. (Brameyer et al. 2015)

### 1.1.2.3 Lineaarse ahelaga signaalmolekulid

Lineaarse ahelaga signaalmolekulide hulka kuuluvad *Vibrio cholerae* autoinduktor 1 (CAI-1) ning rasvhapete derivaadid 3-hüdropalmitiinhappe metüülester ja *Diffusible Signal Factor* (DSF) (Joonis 1D).

3-hüdropalmitiinhappe metüülester avastati taimepatogeen *Ralstonia solanacearum*'ist 1997. aastal. See molekul on väga volatiilne, mistõttu võib mullas suhteliselt kaugele difundeeruda ja vahendada seeläbi signaali küllalt pika maa taha, üksteisest kaugel elavate kolooniate vahel. (Flavier et al. 1997)

Omaette klassi signaalmolekule moodustavad DSF-tüüpi molekulid ehk  $\alpha,\beta$  küllastamata rasvhapped. Need on laialt levinud mitte ainult bakterite, vaid ka seente hulgas. Joonis 1 paneelil D punktis b on ära toodud cis-11-metüül-2-dodekanoolhape, mida toodab *Xanthomonas campestris*. DSF perekonna signaalmolekule kasutavad peale *X. Campestris*'e veel mitmed inimese tervist ohustavad patogeenid, näiteks *P. aeruginosa*, mitmed liigid *Mycobacterium*'i perekonnast ja seen *Candida albicans*. (Wang et al. 2004)

*Vibrio cholerae*'l puudub AHL-vahendatud kvoorumitunnetuse mehhanism, kuid selle asemel kasutab ta molekuli, mida tuntakse kui *V. cholerae* autoinduktor 1 (CAI-1). See on struktuurilt (S)-3-hüdroksütridekaan-4-oon ning võib esineda ka amineeritud vormis. Tähelepanuväärne on see, et ehkki CAI-1, AHL-id ja AI-2 on keemiliselt struktuurilt ja omadustelt ning bioloogiliselt funktsioonilt väga erinevad, sünteesitakse need ühes ja samas metabolismirajas (Henke & Bassler 2004).

## 1.2. Signaalmolekulide toimemehhanismid

Kõiki signaalmolekule iseloomustab see, et nende äratundmiseks on kujunenud välja spetsiifilised retseptorid. Isegi kui signaal ei ole sihilikult info edastamiseks toodetud, nagu näiteks muropeptiidide puhul, on nende äratundmiseks olemas kindlad retseptorid.

Põhiliseks omaduseks, mis eristab valguliste autoinduktorite toimemehhanismi madalmolekulaarsetest induktoritest on see, et valguliste signaalide retseptorid paiknevad raku pinnal või periplasmas, samas kui madalmolekulaarsete signaalmolekulide retseptorid võivad olla ka tsütoplasmaatilised. Retseptorid võivad raku vastust moduleerida nii kaudselt, näiteks algatades fosforülatsioonikaskaadi, või otseselt, olles ise transkriptsioonifaktoriks. Peptiidseid signaale nagu AIP tuntakse ära kahekomponentsete süsteemide abil, AHL-tüüpi molekulid aga tsütoplasmaatilise retseptori abil, mis on ühtlasi ka transkriptsioonifaktor. (Ng & Bassler 2009)

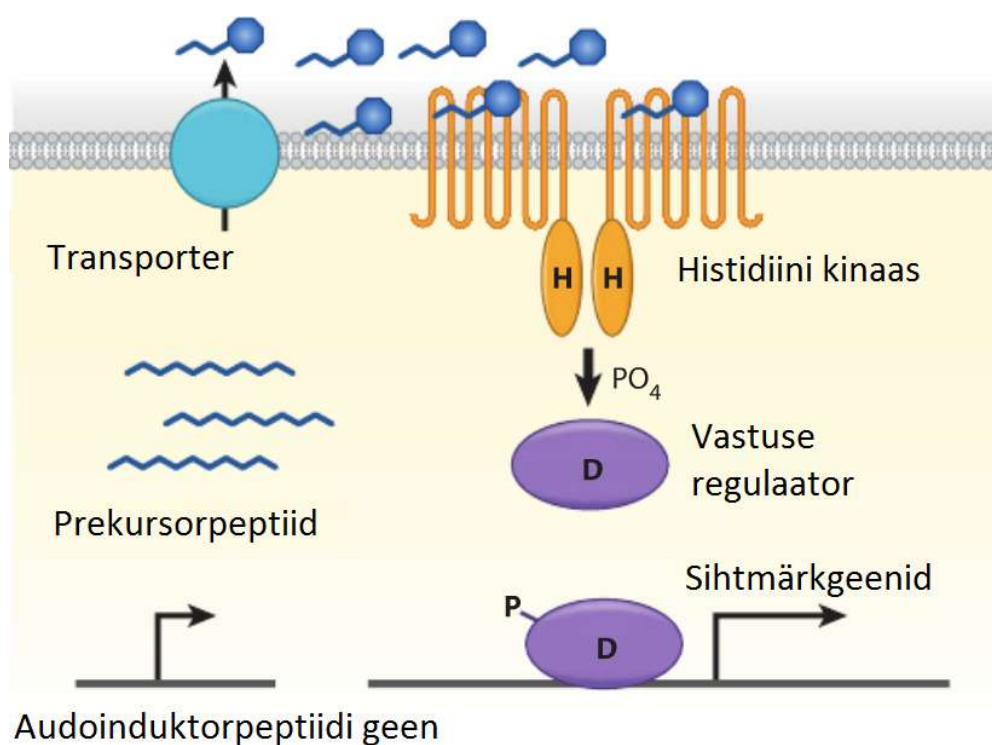
### 1.2.1 Peptiidsete signaalmolekulide toimemehhanismid

Peptiidsete autoinduktorite tajumiseks kasutavad Gram-positiivsed bakterid kahekomponentseid signalisatsioonisüsteeme, mille skeem on toodud Joonis 2. Rakuline vastus tekitatakse läbi fosforüleerimis- või defosforüleerimiskaskaadi. Induktori kontsentratsioon rakuvälises keskkonnas kasvab sedamööda, kuidas kasvab rakupopulatsiooni tihedus. Kui autoinduktori kontsentratsioon ületab kriitilise läve, seondub see kahekomponentse sensorkinaasiga. Rakumembraanis asuva retseptori rakuvälisesse ossa seondub signaalmolekul, samas kui selle rakusisene osa kutsub esile fosforüleerimiskaskaadi, mis kulmineerub geeniekspressiooni reguleeriva valgu aktiveerimisega. Fosforüleeritud transkriptsioonifaktor seondub DNA-ga ja aktiveerib sihtmärkgeenid. (Miller & Bassler 2001)

Kõige paremini uuritud kahekomponentsed süsteemid on *S. pneumoniae* ComD/ComE kopetentsussüsteem, *B. subtilis*'e ComP/ComA kompetentsuse ja sporulatsioonisüsteem ning *S. aureus*'e AgrC/AgrA virulentsussüsteem. Esimene nimetatud valkudest on sensorkinaas, teine transkriptsioonifaktor, mille fosforüleerimine ja seondumine DNA-ga käivitab sihtmärkgeenide ekspressiooni. *S. pneumoniae* ComD/ComE kopetentsussüsteem tunneb ära CSP-d, *B. subtilis*'e ComP/ComA kompetentsuse ja sporulatsioonisüsteem tunneb ära CSF-i ning *S. aureus*'e AgrC/AgrA virulentsussüsteem tunneb ära AIP-i.

Muropeptiidide esinemist rakuvälises keskkonnas tajuvad *B. subtilis*'e rakud läbi PrkC retseptori, mis sarnaneb eukarüootide Ser-Thr kinaasidele. PrkC paikneb spooride sisemises membraanis.

See koosneb muropeptiide siduvast rakuvälisest osast, kus on kolm PASTA (*penicillin and Ser/Thr kinase associated*) järjestust, transmembraanses osas ja kinaase aktiivsusega spoorisisesest osast. PrkC spoorisene osa fosforüleerib EF-G-d (*elongation factor G*), mis on eluks vajalik ribosomaalne GTPaas ja mis osaleb mRNA ja tRNA translokatsioonis, kuid tõenäoliselt ei ole EF-G ainus spooride idanemist tingiv faktor. PrkC rada avastati kui *B. subtilis*'e spooride idanemismehhanism vastusena selle bakteriliigi enda muropeptiididele. (Shah et al. 2008)



**Joonis 2. Peptiidsed autoinduktorid toimivad läbi kahekomponentsete süsteemide, mille mehhanismiks on fosforülatsioonikaskaadi tekitamine.** Signaalpeptiid lõigatakse rakus välja pikemast peptiidahelast ning transporditakse rakust välja. Kui signaali rakuväline kontsentratsioon on tõusnud piisavalt kõrgeks, seondub see kinaase aktiivsusega sensorvalguga. Sensorvalgu rakusisene osa fosforüleerib regulaatorvalgu, mis omakorda aktiveerib sihtmärkgeenide ekspressiooni. Joonis on kohandatud artiklist Ng & Bassler (2009).

Peptidoglükaani hüdrolyüsiv valk Rpf mõjutab soikunud rakkude kasvamahakkamist juba pikomolaarsetes kontsentratsioonides, kuid pole täpselt teada, millest selle äratav mõju tingitud on. Välja on pakutud kaks võimalust: esiteks võib soikunud rakkude aktiveerumine toimuda

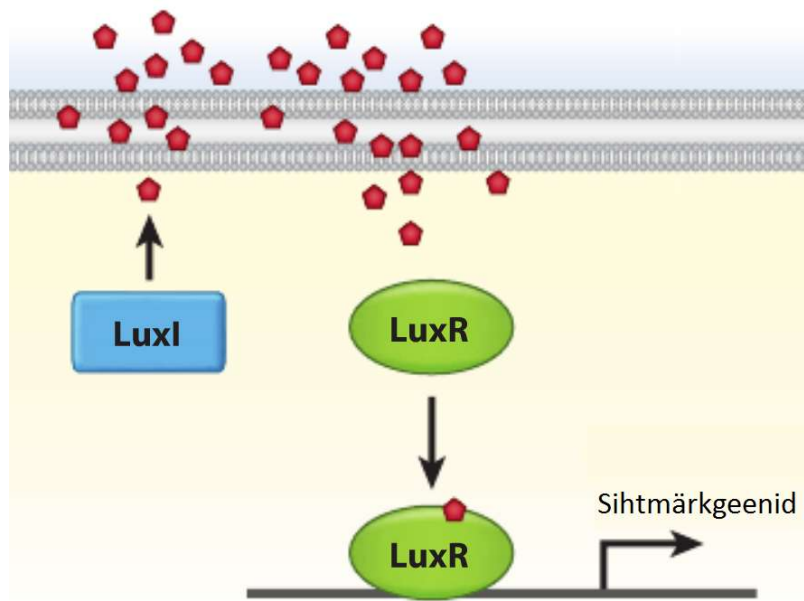
seetõttu, et rakukesta läüsimine soodustab toitainete difusiooni raku ja väliskeskkonna vahel, samas arvatakse teisalt, et Rpf-i mõju võib olla tingitud peptidoglükanaani hüdrolüüsil tekkivatest muropeptiididest. (Keep et al. 2006; Kana & Mizrahi 2010; Shah et al. 2008)

Tsüklilised dipeptiidid, lisaks sellele, et neid sünteesivad Gram-negatiivsed, mitte Gram-positiivsed bakterid, erinevad ülejäänud peptiidsetest autoinduktoritest ka ebatüüpilise toimemehhanismi poolest — need ei toimi mitte läbi kahekomponentse süsteemi, vaid läbi AHL-spetsiifilise LuxR retseptori, millest tuleb juttu allpool. Kui need avastati, arvati esmalt, et tegu on uute AHL-dega, kuna need konkureerisid AHL-idega LuxR retseptori pärast, kuid masspektromeetrilisel (MS) ja tuumamagnetresonants (NMR) analüüsil tehti kindlaks molekulide peptiidne iseloom. (Holden et al. 1999)

### **1.2.2 Madalmolekulaarsete autoinduktorite toimemehhanismid**

Atsüülhomoseriinlaktoonid on suur signaalmolekulide klass, mida kasutavad nii Gram-positiivsed kui Gram-negatiivsed bakterid. AHL-id on küll põhistruktuurilt sarnased, kõik nad sisaldavad laktoonrõngast, kuid erineva pikkusega atsüülahelad võimaldavad liigispetsiifilist signaliseerimist (Miller & Bassler 2001). AHL LuxIR-tüüpi kvoorumitunnetuse süsteem on pikka aega olnud Gram-negatiivsete kvoorumtunnetuse etalonsüsteemiks. See koosneb autoinduktori süntaasist LuxI ja AHL ära tundvast tsütoplasmaatilisest retseptorist LuxR (Joonis 3).

Lühema kõrvalahelaga AHL-id on võimelised ilma transporteri abita raku sisse ja välja difundeeruma, saavutades tasakaalulise oleku. Kui ümbritsevas keskkonnas on signaali kontsentratsioon piisavalt kõrge, ületab selle hulk ka raku sees kriitilise läve ning see seondub LuxR-ga, mis on ühtlasi ka transkriptsioonifaktor, reguleerides ise otseselt sihtmärkgeenide ekspressiooni. Pikema alifaatse ahelaga AHL-idel on olemas transporterid, mida näitab see, et nende rakusisene kontsentratsioon võib tõusta palju kõrgemaks kui rakuväline kontsentratsioon ning see jõuab tasakaalulisse olekusse palju aeglasemalt kui lühikese kõrvalahelaga AHL puhul. (Pearson et al. 1999)



**Joonis 3. Kanooniline Gram-negatiivne LuxIR tüüpi kvoorumitunnetuse süsteem.** LuxI - signaali süntaas, LuxR - signaali retseptor, punased viisnurgad - AHL. Joonis on kohandatud artiklist Ng & Bassler, 2009.

*V. harveyi* kasutab paralleelselt kolme kvoorumitunnetuse molekuli: AHL, AI-2 ja CAI-1, mida sünteesitakse samas metabolismirajas ning mis huvitaval kombel suubuvad kõik samasse, LuxR reguleeritavasse signaaliratta. Sama funktsiooni reguleerimine kolme erineva mehhanismi abil võib olla vajalik selleks, et vastust peenhäälestada. Kolme signaaliraja kasutamine sama regulaatori kontrollimiseks tagab, et süsteem ei aktiveeruks signaalmolekulide kontsentratsioonide juhuslike kõikumiste tõttu. (Henke & Bassler 2004)

*V. harveyi*'s sünteesib AHL struktuuriga molekuli süntaas nimega LuxM, millel puudub igasugune homoloogia teisi AHL molekule sünteesiva LuxI süntaasiga, ehkki täidab sama funktsiooni (Ng & Bassler 2009).

AI-2 sünteesitakse LuxS poolt ja täpne mehhanism, kuidas see rakust välja transporditakse, ei ole veel teada. AI-2 seondub *V. harveyi* puhul LuxP retseptoriga või *S. typhimurium*'i puhul homoloogse retseptori LrsB-ga. Nende retseptorite erinevus seisneb seonduva AI-2 vormi spetsiifikas. *V. harveyi*, kes elab booririkkas meres seob S-THMF-boraati, samas kui boorivaeses keskkonnas elav *S. typhimurium* seob AI-2 teist vormi, R-THMF-i. (Miller et al. 2004)

CAI-1 sünteesitakse läbi CqsA süntaasi ning signaal tuntakse ära periplasmas paikneva transmembraanse CqsS sensorvalgu abil (Higgins et al. 2007).

Nii AHL, AI-2 kui CAI-1 toimivad *V. harveyi*'s samale regulaatorile LuxR, mis aktiveeritakse tiheda populatsiooni korral. Kui populatsioon on hõre, reguleerib geeniekspressiooni madala kultuuritiheduse peamine regulaator, transkriptsioonifaktor AphA. AphA ja LuxR on teineteise retsiprookse kontrolli all ja reguleerivad üksteist läbi sRNA-de. (Henke & Bassler 2004; Rutherford et al. 2011)

On teada, et paljudel proteobakteritel on LuxR-tüüpi retseptoreid, kuid neis puudub LuxI tüüpi AHL süntaas. Putukapatogeeni *P. luminescens*'i LuxR tüüpi PluR retseptori uurimisel avastati 2013. aastal uus signaalmolekulide klass püroonid ning 2015. aastal inimpatogeeni *P. asymbiotica* LuxR analoogi PauR retseptorit uurides dialküülresortsinoolid. (Brachmann et al. 2013; Brameyer et al. 2015)

### **1.3. Signaalmolekulide roll bakterite bioloogias ja meditsiinis**

Kvoorumitunnetus ei ole bakteritele ellujäämiseks lühikeses perspektiivis hädavajalik, kuid see suurendab populatsiooni konkurentsivõimet (LaSarre & Federle 2013). Paljud signaalmolekulid vahendavad nišispetsiifiliste geenide regulatsiooni, tagades selle, et geeniekspressioon aktiveeritaks õigel ajal ja õiges kohas.

