

TARTU JAAN POSKA GÜMNAASIUM

AUTOR: ANNI BRITTA PAJOMA

11.D KLASS

***PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES* TÜVE C70 KATEHHOOLI 2,3-DIOKSÜGENAASI MÕJU UURIMINE *KNOCK- OUT* MUTANDI KONSTRUEERIMISE ABIL**

JUHENDAJAD: TEADUR MERIKE JÕESAAR, PHD

ÕPETAJA LAURI MÄLLO

SISSEJUHATUS

Tööstustootmise tulemusena satuvad keskkonda suurenenud kontsentratsioonis paljud aromaatsed ühendid, mis on omakorda toksilised enamikele seal viibivatele elusorganismidele. Paljud mikroorganismid on võimelised aromaatsed ühendeid lagundama ning neid on võimalik kasutada bioremediatsiooni efektiivsuse suurendamiseks. Tõstmaks aromaatsete ühendite lagunemise kiirust, tuleb eelnevalt uurida keskkonda puhastavate bakterite võimekust ning bakterites toimivaid aromaatsete ühendite lagunemisaraju ja põhirolli mängivaid ensüüme. Üks olulisim võtmeensüüm aromaatsete tuumade lõhustamisel on katehhooli 2,3-dioksügenaas (C23O).

Käesolev uurimistöö käsitleb Läänemerest, Narva lahest isoleeritud *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70 ja selle fenooli lagundamisaraju võtmeensüümi katehhooli 2,3-dioksügenaasi.

Uuritav bakter on võimeline lagundama toksilisi aromaatsed ühendeid, fenooli ja naftaleeni, ning muutma nende ühendite lagundamisel tekkivat katehhooli järk-järgult lihtsamateks komponentideks, mida bakter hiljem kasutab oma põhiainevahetuses. Seega muudab bakter keskkonna vähem kahjulikuks. Fenoolseid ühendeid on leitud Läänemere suubuvatest vetest, mis on sattunud sinna põlevkivi töötlemise tagajärjel tekkinud poolkoksimägedest väljauhutava veega. Seega on uurimistöö teema pikemas perspektiivis seotud sellega, et välja selgitada, kas uuritavat bakterit saaks kasutada reostatud piirkondades bioaugmentatsiooni eesmärgil.

Töö käigus konstrueeriti *Pseudomonas pseudoalcaligenes* metsiktüvest *knock-out* meetodiga 2,3-dioksügenaasi kodeeriva *pheB* geeni suhtes mutanttüvi, et uurida katehooli 2,3-dioksügenaasi geeni puudumise mõju bakteri võimele lagundada fenooli, mis on ühtlasi käesoleva uurimistöo põhieesmärk. Uurimistöo teema valikul sai otsustavaks huvi mikrobioloogia vastu, täpsemalt nii geneetiliselt muundatud mikroorganismide loomise teoreetiliste põhimõtete kui ka praktilise töö kogemuse saamise suhtes. Üks ajend oli molekulaar- ja mikrobioloogiaalase laboritöö kogemuse saamine.

Uurimistöo teostamiseks esitati taotlus Eesti Teadusagentuuri Noore uurija stipendiumikonkursile, tänu millele sai võimalikuks laboritööid hõlmavate kulutuste katmine ning Tartu Ülikoolis töötava juhendaja töö tasustamine.

Täna Merike Jõesaart ja Lauri Mällot juhendamise, nõuannete ja abi eest ning Eesti Teadusagentuuri stipendiumi eest.

SISUKORD

SISSEJUHATUS	1
MÕISTED JA LÜHENDID	4
1. TEOORIA	5
1.1. Bioremediatsioon.....	5
1.2. Aromaatset ühendid ja nende lagundamine.....	5
1.2.1. Fenooli aeroobne lagundamine.....	6
1.2.2. Naftaleeni lagundamine.....	7
1.3. Katehooli 2,3-dioksügenaas	9
1.4. Pseudomonas pseudoalcaligenes C70	9
2. METOODIKA	10
2.1. Polümeraasi ahelreaktsioon	10
2.2. Geelelektroforees	11
2.3. Restrikteerimine.....	12
2.4. Klenow'i töötlus ja aluselise fosfataasi töötlus	12
2.5. Ligeerimine	13
2.6. Elektroporatsioon.....	13
2.7. Konjugatsioon	14
2.8. Uuritava katehooli 2,3-dioksügenaasi geeni katkestamine	14
2.9. Metsiktüve ja mutanttüve kasvatamine	16
2.10. Laboratoorse töö etapid.....	17
3. TULEMUSED JA ARUTELU	18
3.1. Katehooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriva geeni (<i>pheB</i>) <i>knock-out</i> tüve konstrueerimine	18
3.2. Mutanttüve ja metsiktüve kasv fenooli ja salitsülaadi minimaalsöötmetel.....	20
4. KOKKUVÕTE	23
5. SUMMARY	23
6. KASUTATUD MATERJALID	24
7. LISA 1.....	28
Eesti Teadusagentuurile esitatud Noore uurija stipendiumi taotlus	28

MÕISTED JA LÜHENDID

amplifikatsioon – vajamineva geenilõigu mitmekordne paljundamine

aromaatsed ühendid e. aromaatsed süsivesinikud e. areenid – süsivesinikud, mis sisaldavad üht või mitut benseenituumat (Sonn 2005: 6)

biodegradatsiooni rada – bioloogilise lagunemise rada, orgaaniliste ainete muundumine lihtsateks anorgaanilisteks aineteks

ap – aluspaar

Bp – bensüülpenitsilliin, antibiootikum

C23O – katehooli 2,3-dioksügenaas

eukarüoot – päristuumne rakk, rakutuum on membraaniga piiritletud

kbp – kiloaluspaar

Km – kanamütsiin, aminoglükosiidide rühma kuuluv antibiootikum

konjugatsioon – geneetilise materjali kandumine ühest bakterirakust teise

matriitsahel – transkriptsioonil DNA ahel, mida kopeeritakse komplementaarse RNA ahela moodustamiseks (Heinaru 2012: 1032)

operon – grupp genee, mis moodustavad ühtse reguleeriva või kontrollüksuse, mis omakorda koosneb operaatorist, promootorist ja struktuurgeeni(de)st (Heinaru 2012: 1046)

PCR – (ingl *polymerase chain reaction*) polümeraasi ahelreaktsioon ehk kindla DNA-järjestuse amplifikatsioon *in vitro* tingimustes (Heinaru 2012: 1051)

pheB – fenooli degradatsiooni operonis asuv katehooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriv geen, mis katalüüsib katehooli lagundamist

primer– lühike nukleotiidjärjestus, millelt algatatakse matriitsahela alusel DNA süntees (Heinaru 2012: 1053)

prokarüoot – eeltuumne bakteri- või arherakk. Neil puudub membraaniga piiritletud rakutuum (Heinaru 2012: 1054)

vektor – plasmiid (DNA rõngasmolekul), mida saab kasutada prokarüootidel rekombinantsete DNA molekulide konstrueerimisel ning viimisel elusrakku (Heinaru 2012: 1094).

1. TEOORIA

1.1. Bioremediatsioon

Bioremediatsioon (ingl *bioremediation*) on üldmõiste keskkonnatehnoloogilise meetodi jaoks, mille abil puhastatakse keskkonda sinna sattunud reostusest mikroorganismide elutalitluse abil, taastades endine looduslik seisund. Bioremediatsiooni võib jagada kaheks suunaks – *in situ* ehk kohapealsed protsessid pinnase ja põhjavee puhastamiseks; *ex situ* protsessid nagu *land-farming*, kompostimine ja vee-pinnase segu reaktorid (Keskkonna biotehnoloogia 2005).

Nii biostimulatsioon (ingl *biostimulation*) kui ka bioaugmentatsioon (ingl *bioaugmentation*) on bioremediatsiooni alaliigid. Biostimulatsioon tähendab toitainete või muude ühendite lisamist mikroorganismide metabolismi aktiivsuse tõstmiseks. Bioaugmentatsiooni all mõistetakse spetsiifilise degradatsioonilise suutlikkusega mikroorganismide arvukuse tõstmist. (Microbial Biodegradation 2008: 366-367)

On leitud, et bioaugmentatsioon kui bakterite või bakterikoosluste kasutamine reostunud keskkonna puhastamise eesmärgil on osutunud kõige efektiivsemaks, kui kasutatakse reostunud piirkonnaga samast ökoloogilisest nišist pärit mikroorganisme. Algsete keskkonnatingimuste osas sarnase päritoluga mikroorganismide edukama keskkonda sulandumise võtmesõnaks on suurem kohandumisvõime sealse piirkonna biotiliste ja abiotiliste teguritega. Lisaks on sellistel sisse viidud mikroorganismidel kergem ühilduda lokaalse bakteriaalse kooslusega. (Juhanson 2010: 18-19)

Käesoleva uurimistöös üks kaudne tulemus on *P. pseudoalcaligenes* tüve C70 bioaugmentatsioonilise sobivuse kindlaks tegemine põlevkivitööstuse tootmisprotsessis tekkivate aromaatsete ühendite võimaliku lekke korral Läänemeres. Sarnase näitena saab välja tuua 2010. aasta aprillis Mehhiko lahes asunud naftaplatvormil toimunud õnnetuse, mille tagajärjel lekkis mitu miljonit barrelit naftat sealsesse vette, põhjustades ulatusliku keskkonnakatastroofi. Selle likvideerimisel kasutati alkaane lagundavaid baktereid, kes andsid suure panuse, hoidmaks ära veel suurema koguse nafta jõudmise rannikule (Deepwater horizon oil spill 2016).

