

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Hanna Moor

***Pseudomonas putida* globaalse regulaatori Fis osalus biofilmi moodustumises**

Magistritöö

Juhendaja PhD Riho Teras

TARTU 2013

Sisukord

Sisukord.....	3
Lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Biofilm	7
1.1.1 Biofilmi uurimise tähtsus.....	7
1.1.2 Biofilm bakteri seisukohast	8
1.1.3 Biofilmi moodustumine	9
1.1.4 Biofilmi maatriks	9
1.1.5 Biofilmi reguleerivad süsteemid.....	10
1.1.6 Biofilmi regulatsioonis osalevad suured adhesiinid	12
1.1.7 Biofilm taime juurel.....	15
1.2 Globaalne regulaator Fis	15
1.2.1 <i>P. putida</i> Fis.....	19
1.2.2 Fis-i mõju biofilmi moodustumisele.....	19
Eksperimentaalne osa	21
1.3 Töö eesmärk.....	21
1.4 Materjal ja meetodika	21
1.4.1 Bakterite kasvatamistingimused	21
1.4.2 Promootorala klonerimine transkriptsioonitestvektorisse.....	23
1.4.3 Biofilmi moodustumise mõõtmine	24
1.4.4 Bakterite kolmikristamine.....	25
1.4.5 Transposoonmutagenees	25
1.4.6 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) ja sekveneerimine	26
1.4.7 SDS - polüakrüülamiidgeelelektroforees ja <i>Western blot</i>	27
1.4.8 B-galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine	28
1.4.9 Kvantitatiivne reaalaja PCR (qRT-PCR).....	28
1.4.10 RACE-iga mRNA-de 5' otsa määramine	30
1.4.11 LapA märkimine Gfp-ga.....	30
1.4.12 Fluorestsentsi mõõtmine läbivoolutsütomeetril.....	31
1.4.13 Statistiline analüüs	31
1.5 Tulemused.....	32

1.5.1	Fis-i üleekspressioon ei soodusta M9 glükoos CAA söötmes biofilmi moodustumist	32
1.5.2	Ekstratsellulaarne valk on vajalik Fis-i biofilmi võimendava efekti tekkimiseks	33
1.5.3	Valmis biofilmi suudab lagundada proteaas, aga mitte DNAas	35
1.5.4	Enamik transposoonmutante sisaldas insertioone <i>lap</i> -geenides	36
1.5.5	Fis on üleekspressioonitud kõigis <i>lap</i> -deletantides	38
1.5.6	<i>LapA</i> deleteerimine kaotab Fis-i üleekspressiooni biofilmi moodustumist võimendava efekti, kuid <i>lapF-i</i> deletsioon mitte	39
1.5.7	Fis-i üleekspressiooni tüves on ka IPTG-ta indutseerimata rohkem Fis-i mRNA-d	40
1.5.8	Fis reguleerib <i>lap</i> -geenide transkriptsiooni	40
1.5.9	Leiti uuritavate <i>lap</i> -geenide mRNA 5' otsad ja Fis-i seondumine <i>lap</i> geenide promootorpiirkonda	41
1.5.10	Fis suurendab <i>LapA</i> hulka rakus	43
1.6	Arutelu	45
	Kokkuvõte	53
	Summary	54
	Tänuõnad	55
	Kasutatud kirjandus	56
	Lisa 1	63
	Lisa 2	67
	Lisa 3	70
	Lisa 4	72
	Lisa 5	74

Lühendid

5' RACE – RNA 5' otsa määramise meetod (ingl k *rapid amplification of cDNA ends*)

AAF/II – agregatiivsed piilid (ingl k *aggregative adherence fimbriae*)

ACC – 1-amino-tsüklo-propaan-1-karboksüülhappeks (ingl k *1-aminocyclopropane-1-carboxylate*)

α CTD – RNA polümeraasi α subühiku C-terminaalne domeen

BSA – veise seerum albumiin (ingl k *bovine serum albumine*)

c-di-GMP – tsükliline diguanosiinmonofosfaat

DnaA – DNA-d siduv valk (ingl k *DNA binding protein A*)

EPS – ekstratsellulaarsed biopolümeerid (ingl k *extracellular polymeric substances*)

Fis – globaalne regulaatorvalk (ingl k *factor for inversion stimulation*)

GacA – kahekomponendilise süsteemi GacS/GacA vastusregulaator (ingl k *global activator*)

GacS – kahekomponendilise süsteemi GacS/GacA sensor (ingl k *global activator*)

IHF – globaalne regulaatorvalk (ingl. k. *integration host factor*)

IPTG – isopropüül- β -tioglaktosiid

LB – täissööde (ingl k *lysogeny broth*)

Lrp – globaalne regulaator (ingl k *leucine-responsive regulatory protein*)

MCS – suur hulk restriктаaside lõikejärjestusi (ingl k *multi cloning site*)

nt – nukleotiid

OD – optiline tihedus (ingl. k. *optical density*)

ONPG – orto-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid

PGPR- taimekasvu soodustavad risosfääri bakterid (ingl k *plant growth-promoting rhizobacteria*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

TdT - terminaalne desoksüribonukleotidüültransferaas

Sissejuhatus

Bakterite biofilm on tänapäeval järjest suurema tähelepanu all, sest see mõjutab märkimisväärsel määral inimkonna heaolu. Bakterite biofilm põhjustab olulist kahju tööstuses, takistades soojusülekanne jahutussüsteemides ja põhjustades jahutusvee torude roostetamist. Meditsiinis on probleemiks biofilmi moodustajate suur resistentsus antibiootikumidele ning võime meditsiinilistele abivahenditele püsima jääda ja infektsioone põhjustada. Põllumajanduses väheneb biofilmi tõttu põllukultuuride saagikus, kuna taimpatogeenid on biofilmis tundetud taime kaitsemehhanismidele ja selliste taimpatogeenide vastaseid taimekaitsevahendeid pole seni õnnestunud välja töötada.

Siiski, kõik biofilmi moodustavad bakterid pole kahjulikud. Põllumajanduses kasutatakse bioväetisena taime kasvu soodustavaid baktereid. Need moodustavad taimedel biofilmi ja konkureerivad välja patogeenseid baktereid. Taolised kasulikud bakterid võivad oluliselt suurendada taimede kasvu ja saagikust ning vähendada mitmete patogeensete bakterite, seente ja viirustega nakatumist. Meie laboris uuritav *Pseudomonas putida* suudab biofilmi moodustada erinevate põllumajanduslikult oluliste taimede juurel ning kaitsta neid mitmete taimehaiguste eest.

P. putida biofilm erineb biofilmi uurimise mudelorganismi *P. aeruginosa* biofilmist suure valgu ja vähese polüsahhariidide sisalduse poolest. *P. putida* biofilmi oluliseks komponendiks on suured valgulised adhesiinid LapA ja LapF. *P. aeruginosa* genoomis *lapA* ega *lapF*-i geene ei leidu ning *P. putida* lähisugulases *P. fluorescens*'is on ainult *lapA*. *P. putida*'s on LapA vajalik bakterite pinnale kinnitumises ning LapF rakkude omavaheliseks kinnitumiseks. Kuigi suurte adhesiinide posttranslatsioonilist regulatsiooni on üsnagi põhjalikult uuritud, on siiski vähe teada *lapA* ja *lapF*-i transkriptsiooni regulatsioonist.

Meie laboris on varem näidatud, et globaalne transkriptsiooni regulaator Fis (ingl *factor for inversion stimulation*) mõjutab biofilmi moodustumist. Seni pole aga teada milliseid geene mõjutades Fis biofilmi teket reguleerib. Käesoleva töö eesmärgiks on selgitada, kuidas reguleerib Fis biofilmi moodustumist ning kas Fis mõjutab suurte valguliste adhesiinide ekspressiooni.

Kirjanduse ülevaade

1.1 Biofilm

1.1.1 Biofilmi uurimise tähtsus

Biofilm on pinnale kinnitunud bakterite struktureeritud kogum (Costerton jt, 1999), mida leidub looduses praktiliselt kõikjal. Arvatakse, et umbes 99% mikroobidest on looduses biofilmi koosseisus ning planktilised, üksikult ujuvad bakterid, on pigem erandiks (Potera, 1996). Kuna laborites on siiani peamiselt uuritud planktilisi rakke, siis tänapäeval pööratakse biofilmi uurimisele üha rohkem tähelepanu. Seda mitmel põhjusel. Esiteks mõjutab bakterite biofilm inimühiskonda olulisel määral ning teiseks, biofilmis elavate rakkude füsioloogia ja seega ka geenide ekspressioon erineb oluliselt planktilistest rakkudest. (Beloin ja Ghigo, 2005; Hall-Stoodley jt, 2004)

Bakterite biofilmi negatiivne mõju inimühiskonnale on märkimisväärne. Bakterite võime moodustada biofilmi põhjustab suurt kahjumit meditsiinis, tööstuses ja põllumajanduses. Meditsiinis on kaks põhilist biofilmi põhjustatud probleemi. Biofilm põhjustab kroonilisi infektsioone, kuna biofilmis olevad bakterid on antibiootikumidele resistentsed (Kokare jt, 2009). Teiseks rikub biofilm meditsiinilisi abivahendeid nagu kateetrid, südameklapid, tehistorukesed, proteesid ja kontaktläätsed. Näiteks moodustab oportunistlik patogeen *Staphylococcus epidermidis* biofilmi kateetritel ja võib põhjustada veremürgistust (Christensen jt, 1982). Tööstuslikus tootmises on probleemiks biofilmi moodustumine jahutussüsteemides, kus biofilm takistab soojusülekannet ning põhjustab isegi roostevabast terasest jahutusveetorude roostetamist (Minnoş jt, 2012). Toidutööstuses põhjustab biofilmi teke toidu saastumist, kuna tootmispinda, millele on tekkinud biofilm, on raske steriliseerida (Carpentier ja Cerf, 1993). Biofilmi moodustamine tekitab kahjusid ka põllumajanduses, kus on tõsiseks hädaks taimehaigusi tekitavad bakterid nagu näiteks *Xylella fastidiosa*. *X. fastidiosa* moodustab biofilmi taime ksüleemis, ummistab juhtsooned ning põhjustab nii taimede närbumist (Marques, 2002).

Biofilmist võib inimühiskond ka kasu saada. Mitmed taime kasvu soodustavad bakterid (PGPR – ingl k *plant growth-promoting rhizobacteria*) moodustavad taime juurel biofilmi ja kaitsevad nii taime patogeenide eest. Näiteks moodustab *Bacillus subtilis* taime juurt katva biofilmi ning toodab patogeenide hävitamiseks mitmeid antibakteriaalseid aineid

(Bais jt, 2004). Teine PGPR, *Paenibacillus polymyxa*, koloniseerib peamiselt juure tippu, kus ta moodustab biofilmi ja konkureerib patogeenid välja (Timmusk jt, 2005). Biofilmi moodustumine on ka oluline esimene samm lämmastikku fikseerivatel bakteritel noodulite moodustumiseks: enne noodulite teket püsivad perekonna *Rhizobium* liikmed taime juurel biofilmis ja saavad nii noodulite teket initsieerida (Fujishige jt, 2006).

P. putida on põllumajanduslikult oluline PGPR, kuna koloniseerib põllukultuuride risosfääri (Espinosa-Urgel jt, 2000; Espinosa-Urgel jt, 2002). *P. putida* soodustab taimede kasvu ja viljade teket tootes taimede pikkuskavu indutseerivat kasvuhormooni indool-3-äädikhape (Gravel jt, 2007). *P. putida* kaitseb taimi ka erinevate haigustekitajate eest nagu patogeenne seen *Pythium ultimum*-i (Paulitz, 1991), viirushaigust *rhizomania* levitava seene *Polymyxa betae* eest (Aksoy ja Yilmaz, 2008) ning bakteri *Phytoplasma asteris*'e eest (Gamalero jt, 2010).

1.1.2 Biofilm bakteri seisukohast

Bakterid moodustavad biofilmi, et kaitsta end keskkonna negatiivsete mõjude eest, eksisteerida koos kogukonnana ning paigale jääda soodsamate tingimustega keskkonnas (Jefferson, 2004). Biofilm kaitseb baktereid kahjulike keskkonnafaktorite eest nagu UV kiirgus (Espeland ja Wetzel, 2001), liigne soolsus, kuivus (Le Magrex-Debar jt, 2000), antibiootikumid ja antimikroobsed ained (Stewart ja Costerton, 2001). Bakterid on mitmel põhjusel biofilmi koostises keskkonnafaktoritele vastupidavamad: maatriks toimib barjäärina bakterite ja keskkonna vahel; biofilmis olevad bakterid kasvavad aeglasemalt ja on seetõttu tundetumad toksilistele ainetele või toimuvad muud füsioloogilised muutused, mis võimaldavad stressiga paremini toime tulla (Donlan ja Costerton, 2002; Hall-Stoodley jt, 2004). Biofilmi moodustumine on ka lihtsalt viis pinnale kinnitumiseks ja sel püsimiseks. Näiteks toodab inimesega koos elav ja tema nahal biofilmi moodustav oportunist *Staphylococcus aureus* hulgaliselt spetsiaalseid adhesiine, millega ta kinnitub inimese raku ekstratsellulaarse maatriksi valkudele (Jefferson, 2004).

Looduslikes tingimustes ei ole sageli monokultuurseid biofilme, reeglina moodustavad biofilmi mitmest eri liigist bakterid koos (Yang jt, 2011). Mitmest liigist koosneva biofilmi näiteks on hambakatt, kust võib leida ca 700 eri liiki baktereid. Ühe terve inimese hambakatus võib olla koguni 100 kuni 200 eri liiki baktereid (Paster jt, 2006). Multikultuurseid biofilme ei moodusta koos ainuüksi bakterid. Ka seened, nagu näiteks *Candida albicans* (Baillie ja

Douglas, 2000) ja mikroskoopilised vetikad (de Brouwer jt, 2005) toodavad biofilmi maatriksit. Multikultuurse biofilmi koostises interakteeruvad eri liigid omavahel ja mõjutavad vastastikku üksteise geeniekspressiooni (Jakubovics jt, 2008). Taoline vastasmõju võib olla bakteritele vajalik. Näiteks suurendab *C. albicans* *S. aureus*'ega samas biofilmis elades viimase resistentsust vankomütsiinile (Harriott ja Noverr, 2010).

1.1.3 Biofilmi moodustumine

Biofilmi tekke saab jagada neljaks etapiks: bakterite esmane kinnitumine pinnale, mikrokolooniate teke, biofilmi küpsemine ning lagunemine (Sauer jt, 2002; Tolker-Nielsen jt, 2000). Esmane kinnitumine pinnale on tavaliselt pöörduv: bakter on võimeline pinnalt lahkuma ning elama planktiliselt (Stanley ja Lazazzera, 2004). Selleks, et edasised etapid saaksid toimuda peab esmane pöörduv kinnitumine üle minema pöördumatuks ning see eeldab juba geeniregulatsiooni muutusi (Stanley ja Lazazzera, 2004). Kui pöördumatult kinnitunud bakterid kлонаalselt paljunevad, moodustub mikrokoloonia, diskreetne 3-5 kihiline rakkude kogum (Davey ja O'Toole G, 2000; Monds ja O'Toole, 2009). Seejärel mikrokolooniad kasvavad suuremaks ja moodustavad küpse struktureeritud biofilmi (Monds ja O'Toole, 2009). *Pseudomonas putida* OUS82 tüve puhul on näidatud, et enne küpse biofilmi moodustumist toimub kompaksete mikrokolooniate lagunemine. Bakterid vabanevad mikrokolooniatest ja liiguvad viburite abil massiliselt ringi ning moodustavad vähem struktureeritud kolooniad, mis küpsevad edasi valmis biofilmiks. *P. putida* valmis biofilm on lame ja vähestruktureeritud reljeefse kujuga moodustis. (Tolker-Nielsen jt, 2000)

1.1.4 Biofilmi maatriks

Pinnale kinnitunud bakterid katavad end ise toodetud maatriksiga (Costerton jt, 1999), mis tugevdab bakterite kinnitumist pinnale ja seob rakke omavahel (Hall-Stoodley jt, 2004), võimaldades kasulikke rakk-rakk interaktsioone ja geneetilise informatsiooni vahetamist (Klausen jt, 2006). Biofilmist vaid kuni 10% on bakteri rakud, ülejäänud moodustab maatriks. Maatriks koosneb erinevatest hüdreeritud biopolümeeridest ehk EPS-idest (ingl k *extracellular polymeric substances*), millest olulisemad on eksopolüsahhariidid, valgud, lipiidid ja nukleiinhapped. (Flemming ja Wingender, 2010)

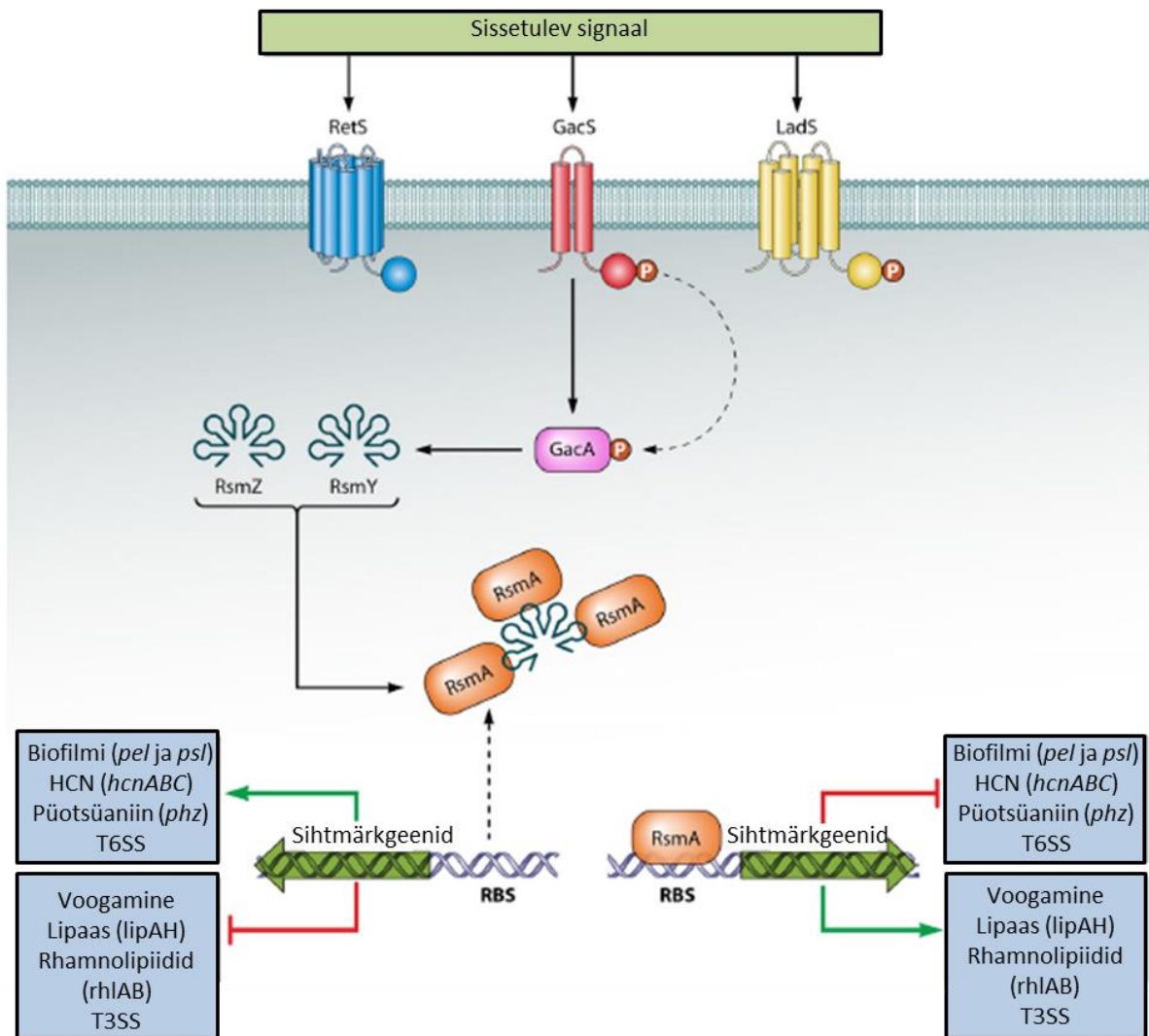
Baktereid katva maatriksi koostis sõltub biofilmi bakterite liigilisest koosseisust ja keskkonnatingimusest (Sutherland, 2001). Näiteks, biofilmi uurimise mudelorganismi

Pseudomonas aeruginosa biofilmis on väga olulisel kohal eksopolüsahhariidid, mida toodetakse vähemalt kolme eri tüüpi: alginaat, Pel ja Psl (Ryder jt, 2007). Lisaks sisaldab tema biofilm palju ekstratsellulaarset DNA-d, millel on oluline struktuurne funktsioon (Whitchurch jt, 2002). *Pseudomonas putida* biofilmi kohta on ühelt poolt näidatud, et see sisaldab palju ekstratsellulaarset DNA-d (Steinberger ja Holden, 2005) ja samas, et ekstratsellulaarne DNA ei ole struktuurselt oluline (Yousef-Coronado jt, 2011). Kindlasti sisaldab *P. putida* biofilm võrreldes *P. aeruginosa* omaga palju rohkem valku ja tunduvalt vähem polüsahhariide (Jahn, 1998).

1.1.5 Biofilmi reguleerivad süsteemid

Kuna biofilmi teke sõltub paljudest signaalirajadest, mis reguleerivad üksteist, siis on biofilmi moodustumine keeruliselt reguleeritud. Lisaks võtavad regulatsioonist osa mitmed globaalsed regulaatorid (O'Toole jt, 2000). Üks globaalne regulaator, mis mõjutab biofilmi uurimise mudelorganismi *P. aeruginosa* biofilmi, on RsmA (Gooderham ja Hancock, 2009). RsmA on posttranskriptsiooniline regulaatorvalk, mis seondub mRNA-dega ning soodustab või takistab nende translatsiooni (Burrowes jt, 2006). Lisaks biofilmi moodustumisele mõjutab RsmA mitmete peremeesorganismi nakatamiseks vajalike virulentsusfaktorite sünteesi. RsmA reguleerib bakterite hulgatunnetusmolekuli N-atsüül homoseriin laktooni sünteesi ning otseste virulentsusfaktorite nagu vesiniktsüaniidi (Pessi ja Haas, 2001), püotsüaniini ja lipsaasi tootmist (Reimann jt, 1997). Seega reguleerib RsmA patogeenses *P. aeruginosa*'s üleminekut akuutse ja kroonilise infektsiooni vahel (Gooderham ja Hancock, 2009).

RsmA aktiivsust reguleerib GacS/A (ingl k *global activator*) kahekomponentne süsteem (joonis 1). Seda on küll põhjalikult uuritud, kuid signaal, millele see süsteem reageerib, on seni teadmata. Teadmata signaali vastu võtnud sensor GacS aktiveerib fosforüleerimisega GacA, mis omakorda indutseerib väikeste regulatoorsete RNA-de transkriptsiooni. Need väikesed regulaarsed RNA-d (RsmZ ja RsmY) on RsmA inhibiitorid: nad seonduvad RsmA valguga ja inaktiveerivad selle. (Gooderham ja Hancock, 2009; Kay jt, 2006) Kui aktiivne RsmA represserib biofilmi moodustumist ja aktiveerib liikumist, siis RsmA inaktiveerimisel liikumine represseritakse, toodetakse biofilmi moodustumiseks vajalikke eksopolüsahhariidide *pel* ja *psl* operonidelt ning moodustub biofilm (Burrowes jt, 2006; Gooderham ja Hancock, 2009; Jimenez jt, 2012; Kay jt, 2006).



Joonis 1. *P. aeruginosa* Gac/Rsm süsteem. GacS võtab keskkonnast vastu seni tundmatu signaali ja aktiveerib fosforüleerimisega GacA, mis omakorda soodustab väikeste reguleerivate RNA-de, RsmZ-i ja RsmY-i transkriptsiooni. Väikesed reguleerivad RNA-d inaktiveerivad RsmA. RsmA puudumisel aktiveeritakse virulentsusfaktorite ja biofilmi moodustumiseks vajalike polüsahhariidide süntees. (Jimenez jt, 2012)

Biofilmi regulatsioonis osaleb ka globaalne alarmoon c-di-GMP (Römling jt, 2005). C-di-GMP koosneb kahest tsüklis olevast guanosiinmonofosfaadist. See lihtne molekul reguleerib bakterites lisaks biofilmi moodustumisele ka virulentsufaktorite (Cotter ja Stibitz, 2007) ja antibiootikumide sünteesi (Fineran jt, 2007). C-di-GMP mõjutab *P. aeruginosa*'s biofilmi moodustumist positiivselt, võimendades eksopolüsahhariidide tootmist (Lee jt, 2007) ning *P. fluorescens*'is, soodustades suurte valguliste adhesiinide raku pinnale transportimist (Monds jt, 2007; Newell jt, 2009). Näiteks seondub c-di-GMP *P. aeruginosa*'s

retseptorvalguga PelD ja soodustab biofilmi moodustumiseks vajalike Pel polüsahhariidide sünteesi (Lee jt, 2007). Paljudel juhtudel on c-di-GMP täpne toimemehhanism veel teadmata.

