

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

*Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdes regulācijas izpēte  
stresa apstākļos izmantojot zaļā fluorescentā proteīna  
reportiersistēmu.

Maģistra darbs

Autors: Māra Biķerniece  
Stud. apl. Nr. mb11109  
Darba vadītājs: Prof., Dr.biol. Uldis Kalnenieks

RĪGA 2023

## SATURS

Kopsavilkums.....	3
Summary .....	4
Ievads .....	5
1. Literatūras apskats.....	7
1.1. <i>Zymomonas mobilis</i> vispārīgs raksturojums .....	7
1.2. Stresa atbildes reakcijas .....	9
1.2.1. Specifiskās stresa atbildes reakcijas.....	9
1.2.1.1. Etanola stress.....	9
1.2.1.2. Osmotiskais stress .....	10
1.2.2. Vispārīgā stresa atbildes reakcija .....	12
1.3. Elektronu transporta ķēde .....	14
1.3.1. II tipa NAD(P)H dehidrogenāze .....	15
1.3.2. Citohroms <i>bd</i> .....	16
1.3.3. Citohroms <i>bc<sub>1</sub></i> .....	18
1.3.4. Citohroma <i>c</i> peroksidāze.....	20
1.3.5. Fizioloģiskā loma .....	21
2. Materiāli un metodes.....	23
2.1. Plazmīdas un baktēriju celmi .....	23
2.2. Kultivēšana.....	24
2.3. Reāģenti.....	26
2.4. Materiāli .....	28
2.5. <i>Zymomonas mobilis</i> genomiskās DNS izdalīšana.....	29
2.6. Polimerāzes ķēdes reakcija .....	29
2.7. Elektroforēze agarozes gēlā .....	31
2.8. PCR produkta attīrīšana .....	31
2.9. Plazmīdu un PCR produktu restrikcija.....	31
2.10. Ligēšana .....	32
2.11. Kompetentu <i>Escherichia coli</i> DH5α transformācija.....	33
2.12. Plazmīdu izdalīšana.....	34
2.13. Plazmīdu pārbaude ar restrikcijas metodi .....	34
2.14. <i>Zymomonas mobilis</i> transformācija ar elektroporācijas metodi.....	36
2.15. Šūnu biomasas mērīšana .....	36
2.16. Fluorescences mērījumi .....	37
2.17. Šūnu membrānu paraugu pagatavošana ar ultraskaņu .....	37
2.18. Elpošanas aktivitātes noteikšana .....	38
2.19. Olbaltumvielu koncentrācijas mērīšana .....	39
2.20. Programmas un statistikas testi .....	39
3. Rezultāti .....	41
3.1. Reportiersistēmas izveide un pārbaude.....	41
3.2. Stresa apstākļu ietekme uz augšanu .....	42
3.3. Stresa apstākļu ietekme uz elpošanas ķēdes komponentu promoteru aktivitāti... 43	
3.4. Stresa apstākļu ietekme uz II tipa NADH dehidrogenāzes aktivitāti.....	48
4. diskusija .....	49
Secinājumi.....	51
Pateicības.....	52
Literatūras saraksts.....	53
Pielikumi .....	63

## KOPSAVILKUMS

*Zymomonas mobilis* ir etanologēna baktērija ar potenciālu pielietojumu biodegvielas ražošanā. Lai izpētītu elpošanas ķēdes lomu pie etanola un sāls stresa apstākļiem tika izveidota reportierģēnu sistēma ar elpošanas ķēdes komponentu promoteriem un EGFP. Iegūtie dati liecina ka visspēcīgākais promoters ir II tipa NADH dehidrogenāzei (Ndh). Pārējo apskatīto komponentu citohroma *bd*, citohroma *bc<sub>1</sub>* un citohroma *c* peroksidāzes promoteru aktivitāte bija vāja. Pie stresa visu promoteru aktivitāte samazinājās, ar izteiktāku efektu pie sāls stresa, kas varētu būt saistīts ar oksidatīvā pēcstresa samazināšanu. Ndh enzīma aktivitāte pie sāls stresa pieauga. Tas varētu būt saistīts ar post-translācijas regulāciju. *Zm6-ndh* pie sāls stresa aug labāk par *Zm6*, kas liecina ka Ndh aktivitāte neuzlabo sāls stresa toleranci.

**Atslēgas vārdi:** *Zymomonas mobilis*, elpošanas ķēde, NaCl stress, etanola stress

## SUMMARY

*Zymomonas mobilis* is an ethanologenic bacterium with potential applications in biofuel production. To investigate the role of the respiratory chain under ethanol and salt stress conditions, a reporter gene system with respiratory chain protein promoters and EGFP was created. Results show that the strongest promoter is type II NADH dehydrogenase (Ndh). Activity of cytochrome *bd*, cytochrome *bc<sub>1</sub>* and cytochrome *c* peroxidase promoters was weak. Under stress, the activity of all promoters decreased, with a more pronounced effect under salt stress, which could be related to the reduction of oxidative post-stress. Ndh enzyme activity increased under salt stress. This could be due to post-transcription regulation. *Zm6-ndh* strain grows better than *Zm6* under salt stress, which indicates that Ndh activity does not improve salt stress tolerance.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*, respiratory chain, NaCl stress, ethanol stress

## IEVADS

*Zymomonas mobilis* ir obligāti fermentatīvs mikroorganisms ar potenciāliem biotehnoloģiskajiem pielietojumiem (Kalnenieks et al., 2020). Baktērijai ir raksturīgs straujš metabolisms un līdz pat 98% no uzņemtās glikozes var tikt izmantots etanola produkcijai (Sahm et al., 2006).

Lai izmantotu šo baktēriju rūpniecībā, viens no metaboliskās inženierijas uzdevumiem ir izprast *Zymomonas mobilis* stresa atbildes regulāciju un uz paaugstināt tās stresa noturību. Augsta tolerance pret etanolu ir vēlama īpašība izmantošanai rūpnieciskajā etanola fermentācijā. Labāka izpratne par molekulārajiem mehānismiem, kas veicina *Zymomonas mobilis* izturību pret tās vielmaiņas galaproduktu, pavērtu iespēju tālākiem ģenētiskiem uzlabojumiem. Etanola produkcijai no lignocelulozes hidrolizāta mikroorganismam nepieciešams uzlabot sāls stresa noturību, kas dabiski ir zema (Fuchino and Bruheim, 2020). Paaugstinātas sāļu koncentrācijas hidrolizātā veidojas priekšapstrādes laikā. Papildus attīrīšana no sāļiem sadārdzina ražošanas procesu un padara to neekonomisku (Fuchino and Bruheim, 2020).

Pētījumi liecina ka *Zymomonas mobilis* elpošanas ķēde ir iesaistīta oksidatīvā stresa atbildes reakcijās (Kovtuna et al., 2022; Strazdina et al., 2012) un spēlē lomu etanola (He et al., 2012) un osmotiskā stresa noturībā (Hayashi et al., 2015). Dažādiem stresa faktoriem ir novērota saistība ar oksidatīvā pēcstresa veidošanos (Hong et al., 2019). Viens no skābekļa aktīvo formu avotiem ir elektronu transporta ķēdes enzīmi (Imlay, 2008) Papildus tam elpošanas ķēdes metaboliskā inženierija arī ir potenciāli svarīgs veids kā šūnās kontrolēt redoks ekvivalentu līdzsvaru, ATP produkciju un biomasas veidošanos (Kalnenieks et al., 2019).

Elpošanas ķēdes aktivitātes pētīšanai pie etanola un NaCl stresa apstākļiem tika izveidota reportierģēnu sistēma ar II tipa NAD(P)H dehidrogenāzes, citohroma *bd*, citohroma *bc<sub>1</sub>* un citohroma *c* peroksidāzes promoteriem un reportierģēnu zaļo fluorescento proteīnu (*engineered green fluorescent protein*, EGFP). Šī pieeja tika izvēlēta, jo atsevišķu elpošanas ķēdes enzīmu izpēti ir grūti veikt ar citām pieejām.

**Mērķis:** Noskaidrot etanola un sāls stresa radīto ietekmi uz *Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdes gēnu ekspresiju *Zymomonas mobilis* celmos ar dažādu elpošanas ātrumu un izturību pret oksidatīvo stresu.

### **Uzdevumi:**

1. Izveidot reportierģēna sistēmu ar elpošanas ķēdes gēnu promoteriem pirms zaļā fluorescentā proteīna(EGFP)

2. Transformēt *Zymomonas mobilis* celmus ar iegūtajām plazmīdām
3. Izvērtēt celmu augšanu un EGFP fluorescences izmaiņas pie etanola un NaCl stresa apstākļiem.
4. Salīdzināt *ndh* promotera aktivitātes izmaiņas ar II tipa NADH dehidrogenāzes aktivitāti membrānās.

Darbs izstrādāts LU MBI Mikroorganismu Bioenerģētikas laboratorijā Prof., Dr.biol. Ulda Kalnenieka vadībā.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. *Zymomonas mobilis* vispārīgs raksturojums

*Zymomonas mobilis* ir fakultatīvi anaeroba, gramnegatīva nūjiņveida baktērija, kurai raksturīgs straujš obligāti fermentatīvs metabolisms. Tā pieder *Alphaproteobacteria* klasei, *Sphingomonadales* kārtai un *Sphingomonadaceae* dzimtai (De Ley and Swings, 1977; Kosako et al., 2000). Mikroorganisms dabā sastopams tropu reģionos rūgstošās ar cukuriem bagātās augu sulās un tiek izmantots alkoholisko dzērienu ražošanā (Sahm et al., 2006).

*Zymomonas mobilis* ir raksturīgi relatīvi vienkārši metabolie ceļi un salīdzinoši mazs genoms (Kalnenieks et al., 2020). Mikroorganismam ir aptuveni divus miljonus bāzu pāru gara cirkulāra hromosoma un, atkarībā no celma, 2 līdz 8 plazmīdas (Yang and Zhang, 2018). Darba izstrādei izmantots Zm6 ATCC 29191 celms, kuram NCBI datu bāzē ir norādītas 3 plazmīdas. Kopā Zm6 celmam ir 1766 identificēti gēni (Desiniotis et al., 2012) Neseni pētījumi liecina ka *Zymomonas mobilis* hromosoma varētu būt poliploīdā stāvoklī (Fuchino et al., 2021).

*Zymomonas mobilis* ir ierobežots substrātu loks, kā oglekļa avotus tā izmanto glikozi, fruktozi un saharozi. Asimilētos substrātus anaerobā vidē mikroorganisms pārveido augstās koncentrācijās etanola un ogļskābās gāzes, izmantojot Entnera – Duderova (ED) glikolīzes ceļu un tālākās piruvātdekarboksilāzes un alkoholdehidrogenāzes reakcijas (Sahm et al., 2006). ED glikolīzes ceļā atšķirībā no Embdena – Meijerhofs – Parnasa (EMP) ceļu no viena mola glikozes tiek iegūts 1 mols nevis 2 moli ATP (Romano et al. 1996). *Zymomonas mobilis* ir vienīgais zināmais mikroorganisms, kurš ED ceļu izmanto anaerobi. Glikolīzes reakcijām *Zymomonas mobilis* ir raksturīga minimāla alostēriskā kontrole (Kalnenieks et al., 2020). ED ceļa enzīmi mikroorganismam tiek ekspresēti konstitutīvi un sastāda līdz pat 50% no kopējā proteīnu sastāva (An et al., 1991). Lielākā daļa glikolīzē radītā piruvāta tālāk tiek pārveidoti par acetaldehīdu un ogļskābo gāzi ar piruvātdekarboksilāzes palīdzību, kas ir galvenais enzīms etanola fermentācijā pēc ED ceļa. Tā katalītiskā aktivitāte ir atkarīga no tiamīna difosfāta un Mg (II) joniem. (Sahm et al., 2006). Acetaldehīda reducēšanu par etanolu nodrošina divi alkohola dehidrogenāzes (ADH) izoenzīmi: ADH I, kurš aktīvajā centrā satur cinku, un ADH II ar dzelzs jonu aktīvajā centrā. Etanola oksidēšanās reakcijas laikā NADH tiek oksidēts par NAD<sup>+</sup> (Neale et al., 1986). Šīs reakcijas reakcijas līdzsvara konstante ir  $K_{eq}$  ir  $6,92 \times 10^{-12} M$ , līdz ar to reakcijas līdzsvars ir novirzīts uz etanola sintēzes pusi (Burton, 1974) ADH izoenzīmi sastāda 2 – 5% no kopējiem *Z. mobilis* šūnas proteīniem (Mackenzie et al., 1989). ADH I

līmenis ir augstāks augšanas fāzē, un stacionārā fāzē šūnās samazinās un pieaug ADH II aktivitāte (An et al., 1991).

Tikai neliela daļa piruvāta ar piruvāta dehidrogenāzes palīdzību tiek pārveidota acetilkoenzīmā A. *Zymomonas mobilis* Krebsa cikls ir nepilns un nodrošina galvenokārt sintēzes vajadzības. Oksidatīvā zara pēdējais metabolīts ir alfa-ketoglutarāts, savukārt reduktīvajā zarā – sukcināts. Līdz ar to NAD(P)H vienīgais avots ir glikolīze. (Dawes and Large, 1970). Mikroorganisms arī nav spējīgs veikt glikoneoģenēzi (Sahm et al., 2006) un arī pentožu fosfātu ceļš ir nepilns, jo iztrūkst oksidatīvais zars (Jacobson et al., 2019).

*Zymomonas mobilis* ir raksturīgs atjūgtais metabolisms, jeb straujš substrātu uzņemšanas ātrums un zema biomasas veidošanās. Katabolisms ir vāji saistīts ar biosintēzes vajadzībām un pie anaerobiem un mikroaerofiliem apstākļiem līdz pat 96 – 98% no patērētās glikozes var tikt metabolizētas etanolā. Etanola produkcijas ātrums var sasniegt 0,75 – 1,0 μmol glikozes uz mg sausnes minūtē eksponenciāli augošās kultūrās, kas vairākkārt pārsniedz specifisko etanola veidošanās ātrumu raugos (Rogers et al., 1982). Bez minētajām *Zymomonas mobilis* ir vairākas citas industriālam pielietojumam lietderīgas īpašības kā tolerance pret augstām etanola koncentrācijām (līdz pat 13-15%), izturība pret koncentrētu substrātu (līdz pat 30% glikozes) un dažādiem pH (3,8-7,5) (Sahm et al., 2006). Mikroorganisms samērā viegli pakļaujas ģenētiskai modifikācijai (Romano and Conway, 1996).

Augstā etanola produkcija rada perspektīvu *Zymomonas mobilis* izmantot biodeģvijas ražošanai. Baktērijai ir izveidoti arī celmi, kuri spēj metabolizēt no lignocelulozes iegūtos monosaharīdus, kā arī uzrāda paaugstinātu izturību pret lignocelulozes hidrolizātā atrodamajiem inhibitorajiem savienojumiem, paaugstinātu temperatūru, paaugstinātu etanola koncentrāciju un oksidatīvo stresu (Charoensuk et al., 2017; Hayashi et al., 2015; Tan et al., 2016; Yang et al., 2014).

Mikroorganismu potenciāli var izmantot kā biokatalizatoru arī citu lietderīgu produktu ieguvei, piemēram, piruvāta, acetāta, laktāta, sorbitola, sukcināta un levāna sintēzei (Lee et al., 2010). Šobrīd notiek arī pētījumi par heterologu antimikrobiālo peptīdu produkciju *Zymomonas mobilis* mīksto audu infekciju ārstēšanai (Rutkis et al., 2022). Tā kā *Zymomonas mobilis* 2-5% no substrāta izmanto biomasas ražošanai un pastāv iespēja nodrošināt augstus produktu iznākumus (Kalnenieks, 2006). Straujais ED glikolīzes ceļš nodrošina pietiekamu adenozīna trifosfātu (ATF) sintēzi, lai daļu no saražotās enerģijas disipētu un reģenerētu adenozīna difosfātu (ADF) un saglabātu metabolītu līdzsvaru šūnā. Līdz ar to iespējams daļu no disipētā ATF varētu izmantot interesējošā produkta sintēzes vajadzībām (Kalnenieks, 2006). Tajā pat laikā, lai uzlabotu mikroorganisma izturību industriālos apstākļos un samazinātu ražošanas

izmaksas, nepieciešams izpētīt baktērijas regulatoros mehānismus stresa apstākļos kā osmotiskā stresa un paaugstinātā galaprodukta, etanola, koncentrācijās (Taylor et al., 2009).

## 1.2. Stresa atbildes reakcijas

Baktērijas dabā saskaras ar dažādiem nelabvēlīgiem apstākļiem, piemēram, barības vielu ierobežojumiem, osmotisko spiedienu, sāls stresu, paaugstinātu temperatūru, skābēm, vielmaiņas galaproduktiem un antibakteriāliem līdzekļiem. Baktērijas spēj pielāgoties šīm nelabvēlīgajām vides izmaiņām, izmantojot stresa faktoram specifiskus un vispārējus aizsargmehānismus. Baktēriju stresa reakciju regulēšana notiek transkripcijas, translācijas un pēctranslācijas līmenī, izraisot izmaiņas gēnu ekspresijā, olbaltumvielu aktivitātē un šūnu metabolismā. Šīs baktēriju stresa reakcijas veicina izturību pret stresu un šūnu bojājumu novēršanu (Dawan and Ahn, 2022).

### 1.2.1. Specifiskās stresa atbildes reakcijas

Daudzas stresa adaptācijas ir īpaši pielāgotas stresa izraisītājam. Piemēram, augsta temperatūra inducē šaperonus un proteāzes, kas degradē paaugstinātās temperatūras ietekmē nepareizi salocītus vai agregētus proteīnus. DNS bojājumi inducē SOS atbildi DNS bojājumu labošanai. Barības substrātu trūkums veicina regulonu aktivāciju, kas ļauj novirzīt vielmaiņu, lai mazinātu vajadzību pēc trūkstošās barības vielas (Gottesman, 2019).

#### 1.2.1.1. Etanola stress

Etanols ir šķīdinātājs, kas var ietekmēt membrānas stabilitāti kā arī makromolekulu, piemēram, proteīnu, nukleīnskābju un lipīdu, struktūru un funkcijas. Tas izraisa gan membrānas integritātes samazināšanos, gan vielmaiņas procesu traucējumus (Yang et al., 2013). Etanols ir galvenais *Zymomonas mobilis* vielmaiņas galaprodukts. Mikroorganisms spēj izturēt 13-16 % augstas etanola koncentrācijas (Rogers et al., 1982). Izturībā lomu spēlē *Z. mobilis* citoplazmas membrānas sastāvā esošie hopanoīdi, kuri veido 50% no kopējā organisma lipīdu satura. Šīs molekulas nodrošina membrānas caurlaidības homeostāzi pie augstākām etanola koncentrācijām (Brenac et al., 2019) Yang et al. (2013) gan atrada ka hopanoīda biosintēzes gēnu ekspresijas regulēšana bija saistīta ar augšanas fāzi, nevis apstrādi ar etanolu.

Transkriptomiskie pētījumi *Z. mobilis* norāda ka reakcija uz etanolu ir dinamiska, sarežģīta un ietver daudzus gēnus no dažādām funkcionālām kategorijām. Yang et al. (2013) ziņo ka etanola stresa stāvoklī novērota paaugstināta šaperonu ekspresija. Lielākā daļa gēnu, kas uzrādīja difrencētu ekspresiju pie etanola stresa, reaģē arī uz pāreju no eksponenciālās fāzes

uz stacionāro. Daudzi no gēniem ar samazinātu ekspresiju ir saistīti ar translāciju un ribosomu biogēnēzi, savukārt paaugstinātu ekspresiju uzrāda ar šūnu procesiem un lielākoties saistīti gēni (Yang et al., 2013).

*Z. mobilis* pakļaušana augstas koncentrācijas etanola iedarbībai izraisa vairāku stresa proteīnu un to gēnu *adhB*, *dnaK* un *groESL* indukciju, kuri kodē alkohola dehidrogenāzi II un karstuma šoka proteīnus DnaK, GroES un GroEL. (Sahm et al., 2006). Karstuma šoka proteīnu DnaK, GroEL un GroES daudzums palielinās arī pēc termiskā stresa. GroES un GroEL ir divi izplatītākie stresa proteīni *Z. mobilis* (Yang et al., 2013).

*Z. mobilis hfq* gēns ir saistīts ar uzlabotu toleranci pie dažādiem inhibitoriem. Hfq ir RNS saistošs proteīns, kas ir kopīgs dažādām baktēriju līnijām. Tam ir nozīmīga loma gēnu ekspresijas kontrolē kopā ar mazām regulatorajām RNS (sRNS). He et al. (2012) gan novēroja *hfq* ekspresijas samazināšanos pie etanola stresa. Kopumā *Z. mobilis* identificēti 54 transkripcijas aktivātori. 33 no tiem uzrādīja pazeminātu ekspresiju pie etanola stresa. Tikai 3 transkripcijas regulatori uzrādīja paaugstinātu ekspresiju pie etanola stresa – XRE, MarR un Hxl (He et al., 2012). Vairākas sRNS uzrāda atšķirīgu ekspresiju pie 5% etanola stresa: Zms2, Zms6 un Zms1. sRNS molekulām Zms2, Zms4 un Zms6 ir identificētas ekspresijas izmaiņas aerobos un anaerobos apstākļos, kad tiek novērota attiecīgi zema un augsta etanola produkcija (Cho et al., 2014).

Pie etanola stresa fiksēta paaugstināta laktāta dehidrogenāzes ekspresija. Novēro arī laktāta uzkrāšanos, kas varētu *Z. mobilis* palīdzēt ar reducējošo ekvivalentu NADH/NAD<sup>+</sup> līdzsvara uzturēšanu (Yang et al., 2013). Pie etanola stresa atrastas arī citu elpošanas ķēdes komponentu ekspresijas izmaiņas. Paaugstinātu ekspresiju atrada 12 no šiem gēniem, tostarp citohroma *bd* subvienību ekspresiju. Pārējiem 13 gēniem bija novērota ekspresijas samazināšanās. Starp tiem bija citohroma *bc1* subvienības un II tipa NADH dehidrogenāze (He et al., 2012).

### 1.2.1.2. Osmotiskais stress

Baktēriju šūnu citoplazmā ir liela molekulu koncentrācija, kas rada ievērojamu osmotisko potenciālu. Citoplazmatiskās membrānas puscaurlaidība un šūnas sienas daļēji elastīguma rezultātā, osmotiskais spēks virza ūdens plūsmu baktērijā un nodrošina paaugstinātu hidrostatisko spiedienu. Turgora klātbūtne ir svarīga šūnu augšanai un dzīvotspējai (Sleator and Hill, 2002). Arējās osmolaritātes palielināšanās, gan samazināšanās neizbēgami izraisa ūdens plūsmas izmaiņas pāri citoplazmas membrānai, tādējādi ietekmējot šūnu hidratācijas pakāpi, molekulāro drūzmēšanos, turgora lielumu un šūnu integritāti. Citoplazmas osmotiskie apstākļi

ietekmē šūnu makromolekulas, vielmaiņas tīklus, RNS polimerāzes mijiedarbību ar promotoriem, DNS replikāciju un citus svarīgus šūnu procesus. Pārmērīgi augsta olbaltumvielu koncentrācija var traucēt enzīmu aktivitāti (Bremer and Krämer, 2019). Mikroorganismi osmotisko regulāciju panāk uzkrājot vai izvadot organiskos osmolītus kā prolīnu, glicīna betaīnu, karnitīnu, prolīna betaīnu, dimetilsulfoniopropionātu, hidroksiektoīnu, trehalozi un glikozilglicerīnu. Šos osmolītus baktērijas var sintezēt vai uzņemt no ārējās vides, kas ir enerģētiski izdevīgāk. Īstermiņā osmotiskā spiediena līdzsvarošanai var tikt pielietoti jonu sūkņi kā, piemēram,  $K^+$  (Bremer and Krämer, 2019). Atbildei uz osmotiskā spiediena izmaiņām jānoris strauji. Reaģējot uz osmotiskā spiediena pazemināšanos svarīga loma ir inducējamiem mehanosensitīviem kanāliem. Osmotiskā spiediena regulācijā iesaistītie proteīni integrē vismaz trīs atbildes posmus- stimula uztveri, pārraidi un mērķa kanāla vai nesēj molekulas aktivāciju. Daudzi no regulācijas mehānismiem ir divkomponentu sistēmas, kas sastāv no histidīna kināzes un atbilstoša atbildes regulatora. Labi izpētīta ir gramnegatīvo baktēriju EnvZ/OmpR sistēma (Dawan and Ahn, 2022).

Baktēriju jonu homeostāzes mehānismi ir kompleksi. Vairāk izpētīti mehānismi ir attiecībā uz katjoniem  $Na^+$ ,  $K^+$  un  $H^+$ , anjonu homeostāze ir mazāk pētīta. Līdzsvara stāvoklī  $H^+$  jonu koncentrācija citoplazmā ir daudz zemāka kā citu monovalento katjonu.  $H^+$  jonu apmaiņas sūkņus mikroorganismi var izmantot, lai mazinātu  $Na^+$  koncentrāciju citoplazmā ar antiporta molekulām. pH svārstības citoplazmā osmotiskā stresa laikā regulē elpošanas ķēdes darbība (Bremer and Krämer, 2019).

*Zymomonas mobilis* ir jūtīgas pret sāls stresu jau zemās koncentrācijās, kas var ierobežot to rūpniecisko izmantošanu kā efektīvu biokatalizatoru. Augšanu un etanola produkciju būtiski kavē jau 10 g/l NaCl pievienošana kompleksajā barotnē. Šāda sāļu koncentrācija bieži tiek pielietota daudzu mikroorganismu barotnēs. Pie sāls stresa apstākļiem *Z. mobilis* maina morfoloģisko formu nūjiņu vietā veidojot garus filamentus, ar paplašinātiem galiem. Ņemot vērā, ka *Z. mobilis* labi aug augstās glikozes koncentrācijās, šo izmaiņu cēlonis nav gluži osmotiskais spiediens, bet vairāk jonu koncentrācijas izmaiņas. Metabolisma pētījumi uzrāda ka sāls izturīgie *Z. mobilis* celmi neuzkrāj šūnā osmolītus, kā prolīnu. Šiem celmiem novērotas mutācijas *himA*, lai gan darbības mehānisms nav skaidrs (Fuchino and Bruheim, 2020). *Z. mobilis* genomā trūkst lielākās daļas lokusu, kas kodē osmolītu transporta proteīnus, piemēram, Kdp kompleksu un BetS, kas nozīmē, ka transportēšanas mehānisms nav iesaistīts *Z. mobilis* atbildes reakcijā uz sāls stresu (Kohler et al., 2015)

Osmotiskā stresa noturību uzlabo arī bioplēves veidošanās, kas ir atkarīga no kvoruma signāliem. *Z. mobilis* slikti veido bioplēves un tās neizmanto kvoruma signālmolekulu AI-2,

kas ir saglabāta daudzās baktēriju sugās (Cao et al., 2023). Sāls stresa laikā *Z. mobilis* svarīgu lomu spēlē arī  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiports (Gao et al., 2018).