1.2. Aromaatsed ühendid ja nende lagundamine

Aromaatsed ühendid sisaldavad ühte või mitut benseenituumat. Benseenituum on tsükliiline ühend, mis koosneb kuuest süsinikust ja vesinikust (Aromaatsed ühendid 2015).

Aromaatsed ühendid on reostusainete seas ühed püsivamad ja laialdaselt levinumad (Li *et al* 2009) nii tööstuslikes heitvetes kui ka reostunud pinnastes (Pessione *et al* 2001). Inimtekkelised aromaatsed ühendid on toksilised, mutageensed ehk mutatsioone esile kutsuvad ja kantserogeensed ehk vähki tekitavad (Habe, Omori 2003). Aromaatsed ühendid on raskesti lagundatavad, mistõttu on nende esinemine looduskeskkonnas suur probleem (Harayama, Rekik 1989).

Benseenituum on biokeemiliselt inertne ja seepärast tuleb aromaadne ühend kõigepealt aktiveerida oksüdeerimise teel, lisades hüdroksüül- (OH) või karboksüülrühmi (COOH). Kirjeldatud protsessi viivad läbi erinevad kataboolsed ensüümid, mis jaotatakse monooksügenaasideks ja dioksügenaasideks. Aromaatsete ühendite lagundamise algstaadiumides katalüüsivad ensüümid hapniku aatomite lisamist substraadile. Monooksügenaasid katalüüsivad ühe hapniku aatomi ning dioksügenaasid kahe hapniku aatomi lisamist substraadile (Harayama, Rekik 1989).

Aromaatsete ühendite lagundamise saab üldiselt jagada kolmeks etapiks (Williams, Sayers 1994) (Joonis 1):

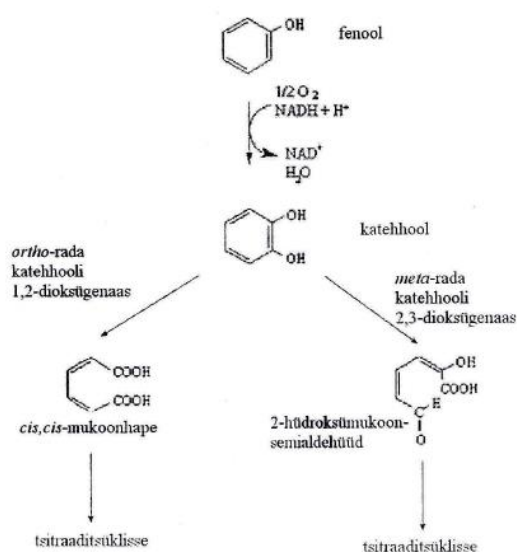
1. Aromaatse ühendiga toimuvad erinevad muutused, kuni tekib dihüdroksüaromaadne vaheprodukt (nt katehhool);
2. toimub tekkinud vaheprodukti benseenituuma lõhkumine dioksügenaaside abil. Dioksügenaasid avavad benseenituuma, lõhkudes ühe C-C sideme ning lisavad kaks hapniku aatomit, mille tulemusena tekib benseenituumata ühend;
3. ensüümid töötlevad vaheühendeid lihtsamateks ühenditeks, mille edasine katabolism toimub põhiainevahetuslikes protsessides.

1.2.1. Fenooli aeroobne lagundamine

Fenool (C_6H_5OH) on aromaadne süsivesinik, mille benseenituuma küljes asub üks hüdroksüülrühm (OH). On leitud mitmeid mikroorganisme, kes taluvad keskkonnas fenooli ning kasutavad seda aromaatset ühendit energia- ja süsinikuallikana. Sõltuvalt mikroobi geneetilisest võimekusest lagundatakse fenool kas aeroobselt või anaeroobselt. Tavaliselt on eelistatud aeroobne protsess. Perekond *Pseudomonas*'e esindajad on tuntuimad fenooli lagundajad, eriti *Pseudomonas putida* (Al-Khalid, El-Naas 2012). Fenooli suudavad degradeerida veel järgmiste perekondade esindajad: *Bacillus sp*, *Acinetobacter sp* ja *Achromobacter sp* (Nair *et al* 2008).

Fenooli benseenituuma lagundamiseks on vajalik molekulaarse hapniku olemasolu. Fenooli metabolismi rada (Joonis 1) algab benseenituuma hüdroksüülimisest fenooli hüdroksülaasiga, mille käigus lisatakse teine hüdroksüülrühm ning tekib katehhool.

Seejärel toimub katehhooli benseenituuma lõhkumine kas *ortho*- või *meta*-oksüdatsiooni kaudu (Al-Khalid, El-Naas 2012) vastavalt ensüümide katehhooli 1,2-dioksügenaasi või katehhooli 2,3-dioksügenaasi abil. Katehhool, tuntud ka kui 1,2-dihüdroksübenseen (omab benseenituuma, millele on lisatud kaks OH-rühma), on orgaaniline ühend molekulaarse valemiga $C_6H_4(OH)_2$ (Joonis 1). Esineb valgete kristallidena ning on vees kergesti lahustuv (Katehhool 2015).

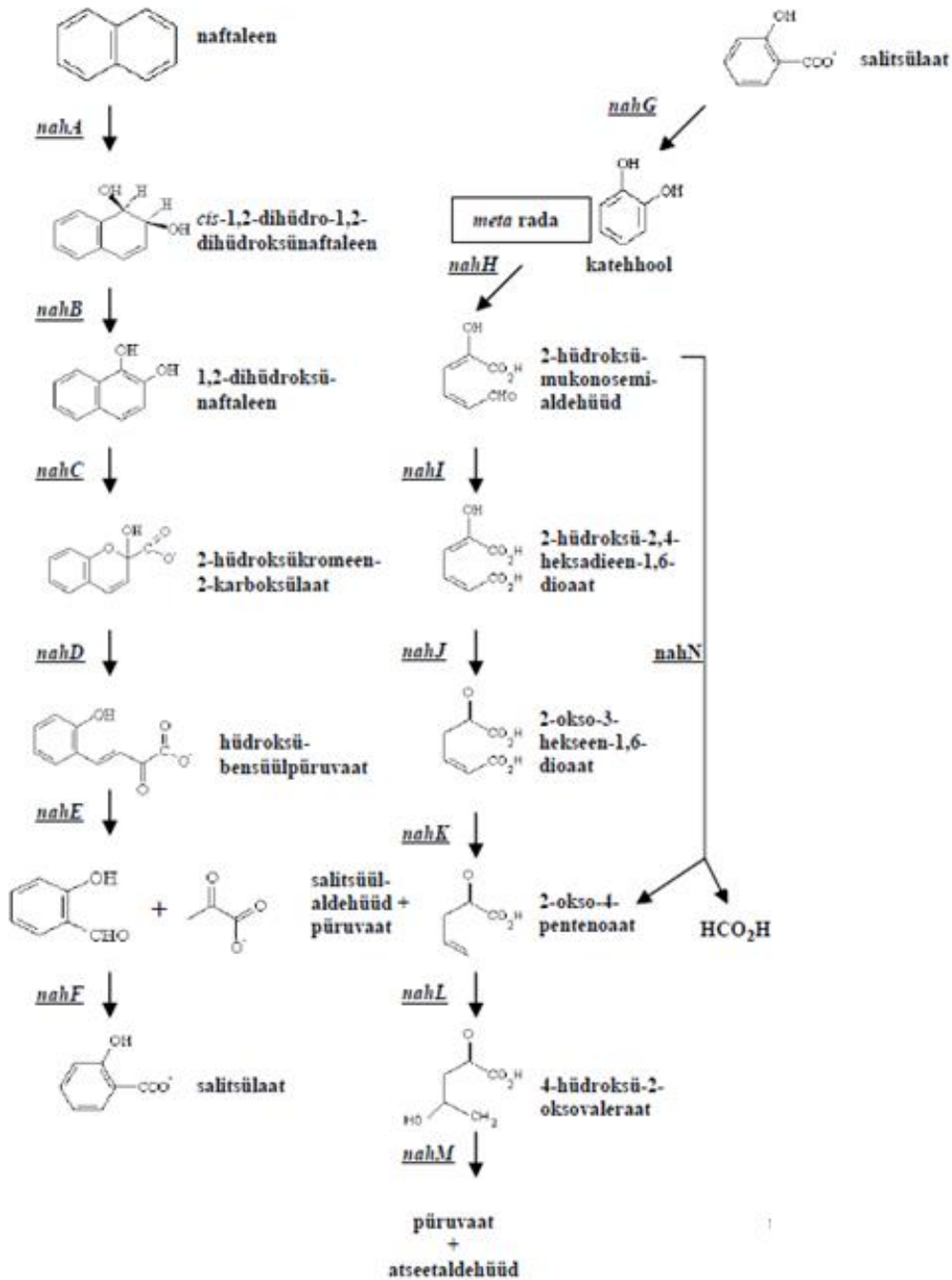


Joonis 1. Fenooli aeroobsed biodegradatsioonirajad (kohandatud artiklist van Schie, Young 2000)

1.2.2. Naftaleeni lagundamine

Naftaleen, molekulaarse valemiga $C_{10}H_8$, on bitsükliiline aromaadne süsivesinik, mida leidub rohkelt naftas ja selle produktides. Naftaleen on kõige lihtsam ja kõige paremini lahustuv polüaromaatne süsivesinik (PAH), mistõttu kasutatakse seda ka mudelainena bakterite PAHide degradeerimisvõime uurimiseks. Paljud isoleeritud bakteritest, kes kasutavad naftaleeni süsiniku- ja energiaallikana, kuuluvad perekondadesse: *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* ja *Streptomyces* (Li *et al* 2008). Tuntuim naftaleeni lagundamise rada paikneb *Pseudomonas putida* tüve G7 plasmiidil NAH7. Naftaleeni lagundamise ensüümid paiknevad kahes operonis – naftaleeni lagundamise ülemises operonis asetsevad geenid, mis kodeerivad ensüüme

naftaleeni lagundamiseks salitsülaadiks (*nah operon*), alumises operonis aga ensüme kodeerivad geenid, mis on vajalikud salitsülaadi edasiseks lagundamiseks põhiainevahetuse vaheühenditeni *meta*-raja (*sal operon*) kaudu (Yen, Gunsalus 1982) (Joonis 2).