C-di-GMP hulka rakus reguleerivad tsüklaasid ja fosfodiesteraasid. Tsüklaasid toodavad ja fosfodiesteraasid lagundavad c-di-GMP-d (Christen jt, 2005; Paul jt, 2004). Näiteks on *P. fluorescens*'is fosfodiesteraas RapA, mis langetab c-di-GMP taset rakus (Navarro jt, 2011). C-di-GMP tootmise eest vastutab ensüümides GGDEF domeen ja lagundamise eest EAL domeen. GGDEF domeen sisaldab vastavat 5 aminohappe pikkust motiivi, mille järgi see on nime saanud, ning EAL vastavat kolme aminohappe pikkust järjestust. (Christen jt, 2005; Paul jt, 2004) Kõik GGDEF ja EAL domeenid rakus ei ole aga seotud c-di-GMP metabolismiga. Tegemist on bakteri proteoomi kõige levinumate domeenidega ning paljudel GGDEF ja EAL motiive sisaldavatel valkudel on vastavad aktiivsused kadunud ning domeenid käituvad c-di-GMP retseptoritena. (Römling jt, 2005) Üks selline c-di-GMP retseptordomeeniga valk on *P. fluorescens*'i LapD (joonis 2), mis reguleerib biofilmi moodustumiseks oluliste suurte adhesiinide pinnale transporti (Newell jt, 2009).

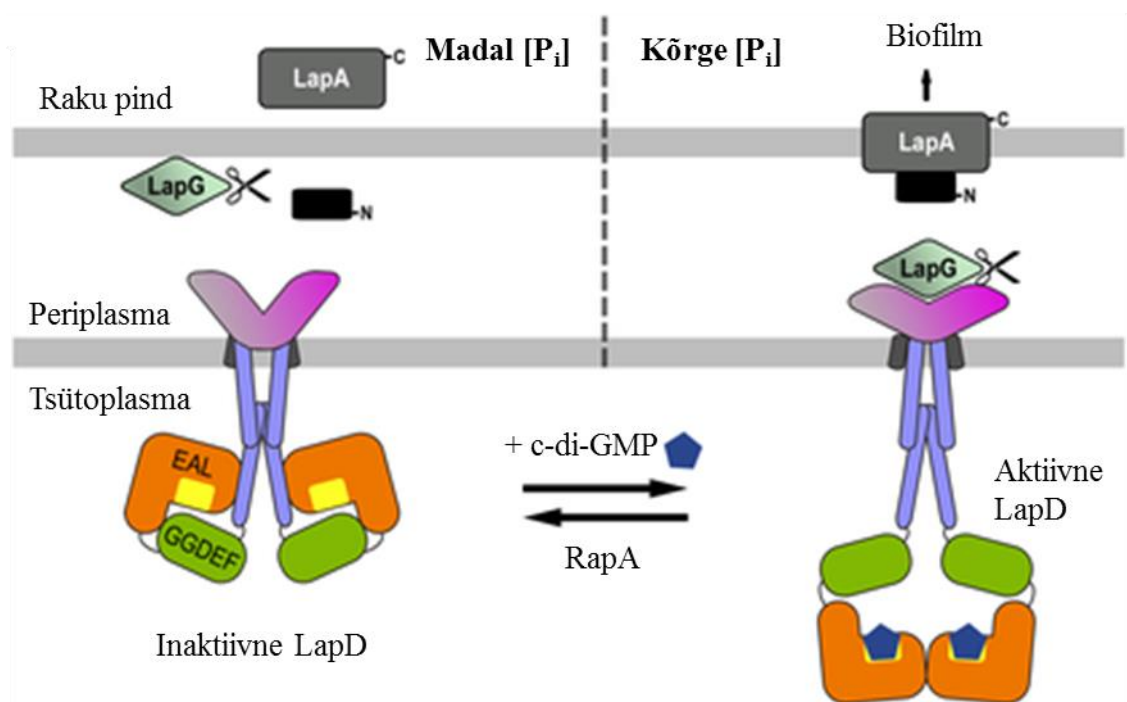
1.1.6 Biofilmi regulatsioonis osalevad suured adhesiinid

Mitmetel bakteritel on biofilmi moodustumiseks olulised suured kordusterohked pinnavalgud: *Staphylococcus aureus*'el on taoliseks valguks Bap (Cucarella jt, 2001), *P. fluorescens*'il LapA ning *P. putida*'l LapA ja LapF (Hinsa jt, 2003). Suured adhesiinid LapA ja LapF transporditakse raku pinnale ja bakter kasutab neid kasvupinnale ning teiste bakterite külge kinnitumiseks. LapA on suurim (üle 8000 aminohappe pikkune) ja LapF suuruselt teine (üle 6000 aminohappe pikkune) *P. putida* genoomilt toodetav valk (Hinsa jt, 2003; Martinez-Gil jt, 2010). LapA võimaldab rakkudel tahkele pinnale kinnituda ja on oluline pöörduva kinnitumise üleminekul pöördumatuks (Hinsa jt, 2003). LapF on vajalik mikrokoonia tekkeks ja edasiseks biofilmi küpsemiseks, osaledes bakterite omavahelises seondumises (Martinez-Gil jt, 2010). Ilmselt nende erineva funktsiooni tõttu biofilmi moodustumises reguleeritakse LapA ja LapF valkude sünteesi erinevate radade kaudu (Fuqua, 2010).

LapA on nii *P. fluorescens*'is kui *P. putida*'s biofilmi moodustumiseks hädavajalik. Kummagi liigi *lapA* mutant ei suuda biofilmi moodustada, kuigi kasvab vedelas söötmes metsiktüvega võrreldavalt (Espinosa-Urgel jt, 2000; Hinsa jt, 2003). *P. fluorescens*'is on näidatud ka, et LapA-d raku pinnale viiva transportsüsteemi mutandid ei suuda sarnaselt *lapA*

mutandile biofilmi moodustada. Seega sõltub biofilmi moodustumine LapA raku pinnale jõudmisest (Hinsa jt, 2003).

LapA eksponeeritus raku pinnal on *P. fluorescens*'is reguleeritud LapA transpordiga ning proteolüütilise regulatsiooniga. LapA transporditakse raku pinnale ABC transporteriga, mis koosneb kolmest valgust: LapE, LapB ja LapC. LapB on ATPaas, LapC sisemembraanis ja LapE välismembraanis paiknev transporterite osa. Kui transporterit ei toodeta, siis LapA ei pääse raku pinnale. (Hinsa jt, 2003) Teiseks LapA raku pinnal eksponeerimise regulatsiooni võimaluseks on LapG-st ja LapD-st sõltuv proteolüütiline regulatsioon (joonis 2). LapG on periplasmas asuv proteaas, mis vabastab LapA välismembraanist, represseerides biofilmi moodustumist. LapG aktiivsust reguleerib sisemembraanne valk LapD, mis suudab periplasmast LapG ära siduda. LapD-l on nn aktiivne konformatsioon, mis on võimeline LapG-d siduma ning inaktiivne konformatsioon, mis ei seo LapG-d. Selleks, et LapD võtaks aktiivse konformatsiooni, peab selle GGDEF domeeniga seonduma c-di-GMP. (Navarro jt, 2011; Newell jt, 2009; Newell jt, 2011b)



Joonis 2. Biofilmi anorgaanilisest fosforist sõltuv regulatsioon. Kui P_i -d on keskkonnas vähe, siis LapD ei suuda siduda LapG-d, mis lõikab LapA rakupinnalt lahti. Kui P_i -d on piisavalt, püsib c-di-GMP tase kõrge. LapD muudab c-di-GMP-d sidudes oma konformatsiooni ja on võimeline LapG ära siduma. LapA jääb raku pinnale püsima ja bakterid moodustavad biofilmi. (Navarro jt, 2011)

LapA püsimit raku pinnal reguleerib ka anorgaanilise fosfori (PO_4^{3-} ehk P_i) hulk (joonis 2; Monds jt, 2007). *P. fluorescens*'is käib regulatsioon Pho raja kaudu, mis on rakus peamine fosforinäljale reageeriv rada. Kui keskkonnas on vähe anorgaanilist fosforit, fosforüleerib kahekomponentse süsteemi sensor PhoB vastuseregulaatori PhoR. Aktiivne, fosforüleeritud PhoR saab aktiveerida Pho reguloni geene. (Wanner, 1996) Üks neist geenidest on *rapA*, mis kodeerib fosfodiesteraasi ja langetab c-di-GMP taset (Jenal ja Malone, 2006). RapA toimel väheneb LapA hulk raku pinnal ja biofilmi ei teki. Kui PO_4^{3-} on keskkonnas piisavalt, siis ei lase Pst süsteem PhoR-il PhoB-d fosforüleerida ning palju LapA-d jõuab raku pinnale. Seega moodustub biofilm. Lisaks on näidatud, et PhoB reguleerib *lapE* transkriptsiooni: PhoB repressseerib *lapE* transkriptsiooni fosforinälja tingimustes ja võib nii mõjutada biofilmi moodustumist. (Monds jt, 2007)

Teiseks mõjutab LapA hulka raku pinnal kaltsiumi hulk. Ca^{2+} -sõltuv regulatsioon toimub LapG kaudu, mis on Ca^{2+} -st sõltuv proteaas. LapG vajab LapA lõikamiseks kaltsiumi ning seega on kaltsiumil biofilmi vähendav efekt. *P. fluorescens*'i biofilmi moodustumine suureneb Ca^{2+} ärasidumisel kaks korda. Looduses võiks Ca^{2+} siduda ja biofilmi moodustumist soodustada näiteks tsitraat. Teisalt on LapG kaltsiumit siduvad aminohappejäägid olulised ka seda inaktiveeriva LapD-ga interakteerumiseks ning nende deleteerimisel LapD ei suuda LapG-d siduda (Boyd jt, 2012).

P. putida'l on lisaks LapA-le ka teine suur adhesiin LapF (Hinsa jt, 2003), kuid *P. fluorescens*'is on ainult LapA ning LapF-iga ortoloogne valk puudub (Winsor jt, 2011b). *P. putida* LapF-i ekspressioon ja raku pinnal eksponeerimine on LapA-st eraldi reguleeritud. *LapF*-i transkriptsiooni reguleerib statsionaarse faasi σ -faktor RpoS, millest tuleneb, et eksponentsiaalses kasvufaasis on *lapF*-i ekspressioon madal, kuid statsionaarsesse faasi jõudes tõuseb hüppeliselt. LapF-i posttranslatsioonilisest regulatsioonist, erinevalt LapA-st, midagi teada pole. Raku pinnale transporditakse LapF arvatavasti oma ABC transporteriga LapHIJ, mis on sarnane LapA-d transportiva LapEBC süsteemiga. (Martinez-Gil jt, 2010)

LapF adhesiin on oluline juure nakatamisel. *LapF*-i mutandid ei suuda edukalt juurt nakatada: nakatamise efektiivsus on väike nii üksinda kui koos konkureeriva metsiktüvega nakatades. Mikroskoobis on näha, et *lapF* mutandid ei suuda üksinda juurel biofilmi moodustada, kuid võivad koos metsiktüvega biofilmis püsima jääda. See viitab, et LapF on vajalik rakk-rakk interaktsioonideks ja LapF-i mitte produtseerivad mutandid saavad vähemalt osaliselt kasu lõigata metsiktüve toodetud LapF-ist. (Martinez-Gil jt, 2010)

1.1.7 Biofilm taime juurel

Taime juurel toimub tihe konkureerimine erinevate bakterite vahel, sest taim eritab juurte kaudu mulda kergesti omastatavaid süsiniku- ja energiaallikaid (Dennis jt, 2010). Taime juurel moodustavad biofilmi nii patogeensed kui taime kasvu soodustavad bakterid (Rudrappa jt, 2008a). Näiteks nakatab patogeenne *P. aeruginosa* müürlooka *Arabidopsis thaliana*'t ja basiilikut *Ocimum basilicum*'i, moodustab nende juurtel biofilmi ning selle tagajärjel taimed hakkavad hukkuma. Biofilm kaitseb *P. aeruginosa*'t taime toodetud antibiootikumide eest ja võimaldab juurel püsima jääda (Walker jt, 2004). *P. putida* on aga kommensalist, mis moodustab taime juurel biofilmi ning inhibeerib patogeenide kasvu (Molina jt, 2000; Rudrappa jt, 2008a). Taimed eritavad spetsiaalseid aineid, nagu näiteks malaati, et ligi meelitada taime kasvu soodustavaid baktereid, kes inhibeerivad patogeenide kasvu juurel (Rudrappa jt, 2008b).

1.2 Globaalne regulaator Fis

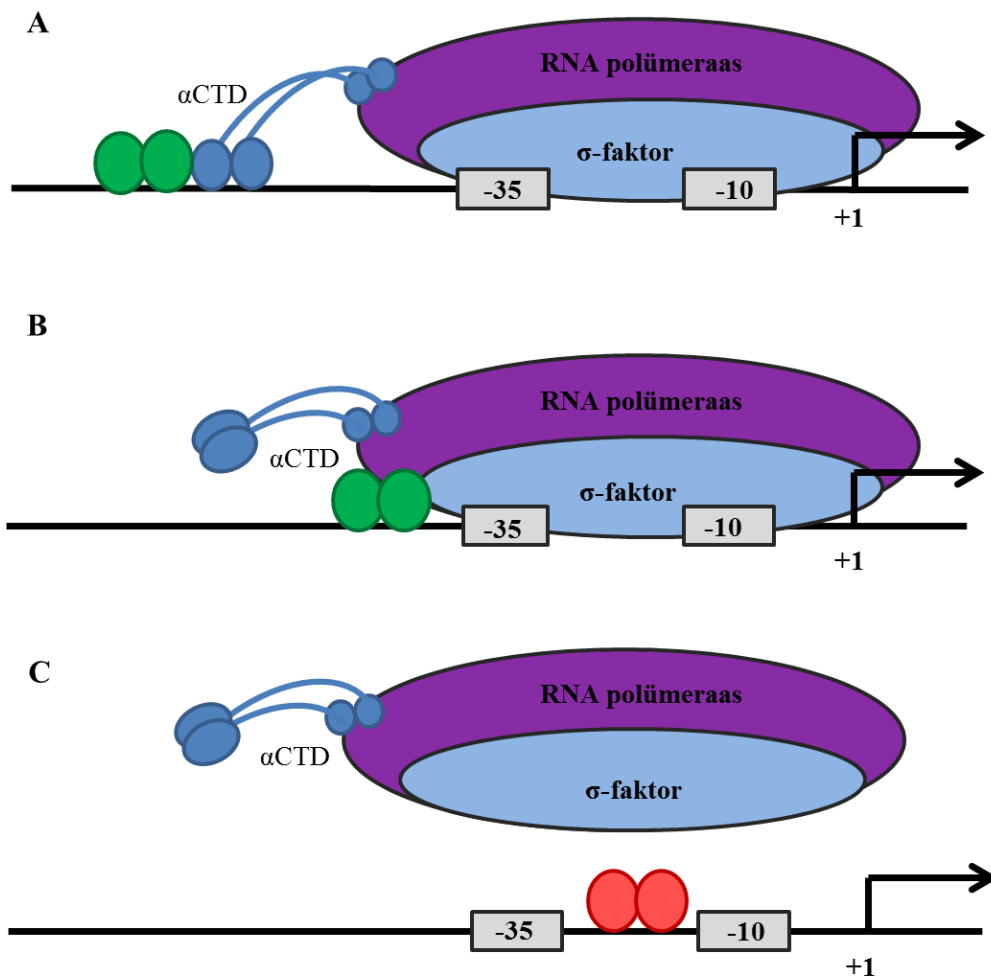
Selleks, et bakterid oleksid võimelised muutuvatele keskkonnatingimustele reageerima, peavad nad sageli ulatuslikult geeniekspressiooni muutma. Rakkude füsioloogilise seisundi kohandamisel keskkonnaga osalevad globaalsed transkriptsiooni-regulaatorid (Martinez-Antonio ja Collado-Vides, 2003). Üks oluline globaalne transkriptsiooniregulaator on Fis (ingl k *factor for inversion stimulation*), mis *E. coli*'s reguleerib ca 5% geenide ekspressiooni (Bradley jt, 2007). Fis on DNA-d siduv valk: see seondub dimeerina DNA suurde vaku ja seondudes painutab DNA-d 50 kuni 90° (Pan jt, 1996). Fis seondub DNA-ga järjestusspetsiifiliselt, aga tema seondumisjärjestus on pigem nõrgalt konserveerunud (Finkel ja Johnson, 1992). Võrreldes teiste järjestusspetsiifiliste globaalsete regulaatoritega nagu IHF ja Lrp, seondub Fis DNA-ga ka pigem madala afiinsusega, kuid võrreldes DnaA-ga suurema afiinsusega (Azam ja Ishihama, 1999).

E. coli's käivitab Fis kiire kasvu bakterite sattumisel toitainerikkasse keskkonda. Seega on Fis valku kõige rohkem just varajases eksponentsiaalses faasis, kus Fis-i hulk tõuseb üle 50 000 molekulini raku kohta. Fis-i hulk hakkab langema juba eksponentsiaalses faasis ja statsionaarses faasis on alles vaid umbes 100 molekuli raku kohta. (Ball jt, 1992; Ninnemann jt, 1992) Fis aktiveerib *E. coli*'s geene, mis on olulised kiireks kasvuks toitainerikkas keskkonnas: translatsiooni, toitainete transpordi, liikumise, süsiniku- ja energia metabolismiga seotud geenid. Kiireks kasvuks mittevajalikke geene Fis reeglina repressib

(Bradley jt, 2007). Geenide transkriptsiooni võib Fis reguleerida nii otseselt transkriptsioonifaktorina käitudes kui ka kaudselt.

Fis-i mõju geeni transkriptsioonile sõltub konkreetsest promootorist ja seondumiskohast. Peamine transkriptsiooni regulatsioon käib RNA polümeraasi promootorile seondumise etapis (Browning ja Busby, 2004). Selleks, et transkriptsioonifaktor saaks transkriptsiooni reguleerida otse RNA polümeraasiga seondudes, peab see transkriptsiooni alguskoha suhtes olema positsioonide -95 kuni +30 (Salgado jt, 2013). Represseeriv efekt avaldub tavaliselt regulaatori seondumisel kas promootori peale või promootorist allavoolu. Sel viisil seondudes takistatakse RNA polümeraasi promootorile seondumist või elongatsiooni alustamist. Samas on leitud ka geenist ülesvoolu paiknevaid regulaatoreid, mis repressivad transkriptsiooni initsiatsiooni. Aktivaatorid seonduvad reeglina geenist ülesvoolu, harva allavoolu, ning soodustavad RNA polümeraasi seondumist promootorile (klass I transkriptsioonifaktorid) või soodustavad DNA ahelate lahtisulamist (klass II transkriptsioonifaktorid). (Ishihama, 2010)

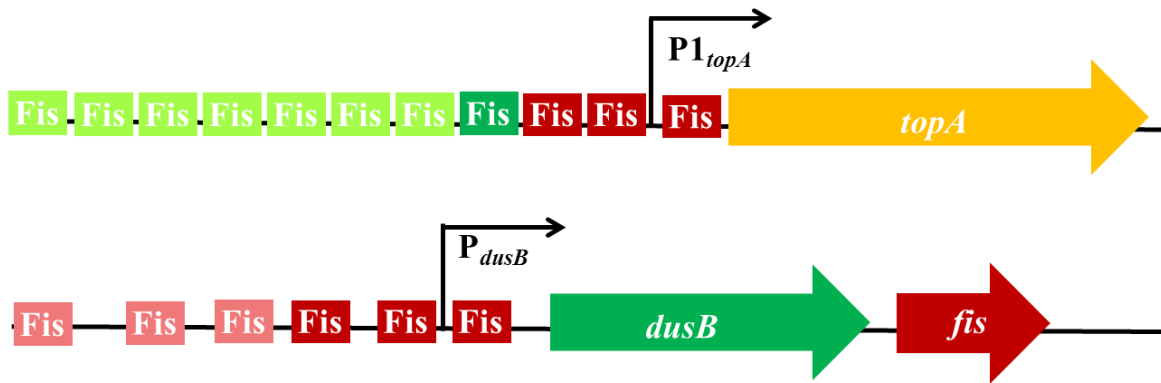
Fis aktiveerib transkriptsiooni reeglina nagu klass I transkriptsioonifaktorid: seondub RNA polümeraasi α subühiku C-terminaalse domeeniga (α CTD) ja soodustab selle promootorile seondumist (joonis 3). Taoliselt aktiveerib *E. coli* Fis näiteks ribosomaalse RNA geeni *rrnB* (nimetatakse ka *rrsB*) P1 promootoritelt lähtuvat transkriptsiooni (Bokal jt, 1997). Ainuke teadaolev näide Fis-i käitumisest klass II transkriptsioonifaktorina on *E. coli* osmoprotektantide transporteri geeni *proP* P2 promootorilt lähtuva transkriptsiooni regulatsioon. Siin seondub Fis positsioonis -41 nt-d transkriptsiooni alguskohast ja katab osaliselt -35 elementi ning võib seonduda σ -faktoriga. (McLeod jt, 2002; Typas jt, 2007) Fis aktiveerib ja represserib asukohast sõltuvalt topoisomeraas I kodeeriva *topA* geeni P1 promootori transkriptsiooni (joonis 4; Salgado jt, 2013). Seondumiskohtade täitumine sõltub Fis-i hulgast rakus (Laskin jt, 2009) ning erinevatele positsioonidele seondub Fis erineva afiinsusega (Thompson jt, 1987). Promootorist ülesvoolu on kaheksa Fis-i seondumiskohta, millele seondudes Fis aktiveerib *topA* transkriptsiooni ning promootoril on kolm -35 või -10 heksameeriga kattuvat seondumiskohta, millele seondumine represserib transkriptsiooni (Salgado jt, 2013).



Joonis 3. Skemaatiline joonis regulaatori seondumispositsioonist sõltuvast mõjust transkriptsiooni initsiatsioonile. Musta joonega on kujutatud DNA, hallide kastidena -10 ja -35 heksameerid ja noolega transkriptsiooni alguskoht. RNA polümeraas ja sellega seondunud σ -faktor on kujutatud vastavalt lilla ja sinise ovaalina ning eraldi on välja toodud polümeraasi α subühiku C-terminaalne domeen. Rohelisega on kujutatud aktiveerivasse ja punasega represserivasse positsiooni seondunud regulaator. **A** Klass I aktivatsiooni korral seondub regulaator promootorist ülesvoolu, kontakteerub α CTD-ga ja soodustab RNA polümeraasi promootorile seondumist. **B** Klass II aktivatsiooniks peab transkriptsiooni regulaator seonduma -41 positsiooni lähedale ja seonduma σ -faktoriga. **C** Repressor seondub heksameeridele ja takistab RNA polümeraasi promootorile seondumist. (Browning ja Busby, 2004)

Fis represserib transkriptsiooni initsiatsiooni sageli klassikalise mudeli järgi otse promootorile seondudes ja RNA polümeraasi seondumist takistades (joonis 3). Samas on palju promootoreid, mida Fis represserib, seondudes promootorist ülesvoolu või ka oluliselt allavoolu. *E. coli* Fis reguleerib negatiivselt oma geeni transkriptsiooni, seondudes kuues positsioonis, millest kolm (26, -42 ja -83 transkriptsiooni alguspunkti suhtes) võiksid otseselt

takistada RNA polümeraasi seondumist ja kolm (-101, -143, -221) asuvad promootorist ülesvoolu (joonis 4; Ninnemann jt, 1992; Salgado jt, 2013). Fis repressseerib ka tsitraaditsükli ensüümi akonitaasi kodeeriva geeni *acnB* transkriptsiooni, seondudes kolmes positsioonis, millest kaks takistavad polümeraasi ja üks asub 171,5 nukleotiidi transkriptsiooni alguskohast ülesvoolu (Salgado jt, 2013).



Joonis 4. Skemaatiline joonis Fis-i mõjust *topA* geeni esimesele promootorile ja oma geeni promootorile. Nooltega on tähistatud promootori asukohas. Kastidena on kujutatud Fis-i seondumiskohad: hele- ja tumerohelistes positsioonides Fis aktiveerib transkriptsiooni ning roosades ja punastes repressseerib. Tumerohelistes ja punastes positsioonides võib toimuda interaktsioon Fis-i ja RNA polümeraasi vahel, helerohelistes ja roosades on mõju kaudne. Fis reguleerib *topA* geeni hulgest sõltuvalt: väikeses koguses Fis aktiveerib *topA* geeni, suures koguses repressseerib. Oma geeni, mis on *dusB* järel operonis teine geen, Fis ainult repressseerib. Joonisel on kujutatud ainult Fis-i seondumiskohad, teisi teadaolevaid regulaatoreid märgitud ei ole. (Salgado jt, 2013)

Fis võib geenide transkriptsiooni mõjutada ka kaudselt, superspiralisatsiooni kaudu. DNA superspiralisatsioon sõltub kasvufaasist: kiiresti kasvavatele rakkudele on iseloomulik tugev negatiivne superspiralisatsioon ehk ahelas on lokaalselt vähem vint, aga suuremas plaanis pakitakse DNA rohkem kokku (Schneider jt, 2000). Superspiralisatsioon muudab promootorite geometriat, mõjutades σ^{70} sõltuva promootori -10 ja -35 elementide paiknemist teineteise suhtes (Travers ja Muskhelishvili, 2005). Optimaalne vahekaugus -35 ja -10 heksameeride vahel on 17 nt-d (Murakami jt, 2002). Kui promootori heksameeride vahekaugus on suurem või väiksem, siis nende aktivatsioon toimub kindla superspiralisatsiooni korral. Geene, mille -35 ja -10 elemendi vaheala on lühem kui 17 nt-d, transkribeeritakse tugeva negatiivse superspiralisatsiooni korral, kuna see liigutab -35 ja -10 elemendi samale küljele ja muudab need polümeraasile ligipääsetavaks. Promootorid, mille vaheala on pikem kui 17 nt-d transkribeeritakse seega enam väiksema negatiivse superspiralisatsiooni korral (Hatfield ja Benham, 2002).