Potenciāla bioloģiskā nozīme sāls stresa regulācijā ir *Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdei, kas nerada augstu protonu gradientu. Elpošanas ķēde normālos apstākļos nodrošina zemu redoks ekvivalentu NADH/NAD<sup>+</sup> attiecību, kas savukārt nodrošina aizsardzību pret oksidatīvo stresu (Hayashi et al., 2015).

### 1.2.2. Vispārīgā stresa atbildes reakcija

Baktērijām ir vispārīgas stresa reakcijas, ko aktivizē transkripcijas regulatori nespecifiskos stresa apstākļos. Vispārējās stresa reakcijas galvenā loma ir novērst subletālus un letālus bojājumus (Dawan and Ahn, 2022). Vispārējo stresa reakciju raksturo šūnas spēja aizsargāties ne tikai no specifiskā izraisošā stresa, bet arī no dažādiem citiem šķietami nesaistītiem stresoriem. Šī reakcija ļauj šūnām paredzēt un sagatavoties uzreiz uz vairākiem dažādiem nelabvēlīgiem apstākļiem ar ko baktērija sastopas dabiskajā vidē. Bieži vispārējā stresa reakcija ir saistīta arī ar stacionārās fāzes augšanu, kad ir ierobežota piekļuve barības vielām un vidē ir uzkrājušies metabolisma gala produkti. Mikroorganismi dabiskā vidē lielu daļu laika var atrasties stacionārā fāzē līdzīgā stāvoklī, kur uz tām vienlaikus iedarbojas vairāki stresa faktori (Gottesman, 2019).

Daudzās baktērijās galvenie vispārējās stresa reakcijas regulatori ir specializēti sigma faktori, kas nodrošina RNS polimerāzes specifisku saistīšanos ar promoteriem. Sigmas faktora pieejamību vai aktivitāti nosaka sarežģītas regulēšanas shēmas, no kurām lielākā daļa ir pēctranskripcijas līmenī (Gottesman, 2019). Dažādiem alternatīviem sigma faktoriem ir svarīga loma baktēriju adaptācijai stresa apstākļos

Sigma faktoru 24,  $\sigma_{24}$ , ekspresija *Pseudomonas aeruginosa* var modulēt gļotādas apvalka veidošanos, kas aizsargā pret antibiotikām, oksidatīvo stresu un imunoloģisku uzbrukumu. Turklāt ekstracitoplazmas funkcijas (ECF) sigmas faktors 70 ( $\sigma_{70}$ ) *Neisseria gonorrhoeae* un *Caulobacter crescentus* var aizsargāt baktērijas no oksidatīviem bojājumiem, ekspresējot gēnu *msrAB*, kas ir atbildīgs par metionīna sulfoksīda reduktāzes aktivitāti (Dawan and Ahn, 2022). Viens no labāk izpētītajiem sigma faktoriem ir *E. coli* RpoS (jeb  $\sigma_S$  vai  $\sigma_{38}$ ). *rpoS* mutanti ir jutīgi pret oglekļa badu, apstrādi ar ūdeņraža peroksīdu, paaugstinātu temperatūru, zemu pH un osmotisko stresu (Gottesman, 2019).

Alfaproteobaktērijās vispārējo stresa atbildi regulē sigma faktors EcfG. Pēctranslācijas līmenī šo sigma faktoru regulē PhyR fosforilēšanas. PhyR aktivē HWE/HisKA2 saimes

histidīna kināzes. Pēc aktivācijas PhyR saistās ar anti sigma faktoru NepR un atbrīvo sigma faktoru EcfG, kas tālāk var saistīties ar RNS polimerāzi (Gottschlich et al., 2019).

Nelabvēlīgi vides apstākļi kā augsts spiediens, skābe, oksidanti, sāls, barības vielu ierobežojums, vielmaiņas gala produktu uzkrāšanās un antibiotiku iedarbība, var izraisīt DNS bojājumus gan tieši mijiedarbojoties ar DNS molekulām, gan netieši veidojot reaktīvas skābekļa formas (*reactive oxygen species*, ROS). DNS bojājumi aktivē SOS reakciju. Pie ROS pieskaita skābekļa reducētās formas, kuras iegūst pievienojot elektronus ārējās elektronu orbitālēs, tiek iegūti superoksīda anjoni ( $O_2^{\cdot-}$ ), tālāk ūdeņraža peroksīds ( $H_2O_2$ ) un hidroksilradikālis ( $OH^{\cdot}$ ). ROS reaģē ar dažādām šūnas struktūrām radot bojājumus. Endogēno ROS veidošanos var izraisīt šūnas vielmaiņas procesi. Viens no ROS avotiem ir elektronu transporta ķēdes (Imlay, 2008). *Zymomonas mobilis* supeoksīda veidošanās vietas ir FAD II tipa NADH dehidrogenāze un citohroma *bc<sub>1</sub>* komplekss (Strazdina et al., 2012). SOS reakciju sākotnēji izraisa vienpavediena DNS (ssDNS) klātbūtne šūnā, kas saistās ar RecA. ssDNA/RecA komplekss savukārt stimulē LexA represora proteolītisko šķelšanos. LexA šķelšana tālāk nodrošina SOS gēnu ekspresiju, kas iesastīti DNS labošanā, mutāģenēzē ar transpozoniem, horizontālā gēnu pārnēsē, biofilmu veidošanā un antibiotiku rezistencē (Dawan and Ahn, 2022).

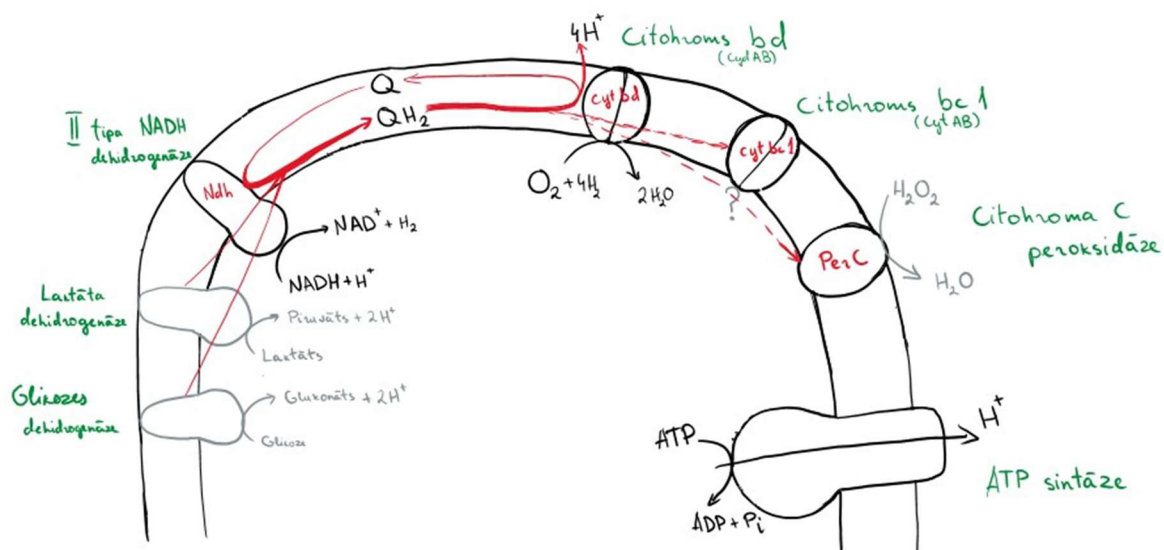
*Zymomonas mobilis* Zm4 ir pieci dažādi sigma faktori. sigma 70 (ZMO1623), sigma 54 (ZMO0274), sigma 32 (ZMO0749), sigma 28 (ZMO0626), un sigma 24 (ZMO1404). Sigma 32, jeb RpoS Zm4 genomā nav sastopams, līdz ar to fermentatīvā stresa atbildi jānodrošina citiem sigma faktoriem. Sigma 32 un sigma 24 faktori tradicionāli saistītas ar karstuma šoku. Šo sigma faktoru pārekspresija *Z. mobilis* ZM4 celmā apstiprināja abu faktoru saistību ar siltuma šoka atbildi, kā aprakstīts citās baktērijās. Turklāt sigma 32 ir arī loma adaptācijā pret osmotisko stresu. Pārekspresijas celmam novēroja palielinātu gan augšanas un glikozes uzņemšanas ātrumu. Sigma 32 pārekspresija gan uzrādīja etanola tolerances samazināšanos. Nav īsti skaidru datu par sigma 24 ietekmi uz etanola toleranci. Tā pārekspresija izraisīja etanola produkcijas mazināšanos (Benoliel et al., 2020).

Dažādi vispārēji stresa faktori var veicināt ar ROS produkciju arī pēc sākotnējā stresa faktora beigšanās un izraisīt mikroorganisma bojāeju. Pārsniedzot noteiktu ROS produkcijas sliekšni ROS pieaugums kļūst pašpastiprinošs. Par to liecina ka *E. coli* pēc pakļaušanas antimikrobiālo vielu un termiskam stresam arī pēc stersoa pārtraukšanas novērojama ROS uzkrāšanās, ko var apturēt eksogēni pievadot katalāzi (Hong et al., 2019).

### 1.3. Elektronu transporta ķēde

Mikroorganismiem ir raksturīgas modulāras, inducējamas elpošanas ķēdes, kuras vienlaikus var izmantot vairākus elektronu donorus un akceptorus. Tas nodrošina elpošanas elastību, kas nepieciešama mainīgajām vides nišām, kurās baktērijas atrodas (Roberts, 2013) Baktēriju elektronu transporta ķēdes bieži sastāv no vairāku veidu dehidrogenāzēm un terminālajām oksidāzēm, kuras savienotas ar hinoniem (Unden and Bongaerts, 1997). Vairākas dehidrogenāzes, kas ļauj izmantot enerģiju no dažādiem substrātiem, un vairākas terminālās oksidāzes, ļauj izmantot dažādus terminālos akceptorus. Bieži šiem proteīniem ir vairākas izoformas, kuras atšķiras ar katalītiskās aktivitātes ātrumu un protonu translokācijas efektivitāti (Roberts, 2013). Bez ATP produkcijas elpošanas ķēdes darbība ietver vairākus citus svarīgus šūnu procesus, kā redoks līdzsvara saglabāšanu, ROS veidošanos un arī aizsardzību pret oksidatīvo stresu (Kalnenieks et al., 2019).

*Zymomonas mobilis* ir zarota elpošanas ķēde (1.1 attēls), kura aerobos apstākļos patērē skābekli straujāk kā *E.coli*, bet tajā pašā laikā mikroorganismam ir novērojama zema ATP produkcija (Rutkis et al., 2014). Elpošanas ķēdes struktūra un regulācija pilnībā nav izpētīta. Pētījumi ar *Zymomonas mobilis* mutantajiem celmiem norāda ka elektronu pārnesei ķēdē ir vismaz divi transporta ceļi līdz skābeklim (Strazdina et al., 2012).



1.1. attēls. *Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdes iespējamā uzbūve.

Figure 1.1. Hypothetical structure of *Zymomonas mobilis* respiratory chain.

*Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdei ir vairākas dehidrogenāzes – II tipa NAD(P)H dehidrogenāze (Ndh) FAD atkarīgā D-laktāta dehidrogenāze (Ldh) un PQQ-atkarīgā glikozes dehidrogenāze (Gdh) un šķietamas NAD(P)H dehidrogenāzes WrbA, kas varētu būt iesaistītas

aizsardzībā pret oksidatīvo stresu, un RnfABCDGE, kuras kodējoša sekvenca atrasta ZM4 celmā un ir saistīta ar slāpekļa fiksēšanu (Kalnenieks et al., 2019, 2008; Sootsuwan et al., 2008; Strazdina et al., 2012; Strohdeicher et al., 1990) No tām nozīmīgākā ir II tipa NADH dehidrogenāze, kuru inaktivējot elpošanas aktivitāte ievērojami samazinās un membrānu preperāti *ndh* mutantajam celmam neuzrāda NAD(P)H oksidāzes aktivitāti. Tas liecina ka II tipa NADH dehidrogenāze ir vienīgā aktīvā NAD(P)H dehidrogenāze *Zymomonas mobilis* (Kalnenieks et al., 2008). No dehidrogenāzēm elektroni tiek nodoti hinona molekulai, kas ir taukos šķīstoša molekula, spējīga pārnest elektronus no oksidētā kompleksa uz nākamo elektornu akceptoru, to reducējot. *Zymomonas mobilis* elpošanas ķēde satur tikai vienu hinona veidu ubihinonu – 10(UQ<sub>10</sub>) (Strohdeicher et al., 1990). Mikroorganisma genomā ir atrasta tikai viena terminālā oksidāze- *cydAB* kodētā *bd* – tipa hinola oksidāze (Seo et al., 2005), kura ir identificēta spektroskopiski (Kalnenieks et al., 1998; Sootsuwan et al., 2008). Elpošanas ķēdē atrodami arī citohroma *bc<sub>1</sub>* komplekss (CytAB) un šķietama citohroma c peroksidāze (PerC) (Balodite et al., 2014; Charoensuk et al., 2011; Sootsuwan et al., 2008).

### 1.3.1. II tipa NAD(P)H dehidrogenāze

II tipa NADH dehidrogenāze ir elpošanas ķēdes enzīms, kurš katalizē elektronu pānesi no NADH uz hinonu (Kerscher et al., 2007). Enzīmu veido homodimēri proteīni, katrs aptuveni 45KDa ar nekovalenti saistītu flavīna adenīna dinukleotīdu (FAD) kā kofaktoru. Enzīms ir izvietots periplazmātiski iekšējā membrānā. Kompleksam ir divas atsevišķas saistīšanās vietas hinonam un NADH (Heikal et al., 2014) II tipa NADH dehidrogenāze nenodrošina protonu pārvietošanu uz starpmembrānu telpu atšķirībā no I tipa NADH dehidrogenāzes, kas ir multisubvienību komplekss ar vairākiem kofaktoriem (Unden and Bongaerts, 1997). II tipa NADH dehidrogenāzes aktivitāte ir straujāka kā I tipa NADH dehidrogenāzei, kas palīdz pie lielām O<sub>2</sub> koncentrācijām nodrošināt NADH/NAD<sup>+</sup> līdzsvaru šūnā un rezultātā strauju substrātu metabolismu (Rutkis et al. 2016). *E. coli* aerobās augšanās laikā lielākā daļa elektronu plūsmas tiek virzīta caur II tipa NADH dehidrogenāzi. *Ndh* tiek vairāk ekspresēts eksponenciālā fāzē. Aerobos apstākļos iespējams nodrošināt arī ātrāku *Ndh* proteīna recirkulāciju (Unden 1997).

II tipa NADH dehidrogenāze ir aktīvākā no *Zymomonas mobilis* sastopamajām dehidrogenāzēm. Elpošanas aktivitāte *ndh* mutantajam celmam ir ievērojami mazāka izmantojot glikozi kā substrātu un pilnībā iztrūkst izmantojot etanolu (Kalnenieks et al., 2008). *Ndh* *Zymomonas mobilis* var reducēt gan NADH, gan NADPH (Kalnenieks 2008) Enzīma inaktivācijas celmam ir augstāka *ldh* aktivitāte (Strazdina et al., 2012) Novēro arī augstāku

biomasas veidošanos un paaugstinātu etanola produkciju, bet izejas celmam raksturīgāka straujāka glikozes uzņemšana (Kalnenieks et al., 2008; Hayashi et al., 2011, 2012). II tipa NADH dehidrogenāzei iespējams ir loma aizsardzībā pret oksidatīvo stresu. Paaugstināta *ndh* un dažu citu oksidoreduktāžu gēnu aktivitāte ir novērota pie lignocelulozes stresa (Chang et al., 2018), tāpat arī pozitīvs efekts ir novērots pie sāls stresa (Hayashi et al., 2015). *Zymomonas mobilis ndh* gēna inaktivācija veicina adaptīvu atbildes reakciju elektronu transporta ķēdes un vairāku oksidatīvā stresa aizsargājošo sistēmu līmenī (Strazdina et al., 2012)

Dažādiem organismiem Ndh ir atšķirīga loma, kas liecina ka šie enzīmi tiem piešķir plastiskumu, lai labāk pielāgotos vides apstākļiem (Melo et al., 2004). *E. coli* Ndh ir novērota loma aizsardzībā pret oksidatīvo stresu reducējot vara jonus un samazinot brīvo skābekļa radikāļu veidošanos (Volentini et al., 2011). Savukārt slāpekli fiksējošās *Azotobacter vinelandii* Ndh ir svarīga loma nitrogenāzes aizsardzībā pie augstām skābekļa koncentrācijām (Bertsova et al., 2001). *Synechocystis spp.* atrodami Ndh ir redokssensori, kuriem ir regulējoša loma, reaģējot uz plastohinonu redoksstāvokli un NADH līmeni citosolā (Howitt et al., 1999). Tāpat laikā *Zymomonas mobilis* mutantais celms ar inaktivētu *ndh* uzrāda lielāku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rezistenci un 2-5 reizes paaugstinātu katalāzes aktivitāti salīdzinot ar izejas celmu. Savukārt mutantais celms ar pārekspresētu *ndh* uzrādīja pretējo efektu (Kovtuna et al., 2022). Ndh aktivitātes deficīts novērots arī spontānās mutācijās celmiem ar uzlabotu augšanu un etanola sintēzi paaugstinātās temperatūrās (39°C) (Hayashi et al., 2012, 2011). Ndh deficīta celma paaugstinātajai izturībai svarīga loma varētu būt Ldh aktivitātei. Ldh inaktivācija uz Ndh deficīta fona padara neelpojošo dubultmutantu jutīgāku pret temperatūru nekā *ndh* mutanto celmu (Strazdina et al., 2018).

NDH -II ekspresija *E. coli* ir pakļauta sarežģītam regulējošo kontroles sistēmu tīklam transkripcijas līmenī. (Green et al., 1995; Meng et al., 1997). Anaerobos apstākļos to nomāc globālais transkripcijas regulators FNR, kas saistās divās vietās *ndh* promotera reģionā. (Meng et al., 1997). Transkripciju var aktivizēt vai nomākt ar DNS saistošo proteīnu Fis (Nbp): augstās koncentrācijās agrīnās eksponenciālās fāzes laikā Fis nomāc *ndh* transkripciju, saistoties ar vismaz trim vietām *ndh* promotērā, savukārt zemās koncentrācijās Fis aktivizē *ndh*. ekspresiju saistoties tikai ar tālāko augstā afinitātes saiti. (Green et al., 1995). *Z. mobilis ndh* regulācija nav skaidra.

### 1.3.2. Citohroms *bd*

Citohroms *bd* ir membrānā integrēts komplekss, kas sastāv no divām līdz četrām subvienībām. Divas vienmēr sastopamās un lielākās ir I un II apakšvienības, kuras kodē *cydA*

un *cydB* gēni (Borisov et al., 2021). Cyd A ir 52-57 kDa un Cyd B 40-43 kDa lieli proteīni. Cyd A ir atrodams aktīvais centrs, kur notiek hinona oksidācija un atrodami trīs hēma kofaktori: divi *b* tipa hēmi (b558 un b595) un *d* hēms, pie kuriem piesaistās O<sub>2</sub> un citi ligandi kā NO, CO un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Giuffrè et al., 2014). Neseni pētījumi liecina ka daudzos mikroorganismos, kā, piemēram, *E. coli*, *Brucella abortus*, *Shewanella oneidensis* papildus sastopamas nelielas subvienības. Tās kodē *cydAB* beigās atrodams *cydX* gēns, un šīs subvienības ir svarīgs oksidāzes funkcionālai stabilitātei (Borisov et al., 2021). Līdzīgi kā hēma/vara terminālās oksidāzes, citohroms *bd* katalizē pilnīgu četru elektronu pānesi un O<sub>2</sub> reducēšanu par diviem H<sub>2</sub>O, izmantojot hinolus kā reducējošos substrātus, bet šī procesa laikā nenotiek protonu sūkņa funkcija. Līdz ar to protonu gradientu veido tikai vektorālie protoni un enzīms ir ar zemu enerģētisko efektivitāti (Unden and Bongaerts, 1997).

Skābekļa terminālās *bd* reduktāzes ir sastopamas tikai prokariotos, kur ortologie proteīni atrodami plašā spektrā taksonomisko grupu (Borisov et al., 2021). Interesanti ka homologi proteīni sastopami arī mikroorganismos, kas uzskatāmi par strikti anaerobiem, kā *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans* (Brochier-Armanet et al., 2009), *Bacteroides fragilis* (Baughn and Malamy, 2004).

Mikroorganismiem var būt vairāki citohromu *bd* izoenzīmi, piemēram, *E. coli* ir sastopami divi (Dassa et al., 1991). *Zymomonas mobilis* ir viens citohroms *bd*, kas arī ir mikroorganisma vienīgā zināmā terminālā oksidāze (Strazdina et al., 2012).

Pētījumi liecina, ka citohroms *bd* ne tikai nodrošina baktēriju O<sub>2</sub> patēriņu bioenerģētiskos nolūkos, bet arī, iespējamas, veic papildus funkcijas. Citohroms *bd* nodrošina aizsardzību pret O<sub>2</sub> toksicitāti saistot vidē atrodamo O<sub>2</sub> un samazinot tā koncentrāciju (Borisov et al., 2021). Iazotrofās baktērijās citohroms *db* novērš O<sub>2</sub> jūtīgu enzīmu kā, piemēram, nitrogenāzes inaktivāciju (Hassani et al., 2010). Novērota enzīma aizsargājoša loma arī pret dažādiem stresa faktoriem, tostarp hipoksiju, vidēju sārmainību, augstu temperatūru un toksiskiem savienojumiem, piemēram, antibiotikām, klasiskiem elpošanas inhibitoriem, piemēram, slāpekļa oksīdu (NO), cianīdu un sērūdeņradi (H<sub>2</sub>S) (Borisov et al., 2021). Citohroms *bd* veicina kaitīgo reaktīvo skābekļa un slāpekļa formu, piemēram, ūdeņraža peroksīda (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vai peroksinitrīta (ONOO<sup>-</sup>) degradāciju, pateicoties neparasti augstajam slāpekļa oksīda (NO) disociācijas ātrumam un ievērojamai katalāzes aktivitātei. Šīs vielas patogēno mikroorganismu apkarošanai viedo saimnieka imūnsistēma, vai konkurējoši mikroorganismi. (Forte et al., 2017). Līdz ar to citohroma *bd* terminālās oksidāzes ir iesaistītas patogēno baktēriju virulences veidošanā, kas padara šos enzīmus par labu potenciālo zāļu mērķi. Citohroma *bd* terminālā oksidāze tiek ekspresēta vairākos baktēriju patogēnos, piemēram, *Salmonella spp*,

*Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*. Dažos no šiem patogēniem virulence ir atkarīga no citohroma *bd* ekspresijas. Citohroms *bd* arī spēlē lomu saimniekorganisma kolonizācijā patogēnam un komensālām baktērijām (Borisov et al., 2021).

Citohroms *bd* *E.coli* tiek visvairāk ekspresēts pie zemām skābekļa koncentrācijām, kas atspoguļo šīs oksidāzes ļoti augsto skābekļa afinitāti (Unden and Bongaerts, 1997). Ekspresija palielinās arī cianīda, NO, oglekļa monoksīda (CO) klātbūtnē, kā arī Ru un Mn saturošo CO atbrīvojošo molekulu (CORM) klātbūtnē (Boot et al., 2017). *E. coli* citohroma *bd* regulācija ir kompleksa un ietver vismaz trīs transkripcijas regulatoru klases. Ekspresijas kontrole *E. coli* tiek galvenokārt panākta ar “fumarāta nitrāta samazināšanas” regulatora (FNR) un ArcB/ArcA divkomponentu sistēmas kombinētajām un kompleksajām darbībām. Pieci promotoru regulējošie kompleksi ierosina *cydAB* transkripciju: četrus no tiem (P1–P4) koordinē regulē skābeklis (izmantojot ArcA un FNR). (Borisov et al., 2021). *Shewanella* divi citohroma *bd* apakšvienības gēni tiek transkribēti ar trešo gēnu *cydE*. *cydE* kodē GbsR regulatoru, kurš nomāc *cydAB* ekspresiju (Xia et al., 2018). Vairākās grampozitīvās ģintīs transkripcijas faktors Rex ir iesaistīts fermentācijai un augšanai svarīgu gēnu regulēšanā zemā skābekļa koncentrācijā, uztverot šūnu redoks līdzsvaru NADH/NAD<sup>+</sup> attiecības veidā. Piemēri Rex lomai citohroma *bd* ekspresijas regulēšanā ir atrodamā *Streptomyces spp* un *Bacillus subtilis* (Borisov et al., 2021). *Rickettsia conorii* *cydA* regulācijā iesaistītas regulējošās mikro RNS (Narra et al., 2016). *Zymomonas mobilis* regulatorie mehānismi nav skaidri. Ir novērots ka pie anaerobiem apstākļiem novērojama citohromu *bd* subvienību CydA un cydB ekspresijas samazināšanās (Strazdina et al., 2012; Yang et al., 2009).