Klassikaline näide kvoorumitunnetusest on *V. fischeri* bioluminestsents. See bakter koloniseerib kalmaar *Euprymna scolopes*'e valgusorganeid, kes elab *V. fischeri*'ga sümbioosis, pakkudes mikroobile toitu ja saades vastutasuks valgust. See aitab kalmaaril taeva taustal nähtamatuks jääda ja sel moel end kiskjate eest kaitsta. Bioluminestsentsi on kalmaaril vaja ainult öösel, kui ta aktiivselt jahti peab, ning magamise ajaks pumpab ta oma valgusorganitest 95% *V. fischeri* rakke välja ja varjub liiva alla. Tänu kvoorumitunnetusele suudab *V. fischeri* kiiresti vahet teha kalmaari valgusorganil ja ümbritseval merel ning lülitada sisse vastavad geenid. Ootamatult valgusorganist ookeani sattudes suudab ta enne varude lõppemist oma geeniekspressiooni optimeerida, ning vastupidi, kogedes kalmaari valgusorganis tihedat populatsiooni, lülitada sisse bioluminestsentsiks vajalikud geenid. Õhtuks saavutab bakterikultuur tema valgusorganites taas suure tiheduse, AHL-i on kogunenud piisavalt, bakterid lülitavad valguse tootmiseks vajalikud geenid sisse ning kalmaari valgusorganid hakkavad taas helendama. Vabalt elavad *V. fischeri* rakud toodavad samuti AHL-i, kuid signaal difundeerub minema ega saavuta kunagi

induktsiooniks vajalikku kontsentratsiooni. Ainult siis, kui induktorit toodab korraga palju füüsiliselt lähestikku asuvaid rakke, ületab AHL kontsentratsioon läve ning kõikide rakkude geeniekspressioonimuster muutub samaaegselt. (Ruby 1996)

Lisaks bioluminestsentsile vahendavad bakterite signaalmolekulid mitmesuguste muude geenide ekspressiooni, mille aktivatsioon on kasulik ainult piisavalt tiheda populatsiooni korral. Väga paljude autoinduktorite puhul on leitud, et need reguleerivad virulentsusega ja biofilmi moodustamisega seotud gene (Tang & Zhang 2014). Peremeesorganismi edukaks koloniseerimiseks on vaja kriitilist hulka patogeene, samuti ei ole rakul mõtet käivitada biofilmi moodustamiseks vajalike eksopolüsahhariidide sünteesi, kui populatsioon on liiga väike. Lisaks neile kahele väga olulisele ja paljusid gene hõlmavale näitele mängivad signaalmolekulid suurt rolli veel horisontaalsel geeniülekanal – Ti-plasmiidi konjugatsioonil *A. tumefaciens*'isel (Zhang et al. 1993) ja *B. subtilis*'e kompetentsusgeenide sisse lülitamisel (Magnuson et al. 1994). Muropeptiidid ja Rpf aktiveerivad soikunud rakkude metabolismi (Shah et al. 2008; Mukamolova et al. 2006) ja bradüoksetiin surub õigel ajal maha sojaoa sümbiondi, *B. japonicum*'i nodulatsioonigeneid (Loh et al. 2002). *S. aureus*'e tüved konkureerivad omavahel, inhibeerides üksteise kasvu AIP-ide abil (Miller & Bassler 2001) ja streptomütseedid reguleerivad diferentseerumist ja kontrollivad antibiootikumide tootmist  $\gamma$ -butürolaktoonide kaudu (Takano 2006).

Biofilmide moodustamine soosib bakterite ellujäämist mitmesuguste keskkonnatingimuste korral, kus üksikud rakud hukkuks, näiteks oleks immuunsüsteemil palju lihtsam krooniliste või korduvate infektsioonide haigustekitajaid surmata, kui bakterid ei kaitseks eksopolüsahhariidne maatriks. Biofilmid suurendavad bakterite tolerantsust antibiootikumide suhtes, kuna need ei difundeeru biofilmi sisse kuigi hästi ja seetõttu võtab selliste infektsioonide ravi kauem aega. Kuna bakteritel on sel moel kauem aega tingimustega kohaneda, võib see viia antibiootikumiresistentsete mutantide tekkele, kes võivad kasuliku mutatsiooni horisontaalse geeniülekanal abil teistega jagada. Kvoorumitunnuse teine meditsiiniliselt väga oluline aspekt on virulentsusgeenide ekspressiooni regulatsioon. Patogeeneid ekspresseerivad virulentsusgene reeglina siis, kui populatsioon on peremehe edukaks koloniseerimiseks piisavalt suur. Virulentsusgeenide avaldumine on väga rangelt kontrollitud, sest nende ettevaatamatu aktivatsioon võib viia immuunvastuseni, mis tähendaks surma kogu patogeensele

populatsioonile. Need kaks tõika on tekitanud huvi kvoorumitunnetuse inhibeerimise vastu. Kui õnnestuks inhibeerida virulentsusgeenide avaldumist, võiks juhtuda, et patogeen küll elaks peremehes mõnda aega, kuid ei suudaks justkui iialgi saada kokku piisavalt suurt kvoorumit, et virulentsusgeene ekspresseerima hakata. (Tang & Zhang 2014; Dong et al. 2001, 2002)

Kui AHL-e peetakse molekulideks, mis vahendavad liigisisest suhtlust, siis AI-2 signalisatsiooni kasutavad paljud bakterid nii Gram-positiivsete kui Gram-negatiivsete bakterite seast. Praeguseks on kindlaks tehtud vähemalt 85 erinevat liiki, kes suudavad AI-2 sünteesida ja detekteerida. AI-2 täidab neis organismides erinevaid funktsioone. Näiteks reguleerib AI-2 *V. cholerae*'s kompetentsuse teket ja virulentsusafaktorite tootmist, *H. pylori*'s liikumisvõimega seotud gene, *Borrelia burgdorferi* puhul rakupinna lipoproteiini VlsE hulka. (Pereira et al. 2013)

Kvoorumitunnetuse summutamiseks on kolm moodust: hävitada signaalmolekul, inhibeerida selle sünteesi või inhibeerida selle retseptorit (Tay & Yew 2013). Mitmesugused mikroobid sekreteerivad AHL lagundamiseks laktonaase ja atsülaase. Laktonaasid ei ole reeglina väga substraadispetsiifilised, aga atsülaasid lagundavad enamasti kindla pikkusega atsüülahelaga AHL-e (LaSarre & Federle 2013). Bakterid, kes kasutavad AI-2 tajumiseks LsrB-tüüpi retseptorit, näiteks *E. coli* ja *S. Typhimurium*, transpordivad statsionaarsesse kasvufaasi jõudes AI-2 rakkudesse sisse (Pereira et al. 2013; Xavier & Bassler 2005). AI-2 signaali kasutavad paljud nii Gram-positiivsed kui Gram-negatiivsed bakterid, seeõttu on uuritud võimalusi *E. coli* kasutamiseks AI-2 sõltuva kvoorumitunnetuse inhibeerimisel (Marques et al. 2014), aga ka soodustamisel (Thompson et al. 2015). Hiljuti avaldasid Thompson ja kolleegid artikli, kus uurisid AI-2 mõju soolestiku mikrofloorale. Nad näitasid, et *E. coli*, kes suudab AI-2 toota kuid mitte tagasi rakku viia, võib pärast antibiootikmiravi aidata kaasa soolestiku normaalse mikrofloora taastumisele (Thompson et al. 2015).

Eri liiki stafülokokid kasutavad erinevaid AIP-e, mis stimuleerivad neid tootva tüve virulentsust, kuid inhibeerivad homoloogseid AIP-e kasutavaid tüvesid. Katsed hiiremudelil on näidanud, et antagonistliku AIP-i lisamine inhibeerib *S. aureus*'e poolt põhjustatud mädapaisete teket (Wright et al. 2005).

*V. cholerae* toodab virulentsusfaktoreid ja moodustab biofilme siis, kui rakutihedus on madal. Tiheda populatsiooni korral akumuleeruvad keskkonda CAI-1 ja AI-2, mis üheskoos represseerivad virulentsusgeenide ekspressiooni (Higgins et al. 2007). 2010. aastal näitasid Duan

ja March, et kui hiirtele sööta esmalt CAI-1 ja AI-2 tootvat *E. coli* Nissle tüve ja seejärel patogeenset *V. cholerae* tüve, tõstab see oluliselt hiirte ellujäämisvõimalust (Duan & March 2010).

Sünteesilise bioloogia abil on loodud *E. coli*, kes suudab üles leida ja tappa patogeenset *P. aeruginosa*'t. *E. coli* tunnetab *P. aeruginosa*-spetsiifilist AHL-i ja vastusena aktiveerib püotsiinide sünteesi. Püotsiinid on pseudomonaadide endi poolt sekreteeritavad toksiinid, mis tapavad selektiivselt teist liiki pseudomonaade, kuid mitte *E. coli* ennast. Selline *E. coli* vähendab *P. aeruginosa* biofilmide moodustamise võimet ja tapab 99% vabalt ujuvatest rakkudest, mistõttu võiks see olla heaks vahendiks näiteks krooniliste kopsupõletike raviks. (Saeidi et al. 2011)

#### **1.4 Puhastamismeetodid**

Kõik hüdrofoobsed signaalmolekulid (näiteks AHL, PQS, püroonid, DSF, tsüklilised dipeptiidid) on söötmest välja ekstraheeritud veega mittesegunevate lahustite nagu etüülatsetaadi, diklorometaani või kloroformi abil või hüdrofoobseid aineid siduva resiini abil. Täiendavaks puhastamiseks on kasutatud pöördfaasikromatograafiat. Enamasti on signaalmolekul muudest ainetest lahutatud C18, vahel ka C8 kolonni abil. Mida tugevam on hüdrofoobne interaktsioon kadja ja uuritava aine vahel, seda kauem püsib aine kolonnile seotuna. See meetod võimaldab keerulisi segusid puhta aine fraktsioonideks lahutada. (Holden et al. 1999; Higgins et al. 2007; Takano et al. 2000; Pesci et al. 1999; Pearson et al. 1994)

Nõrga anioonvahetusmaatriksi abil (DEAE -Diethylaminoethyl cellulose) puhastati söötmest välja Rpf. Tselluloos lisati bakterisöötmesse, loksutati ja hiljem elueeriti resiinilt sinna kinni jäänud ained. Kuna valk on tundlik materjal, viidi kõik ekstraktsioonid läbi jääs. (Mukamolova et al. 1998)

Autoinduktor 2 puhastamine oli väga keeruline ja aeganõudev protsess. Ehkki selle signaalmolekuli olemasolu leidis kinnitust juba 1994. aastal, jõuti selle struktuuri identifitseerimiseni alles peaaegu 10 aastat hiljem. 2001. aastal osati AI-2 molekuli in vitro sünteesida, kasutades selleks puhastatud LuxS ja Pfs valkusi ning prekursori S-adenosiin-homotsüsteiini (SAH), kuid sellegipoolest ei suudetud signaali keemilist struktuuri kindlaks teha. Kuna klassikalised keemilised ja biokeemilised meetodid ei andnud soovitud tulemust, oli vaja kasutada täiesti uutset lähenemist. (Chen et al. 2002)

Erinevalt pisematest AHL molekulidest ei ole AI-2 võimeline läbi rakumembraani difundeeruma ja AI-2 tuntakse ära periplasmaatilise retseptori LuxP abil, mis kuulub substraadi suhtes kõrge afiinsusega retseptorite perekonda. LuxP seob AI-2 molekuli nii tugevalt, et need jäävad seotuks ka kromatograafilise puhastamise käigus. 2002. aastal kristalliseeriti AI-2 struktuuri uurimiseks LuxP AI 2 kompleks ning elektrontiheduse põhjal tehti kindlaks seondunud ligandi struktuur. Selgus, et *V. harveyi* AI-2 on on S-2-metüül-2,3,3,4-tetrahüdroksütetrafüraan-boraat (S-THMF-boraat) (Joonis 1B). (Chen et al. 2002)

See, et AI 2 struktuur booriaatomit sisaldab, tuli suure üllatusena, kuna boor on biomolekulide koostisosana üsna vähelevinud. Boor on küll eluks vajalik mikroelement, kuid selle täpne funktsioon on teadmata. Boor kui element avastati üle 200 aasta tagasi, kuid esimene boori sisaldav biomolekul, boromütsiin, avastati alles 1967. aastal. Mõnda aega hiljem, 1976. aastal, leiti veel üks boori sisaldav antibiootikum aplasmomütsiin. AI-2 oli kolmas oluline biomolekul, mille koostises boori leiti. (Carrano et al. 2009)

2004. aastal kristalliseeriti AI-2 retseptor LsrB *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium'ist ning avastati märkimisväärselt erineva struktuuriga AI-2, mis ei sisaldanud boori aatomit. LsrB ligandiks on R 2 metüül 2,3,3,4-tertafüdroksü-tertafüraan (R THMF). Nii S-THMF-boraat kui R-THMF tekivad spontaanselt samast prekursorimolekulist. Boori juuresolekul tekib S-THMF-boraat, kui boori pole, tekib R THMF. Kuna boori kontsentratsioonid on maismaakeskkondades palju madalamad kui vees, on erinevus kahe bakteriliigi analoogsete retseptorite struktuuris suhteliselt lihtsalt seletatav. Kuna *V. harveyi* elab ookeanis ja *S. Typhimurium* imetajate soolestikus, siis on esimesel juhul boori kontsentratsioon kasvukeskkonnas oluliselt kõrgem. Arvatakse, et kuna ilma boorita AI 2 indutseerib ja boori sisaldav AI 2 inhibeerib *S. Typhimuriumi* virulentsust, aitab selline mehhanism bakteritel aru saada, millises keskkonnas nad parasjagu viibivad ning vältida virulentsusgeenide ekspressiooni vales kohas ja vales ajal. (Pereira et al. 2013)

## **2. Eksperimentaalosa**

### **2.1 Töö eesmärk**

Kirjeldasin oma bakalaureusetöös tundmatut kasvufaktorit, mida sekreteerivad eksponentsiaalses kasvufaasis *E. coli* rakud. Jälgides süsinikunäljas statsionaarse faasi rakkude kasvamahakkamist vastusena uuele süsinikuallikale, selgus, et geneetiliselt identsed rakud reageerivad heterogeenselt. Statsionaarse faasi rakkude metaboolne aktiveerumine toimub kahes etapis. Alguses hakkab kasvama ainult väike osa populatsioonist ning mõnda aega hiljem aktiveerub enamus rakke. Uurisin oma bakalaureusetöös, kas kiiremini virguv rakupopulatsioon mõjutab ülejäänud populatsiooni väljumist statsionaarsest faasist. Selgus, et esimesena aktiveerunud populatsioon sekreteerib kasvukeskkonda midagi, mis kiirendab statsionaarsest faasist väljumist. Kuna tegu oli tundmatu aktiivsusega, nimetasime selle faktor X-iks. (Tüür 2013)

Minu magistritöö eesmärk on bakalaureusetöös kirjeldatud kasvufaktorit keemiliselt iseloomustada, et oleks võimalik see puhastada ja identifitseerida.

## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed ja plasmiidid

Eksperimentide käigus kasutasin kolme *E. coli* tüve. Kõik lahused on testitud K-12 BW25113 (F,  $\Delta(\text{araDaraB})567$ ,  $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$ ,  $\lambda^-$ , *rph-1*,  $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$ , *hsdR514*) tüvel. Söötmete konditsioneerimise eksperimentides kasutasin AI 2 tootmise suhtes defektseid tüvesid DH5 $\alpha$  ja K12 BW25113  $\Delta\text{luxS}$  Keio kollektsioonist. (Surette et al. 1999)

Tabel 1. Kasutatud *E. coli* tüved ja plasmiidid.

Tüvi või plasmiid	Täpsustused	Allikas või viide
K-12 BW25113	<i>rrnB3</i> $\Delta\text{lacZ4787}$ <i>hsdR514</i> $\Delta(\text{araBAD})567$ $\Delta(\text{rhaBAD})568$ <i>rph-1</i>	(Baba et al. 2006)
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$ $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( $\text{r}_K^-$ $\text{m}_K^+$ ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> $\lambda^-$ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	(Henke & Bassler 2004)
K-12 BW25113 $\Delta\text{luxS}$ (Keio collection)	<i>rrnB3</i> $\Delta\text{lacZ4787}$ <i>hsdR514</i> $\Delta(\text{araBAD})567$ $\Delta(\text{rhaBAD})568$ <i>rph-1</i> $\Delta\text{luxS}$	(Baba et al. 2006)
pETgfp mut2 AGGAGG (3)	GFPmut2 reportergeen IPTG-ga indutseeritava tac-promooteri all (Kan <sup>r</sup> )	(Vimberg et al. 2007)
pBAD-Crimson	Crimson reportergeen arabinoosiga indutseeritava pBAD-promooteri all (CAM <sup>r</sup> )	Arvi Jõers

Kasvatasin baktereid MOPS minimaalsöötmel, mis sisaldas süsinikuallikana 0.1% glütserooli (Gly) või 0.2% glükonaati (Glt) ning selektsiooniks kaht antibiootikumi: klooramfenikooli (CAM) ja kanamütsiini (Kan) lõppkontsentratsiooniga 25  $\mu\text{g/ml}$ . Vajadusel lisasin rohelist fluorestseeruva signaalvalgu GFP ekspressiooniks vajalikku induktorit IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 1mM või punast fluorestseeruva valgu Crimsoni ekspressiooniks

vajalikku induktorit arabinoosi lõppkontsentratsiooniga 1mM. Fluoromeetris läbi viidud eksperimentide korral lisasin alati ampitsilliini kontsentratsiooniga 150 µg/ml.