Samuti võib Fis lokaalselt mõjutada promootorala superspiralisatsiooni. Fis-i seondumine DNA-le suurendab lokaalselt negatiivset superspiralisatsiooni ja aktiveerib transkriptsiooni initsiatsiooni. Näiteks seondub Fis kolmes positsioonis *rrnB* P1 promootori ette ja säilitab seal optimaalse superspiralisatsiooni transkriptsiooni alustamiseks (Laskin jt, 2009). Negatiivse superspiralisatsiooni säilitamist promootoralal, kui raku üldine negatiivse superspiralisatsiooni tase pole optimaalne, on näidatud ka türosiini tRNA geeni puhul (Auner jt, 2003). Lisaks on *leuV* geeni näitel teada, et Fis suudab nihutada lokaalset superspiralisatsiooni ja soodustada sel viisil avatud kompleksi teket promootoril (Opel jt, 2004).

1.2.1 *P. putida* Fis

P. putida Fis käitub arvatavasti *E. coli* omaga põhimõtteliselt sarnaselt, aga tõenäoliselt reguleerib erinevaid protsesse. Kui *E. coli* Fis ekspresseeritakse suurtes kogustes logaritmilise kasvufaasi alguses (Ball jt, 1992), siis *P. putida*'s saavutab Fis maksimaalse hulga alles varajaseks statsionaarseks faasiks ning *P. putida* Fis-i tase ei tõuse kunagi nii kõrgele ega lange nii madalale kui *E. coli*'s (Velts, 2008; Yuste jt, 2006). Teine oluline erinevus on see, et *P. putida* jaoks on Fis hädavajalik valk, kuid *E. coli* *fis* mutandid on eluvõimelised, olgugi et vähese konkurentsivõimega (Jakovleva jt, 2012; Schneider jt, 1997). Kuna kahe erineva organismi Fis valgu ekspressioonimustrid on erinevad, siis võib eeldada, et need reguleerivad erinevaid gene.

1.2.2 Fis-i mõju biofilmi moodustumisele

Fis-i mõju biofilmi moodustumisele võib olla nii soodustav kui pärssiv. Näiteks enteroagregatiivses *E. coli* tüves 042 on näidatud, et Fis soodustab biofilmi moodustumist, mõjutades AAF/II (ingl k *aggregative adherence fimbriae*) piilide biosünteesi, mis on vajalikud, et enteroagregatiivne *E. coli* saaks inimese soole seinal biofilmi moodustada. Fis aktiveerib kolme AAF/II piilide sünteesis vajalikku geeni: sünteesi aktivaatori geeni *aggR*, *chaperon*'i geeni *aafD* ja piilide subühiku geeni *aafA* (Sheikh jt, 2001). *Vibrio cholerae*'s on Fis-il kaudne biofilmi soodustav efekt: Fis aktiveerib väikeste regulaatorsete RNA-de sünteesi, mis suruvad alla biofilmi repressori geeni *hapR*-i ekspressiooni (Lenz ja Bassler, 2007). Fis-i represseeriva mõju näiteks on *Dickeya dadantii*. Selle bakteriofilmi maatriksi peamine komponent on tselluloos ning Fis inhibeerib biofilmi moodustumist, represseerides tselluloosi operoni transkriptsiooni (Prigent-Combaret jt, 2012). Fis-i represseerib ka *E. coli*

enteropatoogeenses tüves E2348/69 adhesiivsete piilide, *curli*'de sünteesi. Fis inhibeerib *curli*'de põhilise subühiku ekspressiooni ja takistab nii biofilmi moodustumist (Saldana jt, 2009). Meie grupi varasem töö on näidatud, et *P. putida*'s Fis soodustab biofilmi moodustumist ja inhibeerib liikumist (Jakovleva jt, 2012).

Eksperimentaalne osa

1.3 Töö eesmärk

Meie laboris on eelnevalt näidatud, et globaalne regulaator Fis, üleekspresserituna *P. putida* rakkudes, soodustab biofilmi moodustumist LB söötmes (Jakovleva jt, 2012). Sellest tulenevalt on käesoleva töö laiemaks eesmärgiks välja selgitada Fis-i mõju biofilmi moodustumisele. Täpsemalt, milliste geenide kaudu Fis reguleerib biofilmi moodustumist. Kuna käesoleva töö käigus selgus, et Fis-i positiivne mõju biofilmile sõltub söötimest, siis sai käesoleva töö teiseks eesmärgiks ka uurida, millisest söötmekomponendist sõltub Fis-i positiivne mõju biofilmile.

1.4 Materjal ja meetoodika

1.4.1 Bakterite kasvatamistingimused

Baktereid kasvatati LB söötmes (Miller, 1992) ja M9 glükoos CAA söötmes, mille valmistamisel lisatakse M9 puhvrissi (42 mM KH_2PO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 , 19 mM NH_4Cl , 9 mM NaCl) mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960), 0,2 % lõppkontsentratsiooniga glükoosi ning 0,4 % kaseiini hüdrolüsaati (CAA) koos täiendava L-trüptofaaniga (20 $\mu\text{g/ml}$). Tardsöötme valmistamiseks lisati agarit 1,5 g/l. Seleksioonimarkerina kasutati gentamütsiini (Gm, 10 $\mu\text{g/ml}$), streptomütsiini (Sm, 600 $\mu\text{g/ml}$) ja kanamütsiini (Km, 50 $\mu\text{g/ml}$). *P. putida* rakke kasvatati temperatuuril 30 °C ja *E. coli* rakke temperatuuril 37 °C. Vedelsöötmetes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Töös kasutatud bakterid ja plasmiidid on toodud tabelis 1. *P. putida* F15 rakkudes Fis-i üleekspresserimiseks lisati söötmesse 1 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG-d.

Tabel 1 Töös kasutatud bakterid ja plasmiidid

Bakter	Iseloomustus või genotüüp	Allikas
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (<i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyr A96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(Miller, 1992)
CC118 λ <i>pir</i>	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galK</i> <i>phoA20</i> <i>thi-1</i> <i>rspE</i> <i>rpoB</i> <i>argE</i> (<i>Am</i>)	(Herrero jt, 1990)
HB101	helpertüvi, mis sisaldab pRK2013 plasmidi	(Boyer ja Roulland- Dussoix, 1969)
TG1	<i>supE</i> <i>hsd</i> Δ 5 <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>F'</i> (<i>traD36</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>)	(Carter jt, 1985)
<i>P. putida</i>		
PSm	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7- Ω Sm kassett (Sm ^r)	(Jakovleva jt, 2012)
F15	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7-term- <i>lacI</i> ^f -P _{<i>tac</i>} - <i>fis</i> -T1T2- Ω Gm kassett (Gm ^r)	(Jakovleva jt, 2012)
PSm Δ <i>lapA</i>	PSm; Δ PP0168	Teppo avaldamata andmed
PSm Δ <i>lapF</i>	PSm; Δ PP0806	Teppo avaldamata andmed
PSm Δ <i>lapAlapF</i>	PSm; Δ PP0168 Δ PP0806	Teppo avaldamata andmed
PSm Δ <i>lapE</i>	PSm; Δ PP4519	Teppo avaldamata andmed
PSm Δ <i>lapBC</i>	PSm; Δ PP0166-0167	Teppo avaldamata andmed
PSm Δ <i>lapG</i>	PSm; Δ PP0164	Teppo avaldamata andmed
F15 Δ <i>lapA</i>	F15; Δ PP0168	Teppo avaldamata andmed
F15 Δ <i>lapF</i>	F15; Δ PP0806	Teppo avaldamata andmed
F15 Δ <i>lapAlapF</i>	F15; Δ PP0168 Δ PP0806	Teppo avaldamata andmed
F15 Δ <i>lapE</i>	F15; Δ PP4519	Teppo avaldamata andmed
F15 Δ <i>lapBC</i>	F15; Δ PP0166-0167	Teppo avaldamata andmed
F15 Δ <i>lapG</i>	F15; Δ PP0164	Teppo avaldamata andmed
PSm Δ <i>lapBC</i> <i>lapA-gfp</i>	PSm; Δ PP0166-0167 <i>lapA-gfp</i> (Km ^R)	Käesolev töö
F15 Δ <i>lapBC</i> <i>lapA-gfp</i>	F15; Δ PP0166-0167 <i>lapA-gfp</i> (Km ^R)	Käesolev töö

Tabel 1 jätk Töös kasutatud bakterid ja plasmiidid

Plasmiid	Iseloomustus või genotüüp	Allikas
pBLKT	Test-vektor <i>lacZ</i> geeni ja T1T2 terminaatoriga (Km ^R)	(Moor, 2011)
pBLKT P _{lapA}	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapA</i> 538 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Käesolev töö
pBLKT P _{lapF}	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapF-i</i> 236 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Käesolev töö
pBLKT P _{lapE}	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapE</i> 374 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Käesolev töö
pBLKT P _{lapB}	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapB</i> 556 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Käesolev töö
pBLKT P _{lapG}	<i>Bam</i> HI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>lapG</i> 398 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Käesolev töö
pDOC-G	<i>gfp</i> ja Km geeniga vektor	(Lee jt, 2009)
pDOC-C	konjugatsioonil ülekanduv pika MCS-ga (ingl k <i>multi cloning site</i>) vektor	(Lee jt, 2009)
pDOC- <i>lapA-gfp</i>	<i>Eco</i> RI-ga avatud pDOC-C on inserteeritud	Käesolev töö
pBAM1	mini-Tn5 (Km ^R) kandev suitsiidivektorit (Amp ^R)	(Martinez-Garcia jt, 2011)

1.4.2 Promootorala kloneerimine transkriptsioonitestvektorisse

Kloneerimisel kasutati Thermo Scientificu ensüüme vastavalt tootja ettekirjutusele. PCR produktid ja lõigatud DNA fragmendid lahutati 1% agarosgeelis ning puhastati Macherey-Nagel-i *Nucleospin Extract II* kolonniga. Ligeerimisel lähtuti samuti Thermo Scientificu protokollist. Ligaasisegu transformeeriti vastavalt modifitseeritud Hanahani meetodile *E. coli* DH5 α PIPES kompetentidesse, mille tegemisel kasutati MES-i asemel 10 mM PIPES-i (Sambrook ja Russel, 2001). Saadud kolooniaid kontrolliti PCR-iga ja plasmiidid eraldati Favorgeni *FavorPrepTM Plasmid Extraction Mini Kit* kolonniga. Plasmiid viidi *P. putida* kompetentsetesse rakkudesse elektroporatsioonil (Sharma ja Schimke, 1996).

Uurimaks Fis mõjutab *lap*-geenide ekspressiooni, kloneeriti testvektorisse pBLKT *lapA* (PP0168), *lapF-i* (PP0806), *lapE* (PP4519), *lapB* (PP0166-0167) või *lapG* (PP0164) promootorala (tabel 1). Selleks amplifitseeriti geenide promootoralad vastavate praimeritega:

LapA-fw - LapA-rev; LapF-fw - PP0806-rev, LapE-fw - LapE-rev, PP0167-I-fw - LapB-rev ning PP0164-up - PP0164-down (lisa 1). Praimerite otsa (va kahel viimasel praimeril) olid disainitud *Bam*HI lõikesaidid. Vektor avati samuti *Bam*HI-ga ja sellesse kloneeriti amplifitseeritud promootorala. *LapG* promootorala kloneeriti tõmbilt: PCR produkti ei lõigatud ja vektor tõmbiti pärast *Bam*HI-ga lahtilõikamist Klenowi töötlusega. Kloneerimise õnnestumist kontrolliti PCR-iga, kasutades vastavat -fw või -up praimerit ja vektoriga seonduvat LacZ-AB praimerit (lisa 1).

1.4.3 Biofilmi moodustumise mõõtmine

Biofilmi moodustumise mõõtmiseks kasutati Flecheri modifitseeritud protokoll (Fletcher, 1977). Üleöö LB-s või M9 glükoos CAA söötmes antibiootikumi juuresolekul ette kasvatatud *P. putida* bakterikultuur külvati ümber värskesse söötmesse mikrotiiterplaadil (5 µl bakterikultuuri + 100 µl vastavat söödet). Biofilmi teket võrreldi IPTG-ta ja 1 mM IPTG-ga söötmetes. Rakke kasvatati 24 tundi 30 °C termostaadis. Biofilmi moodustumise hindamiseks värviti rakke 15 minutit 25 µl 1%-lise kristallvioleti vesilahusega. Seejärel värvilahus ja vabad rakud eemaldati ning allesjäänud biofilmi pesti kaks korda 150 µl destilleeritud veega. Biofilmi kinni jäänud värv pesti välja 96%-lise etanooliga. Selleks lisati mikrotiiterplaadi kannu kaks korda 180 µl 96%-list etanooli, mis koguti puhtasse mikrotiiterplaati kokku. Selliselt biofilmist välja pestud värvi lahjendati veega kolm korda. Saadud lahuse optilist tihedust mõõdeti lainepikkusel 540 nm. Saadud tulemusest arvestati maha negatiivse kontrolli väärtus, mis saadi ainult söötmega kannu värvimisel kristallvioletiga.

Leidmaks söötmekomponenti, mis mõjutab Fis-i üleekspressioonist tulenevat biofilmi võimendumist, tehti kahte tüüpi söötmeid. Lisati LB söötmele M9 glükoos CAA söötme komponente ning M9 glükoos CAA söötmele makromolekule, mida LB võiks sisaldada. LB söötmesse lisati M9 puhvrit (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl), mikroelementide lahust (2,5 ml/l; lõppkontsentratsioonidega 667,5 µM MgO; 50 µM CaCO₃; 40 µM FeSO₄; 12,5 µM ZnSO₄; 12,5 µM MnSO₄; 2,5 µM CuSO₄; 2,5 µM CoSO₄; 1,9 µM H₃BO₄) ning 0,2% lõppkontsentratsiooniga glükoosi. M9 glükoos CAA minimaalsöötmesse lisati ühte mikrotiiterplaadi kannu 105 µl söötme kohta 4 mg *P. putida* kromosomaalset DNA-d (lõppkontsentratsiooniga 38,1 mg/ml), 10 mg BSA-d (veise seerumalbumiin, lõppkontsentratsiooniga 95,2 mg/ml) või 0,2 % vees lahustuvat tselluloosi.

Biofilmi moodustumise uurimiseks proteaasiga töödeldud LB-s inkubeeriti LB-d proteaas K-ga (lõppkontsentratsiooniga 90 µg/ml) 24 tundi temperatuuril 37 °C. Proteaasi inaktiveerimiseks inkubeeriti söödet 30 minutit 65 °C juures. Proteaasi inaktiveerumise kontrollimiseks inkubeeriti proteaasiga töödeldud ja võrdluseks töötlemata söötme proovis BSA-d (0,2 µg/µl). BSA lagunemist hinnati Coomassie sinisega värvitud polüakrüülamiidgeelil.

F15 valmis biofilmi mõjutamiseks proteaas K ja DNaaS I-ga lasti biofilmil moodustuda 24 tundi, seejärel lisati kannu proteaas K-d (lõppkontsentratsiooniga 90 µg/ml) või DNaasi (lõppkontsentratsiooniga 4,76 U/ml). Selleks, et DNaaS oleks aktiivne, lisati kannu MgCl₂ lõppkontsentratsiooniga 25 mM ja 1 mM CaCl₂. Pärast 6-tunnist inkubatsiooni mõõdeti biofilmi hulka ja võrreldi ensüümita variandiga.

1.4.4 Bakterite kolmikristamine

Ristamiseks kasvatati tüvesid üleöö LB söötmes koos vastava antibiootikumiga. Doonoriks kasutati *E. coli* CC118λ*pir* või TG1 tüve, mis sisaldas konjugatsioonil üleviidavat plasmidi, retsiipientiks *P. putida* PSm või F15 tüvi ning abitüveks oli *E. coli* HB101 [pRK2013]. Üleöökuultuuridest tehti värskesse LB-sse lahjendused: doonorist ja retsiipientist 35-kordsed lahjendused, abitüvest 30-kordne lahjendus ning kasvatati 2,5 tundi. Seejärel võeti igast värskest kultuurist 100 µl ja segati doonor, retsiipient ja abitüvi kokku. Segust pipeteeriti 100 µl LB tassile ja kasvatati üleöö 30°C termostaadis. Umbes neljandik rakkudest kraabiti tassilt kokku, võeti M9 puhvris üles ja plaaditi selektiivtassile. Kolooniad tekkisid 24 kuni 48 tunni jooksul ja neid analüüsiti PCR-iga ning aeti üksikkolooniateks.

1.4.5 Transposoonmutagenees

Transposoonmutageneesiks kasutati suitsiidivektorit pBAM1, mis kannab transposooni mini-Tn5 (Km^R). Ristamiseks kasutati doonortüve CC118, helpertüve HB101 [pRK2103] ja retsiipienttüve *P. putida* F15. Otsiti geene, mille kaudu Fis reguleerib biofilmi moodustumist ning selekteeriti biofilmi vastandfenotüübi, bakteri liikumisvõime alusel. Seleksioon toimus kolmes etapis. Esmalt valiti paremini voogavaid kolooniaid. Rakud plaaditi 1%-lisele F-agarile (King jt, 1954), mis sisaldab vähem rauda ja mille tulemusena hakkavad *P. putida* rakud voogama, kuid Fis-i üleekspressiooniga *P. putida* rakud ei vooga (avaldamata andmed). F-agarile lisati 1 mM IPTG-d ning seleksiooniks gentamütsiini ja kanamütsiini. Rauast

sõltuvate geenide välistamiseks testiti teises etapis nende ujumisvõimet 1 mM IPTG-ga 0,3%-lise agariga LB söötmes. Baktereid kasvatati 24 tundi temperatuuril 30 °C ja valiti välja kolooniad, mille ujumistulemus oli vähemalt 2/3 metsiktüve omast. Kolmandas etapis kontrolliti PCR-iga Fis-i üleekspressioonikasseti korrektsust, kasutades Prtac ja FisBamHI praimereid (lisa 1). Mini-Tn5 insertioon *P. putida* F15 kromosoomis tehti kindlaks Arb-PCR-ga.

1.4.6 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) ja sekveneerimine

PCR-is kasutati matriitsina eelnevalt puhastatud DNA-d (1 ng) või bakteritest kuumutamise vabanenud DNA-d. Reaktsioonisegu sisaldas 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 10 mM tartrasiin; 0,5% Ficoll 400; 10 pmol kumbagi praimerit; 1 U Taq DNA polümeraasi ja matriits-DNA-d. Reaktsioonisegu viidi veega lõppmahuni 30 µl. PCR tsükkel koosnes kolmest etapist: 30-60 sekundit 96 °C DNA denaturatsiooniks, 30-60 sekundit 56-58 °C praimerite kinnitumiseks matriitsile ning sõltuvalt amplifitseeritava ala pikkusest 30-120 sekundit 72 °C DNA sünteesiks. Kokku toimus reaktsioonis 25 tsükli. Kui matriitsina kasutati bakteritest vabanevat DNA-d, lisati enne tsükli veel 60 sekundit 96 °C bakterirakkude lõhkumiseks. Kasutatud parimerid on toodud lisa 1).

Mini-Tn5 transposooni insertiooni koha tuvastamiseks *P. putida* kromosoomis kasutati Arb-PCR-i, mis koosneb kahest järjestikusest PCR-i reaktsioonist (Martinez-Garcia jt, 2011; O'Toole ja Kolter, 1998). Esimene PCR-i reaktsioon on vähespetsiifiline. Selleks kasutatakse kōdupraimerit ARB6 ning mini-Tn5-ga spetsiifilist praimerit ME-I-extR (lisa 1). Teine PCR on spetsiifiline nn pesa-PCR. Kasutati praimereid ME-I-intR ja ARB2 (lisa 1), mis seonduvad eelmistest praimeritest sissepoole, nii et amplifitseeritakse ainult spetsiifiline järjestus. Saadud produktid sekveneeriti.

DNA järjestuse määramiseks töödeldi PCR proove 2,5 U *E. coli* ExoI ja 1 U aluselise fosfataasiga (FastAP) 30 minuti jooksul 37 °C juures, reaktsioon peatati 15 minuti jooksul temperatuuril 80 °C. Seejärel valmistati sekveneerimisproovid ette *BigDye® Terminator v3.1 Kit*-iga, kasutades modifitseeritud *Applied Biosystems*-i protokollit. Sekveneerimisreaktsiooni segu lõppmahuga 10 µl sisaldab: 0,2 µl PCR produkti, 0,7 µl *BigDye Premix*-i, 2 µl *BigDye®* lahjenduspuhvrit ja 1,6 pmol praimerit. Reaktsioonisegu maht viidi destilleeritud veega 10 µl-ni. Sekveneerimisreaktsioon toimus 30 tsükli jooksul ja tsükkel koosnes järgmistest

etappidest: 15 sekundit 96 °C, 10 sekundit 56 °C ja 45 sekundit 60 °C. Reaktsioonisegu sadestati 2 µl dekstraani ja 30 µl 96 ° etanooliga. Pesti kaks korda 200 µl 75 % etanooliga ning võeti üles 10 µl formamiidis. Kasutati TÛMRI sekveneermisteenust ja saadud nukleotiideid järjestusi analüüsiti programmiga BioEdit 7.0.9.1.

1.4.7 SDS - polüakrüülamiidgeelelektroforees ja Western blot

Rakulüsaatide valmistamiseks tsentrifuugiti *P. putida* üleökultuurist rakud kokku (2300 g, 5 min, 4 °C). Rakud võeti üles 300 µl Fis puhvris (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 300 mM NaCl ja 5% glütserool) ning hoiti jääl. Rakud lõhuti 2 x 20 sekundit Cole-Parmer 4710 Series Ultrasonic Homogenizer'i ultraheliga sonikeerides. Seejärel tsentrifuugiti lüsaate (16000 g, 30 min, 4 °C), et sadestada membraanid ja muud lahustumatud komponendid. Eraldatud supernatanti säilitati -20 °C juures.

Totaalvalgu kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriselt trüptofaani järgi (http://www.biotek.com/resources/docs/Synergy_HT_Quantitation_of_Peptides_and_Amino_Acids.pdf).

Valkude lahutamiseks geelelektroforeesil valmistati 10 protsendiline SDS-polüakrüülamiidgeel (Schagger, 2006). Geelile kandmiseks võeti 30 µg totaalvalku 1 x Laemmli puhvris (0,125 M Tris, 20% glütserool, 2% SDS, 2% β-merkaptotanool, 0,001% broomfenoolsinine, pH 6,8). Proovid denatureeriti enne elektroforeesi 10 minutit 96 °C juures. Valgud lahutati pingel 100 V, kasutades Bio-Rad'i Mini PROTEAN Tetra foreesisüsteemi. Geeli osa, mida membraanile kandmiseks ei kasutatud, värviti valgu koguse visuaalseks hindamiseks Coomassie G-250 värviga.

Western blot meetodit (Burnette, 1981) kasutati Fis-i üleekspressiooni hindamiseks *P. putida* tüvedes. Selleks lahutati vastavate tüvede rakulüsaatidest valgud SDS-geelelektroforeesiga. SDS-polüakrüülamiidgeelis lahutatud valkude ülekandmiseks GE Healthcare-i Amersham™ Hybond™-ECL membraanile kasutati Bio-Rad-i Trans-blot® SD masinat. Enne ülekandmist niisutati membraani vees ning seejärel hoiti membraani, geeli ja Watmani pabereid ülekandepuhvris (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glütsiin; 0,02 % SDS; 20 % metanool). Valgud kandusid üle voolutugevusel 5 mA/cm² 25 minuti jooksul. Antikeha mittespetsiifilise seondumise takistamiseks hoiti membraane 30 minutit blokeerimislahuses (1 × PBS, 5 % lõss, 0,05 % Tween 20). Primaarseks antikehaks oli Fis-i vastane hiirest puhastatud monokloonne antikeha (Sulev Kuuse, TÛMRI), mida lisati suhtes 1:400 lahuse

mahust. Sekundaarseks antikehaks kasutati *Goat anti-mouse* IgG aluselise fosfataasiga seotud antikeha (LabAS Ltd., Tartu), mis lahjendati blokeerimislahusesse suhtes 1:5000. Enne iga antikeha seondumise etappi pesti membraani 4 korda 5 minutit pesulahusega (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,0005 % Tween 20). Signaali visualiseerimiseks kasutati AP puhvrit (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 330 µg/ml NBT ja 165 µg/ml BCIP). Reaktsioon peatati stopplahusega (1 x TBS; 20 mM EDTA).

1.4.8 B-galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine

Uurimaks Fis-i mõju huvipakkuvate geenide transkriptsioonile, kasutati modifitseeritud Milleri meetodikat, mis põhineb reportergeeni *lacZ* kasutamisel promootori aktiivsuse hindamiseks (Miller, 1972). B-galaktosidaasi eriaktiivsust mõõdeti kollase produkti orto-nitrofenooli tekkimise järgi raku kohta. Rakke kasvatati 18 h IPTG-ta ja 1 mM IPTG-ga LB söötmes. Rakutihedus mõõdeti spektrofotomeetriselt 580 nm juures. Eriaktiivsust mõõdeti 1 ml reaktsioonisegus, mis sisaldas 800 µl Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 28 mM β-merkaptopetaanool; pH 7), 50 µl kloroformi, 5-10 µl bakterikultuuri ja 200 µl ONPG-d (orto-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml). Reaktsioon peatati 500 µl 1 M Na₂CO₃-ga. Eriaktiivsuse arvutamiseks mõõdeti reaktsiooni-aeg. Reaktsioonis tekkinud produkti, orto-nitrofenooli hulk määrati spektrofotomeetriselt lainepikkusel 420 nm ja lüüsitud rakkude tihedus lainepikkusel 550 nm. B-galaktosidaasi eriaktiivsus E arvutati valemiga:

$$E = \frac{1000 \times (OD1 - 1,75 \times OD2)}{T \times V \times OD3}$$

kus *T* on reaktsiooniaeg minutites, *V* on reaktsioonis kasutatud bakterikultuuri maht milliliitrites, *OD1* on lainepikkusel 420 nm mõõdetud orto-nitrofenooli neeldumine, *OD2* on 550 nm juures mõõdetud lüüsunud rakkude tihedus ja *OD3* on 580 nm juures mõõdetud rakutihedus.