### 1.3.3. Citohroms *bc<sub>1</sub>*

Ubihinola citohroma *c* oksidoreduktāze, ko ko dēvē arī III kompleksu mitohondrijos vai citohroma *bc<sub>1</sub>* kompleksu (*cyt bc<sub>1</sub>* vai *bc<sub>1</sub>*), ir daudzfunkcionāls, membrānas proteīnu komplekss, kas lokalizēts eikariotu mitohondriju iekšējā membrānā vai prokariotu citoplazmas membrānā. Subvienību skaits var variēt no 3, pārsvarā, prokariotos līdz 11 cilvēku mitohondrijos (Esser et al., 2019). Visbiežāk sastopamās redoks apakšvienības ir *cyt b*, kurai ir divi *b* tipa hēmi (zema potenciāla hēms *b<sub>L</sub>* un augsta potenciāla hēms *b<sub>H</sub>*), *cyt c<sub>1</sub>*, kas satur *c* tipa hēmu, un dzelzs sēra proteīns (ISP), kurš satur augsta potenciāla dzelzs–sēra centrus (Esser et al., 2019). Citohroma *bc<sub>1</sub>* komplekss (*bc<sub>1</sub>*) ir elpošanas ķēdes vidus posms. Komplekss *cyt bc<sub>1</sub>* katalizē elektronu pānesi no lipofilā substrāta ubihinola (QH<sub>2</sub>) uz *cyt c*, kas savienota ar protonu translokāciju cauri membrānai (Xia et al., 2013). Reakcija notiek divos posmos. Pirmajā posmā QH<sub>2</sub> tiek oksidēts par Q pie membrānas ārējās virsmas un starpmembrānu telpā

tiek atbrīvoti  $2H^+$ . No hinola molekulas viens elektrons tiek pārnests uz citohromu  $c_1$ , bet otrs elektrons uz citohroma  $b$  hēma molekulām  $b_L$  un  $b_H$  un tālāk uz Q membrānas iekšējā pusē, kur to reducē par QH. Otrā posmā process tiek atkārtots un QH membrānas iekšējā virsmā tiek tālāk reducēts par QH<sub>2</sub>. Rezultātā membrānas pozitīvajā pusē tiek pārnesti četri protoni un tiek reducētas divas cyt  $c$  molekulas (Trumpower, 1990).

Cyt  $bc_1$  kompleksi ir saistīti arī ar ROS veidošanos. Normālos elpošanas apstākļos elektronu transportu no QH<sub>2</sub> uz cyt  $bc_1$ , pavada neliela daudzuma superoksīda anjonu veidošanās (Xia et al., 2013). Superoksīda veidošanās dramatiski palielinās, kad  $bc_1$  kompleksu bloķē ar inhibitoriem kā antimicīnu A un elektronu transporta ķēde nonāk reducētākā stāvoklī. Visticamākā superoksīda veidošanās vieta, normālos elektronu transporta apstākļos, ir zema potenciāla cyt  $b$  hēma ( $b_L$  hēma) vietā. Mutācijas cyt  $b$  apakšvienībā izraisa ne tikai elektronu transporta aktivitātes pavājināšanos, bet arī palielinātu superoksīda anjonu daudzumu (Yin et al., 2010). Praktiski visi organismi sintezē superoksīda dismutāzes, lai uzturētu zemu O<sub>2</sub>-līmeni, un katalāzes un NADH peroksidāzi, lai samazinātu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Khademian and Imlay, 2017).

*Zymomonas mobilis* ir atrodams citohroms  $bc_1$ , kuru kodē *cytAB*. Tā kā *Zymomonas mobilis* nav atrodams citohroma  $c$  oksidāzes, līdz ar to šķiet citohroms  $bc_1$  ir elektronu transporta ķēdes strupceļš. Iepriekš Charoensuk et al. (2011) izvirzīja hipotēzi ka  $bc_1$  elpošanas ķēdes atzarā terminālā oksidāze ir citohroma  $c$  peroksidāze, savukārt pēc Balodite et al. (2014) citohroma  $c$  peroksidāze funkcionē vairāk kā hinona peroksidāze. Pētījumos ar *Zymomonas mobilis* celmu ar inaktivētu CytB subvienību, *Zm6-cytB*, *cytB* mutācija neizraisīja membrānas NADH peroksidāzes aktivitātes zudumu (Balodite et al., 2014; Strazdina et al., 2012) un neietekmēja šūnu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jutību. Tas norādīja ka: citohroma  $bc_1$  atzaru pārtrauc neidentificēta oksidāze nevis citohroma  $c$  peroksidāze (Balodite et al., 2014).

*Zm6-cytB* celmos novērojama paaugstināta citohroma  $d$  absorbcija salīdzinot ar izejas celmu, kas norāda *Zm6-cytB* elektroni tiek novirzīti vairāk uz citohroma  $bd$  terminālo oksidāzi, nekā sākotnējā celmā, un ka *Z. mobilis* citohroma  $bc_1$  komplekss un citohroms  $bd$  ir lokalizēti dažādos elektronu transportēšanas atzaros (Strazdina et al., 2012). Citohroma  $bc_1$  kā elpošanas ķēdes strupceļš ir atrodams arī dažās citās proteobaktērijās: *Gluconobacter oxydans* (Hanke et al., 2012) un *Acetobacter spp* (Sakurai et al., 2011), kur arī  $bc_1$  nav skaidras funkcijas elektronu transportēšanā. Tomēr zināmā mērā šis komponent ietekmējot fenotipu. *G. oxydans* celmam ar  $bc_1$  deficītu skābā vidē ir novērojama samazināta augšana, savukārt savvaļas tipa gadījumā *qcrABC* gēni tiek pastiprināti ekspresēti ierobežota skābekļa apstākļos (Hanke et al., 2012).

*Z. mobilis* gadījumā mutantam celmam ar inaktivētu  $bc_1$  kompleksa citohroma  $b$  apakšvienību ir arī izmainīts elpošanas fenotips, kas izpaužas kā (i) skābekļa patēriņa

antimicīna rezistences palielināšanās, (ii) citohroma *bd* kinētikas izmaiņas, kas saistītas ar NADH reducešanas izmaiņām. (Strazdina et al., 2012) un (iii) paaugstināta elpošanas skābekļa afinitāte (Balodīte et al., 2014). Tomēr *Z. mobilis bc<sub>1</sub>* kompleksa inaktivācija būtiski neietekmē biomasas veidošanos pie aerobās augšanas un protonu gradienta veidošanas efektivitāti (Rutkis et al., 2014).

#### 1.3.4. Citohroma c peroksidāze

Citohroma-c peroksidāzes (CCP) ir plaši izplatīta enzīmu grupa, kas katalizē ūdeņraža peroksīda ( $H_2O_2$ ) pārveidošanu ūdenī, izmantojot hēma kofaktorus. CCP ir sastopami gan eikariotos, gan prokariotos, bet katras grupas enzīmi izmanto atšķirīgu katalīzes mehānismu (Khademian and Imlay, 2017). Genoma sekvenču dati parāda, ka CCP ir daudzās gramnegatīvajās baktērijās, taču nav sastopamas grampozitīvajās baktērijās un arhejos. Tas varētu būt saistīts ar periplazmatiskā nodalījuma trūkumu šajos organismos (Atack and Kelly, 2006). Atšķirībā no rauga CCP, kam kā kofaktors ir viens *b*-tipa hēms, baktēriju CCP satur vairākus *c*-tipa hēmus. Lielākā daļa baktēriju CCP ir periplazmatiski enzīmi, kas satur divus kovalenti saistītus *c* tipa hēmus. Tomēr ir atsevišķi CCP, kas satur trīs hēmu saistošus motīvus. Dihēma CCP viens no divām hēma molekulām darbojas kā peroksidācijas vieta. Otrais hēms nodrošina elektronu saņemšanu no elektronu donora molekulas. Elektroni tiek piesastīti no citohroma *c* vai hinona un nodoti augsta potenciāla hēmam. Pēc elektronu akceptēšanas augsta potenciāla hēms tos nodod zema potenciāla hēmam un tālāk  $H_2O_2$  (Atack and Kelly, 2006) Līdz ar to  $H_2O_2$  var kalpot kā elektronu transporta ķēdes terminālais elektronu akceptors (Minard and Mcalister-Henn, 2001).

CCP enzīmu fizioloģiskā loma ir mazāk skaidra, īpaši salīdzinājumā ar citiem peroksidāžu enzīmiem, piemēram, katalāzi un alkilhidroperoksīda reduktāzi (Atack and Kelly 2007). *E.coli* šis periplazmatiskais enzīms tiek inducēts tikai tad, ja ir  $H_2O_2$  un nav molekulārā skābekļa. Interesanti, ka tas nav īpaši efektīvs kā aizsargājošs enzīms, bet, pateicoties tā saistībai ar elpošanas ķēdes hinoniem, tas ļauj *E. coli* elpot, izmantojot  $H_2O_2$  kā anaerobo elektronu akceptoru. CCP nav pietiekami augsta aktivitāte, lai aizsargātu citoplazmu no eksogēna  $H_2O_2$ . Tomēr tas saņem elektronus no elpošanas ķēdes hinoniem, un tā plūsmas ātrums aptuveni atbilst citiem anaerobo elektronu akseptoriem. CCP ļauj *E. coli* augt uz nefermentējama oglekļa avota, kad tiek piegādāts  $H_2O_2$ . Līdzīgi novērojumi ir arī *Salmonella spp* (Khademian & Imlay 2017).

Tiek uzskatīts, ka baktēriju CCP aizsargā šūnas pret eksogēniem peroksīda stresa avotiem, nodrošinot membrānas lipīdu un proteīnu integritāti (Khademain and Imlay 2017). Bez aizsardzības pret oksidatīvo stresu ir izvirzītas vairākas CCP alternatīvās funkcijas. Piemēram, *Campylobacter jejuni* CCP ir nepieciešams cāļu kommensālai kolonizācijai (Bingham-Ramos and Hendrixson, 2008), bet tas būtiski neveicina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rezistenci. Tāpat *Neisseria gonorrhoeae* CCP nav nepieciešams H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rezistencei, un citoplazmas katalāze ir galvenais rezistences noteicošais faktors (Turner et al., 2003).

*Z. mobilis* citohroma *c* peroksidāzei ir kopīga homologija ar trihēma CCP un dihēma CCP (Atack and Kelly, 2006). Tās aminoskābju sekvences garums vairāk atbilst trihēma *c* peroksidāžu sekvences garumam. 44 – 57% no sekvences uzrāda homologiju ar trihēmu CCP un atlikušie 39 – 43% ar dihēmu CCP. N terminālajā galā ir arī hidrofobs segments, kas nodrošina integrāciju iekšējā membrānā (Charoensuk et al 2011). *Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdē CCP saņem elektronus no ubihinona nevis citohroma *bc<sub>1</sub>* (Balodite et al. 2014). Balodite et al. (2014.) novēroja arī ka celmiem ar inaktivētu CCP kodējošo gēnu *perC* nav ietekmes uz citohroma *d* reducēšanas kinētiku, un skābekļa piesaisti membrānas preparātos un elpošanas aktivitāti, kā arī H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izdalīšanos no šūnām. Kas liecina ka CCP *Zymomonas mobilis* nepiedalās elektronu pārnēsē uz skābekli – ne tiešā veidā, ne kombinācijā ar iespējamu elpceļu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ģenerējošu reakciju. Mutācija gan izraisīja membrānas NADH dehidrogenāzes aktivitātes samazināšanos un pasliktināja augošās kultūras izturību pret eksogēnu ūdeņraža peroksīdu, kas gan bija mazāka salīdzinot ar katalazes deficīta celmu, un kavēja aerobo augšanu. Charoensuk et al. (2011) novēroja tremotolerantam celmam TISTR 548 pēc CCP izslēgšanas mutācijas ir traucēta augšana paaugstinātā temperatūrā (37 un 39° C).

Regulācijas mehānismi *Zymomonas mobilis* nav skaidri. *E. coli* pie paaugstināta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiek aktivēta OxyR. Paaugstinoties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tas tieši oksidē OxyR transkripcijas faktora sensoro cisteīna atlikumu, izraisot disulfīda saites veidošanos, kas ieslēdz proteīnu aktivizētā konformācijā (Lee et al., 2004). Pēc tam OxyR aktivizē aizsardzības gēnu ekspresiju (Zheng et al., 2001). Pārsteidzoši ka, pat obligātos anaerobos sastopamas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducējamās aizsargreakcijas, ko mediē vai nu ar OxyR, vai ar PerR (22-24). *Zymomonas mobilis* OxyR un PerR homologās sekvences nav atrodams (Seo et al., 2005).

### 1.3.5. Fizioloģiskā loma

*Zymomonas mobilis* elpošanas fizioloģiskā loma vēl joprojām nav pilnībā noskaidrota. Elektronu transporta ķēde pie aerobiem apstākļiem šajā mikroorganismā nenodrošina papildus enerģijas veidošanu un biomasas pieaugumu (Rutkis et al., 2014) NADH oksidācija

nerezultējās pietiekamā protonu gradienta veidošanā, lai nodrošinātu ATP produkciju eksponenciālā augšanas fāzē. Tomēr samazinot NADH/NAD<sup>+</sup> intracelulāro attiecību, elpošanas ķēde nodrošina NAD<sup>+</sup> priekš straujām glikolīzes reakcijām un līdz ar to ātrāku glikozes uzņemšanu no vides (Rutkis et al., 2016). Līdzīgi novērojumi ir arī *Corynebacteria glutamicum* (Tsuge et al., 2015). Iespējams oksidatīvā fosforilēšana kalpo kā enerģijas avots stacionārā fāzē, kad vidē ir beigusies glikoze un fruktoze un akumulēties etanols (Kalnenieks et al. 1993). Etanols šādos apstākļos varētu tikt izmantots kā substrāts, kas dabiskos apstākļos varētu būt daļa no *Zymomonas mobilis* dabiskā dzīves cikla. Elpošanas ķēdes darbības rezultātā veidojas arī inhibējoši metabolīti, kā acetaldehīds, kurus baktērija varētu izmantot konkurējošo mikroorganismu nomākšanai uz savas biomasas straujāka pieauguma rēķina (Kalnenieks 2006).

*Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdei varētu būt arī citas papildus funkcijas. Elpošanas ķēde iespējams zināmu lomu *Z. mobilis* aizsardzībā pret skābekļa, augstas temperatūras, inhibitoru un sāls stresu (Charoensuk et al. 2011; Strazdina et al 2012). *Zymomonas mobilis* neuzrāda izteiktas elpošanas ķēdes un oksidatīvā stresa atbildes reakcijas komponentu izmaiņas reaģējot uz dažādiem aerācijas līmeņiem. Regulācija attiecībā uz šo komponentu gēnu ekspresiju ir maz izprasta atšķiras no vispārpieņemtajiem gramnegatīvo fakultatīvo anaerobu mehānismiem (Yang et al 2009; Strazdina et al. 2012). Piemēram, baktērijas genomam trūkst oxyR un soxR gēnu homologu (Seo et al. 2005). Iespējams regulācijā iesaistīti alternatīvais sigma faktors rpoH (ZMO 0749), MerR saimes regulators (ZMO 1121) (Yang et al., 2009).

Izprotot elpošanas ķēdes nozīmi un regulāciju būtu iespējams labaak pielāgot *Z. mobilis* nepieciešamajiem industriālajiem pielietojumiem. Ar elpošanas ķēdes ģenētiskās inženierijas palīdzību ir iespējams mainīt enerģijas ražošanas efektivitāti un intracelulāro redoks stāvokli un tādējādi ietekmēt galvenos bioprocēsa parametrus: šūnu biomasu, produktivitāti un stresa izturību (Kalnenieks et al., 2019). Samazinot oksidatīvās fosforilēšanas efektivitāti iespējams veicināt fermentatīvu procesu straujāku norisi, oksidētāku produktu veidošanu, bez liekas biomasas uzkrāšanās. Savukārt uzlabojot oksidatīvās fosforilēšanas efektivitāti iespējams panākt lielāku biomasu, kas lietderīgi, ja vēlamais produkts uzkrājas intracelulāri (Kalnenieks et al., 2019). Lai mērķtiecīgi pielietotu elpošanas ķēdes metabolisko inženieriju, ir svarīgi izprast elektronu transporta komponentu aktivitātes regulāciju stresa apstākļos, kas *Zymomonas mobilis* gadījumā ir maz pētīta problēma.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Plazmīdas un baktēriju celmi

Darbam izmantotas 2.1.1.tabulā norādītās plazmīdas. Plazmīda NowGFP/pQE30 tika izmantota zaļā fluorescentā proteīna (*engineered green fluorescent protein*, EGFP) klonēšanai ar PCR. Pēc tam plazmīdā pBBRMC-2 starp restrikcijas saitēm EcoRI un HindIII ieligēts ar PCR klonētais EGFP un izveidota plazmīda pBBR-EGFP. Tālāk pBBR-EGFP starp restrikcijas saitēm BamHI un EcoRI ieligēti ar PCR klonēti *Z. mobilis* promoteri.

#### 2.1.1. tabula

Darbā izmantās plazmīdas

**Table 2.1.1.**

Plasmids used in study

Plazmīda	Raksturojums	Izcelsme
pBBR1MCS-2	Vektora plazmīda ar kanamicīna rezistences gēnu ( <i>kan<sup>r</sup></i> ), multiplo klonēšanas saitu.	Laboratorijas kolekcija
pQE-eGFP	pQE-30 plazmīda ar 720 bp garu EGFP gēnu kodējošo insertu multiplajā klonēšanas saitā. Izmantota EGFP klonēšanai ar PCR.	BMC kolekcija
pBBR-EGFP	No pBBR1MCS-2 atvasināta plazmīda ar 720 bp garu zaļā fluorescentā proteīna ( <i>engineered green fluorescent protein</i> , EGFP)kodējošo sekvenci ievietotu multiplajā klonešanas reģionā starp EcoRI un HindIII restrikcijas saitēm.	Konkrētais darbs
pBBR:Pndh-EGFP	No pBBR-EGFP atvasināta plazmīda, kas satur ar PCR amplificētu II tipa NADH dehidrogenāzes gēna( <i>ndh</i> , ZZ6_0213) promotera reģionu 264 bp garā DNS sekvencē starp BamHI un EcoRI restrikcijas saitēm.	Konkrētais darbs
pBBR:Pbc <sub>1</sub> -EGFP	No pBBR-EGFP atvasināta plazmīda, kas satur ar PCR amplificētu citohroma <i>bc<sub>1</sub></i> gēnu ( <i>cytAB</i> , ZZ6_0349, ZZ6_0348, ZZ6_0347) promotera reģionu 228 bp garā DNS sekvencē starp BamHI un EcoRI restrikcijas saitēm.	Konkrētais darbs
pBBR:Pbd-EGFP	No pBBR-EGFP atvasināta plazmīda, kas satur ar PCR amplificētu citohroma <i>bd</i> gēna( <i>cydAB</i> , ZZ6_1532) promotera reģionu 763 bp garā DNS sekvencē starp BamHI un EcoRI restrikcijas saitēm.	Konkrētais darbs
pBBR:PperC-EGFP	No pBBR-EGFP atvasināta plazmīda, kas satur ar PCR amplificētu citohroma <i>c</i> peroksidāzes gēna( <i>perC</i> , ZZ6_0192) promotera reģionu 423 bp garā DNS sekvencē starp BamHI un EcoRI restrikcijas saitēm	Konkrētais darbs

Darbā izmantoto mikroorganismu celmi norādīti 2.1.2. tabulā. *E. coli* DH5 $\alpha$  šūnās veikta plazmīdu pavairošana un rekombinanto plazmīdu atlasīšana. *Z. mobilis* Zm6, Zm6-*ndh* un Zm6-*cat* celmos tālāk ieporētas pBBR-EGFP plazmīda un tās atvasinājumi ar elpošanas ķēdes proteīnu promoteriem, un veikta promoteru ekspresijas izmaiņu detektēšana, izmantojot EGFP reportierģēna sistēmu, pie eksperimentā izmantotajiem augšanas apstākļiem.

### 2.1.2. tabula

Darbā izmantotie mikroorganismu celmi

**Table 2.1.2.**

Strains of microorganisms used in study

<b>Celms</b>	<b>Raksturojums</b>	<b>Izcelsme</b>
Zm6	<i>Zymomonas mobilis</i> izejas celms	Amerikas kultūru kolekcija ATCC 29191
Zm6- <i>ndh</i>	Zm6 celms ar NADH dehidrogenāzes gēnā <i>ndh</i> (ZZ6_RS01100) ievietotu hloramfenikola rezistences determinantu, Cm <sup>r</sup>	(Kalnenieks et al., 2008)
Zm6- <i>cat</i>	Zm6 celms ar katalāzes gēnā <i>cat</i> (ZMO 0918) ievietotu hloramfenikola rezistences determinantu, Cm <sup>r</sup>	(Strazdina et al., 2012)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Izmantotās kompotentās šūnas.	Thermo Scientific, ASV

## 2.2. Kultivēšana

*Zymomonas mobilis* celmus kultivēja Zm barotnē, ar pH 5,8, kuras sastāvs norādīts 2.2.1. tabulā. Sējmateriālam kultūras audzētas barotnei atrodies stacionāri, bez kratīšanas jeb mikroaerofilos apstākļos 0,5-50 ml tilpumā termostatā pie 30°C.

Eksperimenta laikā, lai noteiktu augšanas līknes pie OD<sub>550</sub> un membrānu preparātu pagatavošanai NADH dehidrogenāzes aktivitātes mērījumiem kultūras audzētas aerobos apstākļos, uz kratītāja ar 100 apgriezieniem/min pie 30°C attiecīgi 100 ml un 250 ml koniskajās kolbās ar 15 ml un 100 ml barotnes. Kultūrām sākotnējais OD<sub>550</sub> atbilda 0,65.

### 2.2.1. tabula

Zm barotne

**Table 2.2.1.**

Zm growth medium

<b>Sastāvdaļa</b>	<b>Koncentrācija</b>
Glikoze	50 g/l
Rauga ekstrakts	5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	1 g/l

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
-------------------------------------	---------

Papildus pievienotas antibiotikas, atkarībā no celma un plazmīdas. *Z. mobilis* celmiem ar pBBRMC2 un no tās atvasinātajām plazmīdām pievienoja kanamicīnu (310 µg/ml). Zm6 – *ndh* un Zm6 – *cat* papildus pievienoja hloramfenikolu (120 µg/ml).

Elektroporācijas metodē tika izmantota RM barotne, kuras sastāvs norādīts 2.2.2. tabulā.

### 2.2.2. tabula

RM barotne

**Table 2.2.2.**

RM growth medium

Sastāvdaļa	Koncentrācija
Glikoze	20 g/l
Rauga ekstrakts	10 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/l

Agarizētajai RM barotnei pievienoja agaru (20 g/l) un antibiotikas – kanamicīnu (310 µg/ml) un hloramfenikolu (120 µg/ml) atkarībā no izolējamā baktēriju celma.

*Escherichia coli* audzēšanai izmantoja LB (*Luria Broth*) barotni, kuras sastāvs norādīts 2.2.3. tabulā.

### 2.2.3. tabula

LB barotne

**Table 2.2.3.**

LB growth medium

Sastāvdaļa	Koncentrācija
Triptons	10 g/l
Rauga ekstrakts	5 g/l
NaCl	10 g/l

*E. coli* tika audzētas kratītājā ar 200 apgr./min pie 37°C. Plazmīdas saturošajiem *E. coli* celmiem pievienoja kanamicīnu ar gala koncentrāciju 60 µg/ml. Agarizētajai LB barotnei pievienoja agaru (20 g/l).

Kompotentu *E. coli* DH5α iegūšanā izmantoja SOC barotni, kuras sastāvs norādīts 2.2.4. tabulā.

### 2.2.4. tabula

SOC barotne

**Table 2.2.4.**

SOC growth medium

Sastāvdaļa	Koncentrācija
Triptons	20 g/l

NaCl	0.5 g/l
Rauga ekstrakts	5 g/l
KCl	1,9 g/l

Ilgstošai *Z.mobilis* un *E. coli* glabāšanai izmantoja glicerīna barotnes, kuru pagatavošana norādīta 2.2.5. tabulā.

### 2.2.5. tabula

Baktēriju glicerīna kultūru pagatavošana

**Table 2.2.5.**

Glycerin bacterial growth medium preparation

<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
1. Audzē baktērijas 30 ml Zm barotnē pa nakti.	1. Audzē baktērijas 30 ml LB barotnē pa nakti.
2. Iegūto kultūru centrifūgē 10 min pie 5000 apgr./min. Supernatantu nolej.	2. Iegūto kultūru centrifūgē 10 min pie 5000 apgr./min. Supernatantu nolej.
3. Nogulsnes resuspendē 1,5 ml Zm barotnes, kurai pievienoti 500 µl 50% glicerīna un 40 µl 50% glikozes.	3. Nogulsnes resuspendē 1 ml LB barotnes, kurai pievienoti 450 µl 50% glicerīna.
4. 30 min inkubē istabas temperatūrā.	4. 30 min inkubē istabas temperatūrā.
5. Uzglabā pie -80 °C.	5. Uzglabā pie -80 °C.

## 2.3. Reāģenti

### 2.3.1. tabula

Izmantotie reāģenti

**Table 2.3.1.**

Reagents used in study

Reāģenti	Ražotājs
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	Sigma, Vācija
100 bp <i>Plus DNA Ladder</i> (DNS marķieris)	Thermo Scientific, ASV
Agarozē	Sigma, Vācija
CaCl <sub>2</sub>	Sigma, Vācija
Cianīds	Sigma, Vācija
DNA <i>Loading dye</i> (krāsviela paraugu ienešanai elektroforēzes gēlā),	Thermo Scientific, ASV
dNTP, Taq polimerāze,	Thermo Scientific, ASV
EDTA	Sigma, Vācija
Etanols	Jaunpagasts Plus, Latvija
Etīksskābe	Sigma, Vācija
Etīdija bromīds	Sigma, Vācija

Fenols	Sigma, Vācija
Glicerīns	Sigma, Vācija
Glikoze	Sigma, Vācija
Hloramfenikols	Sigma, Vācija
Kanamīcīns,	Sigma, Vācija
KCl	Sigma, Vācija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma, Vācija
Lizozīms	Sigma, Vācija
MgCl <sub>2</sub> ,	Thermo Scientific, ASV
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	Sigma, Vācija
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma, Vācija
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Sigma, Vācija
NaCl	Sigma, Vācija
NADH	Sigma, Vācija
NaOH	Sigma, Vācija
Nātrija dodecilsulfāts (SDS)	Sigma, Vācija
Proteināze K,	Thermo Scientific, ASV
<i>QIAquick Purification Kit</i> (komplekts PCR produktu attīrīšanai)	Qiagen, Vācija
<i>QIAquick Spin Miniprep Kit</i> (komplekts plazmīdu izdalīšanai).	Qiagen, Vācija
Rauga ekstrakts	Sigma, Vācija
Taq buferis,	Thermo Scientific, ASV
Trietanolamīns	Sigma, Vācija
Triptons	Sigma, Vācija
Tris bāze	Sigma, Vācija
Ubihinons Q1	Sigma, Vācija

### 2.3.2. tabula

Darbā izmantoto buferšķīdumu sastāvs

**Table 2.3.2.**

Composition of buffer solutions used in study

Nosaukums	Sastāvs
0,1 M CaCl <sub>2</sub> buferis	1,47 g CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O izšķīdina 100 ml H <sub>2</sub> O
0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> buferis pH 7	13,61 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pievieno 800 ml H <sub>2</sub> O; ar 6N KOH titrē līdz pH 7 un uzpilda ar H <sub>2</sub> O līdz 1000 ml
30 mM TrisHCl buferis pH 8,5	2,36 g Tris-HCl pievieno 400 ml H <sub>2</sub> O; titrē ar 6 N KOH līdz pH 8,5 un uzpilda ar H <sub>2</sub> O līdz 500 ml
50x TAE (Tris-acetatEDTA) buferis	48,4 g Tris bāzei pievieno 11,42 ml etiķskābi, 20 ml 0,5 M EDTA un uzpilda ar H <sub>2</sub> O līdz 200 ml
10% SDS (nātrija dodecilsulfāts)	10 g SDS un uzpilda ar H <sub>2</sub> O līdz 100 ml
PKLB (proteināzes K līzes buferis)	50 µl 2 M Tris-Cl (pH 8) sajauc ar 500 µl 0,5 M EDTA un 400 µl 5 M NaCl. Uzpilda ar H <sub>2</sub> O līdz 10 ml

## 2.4. Materiāli

### 2.4.1. tabula

Izmantotā aparatūra un tās ražotāji.