Joonis 2. Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamise rada *Pseudomonas putida* G7 pNAH7 rakkudes (kohandatud artiklist Yen, Serdar 1988). Alla on joonitud reaktsioonides osalevad valke kodeerivad geenid.

1.3. Katehhooli 2,3-dioksügenaas

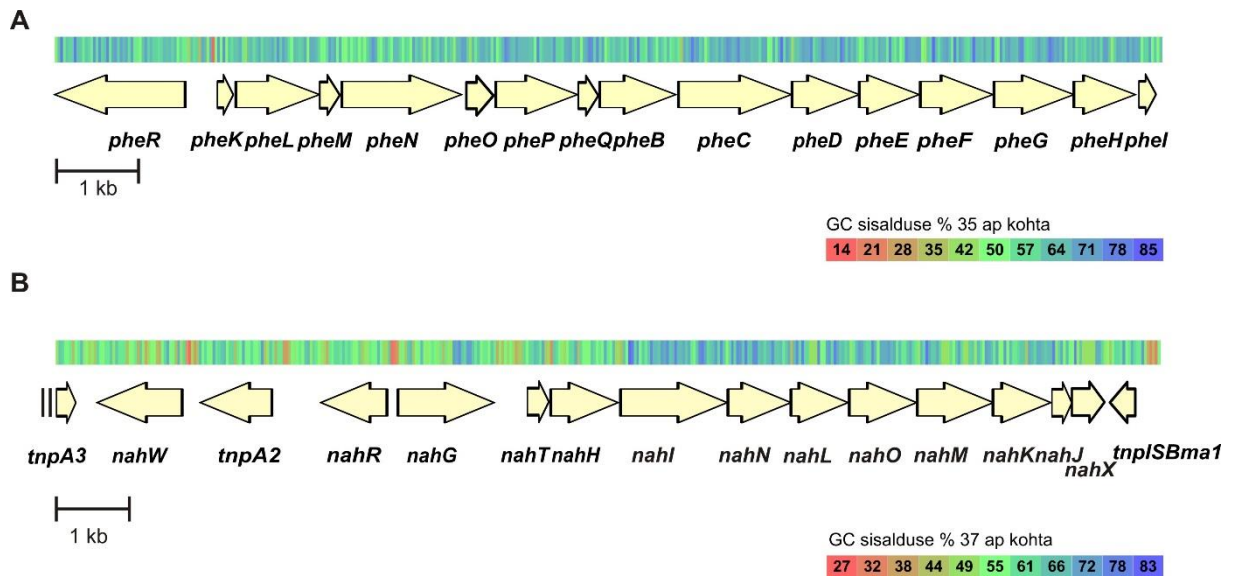
Bakterid toodavad erinevate kesksete vaheühendite, näiteks katehhooli ja salitsülaadi lagundamiseks energia saamise eesmärgil mitmeid ensüüme. Katehhooli 2,3-dioksügenaasi (C23O) geene on neist kõige enam iseloomustatud (Williams, Murray 1974; Kita *et al* 1999; Widada *et al* 2002). Kõige rohkem on uuritud bakteri *Pseudomonas putida* mt-2 TOL plasmiidis pWWO paiknevat *xyIE* geeni kodeeritud C23O (Mishra *et al* 2001).

Dioksügenaasid on benseenituumi lagundavad ensüümid. C23O on Fe²⁺-sõltuv ensüüm, mis lõhub benseenituuma hüdroksüülrühmade kõrvalt (Joonis 1–2), andes produktiks 2-hüdroksümukoonsemialdehüüdi või selle derivaadid, mis muudetakse püruvaadiks ja atseetaldehüüdiks (Williams, Sayers 1994). Mõlemal juhul muudavad bakterid toksilised aromaatsed ühendid ainevahetussaadusteks, mis liiguvad edasi põhilistesse metaboolsetesse radadesse.

1.4. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70

Rakulise ehitusega elusorganisme jaotatakse kolme domeeni ehk rühma: arhed ja bakterid, kes on prokarüootsed (ingl *prokaryote*) ehk eeltuumsed, ja eukarüootsed (ingl *eukaryote*) ehk päristuumsed organismid. Eukarüoodid on organismid, kelle rakud sisaldavad membraaniga ümbritsetud rakutuuma, milles omakorda sisaldub organismi geneetiline info (Heinaru 2012: 990). Käesolevas töös käsitletakse baktereid, kes kuuluvad prokarüootsete mikroorganismide alajaotusesse. Prokarüoote saab iseloomustada kui ainurakseid ja rakutumata organisme, kes paljunevad raku jagunemise teel (Heinaru 2012: 1054).

Pseudomonas pseudoalcaligenes C70 on bakteri tüvi, kes on eraldatud Läänemere pinnaveest Kirde-Eesti rannikuala ääres Narva lahest (Vedler *et al* 2013). Nimetatud piirkonnas on aromaatsed ühendeid tavapärasest suuremas kontsentratsioonis põlevkivitööstuses tekkivate heitvete keskkonda sattumise tõttu (Lehiste 2004: 5-6). Uuritava bakteri genoomi uuringust selgus, et sel tüvel on fenooli lagundamiseks fenooli lagundamise *meta*-operon ja naftaleeni lagundamise jaoks naftaleeni lagundamise ülemine ja alumine *meta*-operon (Joonis 3) (Jõesaar *et al* 2017).



Joonis 3. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 kataboolsed operonid: **A** fenooli lagundamise operon, pheB – ensüümi C23O kodeeriv esimene geen; **B** naftaleeni lagundamise alumine operon, nahH - C23O ensüümi kodeeriv teine geen (kohandatud artiklist Jõesaar et al 2017)

Naftaleeni alumises operonis paiknevad naftaleeni ülemises operonis tekkiva salitsülaadi lagundamiseks vajaminevaid ensüüme kodeerivad geenid. Seega on *P. pseudoalcaligenes* C70 bakteril kaks C23O ensüümi kodeerivat geeni, üks fenooli lagundamise rajal ja teine salitsülaadi lagundamise rajal. (Jõesaar et al 2017) Just sel põhjusel on see tüvi mikrobioloogide huviorbiidis, et selgitada tema kasulikkust ja võimekust bioremediatsioonis.

2. METOODIKA

Siinse töö üks esmane soov oli tutvuda erinevate mikrobioloogiliste ja molekulaarbioloogiliste töövõtete ja meetoditega, seega on alljärgnevalt kirjeldatud töös kasutatud meetodilisi võtteid ja etappe.

2.1. Polümeraasi ahelreaktsioon

Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR (ingl *polymerase chain reaction*) on molekulaarbioloogia üks põhimeetodeid. Selle meetodi abil on võimalik amplifitseerida DNA lõike, mille otse nukleotiidjärjestus on teada ning millest omakorda on sünteesitud üheaahelised DNA lõigud ehk praimerid *in vitro* tingimustes (Viikmaa, Tartes 2008: 53). Polümeraas on ensüüm, mis katalüüsib DNA ja RNA sünteesi (Heinaru 2012: 1051) ehk siis polümeraasi ahelreaktsioon tähendab DNA polümeraasi abil toimuvat DNA replikatsiooni ehk kopeerimist. Tänapäeval on protsess automatiseeritud, seega on tulemuseks vähese töö- ja ajakuluga ülisuur hulk koopiaid

algsest DNA fragmendist (Viikmaa, Tartes 2008: 53). Antud töö raames kasutati PCR meetodit geneetilise materjali hulga suurendamiseks.

Reaktsioonisegu (üldmaht 25 µl) sisaldas: 1 × PCR puhver [75 mM Tris-HCl, pH 8.8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.01% Tween 20], 0.2 mM lõppkontsentratsiooniga iga nukleotiidi (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2.5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, 10 pmol mõlemat praimerit (Tabel 2), 0.02 U/µl termostabiilset Taq DNA polümeraasi (Thermo Scientific) ning bakterite rakke või plasmide (lisati 0.2 µl) ja lõppmahuni destilleeritud vett.

Reaktsioon viidi läbi PCR-masinas ehk tsükleerivas termostaadis, mis tagab iga reaktsioonietapi toimumiseks vajaliku temperatuuri ja aja (Heinaru, Vedler 2011: 52).

Reaktsiooni etapid ning toimumise tingimused (temperatuur ja etapi pikkus):

1. Esialgne denaturatsioon: 96 °C, 3 min.
 2. DNA kaksikahelate denaturatsioon: 94 °C, 2 min.
 3. Praimerite seondumine DNAGA: 58 °C, 45 sek.
 4. DNA süntees: 72 °C, 1 min.
- Etappe 2–4 korratakse 32 korda.
5. Lõppekstensioon: 72 °C, 10 min.