1.4.9 Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR)

Uurimaks, kas Fis-i üleekspressiooni tüves F15 on Fis-i rohkem kui metsiktüves ka juhul, kui üleekspressiooni kassetis ei indutseerita *fis*-i transkriptsiooni IPTG-ga, viidi läbi

qRT-PCR. Selleks kasvatati PSm ja F15 rakke ilma induktsioonita 5 ml-is LB söötmes 18 tundi ning eraldati nende totaalne RNA Macherey-Nageli *NucleoSpin RNA II* kolonniga vastavalt modifitseeritud Macherey-Nageli protokollile. Eraldatud RNA-d töödeldi täiendavalt 1 tunni jooksul 37 °C termostaadis DNAas I-ga. Lahus sisaldas 1x Thermo Scientificu reaktsioonipuhvrit, 3 U DNAas I, 40 U Ribolock'i ja maht viidi RNAasi-vaba veega 100 µl-ni. Seejärel puhastati RNA uuesti kolonniga, järgides Macherey-Nageli protokollit, kuid jäeti vahele filtreerimine läbi *NucleoSpin* filtri ja rDNAasi reaktsioon membraanil. RNA võeti üles 60 µl RNAasi-vabas vees.

Totaalse RNA kontsentratsioon mõõdeti Thermo Scientific *Nanodrop-1000* spektrofotomeetriga. Totaalse RNA kontsentratsioon jäi vahemikku 300 kuni 400 ng/µl. DNA mitteeesinemist RNA-s kontrolliti PCR-iga, kasutades praimereid LapA-fw ja LapA-down2 (lisa 1).

QRT-PCR-iks kasutati QIAGEN-i Rotor-Gene Q masinat ning Invitrogeni *SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®]Taq* komplekti. Reaktsioonisegu kogumahuga 10 µl sisaldas 1 x SYBR[®] Green segu, 8 pmol-i kumbagi praimerit, 10 ng RNA-d ja 0,2 µl *SuperScript[®] III/ Platinum[®]Taq* segu. Sünteesimaks cDNA-d, hoiti reaktsioonisegu 3 minutit temperatuuril 50 °C. Sellele järgnes 5-minutine kuumutamine 96 °C juures ja 40 amplifikatsioonitsükli: 15 sekundit 95 °C, 30 sekundit 62 °C ja 20 sekundit 72 °C. Pärast tsükleid hoiti proovi veel ühe minuti jooksul 40 °C juures ning viidi läbi sulamiskõvera analüüs temperatuurivahemikus 72 kuni 95 °C. Sulamiskõvera analüüs võimaldas hinnata PCR reaktsiooni spetsiifilisust. Uuritava geeni *fis* cDNA amplifitseerimiseks kasutati Fis-ku ja Fisq-new praimereid (lisa 1) ning referentsgeeni *rpoD* (PP_0387) cDNA paljundamiseks kasutati RpoDq-fw ja RpoDq-rev praimereid (lisa 1).

Standardkõvera tegemiseks kasutati kuut totaal-RNA lahjendust: 10x, 20x, 40x, 80x, 160x ja 320x. Standardkõveratest oli näha, et sõltuvus RNA kontsentratsiooni ja C_t (tsükli arv, mis kulub produkti detekteerimiseks) vahel on lineaarne. Katses kasutati 10 ng RNA-d ja katse viidi läbi neljas paralleelis kolme eraldi eraldatud RNA-ga.

Andmeid analüüsiti Rotor-Gene Q versioon 2.0.2 tarkvaraga, PCR reaktsioonide individuaalsed efektiivsused ja C_t väärtused leiti programmiga LinRegPCR versioon 11.0. *Fis*-i mRNA hulk normaliseeriti *rpoD* mRNA kohta, kasutades järgmist valemit:

$$\frac{N_{0,A}}{N_{0,B}} = \frac{E_B^{Ct,B}}{E_A^{Ct,A}} \cdot$$

N_0 on vastava amplokoni algkontsentratsioon, E on PCR reaktsiooni efektiivsus (jäab 1,8 ja 2 vahele) ning C_t on tsükli arv, mis kulub produkti detekteerimiseks. (Nõlvak jt, 2012; Ruijter jt, 2009)

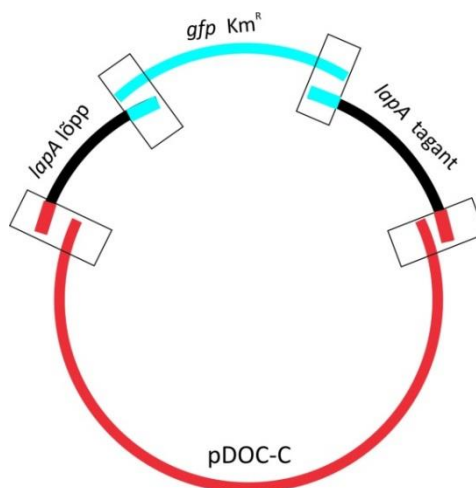
1.4.10 RACE-iga mRNA-de 5' otsa määramine

Uuritavate geenide mRNA 5' ots määrati 5' RACE-iga (*rapid amplification of cDNA ends*) vastavalt modifitseeritud Sambrooki protokollile (Sambrook ja Russel, 2001). Kasutati 1,5 µg qRT-PCR-ks eraldatud RNA-d. Esimene cDNA ahel sünteesiti Thermo Scientificu M-MuLV pöördtranskriptaasiga viie geenispetsiifilise praimeril abil: LapA-RACE1, LapF-RACE1, LapE-RACE1, LapB-RACE1 ja LapG-RACE1 (lisa 1). DNA-le lisas 5' otsa polü(A) või polü(G) saba Thermo Scientificu TdT-ga (terminaalne desoksüribonukleotidüültransferaas). Teine cDNA ahel sünteesiti Taq DNA polümeraasiga, kasutades vastavalt Adapt_pikkC või Adapt_pikkT praimerit (lisa 1), mis seonduvad vastavalt polü(G) või polü(A) sabaga cDNA ahelal. Selleks kasutati PCR masinat programmiga: 5 min 95 °C, temperatuuritõus 1 °C minutis 55 kuni 65 °C, 10 min 72 °C. cDNA amplifitseeriti Taq DNA polümeraasiga geenispetsiifiliste praimerite abil (LapA-RACE2, LapF-RACE2, LapE-RACE2, LapB-RACE2 ja LapG-RACE2) ja Adapt_lyh-iga (lisa 1). DNA puhastati etappide vahel Zymo Research *DNA Clean & Concentrator*TM-5 komplektiga. PCR produktid sekveneeriti geenispetsiifiliste praimeritega, kasutades TÛMRI sekveneerimise täisteenust.

1.4.11 LapA märkimine Gfp-ga

Konstrueeriti *lapA-gfp-Km* kassett, mis kodeerib LapA-Gfp liitvalku (joonis 5). *LapA* geeni lõpust puudub stoppkoodon ja *gfp* on *lapA*-ga samas lugemisraamis. Selleks kasutati T4 DNA polümeraasiga ligaasita kloneerimist (Jeong jt, 2012) ja ristamist. PCR reaktsioonidega amplifitseeriti kolm fragmenti: *lapA* geeni lõpp stoppkoodonita (praimeritega PP0168-10 ja PP0168-2, lisa 1); pDOC-G vektorilt (Lee jt, 2009) pärit *gfp* + *Km* (praimeritega Emgfp-5 ja Km6) ning ala *lapA* geeni tagant praimeritega PP0168-3 ja PP0168-40 (lisa 1). Vektor pDOC-C (Lee jt, 2009) lõigati *EcoRI*-ga lahti ja sellesse kloneeriti T4 DNA polümeraasi kasutades 3 fragmenti. Selleks olid praimeritele disainitud 20-21 nt-d pikad pDOC-C vektori või järgmise fragmendiga ülekattuvad otsad. Praimeril PP0168-10 on vektoriga komplementaarne ots,

PP0168-2 *gfp*-ga komplementaarne osa, PP0168-3 *Km* geeniga ning PP0168-40 vektori teise otsaga (joonis 1). Reaktsiooni pandi fragmente ja vektorit võrdsetes kogustes arvestades kontsentratsiooni. Saadud vektor pDOC-*lapA-gfp* viidi *E. coli* TG1 PIPES kompetentidesse. *E. coli* TG1 rakkudest *P. putida* kromosoomi viidi konstrukt ristamise käigus. Tulemust kontrolliti PCR-i (praimeritega Emgfp-9 ja PP0168-7, lisa 1) ja sekveneerimisega.



Joonis 5. Vektor pDOC-C ja PCR-i fragmentide skeem, mida kasutati vektori pDOC-*lapA-gfp* tegemiseks. PCR-i fragment, millega amplifitseeriti *lapA* geeni lõpp, sisaldab identset otsa pDOC-C vektoriga (punaselt) ning *gfp-Km* PCR-i fragmendiga (siniselt). PCR-i fragment, mis sisaldab DNA-d *lapA* geeni tagant, kattub samuti nii *gfp-Km* PCR fragmendiga (siniselt) kui pDOC-C vektoriga (punaselt). Kattuvad alad on esile toodud ristkülikutega.

1.4.12 Fluorestsentsi mõõtmine läbivoolutsütomeetrial

Üleöö LB-s kasvatatud rakud tsentrifugeeriti kokku (12045 g, 1 min) ja võeti üles filtreeritud M9 puhvis (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl). Proovid lahjendati filtreeritud M9 puhvis 2*10⁷ rakuni ml-is. Igast proovist analüüsiti BD Biosciences masinaga FACSAria-ga 10 000 sündmust. Gfp-d ergastati 488 nm laseriga ning igal mõõtmisel registreeriti otsehajuvus ja fluorestsentsi emissioon lainepikkusel 530 nm. Tulemusi analüüsiti programmi BD FACSDiVa versiooniga 6.3.1.

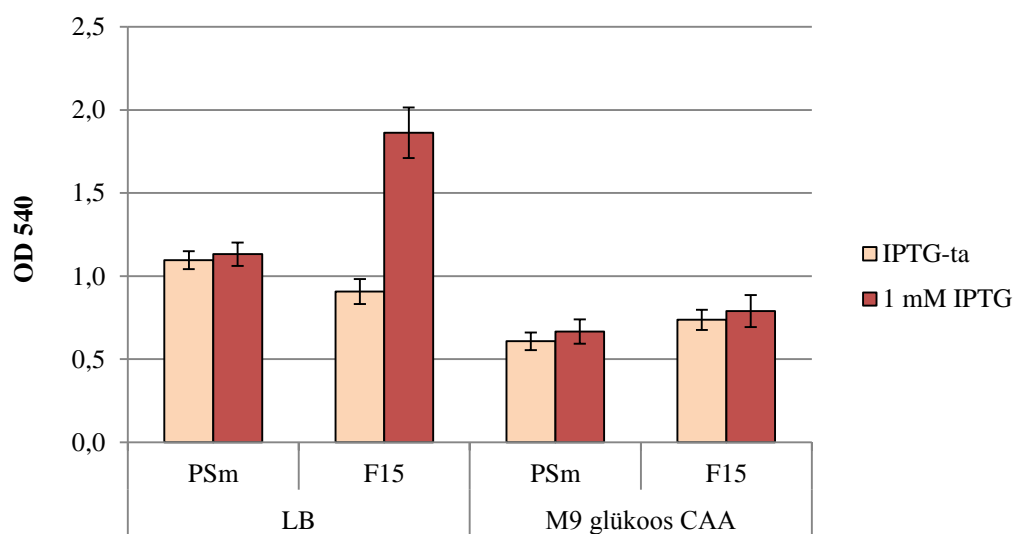
1.4.13 Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati paketti Statistica 10. Tulemusi analüüsiti multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. P-väärtused arvutati Bonferroni testiga programmis PostHoc. Joonistel on näidatud keskmised koos 95% usalduspiiridega.

1.5 Tulemused

1.5.1 Fis-i üleekspressioon ei soodusta M9 glükoos CAA söötmes biofilmi moodustumist

Minu bakalaureusetööst selgus, et Fis mõjutab *gacS*-i, globaalse biofilmi regulaatori, ekspressiooni M9 glükoos CAA söötmes, aga mitte LB söötmes (Moor, 2011). GacS/A kahekomponentsest süsteemist lähtuv signaalirada on keskne biofilmi ja liikumist reguleeriv rada ning *P. aeruginosa*'s represserib see liikumist ja soodustab biofilmi moodustumist (Gooderham ja Hancock, 2009). Sellest tulenevalt tekkis küsimus, kas Fis võimendab biofilmi teket ka M9 minimaalsöötmes. Nägemaks Fis-i mõju biofilmi moodustumisele defineeritud koostisega M9 glükoos CAA söötmes, võrreldi *P. putida* metsiktüve PSm ja Fis valku IPTG juuresolekul üleekspresseriva tüve F15 biofilmi moodustumist nimetatud söötmes.

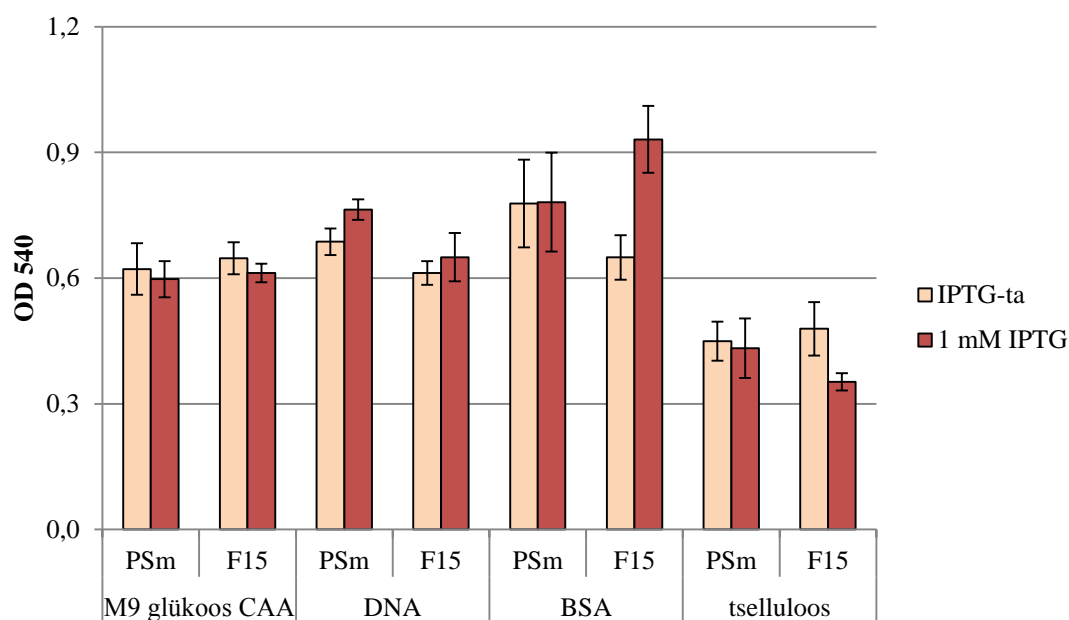


Joonis 6. *P. putida* PSm ja F15 tüvede biofilmi moodustumine 24 tunni jooksul LB ja M9 glükoos CAA söötmes. Söötmele lisati IPTG-d 1 mM lõppkontsentratsiooniga. Biofilmi moodustumist hinnati mikrotiiterplaadile kinnitunud bakterite seotud kristallvioleti hulga järgi. Kristallviolett pesti etanooliga lahusesse ning mõõdeti selle neeldumist lainepikkusel 540 nm. Esitatud on vähemalt 24 paralleeli keskmised.

Selgus, et M9 glükoos CAA söötmes Fis-i üleekspressioon ei soodusta biofilmi moodustumist ja Fis-i üleekspressiooni tingimuses moodustab F15 metsiktüvega võrreldaval hulgal biofilmi ($p = 1$; joonis 6).

1.5.2 Ekstratsellulaarne valk on vajalik Fis-i biofilmi võimendava efekti tekkimiseks

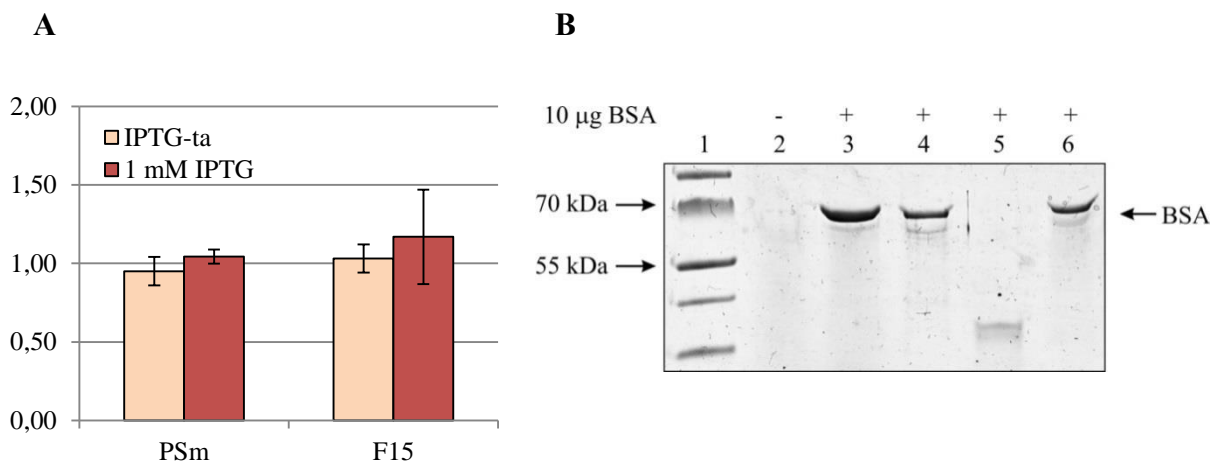
Leidmaks, milline söötme komponent soodustab või pärsib Fis-i indutseeritud biofilmi moodustumist, viidi läbi seeria biofilmi moodustumise katseid. Selleks lisati LB-sse M9 minimaalsöötme komponente või jäljendati LB komponente M9 minimaalsöötmes. M9 glükoos CAA söötmesse kuuluvad fosfaatpuhver, mikroelemendid ega glükoos ei vähenda IPTG-ga mõjutatud F15 biofilmi moodustamisvõimet lisatuna LB söötmesse (andmeid pole esitatud). Sellest tekkis küsimus, kas biofilmi moodustumist suurendava efektiga on seotud mõni LB-s leiduv makromolekul. Sellele küsimusele vastamiseks lisati M9 glükoos CAA söötmele *P. putida* DNA-d või BSA-d (veise seerumalbumiin). Lisaks, kuna meie laboris on eelnevalt uuritud Fis-i mõju odra juurele kinnitumisel, siis lisati katsesse ka taimeraku komponenti tselluloosi sisaldav LB variant.



Joonis 7. *P. putida* Fis-i üleekspresseeriva tüve F15 ja metsiktüve PSm biofilmi moodustumine 24 tunni jooksul M9 glükoos CAA söötmes koos kromosomaalse DNA-ga (38,1 mg/ml), BSA-ga (95,2 mg/ml) ja 0,2 % tselluloosiga. Esitatud on vähemalt seitsme paralleeli keskmised.

DNA ega tselluloos ei suurenda Fis-i üleekspresseeriva tüve biofilmi moodustamise võimet. Biofilmi moodustumist M9 söötmes suurendas kõikidest biopolümeeridest ainult valk. BSA lisamine suurendab PSm-i biofilmi moodustamise võimet IPTG-ta söötmes 1,14 korda ($p = 0,027$; joonis 7). IPTG-ta F15 rakkude biofilmi moodustumise võime ei muutu BSA lisamisel LB-sse, kuid IPTG-ga indutseerides suureneb F15 biofilmi moodustamine

võrreldes IPTG-ta variandiga 1,43 korda ($p < 0,001$). Samas võrreldes F15 ja PSm tüvesid IPTG lisamisel ei tule statistiliselt olulist erinevust ($p = 0,073$), kuid see võib olla tingitud vähesest katsete arvust. Kuigi BSA lisamine ei taasta täielikult LB-s nähtud Fis-i üleekspressiooni võimendavat efekti biofilmile, on selge, et ekstratsellulaarse valgu lisamine söötmesse toob esile Fis-i võimendava efekti. BSA-d ei kasutata arvatavasti söötmes lisatoitainena, kuna siis tõuseks ka IPTG-ta F15 biofilmi hulk. Söötmesse lisatud valk võiks toimida kas signaalina biofilmi moodustamiseks või biofilmi maatriksi struktuurikomponendina. Selleks, et edasi uurida ekstratsellulaarse valgu mõju biofilmi moodustumisele, kasutati biofilmi moodustumisel LB söödet, mida oli eelnevalt töödeldud proteaas K-ga. Kui Fis-i biofilmi võimendav efekt on seotud söötmes oleva valgulise komponendiga, siis peaks LB-s oleva valgu lagundamine võimendava efekti kaotama.

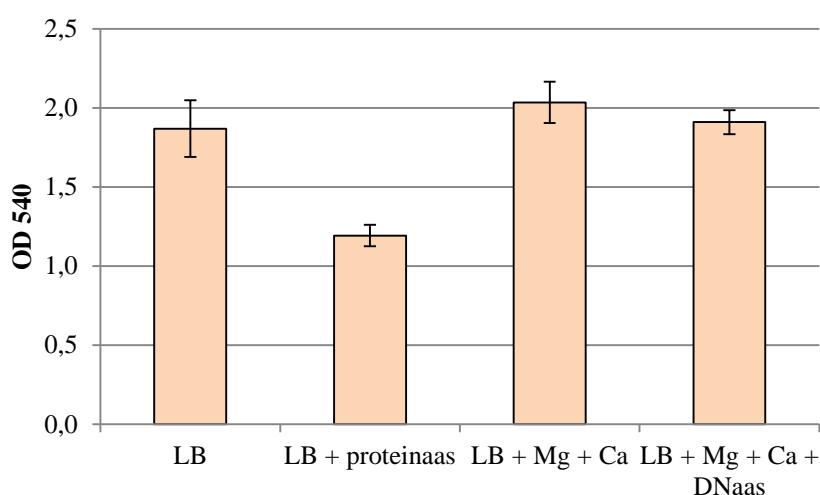


Joonis 8. A *P. putida* metsiktüve PSm ja Fis-i üleekspresseriiva tüve F15 biofilmi moodustumine 24 tunni jooksul proteaas K-ga töödeldud LB söötmes. Biofilmi moodustumist hinnati kristallvioleti hulga kaudu sarnaselt eelmistele katsetele. Esitatud on vähemalt kaheksa paralleeli keskmised. **B** Proteaas K aktiivusse hindamine BSA-ga. Geelirajad: 1. rada valgumarker #SM0671, 2. rada töötlemata LB sööde, 3. rada LB sööde + 2 µg BSA-d, 4. rada 1 µg BSA-d, 5. rada LB + 2 µg BSA-d töödeldud 24 tundi proteaas K-ga, 6. töödeldud LB söötmele, kus proteaas K on inaktiveeritud, on lisatud 2 µg BSA-d ning inkubeeritud 37 °C juures 24 tundi.

Söötme töötlemine proteaasiga metsiktüve taset ei mõjuta (joonis 6 ja joonis 8). Samas ei moodusta proteaasiga töödeldud söötmes Fis-i üleekspresseriiv tüvi võrreldes IPTG-ta F15-e ega PSm-iga statistiliselt oluliselt rohkem biofilmi ($p = 1$; joonis 8). Seega on Fis-i üleekspressiooni biofilmi soodustav efekt kadunud. See katse kinnitab, et valguline komponent söötmes on oluline, et Fis-i üleekspresseriiv tüvi saaks rohkem biofilmi moodustada.

1.5.3 Valmis biofilmi suudab lagundada proteaas, aga mitte DNAas

Bakterite biofilm võib koosneda väga erinevatest komponentidest. Näiteks sisaldab *P. aeruginosa* biofilm palju ekstratsellulaarset DNA-d ja on väga tundlik DNAasi töötlusele (Whitchurch jt, 2002). *P. aeruginosa* biofilmis on väga olulisel kohal ka eksopolüsahhariidid, mida toodetakse vähemalt 3 eri tüüpi: alginaat, Pel ja Psl (Ryder jt, 2007). *P. putida* biofilm sisaldab võrreldes *P. aeruginosa*'ga vähem polüsahhariide ja rohkem valku (Jahn, 1998). Samas *P. putida* F15 lüüsub kergemini kui PSm ja suurenenud biofilm võib olla tekkinud vabanenud DNA abil (Teppo, 2010). Uurimaks Fis-i IPTG juuresolekul üleindutseeriva tüve biofilmi koostist, töötlesime valmis biofilmi 6 tunni jooksul proteaas K-ga ja DNAas I-ga. Tsellulaasiga töötlust läbi viia ei saanud, kuna tsellulaas on aktiivne pH 5 juures ja inaktiveerub LB söötmes. Ensüümile sobiva pH-ga puhvrit ei saa antud katses kasutada, kuna madalama pH-ga puhver iseenesest põhjustab biofilmi lagunemist (andmed esitamata).



Joonis 9. IPTG-ga indutseeritud *P. putida* F15 biofilm pärast 6 tundi töötlemist proteaas K ja DNAas I-ga. DNAasi katses ja kontrollis on LB-le lisatud $MgCl_2$ ja $CaCl_2$, mis on ensüümi aktiivsuseks vajalikud. Biofilmi moodustumist hinnati kristallvioleti hulga kaudu sarnaselt eelmistele katsele. Esitatud on vähemalt 15 paralleeli keskmised.