**Table 2.4.1.**

Equipment used and their producer.

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Autoklāvs	2100 Classic	Prestige Medical, Lielbritānija
Centrifūgas	Z383 K	Hermle laborotechnik GmbH, Vācija
	1-16	Sigma, Vācija
	Fuge-Vortex	Labotek, Vācija
	Sorwall wX+ Ultra series	Thermo Scientific, ASV
Elektroforēzes apatāts	EPS 301 Power Supply	Amersham pharmacia biotech, Lielbritānija
Elektroporācijas aparāts	MicroPulser	Bio-Rad, ASV
Kratītājs	Orbital Shaker – Incubator ES-20	Biosan, Latvija
Laboratorijas sviri	ABT 120-4M	KERN & Sohn GmbH, Vācija
Ledusskapis	SANTO	Elektrolux, Zviedrija
Mikroplašu lasītājs	Tecan infinite 200Pro	Tecan Group Ltd., Šveice
Mikroviļņu krāsns	G2712NR	Samsung, Dienvidkoreja
PCR aparāts	ProFlex™ 3 x 32-well PCR System	Thermo Scientific, ASV
pH metrs	PHM83 AUTOCAL	Radiometer, Dānija
Polarogrāfs	PHM73	Radiometer, Dānija
Spektrofotometrs	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, ASV
Termobloks	Thermo block TDB - 120	Biosan, Latvija
Termostats	BT120	Labaratorni Pristroje Praha, Čehija
Ultraskaņas dezintegrators	UP 200s	Dr. Hielscher GmbH, Vācija

### 2.4.2. tabula

Izmantotie materiāli un to ražotājs.

**Table 2.4.2.**

Materials used and their producer.

Materiāls	Raksturojums	Ražotājs
Automātiskās pipetes	0,1-2,5µl	Eppendorf, Vācija
	10-100µl	Eppendorf, Vācija
	0,2-2µl	Thermo Scientific, ASV
	2-20µl	Thermo Scientific, ASV
	100-1000µl	Thermo Scientific, ASV
	0,5-10µl	Sartorius, Vācija
	500-5000µl	Sartorius, Vācija
Automātisko pipešu uzgaļi	0,1 – 10 µL, 250 µL, 1000 µL, 10 mL zema blīvuma polietilēns	Sarstedt, Vācija

Elektroporācijas kivetes	0,2 cm	Sigma-Aldrich, Vācija
Petri plates	Zema blīvuma polietilēns	Sarstedt, Vācija
Plazmīdu attīrīšanas kolonnas	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Vācija
Laboratorijas trauki	Stikla trauki-kolbas, vārglāzes, mēģenes Mērcilindri	
Stobriņi	50 ml; 30ml; 2,0 ml; 1,5 ml; 0,2ml	Sarstedt, Vācija

## 2.5. *Zymomonas mobilis* genomiskās DNS izdalīšana

DNS izdalīšana veikta pēc (Sambrook et al. 1989):

1. Stobriņā iepilda 1,5 ml kultūras un centrifugē pie 13000 apgr./min 1 min.
2. Supernatantu nolej un nogulsnes resuspendē 1 ml TE bufera.
3. Centrifugē pie 13000 apgr./min 1 min.
4. Supernatantu nolej un nogulsnes resuspendē 200 µl LZ bufera.
5. Pievieno 20 µl lizozīma ar koncentrāciju 50 mg/ml un inkubē 15 min pie 37°C.
6. Pēc inkubācijas beigām pievieno 200 µl PKLB, 30 µl 10% SDS un 1 µl proteīnkināzi K ar koncentrāciju 20 mg/ml.
7. Inkubē 1 h pie 50 – 55°C, regulāri maisa invertējot.
8. Pievieno 600 µl fenola un intensīvi samaisa, lai iegūtu stabilu emulsiju.
9. Centriugē pie 3000 apgr./min 5 min.
10. Parauga augšējo fāzi pārnes sterilā stobriņā un pievieno 80 µl 5M NaCl un 800 µl 96% etanola. Samaisa invertējot.
11. Izgulsnēto DNS ar pipeti pārnes jaunā stobriņā.
12. Skalo ar 800 µl 70% etanolu.
13. Centrifugē pie 6500 apgr./min 5 min.
14. Supernatantu nolej un nogulsnes žāvē, stobriņu invertējot uz filtrpapīra.
15. Nogulsnes izšķīdina 100 – 200 µl ūdens.

## 2.6. Polimerāzes ķēdes reakcija

Reakcijas maisījums, ar kopējo tilpumu 10 µl, tika pagatavots 200 µl mikromēģenēs pēc 2.6.1. tabulā norādītajām sastāvdaļām, izmantojot 2.6.3. tabulā norādītos praimerus. Polimerāzes ķēdes reakcija (*polymerase chain reaction*, PCR) tika veikta pēc 2.6.2. tabulā norādītās programmas.

### 2.6.1. tabula

PCR reakcijas maisījuma komponenti

**Table 2.6.1.**

Components used for PCR

Komponents	Koncentrācija	Tilpums (μl)	Gala koncentrācija
PCR buferis	10x	1	1x
Tiešais praimeris	10 μM	0,1	0,2 μM
Atgriezeniskais praimeris	10 μM	0,1	0,2 μM
MgCL <sub>2</sub>	25 mM	0,8	2 mM
dNTP	10 mM	0,2	200 μM
Taq polimerāze	5 U/ μl	0,14	0,07 U/ μl
H <sub>2</sub> O		7,3	
DNS		0,36	

**2.6.2. tabula**

PCR programmas iestatījumi

**Table 2.6.2.**

Settings for PCR

	1.stadija	2.stadija(35 cikli)			3.stadij a	Uzglabāšan a
	Sākuma denaturācija	Denaturācij a	Praimeru piesaiste	Elongācij a	Beigu elocācij a	
<b>Temperatū ra, °C</b>	95	95	57	72	72	4,0
<b>Laiks, min</b>	3:00	0:30	0:30	1:30	10:00	∞

**2.6.3. tabula**

Izmantotie PCR praimeris, sekvencē pasvītrots restrikcijas saits

**Table 2.6.3.**

PCR primers used, restriction site is underlined

Praimera nosaukums	Sekvence (5' – 3')	Restrikcijas saits
<b>EGFP F</b>	ATACGGATCCACCGGTCGAATTCATGGTGA	EcoRI
<b>EGFP R</b>	TCCGCGGGAAGCTTTACTTGTACAGCTC	HindIII
<b>perC F</b>	CCGATGAATGGGATCCATAAGACCTTTTCC	BamHI
<b>perC R</b>	AGCCTTGATATTCATGAATTCGTGCTTGCC	EcoRI
<b>bc1 F</b>	TTGTTCTGGCTATGGATCCTGAGCCTAGAT	BamHI
<b>bc1 R</b>	TTCGCTATTCTTCATGAATTCTGACGAACC	EcoRI
<b>bd F</b>	GGTGGAATGGATCCGTCGCTTCAACCTTT	BamHI
<b>bd R</b>	CGCATCTGGTACCATGAATTCGGCTCCGTC	EcoRI
<b>Ndh F</b>	GGTTTGTGGATCCATAACCCATATTGACGG	BamHI
<b>Ndh R</b>	GACATGAATTCCTCTATTCTTCCAAGC	EcoRI
<b>Ppdc ndh fwd</b>	ATTTCATTCGCCATTCAGG	
<b>Ppdc ndh rev</b>	CACTTTATGCTTCCGGCTCG	
<b>Cat1</b>	AAGAGGGATCCTATGACTAGACCCAATCTT	

<b>Cat2</b>	GAAGCAGCAAGCTTTATAACAGGCTATCGG
-------------	--------------------------------

## 2.7. Elektroforēze agarozes gēlā

Pagatavoja 0,8% agarozes gēlu – 0,4 g agarozes atšķaida 50 ml 1 x TAE buferšķīdumā un uzsilddīja mikroviļņu krāsnī. Atdzesēja līdz 40°C un pievienoja 4 µl etīdija bromīdu. Gēlu ielēja elektroforēzes gēla formā un ievietoja ķemmīti. Pēc gēla sacietēšanas izņēma ķemmīti, ievietoja elektroforēzes kamerā un pārklāja ar 1x TAE buferi. Bedrītēs iepildīja 10 µl parauga, kuram pievienots 1 µl 1x *Loading Dye*. Vienā no bedrītēm pievienoja DNS marķieri, lai noteiktu paraugu DNS fragmentu izmērus. Elektroforēzi veica pie 120 V, 80 mA uz 1h.

## 2.8. PCR produkta attīrīšana

Ar PCR klonēto DNS produktu attīrīšanu veica pēc QIAGEN *QIAquick Purification Kit Protocol Handbook 2006*:

1. PCR produktam pievieno PB buferi, lai tilpuma attiecība PCR produktam pret buferi būtu 1:5.
2. Iegūto produktu pārnes uz 2 ml QIAquick spin kolonu un centrifūgē 1 min pie 13000 apgr./min.
3. Izņem membrānu, transudātu izlej no kolonas un ievieto membrānu atpakaļ stobriņā. Pievieno 750 µl PE bufera.
4. Kolonu centrifūgē 1 min pie 13000 apgr./min. Izņem membrānu, nolej transudātu, ievieto membrānu atpakaļ stobriņā. Atkārto šo soli otrreiz.
5. Pārliet membrānu sterilā 1,5 ml mikromēģenē. Pievieno 40 µl EB bufera, lai eluētu DNS no membrānas, un inkubē 1 min.
6. Centrifūgē mikromēģeni ar membrānu 1 min pie 13000 apgr./min.

## 2.9. Plazmīdu un PCR produktu restrikcija

pBBR-EGFP plazmīdas iegūšanai izmantoja 2.9.1. tabulā norādītos reakcijas maisījumus. No pBBR-EGFP atvasināto plazmīdu pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc<sub>1</sub>*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP iegūšanai izmantoja 2.9.2. tabulā norādītos reakcijas maisījumus.

Restrikcijas maisījumi tika inkubēti 2 h 37 °C, lai veicinātu restrikcijas enzīmu darbību. Pēc tam, lai inaktivētu restrikcijas enzīmus, temperatūru paaugstināja līdz 80 °C un maisījumu inkubēja 20 min. Pēc atdzesēšanas plazmīdas restrikcijas maisījumam pievienoja 3 µl sārmainās fosfatāzes (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP), kas novērš plazmīdas pašligēšanos. Reakcijas maisījumu ar SAP inkubēja 30 min 37 °C, lai veicinātu SAP enzīma darbību, un pēc tam

inaktivēja uzkaršējot līdz 75 °C un paturot 5 min. Tālāk iegūtos restrikcijas produktus attīrīja pēc protokola, kas paredzēts arī PCR produktu attīrīšanai.

### 2.9.1. tabula

Restrikcijas maisījumi pBBR-EGFP iegūšanai

**Table 2.9.1.**

Restriction enzyme mixtures for making pBBR-EGFP

	<b>pBBRMC-2</b>			<b>Ar PCR klonētais EGFP</b>		
	Koncentrācija	Tilpums	Gala daudzums	Koncentrācija	Tilpums	Gala daudzums
<b>Buferis Tango</b>	10x	20 µl	2x	10x	14 µl	2x
<b>Restriktāze EcoRI</b>	10 U/µl	3 µl	30 U	10 U/µl	3 µl	30 U
<b>Restriktāze HindIII</b>	10 U/µl	3 µl	30 U	10 U/µl	3 µl	30 U
<b>DNS</b>	165 ng/µl	24 µl	3960 ng	130 ng/µl	30 µl	3900 ng
<b>H<sub>2</sub>O</b>		50 µl			20 µl	
<b>Kopējais tilpums</b>	100 µl			70 µl		

### 2.9.2. tabula

Restrikcijas maisījumi no pBBR-EGFP atvasināto plazmīdu iegūšanai

**Table 2.9.2.**

Restriction enzyme mixtures for making plasmids derived from pBBR-EGFP

	<b>pBBR-EGFP2</b>			<b>Ar PCR klonētais promoters</b>		
	Koncentrācija	Tilpums	Gala daudzums	Koncentrācija	Tilpums	Gala daudzums
<b>Buferis EcoRI</b>	10x	10 µl	1x	10x	7 µl	1x
<b>Restriktāze EcoRI</b>	10 U/µl	2 µl	20 U	10 U/µl	2 µl	20 U
<b>Restriktāze BamHI</b>	10 U/µl	2 µl	20 U	10 U/µl	2 µl	20 U
<b>DNS</b>	~120 ng/µl	30 µl	~4000 ng	~85 ng/µl	35 µl	~3000 ng
<b>H<sub>2</sub>O</b>		56 µl			24 µl	
<b>Kopējais tilpums</b>	100 µl			70 µl		

## 2.10. Ligēšana

Lai ar PCR klonēto DNS fragmentu, EGFP vai promoteru, rekombinētu attiecīgajā plazmīdā, pēc restrikcijas tika veikta ligēšana. Ligēšanas reakcijas maisījumu sastāvs aprakstīts

2.10.1. tabulā. Tika variēti plazmīdas un PCR produktu daudzumi un attiecība, kā arī tika veikta plazmīdas pašligēšanās kontrole. Reakcijas maisījumus inkubēja 2,5 h istabas temperatūrā.

### 2.10.1.. tabula

Ligēšanas maisījuma sastāvs

**Table 2.10.1.**

Components used for ligation mixture

Reāģenti	1.variants	2. variants	Pašligēšanās pārbaude
<b>Plazmīda</b>	3 µl	3 µl	3 µl
<b>PCR produkts</b>	3 µl	6 µl	-
<b>T4 DNS ligāze</b>	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
<b>Ligāzes buferis 10x</b>	2 µl	2 µl	2 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	11,8 µl	8,8 µl	14,8 µl
<b>Kopējais tilpums</b>	20 µl	20 µl	20 µl

### 2.11. Kompetentu *Escherichia coli* DH5a transformācija

*Escherichia coli* transformācija tika veikta pēc Mandel and Higa, (1970):

1. *E. coli* DH5a audzē 5 ml LB barotnes pa nakti, kratītājā 37 °C
2. 50 µl no nakts kultūras pievieno stobriņā ar 5 ml LB barotni un audzē 2 h kratītājā 37 °C.
3. Stobriņu ar paraugu centrifūgē 10 min pie 5000 apgr./min.
4. Nogulsnes izšķīdina 10 ml atdzesētā, sterilā 100mM CaCl<sub>2</sub>.
5. Paraugu centrifūgē 10 min pie 5000 apgr./min.
6. Nogulsnes izšķīdina 500 µl atdzesētā, sterilā 100mM CaCl<sub>2</sub>.
7. Paraugu novieto uz ledus un inkubē 2 h pie 0 °C.
8. 100 µl *E. coli* šūnu suspensiju pārnes uz mikromēģenēm, pievieno 5- 10 µl ligēšanas miksa un inkubē uz ledus 30 min.
9. Paraugu 1 min silda 42 °C
10. Paraugu pārvieta uz ledus un atdzesē pie 0 °C 2 min.
11. Paraugam pievieno 900 µl siltas SOC barotnes.
12. Paraugu pārvieta kratītājā 37 °C uz 1 h.
13. Stobriņus ar paraugu centrifūgē 1 min pie 13000 apgr./min, supernatantu nolej.
14. Nogulsnes ar pipeti resuspendē atlikušajā supernatantā un pārnes uz Petri plati ar agarizētu LB barotni, kurai pievienotas antibiotikas transformēto šūnu selekcijai. pBBRMC-2 plazmīdas un tās atvasinājumu gadījumā kanamicīnu (koncentrācija 60 mg/ml).
15. Petri plates inkubē termostatā 37 °C 1-2 dienas.

## 2.12. Plazmīdu izdalīšana

Plazmīdu izdalīšana veikta pēc QIAGEN *Bench Protocol: QIAprep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge 2005*, kas balstīta uz (Birnboim and Doly, 1979):

1. Pa nakti audzēto kultūru centrifūgē 1min pie 13000 apgr./min. Supernatantu nolej.
2. Nogulsnēm pievieno 250 µl P1 bufera un vorteksē līdz nogulsnes izšķīst.
3. Suspensijai pievieno 250 µl P2 bufera un samaisa šūpojot 3 min, līdz paraugs iekrāsojas zils.
4. Pievieno 350 µl N3 bufera un samaisa šūpojot aptuveni 6 reizes, līdz izzūd zilais krāsojums.
5. Paraugu centrifūgē 1 min pie 13000 apgr./min.
6. Supernatantu pārnes uz *QIAprep spin* kolonnu un centrifūgē 1 min pie 13000 apgr./min.
7. Izņem membrānu, nolej transudātu, membrānu ievieto atpakaļ stobriņā.
8. Pievieno 750 µl PE bufera un centrifūgē 1 min pie 13000 apgr./min.
9. Izņem membrānu, nolej transudātu, membrānu ievieto atpakaļ stobriņā.
10. Atkārtoti centrifūgē paraugu 1 min pie 13000 apgr./min.
11. Membrānu pārvieto uz sterilu 1,5 ml mikromēģeni un pievieno 40 µl EB bufera. Inkubē 1 min.
12. Plazmīdas DNS eluācijai centrifūgē mikromēģeni ar membrānu 1 min 13000 apgr./min.

## 2.13. Plazmīdu pārbaude ar restrikcijas metodi

Lai pārbaudītu vai plazmīdas konstrukti ir atbilstoši izveidoti, tika veikta to pārbaude ar restrikcijas metodi. Visi reakcijas maisījumi inkubēti 37 °C 2 h pirms iegūto DNS fragmentu garumi pārbaudīti uz agarozes gēla elektroforēzes.

Plazmīdas pBBR-EGFP pārbaudei tika izmantoti 2.13.1. tabulā norādītie reakcijas maisījumi.

### 2.13.1. tabula

pBBR-EGFP plazmīdas restrikcijas pārbaudei izmantotie reakcijas maisījumi

**Table 2.13.1.**

Components used for plasmid pBBR-EGFP examination with restriction enzymes

Reāģenti	1. maisījums	2. maisījums
Plazmīda	6 µl	6 µl
Restriktāzes	HindIII 0,5 µl	BamHI 0,5 µl
	EcoRI 0,5 µl	-
Buferis	Tango 10x 2 µl	BamHI 1 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl	2,2 µl
Kopējais tilpums	10 µl	10 µl

1. maisījuma reakcijā plazmīda tika sagriezta 2 fragmentos. Starp EcoRI un HindIII restrikcijas saitēm atrodas 720 bp gara EGFP kodējošā sekvenca, kuru izgriežot palika 5130 bp garš pBBRMC-2 plazmīdas fragments. 2. maisījuma reakcijā pBBR-EGFP plazmīda tika pārgriezta BamHI restrikcijas saitā un iegūts 5858 bp garš fragments.

Reakcijas maisījumi no pBBR-EGFP atvasināto plazmīdu pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*PbcI*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP, pārbaudei aprakstīti 2.13.2.tabulā.

### 2.13.2. tabula

pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*PbcI*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP, plazmīdu restrikcijas pārbaudei izmantotie reakcijas maisījumi

**Table 2.13.2.**

Components used pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*PbcI*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP plasmid examination with restriction enzymes

Reāģenti	1. maisījums	2. maisījums	3. maisījums
Plazmīda	5 µl	5 µl	5 µl
Restriktāzes	BamHI 0,5 µl	BamHI 0,5 µl	BamHI 0,5 µl
	EcoRI 0,5 µl	HindIII 0,5 µl	-
Buferis BamHI	1 µl	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl	3 µl	3,5 µl
Kopējais tilpums	10 µl	10 µl	10 µl

1. maisījuma reakcijā no plazmīdām pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP, pBBR:*PbcI*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP tika izgrieztas starp restrikcijas saitēm BamHI un EcoRI esošās promotera sekvences. 2. maisījuma reakcijā no plazmīdām tika izgrieztas starp restrikcijas saitēm BamHI un HindIII atrodoamās promotera sekvences ar pēc tam sekojošo EGFP sekvenci. 3. maisījuma reakcijā plazmīdas tika pārgrieztas BamHI restrikcijas saitā un iegūta linearizēta plazmīda. Iegūto DNS fragmentu garumi apkopoti 2.13.3. tabulā.

### 2.13.3. tabula

Plazmīdu restrikcijas enzīmu pārbaudē iegūto fragmentu garumi

**Table 2.13.3.**

DNA fragment lengths from examination with restriction enzymes

Plazmīda	1. maisījums	2. maisījums	3. maisījums
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promoters</li> <li>pBBR-EGFP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promoters+EGFP</li> <li>pBBRMC-2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Linearizēta plazmīda</li> </ul>
pBBR: <i>Pndh</i> -EGFP	<ul style="list-style-type: none"> <li>266 bp</li> <li>5840 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>992 bp</li> <li>5114 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6106 bp</li> </ul>
pBBR: <i>PperC</i> -EGFP	<ul style="list-style-type: none"> <li>427 bp</li> <li>5840 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1153 bp</li> <li>5114 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6267 bp</li> </ul>
pBBR: <i>PbcI</i> -EGFP	<ul style="list-style-type: none"> <li>224 bp</li> <li>5840 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>950 bp</li> <li>5114 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6064 bp</li> </ul>
pBBR: <i>Pbd</i> -EGFP	<ul style="list-style-type: none"> <li>763 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1489 bp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6603 bp</li> </ul>

	• 5840 bp	• 5114 bp	
--	-----------	-----------	--

#### 2.14. *Zymomonas mobilis* transformācija ar elektroporācijas metodi

*Zymomonas mobilis* celmu transformācija ar elektroporācijas metodi tika veikta pēc (Zou et al., 2012):

1. Kultūru pa nakti audzē RM barotnē pie 30°C termostatā.
2. Pārsēj RM barotnē ar 2% glikozi, lai sākuma OD<sub>600</sub> būtu 0,13 - 0,20.
3. Kultūru audzē līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,3 - 0,45 pie 30°C termostatā.
4. Paraugu centrifugē pie 6000 apgr./min 10 min.
5. Supernatantu nolej un nogulsnes resuspendē 10 ml atdzesētā, sterilā ūdenī.
6. Centrifugē pie 6000 apgr./min 10 min.
7. Supernatantu nolej un nogulsnes resuspendē sterilā ūdenī, 100 reizes koncentrējot no sākotnējā audzēšanas tilpuma.
8. Paraugu iepilda stobriņos, katrā stobriņā 150 µl un novieto uz ledus.
9. Paraugam pievieno plazmīdu, kuras daudzums variē atkarībā no plazmīdas koncentrācijas.
10. Atdzesētā 0,2 cm elektroporācijas kivetē ienes parauga un plazmīdas suspensiju.
11. Veic elektroporāciju pie 2,5 kV 0,5 s.
12. Pievieno 850 µl siltas RM barotnes un paraugu pārnes sterilā stobriņā.
13. Kultūru audzē 24 h pie 30 °C termostatā.
14. Paraugu centrifugē pie 13000 apgr./min 1 min.
15. Supernatantu nolej un nogulsnes ar pipetes uzgali resuspendē.
16. Transformēās šūnas (50 µl) uzsēj uz Peri plates ar agarizētu RM barotni, kurai pievienotas atbilstošās antibiotikas – kanamicīns (310 µg/ml) un hloramfenikols (120 µg/ml)
17. Kultūru audzē 3-5 diennaktis pie 30°C termostatā.

#### 2.15. Šūnu biomasas mērīšana

Šūnu biomasas koncentrāciju noteica ar spektrofotometru pie 600 nm un 550 nm viļņu garumiem. Paraugu atšķaidīja 10 vai 100 reizes, lai OD būtu robežās no 0,1 līdz 1, jo šajā diapazonā ir cieša korelācija starp šūnu masas koncentrāciju un OD. Šūnu sausnes aprēķināšanai nosaka attiecību ar OD, veidojot standart šķīdumus ar noteiktu OD un tilpumu, pēc tam izžāvējot un nosverot. Izmantotajam spektrofotometram NanoDrop 2000c 1 OD pie 550 nm viļņu garuma atbilst 0.203 mg sausnes uz 1 ml.

## 2.16. Fluorescences mērijumi

Naktskultūras pārsēja svaigā Zm barotnē ar celmam un plazmīdai atbilstošām antibiotikām, lai OD<sub>600</sub> mikroplašu lasītājā atbilstu sākotnējai koncentrācijai 0,2. Sāls un etanola stresa apstākļu radīšanai barotnē iepriekš pievienoja NaCl, lai gala koncentrācija būtu 0,225 M, un etanolu, lai gala koncentrācija būtu 6 %. Iegūtos maisījumus pārnesa 96 bedeīšu platē, katrā bedrītē pa 200 μl. Mikroplašu lasītājā kultūras audzēja 15 stundas pie 30 °C, veicot OD un fluorescences mērijumus ik pēc 11 minūtēm ar kratīšanas režīmu 460 s un 1 min gaidīšanas laiku. OD mērijumu veica pie 600 nm, fluorescences ierosināšanas viļņa garums bija 475 nm un emisiju mērīja pie 510 nm. Audzēšana veikta 8 bioloģiskajos atkārtojumos apstākļos bez stresa, 6 bioloģiskajos atkārtojumos ar 6 % etanolu, 5 bioloģiskajos atkārtojumos ar 0,225 M NaCl. Katrā bioloģiskajā atkārtojumā ir veikti 6 līdz 2 tehniskie atkārtojumi, katram no celmiem pie visiem audzēšanas apstākļiem.