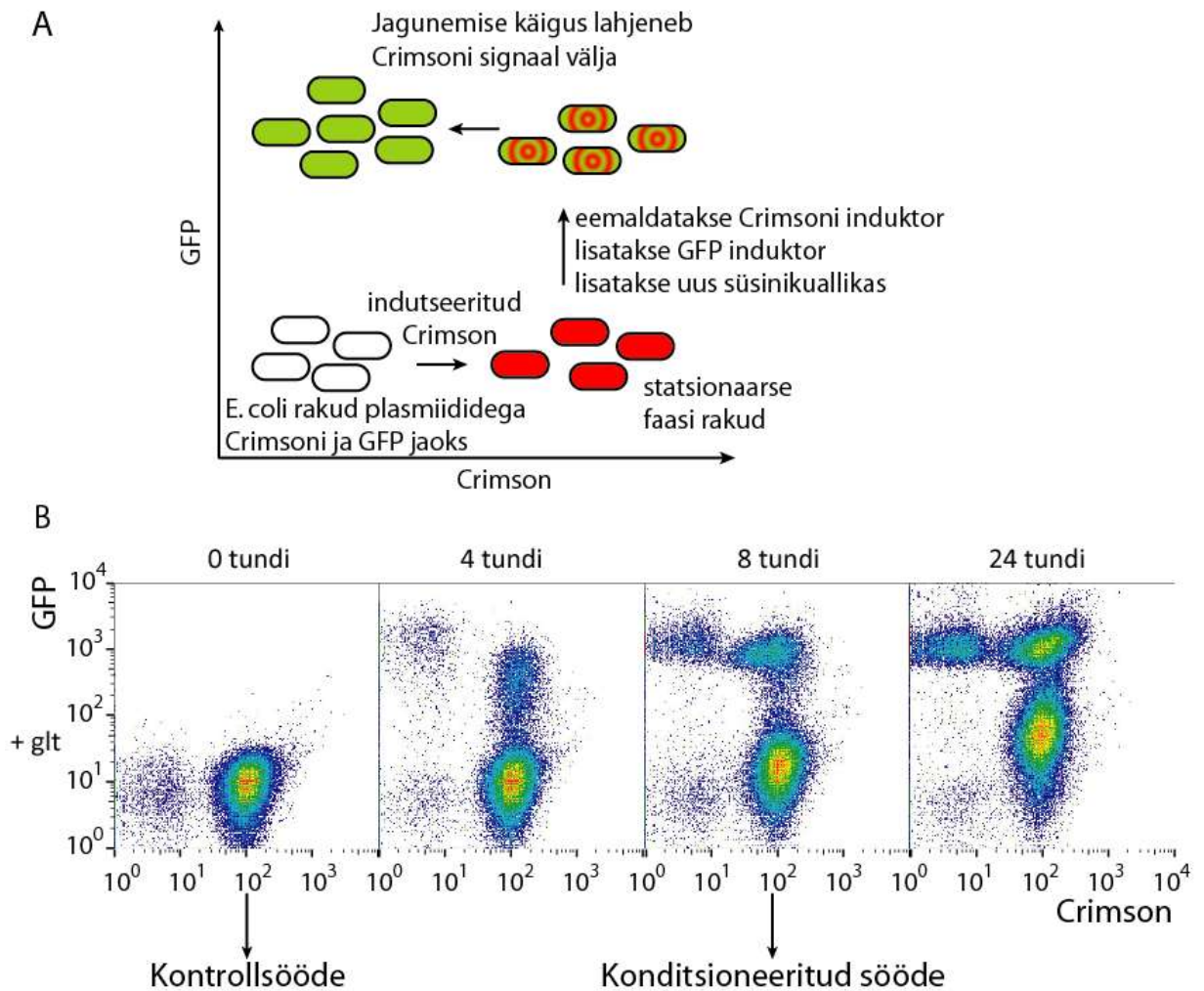
Kasvatasin baktereid alati temperatuuril 37°C. Suuremahulsi kultuure kasvatasin Sanyo loksutil kiirusel 220 rpm või Heidolph Unimax 1010 loksutil 155 kiirusel rpm. Fluoromeetriliste katsete puhul kasvatasin baktereid 96-kannuga plaatidel mahus 100 µl keskmise loksutamiskiiruse juures BioTek Synergy™ Mx mikrotiiterplaadilugejas.

### **2.2.2 Söötme konditsioneerimine**

*E. coli* K-12 tüve BW25113 söötme konditsioneerimiseks kasvatasin rakke kolm päeva 125 ml suuruses kolvis mahus 100 ml MOPS Gly + Kan + CAM+ ara söötmes Sanyo loksutil 220 rpm +37°C juures. Tsentrifuugisin rakukultuuri Sigma 4K15C fuugis rootoriga 11150 15 minutit 5000 g ja 4°C juures. Eemaldasini supernatandi ja pesin rakke MOPS soolalahuses. Tsentrifuugisin rakke veelkord 15 minutit 5000 g ja 4°C juures, eemaldasini supernatandi ja suspendeerisin rakud samas mahus MOPS Glt + IPTG söötmes. Valmistasin kontrollisöötme, eemaldades koheselt poole söötmet ja tsentrifuugisin seda 15 minutit 5000 g ja 4°C juures. Eemaldasini supernatandi ning filtreerisin selle läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri.

Konditsioneeritud söötme saamiseks kasvatasin eeltoodud moel värskes söötmes suspendeeritud rakke Heidolph Unimax 1010 loksutil 155 kiirusel rpm. Monitoorisin statsionaarses faasis rakkude metaboolset aktiveerumist voolutsütomeetriselt (Joonis 4). Rakkude väljumine statsionaarsest faasist toimub kahes etapis: esmalt muutub metaboolset aktiivseks väike osa rakke ning alles seejärel hakkab kasvama suurem osa populatsioonist. Eemaldasini konditsioneeritud söötme siis, kui väiksem osa populatsioonist oli aktiveerunud, kuid suurem osa populatsioonist alles alustas kasvamist (joonis 4B). Sel moel sain konditsioneeritud söötme, mis sisaldas veel piisavalt süsinikuallikat, et võimaldada rakkude kasvu, kuid ka aineid, mida rakud sinna elutegevuse käigus sekreteerinud olid, muuhulgas faktor X-i (FX). Tsentrifuugisin rakukultuuri 15 minutit 5000 g ja 4°C juures, eemaldasini supernatandi ning filtreerisin selle läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri. Nii kontroll- kui konditsioneeritud söödete säilitasin külmutatuna -80°C juures.

*E. coli* DH5α ja Keio kollektsiooni K12 BW25113 Δ*luxS* tüvede söötmete konditsioneerimiseks kasutasin sama meetodikat, kuid väiksemaid mahtusid. Konditsioneerisin kummalgi tüvel 10 ml söödete.



**Joonis 4. Söötme konditsioneerimine. Paneel A: Läbivoolutsütomeetrilise analüüsi põhimõte.** Bakterite metabolismi ja rakujagunemist jälgitakse läbivoolutsütomeetriliselt kahe reportervalgu signaalitugevuse põhjal. X-teljel on punase reportervalgu Crimsoni intensiivsus ja Y-teljel GFP signaali intensiivsus. Esmalt kasvatatakse bakterid Crimsoni induktori juuresolekul statsionaarsesse faasi ning saadakse punaselt fluorestseeruv populatsioon. Kasutatud sööde vahetatakse värske vastu, eemaldatakse Crimsoni induktor ja lisatakse GFP induktor. Metaboolset aktiivsete rakkude GFP-signaali tõuseb, jagunevatest rakkudest lahjeneb Crimson välja. Selline skeem võimaldab eristada statsionaarses faasis rakke aktiivsetest rakkudest. Kui rakke kasvatada faktor X-i sisaldavas lahuses, väheneb Crimson-positiivsete, GFP-negatiivsete rakkude hulk kiiremini kui kontrolli puhul.

**Paneel B: voolutsütomeetrilised pildid rakukultuurist erinevatel ajahetkedel.** Valmistasin kontrollsöötme kohe pärast värske söötme lisamist statsionaarse faasi rakkudele. Konditsioneeritud söötme saamiseks eemaldasid söötme kultuurist, kus rakud olid mõnda aega kasvanud, kuid kus leidis veel piisavalt süsinikuallikat, et võimaldada bakterite kasvu.

### **2.2.3 Faktor X-i sisalduse määramise meetodika**

Otsitava aine sisaldust lahuses hinnati bakterite vastuse kaudu. Selleks kasutati kas voolutsütomeetrilist analüüsi või plaadikatset. Põhiline erinevus kahe meetodika vahel seisneb selles, et voolutsütomeetrias mõõdetakse osakeste helenduvust, fluoromeetris lahuse helenduvust.

#### **2.2.3.1 Voolutsütomeetria**

Voolutsütomeetriliseks analüüsiks (FACS) kasvasin baktereid MOPS Gly + Kan + CAM + ara söötmes Sanyo loksutil 220 rpm +37°C juures neli või viis päeva. Tsentrifuugsisin kultuuri 15 minutit 5000 g ja 4°C juures, eemaldasini supernatandi ning suspendeerisin rakud uuritavas lahuses, mis sisaldas IPTG-d. Alates uue söötme lisamisest võtsin proovid 6. tunnil, 12. tunnil ja 24. tunnil, segasin 1:1 30% glütserooli lahusega PBS-is ja säilitasin voolutsütomeetrilise analüüsini külmutatuna -80°C juures. Enne analüüsi lahjendasini külmutatud proovid 1x PBS puhvris, võttes 500 µl PBS-i kohta 10 µl külmutatud proovi. Lugesini proovid sisse keskmisel kiirusel 15 sekundi jooksul. Loetud sündmuse arv oli alati vähemalt 20000.

Proovide analüüsimiseks kasutasini läbivoolutsütomeetrit FACSCalibur firmalt Becton ja Dickinson. GFP signaali detektsiooniks kasutasini laserit LSR II Blue Laser Sapphire ergastusega 488 nm ja detektsiooniga 530/30 nm. Crimsoni signaali detektsiooniks kasutasini laserit LSR II Red Laser HeNe ergastusega 638 nm ja detektsiooniga 660/20 nm. Andmete analüüsimiseks kasutasini FlowJo 7.5 (Treestar, Inc.) tarkvara. Kui kasvatada rakke faktor X-i sisaldavas lahuses, väheneb GFP-negatiivsete, Crimson-positiivsete rakkude hulk kiiremini kui kontrolli puhul. Joonis 4A kirjeldab läbivoolutsütomeetrilise analüüsi põhimõtet.

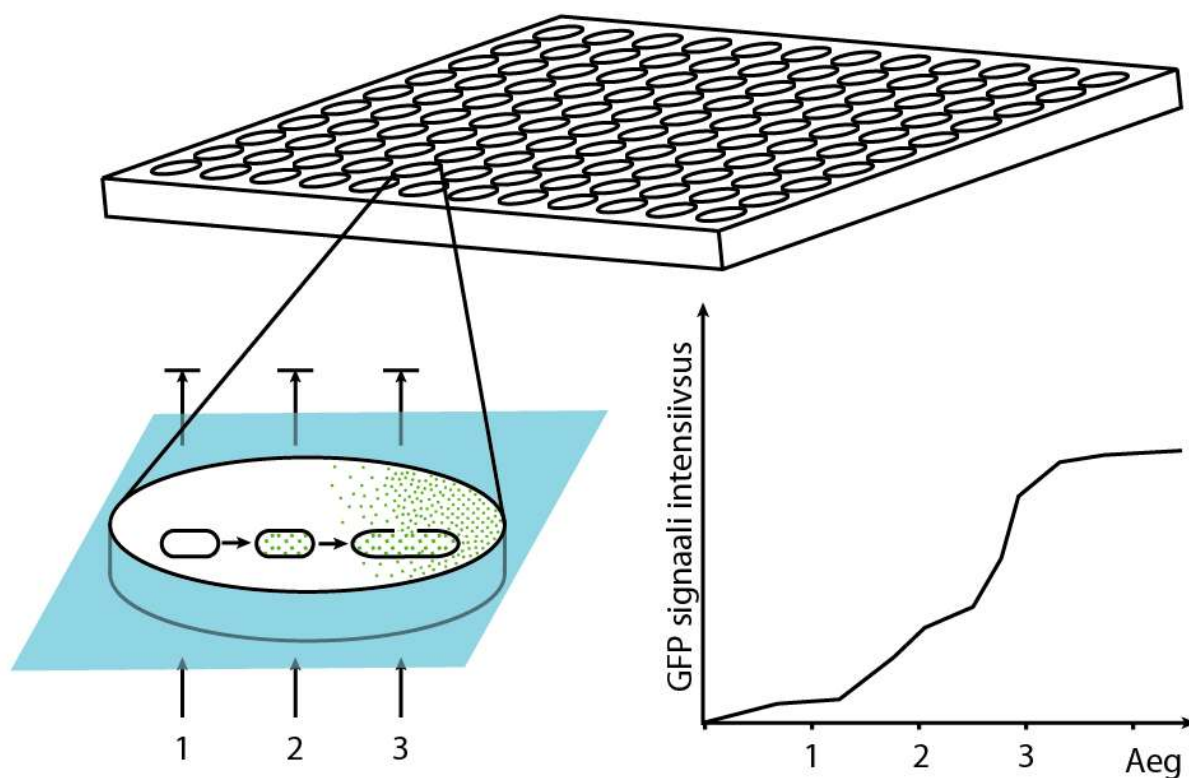
#### **2.2.3.2 Plaadikatse fluoromeetris**

Plaadikatse tarvis kasvasini testkultuuri neil päeva MOPS Gly söötmes. Tsentrifuugsisini kultuuri 15 minutit 5000 g ja 4°C juures ning eemaldasini supernatandi. Suspendeerisin rakud kas 2x MOPS Glt 0,4% või MOPS Glt 0,2% söötmes, pidades silmas, et pärast uuritava lahuse lisamist sisaldaks kultuur 1x MOPS söödet ja 0,2% Glt. Lisasini alati ampitsilliini kontsentratsiooniga 150 µg/ml.

Ampitsilliini lisamine on vajalik selleks, et oleks võimalik jälgida statsionaarse faasi rakkude metaboolset aktiveerumist, mitte populatsiooni kasvudünaamikat. Ampitsilliin on laia spektriga bakteritsiidne antibiootikum, mis mõjub nii Gram-positiivsete kui Gram-negatiivsetele bakteritele. Ampitsilliin lüüsib poolduvaid rakke, kuid ei mõjuta rakke, kes ei kasva, mistõttu on

just ampitsilliin selliseks katseks kõige sobivam antibiootikum. Kasvama hakkav rakk jõuab enne lüüsumist toota enam-vähem kindla koguse GFP-d, seega võimaldab see meetod mõõta statsionaarsest faasist väljuvate rakkude hulka.

Plaadikatses käigus kasvatasin baktereid BioTek Synergy MX *microplate reader*'is pideval loksutamisel keskmisel kiirusel +37°C juures ning rakukultuuri GFP-signaali mõõdeti iga 15 minuti järel alates rakkude viimisest uude söötmesse 19–24 tunni jooksul. Kui rakke kasvatada faktor X-i sisaldavas lahuses, tõuseb GFP signaal kiiremini kui kontrolli puhul. Joonis 5 kirjeldab fluoromeetrilise analüüsi põhimõtet.



**Joonis 5. Fluoromeetrilise analüüsi põhimõte.** Statsionaarse faasi rakke kasvatati 96 kannuga mikrotiiterplaadil ning mõõdeti lahuse GFP-signaali intensiivsust. Mida intensiivsem signaal, seda rohkem metaboolselt aktiivseid rakke. Katses lisati söötmesse alati ampitsilliini. Ampitsilliin lüüsis poolduvaid rakke, kuid ei mõjuta rakke, kes ei kasva. Kasvama hakkav rakk jõuab enne lüüsumist toota enam-vähem kindla koguse GFP-d, seega võimaldab see meetod mõõta statsionaarsest faasist väljuvate rakkude hulka. Kui rakke kasvatada faktor X-i sisaldavas lahuses, tõuseb GFP signaal kiiremini kui kontrolli puhul.

#### **2.2.4 Faktor X-i pH-taluvuse katse**

Võtsin 5 ml konditsioneeritud või kontrollsöödet, viisin selle pH HCl või NaOH-ga 15 minutiks vastavalt kas pH 2 või pH 12-ni ning neutraliseerisin lahuse kas NaOH või HCl-ga. Testisin saadud lahuseid plaadiformaadis neli päeva MOPS Gly söötmes kasvanud testrakkudel paralleelselt töötlemata söötmega. Tegin lahjendusread kuni 64x algsest kontsentratsioonist.

#### **2.2.5 Faktor X-i kuumutamiskatse**

Kuumutasin FX või kontrollekstrakti proove (644 µg kuivainet 100 µl-s) 100°C juures kinnise kaanega katsutis kuumaplokil 10 minutit ja testisin lahuseid plaadiformaadis neli päeva MOPS Gly söötmes kasvanud testrakkudel. Positiivseks kontrolliks lisasin testkultuuridele termiliselt töötlemata ekstrakte. Tegin lahjendusread kuni 64x algsest kontsentratsioonist.

#### **2.2.6 Ekstraktsioonid orgaaniliste solventidega**

Külmutasin 100 ml konditsioneeritud söödet ja 100 ml kontrollsöödet -80°C juures 50 ml falconites ja lüofiliseerisin ScanVac CoolSafe vaakumkuivatis, mille kondensaatori temperatuur oli -107°C ja rõhk 0,012 mbar. Kõik järgnevad protseduurid viisin läbi paralleelselt kontroll- ja konditsioneeritud söötmega. Lahustasin lüofilisaadi 5 ml vees, tõstsin lahuse ümber 20 ml klaasviaali, külmutasin aeglaselt -80 kraadini ning lüofiliseerisin veelkord. See on vajalik seetõttu, et ekstraktsioonid tuleb läbi viia võimalikult inertsest materjalist nõudes, milleks on klaas palju sobivam kui plastik.

Lisasin lüofilisaadile 4 ml 1-butanooli ja ekstraheerisin 2 tundi pidevalt loksutades. Pipeteerisin butanooli 2ml katsutitesse ja tsentrifuugisin Eppendorf 5415R tsentrifuugis rootoriga F 45-24-11 täispööretel (16100 x g) 8 minutit +4°C juures. Tõstsin supernatandi puhtasse 20 ml klaasviaali. Kordasin protseduuri 4 ml ja 6 ml butanooliga, ekstraheerides lüofilisaati kummagi mahuga 12 tundi. Kuivatasin butanoolifraktsiooni tõmbekapis ning lahustasin sademe 2 ml vees, millest 100 µl kasutasin aktiivsuse testimiseks plaadikatses. Kõigi teiste hüdrofiilsete orgaaniliste solventidega kasutasin sarnast meetodikat, kuid väiksemaid söötmemahtusid.