2.2. Geelelektroforees

Geelelektroforeesi meetodiga (ingl *gel electrophoresis*) saab elektrivälja kasutades laenguga molekule (DNA, RNA, valk) suuruse järgi lahutada. Meetodit kasutatakse teostatud PCRi kontrollimiseks, kus PCRi läbinud reaktsioonisegu kantakse agarosgeelile ning amplifitseeritud geenifragmendid lahutatakse elektriväljas (Tover 2008: 20). Kuna DNA molekulid on pH ~ 8 juures negatiivse laenguga, liiguvad nad geelil elektriväljas anoodi suunas. Geeli maatriksi (ristsidemetega polümeer) poolt tekitatava füüsilise takistuse tõttu liiguvad väiksemad molekulid kiiremini kui suured (Heinaru, Vedler 2011: 54). Analüüsitavaid DNA molekule võrreldakse samuti geelile kantud suurusmarkeriga, mis sisaldab DNA fragmente, mille suurused on teada. Seega on uuritavate DNA fragmentide liikumise ehk ajavahemikus läbitud vahemaa järgi võimalik hinnata nende molekulide pikkust. (Tover 2008: 20) Geelelektroforees on selliste tööde raames väga vajalik, kuna tänu sellisele meetodile sai töö vaheetappides kontrollida saadud produktide korrektset pikkust.

Töö käigus saadud PCRi produkte analüüsiti geelelektroforeesil, selleks lisati 7 µl proovile 0.5 µl foresivärvi (0.04% broomfenoolsinise lahust 50% glütseroolis). Proovid kanti

horisontaalsele 0.8% agarosgeelile 1× TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8.2). Geel sisaldas etiidumbromiidi 0.1 µg/ml. Elektroforees viidi läbi toatemperatuuril, pingel 8 V/cm. Produkti suuruse hindamiseks kasutati 1 kbp (kiloaluspaar) DNA suurusmarkerit (Thermo Scientific). Geeli pildistati ultravioletvalguses.

2.3. Restrikteerimine

Restrikteerimine on (tavaliselt kloonimiseks) vajaliku DNA fragmendi eraldamine DNA molekulist ning selleks kasutatakse restriksioonilisi endonukleaase ehk restriктаase. Restriктаasid on ensüümid, mis restriктеerivad DNAd järjestusspetsiifiliselt. Need jagatakse kolme klassi (I, II, III). I ja III klassi restriктаasid vajavad DNA lõikamiseks erinevaid kofaktoreid, mis muudavad nende kasutamise ebamugavaks, seega kasutatakse laboritöös klass II restriктаase („lõikavad“ DNAd palindroomjärjestuse alusel). Need jagunevad omakorda kaheks rühmaks, mida eristatakse lõikamise järel tekkinud DNA molekulide otste poolest. Nimelt võivad „lõikamise“ tagajärjel saadud DNA fragmendid olla kas tšempotsalised või n-ö kleepuvate otstega (Joonis 4, töös kasutatud üks restriктаasidest Eco130I) (Tover 2008: 7–8). Restriктаaside abil eraldati antud töös vektoritest geenifragmente.

Eco130I



Joonis 4. Restriктаasi Eco130I lõikamisjärjestus ja lõike tulemusel tekkinud kleepuvate otstega DNA fragmendid.

2.4. Klenow'i töötlus ja aluselise fosfataasi töötlus

Klenow'i töötlust tehakse DNA restriksiooni tulemusel saadud DNA fragmendile, millel on üleulatuvad ehk kleepuvad otsad (Joonis 4). Klenow'i töötlusega sünteesitakse otsad ühepikkusteks ehk tõmbistatakse (Laak 2013: 35). Töötluse tulemusel on võimalik tõmpide otstega DNA fragmenti erinevatesse vektoritesse kloonida, kleepuvate otste puhul ei ühilduks vektori ja uuritava geneetilise info fragmenti otsad üksteisega. Käesolevas töös kasutati Klenow'i töötlust geenifragmentide töötlemiseks just vektorisse sobitamise eesmärgil.

SAP (aluseline fosfataas) töötuse eesmärk on vältida juba lahti lõigatud vektori taas kokku kleepumist e ligeerumist. Siinses töös kasutati SAP töötlust samal eesmärgil, kuid antud töö puhul osutus tulemus efektiivsemaks geenifragmentide töötlemisel.

2.5. Ligeerimine

Ligeerimine (ingl *ligation*) on uuritava DNA fragmendi sisestamine vektorplasmidi. Hübriidplasmidi loomiseks ligeeritakse kokku restriктаasidega avatud kloneerimisvektor ja uuritava DNA restriktionifragment. Segusse lisatakse veel ligaasi puhvrit, ATPd (ehk adenosiintrifosfaati – energiarikast ribonukleotiidi, mis vahendab energia ülekannet rakus toimuvates protsessides (Heinaru 2012: 973)), DNA ligaasi (ensüüm, mis seob kaks DNA fragmenti, katalüüsides keemilise sideme teket) ja vett (Tover 2008: 17–18). Antud uurimistöös sisaldas ligeerimise reaktsioonisegu üldmahuga 20 µl lisaks PCRi produktile või restrikteeritud fragmendile ja vektorile 1 mM lõppkontentratsiooniga ATPd, 10× ligaasipuhvrit ja 0.5 ühikut ligaasi. Pärast ligeerimiseks vajalike komponentide kokkusegamist algab ligaasireaktsioon, mis kulgeb erinevate temperatuuridega keskkonnas erineva kiirusega. Näiteks käesolevas katses toimus ligeerimine +20 °C juures üleöö. Elektroporeerimiseks kompetentsetesse rakkudesse ligaasisegu sadestati, et vabaneda elektroporatsiooni takistavatest komponentidest. Selleks kasutati 5 M NaCl ja külma 96% etanooli lahust, sadestamisega hoiti -20 °C juures 20 minutit. Segu tsentrifuugiti (12000 × g, 15 min) ning tsentrifuugitud sadet pesti 2 × 70% etanooliga. Sade kuivatati ja suspendeeriti vees (nukleaasivaba vesi, Thermo Scientific).

2.6. Elektroporatsioon

Elektroporatsioon (ingl *electroporation*) on meetodika DNA sisestamiseks bakterirakkudesse. Selle käigus muudetakse rakumembraan lühiajalise tugeva elektrivoolu toimel DNA-le läbilaskvaks, seega toimub ajutine rakumembraani mulgustumine (Heinaru 2012: 987). Protsessiks on vaja uuritavat DNAd (käesoleva töö juures sadestatud ligaasisegu, ptk 2.5) ja kompetentseid bakterirakke, kuhu DNA viiakse. Bakterirakke töödeldakse spetsiifilise ainega, mis just selle bakteritüve rakkude rakumembraani läbilaskvamaks muudab. Siinse töö katselises osas kasutati *Escherichia coli* rakke, mida valmistati elektroporatsiooniks ette, pestes neid külma vee ja külma 10%-lise glütserooliga. Sarnase tulemuse ehk võõr-DNA bakterirakkudesse saamiseks võib kasutada ka keemilist transformatsiooni, kuid võrreldes

sellega on elektroporatsioon ligikaudu 10 korda efektiivsem (Tover 2008: 19, 38-39). Antud töös vajati elektroporatsiooni vektorite bakterirakkudesse viimiseks.

2.7. Konjugatsioon

Konjugatsioon (ingl *conjugation*) on protsess, mille käigus toimub bakteri DNA ühesuunaline ülekande doonorbakterist retsipientbakterisse nende vahetel kontaktil. Kui kaks bakterirakku on lähedastiku, moodustub nende vahele eriline struktuur, konjugatsioonikanal ehk konjugatsioonisild. Konjugatsioonikanali kaudu kantakse DNA doonorrakust retsipientrakku, kuna neil endil puuduvad ülekandeks teised spetsiifilised moodustised (Heinaru 2012: 545-546). Siinses töös tehtud konjugatsioon toimus kolmikristamise meetodil. Ülekantav DNA konstrukt asus *E. coli* tüves CC118λpir ning see viidi uuritavasse *P. pseudoalcaligenes* tüvesse C70. Kuna tüvi CC118λpir ei ole ise võimeline konjugatsioonil plasmidi teise organismi üle kandma, kasutati lisaks helperplasmidi pRK2013, mis on pärit *E. coli* tüvest HB101. Konjugatsiooni toimumiseks kokku segatud tüvedest kandub esimesena doonortüvesse helperplasmid, seejärel vahendab helperplasmid huvipakkuva plasmidi ülekannet doonorrakust vastuvõtvasse bakterisse (Tover 2008: 71–72).

Kolmikristamise läbiviimiseks kasvatati üleöö 4 ml-s LB söötmes antibiootikumide juuresolekul: 1) doonortüve *E. coli* CC118λpir, mis sisaldas uuritava geeni katkestusega pGP704L plasmidi; 2) retsipienttüve *P. pseudoalcaligenes* C70; 3) *E. coli* tüve HB101, mis sisaldas konjugatiivset ülekannet abistavat pRK2013 plasmidi. Üleöö kasvanud kultuuridest tehti kahekümnekordsed lahjendused uude 1.5 ml ilma antibiootikumideta LB söötmesse. Ristamissegude jaoks võeti 1.5, 2 ja 2.5 tunni möödudes igast kultuurist 100 µl, segati kokku ning pipeteeriti 100 µl segu LB tassile. Baktereid kasvatati üleöö 30 °C termostaadis. Üleöö kasvanud rakud kraabiti plaadilt ning suspendeeriti 1 ml-s 1 × M9 (Adams 1959). Suspensioonist pipeteeriti 100 µl selektiivsöötmetele Km ja naftaleeni graanulitega, kus olid võimelised kasvama vaid homoloogilise rekombinatsiooni tulemusel tekkinud katkenud *pheB* geeniga *P. pseudoalcaligenes* C70 mutandid.

2.8. Uuritava katehhooli 2,3-dioksügenaasi geeni katkestamine

Katehhooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriva *pheB* geeni mutageneesi katses kasutatud bakteri tüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70 *pheB* geeni katkestamiseks amplifitseeriti 1.8 kbp (kiloaluspaar) pikkune DNA lõik, mis sisaldab *pheB* geeni, PCR meetodi abil uuritava tüve genoomselt DNA-lt praimerite paariga (Tabel 2):

C70b1F – C70b2R. Amplifitseeritud fragment kloneeriti vektorisse pTZ57R/T, mille tulemusel saadi konstrukt pTZ57R/C70pheB. Seejärel eraldati *pheB* geen konstruktist pTZ57R/C70pheB, kasutades ensüümi *Eco130I*. Ligikaudu 1 kbp suurune *pheB* geeni fragment lõigati välja ja asendati Km^r (kanamütsiini resistentsus) geeniga, mis oli eelnevalt amplifitseeritud PCR meetodiga plasmiidist pUTmini-Tn5 Km2 praimeriga KmSac (Tabel 2) ning seejärel lõigatud ensüümiga *Ecl136II*. Enne Km^r geeni fragmendi ligeerimist tömbistati avatud konstrukti otsad *Eco130I*-ga. Saadud konstruktist pTZ57RΔC70pheB::km eemaldati insert ΔC70pheB::km ensüümidega *KpnI*-*PaeI* ja sisestati plasmiidseesse vektorisse pGP704, mis omakorda moodustas konstrukti pGP704ΔC70pheB::km. Järgnevalt viidi konjugatsiooni teel saadud konstrukt *E. coli* tüvest CC118λpir (Herrero *et al* 1990) *P. pseudoalcaligenes* tüvesse C70, kasutades helperplasmidi pRK2013 (Figurski, Helinski 1979). Transkonjugandid külvati söötmeplaatidele, mis sisaldasid kanamütsiini (50 µg/ml), naftaleeni graanuleid ja bensüülpenitsilliini (1500 µg/ml). Transkonjugante kontrolliti PCR meetodi abil, kasutades selleks primereid KmOc ja C70b1F (Tabel 2), lisaks veel *pheB* sisemisi primereid C70bF ja C70bR (Tabel 2). Konjugatsiooni katset viidi iseseisvalt läbi kolm korda.

Tabel 1. Käesolevas uurimuses kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tüvi või plasmiid	Genotüüp või konstruktsioon	Allikas või viide
<i>P. pseudoalcaligenes</i>		
C70	Metsiktüvi	Vedler <i>et al</i> 2013
C70Δ <i>pheB</i>	Mutantne tüvi, millel puudub <i>pheB</i> geen	käesolev töö
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZ ΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer, Roulland-Dussoix 1969
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am) recA1 λpir</i> phage lysogen	Herrero <i>et al</i> 1990
<u>Plasmiidid</u>		
pTZ57R/T	Kloneerimisvektor (Ap ^r)	Thermo Fisher Scientific
pUTmini-Tn5 Km2	mini-Tn5 Km2 (Ap ^r Km ^r) üle viiv plasmiid	De Lorenzo <i>et al</i> 1990

pGP704 L	Üle viiv plasmiid homologilise rekombinatsiooni jaoks	Pavel <i>et al</i> 1994
pRK2013	Helperplasmiid pGP704 L (Km ^r) konjugatsiooniks	Figurski, Helinski 1979
pTZ57R/C70pheB	pTZ57R/T, mis sisaldab tüvest C70 <i>pheB</i> operonist PCR-iga amplifitseeritud <i>pheB</i> geeni	käesolev töö
pTZ57RΔC70pheB::km	<i>pheB</i> geen tüvest C70 vektoris pTZ57R/T, mis on katkestatud Km ^r geeniga vektorist pUTmini-Tn5 Km ² , asendades <i>pheB</i> Eco 130I loodud fragmendi Km ^r geeniga	käesolev töö
pGP704ΔC70pheB::km	plasmiidne vektor pGP704, milles on ΔC70pheB::km, mis on omakorda eraldatud konstruktist pTZ57RΔC70pheB::km	käesolev töö

Ap^r – ampitsilliinile resistentne

Km^r – kanamütsiinile resistentne

Tabel 2. Käesolevas uurimuses kasutatud PCR praimerid

Praimer	Nukleotiidne järjestus (5'→3')	Viited
C70bF C70bR	TCACCGAGGACCTGCTCAAC CCGGGTTGACCTCGGCCAAG	käesolev töö
C70b1F C70b2R	CACCACCCTGATGCAAGGTCG ATCTCGAAGGCTTCGGTG	käesolev töö
KmSac KmOc	CAGGAGCTCGTTTCGATTTATTCAACAAAGCC TCGAGCAAGACGTTTCCC	Hõrak <i>et al</i> 2004 Saumaa <i>et al</i> 2006

2.9. Metsiktüve ja mutanttüve kasvatamine

Uuritavaid tüvesid kasvatati suletud süsteemis – 150 ml Erlenmeyer'i kolbides, mis sisaldasid 50 ml minimaalsöödet (1× mineraalainete segu M9, 1× mikroelementide segu (Bauchop,

Elsden 1960)) ning ainsa süsinikuallikana lisati kas 1.3 mM fenooli või 1.3 mM salitsülaati. Rakke kasvatati ringloksutil 30 °C juures. Bakterite kasvu näitavat optilist tihedust mõõdeti spektrofotomeetriliselt 580 nm juures.

2.10. Laboratoorse töö etapid

Alljärgnevalt on detailselt välja toodud käesoleva uurimistöö praktiline osa ehk *P. pseudoalcaligenes* tüve C70 *pheB* geeni suhtes mutanse tüve tegemine *knock-out* meetodiga ja selleks kasutatud laboritööd kronoloogilises järjestuses.

1. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 *pheB* geeni amplifitseerimine, ligeerimine ning elektroporatsioon vektorisse pTZ57R. Vektori eraldamine.
2. *pheB* geeni (u 1 kb) restrikteerimine vektorist pTZ57R/C70*pheB*. Välja lõigatud *pheB* geeni asendamine Km resistentsusgeeniga.
 - a) Km^r geeni amplifitseerimine PCR meetodiga plasmiidist pUTmini-Tn5 Km²; kontroll geelelektroforeesil.
 - b) Amplifitseeritud Km^r geenifragmendi restriktsioon.
 - c) Lõikuste kontroll (Km^r ja pTZ57R/C70*pheB*) agarosgeelil.
 - d) Klenow'i töötlus *pheB* geenifragmendi restriktsioonile.
 - e) SAP töötlus Km^r geenifragmendi restriktsioonile.
 - f) Vabanemaks puhvritest ja ensüümidest, mis segaksid DNA lõikude kokku ligeerimist, teostati restriktsioonisegude sadestamine.
 - g) Ligeerimine (restrikteeritud pTZ57RΔC70*pheB* + Km^r geenifragment, produktiks plasmiid pTZ57RΔC70*pheB*::km).
 - h) Ligeerimisegu sadestamine, et vabaneda elektroporatsiooni takistavatest komponentidest.
 - i) Elektroporatsiooniks vajaminevate rakkude (*E. coli* DH5α) kasvama panek ja nende ettevalmistus elektroporatsiooniks.
 - j) Elektroporatsioon (*E. coli* DH5α + vektor pTZ57RΔC70*pheB*::km) ja külv Km + LB söötmele.
 - k) Kloonide õigsuse kontroll PCR meetodil, kontroll agarosgeelil.
 - l) Õigest bakterikolooniast vektori eraldamine (pTZ57RΔC70*pheB*::km).
3. Vektorist pTZ57RΔC70*pheB*::km konstrukti ΔC70*pheB*::km restrikteerimine ja ligeerimine suitsiidvektorisse pGP704L.

- a) Vektori pGP704L avamine restriктаasidega ja konstrukti $\Delta C70pheB::km$ restrikteerimine, kontroll agarosgeelil.
- b) SAP töötlus DNA fragmentidele ja sadestamine.
- c) Ligeerimine (pGP704 sade + $\Delta C70pheB::km$ sade, produktiks pGP704 $\Delta C70pheB::km$).
- d) Ligeerimisegu sadestamine.
- e) Elektroporatsioonirakkude (*E. coli* CC118 λ pir) kasvama panek ja ettevalmistus.
- f) Elektroporatsioon (*E. coli* CC118 λ pir + vektor pGP704 $\Delta C70pheB::km$) ja külv Km + LB söötmele.
- g) Kloonide õigsuse kontroll PCR meetodil, kontroll agarosgeelil.