Lai pārbaudītu etanola un NaCl ietekmi uz EGFP tika uzaudzētas E.coli DH5α ar pQE-eGFP plazmīdu. Nakts kultūru pārsēja LB barotnē, lai OD<sub>600</sub> būtu 0,09. Audzēja uz kratītāja 200 apgr./min 37 °C līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,6 un pievienoja IPTG. Turpnāja audzēt vēl 3 stundas. Pēc tam šūnas centrifūgēja 7000 apgr./min un koncentrēja 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buferī ar pH 7, koncentrējot biomasu, lai OD<sub>600</sub> būtu 20. Šūnas dezintegrēja ar ultraskaņu un iegūto maisījumu ar EGFP atšķaidīja 10, 20 un 40 reizes buferī. Atšķaidījumiem pievienoja 12 %, 6 % un 3 % etanolu un 0,5 M, 0,225 M un 0,1 M NaCl. Iegūtos maisījumus iepildīja 96 bedrīšu platē pa 200 μl un nolasīja fluorescenci pie 475 nm ierosināšanas un 520 nm emisijas viļņu garumiem.

## 2.17. Šūnu membrānu paraugu pagatavošana ar ultraskaņu

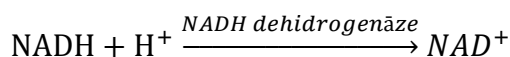
NADH dehidrogenāzes un oksidāzes aktivitātes noteikšanai membrānu paraugus gatavoja no kultūrām, kas augušas līdz agrīnam stacionāram.

1. Kultūras centrifūgēja 7000 apgr./min 10 min.
2. Supernantu nolēja un šūnas resuspendēja 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buferī ar 5mM MgSO<sub>4</sub> (pH=7), lai OD būtu atbilstu 20.
3. 2 ml iegūtās suspensijas iepildīja mēģenē un sonicēja 2 minūtes, paraugu vienlaikus dzesējot ar ledu.
4. Lai izgulsnētu nesagrautās šūnas centrifūgēja 4 min pie 4000 apgr./min. Nesagrautās šūnas izgulsnējās.

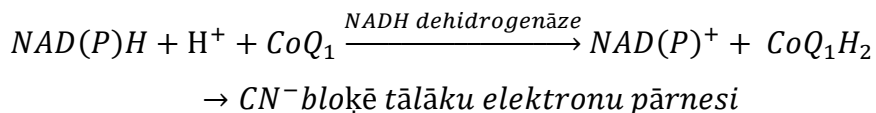
5. Tālāk supernatantu pārnes jaunā mēģenē. Membrānu iegūšanai izmantoja ultracentrifūgu, izgulsnējot pie 35000apgr./min 1 stundu pie 4°C.
6. Šķidro fāzi nolēja un, lai atmazgātu no olbaltumvielām, pievienoja 4 ml 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buferī ar 5mM MgSO<sub>4</sub> (pH=7).
7. Atkārtoti centrifūgēja 35000apgr./min 1 stundu pie 4°C.
8. Šķidro fāzi nolēja un membrānas resuspendēja 250 µl 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buferī ar 5mM MgSO<sub>4</sub> (pH=7).

### 2.18. Elpošanas aktivitātes noteikšana

Elektronu transporta ķēdes aktivitātes noteikšanu veica spektroskopiski (Kim et al., 1995). Oksidāzes reakcijas aktivitāte tika noteikta mērot absorbciju pie 340nm viļņu garuma. NADH dehidrogenāzei oksidējot NADH par NAD<sup>+</sup> ir novērojams absorbcijas kritums. Kivetē, kuras reakcijas maisījuma kopējais tilpums bija 1 ml, pievienoja 980 µl 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7), 10µl 10mM NADH un 10µl membrānu preparātu. Aktivitātes aprēķināšanai izmantoja ekstinkcijas koeficientu  $\epsilon_{\text{NADH}} \text{ pie } 340\text{nm} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .



NADH:CoQ<sub>1</sub> oksidoreduktāzes reakcijas noteikšanai reģistrēja koenzīma Q<sub>1</sub> absorbcijas izmaiņas pie 276 nm viļņu garuma. Bloķējot elpošanas ķēdes terminālās oksidāzes ar KCN, koenzīms Q<sub>1</sub> tiek reducēts un ir novērojams absorbcijas samazināšanās pie 276 nm.



Kivetē, kuras reakcijas maisījuma kopējais tilpums bija 1 ml, pievienoja 950 µl 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7), 10µl membrānu preparātu, 10µl 8mM ubihinonu Q<sub>1</sub>, 20µl 1M KCN un inkubēja 2 min, lai KCN inaktivētu terminālās oksidāzes, un pēc tam pievienoja maisījumam 10µl 10mM NADH. Aktivitātes aprēķināšanai izmantoja ekstinkcijas koeficientu  $\epsilon_{\text{Q}_1} \text{ pie } 276\text{nm} = 14,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Aprēķins veikts pēc formulas:

$$\text{Enzīma aktivtāte} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times c} \times \text{atšķaidījuma faktors} \times \frac{1}{\text{mg sauses vai proteīna}}$$

kur enzīma aktivitātes ar mērvienība ir U/mg sauses vai proteīna (enzimātiskā vienība U=µmol/min),  $\Delta A$  ir absorbcijas izmaiņa 1 min,  $c$  ir kivetes biezums (izmantotā kivete bija 1 cm bieža),  $\epsilon$  ir ekstinkcijas koeficients ar mērvienību  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## 2. 19. Olbaltumvielu koncentrācijas mērīšana

Olbaltumvielu koncentrācija noteikta pēc (Lowry et al., 1951). Izmantotie reaktīvi bija reaktīvs A (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> šķīdums 0,1 N NaOH), reaktīvs B (0,5% CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O šķīdums 1% C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>(OH)(COONa)<sub>3</sub>), reaktīvs C (Reaktīvs A + Reaktīvs B, kuru ar attiecība bija 50 : 1) un Folīna reaktīvs ar 1 N koncentrāciju.

1 ml 50 reizes atšķaidītam membrānu paraugam pievienoja 5 ml reaktīvu C. Iegūto šķīdumu samaisīja un inkubēja 10 minūtes. Tālāk pievienoja 0,5 ml Folīna reaktīva. Šķīdumu samaisīja un inkubēja 30 minūtes. Kad inkubācijas periods beidzās, šķīdumu ielēja 1 cm biezā kivetē un spektroskopiski noteica absorbciju pie 750 nm. Izmantojot kalibrācijas līkni, atrada atbilstošo olbaltumvielu daudzumu mg/ml. Iegūto rezultātu reizināja ar izmantoto atšķaidījumu – 50 reizes.

Kalibrācijas līknei izmantoja 2 mg/ml liellopu seruma albumīnu, no kura izveidoja 50, 100, 300, 500, 750 µg/ml atšķaidījumus 1ml tilpumā. Kontrolei izmantoja 1ml H<sub>2</sub>O.

## 2.20. Programmas un statistikas testi

Datu apstrādei izmantots Microsoft Excel (Microsoft Corporation, ver. 2303 Build 16.0.16227.20202, <https://office.microsoft.com/excel>). Sākotnēji no tehniskajiem atkātojumiem katrā audzēšanas reizē aprēķināts vidējās vērtības OD<sub>600</sub> un fluorescenci. Tālāk aprēķināta fluorescences attiecība pret OD, katram celmam pie attiecīgajiem audzēšanas apstākļiem.

$$\frac{\text{Fluorescence}}{OD_{600}}$$

Individuālo bioloģisko atkātojumu vidējās OD<sub>600</sub> un fluorescences attiecības pret OD vērtības tika apvienotas kopējās vidējās vērtībās un aprēķināta standartnovirze. Pēc tam katram no celmiem (*Zm6*, *Zm6-ndh*, *Zm6-cat*) ar promoterus saturošajām plazmīdām (pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc<sub>1</sub>*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP) pie attiecīgiem audzēšanas apstākļiem (bez stresa, ar 6 % etanolu, ar 0,225 M NaCl) tika veikta normēšana pret attiecīgo celmu ar plazmīdu ar EGFP bez promotera (pBBR-EGFP) pie attiecīgajiem audzēšanas vides apstākļiem. Piemēram:

$$\frac{\text{Zm6 pBBR: Pndh – EGFP}_{\text{vidējā fluorescences vērtība}}}{\text{Zm6 pBBR – EGFP}_{\text{vidējā fluorescences vērtība}}}$$
 **pie 6 % etanola**

Tālāk noteica vai ir statistiski ticama atšķirība *Zymomonas mobilis* celmiem ar promoterus saturošajām plazmīdām un šo pašu celmu ar EGFP saturošu plazmīdu bez promotera pie attiecīgiem audzēšanas apstākļiem, jeb starp skaitītāju un saucēju iepriekšējā

vienādojumā, ar pāru Stjūdentā t-testu. Par statistiskās ticamības sliekšni pieņēma p-vērtību, kas ir zemāka par 0,05.

Tālāk tika noteikta attiecība starp fluorescenci, kas normēta uz OD pret OD celmiem bez promoteriem, lai noteiktu vai pašfluorescences attiecība uz biomasas pieaugumu ir konstanta. Tā kā attiecība nebija konstanta pie visām OD vērtībām, tika izvēlēts reģions kur attiecība ir tuvāk konstantai, jeb 8. audzēšanas stundā. Tika noteikta statistiskā ticamība starp Zm6 fluorescences un OD<sub>600</sub> attiecību ar pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc1*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP plazmīdām, kuras normētas pret plazmīdnesēju bez promotera pBBR-EGFP, pie normāliem un 6 % etanola, kā arī normāliem un 0.225 M NaCl apstākļiem ar Stjūdentā t-testu.

## 3. REZULTĀTI

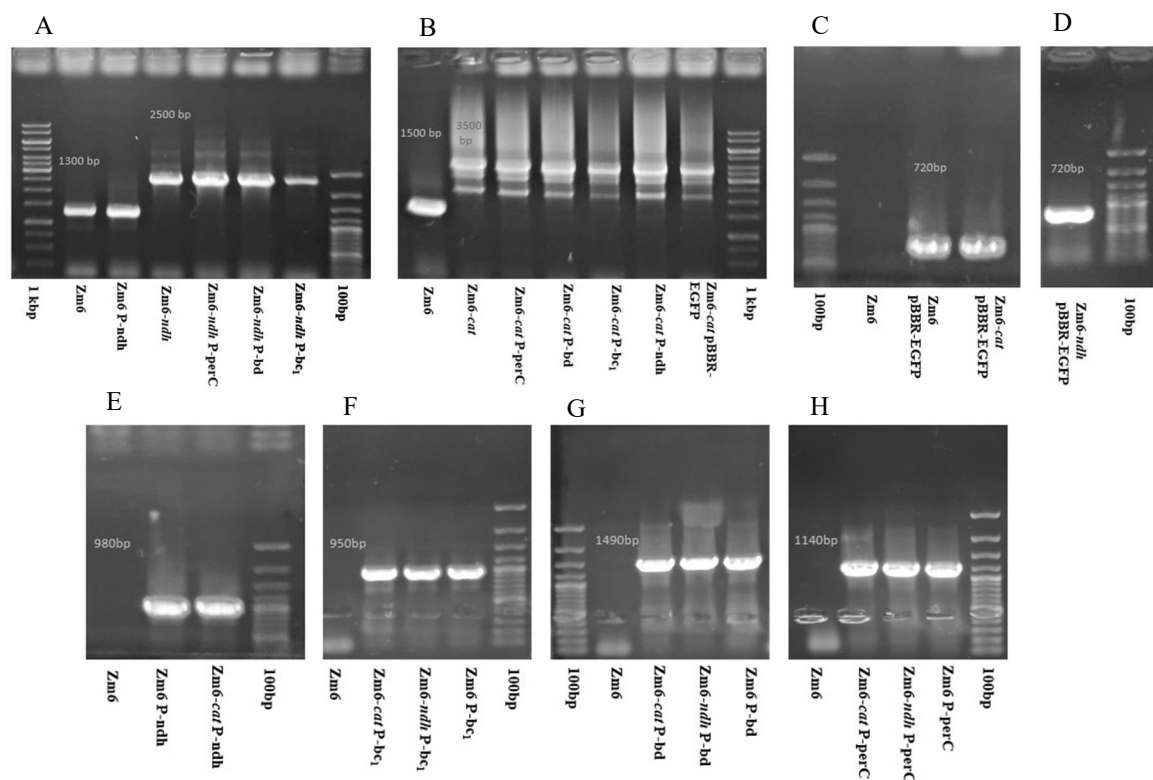
### 3.1. Reportiersistēmas izveide un pārbaude

Reportiergēnu izveidei tika izvēlēti elpošanās ķēdes komponenti: II tipa NAD(P)H dehidrogenāze, citohroms *bd*, citohroms *bc<sub>1</sub>* un citohroma *c* peroksidāze. Promoteru sekvenses tika iegūtas no NCBI datu bāzes (1.pielikums). Pēc Yang et al. (2019) tika izvēlēti Zm6 sekvenses reģioni no intresējošā gēna sākuma līdz iepriekšējā gēna beigām. Operonu gadījumā, kā citohromam *bd* un citohromam *bc<sub>1</sub>*, tika izvēlēts reģions no operona sākuma. PCR kolonēšanai tika izveidoti promoteri ar BamHI un EcoRI restrikcijas saitēm. Sešus nukleotīdus pirms kodējošā gēna sekvenses nomainīja ar EcoRI restrikcijas saiti, lai neskartu ribosomas saistīšanās vietu un iepriekšējā gēna beigās sešus nukleotīdus nomainīja ar BamHI kodējošo sekvenci (2.6.3. tabula, 1.pielikums). Par reportiergēnu izvēlējās EGFR, kurš bija plazmīdas pQE-eGFP sastāvā (4.pielikums). PCR klonēšanai izveidoja praimerus ar EcoRI restrikcijas saiti tieši pirms EGFP kodējošās sekvenses un HindIII saiti pēc kodējošās sekvenses. Stop kodons EGFP tika nomainīts uz TAA (1.pielikums). Iegūtās promoteru sekvenses un EGFP apstrādāja ar restrikcijas enzīmiem (2.9.1. un 2.9.2. tabula) un ieligēja plazmīdas vektorā pBBR1MCS2 (2.10.1. tabula). Iegūto plazmīdu apraksts ir 2.1.1. tabulā.

Vispirms izveidoja pBBR-EGFP plazmīdu ieligējot EGFP pBBR1MCS2. Tālāk ieligējot promoterus izveidoja plazmīdas pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc<sub>1</sub>*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP (vispārēja shēma – 2. pielikumā, sekvence – 3. pielikumā). Plazmīdu klonēšanai un pavairošanai izmantoja *Escherichia coli* celmu DH5 $\alpha$ . Iegūtās DH5 $\alpha$  kolonijas tika pārbaudītas ar PCR, lai noteiktu vai tās satur plazmīdu (5. pielikums) Plazmīdas pēc izdalīšanas un attīrīšanas tika pārbaudītas sagriežot ar restrikcijas enzīmiem un iegūtie garumi noteikti ar agarozes gēla elektroforēzi (fragmentu garumi – 2.13.3. tabula, agarozes gēla elektroforēzes attēli – 5.pielikums).

Nākamajā solī plazmīdas ieporēja *Zymomonas mobilis* celmos Zm6, Zm6-*ndh*, kuram ir inaktivēts *ndh* gēns, un Zm6-*cat*, kuram ir inaktivēts katalāzes gēns. Zm6-*ndh* izvēlēts, jo tas praktiski neuzrāda elpošanas ķēdes aktivitāti (Kalnenieks et al 2008) un tam ir raksturīga paaugstināta izturība pret oksidatīvo stresu (Strazdina 2012; Kovtuna et al 2022), savukārt Zm6-*cat* ir pazemināta izturība pret oksidatīvo stresu (Strazdina 2012, Balodīte et al 2014; Kovunta et al 2022). Zm6-*ndh* un Zm6-*cat* celmi tika pārbaudīti vai tiem attiecīgi *ndh* un katalāzes gēns satur hloramfenikola rezistences marķierus (3.1. A un B attēls). Zm6-*ndh* tika izmantots Ppdc\_ *ndh*\_ fwd un Ppdc\_ *ndh*\_ rev praimeru pāris, Zm6-*cat* – Cat1 un Cat2 (2.6.3. tabula). Pēc pBBR-EGFP ieporēšanas *Zymomonas mobilis* celmos, kolonijas tika pārbaudītas

ar PCR, izmantojot EGFP\_F un EGFP\_R praimeru pāri (3.1. C un D attēls) un arī kombinējot Ppdc\_ndh\_fwd, kurš saistās pBBR1MCS2, kopā ar EGFP\_R (5.pielikums). pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc1*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP pārbaudei tika izmantots EGFP\_R praimeris kombinācijā attiecīgi ar *Ndh\_F*, *bc1\_F*, *bd\_F* un *perC\_F* (3.1. E, F, G un H attēls, 5. pielikums).



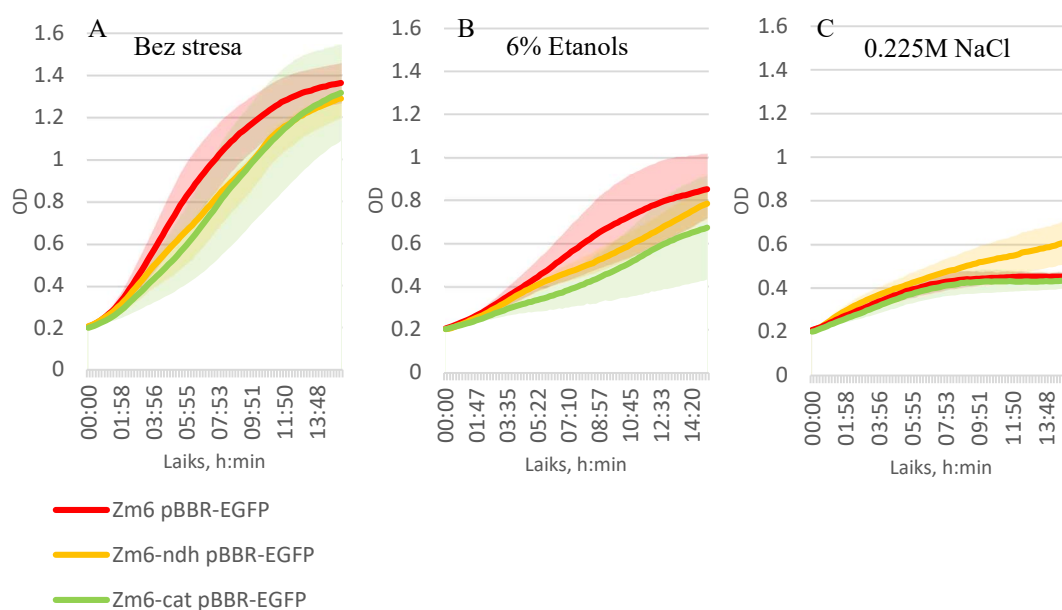
**3.1. attēls.** PCR produktu attēli elektroforēzes gēlā ar eksperimentā izmantoto mutanto celmu pātbaudi (A,B) un plazmīdu pBBR-EGFP (C,E), pBBR:*Pndh*-EGFP (E), pBBR:*Pbc1*-EGFP (F), pBBR:*Pbd*-EGFP (G), pBBR:*PperC*-EGFP (H) pārbaudi izmantotajos celmos Zm6, Zm6-*cat*, Zm6-*ndh*.

**Figure 3.1.** Images of PCR products in an electrophoresis gel with control of mutant strains used in the experiment (A, B) and plasmid pBBR-EGFP (C, E), pBBR:*Pndh*-EGFP (E), pBBR:*Pbc1*-EGFP (F), pBBR:*Pbd*-EGFP (G), pBBR:*PperC*-EGFP (H) test in the used strains Zm6, Zm6-*cat*, Zm6-*ndh*.

### 3.2. Stresa apstākļu ietekme uz augšanu

Optiskā blīvuma mērījumi tika veikti ar mikroplašu lasītāju (.3.2. attēls, 7. pielikums) vairākos bioloģiskos atkārtojumos(8 – 4) un audzējot 15 ml barotnes, kas iepildītas 100 ml koniskajās kolbās uz kratītāja(6. pielikums). Audzēšanas datiem, kuri iegūti no mikroplašu lasītāja ir novērojama liela izkliede To vatētu saistīt ar lielāku sākotnējo apstākļu atšķirību

mazākajā tilpumā. Augšana starp Zm6 celmiem ar visiem plazmīdu variantiem (pBBR-EGFP, pBBR:Pndh-EGFP, pBBR:PbcI-EGFP, pBBR:Pbd-EGFP un pBBR:PperC-EGFP) ir savstarpēji līdzīga, tāpat arī Zm6-ndh celmiem ar visām plazmīdām un Zm6-cat celmiem ar visām plazmīdām (7. pielikums). Normālos apstākļos vislabāk auga Zm6 celmi, Zm6-ndh un Zm6-cat augšana ir līdzīga, kaut gan audzējot lielākā tilpumā Zm6-ndh aug labāk un beigās sasniedz līdzīgu biomasu kā Zm6 (3.2. A attēls). Barotnei pievienojot 6% etanolu visi celmi aug lēnāk, eksponenciālā fāze ir garāka un biomasas audzēšanas beigās ir mazāka (3.2. B attēls). Sāls stress kavē *Zymomonas mobilis* augšanu visvairāk, bet pie sāls stresa visizturīgākais ir Ndh negatīvais celms (3.2. C attēls). To pašu efektu novēroja audzējot lielākā tilpumā (6. pielikums).



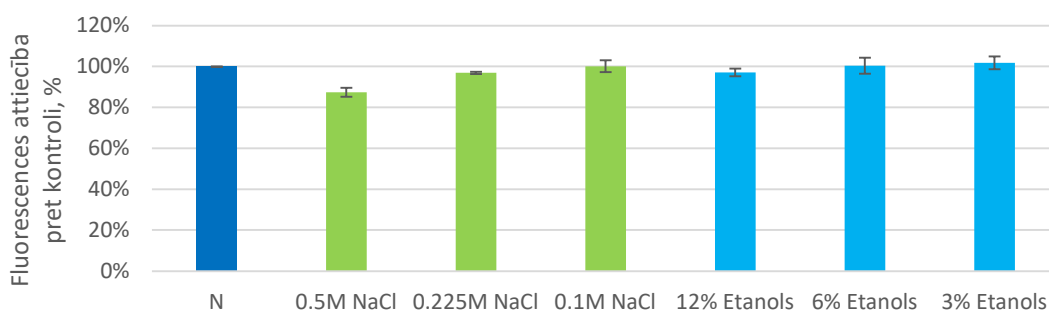
**3.2. attēls.** pBBR-EGFP saturošo celmu augšanas salīdzinājums pie normāla barotnes satura (A), ar pievienotu 6% etanolu (B) un 0,225M NaCl (C). Dati attiecīgi no 8, 5 un 4 bioloģiskajiem atkārtojumiem audzējot uz mikroplašu lasītāja.

**Figure 3.2.** Growth comparison of strains containing pBBR-EGFP plasmid at normal growth medium content (A), supplemented with 6% ethanol and 0.225M NaCl. Data from 8, 5 and 4 biological replicates respectively when grown on a microplate reader.

### 3.3. Stresa apstākļu ietekme uz elpošanas ķēdes komponentu promoteru aktivitāti

Sākotnēji tika pārbaudīta etanola un NaCl ietekme uz EGFP fluorescenci. Šim nolūkam tika *E.coli* DH5 $\alpha$  ar pQE-eGFP kas saturēja IPTG inducējamu T7 fāga polimerāzes regulētu EGFP produkciju. *E.coli* tika iesēta LB barotnē ar sākotnējo OD 0.2. Baktērijas audzēja uz krafitāja 4 stundas un pēc tam pievienoja IPTG un turpināja kultivēt vēl pāris stundas. Pēc tam šūnas tika centrifūģētas 10 min 7000 apgr./min, barotne nolieta un šūnas resuspendētas fosfāta

buferī ar pH7. Lai sagrautu šūnas tās sonicēja un atdalīja supernatantu. *E. coli* lizāts saturēja lielu daudzumu EGFP un to vajadzēja atšķaidīt 10 – 40 reizes. Pēc 12%, 6%, 3% etanola un 0,5M, 0,225M un 0,1M NaCl pievienošanas tika nomērīta fluorescence. Normējot iegūto fluorescenci pret to, ko emitēja EGFP bez pievienotā NaCl un etanola, var redzēt ka visvairāk fluorescence mazinājās pie 0,5M NaCl un atbilda 88% no kontroles. Darbā NaCl stresa apstākļiem tika izmantots 0.225M NaCl, kuram fluorescence atbilda 97% no kontroles. Pie 6% etanola, kas izmantots etanola stresa apstākļu radīšanai *Zymomonas mobilis*, fluorescences samazināšanos nenovēroja (3.3. attēls). Šie dati liecina, ka eksperimentā izmantotās stresoru koncentrācijas ievērojami neietekmēja EGFP fluorescentās īpašības.

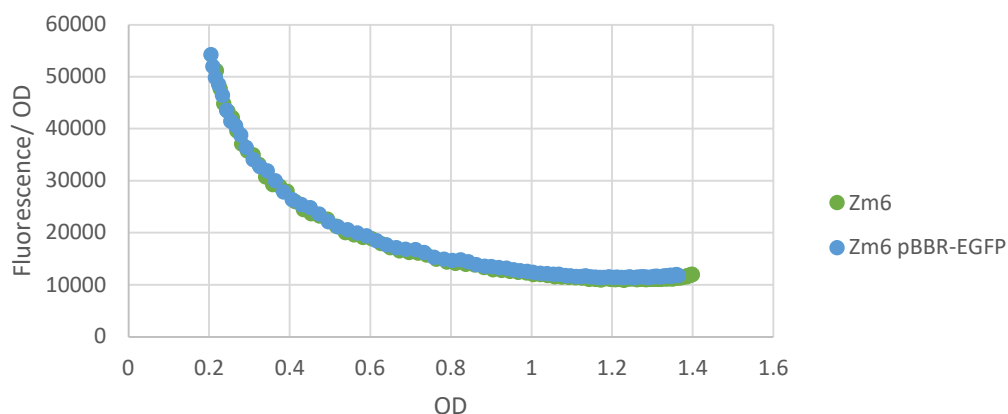


**3.3. attēls.** EGFP fluorescences izmaiņas pēc 0,5 – 0,1 M NaCl un 12 – 3 % etanola pievienošanas. Mērījumi veikti trīs atkārtojumos.