Saadud lahust ekstraheerisin võrdses mahus diklorometaaniga (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Pipeteerisin vesilahuse ja diklorometaani klaasist tuubi, katsin hõbepaberiga ja loksutasin 15 minuti jooksul tugevalt. Eemaldasid diklorometaanifraktsiooni ja tõstsin selle puhtasse 20 ml klaasviaali. Kordasin protseduuri kaks korda samade parameetritega. Kogusin diklorometaanifraktsioonid kokku, kuivatasin tõmbekapis, lahustasin sademe 2 ml vees ja kuivatasin Heto MAXI Dry Plus

vaakumkuivatis. Pipeteerisin ekstraheeritud vesifaasi 1,5 ml katsutitesse ja kuivatasin samal moel. Kaalusin kuivaine massi, lahustasin sademe 100 µl vees ja testisin saadud ekstrakte plaadikatses. Kõikide teiste hüdrofoobsete orgaaniliste solventidega kasutasin sarnast metoodikat.

### **2.2.7 Kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC)**

Kasutasin 2,5 ml C18 pöördfaasikolonne (Vydac) Agilent 1100 Series HPLC-aparatuuris. Kandsin kolonnile 10 µl proovi, milles sisalduva kuivaine mass oli kas 1 mg või 0,5 mg. Kromatograafia koosnes isokraatilisest osast ja eluatsioonist metanooliga. 30 minuti jooksul pumpasin kiirusel 1 ml minutis kolonnist läbi vett, 10 minuti jooksul tõstsin metanooli kontsentratsiooni 80%-ni, pesin 5 minuti jooksul kolonne 80% metanooliga ning viisin 5 minuti jooksul kolonne tagasi vette. Kogusin fraktsioonid koguti ühe minuti kaupa LKB Bromma 2112 Redirc fraktsioonikoguja abil. Kuivatasin fraktsioonid Heto MAXI Dry Plus vaakumkuivatis, lahustasin kuivaine 100 µl vees ja testisin plaadikatses.

### **2.2.8 Ioonvahetuschromatograafia**

Kasutasin nii anioon- kui kationvahetuschromatograafiat.

#### **2.2.8.1 Anioonvahetus**

Anioonvahetusel kasutasin tugevat anioonvahetusmaatriksit Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). Pakkisin kolonne 0,5 ml maatriksit ja eelpesin kolonne 2,5 ml 25 mM TRIS pH 8.0 puhvriga. Vajaminevate lahuste ruumala arvutamisel lähtusin reeglist, et piisav on viie kolonniruumala maht ehk 2,5 ml. Kõik etapid olid puhverdatud 25 mM TRIS pH 8.0 puhvril. Laadisin kolonnile 2 mg proovi (kuivaine mass proovis), pesin kolonne ja elueerisin kahes etapis, kasutades 1 M NaCl ja 3 M NaCl puhverdatud lahuseid. Kogusin neli fraktsiooni: läbijooks, pesu, eluatsioon I ja eluatsioon II, mida testisin plaadikatses.

#### **2.2.8.2 Kationvahetus**

Kationvahetusel kasutasin tugevat kationvahetusmaatriksit SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). Pakkisin kolonne 0,5 ml maatriksit ja eelpesin kolonne 2,5 ml 30 mM KHPO<sub>4</sub> pH 5,8 puhvriga. Vajaminevate lahuste ruumala arvutamisel lähtusin reeglist, et piisav on viie kolonniruumala maht ehk 2,5 ml. Kõik etapid olid puhverdatud 30 mM KHPO<sub>4</sub> pH 5,8 puhvril. Laadisin kolonnile 2 mg proovi (kuivaine mass proovis), pesin kolonne ja elueerisin kahes etapis, kasutades 1 M NaCl ja 3 M NaCl puhverdatud lahuseid. Kogusin neli fraktsiooni: läbijooks, pesu, eluatsioon I ja eluatsioon II, mida testisin plaadikatses.

### **2.2.9 Autoinduktor-2 test**

Selleks, et testida, kas faktor X võiks olla autoinduktor-2 (AI-2), viisin läbi kaks erinevat eksperimenti. Esiteks uurisin, kas bakteritüved, kes ei suuda toota AI-2, suudavad toota FX-i. Teiseks uurisin puhastatud AI-2 mõju statsionaarsest faasist väljumisele.

#### **2.2.9.1 Testid erinevate bakteritüvedega**

Konditsioneerisin AI-2 tootmise suhtes defektsetel tüvedel söötme nagu kirjeldatud lõigus 2.2.2. Võrdlesin plaadikatses neid konditsioneeritud söötmeid BW25113 rakkudel konditsioneeritud söötmega, lisades neid BW25113 tüve statsionaarse faasi rakkudele.

#### **2.2.9.2 Testid puhta AI-2-ga**

Lisasin statsionaarses faasis rakkudele kas konditsioneeritud söödet, kontrollsöödet või kontrollsöödet, mis sisaldas 200  $\mu\text{M}$  AI-2 ning testisin plaadiformaadis.

### **2.2.10 Mass-spektromeetria (LC-MS)**

Mass-spektromeetrilised analüüsid viisid läbi Sergo Kasvandik ja Lauri Peil. Ained lahutati pöördfaasikromatograafia Agilent 1200 seeria *nanoflow* süsteemis (Agilent Technologies) ja analüüsiti LTQ Orbitrap XL mass-spektromeetriga (Thermo Electron, Bremen, Germany), kasutades nanoelektrospreiioonallikat (Proxeon, Odense, Denmark). Kõiki mõõtmisi kalibreeriti sisemise standardi vastu (*lock-mass*  $m/z$  445.12003).

Proovid lahustati 0.1% trifluoroäädikhappes, laaditi ränipõhisele emitterile (75  $\mu\text{m} \times 250$  mm, New Objective), mis sisaldas Repronil-Pur C18-AQ 3  $\mu\text{m}$  osakesi (Dr. Maisch, Germany). Proovi laadimiseks kasutati voolukiirust of 700 nl/min. Ained lahutati 30-minutilise 3-40% lahuse B gradiendis (A: 0.5% äädikhapet, B: 0.5% äädikhapet/80% atsetonitriili) voolukiirusel 200 nl/min. Ekueeritud ained pihustati otse LTQ Orbitrap mass-spektromeetrisse. Kapillaari temperatuur oli 200°C ja pihustusvoltaaž 2.2 kV. Iga prekursoriooni kohta salvestati kuni kolm MS/MS skaneeringut ja LTQ Orbitrap'i opereeriti andmetest sõltuvas töörežiimis. Prekursorioonide spektrite salvestamiseks kasutati järgmisi parameetreid:  $m/z$  50-1000,  $R = 60\,000$ . Kasutati 35% normaliseeritud kollisioonienergiat. Vaadeldi kõiki ioone sõltumata nende ionisatsioonistmest.

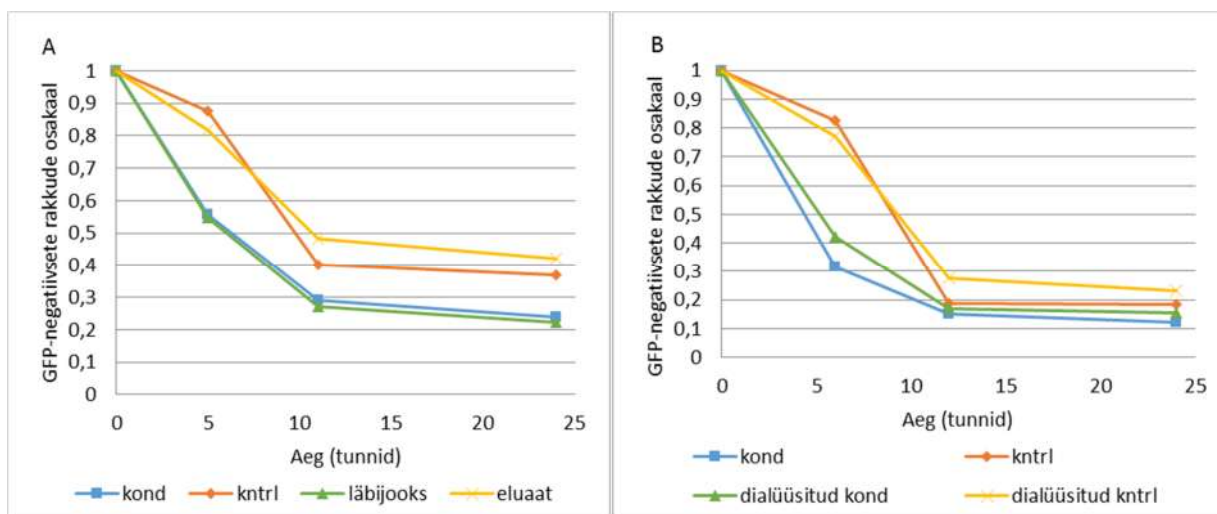
## 2.3 Tulemused

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida ja keemiliselt iseloomustada faktorit, mida kirjeldasin oma bakalaureusetöös (Tüür 2013) ja mis kiirendab *E. coli* rakkude väljumist statsionaarsest faasist. Faktor X-i olemasolu või puudumine tuvastati läbi selle mõju statsionaarse faasi rakkudele, jälgides testkultuuri virgumisdünaamikat. Selleks kasutati kaht erinevat katseskeemi: läbivoolutsütomeetriat (Joonis 4) ja fluoromeetriat (Joonis 5). Kahe meetodika põhiline vahe seisneb selles, et läbivoolutsütomeetra puhul mõõdetakse üksikute bakterite helenduvust, fluoromeetri puhul kogu kultuuri fluorestsentsi. Fluoromeetria võimaldab viia läbi korraga rohkem paralleelseid katseid ning saada tihedama aegrea ja väiksema mõõtmisvea.

Faktor X-i uurimiseks valmistasin konditsioneeritud ja kontrollsöötme nagu kirjeldatud materjali ja meetodika osas (Joonis 4). Kõik protseduurid viidi läbi konditsioneeritud ja kontrollsöötmega paralleelselt. Nende katsete puhul tuleb silmas pidada, et testkultuuri varieeruvuse tõttu ei ole võimalik erinevatest plaadikatsetest saadud tulemusi absoluutarvudes omavahel võrrelda, mistõttu on esitatud graafikutel ära toodud ainult ühest ja samast plaadikatsest pärit tulemused.

### 2.3.1 Faktor X on väike molekul

Esimeseks eksperimentiks, mis tundmatu aine keemilise olemuse kohta suhteliselt palju infot võib anda, on selle suuruse umbkaudne määramine. Selleks, et saada infot otsitava aine suuruse kohta, kasutasin lihtsat füüsilist lahutamismeetodit, *spin*-kolonni, mille filtri poorisuurus on 5000 Da. Tsentrifugisin kontroll- või konditsioneeritud söötme läbi kolonni ning kogusin kolonnist läbi jooksnud materjali (läbijooks). Pesin kolonni peale jäänud ained veega maha ja kogusin eluaadi. Testisin saadud lahuseid statsionaarse faasi rakkudel, kasutades positiivseks kontrolliks töötlemata söötmeid. Mõõtsin läbivoolutsütomeetria katses Crimson-positiivsete, GFP-negatiivsete rakkude hulga muutumist ehk rakkude väljumist statsionaarsest faasist. Joonis 6 paneelilt A on näha, et kolonnist läbi jooksnud konditsioneeritud sööde mõjub statsionaarse faasi rakkudele sarnaselt töötlemata konditsioneeritud söötmega, samas kui kolonnilt elueeritud fraktsioon toimib sarnaselt kontrolliga. Kogu aktiivsus jooksis läbi kolonni, mis tähendab, et otsitava aine mass jääb alla 5000 Da.



**Joonis 6. Faktor X suurus jääb 5000 ja 100 Da vahele.** Jooniste X-teljel on aeg tundides alates uuritavate lahuste lisamisest statsionaarse faasi rakkudele, Y-teljel on protsent GFP-negatiivsete ehk statsionaarses faasis rakkude algsest hulgast. Kond - konditsioneeritud sööde, kntrl - kontrollisööde. Paneelil A on statsionaarse faasi rakkudele lisatud kas kontroll- või konditsioneeritud söödet või 5000 Da poorisuurusega *spin*-kolonni läbijooksu või eluaati. Katse on tehtud ühes korduses. Paneelil B on statsionaarse faasi rakkudele lisatud kas kontrollisöödet või konditsioneeritud söödet või 100-500 Da poorisuuruse membraaniga dialüüsitud konditsioneeritud või kontrollisöödet. Katset tehti 5 kordust, esitatud on representatiivne näide.

Faktor X-i mõõtmete alumise piiri määramiseks dialüüsisin konditsioneeritud söödet väga väikese poorisuurusega dialüüsimembraaniga, mille poorisuurus jääb vahemikku 100 – 500 Da. Joonis 6 paneel B näitab, et konditsioneeritud söödet on võimalik selle membraani abil dialüüsida, nii et aktiivsus jääb dialüüsikotti. Faktor X-i suurus jääb seega vahemikku 100 – 5000 Da.

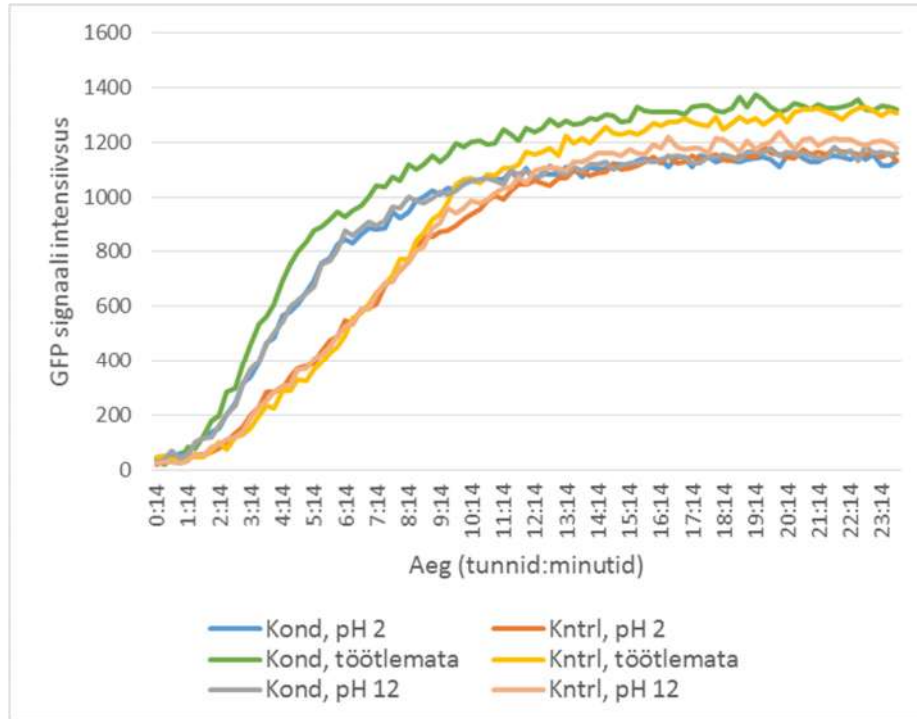
### 2.3.2 Faktor X on keemiliselt stabiilne

Sobiva puhastamisprotokolliga väljatöötamiseks on oluline uurida puhastatava aine stabiilsust, samuti annab see infot aineklassi kohta, kuhu see aine kuuluda võiks. Uurisin, kuidas mõjutab konditsioneeritud söötme aktiivsust kuumutamine ja pH-kõikumised.

#### 2.3.2.1 Faktor X ei kaota oma aktiivsust laias pH vahemikus

Selleks, et uurida happelise ja aluselise pH mõju faktor X-i aktiivsusele, viisin söötme pH soolhappega (HCl) pH 2-ni või naatriumhüdrosiidiga (NaOH) pH 12-ni. 15 minuti möödudes viisin pH vastavalt NaOH või HCl-ga tagasi pH 7 juurde. Testisin saadud lahuseid ja töötlemata

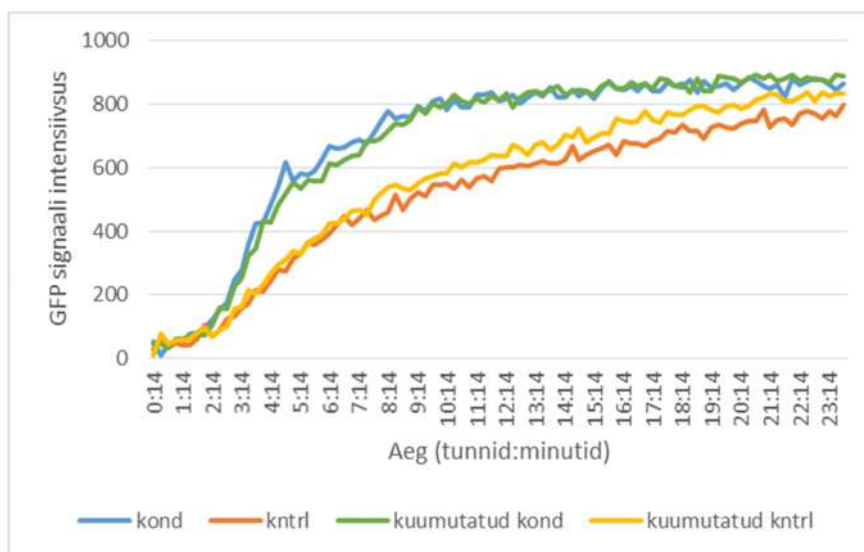
söötmeid plaadiformaadis katses fluoromeetris. Faktor X-i aktiivsus säilis nii aluselistatud kui hapestatud söötmes (Joonis 7).