Fis-i üleekspressiooni tõttu suurenenud biofilm sisaldab valku ja on tundlik proteaasiga töötlemisele (joonis 9). Proteaas K-ga töötlemise tulemusel väheneb biofilmi hulk 1,57 korda ($p < 0,001$). Fis-i üleekspressiooni indutseeritud biofilm ei ole tundlik DNAasi töötlusele ($p = 0,704$), mis näitab, et DNA ei ole oluliseks struktuurseks komponendiks. Järelikult võiks Fis-i üleekspressioon mõjutada valgulisi adhesiine kodeerivaid gene ega ole tõenäoliselt seotud bakterite lüüsumisel vabaneva DNA-ga.

1.5.4 Enamik transposoonmutante sisaldas insertioone *lap*-geenides

Selleks, et välja selgitada, milliseid biofilmiga seotud gene Fis reguleerib, viidi meie laboris läbi transposoonmutagenees, pommitades *P. putida* F15 rakke mini-Tn5 transposooniga. Kuna vähenenud biofilmi moodustamise järgi mutante selekteerida oleks liialt töömahukas ja kulukas, kasutati vastandfenotüüpi ja otsiti suurenenud liikumisvõimega mutante. Bakterite liikumisvõime ja biofilmi moodustumine pole täielikult vastandfenotüübid ning on võimalik, et osa biofilmi moodustumisel osalenud gene, mis on Fis-i kontrolli all, pole antud selektsiooniga võimalik tuvastada. Katses otsiti *P. putida* F15 rakkude voogamisvõime taastumist F-söötmel, kui Fis on üleekspresseeritud. Meie laboris on eelnevalt välja selgitatud, et *P. putida* tüved voogavad ainult 1 % agariga rauavaegusega F-söötmel (esitamata andmed). Lisaks oli teada, et Fis-i üleekspresseerimine pärsib *P. putida* voogamist kuni 3 korda, kui võrrelda 1 mM IPTG-ga F-söötmel kasvanud *P. putida* PSm ja F15 kolooniaid (andmed esitamata). Umbes 40 000 *P. putida* F15 kolooniast oli 155-l voogamisvõime paranenud. Neist 79-l, millel oli taastunud ka ujumisvõime, määrati mini-Tn5 insertiooni koht *P. putida* genoomis. Välja jäeti veel kolm mutanti, millel mini-Tn5 oli inserteerunud *fis*-i üleekspressiooni kasseti. Seega jäi alles 76 huvipakkuvat mutanti.

Tabel 2 *Pseudomonas putida* geenid, mille rikkumine mini-Tn5 transposooniga parandas F15 liikumisvõimet Fis-i üleekspressiooni tingimustes (Riho Terasse avaldamata andmed).

Lookus	Geeni sümbol ja funktsioon JCVI järgi	Valgu lokalisatsioon (Winsor jt, 2011a)	Mutantide arv	Ujumisvõime [±] (IPTG-ga/ IPTG-ta)
PP_0165	<i>lapD</i> ; GGDEF domeeniga valk	sisemembraan	6	0.356
PP_0166	<i>lapC</i> ; LapA-d sekreteeriv valk	sisemembraan	2	0.353
PP_0167	<i>lapB</i> ; LapA-d sekreteeriv ATP-d siduv valk	sisemembraan	3	0.356
PP_0168	<i>lapA</i> ; biofilmis osalev raku pinnaga seonduv adhesioonivalk	ekstratsellulaarne	56	0.402

Tabel 2 jätk *Pseudomonas putida* geenid, mille rikkumine mini-Tn5 transposooniga parandab F15 liikumisvõimet Fis-i üleekspressiooni tingimustes (Terase avaldamata andmed).

Lookus	Geeni sümbol ja funktsioon JCVI järgi	Valgu lokalisatsioon (Winsor jt, 2011a)	Mutante arv	Ujumisvõime [±] (IPTG-ga/ IPTG-ta)
PP_0222	DszA perekonna monooksügenaas	tsütoplasma	1	0.899
PP_1228	signaaliülekanaja kemotaksises	sisemembraan	1	0.374
PP_1387	<i>ttgR</i> ; transkriptsiooni regulaator	tsütoplasma	1	0.391
PP_1490	CheR-i sarnane metüültransferaas	tsütoplasma	1	0.434
PP_2413	GGDEF perekonna valk	sisemembraan	1	0.558
PP_4124	<i>nuoG</i> ; NADH dehüdrogenaas I G-subühik	teadmata	1	0.470
PP_4373	<i>fleQ</i> ; transkriptsiooni regulaator FleQ	tsütoplasma	1	0.334
PP_4519	<i>lapE</i> ; LapA-d läbi välismembraani sekreteeriv valk	välismembraan	1	0.437
PP_5050 ja PP_5051 vahel	intergeenne regioon	-	1	0.313

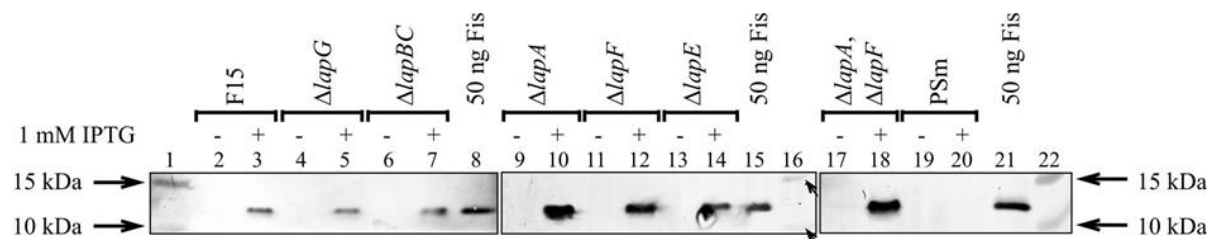
[±] Ujumisvõime hindamiseks kasvatati transposoonmutante paralleelselt 1 mM IPTG-ga ja IPTG-ta 0,3 % agariga LB söötmes ning mõõdetud halo diameetreid võrreldi omavahel. Tabelis on toodud mutandi ujumine IPTG-ga agaris normaliseeritud IPTG-ta saadud tulemuse vastu. F15 on see suhe 0,298. Edasiseks testimiseks keskenduti *lap*-geenidele, kuna need moodustasid väljavalitud mutantidest enamiku (90 %).

Kõige rohkem insertioone oli tekkinud *P. fluorescens*-i *lapA*-ga homoloogsesse geeni PP_0168 (tabel 2), mis kodeerib suurt biofilmi moodustumisel osalevat adhesiini (Hinsa jt, 2003) ja mida hiljutistes artiklites nimetatakse ka lihtsalt LapA-ks (Duque jt, 2013). Palju

insertsioone on tekkinud ka LapD homoloogi geeni, mis on LapG-d siduv retseptor ja selle ülesandeks on takistada LapG-l LapA-d raku pinnalt lahti lõigata. Kirjanduse järgi peaks *lapD* mutant metsiktüvest vähem biofilmi moodustuma (Boyd jt, 2012; Navarro jt, 2011). Mitu insertsiooni on tekkinud ka *lapB* ja *lapC* geenidesse ja üks *lapE* geeni, millelt sünteesitud valgud moodustavad ABC-transporteri, mis transpordib LapA raku pinnale (Hinsa jt, 2003).

1.5.5 Fis on üleekspresseeritud kõigis *lap*-deletantides

Selleks, et välja selgitada, kas Fis mõjutab biofilmi moodustumist Lap-süsteemi kaudu, valmistati meie laboris F15 ja PSm tüvedest *lap*-geenide deletandid (Annika Teppo avaldamata andmed). Lisaks *lapA*-le, *lapB*-le, *lapC*-le ja *lapE*-le, mis tulid välja transposoonmutageneesiga, otsustati uurida ka *lapF*-i, *lapD*-d ja *lapG*-d. *LapD*-d aga ei õnnestunud kohe deleteerida ning seetõttu jäi see katsetest välja. *LapF* geen valiti katsetesse kuna kirjandusest on teada, et LapF on nagu LapA-gi suur adhesioonivalk (Martinez-Gil jt, 2010). *Western blot* meetodit kasutades kontrolliti ega *lap*-geenide deleteerimise käigus pole Fis-i üleekspressioonikassett inaktiveerunud.

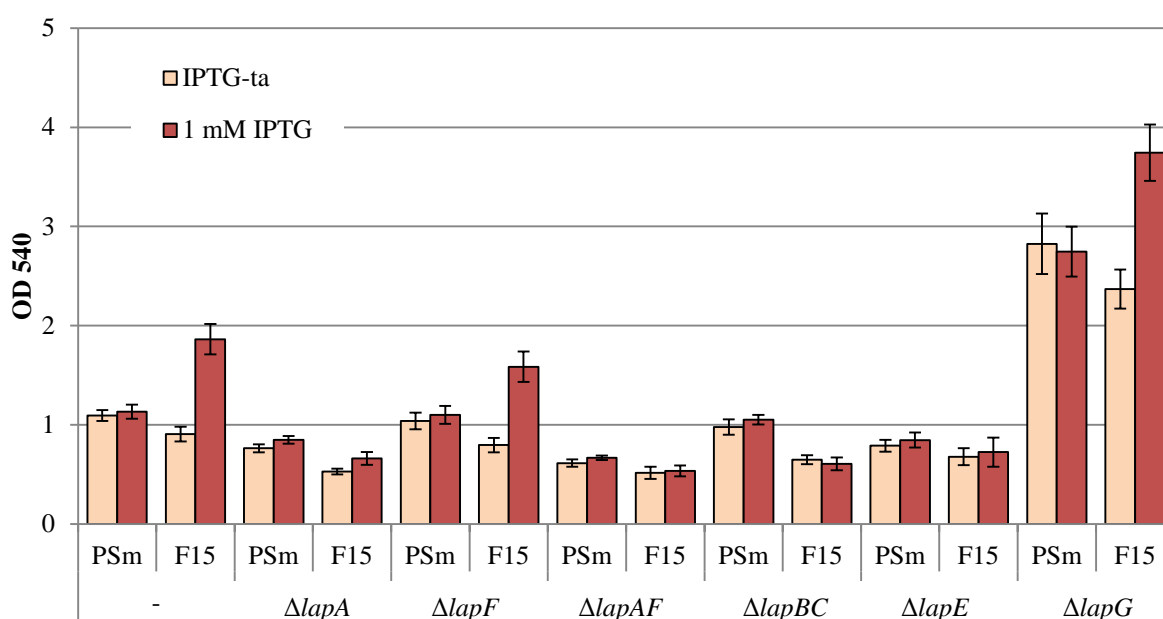


Joonis 10. *P. putida* Fis-i vastase antikehaga *Western blot* *P. putida* LB vedelsöötmes 18 tundi kasvanud rakkude lüsaatidest. Vaadati biofilmi moodustumise katses kasutatud F15 taustaga deletante, kontrolliks kasutati PSm-i ja 50 ng puhastatud Fis-i. IPTG-ta variandid on märgitud miinusega ja 1 mM IPTG-ga variandid plussiga. Geelile kanti igast lüsaadist 30 µg totaalvalku. *P. putida* Fis-i vastast antikeha kasutati suhtes 1: 400 reaktsioonisegu mahust ning sekundaarset antikeha, aluselise fosfaasiga seotud *Goat anti-mouse* IgG-d, 1:5000. Ilmutati NBT ja BCIP-iga.

Kõigis kontrollitud *lap*-geenide deletantides oli Fis-i üleekspressioon säilinud. 18 tundi kasvanud IPTG-ga indutseeritud F15 rakud ekspresseerivad Fis-i tugevalt üle, kuid IPTG-ta kasvatatud F15 rakkudes ja PSm-is on Fis-i alla detekteerimispiiri.

1.5.6 *LapA* deleteerimine kaotab Fis-i üleekspressiooni biofilmi moodustumist võimendava efekti, kuid *lapF*-i deletsioon mitte

Geeni *lapA* deleteerimisel langeb biofilmi moodustumist PSm-is 1,43 korda ($p < 0,01$; joonis 11) ja F15-s 1,71 korda ($p < 0,001$). Lisaks kaotab *lapA* deleteerimine Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendava efekti: Fis-i üleekspressiooni tüve biofilm väheneb *lapA* deleteerimisel 2,82 korda ($p < 0,001$). See võiks näidata, et Fis-i üleekspressiooni mõju biofilmi moodustamisele käib LapA kaudu. Nii *P. putida* PSm-i kui F15 *lapF*-i deletsiooniga tüved käitusid sarnaselt algsele tüvele, millest deletant tehti (joonis 11). Samas kui tüvede *lapAlapF* topeltmutandid on *lapA* deletsiooni fenotüübiga.



Joonis 11. *P. putida* tüvede F15 ja PSm ning nende põhjal tehtud *lap*-deletantide biofilmi moodustamine 24 tunni jooksul LB söötmes. Kriipsuga on tähistatud algse tüve, millel pole gene deleteeritud.

F15 *lapE* ja *lapBC* deletandid on sarnased *lapA* deletandi fenotüübile, mis on kooskõlas kirjanduse andmetega (joonis 11), mille kohaselt vastutavad nemad LapA raku pinnale transportimise eest (Hinsa jt, 2003). PSm *lapBC* deletant paistab vastupidisel oodatule moodustavat rohkem biofilmi kui F15 taustaga deletant: IPTG-ta 1,5 korda ($p = 1$) ja IPTG-ga 1,73 korda rohkem ($p = 0,11$), kuid PSm-i ja F15 deletantide vahel statistiliselt olulisi erinevusi pole. *P. putida* F15 *lapG* deletant moodustab võrreldes algse F15 tüvega juba IPTG-d lisamata 2,61 korda rohkem biofilmi, lisaks on näha ka Fis-i üleekspressiooni soodustav mõju: IPTG lisamisel suureneb F15 *ΔlapG* biofilm veel 1,58 korda ($p < 0,001$). Kuna LapG

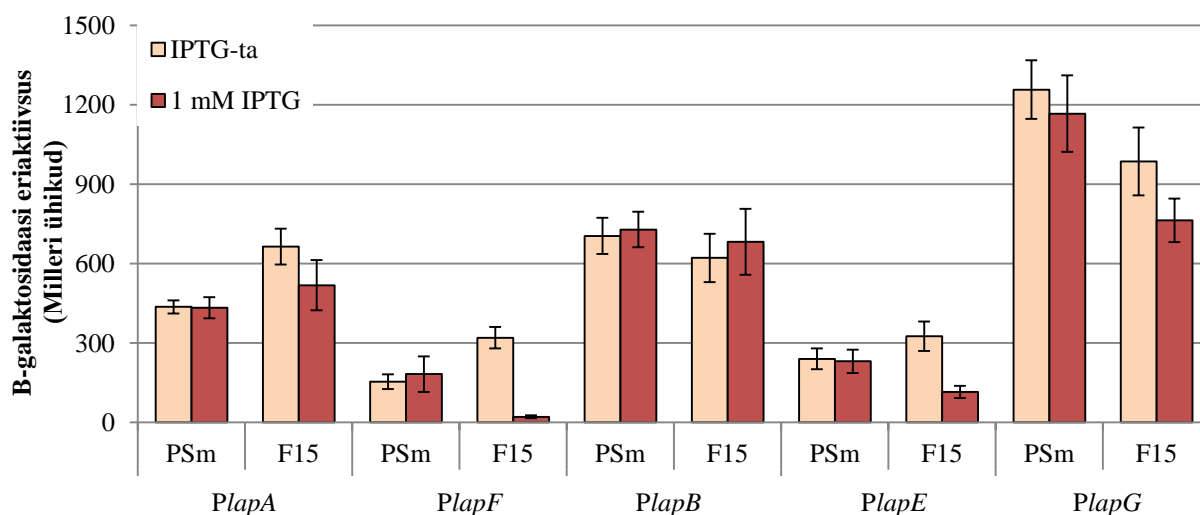
vabastab LapA proteolüüsiga välismembraanist, siis Fis-i üleekspressiooniga suurenenud *P. putida* F15 $\Delta lapG$ biofilm annab tunnistust, et Fis-i üleekspressiooniga on suurenenud LapA hulk välismembraanis.

1.5.7 Fis-i üleekspressiooni tüves on ka IPTG-ta indutseerimata rohkem Fis-i mRNA-d

Varasematest katsetest oli teada, et *fis*-i üleekspressioonikassetis kasutatud *Ptac* promootor võib lekkida, kuna LacI-ga vahendatud repressioon ei ole IPTG puudumisel absoluutne. Seega mõõdeti qRT-PCR-ga *P. putida* PSm ja F15 tüvedest *fis* geeni mRNA hulka *P. putida* referentsgeeni *rpoD* mRNA suhtes. Kolmel erineval RNA eraldusel saadi, et *fis*-i mRNA-d on IPTG-ta F15-s 11,22; 2,49 ja 4,30 korda rohkem kui PSm-is. Seega on F15-s keskmiselt 4,68 korda rohkem *fis*-i mRNA-d kui PSm-is ($p < 0,001$). Sellest tulenevalt võib käsitleda IPTG-ta F15 varianti kui vähese Fis-i üleekspressiooniga tüve.

1.5.8 Fis reguleerib *lap*-geenide transkriptsiooni

Uurimaks, kas Fis mõjutab *lap*-geenide transkriptsiooni, kloonitati *lapA*, *lapF*-i, *lapE*, *lapB* ja *lapG* promootorala *lacZ* testgeeni ette ja hinnati transkriptsiooni aktiivsust testvalgu β -galaktosidaasi eriaktiivsuse järgi.



Joonis 12. B-galaktosidaasi eriaktiivsus mõõdetuna 18 tundi LB-s kasvanud *P. putida* PSm ja F15 rakkudest, mis sisaldavad pBLKT plasmidi kloonituna *lapA*, *lapF*-i, *lapE*, *lapB* või *lapG* promootorala.

IPTG lisamine ei mõjuta *P. putida* PSm-i väärtusi, mis näitab, et IPTG-l pole rakkudele iseseisvat mõju ($p = 1$; joonis 12). Fis suurendab *lapA* transkriptsiooni vähese Fis-i

üleekspressiooni korral (IPTG-ta variant) 1,52 korda võrreldes metsiktüvega ($p < 0,001$), kuid IPTG-ga indutseerides on *lapA* transkriptsioon F15-s võrreldav PSm-iga ($p = 1$). *LapB* promootoralalt lähtuvat transkriptsiooni Fis ei mõjuta: IPTG-ta PSm-is ja F15-s ($p = 1$) ning 1 mM IPTG-ga PSm-is ja F15-s transkribeeritakse *lapB*-d võrreldavalt ($p = 1$).

LapF-i transkriptsioonile on Fis-il kahetine mõju: IPTG-ta F15-s on *lapF*-i transkriptsioon võrreldes metsiktüvega tõusnud 2,08 korda ($p = 0,027$) ning IPTG-ga indutseerides on *lapF*-i transkriptsioon võrreldes IPTG-ga metsiktüvega represseritud 8,78 korda ($p = 0,03$). *LapE*-le paistab Fis-il samuti kahetine efekt olema, kuid kui võrrelda IPTG-ta metsiktüve Fis-i natuke üleekspresseriva tüvega ($p = 1$) ning IPTG-ga metsiktüve tugevalt Fis-i üleekspresseriva tüvega ($p = 0,66$) siis pole erinevused statistiliselt olulised. *LapG* transkriptsiooni represserib Fis vähese üleekspressiooni korral 1,28 korda ($p < 0,001$) ja tugeva ülehulga korral 1,53 korda ($p < 0,001$). Fis ei reguleeri *lapB* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni, aga mõjutab *lapA*, *lapF*-i ja *lapG* transkriptsiooni ning tõenäoliselt ka *lapE* transkriptsiooni.

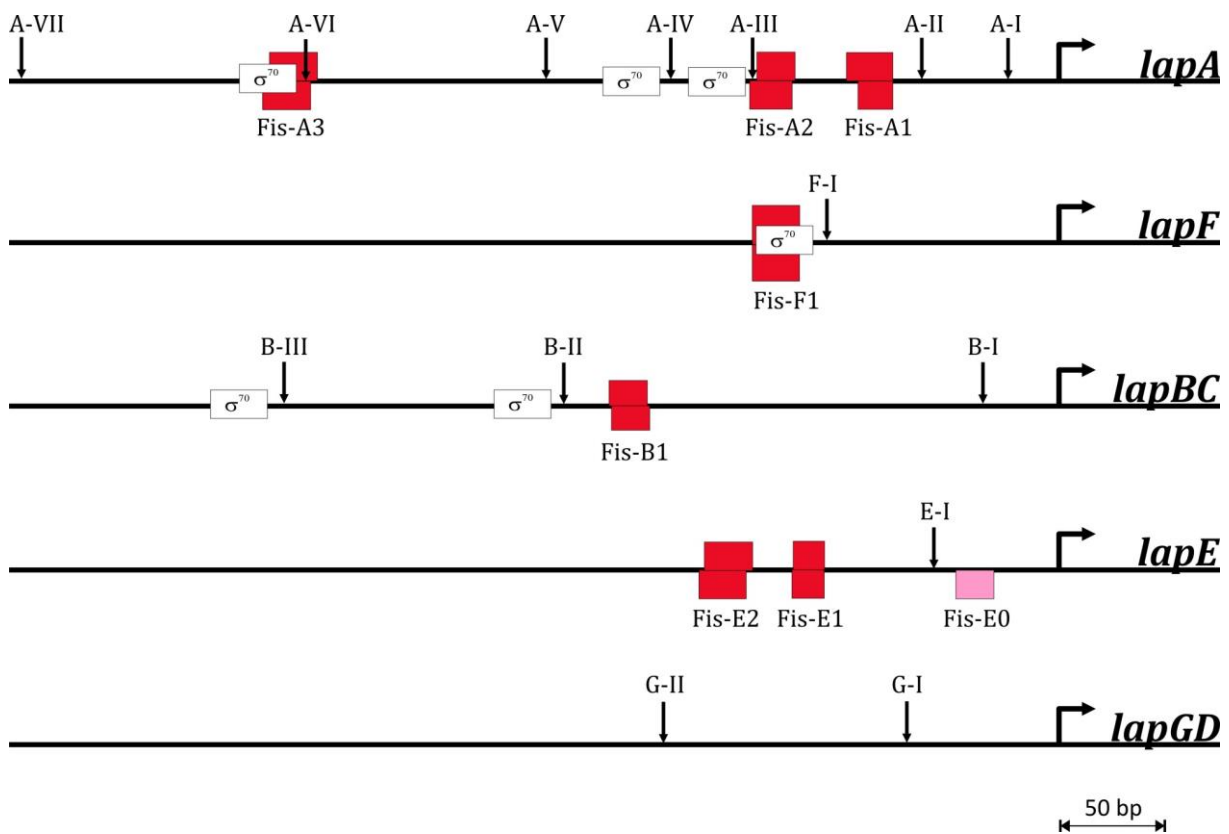
1.5.9 Leiti uuritavate *lap*-geenide mRNA 5' otsad ja Fis-i seondumine *lap* geenide promootorpiirkonda

Selleks, et täpsemalt uurida Fis-i mõju *lap*-geenidele, määrati 5' RACE-iga *lapA*, *lapF*-i, *lapE*, *lapB* ja *lapG* mRNA-de 5' otsad, mis võiksid kattuda transkriptsiooni alguskohtadega (lisad 2-5). Paralleelselt määrati DNaaS I *footprint* meetodiga meie laboris Fis-i seondumine *lap*-geenide ette (Andrio Lahesaare avaldamata andmed), mis on joonistele märgitud lisades 2-5 ja skemaatiliselt kujutatud joonisel 13.

LapA geeni ees on seitse transkriptsiooni alguspunkt: A-I kuni A-VII positsioonides -27, -71, -158, -200, -262, -387/8 ning -532 geeni alguse suhtes (lisa 2, joonis 13). *LapF* geeni ees on üks transkriptsiooni algussait positsioonis -130 (lisa 3, joonis 13). Transportsüsteemi geenil *lapE* on samuti üks transkriptsiooni alguskoht positsioonis -65 (lisa 4, joonis 13). Teiste transportsüsteemi geenide *lapBC* ühise promootori ees on kolm transkriptsiooni alguspunkti: B-I kuni B-III positsioonides -39, -245 ja -438 (lisa 2, joonis 13). Proteaasi geenil *lapG* on kaks alguspunkti -79 ja -204 (lisa 5, joonis 13).

Andrio Lahesaare määras DNaaS I *footprint* meetodiga uuritavate *lap*-geenide ette kokku kaheksa Fis-i seondumisjärjestust, millest seitse kattusid mõlemal ahelal (lisa 2 kuni lisa 5). Mõlemal ahelal kattuvad järjestused on kooskõlas *E. coli*'s saadud andmetega, kus on

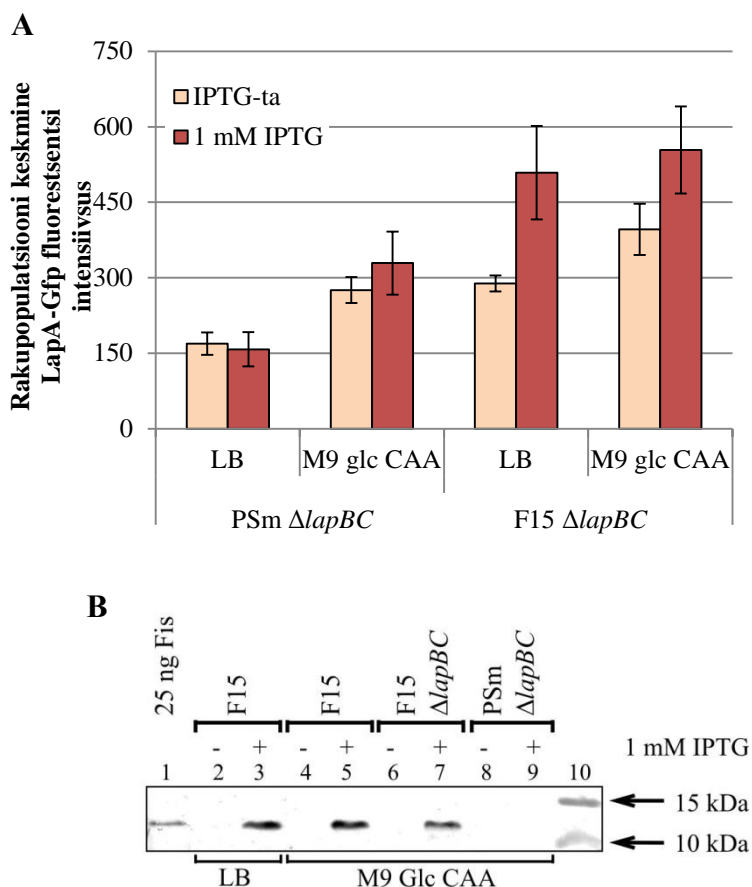
näidatud, et Fis seob palindroomset järjestus (Shao jt, 2008). *LapA* geeni ette seondub Fis kolmes kohas: Fis-A1 kodeerival ahelal positsioonides -110 kuni -86 ja matriitsahelal -104 kuni -87 nt-d geeni algusest, Fis-A2 kodeerival -56 kuni -136 ja matriitsil -160 kuni -138 ning Fis-A3 kodeerival -406 kuni -381 ja matriitsil -409 kuni -385 nt-d *lapA* algusest. *LapF*-i protoororalal on üks Fis-i seondumisjärjestus, mis katab kodeerivat ahelat positsioonides -150 kuni -132 ja matriitsahelat positsioonides -158 kuni -132 geeni algusest. *LapE* promootoralal on kolm Fis-i seondumiskohta. Neist üks, Fis-E0, on hüpoteetiline seondumisjärjestus, mis katab matriitsahelat -53 kuni -33 nt-d geeni algusest. Teised kaks seondumisjärjestust katavad mõlemat ahelat: Fis-E1 positsioonides -119 kuni -136 kodeerival ahelal ning -120 kuni -137 matriitsil ning Fis-E2 positsioonides -182 kuni -157 kodeerival ahelal ning -185 kuni -160 matriitsil. *LapB* ees olev seondumisjärjestus on kodeerival ahelal -231 kuni -212 nt-d ja matriitsahelal -232 kuni -213 nt-d *lapB* geeni algusest. *LapG* promootoralale Fis ei seondu.



Joonis 13. *Lap*-geenide promootoralad koos ennustatud promootorite, mRNA 5' otsadega ning Fis-i seondumiskohtadega. Nooltega on märgitud mRNA 5' otsad, kõvernooltega geenide algused, punaste kastidega Fis-i seondumiskohad, roosa kastiga võimalik seondumiskoht ning valgete kastidega ennustatud σ^{70} – tüüpi promootorid.

1.5.10 Fis suurendab LapA hulka rakus

Kuna eelmistest katsetest selgus, et Fis-i mõju *lap*-geenide transkriptsioonile ei kirjelda üheselt mõju biofilmi fenotüübile, siis märgiti LapA Gfp-ga ja uuriti läbivoolutsütomeetrigaiga Fis-i mõju LapA hulgale transpordisüsteemi deletandis ($\Delta lapBC$), kus kogu ekspresseeritud LapA jääb rakku.



Joonis 14. A LapA hulk, mõõdetuna Gfp fluorestsentsina, 18 tundi LB või M9 glükoos CAA vedelsöötmes kasvanud *P. putida* tüvede PSm ja F15 rakkudes, mille LapA oli Gfp-ga märgitud. Gfp-d ergastati 488 nm laseriga ning fluorestsentsi emissiooni mõõdeti lainepikkusel 530 nm, saadud väärtusest arvutati maha tüvede natiivne emissioon samal lainepikkusel. Esitatud on 12 paralleeli keskmised. **B** Western blot analüüs M9 glükoos CAA söötmes 28 tundi kasvanud rakkude lüsaatidele ning võrdluseks 25 ng puhastatud Fis valku. Western blot analüüs viidi läbi sarnaselt eelmisele korrale.

Sarnaselt LB-s kasvanud rakkudele (joonis 10 rada 19 ja 20) pole ka M9 minimaalsöötmes metsiktüves PSm toodetud Fis Western blot'iga detekteeritav (joonis 14 rada 8 ja 9). Sarnaselt LB-le saab M9 söötmes Fis-i F15-s ja sellest tehtud deletandis IPTG-ga üle ekspresseerida. Seega toimub Fis-i üleekspressioon LB-s ja M9-s sarnaselt.

LB ja M9 söötmes ei ole metsiktüves toodetav LapA hulk sama: IPTG-ta M9 söötmes toodetakse 1,63 korda rohkem LapA-d kui LB söötmes (joonis 14). IPTG ei mõjuta kummaski söötmes PSm tüve LapA hulka, mis näitab, et IPTG-l pole rakkudele iseseisvat mõju ($p = 1$). Nii LB kui M9 minimaalsöötmes on juba IPTG-ta F15-s, kus on vähene Fis-i üleekspressiooni, rohkem LapA-d kui IPTG-ta metsiktüves: LB-s 1,71 korda rohkem ($p = 0,037$) ja M9 glükoos CAA-s 1,44 korda rohkem ($p = 0,034$). Suure Fis-i üleekspressiooni korral on rakkudes veelgi rohkem LapA-d: LB-s võrreldes IPTG-ga metsiktüvega 3,22 korda rohkem ($p < 0,001$) ja M9 minimaalsöötmes 1,68 korda võrreldes IPTG-ga metsiktüvega ($p < 0,001$). Seega soodustab Fis LapA ekspressiooni.

1.6 Arutelu

Bakterite biofilmi moodustumist uuritakse üha põhjalikumalt, sest biofilm mõjutab inimkonna heaolu, põhjustades miljarditesse eurodesse ulatuvaid kahjusid tööstuses, meditsiinis ja põllumajanduses. Samas on mitmed biofilmi moodustavad bakterid põllumajanduses seisukohast väga kasulikud. Näiteks, taime juuri koloniseerivad bakterid on võimelised soodustama taimede kasvu ning kaitsma neid patogeenide eest just tänu biofilmi moodustamisele taime juurtel (Bais jt, 2004; Timmusk jt, 2005). Üheks selliseks näiteks võib tuua *Pseudomonas putida*, mis koloniseerib paljude põllumajanduslike taimede juurestikku (Espinosa-Urgel jt, 2000; Espinosa-Urgel jt, 2002) ning kaitseb taime stressi (Glick jt, 2007) ja mitmete erinevate patogeenide eest (Aksoy ja Yilmaz, 2008; Gamalero jt, 2010; Paulitz, 1991).

Biofilmi moodustumine on keerukas mitmest signaalirajast sõltuv protsess. Biofilmi moodustumist reguleerivad globaalsed regulaatorid, mis võivad korraga muuta paljude geenide ekspressiooni ning olla bakterirühmiti erinevad (O'Toole jt, 2000). Meie laboris on eelnevalt kindlaks tehtud, et globaalne regulaator Fis soodustab üleekspressiooni korral *P. putida* rakkudes biofilmi moodustumist (Jakovleva jt, 2012). Samas, seni polnud teada, milliste geenide kaudu võiks *P. putida* Fis biofilmi moodustumist reguleerida. Tulemus oli intrigeeriv, sest Fis-i ja biofilmi seoseid on siiani kirjeldatud vaid põgusalt. Kirjandusest on leida ainult neli uurimistööd, millest kolmes vaadeldi Fis-i mõju biofilmile sugukonna *Enterobacteriaceae* liikides (Lenz ja Bassler, 2007; Saldana jt, 2009; Sheikh jt, 2001) ja ühel juhul taimepatogeenis *Dickeya dadantii*. Sheikh jt (2001) ning Lenz jt (2007) avaldatud andmed, kus nähti, et Fis reguleerib biofilmi positiivselt, on üllatavad. Tavaliselt on Fis enterobakterites kiire kasvu globaalseks regulaatoriks (Ball jt, 1992), kuid biofilmis on bakterite kasv aeglustunud (Donlan, 2002). Nimetatud töödes oli Fis-i positiivne mõju otsene, aktiveerides enteroagregatiivse *E. coli* biofilmi moodustumiseks vajalike piili geenide transkriptsiooni (Sheikh jt., 2001), või kaudne, *V. cholerae*'s inaktiveeris Fis väikeste RNA-de kaudu biofilmi repressorit (Lenz ja Bassler, 2007; Sheikh jt, 2001). *E. coli* enteropatogeenses tüves E2348/69 Fis aga represserib biofilmi moodustumist, represserides adhesiivsete piilide *curli*'de põhilise subühiku geeni ekspressiooni (Saldana jt, 2009). Taimepatogeenis *Dickeya dadantii*'s Fis samuti represserib biofilmi moodustumist, inhibeerides tselluloosi operoni transkriptsiooni (Prigent-Combaret jt, 2012). Käesolevas töös uuriti, milliste geenide kaudu reguleerib Fis biofilmi moodustumist *P. putida*'s ning millised keskkonna signaalid on olulise Fis-i mõju avaldumiseks.

Selleks, et leida geene, mille kaudu Fis reguleerib biofilmi moodustumist, viidi läbi transposoonmutagenees mini-Tn5-ga (tabel 2; Riho Teras avaldamata andmed). Kõige rohkem minitransposooni insertioone (56 insertiooni 76-st) oli tekkinud pinnaadhesiini *lapA* geeni ja mitmeid insertioone oli ka teistes *lap*-geenides nagu transportsüsteemi geenides *lapB*, *lapC* ja *lapE* ning c-di-GMP retseptori geenis *lapD*. Kuna enamik transposoonmutantidest sisaldasid insertioone *lap*-geenides, siis käesolevas töös pöörati tähelepanu just nendele geenidele. *P. putida* metsiktüvest (PSm) ja Fis-i üleekspressiooniga tüvest (F15) tehti *knock-out* mutandid $\Delta lapA$, $\Delta lapF$, $\Delta lapE$, $\Delta lapBC$, $\Delta lapG$ ja $\Delta lapAlapF$ (Annika Teppo avaldamata andmed) ning mõõdeti nende biofilmi moodustumise võimet LB söötmes (joonis 11). Sarnaselt *P. fluorescens*'is saadud tulemustega (Hinsa jt, 2003) langetab *lapA* deleteerimine metsiktüves oluliselt biofilmi moodustumist. *LapF*-i deleteerimine biofilmi moodustumist ei vähenda, mis on samuti kooskõlas varasemate *P. putida*'s tehtud katsete tulemustega, kus näidati, et *lapF*-i deletsiooniga bakteritel täissöötmes biofilmi moodustumine ei vähene, kuid efekt esineb siiski minimaalsöötmes või läbivoolukultuuris (Espinosa-Urgel jt, 2000; Martinez-Gil jt, 2010).

Järgnevalt hinnati *lap*-geenide deletsiooni mõju biofilmi moodustumisele Fis-i üleekspressiooni korral. *P. putida* kromosoomist *lapA* deleteerimine kaotab Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendava efekti (joonis 11). See näitab, et Fis-i mõju biofilmile käib LapA kaudu, kuid kuna LapA rakupinnale viimine ja seal hoidmine on biofilmi moodustumise viimane etapp, siis tekib küsimus, kas Fis mõjutab LapA hulka otseselt *lapA* transkriptsiooni kaudu või kaudselt. Fis-i positiivset mõju LapA ekspressioonile kinnitab ka $\Delta lapG$ tüve biofilmi moodustumine. *LapG* deleteerimisel tõuseb *P. putida* biofilmi hulk drastiliselt, mis on ka ootuspärane, kuna LapG on LapA-d raku pinnalt lahti lõikav proteaas (Newell jt, 2011a). Samas jääb ikkagi alles Fis-i tugeva üleekspressiooni biofilmi soodustav efekt (joonis 11). Seega, kui *lapG* on puudu, tõuseb LapA hulk *P. putida* Fis-i tugevalt üleekspresserivas tüves kahel põhjusel: LapA-d ei lõigata raku pinnalt ära ning Fis suurendab LapA hulka. LapA märkimisel Gfp-ga näeme, et Fis tõstab LapA hulka rakus (mõõdetud transpordimutandis $\Delta lapBC$) tugeva üleekspressiooni korral 3,22 korda (joonis 14). See kinnitab, et Fis suurendab biofilmi teket LapA hulka muutes.

Selgitamaks välja, kas Fis mõjutab *lapA*-d ja teisi *lap*-geene kaudselt või otseselt transkriptsiooni reguleerides, tehti järgmised katsed. Mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsust, et hinnata Fis-i mõju promootori ekspressioonile. Määrati Fis-i seondumiskohad DNA-s I

footprint meetodiga (Andrio Lahesaare avaldamata andmed), kuna selleks, et Fis saaks otseselt geenide regulatsiooni mõjutada, peab see promootoralaga seonduma.

LapA promootorala kloneerimisel testgeeni *lacZ* ette, nägime et Fis mõjutab *lapA* ekspressiooni ainult vähese üleekspressiooni korral, kui söötmesse pole IPTG-d lisatud. Fis-i vähene üleekspressioon suurendab *lapA* transkriptsiooni 1,52 korda (joonis 12). Kuna promootoralalt leiti *footprint* analüüsiga kolm DNA piirkonda, kuhu Fis seondub, siis on alust arvata, et Fis mõjutab *lapA* ekspressiooni otseselt (joonis 13, lisa 2). IPTG lisamisel söötmesse langes *lapA* promootorilt lähtuv transkriptsioon metsiktüvega võrreldavale tasemele, mis viitab, et *lapA* transkriptsioon on keerukamalt reguleeritud (joonis 12). Arvatavasti osaleb *lapA* transkriptsiooni reguleerimisel veel valke, mis võivad olla Fis-ist sõltuva ekspressiooniga. Kuna *LapA* on *P. putida* biofilmi moodustumiseks keskse tähtsusega, siis on mitmete regulaatorite osalemine geeni ekspressiooni regulatsioonis ootuspärane. Sellest lähtuvalt ei muteeritud promootoralas Fis-i seondumisjärjestusi ega uuritud muteeritud alalt transkriptsiooni regulatsiooni, kuna DNA muteerimine võib muuta seni tundmatute regulaatorite seondumist promootoralale. *LapA* keerukast ekspressiooni regulatsioonist annab tunnistust ka *lapA* geeni taha, samasse lugemisraami, *gfp* geeni kloneerimine. FACS-iga fluorestsentsi mõõtmisel saadi, et Fis-i ja *LapA* hulk rakus on võrdelises seoses (joonis 14). Kui suureneb Fis-i hulk suureneb ka *LapA*-*Gfp* hulk rakus, mis viitab posttranskriptsioonilisele regulatsioonile.

Fis seondub kolmele DNA lõigule *lapA* geeni eelsel alal (joonis 13, lisa 2): kattes ühe ennustatud promootori -10 heksameeri (Fis-A3), promootoritest geeni poole (Fis-A2) ja kohe A-II transkriptsiooni alguspunkti järele (Fis-A1). Fis-A3 seondumisjärjestus on tõenäoliselt represseriva mõjuga promootorile, millega ta kattub, kuid teisi võib ta aktiveerida. Fis-A2 ja Fis-A3 mõju on raske ennustada, need võivad olenevalt DNA konformatsioonist transkriptsiooni nii aktiveerida kui represserida.

Geeni *lapA* transkriptsiooni kompleksust näitab veel ka *lapA* mRNA seitsme 5' otsa leidmine (joonis 13, lisa 2). Tõenäoliselt on *lapA* geenil mitu promootorit, millelt reguleeritakse transkriptsiooni erinevates kasvutingimustes ning on tõenäoline, et lisaks Fis-le seondub *lapA* promootoralaga veel regulaatorvalke ning toimub kooperatiivne või antagonistlik regulatsioon.

Kuna tehti kindlaks kolm piirkonda, kuhu Fis *lapA* geeni ees seondub, siis tegelik mõju *lapA* transkriptsioonile on vaja edaspidi täpsustada. Selliste järjestike seondumisalade

olemasolul, on oluline Fis-i seondumisafiinsus ning DNA konkreetne konfirmatsioon, mis tekib Fis-i seondumisel ühte, kahte või kolme kohta. Erineva afiinsusega järjestuste olemasolul täituvad DNA järjestused Fis-i kontsentratsioonist sõltuvalt, mis võib viia osade promootorite repressioonile, kuid teiste aktivatsioonile. DNA konformatsiooni muutumisel võivad promootorid olla RNA polümeraasile paremini või halvemini eksponeeritud ning transkriptsioon võib muutuda otseselt promootorile seondumata.

Teise suure adhesiini geeni *lapF*-i transkriptsiooni Fis pigem represserib, kuid vähese üleekspressiooni korral on arvatavasti kaudne positiivne mõju (joonis 12). *LapF* geeni ees olev Fis-i seondumiskoht kattub ennustatud promootori -10 heksameeriga ning tõenäoliselt takistab RNA polümeraasi promootorile seondumist ja seeläbi represserib geeni ekspressiooni (joonis 13, lisa 3). Biofilmi moodustumise katsest on näha, et *lapF*-i deleteerimisel ei kao Fis-i üleekspressiooni soodustav efekt biofilmi moodustumisele (joonis 11). Seega ei käi Fis-i soodustav mõju biofilmile LB-s *LapF*-i kaudu.

LapB transkriptsiooni Fis uuritud tingimustes ei mõjuta, olgugi et *lapB* ees tehti kindlaks Fis-i seondumiskoht Fis-B1, mis ei kattu võimalike promootoritega (joonis 12, joonis 13, lisa 2). Geeni *lapB* mRNA-l tehti kindlaks kolm 5' otsa (joonis 13, lisa 2), mis näitab omakorda, et ka *LapA* transpordisüsteem on tõenäoliselt komplekselt reguleeritud. Kuna Fis ei mõjutanud β -galaktosidaasi eriaktiivsust, kui testgeeni ette oli kloonitud *lapB* promootorala (joonis 12), siis on tõenäoline, et Fis mõjutab mõne teise transkriptsiooni-regulaatori seondumist antud promootoralale, mida antud katsetingimustes rakus ei ole.

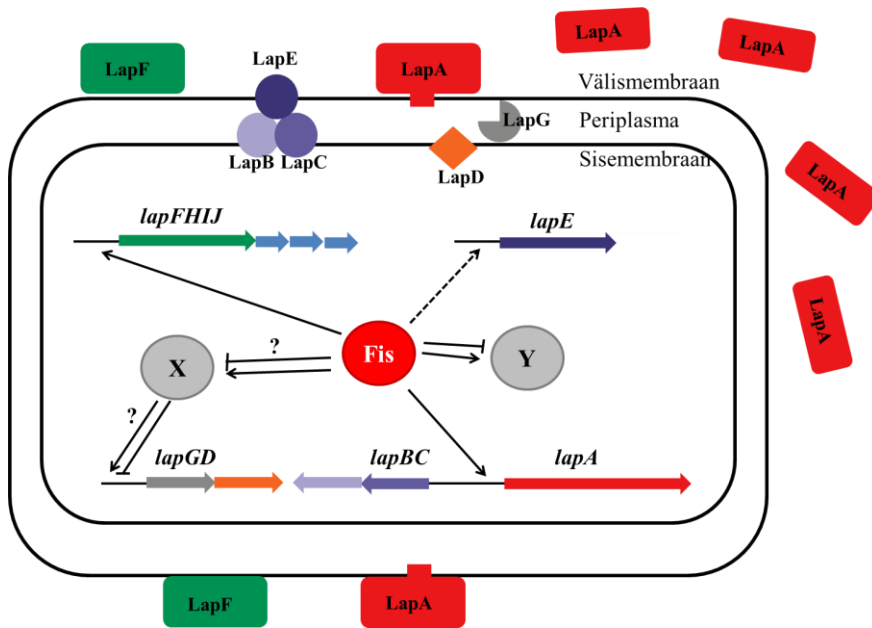
Fis-il paistab *lapE* transkriptsioonile olema vähese Fis-i üleekspressiooni korral positiivne mõju ja suure üleekspressiooni korral represseriv efekt (joonis 12). Samas ei anna Bonferroni test ei Fis-i vähese üleekspressiooni aktiveerivale mõjule ega tugeva üleekspressiooni repressioonile võrreldes metsiktüvega statistilist erinevust. Fis arvatavasti siiski mõjutab *lapE* transkriptsiooni, kuna seondub *lapE* promootorile kahes või lausa kolmes positsioonis, mis on erinevate afiinsustega (joonis 13, lisa 4). Nendest kaks DNA järjestust Fis-E1 ja Fis-E2 asuvad *lapE* mRNA 5' otsast (E-I) ülesvoolu ning sellisel kaugusel on võimalik transkriptsiooni aktiveerimine. Samas oleme näidanud, et Fis võib seonduda *lapE* potentsiaalsest promootorist allavoolu Fis-E0-le. Kuigi see seondumisjärjestus on DNaaS I *footprint*'i järgi väga nõrk (lisa 4), seletaks Fis-i üleekspressiooniga rakkudes kolmele DNA järjestusele seondumine *lapE* transkriptsiooni repressiooni. Kuna Fis painutab seondumisel

DNA-d 90°, siis kõigi *lapE* ees olevate seondumiskohtade täitumisel tekib RNA polümeraasi jaoks ebasobiv DNA topoloogia ning transkriptsioon represseritakse.

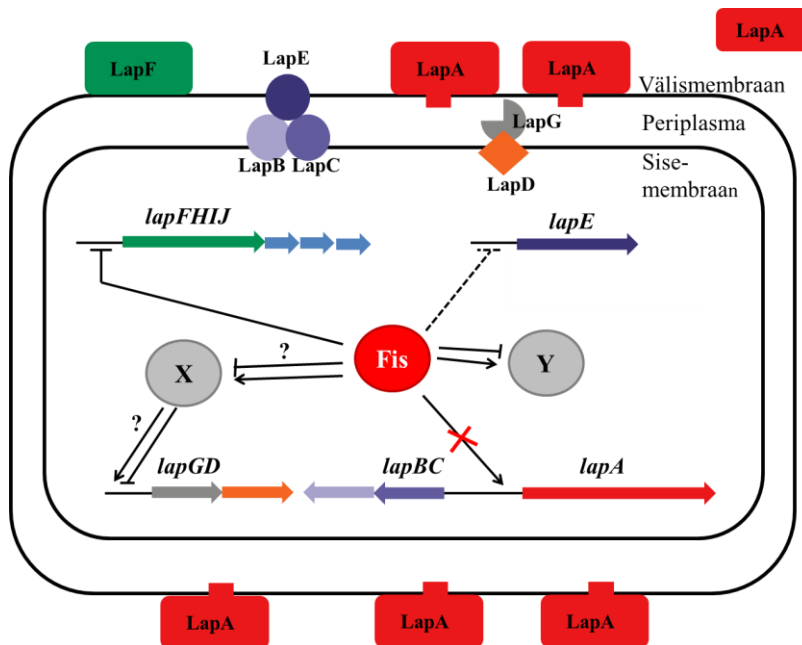
Biofilmi moodustumist takistava proteaasi geeni *lapG* transkriptsiooni represserib Fis nii vähese kui tugeva üleekspressiooni korral (joonis 12). Fis *lapG* promootoralale ei seonu (joonis 13, lisa 5) ning tõenäoliselt reguleerib *lapG* transkriptsiooni kaudselt, teiste geenide kaudu. Veelgi enam, *lapG* geeni mRNA-l tehti kindlaks kaks 5' otsa, kusjuures kummalgi juhul ei suudetud leida võimalikku σ^{70} -tüüpi promootori -10 heksameeri 5' otsast ülesvoolu. Võimalik, et *lapG* transkriptsioon on mõne teise σ -faktori kontrolli all.

Vähese üleekspressiooni korral soodustab Fis suurte adhesiinide *lapA* ja *lapF*-i ning transporterite geeni *lapE* transkriptsiooni (joonis 15), mis on kõik vajalikud biofilmi moodustumiseks. Lisaks represserib Fis kaudselt *lapG* transkriptsiooni, mis takistab biofilmi moodustumist. Seega aktiveerib Fis biofilmi moodustumiseks olulisi gene ja represserib biofilmi teket takistavat *lapG*-d. Raku sees on näha ka rohkem Gfp-ga märgitud LapA valku kui metsiktüves, aga F15 vähese üleekspressiooni tingimustes siiski ei moodusta rohkem biofilmi. On mitu võimalust, miks vähese Fis-i üleekspressiooni tingimustes rohkem biofilmi ei teki. Esiteks, töös ei uuritud LapA transporti raku pinnale, kuna mõõdeti Gfp-ga märgitud LapA hulka transporterite geenide *lapBC* mutandis. Seega, kuigi raku sees on näha LapA hulga tõusu ja ka ühte transporterite geeni aktiveeritakse, siis ei pruugi funktsionaalne LapA välismembraani jõuda. Teiseks võib mõni teine Fis-i kontrolli all olev negatiivne regulaator Fis-i vähese üleekspressiooni korral signaaliraja blokeerida. Näiteks üheks võimaluseks on, et Fis mõjutab GacS/GacA signaaliraja kaudu posttranskriptsioonilist regulaatorit RsmA-d, mis seondub biofilmi moodustumisel osalevate geenide mRNA-dega ja reguleerib nende transkriptsiooni.

A Vähene Fis-i üleekspressioon



B Tugev Fis-i üleekspressioon.



Joonis 15. Fis-i mõju *lap*-geenidele vähese ja tugeva üleekspressiooni korral. *Lap*-geenid on kujutatud nooltena ja vastavad valgud on tähistatud geeniga sama värvi ringi või kastiga. LapA võib olla kinnitunud välismembraani või pärast proteaasiga LapG lõikamist eraldunud väliskeskkonda. LapG on periplasmaatiline valk, LapD sisemembraani valk. LapEBC on LapA transportsüsteem. Transkriptsiooni aktivatsioon on näidatud noolega, repressioon tõmbi otsaga joonega. Välja on toodud hüpoteetiline regulaator X, mis võiks mõjutada *lapG* transkriptsiooni. Y-ga on tähistatud faktor, mis võib mõjutada biofilmi moodustumist negatiivselt, kui rakkudes on Fis-i vähene üleekspressioon.