**Figure 3.3.** Changes in EGFP fluorescence after addition of 0.5–0.1 M NaCl and 12–3% ethanol. Measurements were performed in three replicates.

Lai pārbaudītu promoteru aktivitātes izmaiņas, *Zymomonas mobilis* celmus Zm6, Zm6-ndh, Zm6-cat ar reportierģēnu plazmīdām pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc1*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*PperC*-EGFP un pašfluorescences kontroli pBBR-EGFP audzēja mikroplašu lasītājā, vienlaikus nosakot gan OD, gan fluorescenci ik pēc 10 min 15 stundu garumā.

Nākamais solis bija noskaidrot kā fluorescence mainās atkarībā no biomasas pieauguma OD. Pēc šīs attiecības aprēķināšanas bija nozīmīgi noskaidrot vai attiecība starp šiem mērījumiem ir lineāra izejas celmiem un celmiem ar pašfluorescences kontroles plazmīdu pBBR-EGFP. Apskatot fluorescences attiecību pret OD atkarībā no OD (3.4. attēls) var redzēt ka tā nav konstanta, līdz ar to arī attiecība starp fluorescenci un OD nav lineāra. Šūnām augšanas sākumposmā ir raksturīga daudz augstāka pašfluorescence, tādējādi nelielām atšķirībām OD starp celmiem ir daudz lielāka fluorescences atšķirība augšanas sākumposmā un, salīdzinot dažādos celmos šos lielumus, būtu lielāka kļūda.. Audzēšanas beigu posmā attiecība kļūst lineāra un OD ietekme mazinās. 3.4. attēlā ir salīdzināta pašfluorescence Zm6 celmam bez plazmīdas un Zm6 ar pBBR-EGFP. Starp abiem celmiem nav atšķirības, kas liecina ka Zm6 ar bezpromotera plazmīdu pBBR-EGFP nesintezē EGFP un uzrāda tikai fona fluorescenci.



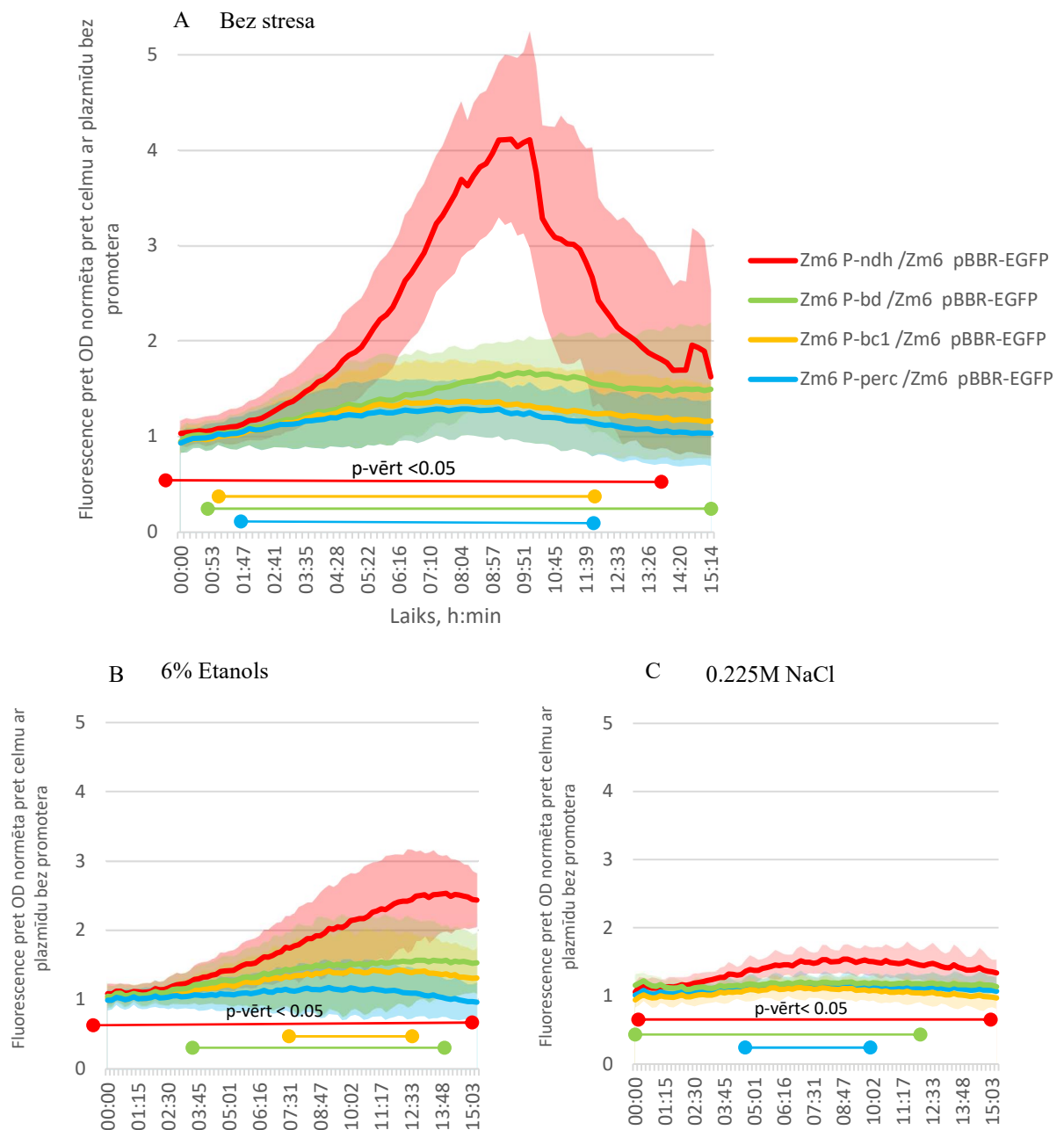
**3.4. attēls.** Fluorescence, kas normēta pret OD, atkarībā OD Zm6 celmam un Zm6 ar pBBR-EGFP plazmīdu. Mērījumi no 8 bioloģiskajiem atkārtojumiem.

**Figure 3.4.** Fluorescence normalized to OD as a function of OD for the Zm6 strain and Zm6 with the pBBR-EGFP plasmid. Measurements from 8 biological replicates.

Pēc tam tika noskaidrots vai ir statistiski ticama atšķirība fluorescences/OD mērījumu attiecībai starp celmiem ar pašfluorescences plazmīdu pBBR-EGFP pret to pašu celmu variantiem ar katru promoteru saturošajām plazmīdām – pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc1*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP un pBBR:*PperC*-EGFP. Statistiskās ticamības noteikšanai izmantoja pāru t-testu. Tika salīdzināti visi mērījuma veikšanas punkti, kuri veikti ik pēc 10 min 15 stundu garumā. Rezultāti Zm6 celmam attēloti 3.5. attēlā ar līnijām, kas atbilst laika nogrieznim, kur p-vērtība bija zemāka par 0,05, salīdzinot Zm6 ar pBBR-EGFP ar katru no promoteru saturošajiem Zm6 celmiem.

Pie normāliem audzēšanas apstākļiem attiecība bija statistiski ticama gandrīz visā audzēšanas laikā (3.5. A attēls). Tas liecina ka promoteru aktivitātes rezultātā tika sintezēts EGFP. Pie 6% etanola stresa statistiski ticama atšķirība starp Zm6::pBBR-EGFP un Zm6::pBBR:*Pndh*-EGFP celmiem bija gandrīz visā audzēšanas laikā, statistiski ticamas attiecības mazākos laika intervālos bija novērojamas arī salīdzinot Zm6::pBBR-EGFP ar Zm6::pBBR:*Pbc1*-EGFP un Zm6::pBBR:*Pbd*-EGFP (3.5. B attēls). Pie sāls stresa gandrīz visā audzēšanas laikā statistiski ticama attiecība bija ar Zm6::pBBR:*Pndh*-EGFP, un mazākos intervālos ar Zm6::pBBR:*Pbd*-EGFP un Zm6::pBBR:*PperC*-EGFP.

Lai izslēgtu pašfluorescences ietekmi, celmiem ar promoteru saturošajām plazmīdām fluorescences/OD attiecība tika normēta, jeb dalīta ar tā paša celma pBBR-EGFP saturošā celma fluorescences/OD attiecību. Šīs normētās fluorescences/OD attiecības Zm6 celmiem ar pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc1*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP un pBBR:*PperC*-EGFP plazmīdām ir attēlotas 3.5. attēla augšējā daļā ar līknēm un norāda uz attiecīgā promotera aktivitāti.



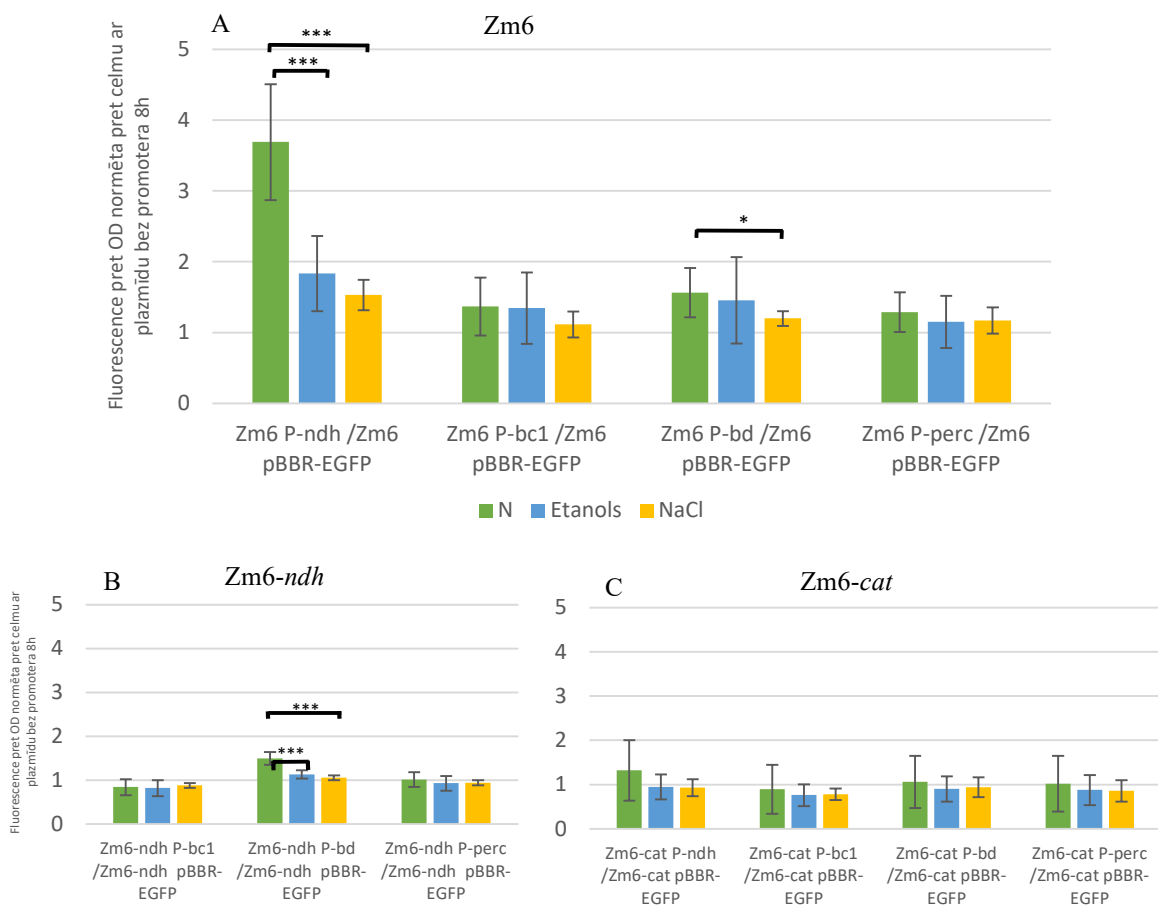
**3.5. attēls.** Fluorescences attiecība pret OD promorerus saturošo plazmīdu pBBR:*Pndh*-EGFP (P-ndh), pBBR:*Pbc1*-EGFP (P-bc1), pBBR:*Pbd*-EGFP (P-bd), pBBR:*Pperc*-EGFP (P-perC) celmiem Zm6, kas normēti pret celmu ar promoteru nesaturošo pBBR-EGFP plazmīdu Zm6. Izmaiņas laikā audzējot pie normāliem apstākļiem (A), ar pievienotu 6% etanolu (B) un 0,225M NaCl (C). Ar līniju norādīts, kur ir statistiski ticama attiecība izmantojot pāru t-testu ( $p$ -vērt < 0.05) starp Zm6 ar pBBR-EGFP un attiecīgi krāsai Zm6 ar pBBR:*Pndh*-EGFP, pBBR:*Pbc1*-EGFP, pBBR:*Pbd*-EGFP, pBBR:*Pperc*-EGFP. Aprēķins veikts katrā datu ievākšanas punktā. Dati no 8 (A), 5 (B) un 4 (C) bioloģiskajiem atkārtojumiem.

**Figure 3.5.** Fluorescence ratio to OD for plasmids containing promoters pBBR:Pndh-EGFP (P-ndh), pBBR:Pbc1-EGFP (P-bc1), pBBR:Pbd-EGFP (P-bd), pBBR:PperC-EGFP (P-perC) in Zm6 normalized against the promoterless pBBR-EGFP plasmid in Zm6. Grown under normal conditions (A), with added 6% ethanol (B) and added 0.225M NaCl (C). A line indicates where there is a statistically significant relationship between Zm6 with pBBR-EGFP and Zm6 with pBBR:Pndh-EGFP, pBBR:Pbc1-EGFP, pBBR:Pbd-EGFP or pBBR:PperC-EGFP indicated with respective color. Significance test calculated using a paired t-test ( $p$ -value $<0.05$ ) in every measurement point. Data from 8 (A), 5 (B) and 4 (C) biological replicates.

Vislielākā aktivitāte ir novērojama *ndh* promoteram. Tā pieaug eksponenciālās fāzes vidū un sasniedzot stacionāro fāzi krītas. NADH II tipa dehidrogenāzes aktivitātes maksimums eksponenciaālās fāzes vidū novērots arī *E.coli* (Wackwitz et al. 1999). Grafikā norādītā aktivitāte *ndh* promoteram 9. – 14. stundā ir mazāka par faktisko, jo 5 no 8 atkārtojumiem šajā intervālā nomērītā fluorescences pārsniedza mikroplašu lasītāja mērāmo diapazonu. Pārējo elpošanas ķēdes komponentu aktivitāte ir vāja, bet arī ir novērojama tendence aktivitātei pieaugt eksponenciālās fāzes vidū. Otrs spēcīgākais promotors ir *Zymomonas mobilis* vienīgai zināmajai terminālai oksidāzei – citohromam *bd*.

Pie etanola stresa novērojama promoteru aktivitātes samazināšanās (3.5. B attēls), bet pie NaCl stresa promoteru aktivitāte ir pavisam niecīga (3.5. C attēls).

Tā kā audzēšanas sākumposmā šūnām ir lielāka pašfluorescence un nelielas OD izmaiņas vairāk ietekmē fluorescences attiecību pret OD, promoteru aktivitātes izmaiņu salīdzināšanai pie dažādiem audzēšanas apstākļiem veica 8. audzēšanas stundā, kur attiecība kļūst lineārāka (3.4. attēls). Zm6 ir novērojami statistiski ticami ( $p$ -vērtība $<0,05$ ) aktivitātes samazināšanās pie 6% etanola stresa salīdzinot ar aktivitāti audzējot normālā Zm barotnē. Pie sāls stresa aktivitātes samazinājums bija vēl lielāks. Statistiski ticams aktivitātes samazinājums bija arī citohroma *bd* promoteram pie 0,225M NaCl stresa salīdzinot ar kontroli. Aktivitāte kritās arī pie etanola stresa, bet starpība nebija statistiski ticama. Arī citohroma *bc1* un citohroma *c* peroksidāzes promoteru aktivitātēm bija neliela tendence samazināties pie stresa apstākļiem (3.6. A attēls). Zm6-*ndh* un Zm6-*cat* (izņemot P-ndh) elpošanas ķēdes promoteriem nebija novērojama aktivitāte (3.6. B un C attēls). Normētā promoterus saturošo plazmīdu fluorescences/OD attiecība bija aptuveni 1, kas nozīmē ka tā pielīdzināma pašfluorescensei. Zm6-*ndh* celmam gan bija novērojama citohroma *bd* aktivitāte, kura uzrādīja statistiski ticamu aktivitātes samazināšanos gan pie etanola, gan pie sāls stresa, kad promoteru aktivitāte vairs nebija novērojama (3.6. B attēls).



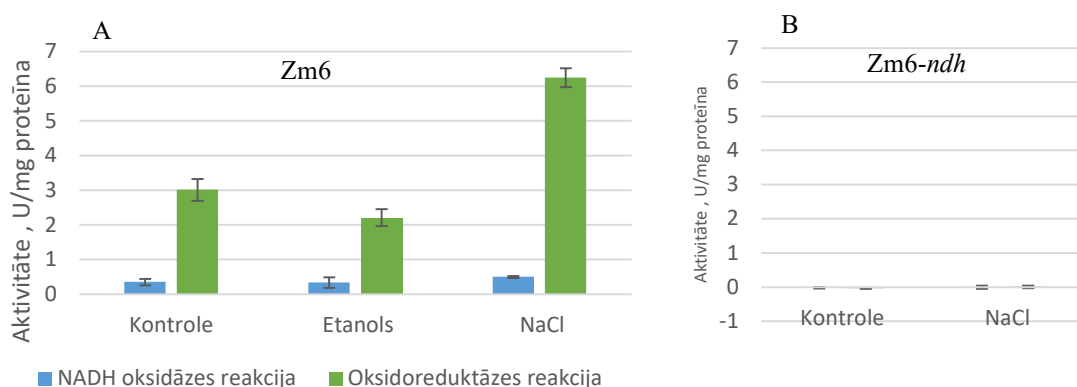
**3.6. attēls.** Fluorescences attiecība pret OD promorerus saturošo plazmīdu pBBR:*Pndh*-EGFP (P-ndh), pBBR:*Pbc1*-EGFP (P-bc1), pBBR:*Pbd*-EGFP (P-bd), pBBR:*PperC*-EGFP (P-perC) celmiem, kas normēti pret celmu ar promoteru nesaturošo pBBR-EGFP plazmīdu Zm6 (A), Zm6-*ndh* (B) un Zm6-*cat* (C) 8. audzēšanas stundā audzējot pie normāliem apstākļiem, ar pievienotu 6% etanolu un 0,225M NaCl. Norādīta statistiskā pie dažādiem apstākļiem izmantojot t-testu.

**Figure 3.6.** Fluorescence to OD ratio for plasmids containing promoters pBBR:*Pndh*-EGFP (P-ndh), pBBR:*Pbc1*-EGFP (P-bc1), pBBR:*Pbd*-EGFP (P-bd), pBBR:*PperC*-EGFP (P-perC) OD normalized to the strain with the promoterless pBBR-EGFP plasmid in Zm6 (A), Zm6-*ndh* (B) and Zm6-*cat* (C) strains at 8<sup>th</sup> hour of growth under normal conditions, with added 6% ethanol or added 0.225M NaCl. Statistical difference is shown between different growth conditions in same strain using t-test.

### 3.4. Stresa apstākļu ietekme uz II tipa NADH dehidrogenāzes aktivitāti

Pēc promoteru aktivitātes mērījumiem bija svarīgi salīdzināt iegūtos rezultātus ar enzīmu aktivitātes izmaiņām pie tiem pašiem stresa apstākļiem. Tā kā visspēcīgākais promoters bija *Ndh*, tika noteikta šī enzīma aktivitāte membrānu preparātos. To var noteikt ar divām reakcijām

– NADH oksidēšanās un hinona reducēšanās. Hinona reducēšanas reakcijai ar KCN tiek bloķēti terminālie elpošanas ķēdes komponenti un hinons uzkrājas reducētā stāvoklī. Abām reakcijām pie etanola stresa Zm6 novēroja enzīma aktivitātes krišanos (3.7. A attēls). Statistiski ticams (p-vērtība = 0.0251) samazinājums bija gan novērojams tikai oksidoreduktāzes reakcijai, kas apraksta hinona reducēšanas ātrumu. Samazinājums enzīma aktivitātē bija gan mazāk izteikts ka promotera aktivitātes kritums. Pretēji gaidītajam, pie NaCl stresa novēroja statistiski ticamu (p-vērtība = 0.0002) Ndh aktivitātes pieaugumu oksidoreduktāzes reakcijai. Arī NADH oksidāzes aktivitāte pieauga, bet šis efekts neuzrādīja statistiski ticamu atšķirību (3.7. A attēls). Tālāk, lai pārbaudītu vai pie NADH reducēšanas un Q<sub>10</sub> oksidēšanas pieauguma membrānu preparātos pie NaCl stresa nevarētu būt iesaistīta kāda no citām *Zymomonas mobilis* genomā atrodamām NADH dehidrogenāzēm, to aktivitāte tika mērīta arī Zm6-*ndh* membranas (3.7. B attēls). Atbilstoši iepriekšējiem novērojumiem Zm6-*ndh* neuzrādīja nekādu aktivitāti ne pie normāliem audzēšanas apstākļiem (Kalnenieks et al 2008), ne pie NaCl stresa.



**3.7. attēls.** NADH oksidāzes un NADH:CoQ<sub>1</sub> oksidoreduktāzes aktivitāte membrānu preparātos Zm6 (A) un Zm6-*ndh* (B) pie dažādiem audzēšanas apstākļiem.

**Figure 3.7.** NADH oxidase and NADH:CoQ<sub>1</sub> oxidoreductase activity in membrane preparations in Zm6 (A) and Zm6-*ndh* (B) under different growth conditions.

#### 4. DISKUSIJA

No iegūtajiem rezultātiem izriet ka *ndh* promoters ir spēcīgāks par pārējiem apskatītajiem promoteriem – citohroma *bd*, citohroma *bc<sub>1</sub>* un citohroma *c* peroksidāzes. *ndh* promotera aktivitāte pie etanola un NaCl stresa apstākļiem izteikti krītas. Pārējie promoteri ir vāji un maz reaģē uz stresa apstākļiem. Arī katalāzes negatīvajā celmā nav redzams *perC* promotera aktivitātes pieaugums, kas liecina ka PerC nekompensē katalāzes trūkumu. Tas saskan ar iepriekšējiem novērojumiem (Balodīte et al 2014). Izejas celmā un *ndh* inaktivācijas mutantā citohroma *bd* aktivitātes būtiski neatšķiras, tomēr iepriekš ar spektroskopijas metodēm

konstatēts, ka citohroma *d* saturs *Zmh-ndh* mutanta membrānās ir augstāks (Kalnenieks et al., nepublicēti dati). To varētu skaidrot ar iespējamām atšķirībām citohroma *bd* oksidāzes integrācijā membrānā, hēmu piesaistīšanā pie subvienībām, vai proteīna un mRNS degradācijas ātruma izmaiņām. Varbūt pie jūtīgākām mērīšanas sistēmām, kur noteiktu fluorescenci individuālām šūnām nevis kopumā uz visu biomasu, kā, piemēram, plūsmas citometrijā, būtu iespējams labāk izšķirt stresa apstākļu ietekmi.

Reportiersistēmas atspoguļotās *ndh* promotera aktivitātes izmaiņas liecina ka pie stresa apstākļiem tiek samazināta *ndh* ekspresija, kas varētu samazināt vienu no ROS ģenerācijas avotiem- Ndh enzīma kofaktora FAD daudzumu (Imlay, 2008). Bez tam, samazinot elpošanas ķēdes aktivitāti tās sākuma posmā, pārējie komponenti nonāk oksidētākā stāvoklī, kas mazina ROS ģenerēšanas apjomu pie citiem enzīmiem kā citohroma *bc<sub>1</sub>* (Xia et al. 2013). Spriežot pēc iegūtajiem reportiersistēmas datiem, *Zymomonas mobilis* atbild uz pētītajiem stresiem ar elpošanas ķēdes izmaiņām, kas mazina ROS ģenerēšanu un, un tādejādi mazina iespējamo oksidatīvo pēcstresu (Hong et al., 2019) .

Pretēji Hayashi et al (2015) publicētajiem datiem, tika novērota Ndh negatīvā celma labāka sāls stresa izturība kā izejas celma, kas ir pretrunā iegūtajiem OD datiem. Jāpiebilst, ka Hayashi et al (2015) eksperimentus veica strikti anaerobos apstākļos, bet šajā darbā izmantoti aerobi audzēšanas apstākļi un līdz ar to rezultāti nav tieši pretstatīti. Audzējot *Zymomonas mobilis* strikti anaerobos apstākļos, nav gan skaidrs, kas tika elpošanas ķēdē izmantots kā terminālais akceptors.

Tomēr sāls stresa gadījumā reportiersistēmas dati ir krasā pretrunā ar NADH:CoQ1 oksidoreduktāzes un NADH oksidāzes mērījumiem membrānu preparātos. Sāls stresa gadījumā abas aktivitātes eksponenciāli augošām šūnām ir pieaugušas, īpaši NADH:CoQ1 oksidoreduktāze. Šo aktivitātes pieaugumu ir grūti skaidrot kā adaptīvu pielāgojumu, kura izpaužas kādā pēctranslācijas līmenī, jo salīdzinot *Zm6-ndh* ar *Zm6*, izejas celma spēja augt sāls stresa apstākļos ir sliktāka. Iespējams, ka Ndh aktivēšanos nosaka fizikāli ķīmiski faktori, kā piemēram izmainīta Ndh mijiedarbība ar membrānu, kuras sastāvs un virsmas īpašības izmainās sāls stresa iedarbībā. Enzīma stabilitāti varētu izmainīt arī kovalentas modifikācijas, kas uzlabo tā stabilitāti. Kopumā iespējamie mehānismi nav skaidri un nepieciešams veikt tālākus pētījumus.