**Joonis 7. Happeline ega aluseline keskkond ei mõjuta faktor X-i aktiivsust.** Testkultuuri sööde vahetati kas töötlemata kontroll- või konditsioneeritud söötme vastu või kontroll- või konditsioneeritud söötme vastu, mida oli kas hapestatud pH 2-ni või aluselistatud pH 12-ni ning viidud pH tagasi neutraalseks. Eksperiment viidi läbi ühel korral.

### 2.3.2.2 Faktor X talub kuumutamist

Kuumutamine annab infot selle kohta, mis ühendiklassi uuritav aine kuuluda võiks. Testisin, kuidas mõjutab temperatuur faktor X-i aktiivsust. Selleks kuumutasin uuritavaid lahuseid 10 minutit 100°C juures. Joonis 8 nähtub, et kuumutamine ei mõjuta faktor X-i aktiivsust.

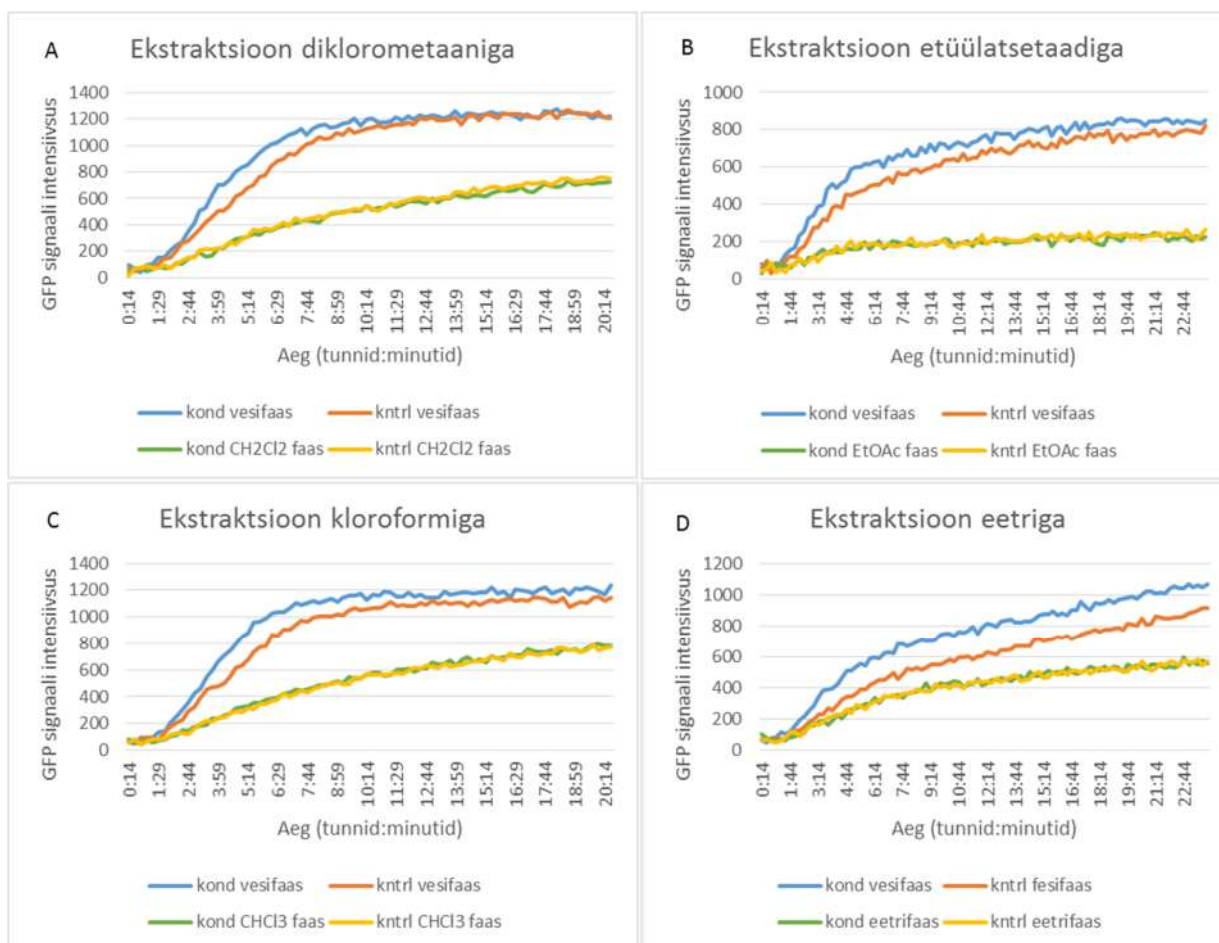


**Joonis 8. Kuumutamisel konditsioneeritud söötme aktiivsus ei vähene.** Testkultuuri rakkude sööde vahetati kas kontroll- või konditsioneeritud söötme vastu, mida oli kuumutatud 10 minutit 100°C juures või mida ei olnud töödeldud. Eksperiment viidi läbi ühel korral.

Lisaks sellele, et faktor X talub hästi pH ja temperatuurikõikumisi, talub see ka korduvat külmutamist ja sulatamist ning ei lendu lüofiliseerimisel ega rootorvakumeerimisel (tulemused allpool).

### 2.3.3 Faktor X-i ei saa vesilahusest mittepolaarsete lahustitega ekstraheerida

Enamus praeguseks teadaolevaid bakterite signaalmolekule on söötimest eraldatud vees mittelahustuva orgaanilise solvendiga ekstraheerides. Proovisin faktor X-i puhastamiseks samuti erinevaid hüdrofoobseid solvente. Ekstraheerisin konditsioneeritud ja kontrollsöödet diklorometaaniga (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (Joonis 9A), etüülatsetaadiga (EtOAc) (Joonis 9B), kloroformiga (CHCl<sub>3</sub>) (Joonis 9C) või eetriga (Joonis 9D). Kõikide ekstraksioonide korral jäi faktor X vesifaasi.

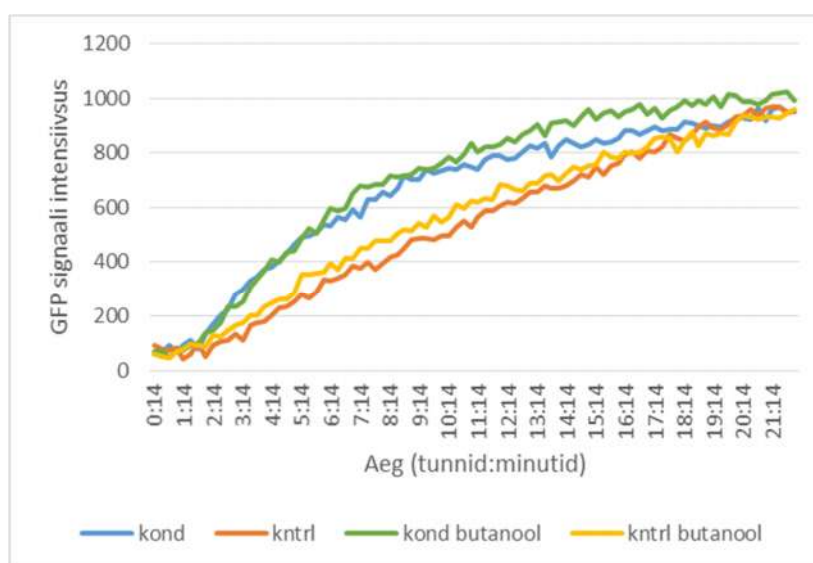


**Joonis 9.** Faktor X ei ekstraheeru mittepolaarsete lahustitega ning aktiivsus jääb vesifaasi. Ekstraheerisin konditsioneeritud ja kontrollsöödet kas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (paneel A), EtOAc (paneel B),  $\text{CHCl}_3$  (paneel C) või eetriga (paneel D), kuivatasin orgaanilise solvendifaasi ja vesifaasi, lahustasin kuivaine vees ja testisin lahuseid testkultuuri rakkudel. Kõikidel paneelidel on jälgitav FX mõju vesifaasis, kuid mitte orgaanilise solvendi faasis.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -ga on katset korratud kolm korda, EtOAc-ga viis korda,  $\text{CHCl}_3$ -ga ja eetriga üks kord. Esitatud on representatiivsed näited.

### 2.3.4 Faktor X-i saab ekstraheerida lüofiliseeritud söötmetest erinevate alkoholidega

Kuna vesilahust (söödet) ei saa veega segunevate orgaaniliste solventidega otse ekstraheerida, lüofiliseerisin söötme ning ekstraheerisin alles jäänud tahket materjali erinevate alkoholidega. Testisin lühema süsinikahelaga alkohole nagu metanool, isopropanool ja butanool, et näha, kas otsitav faktor on võimeline lahustuma veest vähem polaarses lahustis. Kõik loetletud alkoholid on polaarsed ja hüdrofiilsed, kuid nõrgemalt kui vesi ise.

Lüofiliseerisin klaasviaalides 5 ml kumbagi söödet ning ekstraheerisin sama söödet järjestikku kõikide alkoholidega alates kõige hüdrofoobsemast ehk butanoolist. Lisasin sademele 1 ml butanooli ja ekstraheerisin tund aega loksutil. Eemaldas sademelt butanooli, kuivatasin selle rootorevaporatoris ja lahustasin kuiva materjali vees. Kordasin ekstraktsioone samal moel isopropanooli ja metanooliga. Katse tulemused näitasid, et faktor X lahustub kõikides testitud alkoholides. Joonis 10 võrdlen ekstraheerimata konditsioneeritud ja kontrollsöötme aktiivsusi butanoolifraktsioonide aktiivsusega, sest butanool on testitud alkoholidest kõige pikema ahelaga ja kõige hüdrofoobsem, seega edasisteks katseteks kõige sobivam.



**Joonis 10. Faktor X-i saab ekstraheerida tahkest faasist butanooliga.** Statsionaarse faasi rakke on inkubeeritud värskes söötmes, kuhu on lisatud butanooli ekstrakti kontroll (kntr butanool) või konditsioneeritud söötme (kond butanool). Katse kontrollideks on kasutatud ekstraheerimata kontroll- või konditsioneeritud söödet. Katset on läbi viidud kaheksal korral, esitatud on representatiivne näide.

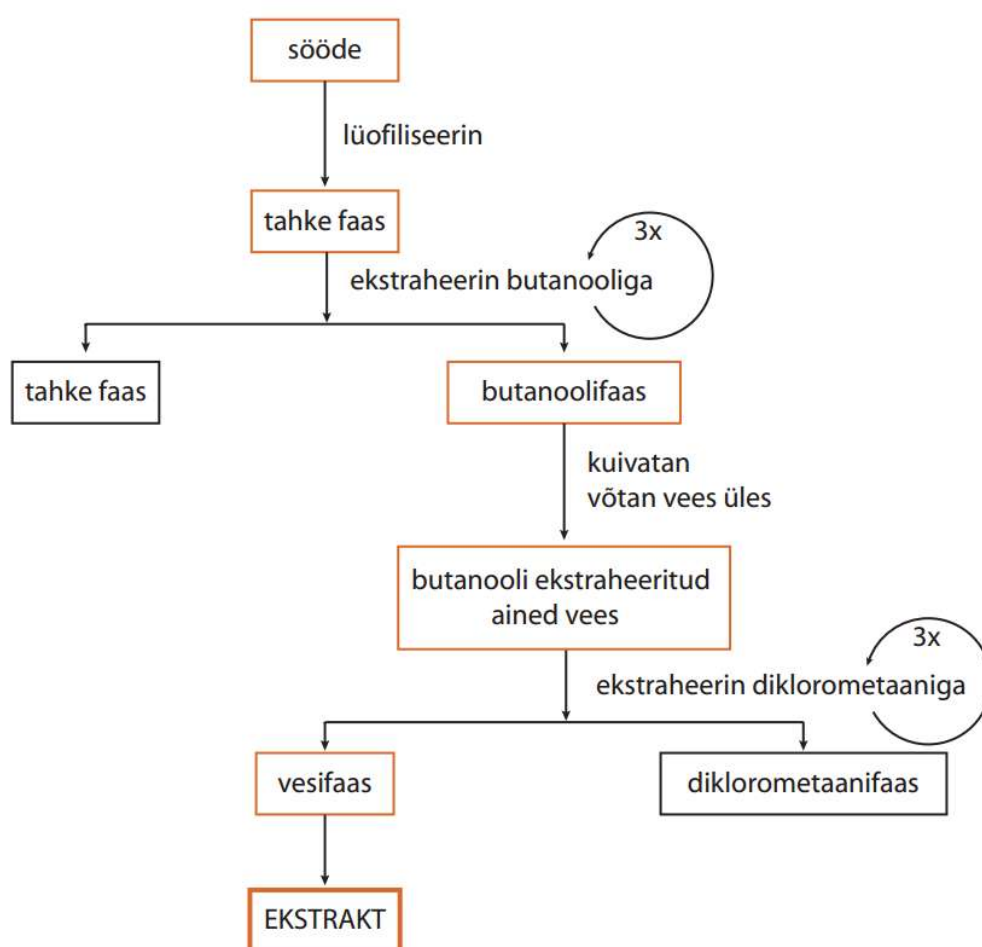
### 2.3.5 Metoodika faktor X-i esmaseks puhastamiseks

Tuginedes ülaltoodud tulemustele, töötasin välja keemiliste ekstraktsioonide skeemi, mis võimaldaks faktor X-i puhastada, vabanedes maksimaalsest hulgast lisaainetest. Puhastusskeem sisaldab ekstraktsioone butanooli ja diklorometaaniga ja on etapiviisiliselt kirjeldatud Joonis 11.

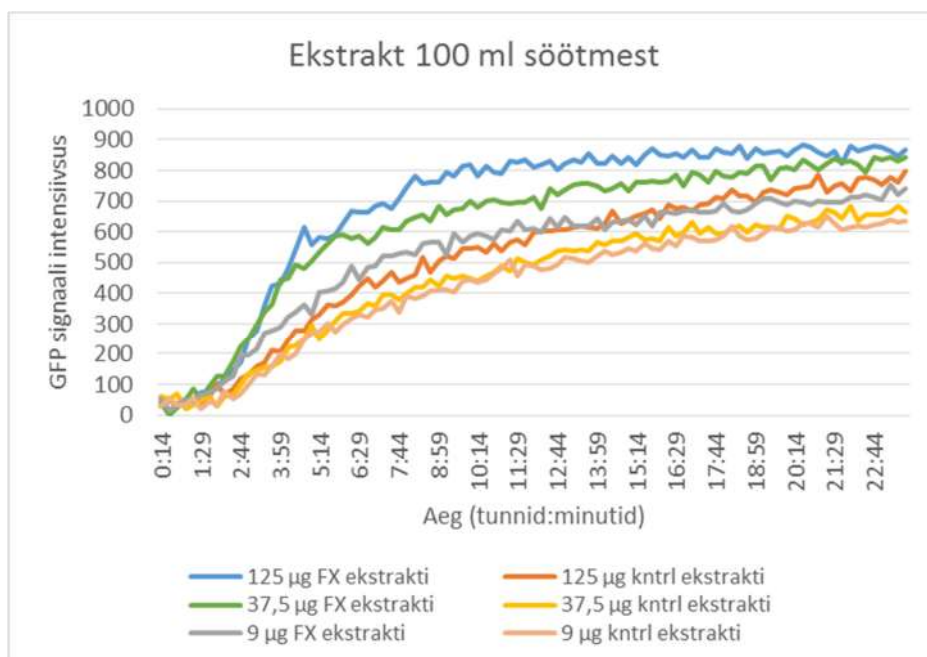
Esimese etapina vabanen söötmes sisalduvatest sooladest ja muudest väga hüdrofiilsetest molekulidest butanooliekstraktsiooni abil. Teise etapina ekstraheerin butanoolis lahustunud ainete seast välja kõige hüdrofoobsemad ained. Tulemuseks on soolavaba, faktor X-i suhtes rikastatud

proov, millega on võimalik edasi minna aparatuuridele, kus proovi madal soolasisaldus on kriitilise tähtsusega (näiteks mass-spektromeetria).

Pärast söötme ekstraheerimist eeltoodud puhastuskeemi abil testisin ekstrakti aktiivsust, lisades statsionaarse faasi rakkudele erinevates kontsentratsioonides konditsioneeritud või kontrollsöötme ekstrakti (Joonis 12). Vahe konditsioneeritud ja kontrollsöötme ekstraktide vahel oli nähtav ka kõige madalamal testitud kontsentratsioonil (lähtunud on pärast ekstraktsiooni alles jäänud kuivaine massist).



**Joonis 11. Ekstraktsiooniskeem faktor X-i esmaseks puhastamiseks.** Oranžides kastides olevad materjalid sisaldavad faktor X-i. Kõigepealt lüofiliseerin konditsioneeritud või kontrollsöötme, ekstraheerin tahket faasi butanooliga, kuivatan butanoolifraktsiooni, võtan tahke aine vees üles ja ekstraheerin seda diklorometaaniga. Seejärel kuivatan vesifaasi ning võtan selle vees üles. Saadud lahust nimetan tekstis ekstraktiks.