4. Konjugatsioon mutandi $\Delta C70pheB$ saamiseks.

- a) Kolme bakteritüve vajamineva koguse ettekasvatused, üleöö kultuurist ümberkylv uude LBsse.
- b) Ümberkylvist proovide võtmine 1.5 h, 2 h ja 2.5 h tunni möödudes – segades kokku 100 μ l igast kolmest tüvest, uuesti LB söötmele kasvama.
- c) Rakkude külvamine minimaalsöötmele, mis sisaldab Km ja kuhu lisatakse naftaleeni graanuleid.
- d) Tassidel moodustunud kolooniate külvamine minimaalsöötmele, millele on lisatud bensüülpenitsilliini (Bp) ja naftaleeni graanuleid.
- e) Minimaalsöötme + Km tassil, kuid mitte minimaalsöötme + Bp tassil kasvavate transkonjugantide kontrollimine PCR meetodiga, et tõestada korrektse mutante tüve olemasolu.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Katehhooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriva geeni (*pheB*) *knock-out* tüve konstrueerimine

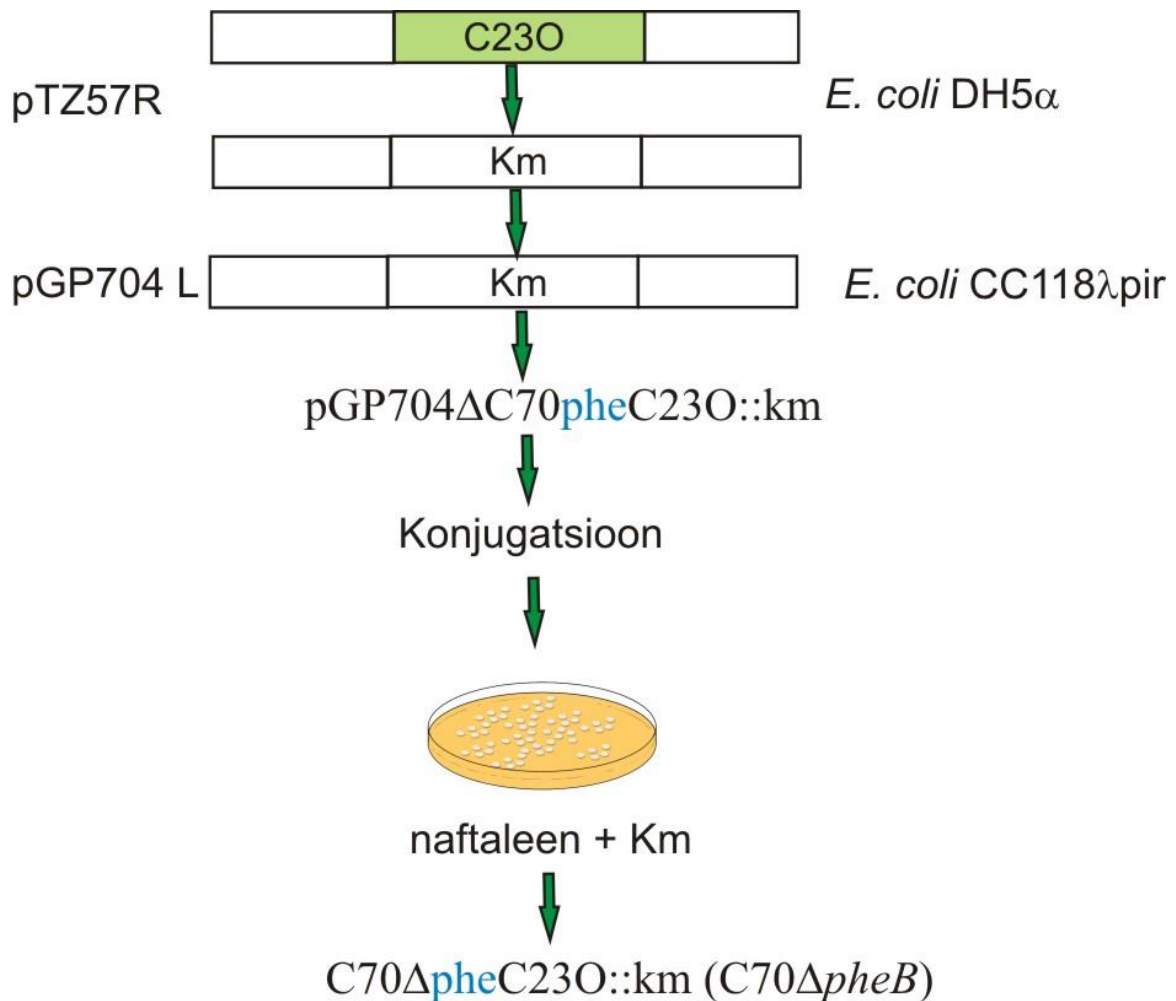
Fenooli ja salitsülaati lagundava *P. pseudoalcaligenes* C70 genoomi uuringust selgus, et antud tüvel on katehhooli lagundamiseks kaks katehhooli *meta*-rada, mis paiknevad bakteri kromosoomis. Fenooli lagundavas rajas tegutsevat C23O ensüümi kodeerib geen *pheB* ja naftaleeni lagundamise alumise raja (*sal* operon) C23O ensüümi kodeerib *nahH* geen (Joonis 3). Uuritava tüve mõlemad C23O ensüümid on aminohappelise järjestuse poolest üpris sarnased, 85% ulatuses identsed (Jõesaar *et al* 2017). Kirjanduses on näidatud, et mõned TOL plasmidi (pWW15, pWW53) kandvad *Pseudomonas*'e tüved omavad plasmidis kahte või

enamat *meta*-rada, seega mitut C23O ensüümi kodeerivat geeni (Osborne *et al* 1988; O'Donnell, Williams 1991). Kahjuks rohkemat infot duplitseerunud C23O-de ja nende funktsioneerimisest ühes rakus pole. Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas funktsioneerib uuritav tüvi, kui üks *meta*-raja võtmeensüümidest (C23O) on bakteri genoomist eemaldatud e „välja löödud“ (ingl *knock-out*). Selleks konstrueeriti mutanttüvi, kus fenooli operoni kuuluv C23O ensüümi kodeeriv *pheB* geen oli välja lõigatud.

Mutandi tegemiseks tehti konstrukt pGP704ΔC70*pheB*::km (Metoodika 2.8 ja Joonis 5). Kolmikristamine viidi läbi järgnevate tüvedega: 1) retsipienttüvi *P. pseudoalcaligenes* C70; 2) *E. coli* HB101, mis sisaldas konjugatsiooni abistavat plasmidi pRK2013; 3) doonortüvi *E. coli* CC118λpir, mis sisaldas plasmidi pGP704L/C70*pheB*::Km. Selektiooniks plaaditi rakke kanamütsiini (Km) sisaldavatele naftaleeni-minimaalsöötmega tassidele, millel olid võimelised kasvama vaid need Km^r rakud, milles homoloogilise rekombinatsiooni tagajärjel oli bakteri kromosoomis asuv C23O ensüümi kodeeriv *pheB* geen asendatud kanamütsiini resistentsusgeeniga.

Naftaleen-Km minimaaltassidele tekkinud kolooniaid külvati paralleelselt nii naftaleen-Km kui ka naftaleen-bensüülpenitsilliini tassidele. Bensüülpenitsilliini (Bp) sisaldavatele minimaaltassidele tehti külv selleks, et välistada need Km^r kolooniad, milles oli terve pGP704L/C70*pheB*::Km plasmid genoomi lülitunud (Joonis 5).

Järgnevalt kontrolliti PCR meetodil (Metoodika osa 2.8) vaid neid kolooniaid, mis kasvasid ainult naftaleen-Km tassidel. PCR jaoks kasutati kahte praimeride kombinatsiooni – C70bF/C70bR *pheB* geeni eemaldamise kontrollimiseks ja praimeripaari C70bF/KmOc (vt Tabel 2) kromosoomis oleva *pheB* geeni Km^r geeniga katkestatuse kontrollimiseks. Lisaks kontrolliti mutandi õigsust 16S rRNA geeni ja teiste metsiktüve kataboolsete geenide sekveneerimisega (teostas Jõesaar, M.).

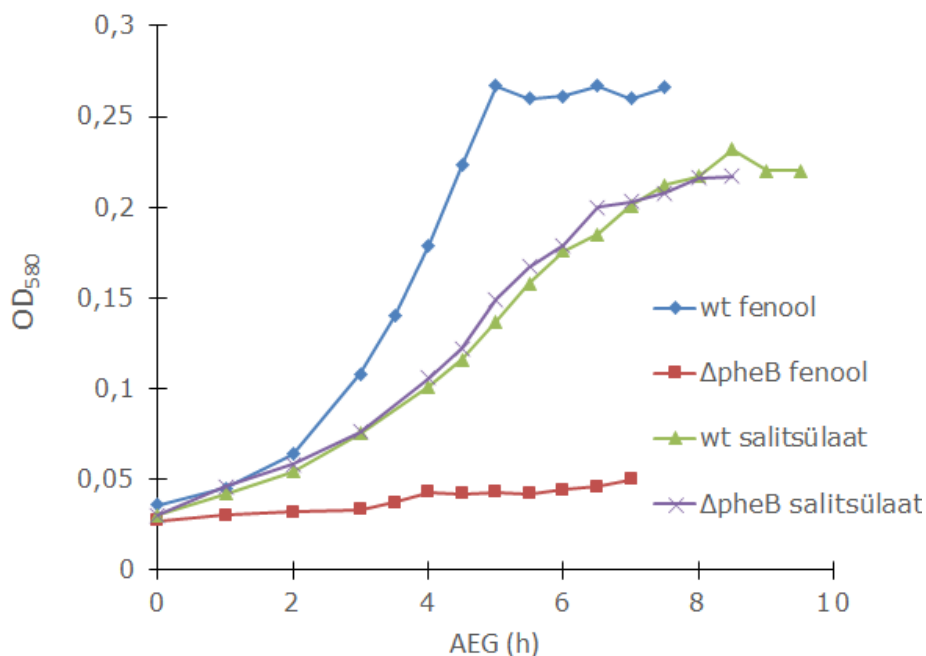


Joonis 5. Katehooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriva geeni suhtes puuduliku tüve $C70\Delta pheB$ konstrueerimise skeem *knock-out* meetodil

3.2. Mutanttüve ja metsiktüve kasv fenooli ja salitsülaadi minimaalsöötmetel

Metsiktüve ja mutanttüve fenoolil ja salitsülaadil kasvamise võime võrdlemiseks viidi läbi kasvatuskatse nende substraatide juuresolekul. Kuigi metsiktüvi lagundab naftaleeni, valiti substraadiks salitsülaat, sest naftaleen lahustub vees halvasti ning seepärast on salitsülaat kergemini kättesaadav süsinikuallikas. Kasvatused viidi läbi 1.3 mM substraatide kontsentratsioonil, kuna salitsülaadi kõrgem kontsentratsioon osutus uuritud tüvele toksiliseks (Jõesaar *et al* 2017). Ka kirjanduses on näidatud, et salitsülaat on bakteritele väga toksiline (Lee *et al* 2005).

Katse läbiviimiseks kasvatati uuritavaid tüvesid fenoolil ja salitsülaadil perioodilises kultuuris termosteeritud loksutil (150 p/min) 30 °C juures. Bakteri biomassi suurenemist mõõdeti spektrofotomeetriliselt. Saadud kasvukõverad on toodud joonisel 6.



Joonis 6. *P. pseudoalcaligenes* C70 metsiktüve ja mutandi C70ΔpheB kasvukõverad fenooli (1.3 mM) või salitsülaadiga (1.3 mM) minimaalsöötmes.

Jooniselt 6 on näha, et kõige suurem kasvukiirus on metsiktüvel fenoolil. Samas on salitsülaadil nii metsiktüve kui ka mutanttüve kasvukiirused sarnased. Mutanttüvi, kellel on fenooli raja katehhooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriv geen (*pheB*) eemaldatud, ei suuda enam fenoolil kasvada (Joonis 6) ning kasvukeskkond värvub tumepruuniks koguneva katehhooli tõttu, mida bakter ei suuda enam edasi lagunda ning see omakorda inhibeerib rakkude kasvu (Joonis 7).



Joonis 7. Foto üleöö kultuuridest (vasakult): metsiktüvi fenooliga minimaalsöötmes, mutanttüvi fenooliga minimaalsöötmes ja mutanttüvi salitsülaadiga minimaalsöötmes (kõikide substraatide kontsentratsioon oli 1.3 mM)

Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et salitsülaadi lagundamise raja ensüüm C23O (NahH) ei asenda fenoolil (üksiksubstraadil) kasvatamisel fenooli raja ensüümi C23O (PheB), mistõttu kasvukeskkonda koguneb katehool. Seda tõestati ka vaatluse all olevate geenide ekspressiooni määramisega qRT-PCR (kvantitatiivne reaalaja-PCR) meetodikaga (Jõesaar *et al* 2017).

Siit tekib aga küsimus, milleks on üldse bakteritel vaja duplitseerunud gene? Kirjanduses on täheldatud, et lisandunud geen või terve kataboolne rada annab eelise teiste bakterite ees, kellel on ainult üks vastav geen või rada. Jiménez koos kaastöötajatega (2014) tõestas, et lisakoopia katehooli 1,2-dioksügenaasi annab bakterile *Pseudomonas putida* mt-2 eelise, sest lisaensüüm aitab vähendada katehooli toksilisust rakus ning annab bakterile võime lagundada ka erinevate funktsionaalsete rühmadega katehooli. On näidatud ka, et topeltgeenide olemasolu tõstab organismide potentsiaali kohanemaks uute süsinikuallikatega (Patrauchan *et al* 2005). Jõesaar koos kaastöötajatega (2017) näitasid, et tüvi C70, kasvades fenooli ja salitsülaadi segasubstraadil, kasutab naftaleeni raja C23O ensüümi fenooli rajalt tuleva katehooli lagundamiseks ning seetõttu ei toimu katehooli kogunemist. Lisaks suutis uuritav tüvi kasvada ka kõrgetel substraatide kontsentratsioonidel (3 mM). Tuginedes kirjandusele ja Jõesaare *et al* tööle (2017), võib väita, et mitme C23O ensüümi kodeeriva geeni omamine annab *P. pseudoalcaligenes* tüvele C70 eelise segasubstraatidel (fenool ja salitsülaad) ja kõrgematel kontsentratsioonidel kasvamiseks, kuna teatavasti on looduses leiduvad aromaatsed ühendid segu- mitte üksiksubstraatide kujul.

4. KOKKUVÖTE

Aromaatsed ühendid jõuavad loodusesse peamiselt tööstustootmise tulemusena ning kuna need on toksilised enamikele elusorganismidele, on ilmselge, et neist ühenditest on vaja mingil viisil vabaneda. Seepärast uuritaksegi baktereid, kes on kohastunud aromaatsaid ühendeid lagundama. Biodegradatsiooni radade ja nende võtmeensüümide uurimine annab võimaluse välja valida ekstreemsetes tingimustes vastupidavad ja suurema biodegradatsiooni efektiivsusega bakterid, kasutamaks neid bioremediatsiooni eesmärgil.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida Läänemerest isoleeritud *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70, kes omab fenooli ja naftaleeni lagundamiseks kahte *meta*-rada. Ka teistes uurimustes on täheldatud, et bakterid, kel on topeltgeenid ja -rajad, on enamasti eelisolukorras ühte geenikoopiat või rada omavate bakterite suhtes. Uuritavas tüves kahe katehhooli 2,3-dioksügenaasi ensüümi funktsioneerimise kindlaks tegemiseks konstrueeriti metsiktüvest *knock-out* meetodiga mutanttüvi, kelles puudus fenooli raja katehhooli 2,3-dioksügenaasi geen. Nii mutant- kui metsiktüve kasvatati minimaalsöötmetel, kus ainsaks süsinikuallikaks oli fenool või salitsülaad. Metsiktüvi kasvas kõige paremini fenooliga söötmel ning nii mutant- kui metsiktüvede kasv salitsülaadil osutus küllaltki ühesuguseks. Vaatamata C23O ensüümi kodeeriva teise geeni olemasolule ei suutnud mutanttüvi fenoolil kasvada. Seega võib saadud tulemustest järeldada, et erinevate metaboolsetes radades asuvad C23O ensüümid ei kompenseeri teineteise tööd, st mutanttüve kasvatamisel üksiksubstraadil (fenool) ei suuda naftaleeni rajas asuv C23O lagundada fenooli degradatsiooni produktina tekkivat katehhooli.

Käesolevat uurimistööd jätkates tuleb edasi uurida, miks fenoolil kasvades lagundatakse fenool fenooli hüdroksülaasiga kuni C23O ensüümini, kuid selle ensüümi puudumisel fenooli rajas ei aktiveeru naftaleeni alumine lagundamisrada, mis fenooli lagundamisrajast tulenevat katehhooli võiks edasi lagundada. Oletatav põhjendus eelmainitud olukorrale võib olla, et üksiksubstraadil kasvades pole bakteril naftaleeni, mis aktiveeriks naftaleeni lagundamisraja. Hüpoteesi kinnitamiseks või ümber lükkamiseks on seega vaja läbi viia mitmeid katseid.

5. SUMMARY

Higher concentration of aromatic compounds end up in nature mostly as a result of industrial production and majority of those compounds are toxic to organisms located in this area. However, there are bacteria that are adapted to degrade aromatic compounds. Studying different biodegradation pathways and key enzymes enables us to select bacteria with higher

biodegradation effectivity that can survive in extreme conditions and can be used in bioremediation.

The main aim of the current work was to study the strain *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 which has been isolated from the Baltic Sea and which degrades phenol and naphthalene via two alternative catechol *meta*-routes. In other studies, there have also been observations that bacteria who possess additional genes or routes are in preponderant position compared to strains with only one gene copy or route. A mutant strain without *pheB* was constructed from wild type strain by using *knock-out* method in order to make sure how exactly the two copies of catechol 2,3-dioxygenases (C23O) function. The mutant strain did not possess the C23O coding gene of the phenol degradation pathway. Both mutant and wild type strain cells were grown on minimal media where phenol or salicylate had been added. The wild type strain preferred growing on media, which included phenol, whereas both mutant and wild type strains grew similarly well on media containing salicylate. Possessing only one of C23O gene copies, mutant strain could not grow on media containing phenol. Therefore, originating from those results, it can be stated that the studied strain possessing only one route's C23O cannot function in the proper way anymore – naphthalene route's C23O in the mutant strain is not able to degrade catechol while growing on phenol.

6. KASUTATUD MATERJALID

Adams, M. H. 1959. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers, lk 445-447.

Al-Khalid, T., M.H. El-Naas 2012. Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review. – Critical Reviews in Environmental Science and Technology nr 42, lk 1632-1690.

Aromaatsed ühendid 2015 – <https://et.wikipedia.org/wiki/Areenid>. Vaadatud 28.12.2015.

Bauchop, T., S.R. Elsdon 1960. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. – Journal of General Microbiology nr 23, lk 457-469.

Boyer, H.W., D. Roulland-Dussoix 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. – Journal of Molecular Biology nr 41, lk 459-472.

de Lorenzo *et al* = de Lorenzo, V., J. Herrero, U. Jakubzik, K.N. Timmis 1990. MiniTn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. – Journal of Bacteriology nr 172, lk 6568-6572.

Deepwater horizon oil spill 2016 – https://en.wikipedia.org/wiki/Deepwater_Horizon_oil_spill. Vaadatud 21.03.2016.

- Figurski, D.H., D.R. Helinski 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. – Proceedings of the National Academy of Sciences USA nr 76, lk 1648-1652.
- Habe, H., T. Omori 2003. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. – Bioscience, Biotechnology and Biochemistry nr 67, lk 225-243.
- Harayama, S., M. Rekik 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. – Journal Biological Chemistry nr 264, lk 15328-15333.
- Heinaru, Ain 2012. Geneetika õpik kõrgkoolile. Tartu: Tartu Ülikool.
- Heinaru, Eeva, Eve Vedler 2011. Praktilisi töid mikrobioloogiast. Praktikumi juhend. Tartu: AS Atlex.
- Herrero *et al* = Herrero, M., V. de Lorenzo, K.N. Timmis 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. – Journal of Bacteriology nr 172, lk 6557-6567.
- Hõrak *et al* = Hõrak, R., H. Ilves, P. Pruunsild, M. Kuljus, M. Kivisaar 2004. The ColR–ColS two-component signal transduction system is involved in regulation of Tn4652 transposition in *Pseudomonas putida* under starvation conditions. – Molecular Microbiology nr 54, lk 795-807.
- Jiménez *et al* = Jiménez, J.I., D. Pérez-Pantoja, M. Chavarria, E. Díaz, V. de Lorenzo 2014. A second chromosomal copy of the *catA* gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol. – Environmental Microbiology nr 16, lk 1767-1778.
- Juhanson, Jaanis 2010. Impact of phytoremediation and bioaugmentation on the microbial community in oil shale chemical industry solid waste. (doktoridissertatsioon). Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Jõesaar *et al* = Jõesaar, M., S. Viggor, E. Heinaru, E. Naanuri, M. Mehike, I. Leito, A. Heinaru 2017. Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. – PLoS ONE nr 12(3): e0173180.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0173180>. Vaadatud 21.03.2017.
- Katehool – <https://en.wikipedia.org/wiki/Catechol>. Vaadatud 28.12.2015.
- Keskkonna biotehnoloogia 2005 – <http://gt.inkblue.net/Vee-%20ja%20mullamikrobioloogia/loeng10-11.pdf>. Vaadatud 25.03.2016.
- Kita *et al* = Kita, A., S. Kita, I. Fujisawa, K. Inaka, T. Ishida, K. Horiike, M. Nozaki, K. Miki 1999. An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt- 2. – Structure nr 7, lk 25-34.

Laak, Kaarel 2013. Alküültransferaasi-sarnase valgu osalus mutatsiooniprotsessides bakteris *Pseudomonas putida*. (bakalaureusetöö). Tartu: Tartu Ülikool.

Lehiste, Merit 2004. Katehhooli 2,3-dioksügenaasi geenide mitmekesisus fenooli ja *p*-kresooli lagundavates bakteritüvedes. (bakalaureusetöö). Tartu: Tartu Ülikool.

Li *et al* = Li, X.J., P.J. Li, X. Lin, C.G. Zhang, Q. Li, Z.Q. Gong 2008. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. – Journal of Hazardous Materials nr 150, lk 21-26.

Microbial Biodegradation 2008. Genomics and Molecular Biology. Toimetanud Eduardo Díaz. Norfolk: Caister Academic Press.

Mishra *et al* = Mishra, V., R. Lal, C. Srinivasan 2001. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. – Critical Reviews in Microbiology nr 27, lk 133-166.

Nair *et al* = Nair, C. I., K. Jayachandran, S. Shashidhar 2008. Biodegradation of phenol. – African Journal of Biotechnology nr 7, lk 4951-4958.

O'Donnell, K.J., P.A. Williams 1991. Duplication of both *xyI* catabolic operons on TOL plasmid pWW15. – Journal of General Microbiology nr 137, lk 2831-2838.

Osborne *et al* = Osborne, D.J., R.W. Pickup, P.A. Williams 1988. The presence of two complete homologous *meta* pathway operons on TOL plasmid pWW53. – Journal of General Microbiology nr 134, lk 2965-2975.

Patrauchan *et al* = Patrauchan, M.A., C. Florizone, M. Dosanjh, W.W. Mohn, J. Davies, L.D. Eltis 2005. Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: Redundancies and convergence. – Journal of Bacteriology nr 187, lk 4050-4063.

Pavel *et al* = Pavel, H., M. Forsman, V. Shingler 1994. An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on *para*-substituted methylphenols. – Journal of Bacteriology nr 176, lk 7550-7557.

Pessione *et al* = Pessione, E., G.M. Giuffrida, R. Mazzoli, P. Caposio, S. Landolfo, A. Conti, C. Giunta, G. Gribaudo 2001. The catechol 1,2-dioxygenase system of *Acinetobacter radioresistens*: isoenzymes, inductors and gene localisation. – Biological Chemistry nr 382, lk 1253-1261.

Saumaa *et al* = Saumaa, S., K. Tarassova, M. Tark, A. Tover, R. Tegova, M. Kivisaar 2006. Involvement of DNA mismatch repair in stationary phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. – DNA Repair nr 5, lk 505-514.

Sonn, Elise 2005. Fenoolilagundajate bakterite ja fenooli hüdroksülaaside fülogeneetilise mitmekesisus. (bakalaureusetöö). Tartu: Tartu Ülikool.

Tover, Andres 2008. Geneetika praktikum. Praktikumi juhend. Tartu: Sulemees OÜ.

van Schie, Paula M., L.Y. Young 2000. Biodegradation of phenol: Mechanisms and Applications. – Bioremed nr 4, lk 1-8.

Vedler *et al* = Vedler, E., E. Heinaru, J. Jutkina, S. Viggor, T. Koressaar, M. Remm, A. Heinaru 2013. *Limnobacter* spp. as newly detected phenol-degraders among Baltic Sea surface water bacteria characterised by comparative analysis of catabolic genes. – Systematic and Applied Microbiology nr 36, lk 525-532.

Viikmaa, Mart, Urmas Tartes 2008. Bioloogia gümnaasiumile II osa. Tartu: Eesti Loodusfoto.

Widada *et al* = Widada J., H. Nojiri, T. Omori 2002. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotics-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. – Applied Microbiology and Biotechnology nr 60, lk 45-59.

Williams, P.A., K. Murray 1974. Metabolism of benzoate and the methyl benzoates by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. – Journal Bacteriology nr 120, lk 416-423.

Williams, P.A., J.R. Sayers 1994. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation on *Pseudomonas*. – Biodegradation nr 5, lk 195-217.

Yen, K.-M., I.C. Gunsalus 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. – Proceedings of the National. Academy of Sciences USA nr 79, lk 874-878.

Yen, K.-M., C.M. Serdar, 1988. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonas*. – CRC Critical Reviews in Microbiology nr 15, lk 247-268.

7. LISA 1

Eesti Teadusagentuurile esitatud Noore uurija stipendiumi taotlus

Milline on Sinu varasem kokkupuude uurimistöödega?

Minu varasemaks kokkupuuteks uurimistöödega on põhikoolis kirjutatud loovtöö teemal „Maalihked“. Loovtöö sisaldas nii teoreetilist ehk referatiivset kui ka praktilist töö osa. Töö valmis aastal 2012 ning töö juhendajaks oli TKoG geograafiaõpetaja Sirje Peterson.

Kirjelda oma tulevast uurimistööd.

Teema on praeguseks juba valitud ja juhendajaks on Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi teadur. Teema valikul oli algseks lähtekohaks huvi geneetiliselt muundatud organismide vastu ja soov saada juba gümnaasiumis molekulaar- ja/või mikrobioloogiaalase laboritöö kogemus. Kitsam uurimisvaldkond on seotud TÜ poolse juhendaja Merike Jõesaare tööühma tööga, kus uurimissuunaks on bakter nimega *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 ning selles tüves leiduv üleliigne katehhooli 2,3-dioksügenaasi geen. Minu töö üheks osaks on vastava geenikonstrukti manipuleerimine ja selle avaldumise mõju uurimine. Töö TÜ poolseks juhendajaks on PhD Merike Jõesaar ja koolipoolseks kaasjuhendajaks on Tartu Jaan Poska Gümnaasiumi bioloogiaõpetaja Lauri Mällo.

Põhjenda oma valikut. Miks on selle uurimine vajalik ja miks see sind huvitab?

Selle uurimuse tulemusel saab teada, milleks on antud bakteril vaja üleliigset katehhooli 2,3-dioksügenaasi geeni ning mis juhtub bakteriga selle geeni puudumisel. Töö praktiline osa on uuritavalt bakterilt üleliigse geeni eemaldamine ning temaga hilisemalt toimivate muudatuste jälgimine.

Sealjuures huvitabki mind just laboris praktilises töös osalemine ja seal vajaminevate oskuste omandamine.

Kui oluline on Teadusagentuuri poolne toetus uurimistöö elluviimisel?

Toetus on väga oluline, sest tänu toetuserahadele saaks kaetud uurimistööks vajaminevate töövahendite hankimine ja TÜ poolse juhendaja töötasu. Kuna töö algsetes etappides on vaja omandada elementaarsed laboritöö oskused, mille osas on vaja kindlasti juhendaja ajalist panust, ning ka töö põhiosa on ajamahukas, siis oleks käesolev stipendium väga suureks abiks

õppimise käigus kuluvate materjalide soetamiseks ning TÜ poolse juhendaja töö tasustamiseks.

Juhendajaga on kokkulepped juba tehtud ning reaalne töö laboris peamiste töövõtete omandamiseks käib alates käesoleva aasta septembrikuu lõpust.