## SECINĀJUMI

1. Tika izveidoti EGFP reportierģenu konstrukti ar *Z.mobilis* elpošanas ķēdes komponentu promoteriem, kas ļāva konstatēt, šo promoteru aktivitātes atšķirības stresu apstākļos
2. Elpošanas ķēdes promoteru ekspresija pieauga eksponenciālās fāzes laikā un sasniedzot stacionāro fāzi novērojama EGFP fluorescences samazināšanās.
3. Vispēcīgākais promoters ir *Ndh*, citohromu *bd* un *bc<sub>1</sub>* un citohroma *c* peroksidāzes promoteri ir vāji.
4. Abi stresa veidi ierobežo *Zymomonas mobilis* augšanu, bet *Zm6-ndh* ir relatīvi izturīgāks, īpaši pret sāls stresu.
5. Pie stresa apstākļiem novērojams statistiski ticams *Ndh* promotera aktivitātes samazinājums ( $p$ -vērtība $<0.05$ .), pārējo promoteru aktivitātei arī ir tendence samazināties, bet starpība, lielākoties, nav statistiski ticama.
6. Neskatoties uz *ndh* promotera aktivitātes samazināšanos, tika konstatēta NADH:CoQ<sub>10</sub> oksidoreduktāzes aktivitātes palielināšanās sāls stresa ietekmē, kas varētu liecināt par pēctranslācijas regulāciju vai membrānas fizikāli ķīmisko īpašību izmaiņu ietekmi, kuru adaptīvā loma ir neskaidra.
7. Elpošanas ķēdes komponentu promoteru aktivitātes samazināšanās etanola un sāls stresu apstākļos varētu būt saistīta ar šūnu adaptāciju oksidatīvā pēcstresa mazināšanai.

## PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājam profesoram Dr. biol. Uldim Kalneniekam par palīdzību maģistra darba izstrādē, eksperimentu plānošanā, datu apstrādē, konsultācijām un labojumiem. Inesei Strazdiņai, Zanei Ļāšai, Reinim Rutkim, Martai Rubinai par ieteikumiem, palīdzību eksperimentu plānošanā un veikšanā.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

- An, H., Scopes, R.K., Rodriguez, M., Keshav, K.F., Ingram, L.O., 1991. Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: Identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. *J Bacteriol* 173, 5975–5982. <https://doi.org/10.1128/jb.173.19.5975-5982.1991>
- Atack, J.M., Kelly, D.J., 2006. Structure, Mechanism and Physiological Roles of Bacterial Cytochrome c Peroxidases. *Adv Microb Physiol*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)52002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)52002-8)
- Balodite, E., Strazdina, I., Galinina, N., McLean, S., Rutkis, R., Poole, R.K., Kalnenieks, U., 2014. Structure of the *Zymomonas mobilis* respiratory chain: Oxygen affinity of electron transport and the role of cytochrome c peroxidase. *Microbiology (United Kingdom)* 160, 2045–2052. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081612-0>
- Baughn, A.D., Malmay, M.H., 2004. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature* 427, 441–444. <https://doi.org/10.1038/nature02285>
- Benoliel, T., Rubini, M.R., de Souza Baptistello, C., Janner, C.R., Vieira, V.R., Torres, F.A., Walmsley, A., de Moraes, L.M.P., 2020. Physiological effects of overexpressed sigma factors on fermentative stress response of *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 51, 65–75. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00158-3>
- Bertsova, Y. V., Bogachev, A. V., Skulachev, V.P., 2001. Noncoupled NADH:Ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *J Bacteriol* 183, 6869–6874. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6869-6874.2001>
- Bingham-Ramos, L.K., Hendrixson, D.R., 2008. Characterization of two putative cytochrome c peroxidases of *Campylobacter jejuni* involved in promoting commensal colonization of poultry. *Infect Immun* 76, 1105–1114. <https://doi.org/10.1128/IAI.01430-07>
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids reaserch* 7, 1513–1523. <https://doi.org/10.1007/BF00429704>
- Boot, M., Jim, K.K., Liu, T., Commandeur, S., Lu, P., Verboom, T., Lill, H., Bitter, W., Bald, D., 2017. A fluorescence-based reporter for monitoring expression of mycobacterial cytochrome bd in response to antibacterials and during infection. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10944-4>

- Borisov, V.B., Siletsky, S.A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., Giuffrè, A., Poole, R.K., 2021. Bacterial Oxidases of the Cytochrome bd Family: Redox Enzymes of Unique Structure, Function, and Utility As Drug Targets. *Antioxid Redox Signal*. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8039>
- Bremer, E., Krämer, R., 2019. Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annu. Rev. Microbiol* 73, 313–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518>
- Brenac, L., Baidoo, E.E.K., Keasling, J.D., Budin, I., 2019. Distinct functional roles for hopanoid composition in the chemical tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Mol Microbiol* 112, 1564–1575. <https://doi.org/10.1111/mmi.14380>
- Brochier-Armanet, C., Talla, E., Gribaldo, S., 2009. The multiple evolutionary histories of dioxygen reductases: Implications for the origin and evolution of aerobic respiration. *Mol Biol Evol* 26, 285–297. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn246>
- Burton, K., 1974. The Enthalpy change for the reduction of nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemical Journal* 143, 365–368. <https://doi.org/10.1042/bj1430365>
- Cao, L.Y., Liu, C.G., Yang, S.H., Bai, F.W., 2023. Regulation of biofilm formation in *Zymomonas mobilis* to enhance stress tolerance by heterologous expression of pfs and luxS. *Front Bioeng Biotechnol* 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1130405>
- Chang, D., Yu, Z., Ul Islam, Z., French, W.T., Zhang, Y., Zhang, H., 2018. Proteomic and metabolomic analysis of the cellular biomarkers related to inhibitors tolerance in *Zymomonas mobilis* ZM4. *Biotechnol Biofuels* 11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1287-5>
- Charoensuk, K., Irie, A., Lertwattanasakul, N., Sootsuwan, K., Thanonkeo, P., Yamada, M., 2011. Physiological importance of cytochrome c peroxidase in ethanologenic thermotolerant *Zymomonas mobilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20, 70–82. <https://doi.org/10.1159/000324675>
- Charoensuk, K., Sakurada, T., Tokiyama, A., Murata, M., Kosaka, T., Thanonkeo, P., Yamada, M., 2017. Thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in thermotolerant ethanologenic *Zymomonas mobilis* TISTR 548. *Biotechnol Biofuels* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0891-0>
- Cho, S.H., Lei, R., Henninger, T.D., Contreras, L.M., 2014. Discovery of ethanol-responsive small RNAs in *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol* 80, 4189–4198. <https://doi.org/10.1128/AEM.00429-14>
- Dassa, J., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M., Boquet, P.L., 1991. A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third

- cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (appA). *Mol Gen Genet* 229, 341–352. <https://doi.org/10.1007/BF00267454>
- Dawan, J., Ahn, J., 2022. Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071385>
- Dawes, E.A., Large, P.J., 1970. Effect of starvation on the viability and cellular constituents of *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. *J Gen Microbiol* 60, 31–42. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-1-31>
- De Ley, J., Swings, J., 1977. Phenotypic description, numerical analysis, and proposal for an improved taxonomy and nomenclature of the genus *Zymomonas* Kluver and van Niel 1936. *Int J Syst Bacteriol* 26, 146–157. <https://doi.org/10.1099/00207713-26-2-146>
- Desiniotis, A., Kouvelis, V.N., Davenport, K., Bruce, D., Detter, C., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L.A., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Typas, M.A., Pappas, K.M., 2012. Complete genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas*: *Mobilis* subsp. *Mobilis* centrotpe ATCC 29191. *J Bacteriol*. <https://doi.org/10.1128/JB.01398-12>
- Esser, L., Zhou, F., Yu, C.A., Xia, D., 2019. Crystal structure of bacterial cytochrome bc1 in complex with azoxystrobin reveals a conformational switch of the Rieske iron–sulfur protein subunit. *Journal of Biological Chemistry* 294, 12007–12019. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008381>
- Forte, E., Borisov, V.B., Vicente, J.B., Giuffrè, A., 2017. Cytochrome bd and Gaseous Ligands in Bacterial Physiology, in: *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 171–234. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.05.002>
- Fuchino, K., Bruheim, P., 2020. Increased salt tolerance in *Zymomonas mobilis* strain generated by adaptative evolution. *Microb Cell Fact* 19. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01406-0>
- Fuchino, K., Wasser, D., Soppa, J., 2021. Genome Copy Number Quantification Revealed That the Ethanologenic Alpha-Proteobacterium *Zymomonas mobilis* Is Polyploid. *Front Microbiol* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705895>
- Gao, X., Gao, Q., Bao, J., 2018. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene ZMO0119. *J Biotechnol* 282, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.013>
- Giuffrè, A., Borisov, V.B., Arese, M., Sarti, P., Forte, E., 2014. Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2014.01.016>

- Gottesman, S., 2019. Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.005593>
- Gottschlich, L., Geiser, P., Bortfeld-Miller, M., Field, C.M., Vorholt, J.A., 2019. Complex general stress response regulation in *Sphingomonas melonis* Fr1 revealed by transcriptional analyses. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45788-7>
- Green, J., Anjum, M.F., Guest, J.R., 1995. The ndh-binding protein (Nbp) regulates the ndh gene of *Escherichia coli* in response to growth phase and is identical to Fis, *Molecular Microbiology*.
- Hanke, T., Richhardt, J., Polen, T., Sahm, H., Bringer, S., Bott, M., 2012. Influence of oxygen limitation, absence of the cytochrome bc 1 complex and low pH on global gene expression in *Gluconobacter oxydans* 621H using DNA microarray technology. *J Biotechnol* 157, 359–372. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.020>
- Hassani, B.K., Steunou, A.S., Liotenberg, S., Reiss-Husson, F., Astier, C., Ouchane, S., 2010. Adaptation to oxygen: Role of terminal oxidases in photosynthesis initiation in the purple photosynthetic bacterium, *rubrivivax gelatinosus*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 19891–19899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086066>
- Hayashi, T., Furuta, Y., Furukawa, K., 2011. Respiration-deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. *J Biosci Bioeng* 111, 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.009>
- Hayashi, T., Kato, T., Furukawa, K., 2012. Respiratory chain analysis of *zymomonas mobilis* mutants producing high levels of ethanol. *Appl Environ Microbiol* 78, 5622–5629. <https://doi.org/10.1128/AEM.00733-12>
- Hayashi, T., Kato, T., Watakabe, S., Song, W., Aikawa, S., Furukawa, K., 2015. The respiratory chain provides salt stress tolerance by maintaining a low NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in *zymomonas mobilis*. *Microbiology (United Kingdom)* 161, 2384–2394. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000195>
- He, M.X., Wu, B., Shui, Z.X., Hu, Q.C., Wang, W.G., Tan, F.R., Tang, X.Y., Zhu, Q.L., Pan, K., Li, Q., Su, X.H., 2012. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under ethanol stress. *Biotechnol Biofuels* 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-75>
- Heikal, A., Nakatani, Y., Dunn, E., Weimar, M.R., Day, C.L., Baker, E.N., Lott, J.S., Sazanov, L.A., Cook, G.M., 2014. Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: A

- monotopic membrane protein with an essential role in energy generation. *Mol Microbiol* 91, 950–964. <https://doi.org/10.1111/mmi.12507>
- Hong, Y., Zeng, J., Wang, X., Drlica, K., Zhao, X., 2019. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 10064–10071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901730116>
- Howitt, C.A., Udall, P.K., Vermaas, W.F.J., 1999. Type 2 NADH Dehydrogenases in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Are Involved in Regulation Rather Than Respiration, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- Imlay, J.A., 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 77, 755–776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>
- Jacobson, T.B., Adamczyk, P.A., Stevenson, D.M., Regner, M., Ralph, J., Reed, J.L., Amador-Noguez, D., 2019. 2H and 13C metabolic flux analysis elucidates in vivo thermodynamics of the ED pathway in *Zymomonas mobilis*. *Metab Eng* 54, 301–316. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.006>
- Kalnenieks, U., 2006. Physiology of *Zymomonas mobilis*: Some Unanswered Questions, *Advances in Microbial Physiology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)51002-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)51002-1)
- Kalnenieks, U., Balodite, E., Rutkis, R., 2019. Metabolic Engineering of Bacterial Respiration: High vs. Low P/O and the Case of *Zymomonas mobilis*. *Front Bioeng Biotechnol* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00327>
- Kalnenieks, U., Galinina, N., Bringer-Meyer, S., Poole, R.K., 1998. Membrane D-lactate oxidase in *Zymomonas mobilis*: Evidence for a branched respiratory chain. *FEMS Microbiol Lett* 168, 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00424-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00424-8)
- Kalnenieks, U., Galinina, N., Strazdina, I., Kravale, Z., Pickford, J.L., Rutkis, R., Poole, R.K., 2008. NADH dehydrogenase deficiency results in low respiration rate and improved aerobic growth of *Zymomonas mobilis*. *Microbiology (N Y)* 154, 989–994. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012682-0>
- Kalnenieks, U., Pappas, K.M., Bettenbrock, K., 2020. *Zymomonas mobilis* metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering. *Adv Microb Physiol* 77, 37–88. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.08.001>
- Kerscher, S., Dröse, S., Zickermann, V., Brandt, U., 2007. The Three Families of Respiratory NADH Dehydrogenases. [https://doi.org/10.1007/400\\_2007\\_028/Published](https://doi.org/10.1007/400_2007_028/Published)
- Khademian, M., Imlay, J.A., 2017. *Escherichia coli* cytochrome c peroxidase is a respiratory oxidase that enables the use of hydrogen peroxide as a terminal electron acceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6922–E6931. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701587114>

- Kim, Y.J., Song, K.B., Rhee, S.K., 1995. A novel aerobic respiratory chain-linked NADH oxidase system in *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* 177, 5176–5178. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.5176-5178.1995>
- Kohler, C., Lourenço, R.F., Bernhardt, J., Albrecht, D., Schüler, J., Hecker, M., Gomes, S.L., 2015. A comprehensive genomic, transcriptomic and proteomic analysis of a hyperosmotic stress sensitive  $\alpha$ -proteobacterium. *BMC Microbiol* 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0404-x>
- Kosako, Y., Yabuuchi, E., Naka, T., Fujiwara, N., Kobayashi, K., 2000. Proposal of Sphingomonadaceae fam. nov., consisting of *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990, *Erythrobacter shiba* and Shimizu 1982, *Erythromicrobium Yurkov* et al. 1994, *Porphyrobacter Fuerst* et al. 1993, *Zymomonas Kluyver* and van Niel 1936, and *Sandaracinobac.* *Microbiol Immunol* 44, 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2000.tb02535.x>
- Kovtuna, K., Strazdina, I., Bikerniece, M., Galinina, N., Rutkis, R., Martynova, J., Kalnenieks, U., 2022. Improved Hydrogen Peroxide Stress Resistance of *Zymomonas mobilis* NADH Dehydrogenase (*ndh*) and Alcohol Dehydrogenase (*adhB*) Mutants. *Fermentation* 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060289>
- Lee, C., Lee, S.M., Mukhopadhyay, P., Kim, S.J., Lee, S.C., Ahn, W.S., Yu, M.H., Storz, G., Ryu, S.E., 2004. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1179–1185. <https://doi.org/10.1038/nsmb856>
- Lee, K.Y., Park, J.M., Kim, T.Y., Yun, H., Lee, S.Y., 2010. The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. *Microb Cell Fact* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-94>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Mackenzie, K.F., Eddy, C.K., Ingram, L.O., 1989. Modulation of alcohol dehydrogenase isoenzyme levels in *Zymomonas mobilis* by iron and zinc. *J Bacteriol* 171, 1063–1067. <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.1063-1067.1989>
- Mandel, M., Higa, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159–162. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)

- Melo, A.M.P., Bandejas, T.M., Teixeira, M., 2004. New Insights into Type II NAD(P)H:Quinone Oxidoreductases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 603–616. <https://doi.org/10.1128/membr.68.4.603-616.2004>
- Meng, W., Green, J., Guest, J.R., 1997. FNR-dependent repression of *ndh* gene expression requires two upstream FNR-binding sites, *Microbiology*.
- Minard, K.I., Mcalister-Henn, L., 2001. Original Contribution ANTIOXIDANT FUNCTION OF CYTOSOLIC SOURCES OF NADPH IN YEAST.
- Narra, H.P., Schroeder, C.L.C., Sahni, A., Rojas, M., Khanipov, K., Fofanov, Y., Sahni, S.K., 2016. Small Regulatory RNAs of *Rickettsia conorii*. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep36728>
- Neale, A.D., Scopes, R.K., Kelly, J.M., Wettenhall, R.E.H., 1986. The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis* Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterisation and physiological roles. *Eur J Biochem* 154, 119–124. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09366.x>
- Roberts, G.C.K. (Ed.), 2013. *Encyclopedia of Biophysics*, *Encyclopedia of Biophysics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6>
- Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E., 1982. Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*, *Microbial Reactions. Advances in Biochemical Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1002/bit.260260308>
- Romano, A.H., Conway, T., 1996. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res Microbiol* 147, 448–455. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)83998-2](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)83998-2)
- Rutkis, R., Galinina, N., Strazdina, I., Kalnenieks, U., 2014. The inefficient aerobic energetics of *Zymomonas mobilis*: Identifying the bottleneck. *J Basic Microbiol* 54, 1090–1097. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300859>
- Rutkis, R., Ļaša, Z., Rubina, M., Ščerbaka, R., Kalniņš, G., Bogans, J., Kalnenieks, U., 2022. Antimicrobial Activity of *Zymomonas mobilis* Is Related to Its Aerobic Catabolism and Acid Resistance. *Fermentation* 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020077>
- Rutkis, R., Strazdina, I., Balodite, E., Lasa, Z., Galinina, N., Kalnenieks, U., 2016. The low energy-coupling respiration in *zymomonas mobilis* accelerates flux in the entner-doudoroff pathway. *PLoS One* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153866>
- Sahm, H., Bringer-Meyer, S., Sprenger, G.A., 2006. The Genus *Zymomonas*. *The Prokaryotes* 201–221. [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_10](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_10)

- Sakurai, K., Arai, H., Ishii, M., Igarashi, Y., 2011. Transcriptome response to different carbon sources in *Acetobacter acetii*. *Microbiology (N Y)* 157, 899–910. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045906-0>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Seo, J.S., Chong, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Jung, C., Kim, J.J., Hong, J.H., Kim, H., Kim, J.H., Kil, J. Il, Park, C.J., Oh, H.M., Lee, J.S., Jin, S.J., Um, H.W., Lee, H.J., Oh, S.J., Kim, J.Y., Kang, H.L., Lee, S.Y., Lee, K.J., Kang, H.S., 2005. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol* 23, 63–68. <https://doi.org/10.1038/nbt1045>
- Sleator, R.D., Hill, C., 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 26, 49–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00598.x>
- Sootsuwan, K., Lertwattanasakul, N., Thanonkeo, P., Matsushita, K., Yamada, M., 2008. Analysis of the respiratory chain in ethanologenic *Zymomonas mobilis* with a cyanide-resistant bd-type ubiquinol oxidase as the only terminal oxidase and its possible physiological roles. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14, 163–175. <https://doi.org/10.1159/000112598>
- Strazdina, I., Balodite, E., Lasa, Z., Rutkis, R., Galinina, N., Kalnenieks, U., 2018. Aerobic catabolism and respiratory lactate bypass in Ndh-negative *Zymomonas mobilis*. *Metab Eng Commun* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2018.e00081>
- Strazdina, I., Kravale, Z., Galinina, N., Rutkis, R., Poole, R.K., Kalnenieks, U., 2012. Electron transport and oxidative stress in *Zymomonas mobilis* respiratory mutants. *Arch Microbiol* 194, 461–471. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0785-7>
- Strohdeicher, M., Neuß, B., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., 1990. Electron transport chain of *Zymomonas mobilis* - Interaction with the membrane-bound glucose dehydrogenase and identification of ubiquinone 10. *Arch Microbiol* 154, 536–543. <https://doi.org/10.1007/BF00248833>
- Tan, F., Wu, B., Dai, L., Qin, H., Shui, Z., Wang, J., Zhu, Q., Hu, G., He, M., 2016. Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Microb Cell Fact* 15, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0398-y>

- Taylor, M.P., Eley, K.L., Martin, S., Tuffin, M.I., Burton, S.G., Cowan, D.A., 2009. Thermophilic ethanogenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends Biotechnol* 27, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.03.006>
- Trumpower, B.L., 1990. Cytochrome bc<sub>1</sub> Complexes of Microorganisms, *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*.
- Tsuge, Y., Hasunuma, T., Kondo, A., 2015. Recent advances in the metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of lactate and succinate from renewable resources. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42, 375–389. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1538-9>
- Turner, S., Reid, E., Smith, H., Cole, J., 2003. A novel cytochrome c peroxidase from *Neisseria gonorrhoeae*: a lipoprotein from a Gram-negative bacterium, *Biochem. J*.
- Uden, G., Bongaerts, J., 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors, *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Volentini, S.I., Fariás, R.N., Rodríguez-Montelongo, L., Rapisarda, V.A., 2011. Cu(II)-reduction by *Escherichia coli* cells is dependent on respiratory chain components. *BioMetals* 24, 827–835. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9436-3>
- Xia, D., Esser, L., Tang, W.K., Zhou, F., Zhou, Y., Yu, L., Yu, C.A., 2013. Structural analysis of cytochrome bc<sub>1</sub> complexes: Implications to the mechanism of function. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2012.11.008>
- Xia, X., Wu, S., Li, L., Xu, B., Wang, G., 2018. The cytochrome bd complex is essential for chromate and sulfide resistance and is regulated by a GbsR-type regulator, CydE, in *Alishewanella* Sp. WH16-1. *Front Microbiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01849>
- Yang, S., Pan, C., Hurst, G.B., Dice, L., Davison, B.H., Brown, S.D., 2014. Elucidation of *Zymomonas mobilis* physiology and stress responses by quantitative proteomics and transcriptomics. *Front Microbiol* 5, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00246>
- Yang, S., Pan, C., Tschaplinski, T.J., Hurst, G.B., Engle, N.L., Zhou, W., Dam, P.A., Xu, Y., Rodriguez, M., Dice, L., Johnson, C.M., Davison, B.H., Brown, S.D., 2013. Systems Biology Analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 Ethanol Stress Responses. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068886>
- Yang, S., Tschaplinski, T.J., Engle, N.L., Carroll, S.L., Martin, S.L., Davison, B.H., Palumbo, A. V., Rodriguez, M., Brown, S.D., 2009. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. *BMC Genomics* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-34>

- Yang, Y., Shen, W., Huang, J., Li, R., Xiao, Y., Wei, H., Chou, Y.C., Zhang, M., Himmel, M.E., Chen, S., Yi, L., Ma, L., Yang, S., 2019. Prediction and characterization of promoters and ribosomal binding sites of *Zymomonas mobilis* in system biology era. *Biotechnol Biofuels* 12. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1399-6>
- Yang, Z., Zhang, Z., 2018. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* 36, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.002>
- Yin, Y., Yang, S., Yu, L., Yu, C.A., 2010. Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Journal of Biological Chemistry* 285, 17038–17045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104364>
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., Storz, G., 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 183, 4562–4570. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4562-4570.2001>
- Zou, S.L., Zhang, K., You, L., Zhao, X.M., Jing, X., Zhang, M.H., 2012. Enhanced electrotransformation of the ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 with plasmids. *Eng Life Sci* 12, 152–161. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100106>

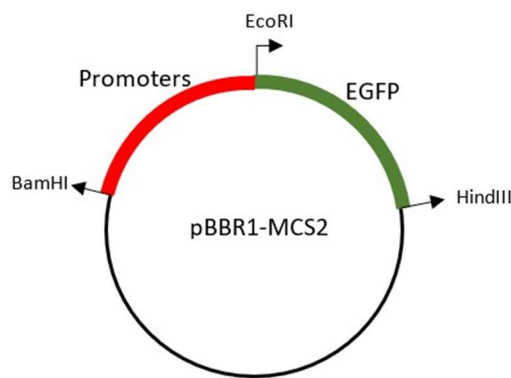
PIELIKUMI



<b>EGFP</b>	Gēna sekvenca (5' → 3') → <b>F praimeris</b> <b>ATACGGATCCACCGGTCGCC ACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA</b> GCTGTTACCGGGGTGGTGCCTTCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGTG AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTACCACCCGTG ACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTC AAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGC AACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAG CTGAAGGGCATCGACTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAG AACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACCAG TCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTG ACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGAC <b>GAGCTGTACAAGGGTGGAGGTTC</b> CCGCGGA ← <b>R praimeris</b> ; TAA	720 bp	<b>F praimeris</b> (EcoRI GAATTC) ATACGGATCCACCGGTC <b>GAATTC</b> A TGGTGA EGFP_F  <b>R praimeris</b> (HindIII AAGCTT) TCCGCGGGA <b>AAGCTT</b> TACTTGTA CAGCTC EGFP_R
-------------	--	--------	---

2.pielikums

Reportiergēnu plazmīdu shematiskis attēlojums



3.pielikums

Reportiergēnu plazmīdu sekvences kopējā daļa. EGFP iekrāsots zaļā krāsā. Restrikcijas saiti pasvītroti.