Tugeva üleekspressiooni korral Fis represserib *lapF*-i, *lapE* ja kaudselt *lapG* ekspressiooni (joonis 15). *LapF*-i ja *lapE* represserimine peaks ühelt poolt vähendama biofilmi teket ja teisalt *lapG* represserimine jälle suurendama. *LapA* transkriptsiooni Fis sellistel tingimustel ei mõjuta ning *lapA*-d transkribeeritakse metsiktüvega samal tasemel. Samas *LapA* hulka raku sees on veelgi suurem kui vähese Fis-i üleekspressiooni korral ja see *LapA* jõuab tõenäoliselt ka raku pinnale, kuna sellistes tingimustes tekib tugev biofilm. Kuidas toodetakse tugeva Fis-i üleekspressiooni korral rohkem *LapA*-d kui vähese üleekspressiooni tingimustes pole selle töö raames võimalik öelda. Siiski, üheks erinevuseks on *lapG* veelgi madalam transkriptsioon, mis võib suurendada raku pinnal püsiva *LapA* hulka, kuid see ei saa olla ainuke erinevus, kuna *lapG* transkriptsioon on ka vähese Fis-i üleekspressiooniga tüves madalam kui metsiktüves. Erinevus vähese ja tugeva üleekspressiooni vahel võib olla ka *LapA* transpordis või mõne teise negatiivse regulaatori käitumises.

Käesoleva töö käigus selgus, et Fis-i üleekspressioonitüve F15 kasvatamisel M9 minimaalsöötmes ei ole Fis-i üleekspressioonil biofilmi soodustavat efekti, nagu oli näha LB söötmes (joonis 6). Tekkis küsimus, miks kaob M9 minimaalsöötmes Fis-i biofilmi soodustav efekt. Põhjusi võib olla kaks: muutunud on geenide ekspressioon või sõltub Fis-i biofilmi võimendav efekt söötimest. Biofilmi moodustumiseks hädavajaliku *LapA* valku toodetakse mõlemas söötmes Fis-i hulgast sõltuvalt – mida rohkem Fis-i, seda rohkem *LapA*-d (joonis 14, tulemused 3.3.6). Seega ei saa Fis biofilmi võimendav efekti kadu M9-minimaalsöötmes olla tingitud *LapA* vähesusest bakterites. Seda enam, et M9 söötmes toodetakse *LapA* valku 1,63 korda rohkem kui LB-s. Samas M9 söötmes moodustab *P. putida* biofilmi just vähem.

Söötme komponentide toimel Fis-i võimendatud biofilmile oli kaks võimalust: M9 söötme komponendid pärivad biofilmi moodustumist või LB komponendid soodustavad Fis-i võimendava biofilmi moodustumise efekti esiletulemist. Ühelgi testitud M9 söötme komponendil (fosfaatpuhver, glükoos, mikroelemendid) ei olnud LB-sse lisades biofilmi moodustumisele inhibeerivat efekti (andmeid pole esitatud). Samas, LB söötme komponentide (DNA ja valgud) ükshaaval lisamine M9 söötmesse näitas, et ainult valgu lisamine tõstis biofilmi hulka kui Fis on *P. putida*'s üle ekspresseeritud. DNA ebaolulisus *P. putida* biofilmi moodustumisele on kooskõlas kirjanduse andmetega, mille kohaselt *P. putida* biofilmi töötlemine DNAasiga ei põhjusta biofilmi lagunemist (Yousef-Coronado jt, 2011). Ka meie nägime, et Fis-i üleekspresseriva tüve biofilmi DNAas lagundada ei suuda (joonis 9). Lisaks testiti ka taimeraku komponenti tselluloosi, mis süsteemi ei mõjutanud.

Valkude rolli biofilmi moodustumises on ka varem kirjeldatud, kuid käsitletud on ainult bakterite sekreteeritud valke (Cucarella jt, 2001; Hinsä jt, 2003; Martinez-Gil jt, 2010), mitte keskkonnast pärinevaid. Käesolevas töös leiti, et Fis-i üleekspressiooni efekt biofilmile sõltub väliskeskkonnas olevast valgust, mis võib toimida signaalina biofilmi moodustumiseks, kuid mitte lisatoitainena. Signalisatsiooni kasuks räägib fakt, et proteaasiga töödeldud LB söötmes ei tõsta Fis-i üleekspressioon metsiktüvega võrreldes biofilmi taset (joonis 8). Samuti, kui valku kasutatakse lisatoitainena, siis tõuseks ka IPTG-ta F15 biofilmi hulka BSA lisamisel (joonis 7), kuid see ei ole nii. Järelikult on valk oluline signaal biofilmi moodustamiseks, kuid silmas tuleb pidada, et efekt on jälgitav ainult Fis-i üleekspressiooni korral ning mõju metsiktüvele on väike.

Valgu äratundmine biofilmi moodustumise signaalina võib olla oluline juure peal elamiseks. Juure tipu kaudu eritavad taimed aktiivselt erinevad suhkruid, aminohappeid ja orgaanilisi happeid. Enamik risosfääris elavaid baktereid moodustavad biofilmi aga reeglina juure vanematel osadel, kus lüüsovatest rakkudest eraldub erinevaid taimeraku komponente, mille hulgas on ka valku. (Bais jt, 2004; Dennis jt, 2010). Seega võib taime juure vanematelt osadelt vabanev valguline komponent soodustada just seal biofilmi moodustumist.

Kokkuvõtteks võib öelda, et *P. putida* Fis osaleb *lap*-geenide regulatsioonis nii otse transkriptsiooni mõjutades kui ka kaudselt. Fis mõjutab otseselt *lapA* geeni transkriptsiooni ja reguleerib rakus ka LapA hulka, kuid nende kahe etapi vahel on veel mingi regulatoorne etapp. Fis-i mõju LapA hulgale kinnitab ka see, et Fis-i tugeval üleekspressioonil tekkiv suurenenud biofilm on valgulise koostisega. Lisaks ei mõjuta Fis biofilmi moodustamist arvatavasti ainult *lap*-geenide kaudu, vaid reguleerib ka mingeid teisi biofilmi moodustumist mõjutavaid gene.

Kokkuvõte

Meie laboris oli varem näidatud, et Fis soodustab tugeva üleekspressiooni korral biofilmi moodustumist. Töö käigus sai selgeks, et Fis võib mõjutada biofilmi moodustumises keskset Lap-valkude süsteemi. *P. fluorescens*'is ja *P. putida*'s on Lap-süsteemi posttranslatsioonilist regulatsiooni varem põhjalikult uuritud, kuid *lap*-geenide transkriptsiooni regulatsioonist ei ole veel eriti palju teada.

Käesolevas töös uuriti Fis-i üleekspressiooni mõju biofilmi moodustumisele: otsiti Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendavaks efektiks vajalikke keskkonna signaale ning uuriti Fis-i mõju *lap*-geenide transkriptsioonile. Saadud tulemused võib kokku võtta järgmiselt:

- Keskkonna signaaliks, mis laseb Fis-i üleekspressiooni biofilmi võimendaval efektil avalduda, on valk.
- Fis-i üleekspressiva tüve biofilmi peamine struktuurne komponent on valguline.
- Fis reguleerib biofilmi moodustumist LapA kaudu: *lapA* deleteerimisel kaob Fis-i üleekspressiooni biofilmi soodustav efekt, kuid mitte LapF-i kaudu.
- Fis reguleerib otseselt adhesiini geenide *lapA*, *lapF*-i ja arvatavasti ka transporteri geeni *lapE* transkriptsiooni. Kaudselt reguleerib Fis proteaasi geeni *lapG* transkriptsiooni. Vähese üleekspressiooni korral soodustab Fis *lapA* transkriptsiooni, kuid tugeva üleekspressiooni korral transkribeeritakse LapA-d metsiktüvega võrreldaval tasemel. *LapF*-i ja arvatavasti ka *lapE* transkriptsiooni Fis soodustab nõrga üleekspressiooni korral, kuid represserib tugeva üleekspressiooni tingimustes. *LapG* transkriptsiooni Fis represserib kaudselt, kusjuures tugeva üleekspressiooni korral rohkem kui vähese üleekspressiooni tingimustes.
- Fis mõjutab LapA hulka rakus: mida rohkem on rakus Fis valku, seda rohkem toodetakse rakus (mõõdetud transpordi geenide *lapBC* deletandis) ka LapA-d.
- Fis reguleerib *lap*-geenide ekspresiooni kaudselt, arvatavasti mõne globaalse regulaatorraja kaudu.

***Pseudomonas putida* Fis regulates biofilm formation**

Hanna Moor

Summary

The negative effects of biofilm-forming bacteria on medicine, industry and agriculture are widely acknowledged. It is less known, however, that many bacteria are able to promote plant growth and health by forming biofilm on plant roots and some strains are even used as fertilizer components. *Pseudomonas putida* is a plant symbiont that forms biofilm on many crop plants, protecting them from pathogens and promoting plant growth and crop yield.

Protein is the major component in *P. putida*'s biofilm, which is unusual, as most biofilms consist mainly of exopolysaccharides. *P. putida* produces two large externalized adhesion proteins LapA and LapF, which mediate cell-to-surface and cell-to-cell interactions. LapA is transported to the outer membrane by an ABC transporter LapEBC and in suboptimal conditions for biofilm formation, LapA is released from the outer membrane by the protease LapG.

We have previously shown that the global transcription regulator Fis (factor for inversion stimulation) regulates biofilm formation. Our goal was to identify Fis target genes involved in biofilm formation. The findings of this work can be summarised as follows:

- Extracellular proteins are required for Fis overexpression-induced biofilm formation.
- Fis overexpression-induced biofilm mainly consists of protein.
- Fis regulates biofilm formation via LapA. Effect of Fis overexpression on biofilm formation is abolished by *lapA* deletion, but not *lapF* deletion.
- Fis directly regulates transcription of adhesion proteins genes *lapA*, *lapF* and most probably transporter gene *lapE*, and indirectly regulates the protease gene *lapG*.
- Fis positively regulates the amount of LapA in the cell.

These results indicate that Fis regulates biofilm formation via the Lap-system in a very complicated manner. We observed both direct and indirect effects of Fis on the *lap*-genes and suspect that additional unidentified regulators may also be involved. Furthermore, due to the experimental set-up, we believe that we have not yet identified all the biofilm formation-related genes that are regulated by Fis. Further studies will elucidate the Fis-driven regulatory network that controls biofilm formation in *P. putida*.

Tänuõnad

Tahaksin tänada Annika Teppet ja Andrio Lahesaaret ning kõiki teisi laborikaaslasi, kes mind nõu ja vahel ka jõuga aitasid. Eriti tahaksin tänada oma juhendajat Riho Terast, kes kõikidele muredele lahendused leidis, nõustas ja julgustas. Suur tänu ka Hiie Nõlvakule abi ja nõuannete eest qPCR-i katsetega ning Dmitri Lubenetsile abi eest läbivoolutsütomeetri tulemuste analüüsil.

Kasutatud kirjandus

1. Aksoy, H. & Yilmaz, N. K. (2008). Antagonistic effects of natural *Pseudomonas putida* biotypes on *Polymyxa betae* Keskin, the vector of Beet necrotic yellow vein virus in sugar beet. *Journal of Plant Diseases and Protection* **115**, 241-246.
2. Azam, T. A. & Ishihama, A. (1999). Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *The Journal of biological chemistry* **274**, 33105-33113.
3. Auner, H., Buckle, M., Deufel, A. & other authors (2003). Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *Journal of molecular biology* **331**, 331-344.
4. Baillie, G. S. & Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **46**, 397-403.
5. Bais, H. P., Fall, R. & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology* **134**, 307-319.
6. Ball, C. A., Osuna, R., Ferguson, K. C. & Johnson, R. C. (1992). Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **174**, 8043-8056.
7. Bauchop, T. & Elsdén, S. R. (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *Journal of general microbiology* **23**, 457-469.
8. Beloin, C. & Ghigo, J. M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in microbiology* **13**, 16-19.
9. Bokal, A. J., Ross, W., Gaal, T., Johnson, R. C. & Gourse, R. L. (1997). Molecular anatomy of a transcription activation patch: FIS-RNA polymerase interactions at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter. *The EMBO journal* **16**, 154-162.
10. Boyd, C. D., Chatterjee, D., Sondermann, H. & O'Toole, G. A. (2012). LapG, required for modulating biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, is a calcium-dependent protease. *Journal of bacteriology* **194**, 4406-4414.
11. Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **41**, 459-472.
12. Bradley, M. D., Beach, M. B., de Koning, A. P., Pratt, T. S. & Osuna, R. (2007). Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology* **153**, 2922-2940.
13. Browning, D. F. & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature reviews Microbiology* **2**, 57-65.
14. Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* **112**, 195-203.
15. Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C. & O'Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* **152**, 405-418.
16. Carpentier, B. & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *The Journal of applied bacteriology* **75**, 499-511.
17. Carter, P., Bedouelle, H. & Winter, G. (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic acids research* **13**, 4431-4443.
18. Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *The Journal of biological chemistry* **280**, 30829-30837.
19. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. & Beachey, E. H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity* **37**, 318-326.
20. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

21. Cotter, P. A. & Stibitz, S. (2007). C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current opinion in microbiology* **10**, 17-23.
22. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. & Penades, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology* **183**, 2888-2896.
23. Davey, M. E. & O'Toole G, A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**, 847-867.
24. de Brouwer, J. F., Wolfstein, K., Ruddy, G. K., Jones, T. E. & Stal, L. J. (2005). Biogenic stabilization of intertidal sediments: the importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. *Microbial ecology* **49**, 501-512.
25. Dennis, P. G., Miller, A. J. & Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS microbiology ecology* **72**, 313-327.
26. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* **8**, 881-890.
27. Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* **15**, 167-193.
28. Duque, E., de la Torre, J., Bernal, P. & other authors (2013). Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environmental microbiology* **15**, 36-48.
29. Espeland, E. M. & Wetzel, R. G. (2001). Complexation, Stabilization, and UV Photolysis of Extracellular and Surface-Bound Glucosidase and Alkaline Phosphatase: Implications for Biofilm Microbiota. *Microbial ecology* **42**, 572-585.
30. Espinosa-Urgel, M., Salido, A. & Ramos, J. L. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of bacteriology* **182**, 2363-2369.
31. Espinosa-Urgel, M., Kolter, R. & Ramos, J. L. (2002). Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* **148**, 341-343.
32. Fineran, P. C., Williamson, N. R., Lilley, K. S. & Salmond, G. P. (2007). Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *Journal of bacteriology* **189**, 7653-7662.
33. Finkel, S. E. & Johnson, R. C. (1992). The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Molecular microbiology* **6**, 3257-3265.
34. Flemming, H. C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology* **8**, 623-633.
35. Fletcher, A. (1977). The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachments to polystyrene. *Can J Microbiol* **23**, 1-6.
36. Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L. & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS microbiology ecology* **56**, 195-206.
37. Fuqua, C. (2010). Passing the baton between laps: adhesion and cohesion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Molecular microbiology* **77**, 533-536.
38. Gamalero, E., D'Amelio, R., Musso, C. & other authors (2010). Effects of *Pseudomonas putida* S1Pf1Rif Against Chrysanthemum Yellows Phytoplasma Infection. *Phytopathology* **100**, 805-813.
39. Glick, B. R., Cheng, Z., Czarn, J. & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol*, 329-339.
40. Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology reviews* **33**, 279-294.
41. Gravel, V., Antoun, H. & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*, 1968.
42. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology* **2**, 95-108.

43. Harriott, M. M. & Noverr, M. C. (2010). Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 3746-3755.
44. Hatfield, G. W. & Benham, C. J. (2002). DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annual review of genetics* **36**, 175-203.
45. Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* **172**, 6557-6567.
46. Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L. & O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular microbiology* **49**, 905-918.
47. Ishihama, A. (2010). Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS microbiology reviews* **34**, 628-645.
48. Jakovleva, J., Teppo, A., Velts, A., Saumaa, S., Moor, H., Kivisaar, M. & Teras, R. (2012). Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology* **158**, 708-720.
49. Jakubovics, N. S., Gill, S. R., Iobst, S. E., Vickerman, M. M. & Kolenbrander, P. E. (2008). Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *Journal of bacteriology* **190**, 3646-3657.
50. Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters* **236**, 163-173.
51. Jenal, U. & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual review of genetics* **40**, 385-407.
52. Jeong, J. Y., Yim, H. S., Ryu, J. Y., Lee, H. S., Lee, J. H., Seen, D. S. & Kang, S. G. (2012). One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and environmental microbiology* **78**, 5440-5443.
53. Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **76**, 46-65.
54. Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C. & Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **188**, 6026-6033.
55. King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **44**, 301-307.
56. Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J. U. & Tolker-Nielsen, T. (2006). Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS microbiology letters* **261**, 1-11.
57. Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N. & Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology* **8**, 159-168.
58. Laskin, A. I., Sariaslani, S. & Gadd, G. M. (2009). *Advances in Applied Microbiology*. San Diego, USA: Academic Press.
59. Le Magrex-Debar, E., Lemoine, J., Gelle, M. P., Jacquelin, L. F. & Choisy, C. (2000). Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *International journal of food microbiology* **55**, 239-243.
60. Lee, D. J., Bingle, L. E., Heurlier, K., Pallen, M. J., Penn, C. W., Busby, S. J. & Hobman, J. L. (2009). Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC microbiology* **9**, 252.
61. Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular microbiology* **65**, 1474-1484.
62. Lenz, D. H. & Bassler, B. L. (2007). The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Molecular microbiology* **63**, 859-871.

63. **Martinez-Antonio, A. & Collado-Vides, J. (2003).** Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current opinion in microbiology* **6**, 482-489.
64. **Martinez-Garcia, E., Calles, B., Arevalo-Rodriguez, M. & de Lorenzo, V. (2011).** pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC microbiology* **11**, 38.
65. **Martinez-Gil, M., Yousef-Coronado, F. & Espinosa-Urgel, M. (2010).** LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular microbiology* **77**, 549-561.
66. **McLeod, S. M., Aiyar, S. E., Gourse, R. L. & Johnson, R. C. (2002).** The C-terminal domains of the RNA polymerase alpha subunits: contact site with Fis and localization during co-activation with CRP at the *Escherichia coli* *proP* P2 promoter. *Journal of molecular biology* **316**, 517-529.
67. **Miller, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring harbor Laboratory Press.
68. **Miller, J. H. (1992).** A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
69. **Minnoş, B., İlhan-Sungur, E., Çotuk, A., Güngör, N. G. & Cansever, N. (2012).** The corrosion behaviour of galvanized steel in cooling tower water containing a biocide and a corrosion inhibitor. *Biofouling* **29**, 223-235.
70. **Molina, L., Cabes, M., Diaz-Ferrero, J., Coll, M., Marti, R., Broto-Puig, F., Comellas, L. & Rodriguez-Larena, M. C. (2000).** Separation of non-ortho polychlorinated biphenyl congeners on pre-packed carbon tubes. Application to analysis in sewage sludge and soil samples. *Chemosphere* **40**, 921-927.
71. **Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2009).** The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology* **17**, 73-87.
72. **Monds, R. D., Newell, P. D., Gross, R. H. & O'Toole, G. A. (2007).** Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Molecular microbiology* **63**, 656-679.
73. **Moor, H. (2011).** *Pseudomonas putida* Fis-i osalemine bakteri liikumise ja biofilmi moodustumise regulatsioonis. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
74. **Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O. & Darst, S. A. (2002).** Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **296**, 1285-1290.
75. **Navarro, M. V., Newell, P. D., Krasteva, P. V., Chatterjee, D., Madden, D. R., O'Toole, G. A. & Sondermann, H. (2011).** Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS biology* **9**, e1000588.
76. **Newell, P. D., Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2009).** LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3461-3466.
77. **Newell, P. D., Boyd, C. D., Sondermann, H. & O'Toole, G. A. (2011a).** A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS biology* **9**, e1000587.
78. **Newell, P. D., Yoshioka, S., Hvorecny, K. L., Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2011b).** Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Journal of bacteriology* **193**, 4685-4698.
79. **Ninnemann, O., Koch, C. & Kahmann, R. (1992).** The *E.coli* *fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *The EMBO journal* **11**, 1075-1083.
80. **Nölvak, H., Truu, M. & Truu, J. (2012).** Evaluation of quantitative real-time PCR workflow modifications on 16S rRNA and *tetA* gene quantification in environmental samples. *The Science of the total environment* **426**, 351-358.
81. **O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology* **54**, 49-79.
82. **O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* **28**, 449-461.

83. Opel, M. L., Aeling, K. A., Holmes, W. M., Johnson, R. C., Benham, C. J. & Hatfield, G. W. (2004). Activation of transcription initiation from a stable RNA promoter by a Fis protein-mediated DNA structural transmission mechanism. *Molecular microbiology* **53**, 665-674.
84. Pan, C. Q., Finkel, S. E., Cramton, S. E., Feng, J. A., Sigman, D. S. & Johnson, R. C. (1996). Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *Journal of molecular biology* **264**, 675-695.
85. Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A. & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000* **42**, 80-87.
86. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. & Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes & development* **18**, 715-727.
87. Paulitz, T. C. (1991). Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed solatiles of pea and soybean. *Pythopathogeny*, 1282-1287.
88. Pessi, G. & Haas, D. (2001). Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS microbiology letters* **200**, 73-78.
89. Potera, C. (1996). Biofilms invade microbiology. *Science* **273**, 1795-1797.
90. Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S. & Nasser, W. (2012). The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Molecular microbiology* **86**, 172-186.
91. Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molecular microbiology* **24**, 309-319.
92. Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L. & Bais, H. P. (2008a). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS microbiology ecology* **64**, 153-166.
93. Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Pare, P. W. & Bais, H. P. (2008b). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology* **148**, 1547-1556.
94. Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. & Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* **37**, e45.
95. Römling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular microbiology* **57**, 629-639.
96. Ryder, C., Byrd, M. & Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology* **10**, 644-648.
97. Saldana, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L. & Giron, J. A. (2009). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environmental microbiology* **11**, 992-1006.
98. Salgado, H., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S. & other authors (2013). RegulonDB v8.0: omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, cross-validated gold standards and more. *Nucleic acids research* **41**, D203-213.
99. Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
100. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology* **184**, 1140-1154.
101. Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* **1**, 16-22.
102. Schneider, R., Travers, A. & Muskhelishvili, G. (1997). FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **26**, 519-530.
103. Schneider, R., Travers, A. & Muskhelishvili, G. (2000). The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Molecular microbiology* **38**, 167-175.

104. Shao, Y., Feldman-Cohen, L. S. & Osuna, R. (2008). Functional characterization of the *Escherichia coli* Fis-DNA binding sequence. *Journal of molecular biology* **376**, 771-785.
105. Sharma, R. C. & Schimke, R. T. (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques* **20**, 42-44.
106. Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D. & Nataro, J. P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **41**, 983-997.
107. Stanley, N. R. & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular microbiology* **52**, 917-924.
108. Steinberger, R. E. & Holden, P. A. (2005). Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and environmental microbiology* **71**, 5404-5410.
109. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.
110. Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology* **9**, 222-227.
111. Teppo, A. (2010). Fis üleekspressioonist põhjustatud *Pseudomonas putida* kasvuhäired. Magistritöö. Tartu Ülikool.
112. Thompson, J. F., Moitoso de Vargas, L., Koch, C., Kahmann, R. & Landy, A. (1987). Cellular factors couple recombination with growth phase: characterization of a new component in the lambda site-specific recombination pathway. *Cell* **50**, 901-908.
113. Timmusk, S., Grantcharova, N. & Wagner, E. G. (2005). *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and environmental microbiology* **71**, 7292-7300.
114. Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S. & Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of bacteriology* **182**, 6482-6489.
115. Travers, A. & Muskhelishvili, G. (2005). DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nature reviews Microbiology* **3**, 157-169.
116. Typas, A., Stella, S., Johnson, R. C. & Hengge, R. (2007). The -35 sequence location and the Fis-sigma factor interface determine sigmas selectivity of the *proP* (P2) promoter in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **63**, 780-796.
117. Walker, T. S., Bais, H. P., Deziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R. & Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant physiology* **134**, 320-331.
118. Wanner, B. L. (1996). Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC: ASM Press.
119. Velts, A. (2008). Fis valgu ekspressioon *Pseudomonas putida*'s. Magistritöö. Tartu Ülikool.
120. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487.
121. Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W. & Brinkman, F. S. L. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research* **39**, D596-D600.
122. Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hoiby, N., Molin, S. & Song, Z. J. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of oral science* **3**, 74-81.
123. Yousef-Coronado, F., Soriano, M. I., Yang, L., Molin, S. & Espinosa-Urgel, M. (2011). Selection of hyperadherent mutants in *Pseudomonas putida* biofilms. *Microbiology* **157**, 2257-2265.
124. Yuste, L., Hervas, A. B., Canosa, I. & other authors (2006). Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environmental microbiology* **8**, 165-177.

Lisa 1

Lisa 1 Töös kasutatud praimerid

Praimer	Praimeri järjestus 5'-3' suunas	Seondumiskoht
Adapt-lyh	GACTCGAGTCGACATCG	adaptorpraimer, seondub Adapt_pikk praimerile
Adapt_pi kkC	GACTCGAGTCGACATCGA(C) ₁₇	polüG-saba
Adapt_pi kkT	GACTCGAGTCGACATCGA(T) ₁₇	polüT-saba
ARB2	GGCACGCGTCGACTAGTAC	arbitraarne praimer
ARB6	GGCACGCGTCGACTAGTACNNN NNNNNNNACGCC	arbitraarne praimer
Emgfp-5	AGCAAGGGCGAAGAGCTGTT	pDOC-G vektoril, 1-20 nt-d <i>gfp</i> geeni algusest suunaga geeni lõpu poole
Emgfp-9	GCTCCAGCCAATTGACC	pDOC-G vektoril, 4-20 nt-d <i>gfp</i> geeni lõpust edasi suunaga geeni poole
Fis- BamHI*	AGAGGATCCTTACAACAAGTCG TACTGC	1 – 19 nt-d <i>fis</i> geeni lõpust ülesvoolu suunaga <i>fis</i> geeni alguse poole
Fis-ku	AAGGCGCTGCACAACTA	121-137 nt-d <i>fis</i> geeni algusest suunaga geeni lõpu poole
Fisq-new	TGCCCTTCACGTAGTTCATC	223-242 nt-d <i>fis</i> geeni algusest suunaga geeni alguse poole
Km6	ATATGAATATCCTCCTTAGTT	pDOC-G vektorile, 233-253 nt-d pärast Km geeni suunaga geeni poole

Lisa 1 jätk Töös kasutatud praimerid

Praimer	Praimeri järjestus 5'-3' suunas	Seondumiskoht
LacZ-AB	GTGTTACCCAGAGTCAGC	3 – 20 nt-d <i>lacZ</i> geenis suunaga geeni algusest välja
LapA-down2	CACCTCAGCAGCCTGAAATCA	289-309 nt-d enne <i>lapA</i> geeni suunaga geenist eemale
LapA-fw*	<u>TGGATCC</u> ACATAGCTGCTTGTG ACTCG	482- 501 nt-d enne <i>lapA</i> geeni suunaga geeni alguse poole
LapA-RACE1	AGCTCAGTAGTCGGGTCAA	293-311 nt-d <i>lapA</i> geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapA-RACE2	CATCAGCCAGCTCCAAAGT	142-160 nt-d <i>lapA</i> geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapA-rev*	<u>TGGATCC</u> GACAGGCGGTCACC TTCGA	17-36 nt-d <i>lapA</i> -geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapB-RACE1	ATGGCGATACTCGGGATCT	233 -251 nt-d <i>lapB</i> -geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapB-RACE2	GTGCAGGACACACAGGC	83-99 nt-d <i>lapB</i> -geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapB-rev*	<u>TGGATCC</u> ATCGTCATGCTGACT GCG	43-60 nt-d <i>lapB</i> geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapBC down	TGCTGATAAGGGTTATCAC	<i>lapB</i> geeni ees 96-114 nt-d geeni algusest suunaga geenist eemale
LapE-fw*	<u>TGGATCCA</u> ACCCTGCACAAGC CAAAG	315-333 nt-d enne <i>lapE</i> geeni algust suunaga geeni poole
LapE-RACE1	GGGTGTAGTTGAGGGTTT	266- 283 nt-d <i>lapE</i> geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapE-RACE2	CGAACTTCACGTCTTCATC	148-166 nt-d <i>lapE</i> geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapE-rev*	<u>TGGATCC</u> GCCAACAGTAAAGC ACTGG	23-41 nt-d geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapF-fw*	<u>TGGATCCTT</u> CGCTGAGGCTTTT CTAC	180-198 nt-d enne <i>lapF</i> geeni suunaga geeni alguse poole

Lisa 1 jätk Töös kasutatud praimerid

Praimer	Praimeri järjestus 5'-3' suunas	Seondumiskoht
LapF-RACE1	GCCGACGAAGACCATATC	224-241 nt-d <i>lapF</i> -geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapF-RACE2	CCGATGGTGATCTTTTCCC	168-186 nt-d <i>lapF</i> -geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapG-RACE1	TGCGCCGTAGACTGAAATA	463-481 nt-d <i>lapG</i> -geeni algusest suunaga geeni alguse poole
LapG-RACE2	GTACCCTGCTTCTGCGTG	138-155 nt-d <i>lapG</i> -geeni algusest suunaga geeni alguse poole
ME-I-extR	CTCGTTTCACGCTGAATATGGC TC	pBAM vektoril, IE (ingl k <i>internal end</i>) otsast 129-152 nt-d suunaga IE poole
ME-I-intR	CAGTTTTATTGTTCATGATGAT ATA	pBAM vektoril, IE otsast 75-99 nt-d suunaga IE poole
PP0164-down	GGCAAAGCCGACATAGC	1-17 nt-d enne <i>lapG</i> geeni algust suunaga geenist eemale
PP0164-up	ATCACGGCACGGGCCTG	382-398 nt-d enne <i>lapG</i> geeni algust suunaga geeni poole
PP0167-I-fw*	TGGATCCCGAGTCACAAGCAG CTATGT	478-496 nt-d enne <i>lapBC</i> geenide stratkoodonit suunaga geeni poole
PP0168-2 [±]	AACAGCTCCTCGCCCTTGCT GCTGTCCTTGTTGTGGAT	<i>lapA</i> geeni sees, 4-21 nt-d <i>lapA</i> geeni lõpust suunaga geeni alguse poole, alguses 20 nt-d komplementaarne Emgfp5-ga
PP0168-3 [±]	AACTAAGGAGGATATTCATA TCTCTTTCCTGCTACCCG	31-47 nt-d <i>lapA</i> geeni lõpust edasi, suunaga geenist eemale, alguses on 21 nt-d Km6-ga komplementaarset ala
PP0168-7	TGACATCCTCTTCGGCC	<i>lapA</i> geeni sees, 442-458 nt-d <i>lapA</i> geeni lõpust suunaga geeni lõpu poole
PP0168-10	CGGTACTGGCAATGACAC	<i>lapA</i> geeni sees, 371-388 nt-d <i>lapA</i> geeni lõpust suunaga geeni lõpu poole

Lisa 1 jätk Töös kasutatud praimerid

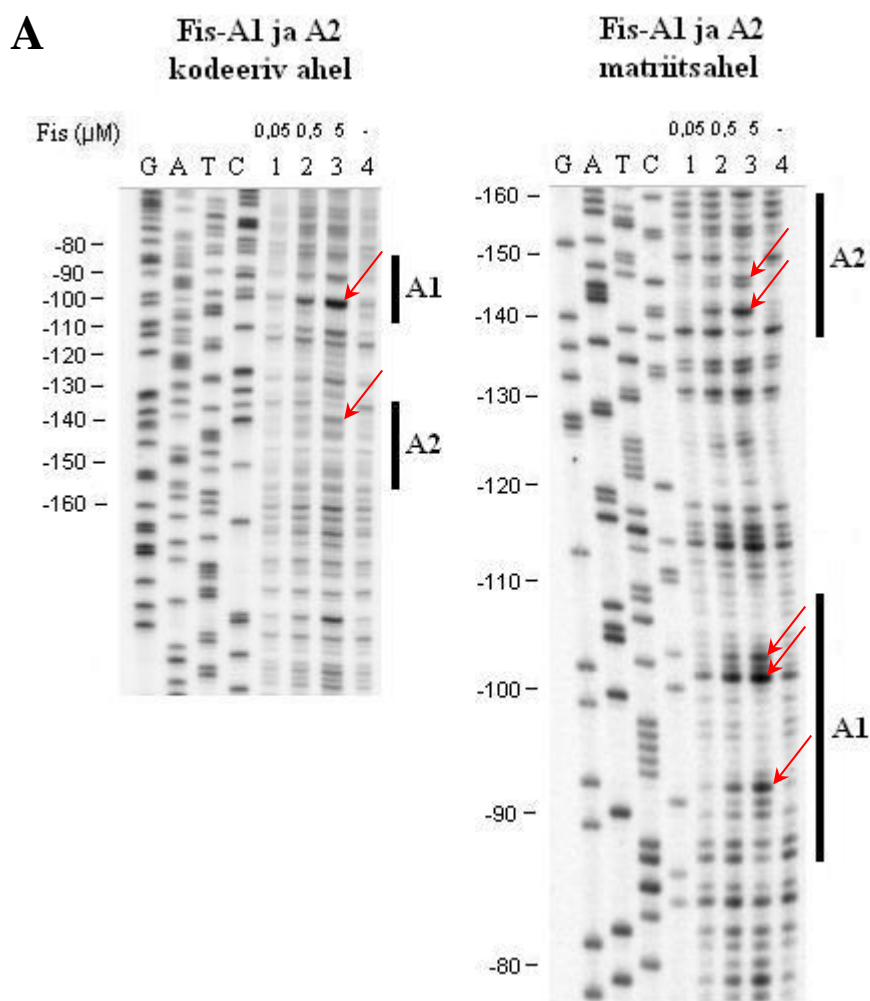
Praimer	Praimeri järjestus 5'-3' suunas	Seondumiskoht
PP0168-40	AGGTCGGTGATCTTGAA	365-381 nt-d <i>lapA</i> geeni lõpust edasi suunaga geeni poole
LapA-rev	<u>TGGATCC</u> GACAATGCTTTTGAC GATGG	<i>lapA</i> geeni sees, 17-36 nt-d <i>lapA</i> algusest suunaga geeni alguse poole
PP0806-rev*	<u>TGGATCC</u> ACTTCGGATTGCTTA TCGG	20-38 nt-d <i>lapF</i> -geeni algusest edasi suunaga geeni alguse poole
Prtac	AATTAATCATCGGCTCGTATAA	79-100 nt-d <i>fis</i> geeni algusest ülesvoolu suunaga <i>fis</i> geeni alguse poole (mini-Tn7-term- <i>lacI</i> [†] -P _{<i>tac</i>} - <i>fis</i> -T1T2-ΩGm)
RpoDq-fw	GCAACAGCAGTCTCGTATCA	15-34 nt-d <i>rpoD</i> geeni algusest edasi suunaga geeni lõpu poole
RpoDq-rev	ATGATGTCTTCCACCTGTTCC	120-140 nt-d <i>rpoD</i> geeni algusest edasi suunaga geeni alguse poole
T1T2	TGGCCTTTTTGCGTAGATC	107 – 125 nt-d <i>lacZ</i> geenist ülesvoolu suunaga geeni alguse poole (pBLKT-s)

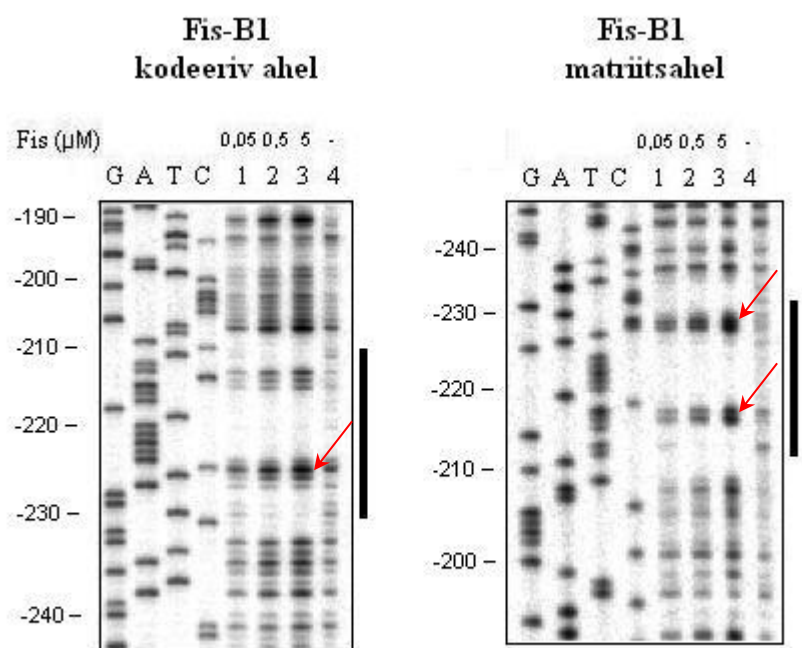
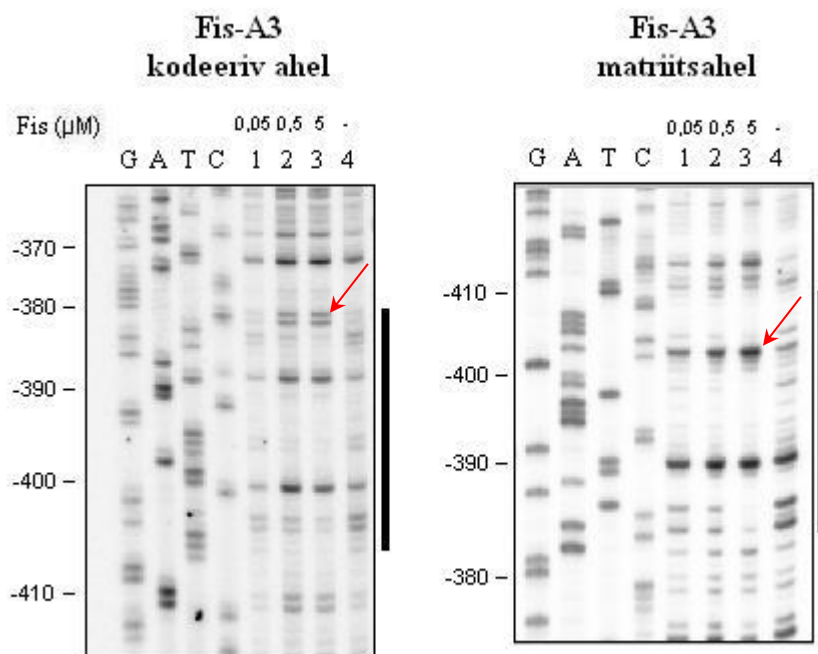
* Allajoonituna on tähistatud restriктаasi *Bam*HI äratundmisjärjestused

± Jämedas kirjas on tähistatud teise praimeriga komplementaarne osa

Lisa 2

A DNAas I *footprint* analüüs *lapA* ja *lapB* geeni promootoralale. Joonisel on märgitud Fis valgu kontsentratsioon (μM) reaktsioonides ja kaugus nukleotiidides geeni algusest. Musta joonega on tähistatud Fis valgu seondumisjärjestus DNA-l ja punaste nooltega on näidatud hüpersensitiivsed nukleotiidid. **B** RACE-iga määratud *lap*-geenide transkriptsiooni alguspunktid ja DNAas I *footprint* meetodiga näidatud Fis-i seondumiskohad *lapA* ja *lapB* geenide ees. Nooltega on märgitud *lapA* ja *lapB* geeni algused ning kastidega tähistatud σ^{70} -tüüpi promootori -10 ja -35 heksameerid. Fis-i seondumisjärjestustel on märgitud seondumine mõlema ahelaga. Joonisel on näidatud kaugus *lapA* geeni algusest. *LapA* geeni ees on kolm Fis-i seondumisjärjestust (Fis-A1, Fis-A2 ja Fis-A3) ning 7 transkriptsiooni alguspunkti (A-I kuni A-VII). *LapB* geeni ees on üks Fis-i seondumisjärjestus, Fis-B1, ning kolm transkriptsiooni alguspunkti (B-I kuni B-III). **C** Sekvencerimisse läinud võõdid lahutatuna 1% agarosgeelis ja etiidumbromiidiga värvituna. Kaheahelaline cDNA on kõigis reaktsioonides amplifitseeritud Adapt_lyh-i ja spetsiifilise praimeriga: LapA-RACE2, LapA-rev, LapB-RACE2 või LapBCdown. (joonis Riho Teraselt)

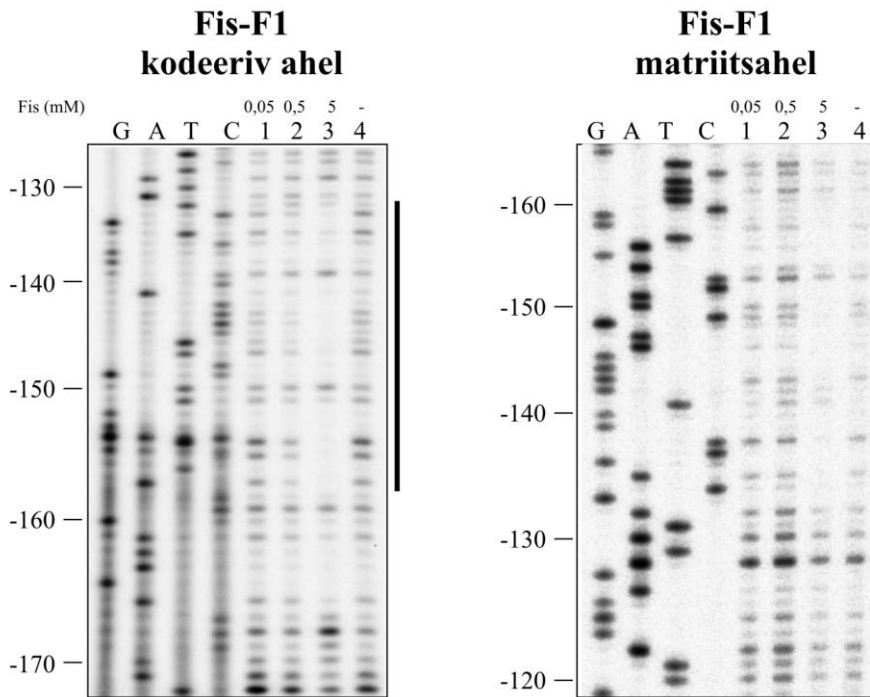




Lisa 3

A DNaaS I *footprint* analüüs *lapF* geeni promootoralale. Joonisel on märgitud Fis valgu kontsentratsioon (μM) reaktsioonides ja kaugus nukleotiidides geeni algusest. Musta joonega on tähistatud Fis valgu seondumisjärjestus DNA-l ja punaste nooltega on näidatud hüpersensitiivsed nukleotiidid. **B** RACE-iga määratud *lapF*-geeni transkriptsiooni alguspunkt F-I ja DNaaS I *footprint* meetodiga näidatud Fis-i seandumiskoht Fis-F1. Noolega on märgitud *lapF* geeni algus ning kastidega tähistatud σ^{70} -tüüpi promootori -10 ja -35 heksameerid. Fis-i seondumisjärjestustel on märgitud seondumine mõlema ahelaga. **C** Sekvencerimisse läinud LapF-RACE2 ja Adapt_lyh-iga amplifitseeritud cDNA lahutatuna 1% agarosgeelis ning etiidiumbromiidiga värvituna (joonis Riho Teraselt).

A



B

-170 -160 -150 **Fis-F1** -140 -10 F-I -110 -100

AAGGATTAACCCAGAAAGCCATCTGGTTGCTTCCCCACCGGTGCTATATCTCCCTAACCCACCCGTTTGTGCGACTGCCTG
TTCCTAATTGGGTCTTTCCGTAGACCAACGAAGGGGTGGCCGACGATATAGAGGGATTGGTGGCAAACAGCTGACGGAC

-90 -80 -70 -60 -50 -40 -30 -20

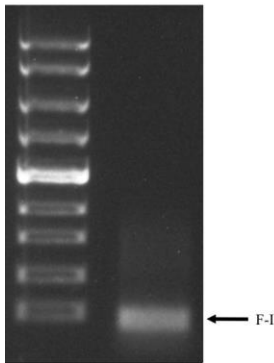
GTCGAGGCTGTGCGTAAGACCCCTGAAAGGGCTCTGTTACGTCGGTTGTGGCCCGAACACTCGGGCCGGGGATCCGGAT
CAGCTCCGACACGCATTCTGGGGACTTTCCCGAGACAATGCAGCCAACACCGGGCTTGTGAGCCCGGCCCCCTAGGCCTA

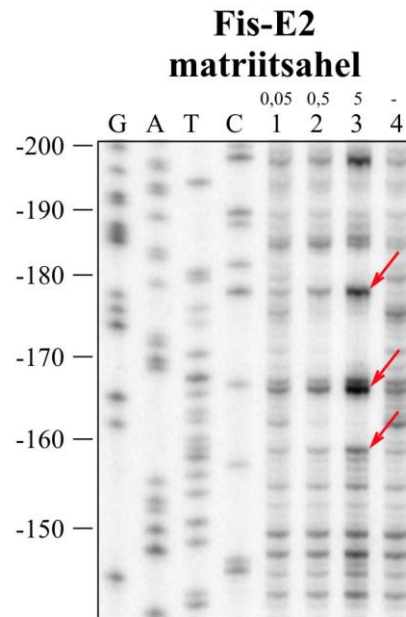
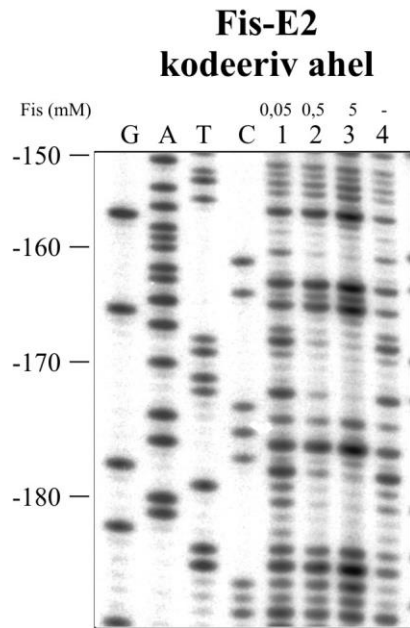
-10

ATCAGCAGGGAGCATCC**ATG**GACAACATCGTCTGTCGCCGATAAGCAATCCGAAGTCGCCACTCAGAGCGCCTGGGGCAAT
TAGTCGTCCCTCGTAGGTACCTGTTGTAGCAGCAGCGGCTATTTCGTTAGGCTTCAGCGGTGAGTCTCGCGGACCCCGTTA

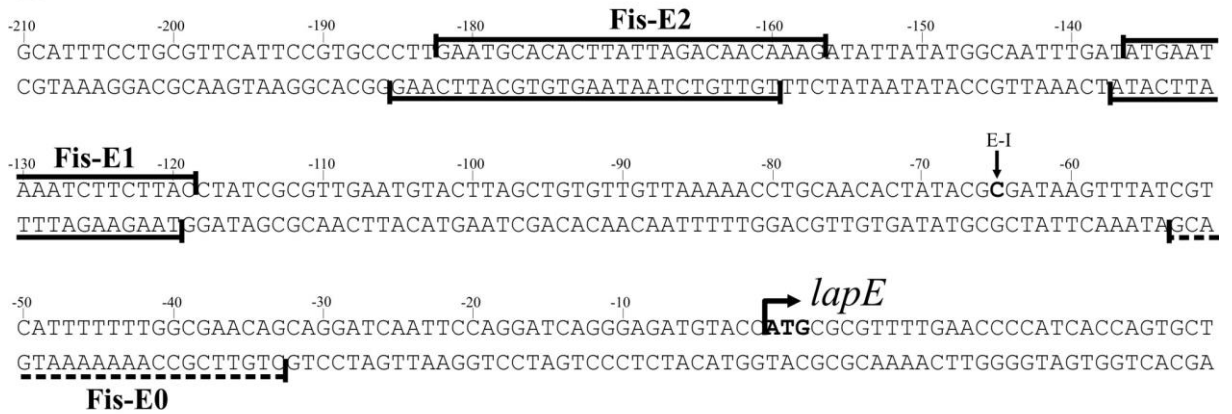
→ *lapF*

C

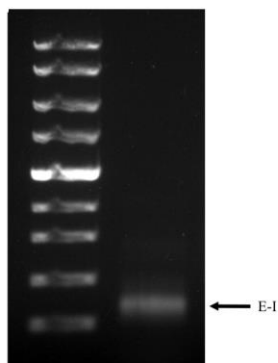




B



C



Lisa 5

A RACE-iga määratud *lapG*-geeni transkriptsiooni alguspunktid G-I ja G-II. Noolega on märgitud *lapG* geeni algus. **B** LapG-RACE2 ja Adapt_lyh-iga amplifitseeritud cDNA lahutatuna 1% agarosgeelis ning etiidiumbromiidiga värvituna (joonis Riho Teraselt).

A

```

-260      -250      -240      -230      -220      -210      -200      -190
GTCAAACCTGCACCCACACTGGTACGGGGCGCCCCAAAAGCGCGGCTATGGTGGAGGAAGTTCGCACGTCAAAGGAAGCTGC
CAGTTTGGACGTGGGTGTGACCATGCCCCGCGGGGTTTTTCGCGCCGATACCACCTCCTTCAGCGTGCAGTTTCCTTCGACG

-180      -170      -160      -150      -140      -130      -120      -110
CTATAGAAAGATGTAAGCAGAAAGTATAGGCGGGCTGACAGCCGGGTGCGTGATTGCAGGGTGCCATTTGTCTTTTGCGG
GATATCTTTCTACATTTCGTCTTTCATATCCGCCCCGACTGTCGGCCACGCACTAACGTCCCACGGTAAACAGAAAACGCC

-100      -90      -80      -70      -60      -50      -40      -30
TGGCAAGCCCCACCATCGCTGCTTTTCGACTGGTCTGAACAGGGCTTCGCAGTGGCGATATCCTGGTTGCTCAAACCGTA
ACCGTTCGGGGTGGTAGCGACGAAAGCTGACCAGACTTGTCCCGAAGCGTCACCGCTATAGGACCAACGAGTTTTGGCAT

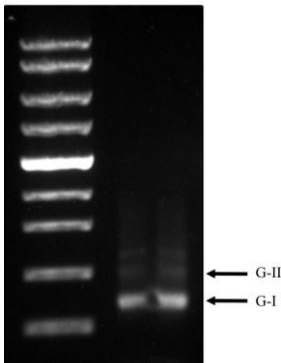
-20      -10
GTGCGCTATGTCGGCTTTGCCGTCCTGCTGGGCAGTCTTCTGCTGGGCGGCTTGCACGCGGATTGGGATTTCTCCAGAT
CACGCGATACAGCCGAAACGGCACGACGACCCGTGAGAAGACGACCCGCCGAACGTGCGCCTAACCCCTAAAGAGGGTCTA

          G-I
          ↓
          GTC

          G-II
          ↓
          AAGTTCGCACGTCAAAGGAAGCTGC

```

B



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Hanna Moor (21.04.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „*Pseudomonas putida* globaalse regulaatori Fis osalus biofilmi moodustumises”, mille juhendaja on Riho Teras
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **27.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013