Joonis 12. Eeltoodud skeemi (

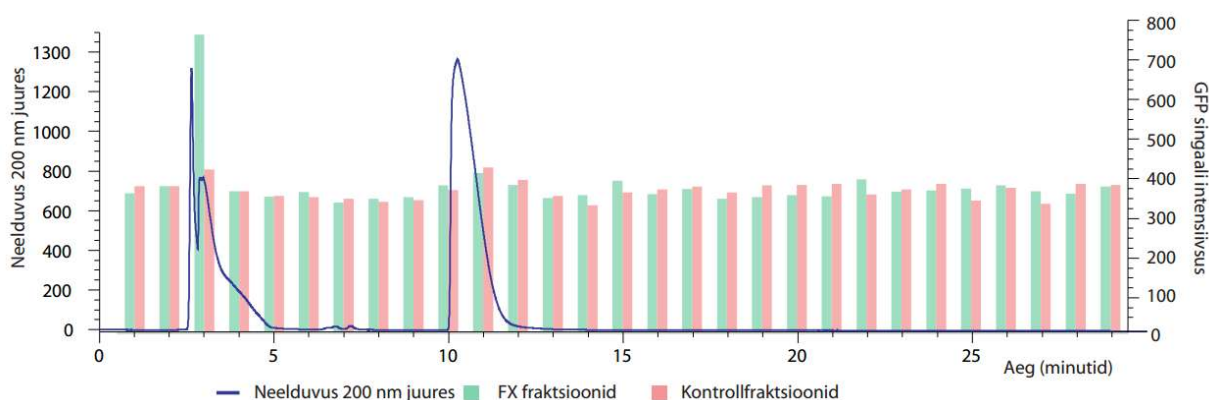
Joonis 11. Ekstraktsiooniskeem faktor X-i esmaseks puhastamiseks. Oranžides kastides olevad materjalid sisaldavad faktor X-i. Kõigepealt lüofiliseerin konditsioneeritud või kontrollsöötme, ekstraheerin tahket faasi butanooliga, kuivatan butanoolifraktsiooni, võtan tahke aine vees üles ja ekstraheerin seda diklorometaaniga. Seejärel kuivatan vesifaasi ning võtan selle vees üles. Saadud lahust nimetan tekstis ekstraktiks.

11) järgi valmistatud ekstraktide testimine. Statsionaarse faasi rakkudele lisati koos värskes söötme erinev kogus konditsioneeritud või kontrollsöötme valmistatud ekstrakti. Vahe kontrolli ja FX sisaldava ekstrakti vahel on nähtav isegi kõige väiksema testitud ainekoguse korral - ekstrakti saab väga tugevalt lahjendada.

### 2.3.6 Faktor X ei seondu pöördfaasi C18 kolonniga

Faktor X-i ei saa ekstraheerida hüdrofoobsete lahustitega, kuid see on piisavalt mittepolaarne, et lahustuda butanoolis. Seetõttu otsustasin proovida faktor X-i puhastamist pöördfaasi C18 kolonniga kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) formaadis, kuna seda tüüpi kolonniga interakteeruvad ka minimaalselt hüdrofoobsed ained. Laadisin kolonnile 0,5 mg eelmises punktis kirjeldatud viisil puhastatud proovi ning voolutasin kolonni kiirusel 1 ml/min 30 minutit isokraatiliselt vees, misjärel elueerisin kolonni 15 minuti jooksul 80% metanooliga. Kogusin fraktsioonid minuti kaupa, kuivatasin need, lahustasin vees ning testisin statsionaarse faasi

rakkudel. Joonis 13 on sinise joonega tähistatud faktor X-i sisaldava proovi neelduvus 200 nm juures. Tulbad tähistavad ärkamiskatse tulemusi – bakterikultuuri GFP-signaali intensiivsust 10. tunnil pärast uuritavate lahuste lisamist statsionaarse faasi rakkudele. Faktor X-i aktiivsus (rohelised tulbad) oli tuvastatav ainult ühes fraktsioonis, mis väljus kolonnist 3. minutil. Arvestades, et kasutatud kolonni ruumala on 2,5 ml, võib öelda, et faktor X jäi kolonni läbijooksu ning ei seondunud C-18 kolonniga.



**Joonis 13. Faktor X ei seonu C-18 kolonnile.** Laadisin C-18 kolonnile 0,5 mg proovi ja voolutasin kolonni isokraatiliselt kiirusega 1 ml/min. Mõõtsin lahuse neelduvuse 200 nm juures. Joonisel on kujutatud ainult faktor X-i sisaldava proovi neelduvus. Kogusin minuti kaupa fraktsioonid, kuivatasin ning lahustasin vees. Testisin fraktsioonide aktiivsust statsionaarse faasi rakkudel plaadiformaadis katses. Tulbad tähistavad rakukultuuri GFP signaali intensiivsust 10. kasvutunnil. Faktor X on tuvastatav ainult ühes fraktsioonis. Eksperiment viidi läbi viis korda, esitatud on representatiivne näide.

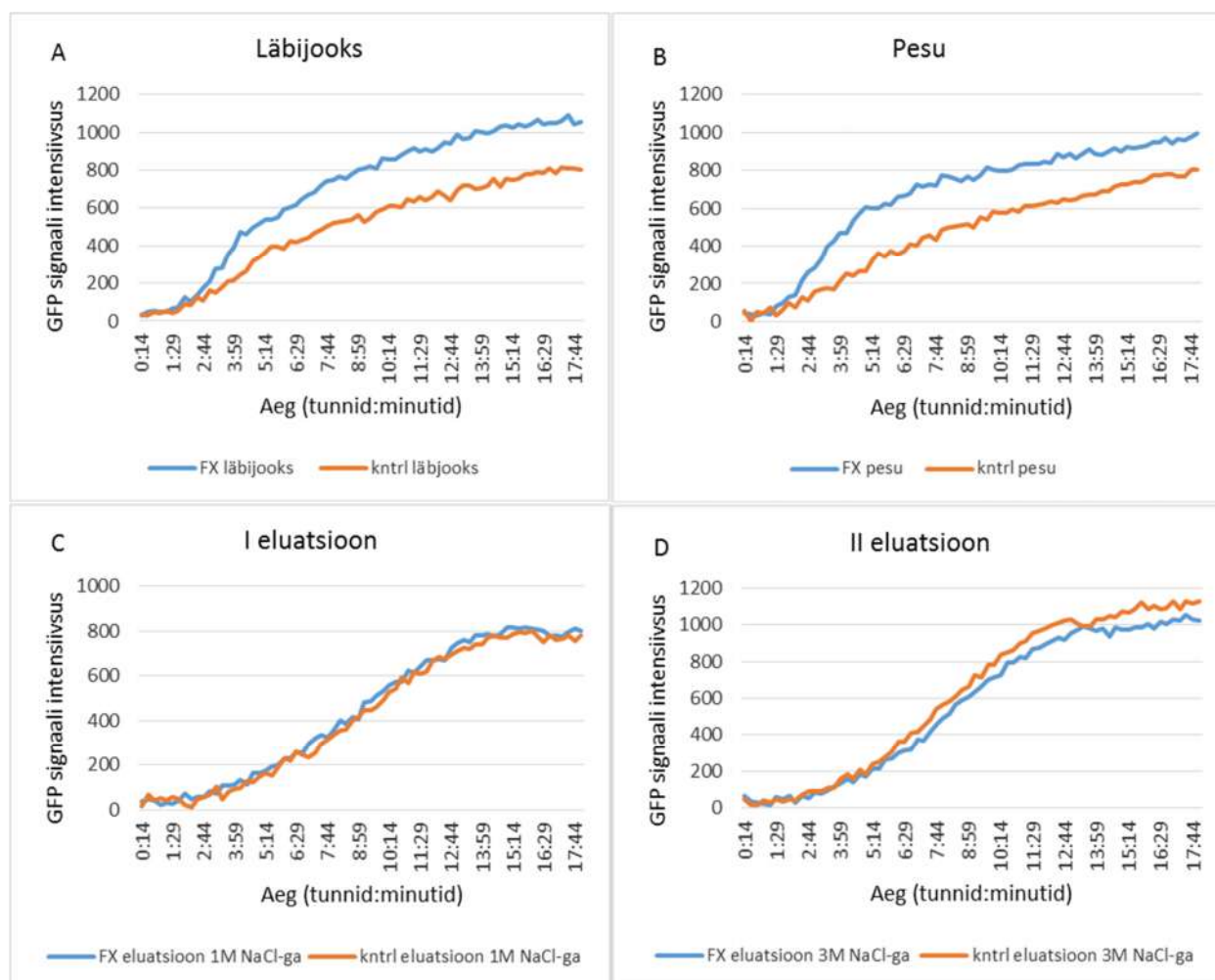
### 2.3.7 Faktor X ei seonu tugeva katioon- ega anioonvahetusmaatriksiga.

Kuna faktor X pöördfaasikolonniga ei seondunud, otsustasin proovida faktor X-i lahutamist ioonvahetusmaatriksite abil. Kuna tegu on tundmatu ainega, mille isoelektrilise punkti kohta info puudub, siis kasutasin puhverlahuseid, mille pH ei erinenud neutraalsest väga palju. Kasutatud kolonnid toimisid gravitatsiooni jõul.

#### 2.3.7.1 Faktor X ei seonu anioonvahetiga

Pakkisin anioonvahetuskolonnile 0,5 ml Q-Sepharose Fast Flow tugeva anioonvahetusmaatriksit ja kandsin peale 2 mg kontroll- või FX-ekstrakti. Kõik lahused olid puhverdatud 25 mM TRIS pH 8,0 puhvril. Pärast proovi pealekandmist kogusin kokku läbijooksu, pesin kolonni puhvriga ja kogusin pesulahuse. Elueerisin kolonni kahes astmes, 1M ja 3M NaCl puhverdatud lahusega, kogusin eluatsioonifraktsioonid ning testisin neis faktor X-i sisaldust. Aktiivsus oli nii

anioonvahetuskoloni läbijooksus (Joonis 14A) kui pesufraktsioonis (Joonis 14B), samas kui eluatsioonifraktsioonides (Joonis 14C ja D) aktiivsus tuvastatav ei olnud. Faktor X-il on anioonvahetiga ilmselt nõrk interaktsioon, kuid mitte piisav, et võimaldada selle puhastamist.

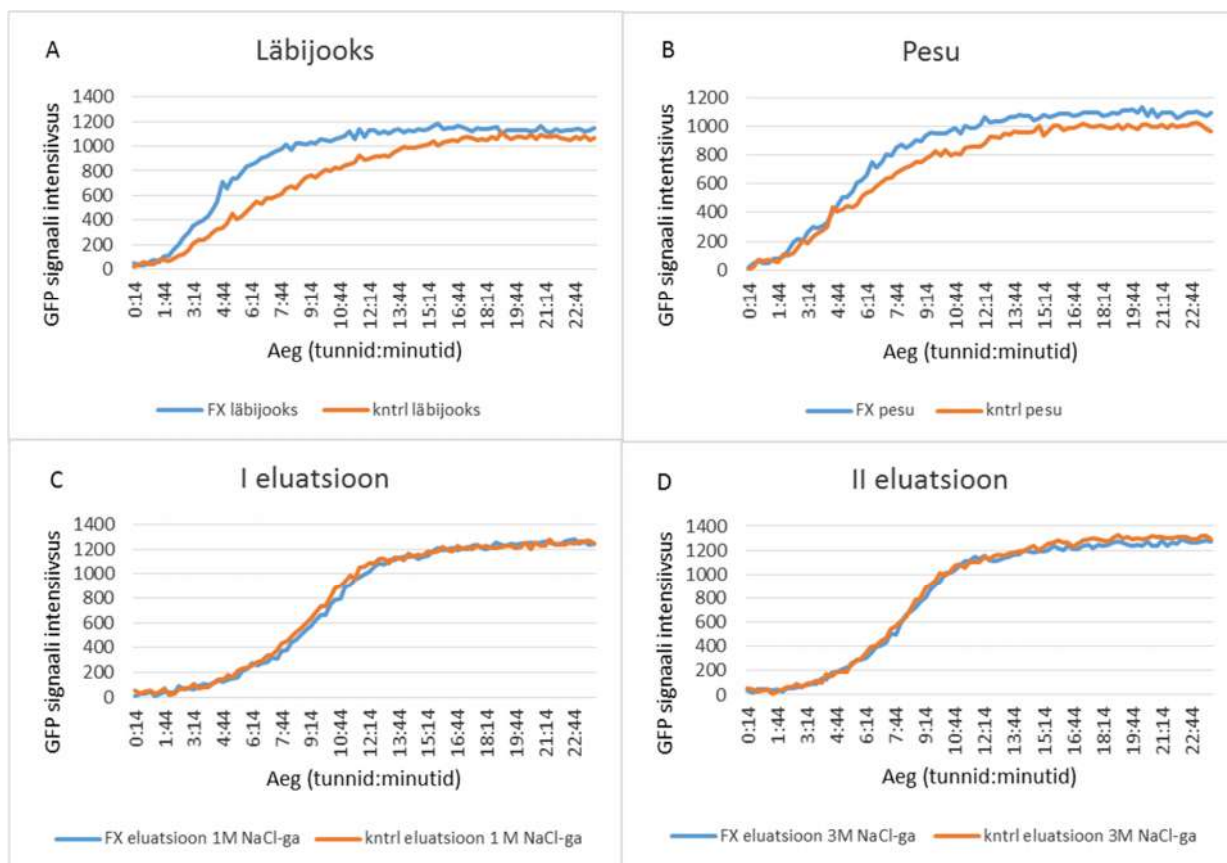


**Joonis 14. Faktor X ei seendu anioonvahetiga.** Statsionaarses faasis rakkudele lisati anioonvahetusmaatriksile kantud kas FX ekstrakti või kontrollekstrakti läbivoolu (paneel A), pesulahust (paneel B), 1M NaCl-ga elueeritud fraktsiooni (paneel C) või 3M NaCl-ga elueeritud fraktsiooni (paneel D) ja mõõdeti rakukultuuri GFP signaali. FX mõju oli selgelt jälgitav nii koloni läbijooksu kui pesufraktsioonis, kuid puudus eluatsioonifraktsioonides. Eksperiment viidi läbi üks kord.

### 2.3.7.2 Faktor X ei seendu katioonvahetiga

Pakkisin katioonvahetuskoloni 0,5 ml SP-Sepharose Fast Flow tugeva katioonvahetusmaatriksiga ja kandsin peale 2 mg kontroll- või FX-ekstrakti. Kõik lahused olid puhverdatud 30 mM KHPO<sub>4</sub> pH 5,8 puhvrts. Kogusin pärast proovi pealekandmist kokku

läbijooksu, pesin kolonni puhvriga ja kogusin pesulahuse. Elueerisin kolonni kahes astmes, 1M ja 3M NaCl puhverdatud lahusega, kogusin eluatsioonifraktsioonid ning testisin neis faktor X-i sisaldust. Aktiivsus oli nii kationvahetuskolonne läbijooksus (Joonis 15A) kui pesufraktsioonis (Joonis 15B). Eluatsioonifraktsioonides (Joonis 15C ja D) aktiivsus tuvastatav ei olnud. Seega faktor X-i ei interakteeru kationvahetiga.



**Joonis 15. Faktor X ei seodu kationvahetiga.** Statsionaarses faasis rakkudele lisati kas kationvahetusmaatriksile kantud FX ekstrakti või kontrollekstrakti läbivoolu (paneel A), pesulahust (paneel B), 1M NaCl-ga elueeritud fraktsiooni (paneel C) või 3M NaCl-ga elueeritud fraktsiooni (paneel D) ja mõõdeti rakukultuuri GFP signaali. FX mõju oli selgelt jälgitav nii kolonne läbijooksu kui pesufraktsioonis, kuid puudus eluatsioonifraktsioonides. Eksperiment viidi läbi üks kord.

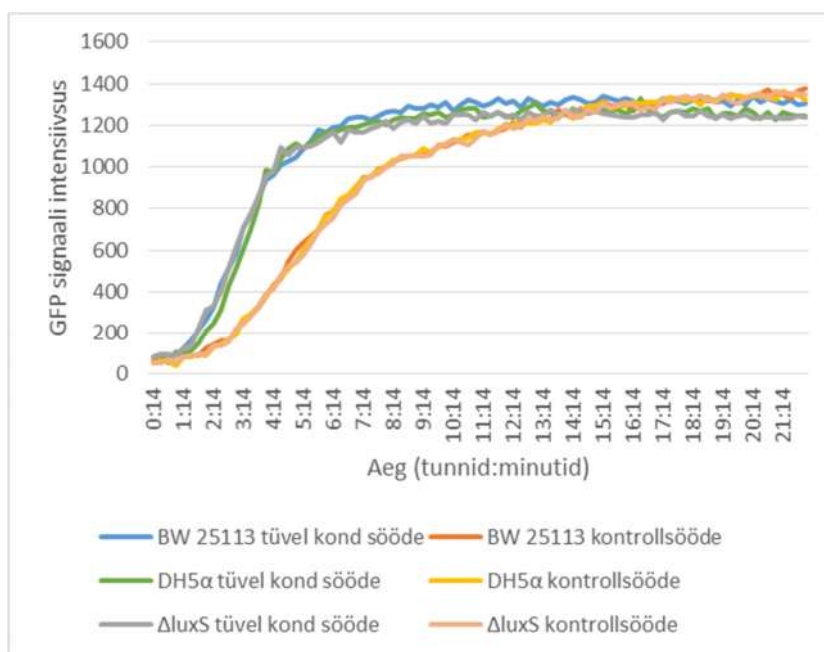
### 2.3.8 Faktor X ei ole autoinduktor 2

Praeguseks on teada ainult üks bakterite poolt kasutatav signaalmolekul, mis on hüdrofiilne ja mida ei saanud bakterisöötimest hüdrofoobseid lahusteid kasutades eraldada – autoinduktor 2 (AI-2). Testisin, kas faktor X võiks olla AI-2 kahel erineval moel. Esiteks uurisin, kas bakteritüved,

kes ei ole võimelised AI-2 tootma, suudavad toota FX-i. Teiseks lisasin statsionaarse faasi rakkudele puhast AI-2, et näha, kas sellel on FX-ga sarnane mõju.

### 2.3.8.1 Tüved, kes ei suuda toota AI-2, suudavad toota ja tajuda FX-i.

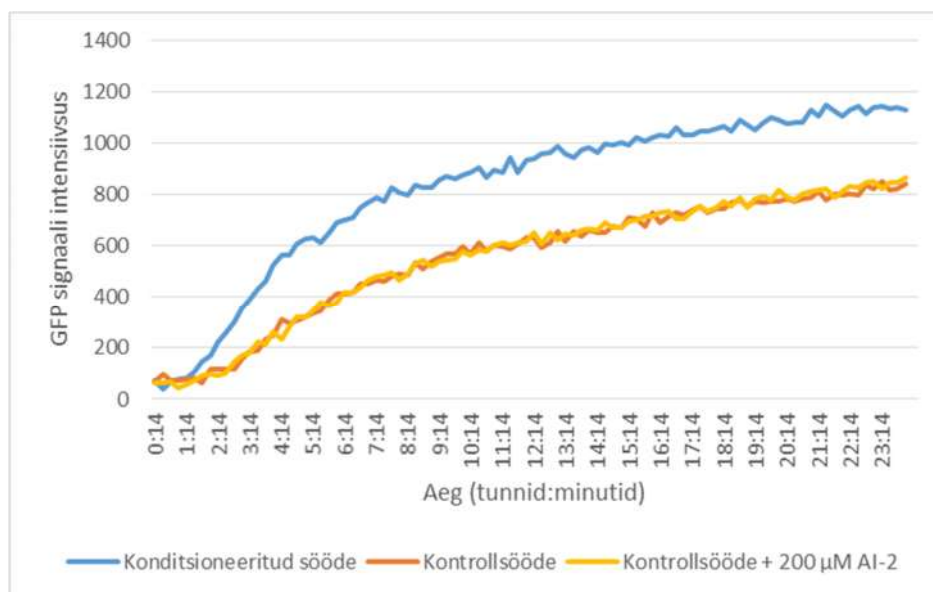
Kirjanduse andmetel on AI-2 signaali tootmiseks vaja AI-2 süntaasi, mida kodeerib geen *luxS*. Testimaks, kas AI-2 ja FX võiksid olla üks ja seesama aine, kasutasin kahte bakteritüve, kes AI-2 toota ei suuda: K12 BW25113  $\Delta luxS$  Keio kollektsioonist ja DH5 $\alpha$ . Konditsioneerisin kummalgi tüvel söötme ja võrdlesin neid BW25113 tüvel konditsioneeritud söötme efektiga BW25113 statsionaarse faasi rakkudel. Selgus, et AI-2 tootmise suhtes defektsed tüved olid võimelised tootma FX-i (Joonis 16).



**Joonis 16. FX-i toodavad ka tüved, kes ei tooda AI-2.** Testisin BW25113 rakkudel erinevatel *E. coli* tüvedel konditsioneeritud söötmeid. AI-2 suhtes defektsetel tüvedel ( $\Delta luxS$ , DH5 $\alpha$ ) konditsioneeritud söötmed toimisid võrdselt hästi BW25113 tüvel konditsioneeritud söötmega. Katset viidi läbi kaks korda.

### 2.3.8.2 Puhtal AI-2-l ei ole FX-ga sarnast aktiivsust.

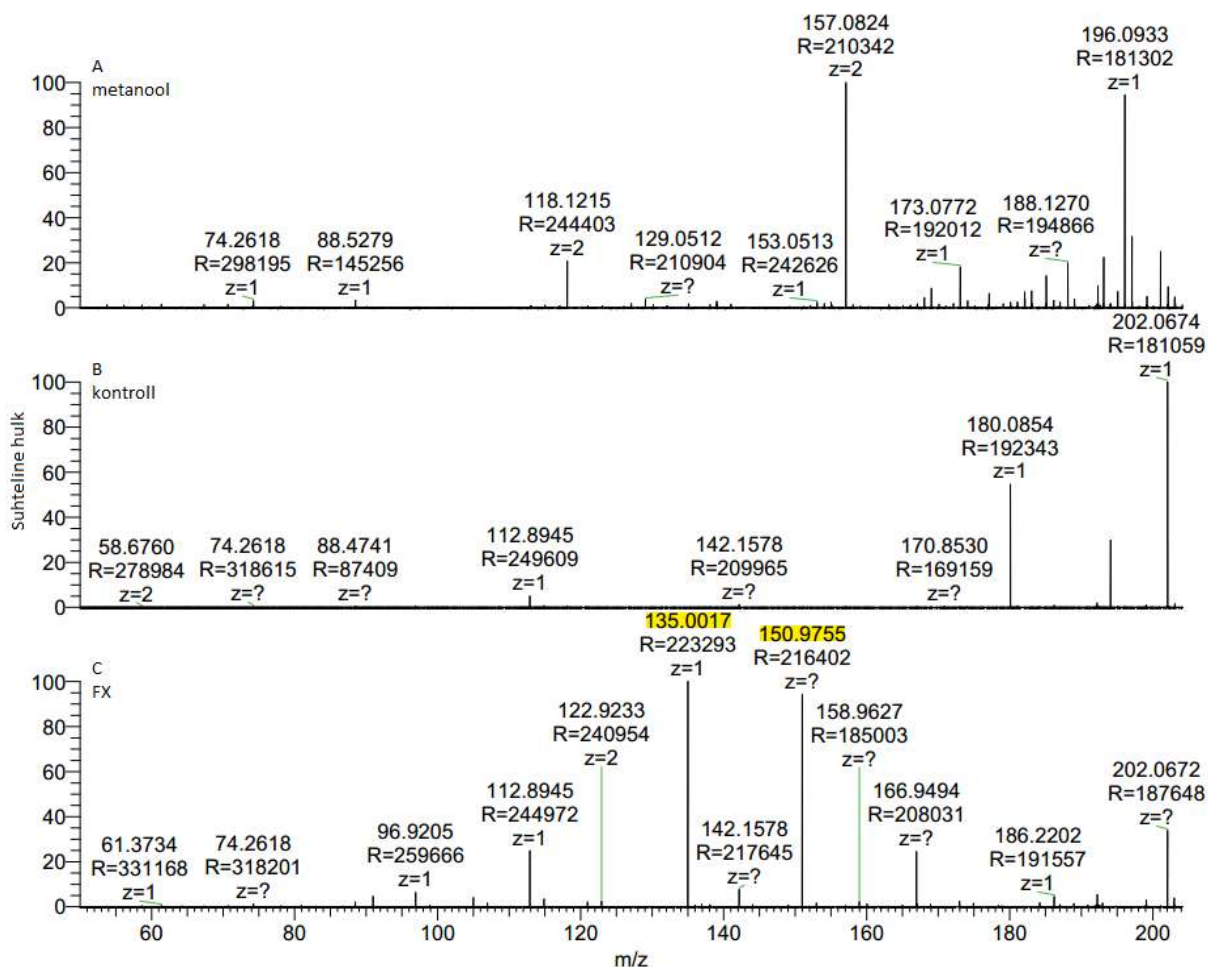
Testisin, kas FX ja AI-2 võiksid olla üks ja seesama molekul, lisades statsionaarse faasi rakkudele erinevates kontsentratsioonides puhast AI-2. Statsionaarse faasi rakukultuuris, kuhu lisasin AI-2, ei aktiveerunud bakterid kiiremini kui kontrollgrupis, järelikult ei ole AI-2 faktor X-ile sarnast aktiivsust (joonis 17).



Joonis 17. AI-2 ei oma FX-ga sarnast efekti. Lisasin statsionaarses faasis rakkudele kas konditsioneeritud söödet, kontrollsöödet või AI-2 sisaldavat kontrollsöödet. AI-2 ei mõjuta statsionaarse faasi rakkude kasvamahakkamist. Katse viidi läbi ühel korral.

### 2.3.9 HPLC C18 pöördfaasikolonnil 3. minutil läbi jooksnud fraktsioonide mass-spektromeetiline (MS) võrdlus

Ehkki FX ei seondunud C18 kolonniga ning seda ei ole võimalik selle kolonni abil fraktsioneerida, on alust arvata, et selline töötlus aitab vabaneda märkimisväärsest hulgast lisaainetest, mis ekstraktis sisalduvad. Tänu sellele, et soovitasin HPLC C18 kolonni puhtas vees, oli võimalik saada soolavaba fraktsioon, mida sai uurida mass-spektromeetria (MS) abil. MS eksperimendid viisid läbi Sergo Kasvandik ja Lauri Peil. Joonis 18 paneelil C on esitatud FX proovis sisalduvad molekulmassid ning võrdluseks on esitatud kontrollproovis sisalduvad molekulmassid joonisel 18 paneelil B ja lahustis (metanoolis) sisalduvad molekulmassid joonisel 18 paneelil A. MS uuringuid viidi läbi kahest HPLC eksperimendist saadud materjaliga. Saadi kaks korduvat, FX proovile unikaalset piiki massi-laengu suhtega 135,002 ja 150,975. Muude parameetrite alusel on nende ionide laeng 1, nii et tegemist on tegelike täppismassidega. Molekulmassipõhised otsingud erinevatest metaboliitide andmebaasidest ei viinud ühegi kandidaatmolekulini.



Joonis 18. HPLC C18 pöördfaasikolonist 3. minutil läbi jooksnud FX sisaldav proov sisaldab kaht unikaalse molekulmassiga ainet. Paneelil A on lahustis (metanoolis) sisalduvate ainete piigid, paneelil B kontrollproovis sisalduvate ainete piigid ja paneelil C FX sisaldavas proovis tuvastatud ainete piigid. Kahe sõltumatu eksperimendi käigus leiti kaks FX proovile unikaalset piiki, mille massid on joonisel kollase värviga esile toodud. Joonisel on esitatud andmed ühest katsest.

## 2.4 Arutelu

Uurisin oma magistritöös *E. coli* tundmatut kasvufaktorit, faktor X-i. Statsionaarsest faasist väljumisel eristub *E. coli* rakukultuuris selgelt kaks alampopulatsiooni: rakud, kes reageerivad kiiresti ja rakud, kes püsivad kauem soikunud seisundis. Kiiremini kasvama hakkav rakupopulatsioon sekreteerib kasvukeskkonda ainet, mis soodustab ülejäänud populatsiooni väljumist statsionaarsest faasist. Teistel liikidel on varasemalt kirjeldatud sarnase funktsiooniga faktoreid, kuid *E. coli*'s on see üks esimesi kirjeldatud kasvufaktoreid.

*B. subtilis*'el on kirjeldatud muropeptiidide mõju spooride idanemisele (Shah et al. 2008) ning *M. xanthus*'e ja mükobakterite puhul aktiveerub rakkude metabolism vastusena pikomolaarses kontsentratsioonis Rpf valgule (Mukamolova et al. 1998). Pole välistatud, et need toimivad sama mehhanismi kaudu: *B. subtilis* on Gram-positiivne bakter, kes ei suuda oma rakukesta efektiivselt taaskasutada, mistõttu koguneb tema elutegevuse käigus keskkonda sporuleerivatele Gram-positiivsetele ja Gram-negatiivsetele bakteritele iseloomulikke muropeptiide (Shah et al. 2008). Rpf lüüsib peptidoglükaani ja on spekuleeritud, et selle käigus võivad tekkida muuhulgas ka muropeptiidsed fragmendid, mis läbi Rpf oma mõju avaldab (Mukamolova et al. 1998). Shah ja Dworkin leidsid, et *B. subtilis*'e spoorid idanevad vastusena ka *E. coli* kasutatud söötmele, mis on tingitud nende muropeptiidide sarnasest ehitusest (Shah et al. 2008). Võimalik, et *E. coli* kasutab sarnast mehhanismi.

Olgugi et *B. subtilis* ja *E. coli* kasutavad peptidoglükaani ristsidumiseks sarnaseid muropeptiide, ei ole faktor X puhas muropeptiid, sest erinevalt muropeptiididest ei ole faktor X-i võimalik C18 pöördfaasikolonniga puhastada. Tuginedes MS abil saadud tulemustele, võib öelda, et faktor X on muropeptiidist tõenäoliselt ka palju väiksem. Sellegipoolest võib olla, et faktor X on mingi väike rakukestakomponent.

Kindlasti ei ole faktor X Rpf ega mõni muu valk, kuna ta on selleks liiga väike ning keemiliselt vastupidav. pH- ja temperatuurikõikumised denatureerivad valkude sekundaarstruktuuri ja inaktiveerivad need, kuid faktor X oli söötme hapestamise, aluselise või kuumutamise järgselt sama aktiivne kui enne. Faktor X-i valgulise struktuuri vastu räägib seegi, et see ei seondunud C18 pöördfaasikolonniga. Ained, mis C18 kolonniga seonduvad, sisaldavad hüdrofoobseid osi, näiteks hüdrofoobseid aminohappeid. Mida pikem valk, seda tõenäolisemalt

sisaldab see mõnda apolaarset aminohappejääki ja seda kauem kulub sellel aega kolonnist väljumiseks. Faktor X väljus aga kolonni tühiruumalas, mistõttu see ei saa olla valk.

Faktor X ei saa olla ka ükski hüdrofoobse struktuuriga signaalmolekulidest (AHL, DSF, PQS, püroon või mõni muu). Kõik teadaolevad hüdrofoobse struktuuriga signaalmolekulid on bakterisöötimest välja puhastatud keemilisel ekstraktsioonil mõne hüdrofoobse orgaanilise solvendiga (nt EtOAc, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>) ja ekstrakti täiendaval puhastamisel pöördfaasikromatograafia abil. Kuna FX ei lahustu hüdrofoobsetes orgaanilistes solventides ega seondu C18 pöördfaasikolonnile, võib kindalt öelda, et see ei ole ükski teadaolevatest hüdrofoobsetest signaalmolekulidest.

Faktor X on hüdrofiilne aine. Kuna hüdrofiilse struktuuriga signaalmolekule on praeguseks teada vaid üks, otsustasin proovida, kas see võiks olla sama aine mis faktor X. Kasutasin selleks kaht moodust. Esiteks testisin, kas bakteritüved, kes ei suuda toota AI-2 on võimelised sünteesima FX-i. Eksperiment näitas üheselt, et AI-2 tootmise suhtes defektsetel tüvedel konditsioneeritud söötmed sisaldavad faktor X-i. Teiseks testisin, kas AI-2 on FX-ga sarnane mõju. AI-2 lisamine bakterisöötmesse ei mõjutanud stacionaarse faasi rakkude aktiveerumise kiirust. Nende eksperimentide tulemused näitavad üheselt, et FX ja AI-2 ei ole üks ja seesama aine.

2001. aastal kirjeldasid Weichart ja Kell tundmatut faktorit, mis kiirendas *E. coli* statsionaarse faasi rakkude kasvamahakkamist. Nad proovisid seda aktiivsust mitmesuguste erinevate meetodite abil puhastada, kuid tulutult. Ka nende kirjeldatud faktori aktiivsus säilis kuumutamisel ja talus pH-kõikumisi, seda ei saanud söötimest etüülatsetaadi abil ekstraheerida ning see ei seondunudioonvahetitega. Neil ei õnnestunud aktiivset ainet lahutada ka HPLC abil, kus kasutasid väga erinevat tüüpi kolonne. Siiski väidavad nad, et otsitav aktiivsus elueerus kõikidelt kasutatud kolonnidelt samal ajal uratsiiliga. Kuna eeltoodud artiklis räägitakse aine elueerimisest, oletan ma, et erinevalt minu kirjeldatud aimest seondus nende kirjeldatud aktiivsus kolonniga, mis viitab pigem sellele, et tegu ei ole siiski ühe ja sama ainega. Paraku ei ole võimalik nende katseid korrata, kuna nad ei kirjelda kasutatud tingimusi piisavalt täpselt (millist pH-d kasutati, millal aktiivsus elueerus). (Weichart & Kell 2001)

Weicharti ja Kelli töö on tänuväärne seetõttu, et nad testisid väga paljude erinevate ainete (vitamiinide, puriinide ja pürimidiinide, aminohapete ja toleks ajaks teada olnud signaalmolekulide) mõju *E. coli* statsionaarsest faasist väljumise kiirusele, kuid neil ei

õnnestunud leida otsitavale sarnase aktiivsusega ainet (Weichart & Kell 2001). Võib arvata, et ained, mis nende katsesüsteemis bakterite kasvukiirusele mõju ei avaldanud, ei mõjuta seda tõenäoliselt ka minu katsesüsteemis. Nende eksperimendid on tehtud ajal, mil AI-2 struktuur ei olnud veel teada, mistõttu ei saanud nad seda ka testida, kuid tuginedes magistritöö raames tehtud katsetele arvan ma, et AI-2 ei olnud see, mida nad otsisid.

Weichart ja Kell kasutasid oma eksperimentides statsionaarse faasi kultuurilt võetud söödet, mida lahjendati värske söötmega (Weichart & Kell 2001). Mina olen oma katsetes kasutanud söödet, mis on konditsioneeritud eksponentsiaalse kasvufaasi alguses, kuid FX ei pruugi olla ainult selle faasi spetsiifiline. FX on väga stabiilne ja juhul kui rakud seda just ära ei metaboliseeri, on väga tõenäoline, et seda leidub ka statsionaarsesse faasi jõudnud rakkude supernatandis. Teisalt olen söödet konditsioneerinud ka nii, et selle asemel, et vahetada kasutatud sööde värske vastu, lisasin süsinikuallika otse statsionaarses faasis kultuuri kasutatud söötmesse (andmeid ei ole selles töös esitatud). Ka sel juhul on näha selge vahe konditsioneeritud ja kontrollsöötme vahel, mis ei saaks olla tõsi, kui ka kontrollsööde sisaldaks FX-i.

Ehkki minu ning Weichart ja Kelli (2001) ained on funktsionaalselt sarnased, ei saa olemasolevate andmete põhjal siiski üheselt otsustada, kas olen kirjeldanud ja iseloomustanud sama ainet kui Weichart ja Kell.

FX ei ole hüdrofoobne ega ioonne ja on tõenäoliselt väike. Selliseid orgaanilisi molekule on väga palju, kuid üks võimalik spekulatsioonisuund on ained, mida rakud saaksid kasutada süsinikuallikana. Näiteks võiks FX olla üks neljast polaarsest laenguta aminohappest, kuid pole selge, kuidas see rakuvälisesse keskkonda sattuma peaks. Kasvatan baktereid minimaalsöötmele, kus rakud peavad kõiki aminohappeid ise sünteesima ja pole alust arvata, et nad neid rakust välja transpordiks. On näidatud, et *M. xanthus* sekreteerib nälja korral aminohappeid, mis koordineerivad viljakeha moodustumist, kuid on vaieldav, kas bakterid tunnevad neid ära signaali või toiduna: stimulatsiooniks vajalikud kontsentratsioonid on küllaltki kõrged (Kuspa et al. 1992). Tõenäoliselt ei ole FX näol tegu ainega, mis vabaneks lüüsovatest rakkudest, kuna konditsioneeritud söötme efekt on ühesugune nii rakukultuuris, kus lüüsitakse ampitsilliiniga kõik kasvavad rakud kui ka ampitsilliiniga töötlemata rakukultuuris (Tüür 2013). Lisaks sellele ei kattu MS uuringutes tuvastatud kandidaatainete massid ühegi polaarse laenguta aminohappe

massiga. Samuti pole neid masse arvesse võttes võimalik, et FX oleks kahest polaarsest laenguta aminohappest moodustunud dipeptiid.

Üks klass molekule, mis sarnaneb oma keemiliste omaduste poolest faktor X-le, on süsivesikud. Süsivesikud sisaldavad polaarseid –O-H sidemeid, nad on mitteioonsed ja lahustuvad vees väga hästi. Arvi Jõers on näidanud, et glükoos võib väga madalal kontsentratsioonil oluliselt mõjutada bakterikultuuri statsionaarsest faasist väljumise kiirust: 0,002% glükoosi lisamine koos muu süsinikuallikaga hoogustab kultuuri aktiveerumist, samas kui selline kogus glükoosi üksinda baktereid kasvama ei pane ja ilma glükoosita on kavamahakkamine märksa aeglasem (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Glükoos on suure väärtusega süsinikuallikas, mistõttu on kaheldav, et rakud seda välja sekreteeriks ja tõenäoliselt ei ole faktor X glükoos. Suhkrute ja faktor X-i keemilised omadused langevad üldjoontes üsna hästi kokku.

Tulenevalt FX keemilistest omadustest võib arvata, et see aine ei suuda iseseisvalt membraane läbida ja signaali vahendamiseks on vaja spetsiifilist retseptorit või transporterit.

Faktor X on signaal kasvuks soodsatest tingimustest. Evolutsiooniline põhjus, miks selline signaal välja on kujunenud, võib peituda riskide hajutamises (*bet-hedging*). Soikunud rakud on mitmesugustele stressidele oluliselt vastupidavamad kui kasvavad rakud. Oludes, mis on kasvamiseks kõigiti soodsad, aktiveerub ainult osa populatsioonist. See võib populatsiooni jätkusuutlikkuses suurt rolli mängida, kui kasvukeskkonnas on lisaks toitainetele midagi, mis aktiivselt kasvavaid baktereid surmab, kuid mida bakterid õigeaegselt ohuna ei taju. Kui kõik rakud ei aktiveeru korraga, ei saa nad ka korraga surma ning kõikide rakkude äratamiseks on vajalik kindel tõestus keskkonna sobivusest (äratussignaal).

Teisalt võib FX-i vaadelda kui domineerimisstrateegiat. Looduslikud populatsioonid on enamasti liigirikkad ning signaal, mis võimaldaks soodsate olude saabumise sõnumit liigikaaslastele kiiresti edastada, võiks anda selle liigi esindajatele märkimisväärse kasvueelise. Seda, miks ja kuidas aktiveerub esimene rakk, kes signaalmolekuli tootma võiks hakata, kirjeldab Slava Epsteini skaudihüpotees (Epstein 2009). Skaudihüpoteesi kohaselt toimub soikunud rakkude aktiveerumine pidevalt olenemata keskkonnatingimustest ning aktiveerumise põhjuseks võib olla juhuslik müra raku geeniekspressioonis (Epstein, 2009). Kui rakk aktiveerub juhtumisi ebasoodsates oludes, kasutab ta ära oma sisemised ressursid ja hukkub. Juhul kui rakk hakkab kasvama soodsates oludes, saab ta paljuneda, panna aluse uuele kasvavale populatsioonile ning

signaliseerida inaktiivsetele rakkudele, et keskkond on soodne (Epstein, 2009). Selline ökoloogiline strateegia võimaldab üsna väiksearvulisel populatsioonil pika aja jooksul pidevalt keskkonda 'testida' ja olla valmis kohe kasvu alustama, kui keskkond osutub soodsaks.

Olenemata sellest, kas FX on liigispetsiifiline (nagu AHL-id) või universaalne signaalmolekul (nagu AI-2), võiks olla huvitav uurida võimalusi selle rakendamiseks krooniliste ja korduvate infektsioonide ravis. Paljude tõsiste haiguste, näiteks tuberkuloosi puhul, takistab infektsiooni kiiret ja efektiivset ravi väike populatsioon soikunud rakke, keda ei ole võimalik antibiootikumidega surmata (Kana et al. 2008). Ravi tuleb jätkata seni, kuni kõik patogeenid on hävitatud, kuid stohhastilise aktiveerumise korral võib see väga kaua aega võtta. Ravi käigus hukuvad lisaks patogeenidele ka sümbiontsed bakterid, mis omakorda halvendab inimese tervist. Hüpoteesiliselt võiks olla hea lahendus see, kui õnnestuks kõikide patogeenide metabolism märksa lühema aja jooksul aktiveerida. Kiirem aktivatsioon tähendaks ühtlasi nende kiiremat surmamist ja lühemat ravi. Juhul, kui FX oleks paljude erinevate bakteriliikide poolt kasutatav, võiks olla võimalik kasutada seda otse infektsioonikoldes. Juhul, kui FX on liigispetsiifiline, võiks FX struktuuri ja sünteesiks vajalike geenide tuvastamine võimaldada otsida patogeenide mikroobide genoomist homoloogseid gene ja leida aineid, mis stimuleerivad kindla bakteriliigi kasvu.

Töö faktor X-i struktuuri välja selgitamiseks jätkub ja käimas on eksperimendid selle puhastamiseks normaalfaasikromatograafia abil.

## Kokkuvõte

Üks võimalikke meetodeid, mille kaudu bakterid üksteisega infot jagavad, on vahendatud signaalmolekulide kaudu. Andsin oma magistritöö teoreetilises osas ülevaate signaalmolekulide struktuurist, toimemehhanismidest ja bioloogilisest rollist. Töö eksperimentaalses osas uurisin *E. coli* tundmatu struktuuriga kasvufaktorit, faktor X-i, mis soodustab rakkude väljumist statsionaarsest faasist ja mida kirjeldasin oma bakalaureusetöös.

Iseloomustasin faktor X-i keemiliselt. Faktor X on stabiilne mittelenduv aine, mis säilitab oma aktiivsuse isegi pärast suuri pH- ja temperatuurikõikumisi. Faktor X on hüdrofiilne ja polaarne aine, mida ei ole võimalik vesilahusest apolaarsete orgaaniliste solventide abil ekstraheerida ja mis ei seonu pöördfaasikromatograafia C18-kolonnile, kuid mida saab ekstraheerida lüofiliseeritud söötimest lühikese ahelaga alkoholide abil. Saadud teadmiste tuginedes töötasin välja meetoodika, mis võimaldab faktor X-i esmast puhastamist.

Faktor X ei ole ükski praeguseks teadaoleva struktuuriga signaalmolekulidest. Faktor X ei ole valk, sest ta on liiga väike, stabiilne ja ei seonu C18 kolonniga. See ei ole ka ükski hüdrofoobsetest signaalmolekulidest, kuna seda ei saa söötimest sarnaste meetodite abil puhastada. Lisaks sellele ei ole faktor X autoinduktor 2, kuna neil ei ole statsionaarsest faasist väljuvale bakterikultuurile sarnast mõju ning *E. coli* tüved, kes ei suuda toota AI-2, on võimelised tootma faktor X-i.

Faktor X-i keemilist struktuuri ei õnnestunud veel kindlaks teha, kuid töö sellel suunal jätkub.

# **Chemical characterization of a novel secreted growth factor in *Escherichia coli***

Kristiina Vind

## **Summary**

One of the main ways bacterial communication is mediated is via small diffusible signal molecules. In the theoretical part of this thesis I give an overview of the structure, function and relevance of currently known bacterial signaling molecules. In the experimental section I characterize a novel signaling molecule that is involved in the resuscitation of stationary phase *E. coli* cells. As its chemical structure is yet to be elucidated, it is referred to as 'factor X' for simplicity.

The factor X is a chemically resistant substance that tolerates large pH and temperature changes and it is not volatile. It cannot be extracted from the media by hydrophobic solvents and it does not bind to C18 reverse phase column nor does it interact with ion exchange resins. Factor X is hydrophilic and non-ionic and thus cannot be purified from the bacterial media using similar protocols that are used in the purification of well-known quorum sensing molecules. In this thesis I developed an assay for the primary purification of the factor X from bacterial medium. Factor X could be extracted from the solid phase using short-chained alcohols. This enabled me to prepare a salt-free crude extract that I further purified by hydrophobic solvent extraction and HPLC. The active fraction was analyzed in mass-spectrometry and two potential candidate masses were obtained. The structure of the factor X could not yet be elucidated but the work towards it is going to continue.

## **Kasutatud kirjandus**

Anisova, LN, Blinova, IN, Efremenkova, OV, Kozmin, Yu, P, Onoprienko, VV, Smirnova, GM & Khokhlov, AS (1984) Regulators of the development of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Izv Akad Nauk SSSR Ser Biol* 1, 98-108.

Baba T et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2.

Bassler B, Wright M & Silverman M (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol*.

Brachmann AO, Brameyer S, Kresovic D, Hitkova I, Kopp Y, Manske C, Schubert K, Bode HB & Heermann R (2013) Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat. Chem. Biol.* 9: 573–578.

Brameyer S, Kresovic D, Bode HB & Heermann R (2015) Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: 572–577.

Carrano CJ, Schellenberg S, Amin SA, Green DH & Küpper FC (2009) Boron and marine life: a new look at an enigmatic bioelement. *Mar. Biotechnol.* 11: 431–440.

Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczer I, Bassler BL & Hughson FM (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545–549.

Dong -H, Gusti, Zhang, Xu -L & Zhang -H (2002) Identification of Quorum-Quenching N-Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*.

Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF & Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813–817.

Duan F & March J (2010) Engineered bacterial communication prevents *Vibrio cholerae* virulence in an infant mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 11260–11264.

- Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Neilson KH & Oppenheimer NJ (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20: 2444–2449.
- Efremenkova, OV, Anisova, LN & Bartoshevich, YE (1985) Regulators of differentiation in actinomycetes. *Antibiot Med Biotechnol* 9, 687-707.
- Epstein S (2009) General model of microbial uncultivability. In S. Epstein (ed.), *Uncultivated microorganisms, Microbiology Monographs, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* 10: 131–159.
- Flavier A, Clough S, Schell M & Denny T (1997) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* 26: 251–259.
- Fuqua C, Parsek MR & Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35: 439–468.
- Gerth K, Metzger R & Reichenbach H (1993) Induction of myxospores in *Stigmatella aurantiaca* (myxobacteria): inducers and inhibitors of myxospore formation, and mutants with a changed sporulation behaviour. *Journal of General Microbiology* 139: 865–871. <http://mic.sgmjournals.org/content/139/4/865.short>.
- Henke JM & Bassler BL (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 186: 6902–6914.
- Higgins DA, Pomianek ME, Kraml CM, Taylor RK, Semmelhack MF & Bassler BL (2007) The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* 450: 883–886.
- Holden M et al. (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* 33: 1254–1266.
- Ilangovan A et al. (2013) Structural basis for native agonist and synthetic inhibitor recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator PqsR (MvfR). *PLoS Pathog.* 9: e1003508.

- Ji G, Beavis RC & Novick RP (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 12055–12059.
- Kana B & Mizrahi V (2010) Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58: 39–50.
- Kana BD et al. (2008) The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol. Microbiol.* 67: 672–684.
- Keep N, Ward J, Cohen-Gonsaud M & Henderson B (2006) Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends in Microbiology* 14.
- Khokhlov, AS, Tovarova, II, Borisova, LN, Pliner, SA, Schevchenko, LA, Kornitskaya, EY, Ivkina, NS & Rapoport, IA (1967) A-factor responsible for the production of streptomycin by a mutant strain of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR* 177, 232-235.
- Kuspa A, Plamann L & Kaiser D (1992) Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 174: 3319–3326.
- LaSarre B & Federle M (2013) Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77: 73–111.
- Lee J & Lee J (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 426–444.
- Loh J, Carlson R, York W & Stacey G (2002) Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Magnuson R, Solomon J & Grossman AD (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* 77: 207–216.
- Marques J, Oh I, Ly D, Lamosa P, Ventura M, Miller S & Xavier K (2014) LsrF, a coenzyme A-dependent thiolase, catalyzes the terminal step in processing the quorum sensing signal autoinducer-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 14235–14240.
- Miller M & Bassler B (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Microbiology* 55: 165199.

- Miller ST, Xavier KB, Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, Bassler BL & Hughson FM (2004) Salmonella typhimurium recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol. Cell* 15: 677–687.
- Mukamolova G, Kaprelyants A, Young D, Young M & Kell D (1998) A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 8916–8921.
- Mukamolova G, Murzin A, Salina E, Demina G, Kell D, Kaprelyants A & Young M (2006) Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol Microbiol* 59: 84–98.
- Ng W-L & Bassler B (2009) Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Genetics*.
- Pearson JP, Van Delden C & Iglewski BH (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181: 1203–1210.
- Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH & Greenberg EP (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 197–201.
- Pereira CS, Thompson JA & Xavier KB (2013) AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 156–181.
- Pesci E, Milbank J, Pearson J, McKnight S, Kende A, Greenberg P & Iglewski B (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Plamann L, Kuspa A & Kaiser D (1992) Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 174: 3311–3318.
- Ruby E (1996) Lessons From A Cooperative, Bacterial-Animal Association: The *Vibrio fischeri*–*Euprymna scolopes* Light Organ Symbiosis. *Microbiology* 50: 591–624.
- Rutherford S, Kessel J, Shao Y & Bassler B (2011) AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios. *Genes Dev.* 25: 397–408.
- Saeidi N, Wong C, Lo T, Nguyen H, Ling H, Leong S, Poh C & Chang M (2011) Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. *Mol. Syst. Biol.* 7.

Shah I, Laaberki M-H, Popham D & Dworkin J (2008) A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. *Cell* 135.

Surette MG, Miller MB & Bassler BL (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 1639–1644.

Takano E (2006)  $\gamma$ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current Opinion in Microbiology*.

Takano E, Nihira T, Hara Y, Jones J, Gershater C, Yamada Y & Bibb M (2000) Purification and Structural Determination of SCB1, a  $\gamma$ -Butyrolactone That Elicits Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Biological Chemistry*.

Tang K & Zhang X-H (2014) Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Marine Drugs*.

Tay S & Yew W (2013) Development of Quorum-Based Anti-Virulence Therapeutics Targeting Gram-Negative Bacterial Pathogens. *IJMS* 14.

Thompson J, Oliveira R, Djukovic A, Ubeda C & Xavier K (2015) Manipulation of the Quorum Sensing Signal AI-2 Affects the Antibiotic-Treated Gut Microbiota. *Cell Reports* 10.

Tüür K (2013) Soikeseisundist väljumine ja seda mõjutavad tegurid *Escherichia coli*'s. Tartu Ülikool.

Vimberg V, Tats A, Remm M & Tenson T (2007) Translation initiation region sequence preferences in *Escherichia coli*. *BMC Molecular Biology* 8: 100.

Wang L-HH et al. (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51: 903–912.

Weichart DH & Kell DB (2001) Characterization of an autostimulatory substance produced by *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147: 1875–1885.

Wright J, Jin R & Novick R (2005) Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 1691–1696.

Xavier K & Bassler B (2005) Regulation of Uptake and Processing of the Quorum-Sensing Autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 238–248.

Zhang L, Murphy PJ, Kerr A & Tate ME (1993) *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 362: 446–448.

## **Tänuõnad**

Aitäh, Arvi, selle eest, et oled alati väga objektiivne, oskad suunata oma arvamust peale surumata ja hoidud isiklikest märkustest.

Aitäh, Tanel, targa nõu eest.

Aitäh, Vuss, et mind HPLC eksperimentide juures kannatlikult aitasid.

Aitäh, Jaanus Remme, et andsid nõu keemiliste ekstraksioonide osas.

Aitäh, Marta, et oled hoolitsev ja armas.

Aitäh kõikidele kolleegidele antibiootikumide töörühmast.

Aitäh, armas abikaasa.

## **Lihtlitsents**

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

Mina, Kristiina Vind

(sünnikuupäev: 28.05.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Escherichia coli tundmatu kasvufaktori keemiline iseloomustus“, mille juhendaja on Arvi Jõers,
  - 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.

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

Tartus, 26.05.2015