CTCGGGCCGTCTCTTGGGCTTGATCGGCCTTCTTGCGCATCTCACGCGCTCCTGCGGCGGCCTGTAGGGCAGGCTCATACCCC  
 TGCCGAACCGCTTTTGTGTCAGCCGGTCGGCCACGGCTTCCGGCGTCTCAACGCGCTTTGAGATCCCAGCTTTTCGGCCAATCC  
 CTGCGGTGCATAGGCGGTGGCTCGACCGCTTGGGGCTGATGGTGACGTGGCCACTGGTGGCCGCTCCAGGGCCTCGTAGA  
 ACGCCTGAATGCGCGTGTGACGTGCCTTGTGTCCTCGATGCCCCGTTGCAGCCCTAGATCGGCCACAGCGCCGCAAACGTG  
 GTCTGGTTCGCGGGTCACTCTGCGCTTTGTTGCCGATGAACCTCTTGGCCGACAGCCTGCCGTCTGCGTTCAGCGCACACGAA  
 CGCGTCAATGTGCGGGTGGTTTTCGTACGGTGGATGCTGGCCGTCACGATGCGATCCGCCCGTACTTGTCCGCCAGCCACT  
 TGTGCGCTTCTCGAAGAACGCCGCTGCTGTTCTTGGCTGGCCGACTTCCACCATTCCGGGCTGGCCGTCATGACGTACTCG  
 ACCGCCAACACAGCGTCTTGGCCGCTTCTTGGCAGCAACTCGCGCAGTCGGCCATCGCTTCATCGGTGCTGCTGGCCGC  
 CCAGTGTCTGTTCTTGGCGTCTGCTGGGTCAGCGTTGGGCGTCTCGCGCTCGCGGTAGGCGTGTGAGACTGGCCGCCA  
 CGTTGCCATTTTCGCCAGCTTCTTGCATCGCATGATCGCGTATGCCGCCATGCTGCCCTCCCTTTTGGTGTCCAACCGGC  
 TCGACGGGGCAGCGCAAGCGGTCCTCCGGCGGGCCACTCAATGCTTGGTATACTACTAGACTTTGCTTCGCAAAGTCG  
 TGACCGCTACGGCGGCTGCGGGCCCTACGGGCTTGTCTCCGGGCTTCGCCCTGCGCGGTGCTGCGCTCCCTTGCCAGCC  
 CGTGGATATGTGGACGATGGCCGCGAGCGGCCACCGGCTGGCTCGCTTCGCTCGGCCCGTGGACAACCCTGCTGGACAAGCTG  
 ATGGACAGGCTGCGCCTGCCACGAGCTTGACCACAGGGATTGCCACCGGCTACCCAGCCTTCGACCACATAACCACCGGCT  
 CCAACTGCGCGCCTGCGGCCTTGCCCATCAATTTTTTAAATTTTCTCTGGGAAAAGCCTCCGGCCTGCGGCTGCGCGCT  
 TCGCTTGGCGGTTGGACCAAGTGAAGCGGGTCAAGGCTCGCGCAGCGACCGCGCAGCGCTTGGCCTTACGCGCCTGG  
 AACGACCAAGCCTATGCGAGTGGGGCAGTGAAGGCGAAGCCCGCCCGCTGCCCCCGAGCCTCACGGCGCGAGTGGCGG  
 GGGTTCCAAGGGGGCAGCGCCACCTTGGGCAAGGCCGAAGCCGCGCAGTGCATCAACAAGCCCGGAGGGGCCACTTTTTGC  
 CGGAGGGGGAGCCGCGCCGAAGGCGTGGGGAAACCCCGAGGGTGCCTTCTTTGGGCACCAAAGAACTAGATATAGGGCGA

AATGCGAAAGACTTAAAAATCAACAACCTAAAAAAGGGGGGTACGCAACAGCTCATTGCGGCACCCCCGCAATAGCTCATTG  
CGTAGGTTAAAGAAAATCTGTAATTGACTGCCACTTTTACGCAACGCATAATTGTTGTGCGCTGCCGAAAAGTTGCAGCTGA  
TTGCGCATGGTGCCGCAACCGTGCGGCACCTACCGCATGGAGATAAGCATGGCCACGCAGTCCAGAGAAATCGGCATTCAAG  
CCAAGAACAAGCCCGGTCACTGGGTGCAAACGGAACGCAAAGCGCATGAGGCGTGGGCCGGGCTTATTGCGAGGAAACCCACG  
GCGGCAATGCTGCTGCATCACCTCGTGGCGCAGATGGGCCACCAGAACGCCGTGGTGGTCAGCCAGAAGACACTTTCGAAGCT  
CATCGGACGTTCTTTGCGGACGGTCCAATACGCAGTCAAGGACTTGGTGGCCGAGCGCTGGATCTCCGTCGTGAAGCTCAACG  
GCCCCGGCACCGTGTGCGCTACGTGGTCAATGACCGCTGGCGTGGGGCCAGCCCCGCGACCAGTTGCGCCTGTCGGTGTTC  
AGTGCCGCCGTGGTGGTTGATCACGACGACCAGGACGAATCGCTGTTGGGGCATGGCGACCTGCGCCGCATCCCGACCCTGTA  
TCCGGGCGAGCAGCAACTACCGACCGGCCCGGCGAGGAGCCGCCAGCCAGCCCGGCATTCGGGGCATGGAACCAGACCTGC  
CAGCCTTGACCGAAACGGAGGAATGGGAACGGCGGGCAGCAGCGCTGCCGATGCCGATGAGCCGTGTTTTCTGGACGAT  
GGCGAGCCGTTGGAGCCGCCGACACGGGTACGCTGCCGCGCCGGTAGCACTTGGGTTGCGCAGCAACCCGTAAGTGCCTGT  
TCCAGACTATCGGCTGTAGCCGCTCGCCGCCCTATACCTTGCTGCCTCCCCGCTTGGCTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCC  
ACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCACCGTTTTTATCAGGCTCTGGGAGGCAGAATAAATGATC  
ATATCGTCAATTATTACCTCCACGGGGAGAGCTGAGCAACTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTACACTGCTTCC  
GGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCTGCCCTGAACCGACGACCGGGTCAATT  
TGCTTTGCAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCACCAGGCGTTTAAAGGCACCAATAACTGCC  
TTAAAAAATACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACG  
CGAATTTTAAACAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTGCCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG  
CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCA  
CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGAGCGCGGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCG  
CTCTAGAACTAGTGGATCC P R O M O T E R S GAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCA  
TCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG  
CTGACCCGAAAGTTTATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCGCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCA  
GTGCTTCAGCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAAGGCTACGTCCAGGAGCGCA  
CCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAG  
CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATAT  
CATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCG  
ACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTG  
AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTGCTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGA  
GCTGTACAAGTAAAGCTTATCGATAACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTA  
ATTGCGCGCTTGCGGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATAACGAGC  
CGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCC  
AGTCCGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGCCGCATGCAT  
AAAACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCAT  
CAGCACCTTGTCGCTTGCCTATAATATTTGCCCATGGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATC  
ATCCAGCCGGCTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGGCGGGTGGAAATCGAAATCTCGTGATGGCAG  
GTTGGGCGTCGCTTGGTGGTCATTTGAAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCG  
CTGCGAATCGGGAGCGGCATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCAAGCTCTTACGCAATATCACGGG  
TAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTGCATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACC  
ATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCGCGCCTTGAAGCTGGCGAACAG  
TTCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCT  
CGATGCGATGTTTTGCTTGGTGGTCAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATG  
GATACTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCTGCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGC  
TTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCTGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCCTGCTCCTGCAGTT  
CATTCAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAG  
CAGCCGATTGCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGAATCCATCTTG

TTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCAGATCTTGATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCAAGAAAG  
CCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCGGTTTCGCTTGTGTCCATAAA  
ACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTCTTTGCGCTTGGCTTTTCCCTTGTCCAGAT  
AGCCCAGTAGCTGACATTCATCCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGCCCGCTTCTGCTGGCGCTGGGCCTGTTT  
CTGGCGCTGGACTTCCCGCTGTTCCTGTCAGCAGCTTTTCGCCACGGCCTTGATGATCGCGCGGCCTTGGCTGCATATCCC  
GATTCAACGGCCCCAGGGCTCCAGAACGGGCTTCAGGCGCTCCCGAAGGT

#### 4.pielikums

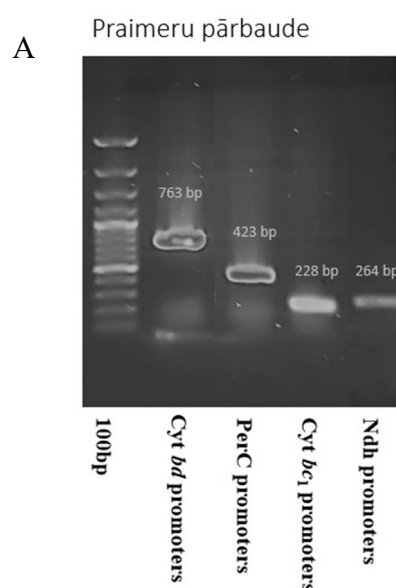
#### EGFP kolnēšanai izmantotās plazmīdas pQE-eGFP sakvence

CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA  
CACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAATCTATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCACCGGTCGCCACCA  
TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTC  
AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGTAAGTTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGT  
GCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACT  
TCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC  
GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG  
GCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCA  
AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTG  
CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCT  
GGAGTTCGTGACCGCCCGCGGATCAGTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTGGAGGTTCCCGCGACTAAAGCGGCCCT  
AGAGCTCGTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTG  
GAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGG  
GGGTGGGTGGGGCAGGACGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTT  
CTGAGGCGAAAGAACCAGTGGGGCTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTA  
ATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTTTATTTGGTGAAGTCCAAGCTAGCT  
TGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCAGTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCAT  
CGTAAAGAACATTTTTCAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTT  
AAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTTCTGCCCCCTGATGAATGCTCATCCGGAAT  
TTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGGAGCTGGTGTATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAA  
ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGG  
TGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCACTT  
TTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTG  
CTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTA  
CTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGGCCTTAAACGCCTGGGGTAAAGACTCTCTAGC  
TTGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTGCGGTGAACGCTCTCCT  
GAGTAGGACAAAATCCGCCGCTCTAGAGCTGCCTCGCGCTTTCGGTGTGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGG  
AGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCG  
GGCGCAGCCATGACCCAGTACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGA  
GTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCAC  
TGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG  
GGGATAACGCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTC  
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATA  
CCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCC  
CTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGT

GTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT  
 ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGC  
 CTAACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC  
 TCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATC  
 TCAAGAAGATCCTTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT  
 TATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGG  
 TCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGCTGCCTGACTCCC  
 CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGG  
 CTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAG  
 TCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT  
 CGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGT  
 TGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATG  
 GCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG  
 AGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTTAAAAG  
 TGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCATGTAACCCACT  
 CGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAA  
 AAAGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATT  
 GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCA  
 CCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTAC

## 5. pielikums

Agarozes gēla elektroforēzes attēli no izmantoto praimeru pārbaudes (A), pBBR-EGFP plazmīdas konstrukta pārbaudes (B) ar PCR pēc klonešanas DH5 $\alpha$ , pārbaude sagriežot plazmīdu ar restrikcijas enzīmiem un PCR pārbaude pēc ieporēšanas Zm6, Zm6-*cat*, Zm6-*ndh* celmos. pBBR:*Pndh*-EGFP (C), pBBR:*Pbc1*-EGFP (D), pBBR:*Pbd*-EGFP (E), pBBR:*PperC*-EGFP (F) plazmīdu pārbaudes.

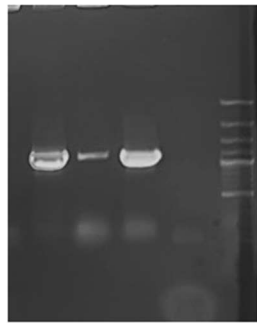


B

**pBBR-EGFP**

PCR pārbaude: *E.coli* DH5 $\alpha$

Praimeri: *ppdc\_ndh\_fwd*+*EGFP\_R*

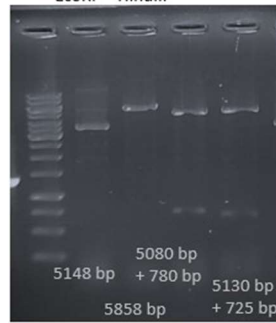


2. plate 2. kolonija  
1. plate 1. kolonija  
1. plate 2. kolonija  
100 bp 1. kolonija

**Restrikcijas pārbaude**

Restriktāzēs:

HindIII + Sac I  
EcoRI + HindIII BamHI

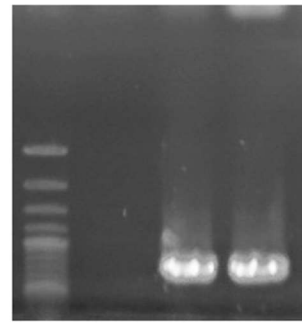


5080 bp  
5148 bp + 780 bp 5130 bp  
5858 bp + 725 bp

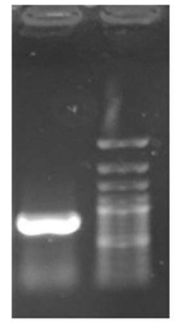
**PCR pārbaude**

Praimeri: *EGFP\_F* + *EGFP\_R*

Zm6 Zm6 pBBR-EGFP Zm6-cat pBBR-EGFP Zm6-*ndh* pBBR-EGFP



100 bp

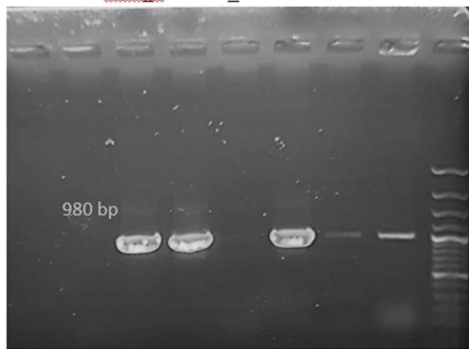


100 bp

**pBBR:*Pndh*-EGFP**

PCR pārbaude: *E.coli* DH5 $\alpha$

Praimeri: *Ndh\_F*+*EGFP\_R*

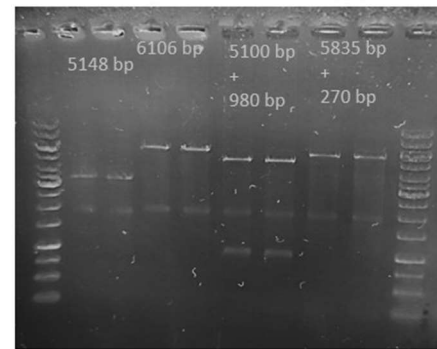


Pašligēšans plates kontrole  
3. plate 2. kolonija  
2. plate 1. kolonija  
1. plate 2. kolonija  
100 bp 1. kolonija

**Restrikcijas pārbaude**

Restriktāzēs:

BamHI BamHI+ HindIII BamHI+ EcoRI

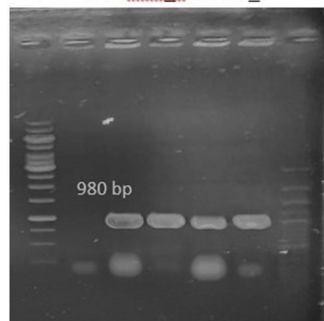


5148 bp 6106 bp 5100 bp 5835 bp  
+ 980 bp + 270 bp  
1 kbp  
Kontrolē pBBRM-C-2  
3.plates 1.kolonija  
2.plates 1.kolonija  
3.plates 1.kolonija  
2.plates 1.kolonija  
3.plates 1.kolonija  
2.plates 1.kolonija

C

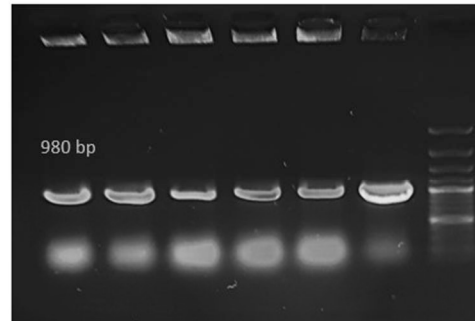
**PCR pārbaude: Zm6**

Praimeri: *Ndh\_F*+*EGFP\_R*



100 bp 3. plate 2. kolonija  
2. plate 1. kolonija  
1. plate 1. kolonija

**Zm6-cat**

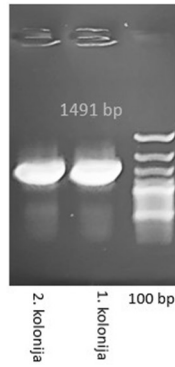


980 bp  
9. kolonija  
8. kolonija  
7. kolonija  
6. kolonija  
5. kolonija  
4. kolonija  
100 bp

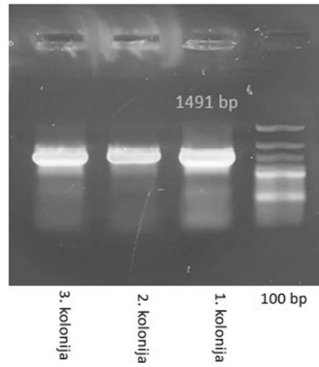


**PCR pārbaude: Zm6**

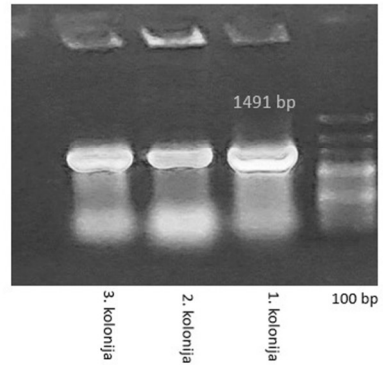
Praimeri: bd\_F +EGFP\_R



**Zm6-ndh**



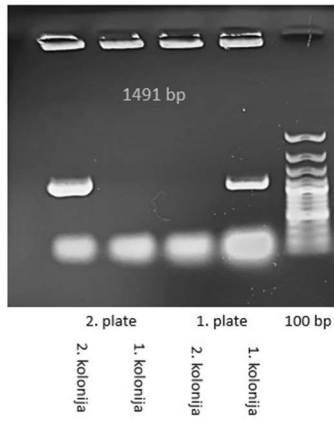
**Zm6-cat**



**pBBR:PperC-EGFP**

PCR pārbaude: E.coli DH5α

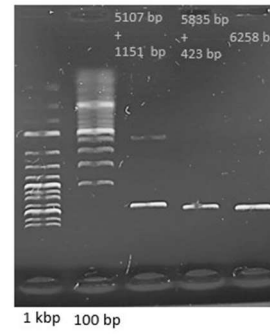
Praimeri: PerC\_F +EGFP\_R



**Restrikcijas pārbaude**

Restriktāzes:

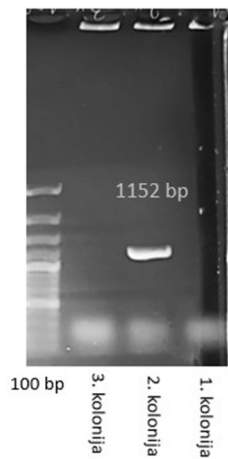
BamHI+ BamHI+ BamHI+  
EcoRI HindIII



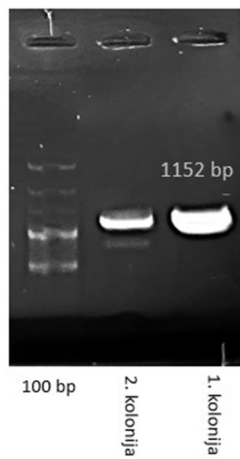
F

**PCR pārbaude: Zm6**

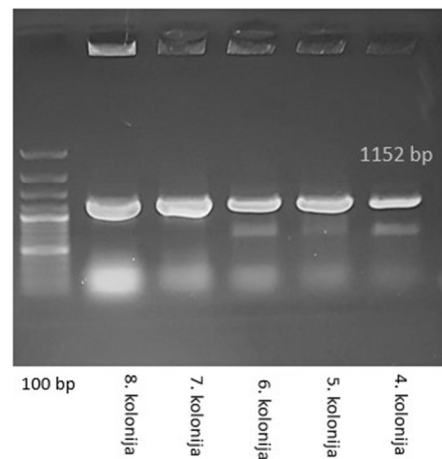
Praimeri: PerC\_F +EGFP\_R



**Zm6-ndh**

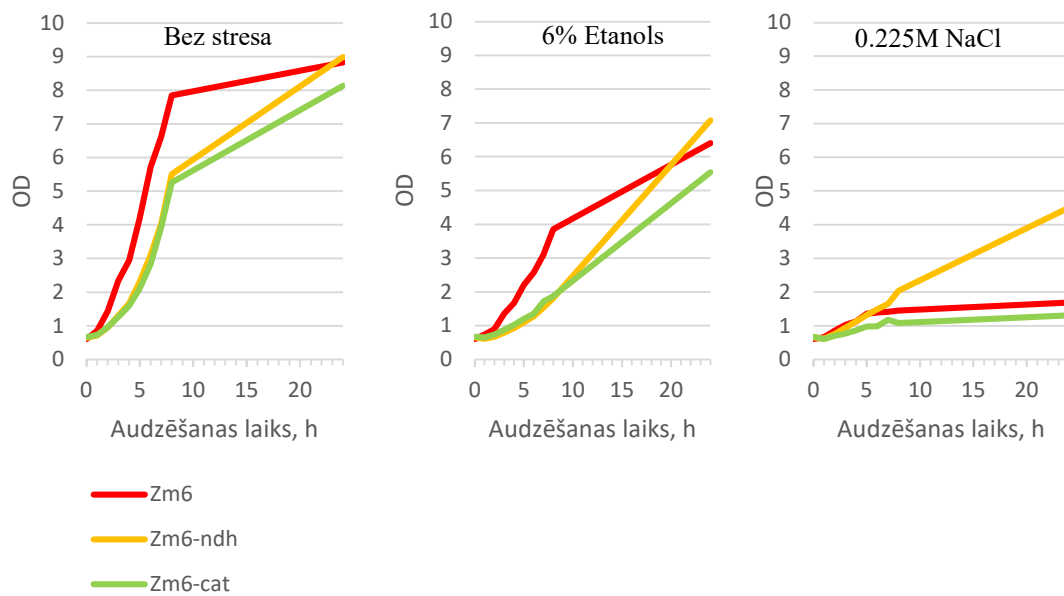


**Zm6-cat**

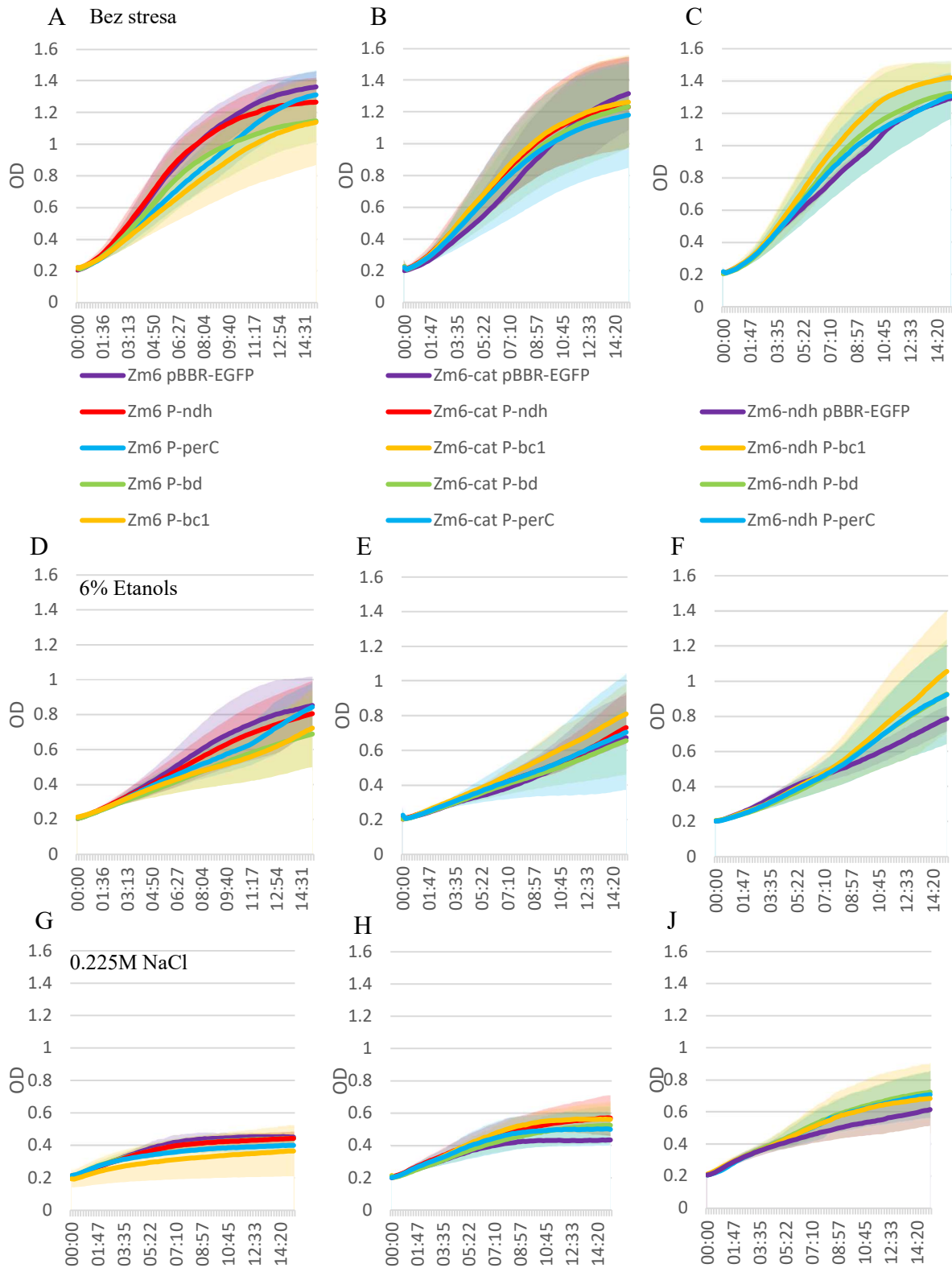


## 6. pielikums

pBBR-EGFP saturošo celmu augšanas salīdzinājums pie normāla barotnes satura (A), ar pievienotu 6% etanolu (B) un 0,225M NaCl (C) audzējot uz krafitāja 15 ml tilpumā 100ml koniskajās kolbās.



Zm6, Zm6-cat, Zm6-ndh plazmīdas saturošo celmu augšanas savstarpējs salīdzinājums pie normāla barotnes satura (A,B,C), ar pievienotu 6% etanolu (D,E,F) un 0,225M NaCl (G,H,J). Dati no 8 – 4 bioloģiskajiem atkārtojumiem audzējot uz mikroplašu lasītāja.



Maģistra darbs „*Zymomonas mobilis* elpošanas ķēdes regulācijas izpēte stresa apstākļos izmantojot zaļā fluorescentā proteīna reportiersistēmu” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un LUISā iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai un/vai e-studijās iesniegtai darba elektroniskai versijai.

Autors: Māra Biķerniece

26.05.2023.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: prof., Dr.biol. Uldis Kalnenieks

26.05.2023.

Recenzents:

asoc. prof., Dr. biol. Nils Rostoks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 26.05.2023.

Studiju metodiķe: .....

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: