

Tartu Ülikool

Bioлогия-Geograafiateaduskond
Molekulaar- ja rakubioloogia instituut
Geneetika õppetool

Paula Ann Kivistik

***Pseudomonas putida* kahekomponentse signaalsüsteemi
ColRS märklaudgeenid**

Magistritöö

Juhendaja:
Rita Hõrak, Ph.D.

Tartu 2006

Sisukord

Sisukord	2
Sissejuhatus	3
Kirjanduse ülevaade	4
I Bakteriraku membraan	4
1. Grampositiivsed ja gramnegatiivsed bakterid	4
2. Membraani funktsioon	5
II Kahekomponentne signaalsüsteem	7
1. Signaaliülekanne kahe valguga	7
2. Kahekomponentsete signaalsüsteemide funktsioon	9
3. Kahekomponentsed signaalsüsteemid perekonnas <i>Pseudomonas</i>	11
3.1. Kahekomponentne signaalsüsteem ColRS	11
Töö eesmärk	13
Eksperimentaalne osa	14
I Materjal ja meetodika	14
1. Töös kasutatud bakteritüved, söötmed ja plasmiidid	14
2. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs	15
3. Transformatsioon	16
4. Bakterite elektroporatsioon	16
5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	17
6. DNA sekveneerimine	18
7. Kromosoomse DNA eraldamine	18
8. <i>Pseudomonas putida</i> promootor-raamatukogu konstrueerimine ja ColR- sõltuvate promootorite tuvastamine	18
9. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramine	20
10. Valkude puhastamine	21
11. DNA <i>gel mobility shift</i> analüüs	21
12. <i>DNase I footprint</i> analüüs	22
II Tulemused	23
1. ColRS signaaliraja märklaudgeenide tuvastamine <i>Pseudomonas putida</i> kromosoomse promootor-raamatukogu abil	23
2. Potentsiaalsete ColR märklaudgeenide transkriptsiooni analüüs	25
3. ColR valk seondub <i>oprQ</i> ja <i>algD</i> promootoritele <i>in vitro</i>	26
4. ColR-i seondumiskoht <i>oprQ</i> promootor-regioonis	28
III Arutelu	30
Kokkuvõte	35
Summary	36
Kasutatud kirjandus	37

Sissejuhatus

Gramnegatiivsed mikroobid on mitmetele toksilistele ühenditele (näiteks antibiootikumidele, fenoolsetele ühenditele jpt) palju tolerantsemad kui grampositiivsed. Gramnegatiivsed bakterid on väliskeskkonna mõjurite eest paremini kaitstud, kuna nad on ümbritsetud kahe membraaniga. Välimine membraan, mis koosneb lipopolüsahhariididest, on hea barjäär erinevate ühendite vastu, kuna sahhariidne osa ei lase läbi lipofiilseid ühendeid ja lipiidne osa takistab hüdrofiilsete ühendite difusiooni raku sisemusse. Toksiliste ühendite olemasolul keskkonnas on mikroobile kasulikum vähe läbilaskev membraan. Teisest küljest peab membraan võimaldama ka eluks vajalike toitainete omastamist ja sellisel juhul osutub kasulikumaks läbilaskvam membraan. Seega peavad bakterid pidevalt reguleerima oma membraani läbilaskvust vastavalt elukeskkonna tingimustele.

Selleks, et tunnetada ümbritsevas keskkonnas toimuvaid muutusi ja reageerida neile adekvaatselt, kasutavad bakterid kahekomponentseid signaalsüsteeme. Kahekomponentse signaaliraja esimene osaline on sensorvalk, mis tunnetab rakuvälise signaali ja fosforüleerub selle tagajärjel. Seejärel toimub fosforüülühme ülekande vastuse regulaator-valgule, mis aktiveeritud kujul mõjutab märkaudgeenide ekspressiooni. Mullabakteri *Pseudomonas fluorescens*-i kahekomponentne signaalsüsteem ColRS on mikroobile oluline taimejuurte koloniseerimisel (Dekkers *et al.* 1998). Meie uurimisgrupp on täheldanud *Pseudomonas putida* ColRS süsteemi vajalikkust Tn4652 transpositsioonil rakkude nälgimisel fenooli sisaldaval söötmel (Hörak *et al.* 2004). Kuna ColRS signaaliraja täpne roll taimejuurte koloniseerimisel ja transpositsiooni regulatsioonis pole teada, siis saigi käesoleva töö eesmärgiks tuvastada ColRS süsteemi märklaudgeenid *P. putida* kromosoomi promootor- raamatukogu abil.

Käesoleva töö valmimise eest pean avaldama suurt tänu oma juhendajale Rita Hörakule. Samuti lähevad erilised tänud Heili Ilvesele ja Maia Kivisaarele ning kõikidele abivalmis laborikaaslastele.

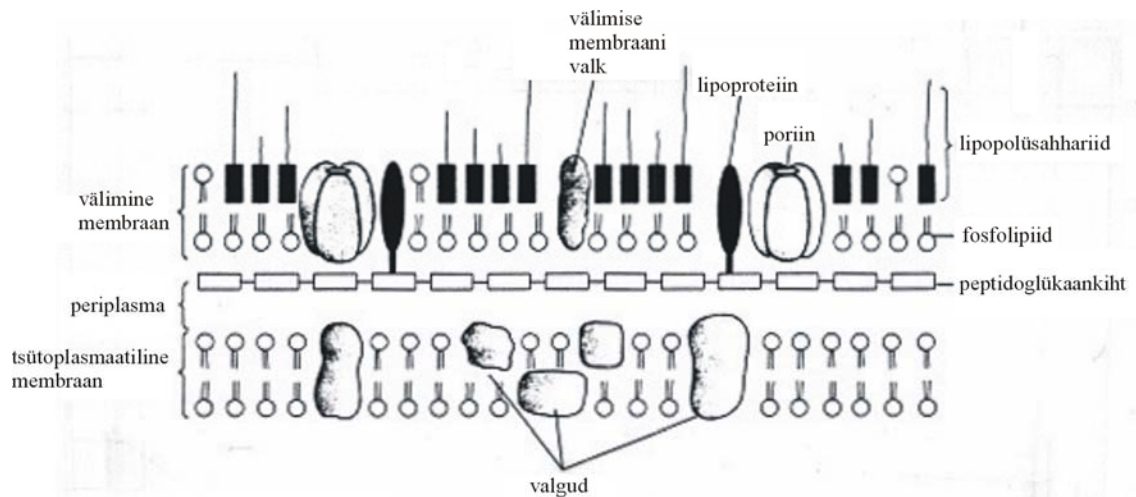
Kirjanduse ülevaade

I Bakteriraku membraan

Ainuraksete organismidena on mikroobid vahetus kontaktis ümbritseva keskkonnaga ning bakteri rakumembraan on barjääriks, mis eraldab raku sisemuse väliskeskkonnast. Membraan on fosfolipiididest koosnev kaksikkiht, millesse on sukeldunud mitmesugused valgud (Joonis 1). Fosfolipiidse kaksikkihi sisemisse osasse peituvad rasvhapete hüdrofoobsed sabad ja väljapoole jäävad rasvhapete polaarsed osad. Oma ehituse tõttu moodustab membraan hüdrofoobse barjääri rakusisese ja -välise vesikeskkonna vahele. Fosfolipiidset kaksikkihti ei suuda läbida vesi ega teised hüdrofiilsed molekulid ning laenguga osakesed, kuid hüdrofoobsed molekulid on võimelised passiivselt difundeeruma läbi membraani.

1. Grampositiivsed ja gramnegatiivsed bakterid

Rakumembraani ja ümbrise struktuuri eripärade järgi jaotatakse mikroobid kahte suurde rühma. Grampositiivsetel bakteritel katab fosfolipiididest tsütoplasmaatilist membraani paks peptidoglükaanist ümbris, mille koostis võib erinevatel liikidel suuresti varieeruda. Selline rakuümbris on näiteks grampositiivsetel bakteritel perekondadest *Bacillus* ja *Clostridium*. Gramnegatiivsetel bakteritel on samuti fosfolipiididest koosnev tsütoplasmaatiline membraan, kuid selle peal on õhem peptidoglükaankiht (Joonis 1). Õhukest peptidoglükaankihti katab välimine membraan, mille sisemise kihi moodustavad tavalised membraansed fosfolipiidid, kuid välimine osa koosneb keerulise struktuuriga lipopolüsahhariididest (LPS), mille struktuur erinevatel liikidel ja ka erinevates tingimustes varieerub. Gramnegatiivsete bakterite näideteks võib tuua perekonnad *Pseudomonas*, *Shigella* ja *Salmonella* ning ka uurijate lemmikobjekti inimese soolebakteri *Escherichia coli*. Järgnevalt keskendun põhiliselt gramnegatiivsete mikroobide membraani omaduste kirjeldamisele.



Joonis 1. Skemaatiline joonis gramnegatiivse bakteri membraani ehitusest (*Todar's Online Textbook of Bacteriology* joonist on modifitseeritud).

2. Membraani funktsioon

Bakteri rakumembraani peamine funktsioon on tagada barjäär raku sisemuse ja ümbritseva keskkonna vahel. Ühest küljest peab membraan olema võimalikult läbimatu erinevatele toksilistele ühenditele, et mikroobi paremini kaitsta. Membraan peab olema läbimatu ka ionidele ja laenguga ühenditele, sest ionide kontsentratsiooni erinevust kahel pool membraani kasutatakse raku varustamiseks energiaga. Teisest küljest võib suurema läbilaskvusega membraan kasulik olla, sest bakteril on vaja omastada läbi membraani kõik vajalikud keskkonnas olevad toitained ja väljutada metabolismi jääkproduktid. Seega peab membraani läbilaskvus olema reguleeritud igal ajahetkel vastavalt mikroobi vajadustele.

Gramnegatiivsete bakterite välismembraan on reeglina vähem läbilaskev kui grampositiivsete oma ja seepärast taluvad gramnegatiivsed mikroobid näiteks mitmeid antibiootikume paremini kui grampositiivsed (Nikaido 1994). Gramnegatiivsete bakterite rakuümbrise väikese läbilaskvuse tagab suures osas välimine membraan, milles lipopolüsahhariidid ei lase läbi membraani difundeeruda lisaks hüdrofiilsetele molekulidele ka hüdrofoobsetel ühenditel (Poole 2002). Membraani läbilaskvust on võimalik reguleerida lipopolüsahhariidide struktuuri ümberkorraldamise abil. Näiteks muutus *Salmonella enterica* rakkude membraan katioonsetele antibiootikumidele

paremini läbitavaks, kui rakud ei suutnud enam fosforüleerida lipopolüsahhariidide sahhariidset osa mutatsiooni tõttu kinaasi geenis (Poole 2002). Muutused LPS lipiidises osas suurendavad membraani läbilaskvust hüdrofoobsetele antimikroobsetele ühenditele nii *Salmonella enterica* kui ka *Escherichia coli* puhul (Poole 2002).

Välimises membraanis on erinevaid valkudest koosnevaid kanaleid, mille vahendusel saavad mikroobid keskkonnast kätte toitaineid ja vabanevad ainevahetuse jääkproduktidest. Välimise membraani kanalid võib jagada laias laastus kolme gruppi: poriinid, spetsiifilised kanalid ja suure afiinsusega retseptorid (Nikaido 1994).

- Poriinid on trimeersed veega täidetud kanalid bakteri välimises membraanis ja nad võimaldavad mittespetsiifiliselt väikeste, hüdrofiilsete molekulide kiiret difusiooni rakust välja ja sisse (Nikaido 1994). *Escherichia coli* peamisteks poriinideks on OmpF ja OmpC, mida mööda liiguvad positiivse laenguga ühendid ning PhoE, mida mööda difundeeruvad paremini negatiivse laenguga molekulid (Nikaido 2003).
- Spetsiifilistel kanalitel on olemas seondumiskoht kindlale ligandile. Spetsiifilisi kanaleid mööda liiguvad toitained, mis on liiga suured või mille liikumine toimub liiga aeglaselt, et piisaks nende difusioonist mööda tavalisi poriine. Näiteks võimaldab *E. coli* LamB valgukanal maltoosi ja maltodekstriinide liikumist rakku (Nikaido 2003). Bakteril *Pseudomonas aeruginosa* on mitmetele ühenditele spetsiifilisi kanaleid, näiteks OprB, mis vahendab glükoosi difusiooni ja OprD, mis on aluselisi aminohappeid läbilaskev kanal (Nikaido 1994).
- Suure afiinsusega retseptorid aitavad transportida rakku suuri molekule, mille kontsentratsioon ümbritsevas keskkonnas on väike. Näiteks transpordib *E. coli* retseptor BtuB rakku vitamiini B₁₂ (Nikaido 2003).

Bakteritel on tihti vaja reguleerida membraani läbilaskvust vastavalt ümbritsevas keskkonnas olemasolevatele ühenditele ja see toimub enamasti erinevate kanalite hulka reguleerides. Selline regulatsioon on võimalik näiteks tänu kahekomponentsetele signaalsüsteemidele, mis edastavad välise signaali raku sisemusse. Näiteks sõltub *E. coli* poriinide OmpC ja OmpF arvukus membraanis

keskkonna osmolaarsusest ja nende ekspressiooni kontrollib osmolaarsusele reageeriv signaalsüsteem EnvZ-OmpR (Pratt *et al.* 1996), millest tuleb pikemalt juttu allpool.

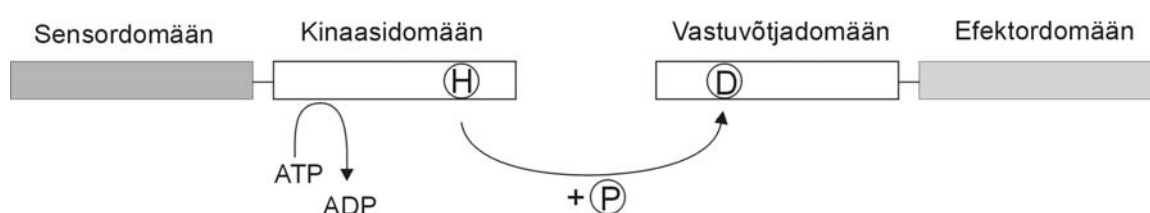
II Kahekomponentne signaalsüsteem

Mikroobidel on väliste muutuste tunnetamiseks mitmeid kahekomponentseid signaalsüsteeme, mis tavaliselt moodustavad umbes 1% kõikidest bakteri poolt kodeeritavatest valkudest (West and Stock 2001). Kahekomponentsetest signaalsüsteemidest kirjeldati esimesena *Escherichia coli* NR süsteemi, mis reguleerib geeniekspressiooni vastavalt lämmastiku olemasolule või puudumisele keskkonnas (Ninfa and Magasanik 1986). Hiljem on ka teistes bakteriliikides kirjeldatud mitmeid signaaliradu, mis reguleerivad väga erinevaid protsesse. Kahekomponentsete signaalsüsteemide arvukus varieerub mikroobidel vastavalt nende genoomi suurusele ja nende poolt asustatavale elukohale. Näiteks on inimese sooles elaval bakteril *Escherichia coli* 30 erinevat kahekomponentset signaalsüsteemi (Mizuno 1997). Samas väikseimal bakteril *Mycoplasma genitalium* puuduvad need süsteemid hoopiski (Chang and Stewart 1998). Tänapäevaks on selgunud, et kahekomponentseid signaaliradasid leidub ka mitmetes eukarüootides, näiteks võib tuua uurijate lemmikobjektiks saanud taime *Arabidopsis thaliana* (Mizuno 2005). Käesolevas töös piirdun ma siiski vaid bakteriaalsete kahekomponentsete signaalsüsteemide kirjeldamisega.

1. Signaaliülekanne kahe valgu vahel

Bakteriaalne kahekomponentne signaalsüsteem koosneb reeglina kahest valgust: membraanis paiknevast sensorvalgust ehk histidiin-kinaasist ja vastuse regulaatorvalgust, mis on enamasti transkriptsioonifaktor. Sensorvalk koosneb kahest domäänist: membraan-seoselisest sensordomäänist ja tsütoplasmaatilisest kinaasidomäänist. Sensordomään tunnetab mingit keskkonnas toimuvat muutust ja reageerib vastusena sellele. Signaali olemasolul, milleks on ligandi seondumine

sensoridomääniga, sensorvalk aktiveerub ja autofosforüleerib konserveerunud histidiini jäägi oma tsütoplasmaatilises domäänis kasutades fosforüülrühma doonorina ATP-d (Joonis 2). Vastuse regulaator-valk koosneb samuti kahest osast: vastuvõtjedomäänist ja efektordomäänist. Vastuse regulaator katalüüsib fosforüülrühma ülekannet fosforüleerunud sensorvalgult oma vastuvõtjedomäänis asuvale konserveerunud asparagiinhappele (Joonis 2). Seega toimub kahekomponentsetes süsteemides signaali edastamine järjestikuste fosforüleerumis- ja defosforüleerumisreaktsioonide vahendusel.



Joonis 2. Joonisel on kujutatud kahekomponentse süsteemi signaaliülekanne sensorvalgult vastuse regulaatorile. Keskkonnast saadud signaali tagajärjel fosforüleerib sensorvalk ATP arvelt oma kinaasidomäänis paikneva konserveerunud histidiini (H). Seejärel toimub fosforüülrühma (P) ülekanne vastuse regulaatori vastuvõtjedomäänis asuvale konserveerunud asparagiinhappele (D).

Fosforüleerunud vastuse regulaator omandab uue konformatsiooni, mille tagajärjel muutub ta võime seonduda DNA-ga. Enamus vastuse regulaatoreid on transkriptsioonifaktorid ja seega aktiveerivad või represseerivad märklaudgeene vastavalt välise signaali olemasolule või puudumisele. Esineb ka erandlikke vastuse regulaatoreid, mis osalevad muude protsesside mõjutamises. Näiteks seondub *Pseudomonas aeruginosa* vastuse regulaator AmiR hoopis RNA-ga (Shu and Zhulin 2002) ja *Escherichia coli* vastuse regulaator SprE reguleerib ClpXP proteaasi aktiivsust (Pratt and Silhavy 1996).

Tavaliselt on vastuse regulaatoril ka autofosfataasne aktiivsus, mis võimaldab vähendada valgu fosforüleeritud oleku eluiga (West and Stock 2001). Lisaks vastuse regulaatorile on ka paljudel sensorvalkudel võime defosforüleerida oma partnerit – vastuse regulaatorit. Vastuse regulaatori fosforüleeritud seisundi lühike eluiga on

tähtis, kuna see võimaldab tagada täpsema geeniekspressiooni regulatsiooni vastavalt signaali olemasolule keskkonnas. Enamike kahekomponentsete signaalsüsteemide vastuse regulaatorid seonduvad ka oma promootorile ja autoreguleerivad enda geenide ekspressiooni. Sellisel juhul on neil tavaliselt kaks promootorit, millest üks on konstitutiivne ja teiselt aktiveeritakse transkriptsioon vastuse regulaatori seondumisel (Bijlsma and Groisman 2003).

2. Kahekomponentsete signaalsüsteemide funktsioon

Kahekomponentsed signaalirajad kontrollivad bakterites väga erinevaid elutegevuseks vajalikke protsesse nagu näiteks raku jagunemist, rakkudevahelist kommunikatsiooni, sporulatsiooni, kemotaksist, metabolismi, transporti, osmoregulatsiooni, stressivastust, virulentsust jm.

Üheks enim uuritud näiteks kahekomponentsetest süsteemidest on *Escherichia coli* EnvZ-OmpR, mis kontrollib bakteri välimise membraani poriinide OmpF ja OmpC ekspressiooni (Pratt *et al.* 1996). Valgud OmpF ja OmpC moodustavad välimise membraani trimeerseid kanaleid, mida mööda difundeeruvad väikesed, hüdrofiilsed ühendid. OmpF tekitab suurema diameetriga kanaleid kui OmpC ja seetõttu toimub väikeste molekulide liikumine mööda OmpF kanaleid kiiremini (Pratt *et al.* 1996). Inimese sooles, kus on *Escherichia coli* looduslik elupaik, leidub mikroobile palju toitaineid, kuid ka palju toksilisi ühendeid. Sellises keskkonnas on bakteri membraanis enam esindatud poriin OmpC, mille kaudu toimub ainete liikumine aeglasemalt (Pratt *et al.* 1996). Puhtas vees on toitainete kontsentratsioon madal ja sellistes tingimustes on membraanis rohkem poriini OmpF, mis võimaldab toitainete efektiivsemat omastamist (Pratt *et al.* 1996). Seega reguleerib *Escherichia coli* oma membraani läbilaskevõimet vastavalt toitainete olemasolule väliskeskkonnas. Ümbruskonna toitainete rikkusest sõltub keskkonna osmolaarsus ja seda tunnetab sisemises membraanis paiknev sensorvalgk EnvZ (Forst *et al.* 1989). EnvZ paariline on vastuse regulaator OmpR, mis seondub poriinide *ompF* ja *ompC* promootoraladele umbes 90 bp transkriptsiooni alguskohast ülesvoolu (Pratt *et al.* 1996). Madala osmolaarsuse korral on sensorvalgu EnvZ fosfataasne aktiivsus suurem kui kinaasne

ja seetõttu on vaid väike hulk vastuse regulaatorist fosforüleeritud. Vähesest kogusest fosforüleerunud OmpR valgust piisab *ompF* transkriptsiooni käivitamiseks (Yoshida *et al.* 2006) ja see võimaldab madala osmolaarsusega keskkonnas kiiremat toitainete omastamist suurema diameetriga OmpF poriinide vahendusel. Kõrge osmolaarsusega keskkonnas on suurem osa OmpR valgust fosforüleeritud. Sellisel juhul represseritakse *ompF* transkriptsioon ja aktiveeritakse *ompC* transkriptsiooni (Yoshida *et al.* 2006), mistõttu on membraanis rohkem kitsama kanaliga OmpC poriine.

Teine põhjalikult uuritud kahekomponentne signaalsüsteem on PhoP-PhoQ, mis esineb mitmetel gramnegatiivsetel perekondadel nagu *Shigella*, *Yersinia* jt, kuid kõige rohkem on antud signaalirada uuritud patogeenses enterobakteris *Salmonella* (Groisman 2001). PhoQ on tsütoplasmaatilises membraanis paiknev sensorvalk ja PhoP on tsütoplasmaatiline vastuse regulaator-valk. Sensori PhoQ signaaliks, mille ta edastab fosforüülrühma ülekande vahendusel vastuse regulaatorile, on rakuväline Mg^{2+} kontsentratsioon (Groisman 2001). Väikese ehk mikromolaarse Mg^{2+} kontsentratsiooni juures indutseerib vastuse regulaator PhoP transkriptsiooni oma märklaudgeenidelt ja suure ehk millimolaarse kontsentratsiooni juures ta represserib vastavate geenide ekspressiooni (Groisman 2001). Ka suur Ca^{2+} ja Mn^{2+} kontsentratsioon väliskeskkonnas põhjustab vastuse regulaatori PhoP poolt reguleeritud promootorite transkriptsiooni repressiooni (Groisman 2001). Vastuse regulaator PhoP reguleerib ligikaudu 40 geeni ekspressiooni, mis moodustavad umbes 1% *Salmonella* poolt kodeeritavatest geenidest. Mitmed PhoP poolt aktiveeritavad geenid kodeerivad välimises membraanis paiknevaid valke, mille funktsioonideks on näiteks välimise membraani lipiididele aminoarabinoosi lisamine ning nende palmitüleerimine ja müristüleerimine (Ernst *et al.* 2001). Seega toimuvad nende ensüümide töö tulemusena mitmed muutused bakteri välimises membraanis: väheneb pinna negatiivne laeng, suureneb membraani hüdrofoobsus ja muutub valkude kompositsioon membraanis (Ernst *et al.* 2001). PhoP-PhoQ signaaliraja peamiseks funktsiooniks peetaksegi rakumembraani ümberkujundamist ja lipopolüsahhariidide modifitseerimist (Ernst *et al.* 2001). On näidatud, et sellised membraani muutused võimaldavad bakteril paremini võidelda peremehe immuunsüsteemiga (Ernst *et al.* 2001). Viimasel põhjusel on ka PhoP-PhoQ signaalirada oluline paljude gramnegatiivsete patogeenide virulentsuseks (Groisman 2001).

3. Kahekomponentsed signaalsüsteemid perekonnas *Pseudomonas*

Perekonna *Pseudomonas* esindajad asustavad väga mitmesuguseid bioloogilisi paiku, alates mullast ja veest ning lõpetades taimede ja loomadega. Pseudomonaadidel on arvukalt kahekomponentseid signaalsüsteeme, mis aitavad toime tulla ja kohaneda erinevate keskkonnatingimustega. Näiteks leidub *Pseudomonas aeruginosa* genoomis üle 100 kahekomponentse signaaliraja komponendi geeni, millest 64 geeni kodeerib vastuse regulaatoreid ja 63 geeni kodeerib histidiin-kinaase (Rodrigue *et al.* 2000). Nendest signaalsüsteemidest vaid vähestel on täpne funktsioon teada. Hiljuti näidati, et kahekomponentse signaaliraja RocS1-RocA1 vastuse regulaator RocA1 aktiveerib mitmete adhesiinigeenide ekspressiooni ja kontrollib seeläbi *P. aeruginosa* biofilmi moodustamist vastavalt keskkonnast saadud signaalile (Kulasekara *et al.* 2005). *P. aeruginosa* PprB-PprA süsteem reguleerib virulentsusfaktorite tootmist ja bakteri ujumis- ning roomamisvõimet, mis on kontrollitud ka hulgatunnetuse (ingl. k. *quorum sensing*) signaaliraja poolt (Dong *et al.* 2005). Selgus, et PprB-PprA signaalirada mõjutab hulgatunnetuse poolt reguleeritud geenide ekspressiooni, kuna ta muudab rakumembraani hulgatunnetuse signaalmolekuli suhtes paremini läbilaskvaks (Dong *et al.* 2005). Nii RocS1-RocA1 kui ka PprB-PprA süsteemi aktiveeriva signaali kohta pole seni informatsiooni.

Pseudomonas aeruginosa asustab väga mitmesuguseid paiku, näiteks koloniseerib ta edukalt inimeste põletushaavu ja tsüstilise fibroosi patsientide kopse ning samuti põhjustab erinevaid põletikke nõrgenenud immuunsüsteemiga inimestel. Suure tõenäosusega võimaldab just suur kahekomponentste signaaliradade võrgustik *P. aeruginosa*-l kohaneda nii mitmekülgete elukohtadega.

3.1. Kahekomponentne signaalsüsteem ColRS

Kahekomponentne signaalsüsteem ColRS koosneb sensorvalgust ColS ja vastuse regulaator-valgust ColR ning ta kirjeldati esmakordselt mullabakteris *Pseudomonas fluorescence* (Dekkers *et al.* 1998) kui süsteem, mis on oluline bakterile taimejuurte koloniseerimisel. Kui ColRS signaaliraja suhtes defektseid baktereid kasvatati koos

metsiktüüpi *P. fluorescence* tüvega kartuli-, tomati-, redise- ja nisujuurtel, siis ilmnes, et ColRS süsteemi puudumisel ei suuda bakter konkureerida algse tüvega taimejuurte koloniseerimises (Dekkers *et al.* 1998). Kui aga ColRS raja suhtes puudulikku tüve kasvatati taimede juurtel üksi, siis toimus koloniseerimine sama edukalt kui metsiktüüpi tüvel (Dekkers *et al.* 1998). ColRS süsteemi osale taimejuurte koloniseerimisel viitab ka fakt, et *Pseudomonas putida* sensorvalgu ColS ekspressioon on indutseeritud maisijuurte poolt (Ramos-Gonzalez *et al.* 2005). Seega on tõenäoline, et ColRS süsteemil on sarnane funktsioon mõlemas *Pseudomonase* perekonna mullabakteris, kuigi tema täpne roll bakteri kolonisatsioonivõime tagamisel ei ole selgunud. Inimese kopsu koloniseeriva *Pseudomonas aeruginosa* kohta on teada, et vastuse regulaatori ColR promootor reguleeritakse kümnekordselt üles kasvatamisel koos teiste kopsu asustavate bakteritega ehk nn. konkurentsi tingimustes (Duan *et al.* 2003). Seega on nii *P. fluorescence*-i kui ka *P. aeruginosa* ColRS süsteemi olulisust täheldatud just konkurentsi tingimustes, mis omakorda vihjab ColRS signaaliraja osalusele rakkudevahelises kommunikatsioonis.

Lisaks eespool mainitule on selgunud meie grupis tehtud uurimistöö tulemusena, et *Pseudomonas putida* signaalsüsteem ColRS on vajalik mobiilse elemendi Tn4652 transpositsiooniks tingimustes, kus rakud nälgivad fenooli sisaldaval söötmel (Hõrak *et al.* 2004). Nii *colR* kui *colS* geeni katkestamisel langes Tn4652 transpositsiooni tagajärjel fenooli tarbivate (Phe^+) kolooniate tekkesagedus umbes kümme korda võrreldes algse *P. putida* tüvega (Hõrak *et al.* 2004). Seni publitseerimata andmed näitavad, et ColRS signaalirada mõjutab Tn4652 transpositsiooni ainult fenooli selektsiooni tingimustes (H. Ilvese ja R. Hõraku avaldamata andmed). Samuti viitavad esialgsed tulemused, et ColRS süsteem osaleb *P. putida* fenoolitolerantsuse regulatsioonis (M. Putrinši ja R. Hõraku avaldamata andmed) ja et Tn4652 transpositsiooni mõjutab antud signaalirada kaudselt. Kuigi on mitmeid viiteid ColRS signaaliraja funktsioonile, ei ole teada millised on tema poolt otseselt reguleeritavad geenid.

Töö eesmärk

Kirjanduse ülevaate osas tutvustasin lühidalt *Pseudomonas* perekonna signaalirajale ColRS omastatud funktsioone. ColRS süsteem on oluline taimejuurte koloniseerimisel (Dekkers *et al.* 1998) ja Tn4652 transpositsioonil fenooli selektsiooni tingimustes (Hõrak *et al.* 2004). Meie avaldamata tulemused viitavad, et ColRS signaalirada on oluline *P. putida* fenoolitolerantsuses. Järjestuse analüüsi järgi võiks vastuse regulaator ColR olla DNA-ga seonduv transkriptsioonifaktor, kuid seni pole andmeid tema märklaudgeenidest. Samas aitaks märklaudgeenide tuvastamine kaasa ColRS signaaliraja täpse funktsiooni paljastamisele. Seepärast saigi minu töö eesmärgiks välja selgitada vastuse regulaatori ColR märklaudgeenid *P. putida* kromosoomse promotoor-raamatukogu abil.

Eksperimentaalne osa

I Materjal ja meetodika

1. Töös kasutatud bakteritüved, söötmed ja plasmiidid

Söötmetena kasutati LB-söödet (Miller 1972) või M9 minimaalsöödet (Adams, 1959), millele lisati mikroelementide lahust (Bauchop and Elsdén 1960) ning süsinikuallikana glükoosi lõppkontsentratsiooniga 10 mM või fenooli lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. Plasmidi või tüve seleksiooniks kasutati antibiootikume: karbenitsilliini (Cb) (1,5 mg/ml), kanamütsiini (Km) (0,05 mg/ml), klooramfenikooli (Cm) (0,02 mg/ml). Promootori aktiivsuse visuaalseks hindamiseks tassidel kasutati X-Gal-i (5-bromo-4-kloro-3-indolüül- β -D-galaktopüranosiid) ja X-Gluc-i (5-bromo-4-kloro-3-indolüül- β -D-glukuroonhape, tsükloheksüülammooniumi sool). P_{tac} promootori indutseerimiseks kasutati 0,5 mM IPTG-d (isopropüül- β -tio-galaktosiid). *Escherichia coli* rakke kasvatati 37°C juures ja *Pseudomonas putida* rakke 30°C juures. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Kasutatud bakteritüved ning plasmiidid on toodud Tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Genotüüp või iseloomustus	Allikas või viide
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Miller 1992
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> <i>gal</i> (λ <i>clts857</i> <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7</i> gene <i>l</i>)	Studier and Moffatt 1986
<i>Pseudomonas putida</i> PaW85	Tn4652	Bayley <i>et al.</i> 1977
<i>P. putida</i> PaWcolR	PaW85 <i>colR::Km^r</i>	Hörak <i>et al.</i> 2004
<i>P. putida</i> PaWRtaccolRD51A	PaWcolR+ <i>colRD51A</i> P_{tac} promootori ja <i>lacI^r</i> repressori kontrolli all (Km^r Tel ^r)	Hörak <i>et al.</i> 2004
Plasmiidid	Iseloomustus	Allikas või viide
p9TT β lacZ	promootori testvektor (Amp^r Cm ^r)	Rita Hörak
p9TTpheAgusA	pPR9TT sisaldab promootorit <i>pheA</i> ja <i>gusA</i> geene (Amp^r Cm ^r)	Heili Ilves
pET11c/hicolR	pET11c sisaldab N-terminaalse <i>his₆</i> sabaga <i>colR</i> geeni (Amp^r)	Hörak <i>et al.</i> 2004
pET11c/ Δ 158colShis	pET11c sisaldab N-terminusest kärbitud <i>colS</i> geeni C-terminaalse <i>his₆</i> sabaga (Amp^r)	Hörak <i>et al.</i> 2004

2. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks tsentrifugeeriti (tsentrifuugiga “Eppendorf” 5415 C, 30 sekundit, maksimumpööretel) üleöö 4 ml-s LB vedelkultuuris kasvanud rakud söötmet välja, rakud suspendeeriti 300 µl-s SET-lahuses (8% sahharoos; 50 mM EDTA ehk etüleen-di-amiin-tetra-äädikhape; 50 mM TrisHCl, pH 8,0). Rakususpensioonile lisati 50 µl lüsotsüümilahust (20 mg/ml), segati ja lasti seista toatemperatuuril 5 minutit. Seejärel lisati 300 µl TET-lahust (1% Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM TrisHCl; pH 8,0), segati ning hoiti 3 minutit 96°C juures. Lüüsunud bakterirakke tsentrifugeeriti maksimumpööretel 10 minuti jooksul 4°C juures. Sade eemaldati tikuga ja lahusele lisati 800 µl isopropanooli. Peale loksutamist tsentrifugeeriti lahust 10 minuti jooksul maksimumpööretel. Vedelik eemaldati ja sade lahustati 50 µl-s RNAasi sisaldavas vees (20 µg/ml) ning hoiti 30 minutit 37°C juures. Seejärel ekstraheeriti DNA-d sisaldavat lahust fenooli ja kloroformiga. DNA lahusele lisati 1/10 mahtu 5 M NaCl ja DNA sadestati 10 minuti jooksul –20°C juures 2 mahu 96%-se etanooliga ning tsentrifugeeriti 8 minutit maksimumpööretel 4°C juures. DNA sade pesti 75%-se etanooliga ning lahustati H₂O-s.

Geelelektroforeesiks lisati DNA-le 0,04%-list broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis, 20 µl proovi kohta 4 µl. Proov kanti etiidiumbromiidi sisaldavale 1%-sele agarosgeelile TAE-puhvril (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2). Elektroforees toimus toatemperatuuril pingel 100-200 V. Geeli pildistati ultravioletvalguses.

Plasmiidse DNA restriksiooniks kasutati firma Fermentas ensüüme. Reaktsioonid viidi läbi tingimustel, mis olid ette nähtud Fermentase kataloogis. Peale restriksiooni toimumist lisati restriksioonisegule broomfenoolsinise lahust 50%-lises glütseroolis ning kanti agarosgeelile (1 % agarosgeel TAE puhvril).

3. Transformatsioon

Transformatsiooniks kasvatati retsipienttöve rakke LB vedelsöötmes tiheduseni 0,2–0,3 (mõõdeti spektrofotomeetriselt lainepikkusel 580 nm, OD₅₈₀). Rakud viidi kompetentseteks Hanahani (Hanahan 1983) meetodil. Transformatsiooniks kasutati ligikaudu 0,1 µg DNA-d. Transformeeritud rakke hoiti 30 minutit jääl, seejärel 5 minutit 37°C juures ning veel 10 minutit jääl. Siis külvati rakud 1,5 ml LB vedelsöötmesse ning pärast 1-tunnist kasvatamist loksutil tsentrifuugiti (tsentrifuugiga “Eppendorf” 5415 C, 30 sekundit maksimumpööretel) rakud söötimest välja ja hõõruti antibiootikumi sisaldavale tardsöötmele.

4. Bakterite elektroporatsioon

Retsipienttöve rakke kasvatati 50 ml-s YENB-söötmes (0,75% “Bacto yeast extract”; 0,8% “Bacto nutrient broth”): *E. coli* kasvatati optilise tiheduseni 0,5-0,9 ning *P. putida* tiheduseni 1 (λ 580 nm). Rakud tsentrifuugiti söötimest välja, pesti kahel korral destilleeritud veega ja ühe korra 10%-se glütserooliga. Seejärel suspendeeriti rakud 200 µl 10%-ses glütseroolis ja jaotati eppendorfi tuubidesse.

Rakkudele (40 µl) lisati ~ 0,1 µg vees lahustatud DNA-d ja hoiti 1 minut jääl. Seejärel pipeteeriti rakud elektroporatsiooni küveti, mida oli jahutatud jääl. Elektroporatsioon teostati “BioRad`i” elektroporaatoriga pingel 2500 V. Rakud pesti küvetist välja 0,5 ml LB-söötmega ja külvati 1,5 ml-sse LB-söötmesse. Pärast tunnist kasvatamist loksutil tsentrifuugiti rakud söötimest välja ja hõõruti selektiivplaadile.

5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-s (ingl. k *Polymerase Chain Reaction*) kasutati matriitsina eelnevalt eraldatud plasmiidset DNA-d (~10 ng) või rakke. PCR toimus 20 µl-s. Reaktsioonisegu sisaldas: 1 x Fermentase PCR-i puhvrit; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,5 ühikut *Taq* DNA polümeraasi ja praimereid (10-20 pmol reaktsiooni kohta). Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 2.

PCR-i 25 tsüklit toimusid enamasti järgmistes tingimustes: 1) DNA denaturatsioon – 1 minut 96°C juures; 2) praimeri kinnitumine matriitsile – 1 minut 54°C juures; 3) DNA süntees – 1-3 minut (sõltuvalt amplifitseeritava DNA fragmendi pikkusest) 72°C juures.

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Oligon. nimi	Oligonukleotiidi järjestus	Lokalisatsioon ja iseloomustus
pheAval	5`-TGCTCAAGATTATCATTACGCT-3`	komplementaarne <i>pheA</i> geeniga positsioonides 11 kuni 32
T1T2	5`-GGCCTTTTTGCGTAGATC-3`	positsioonid 9013-9030 plasmiidis pPR9TT
267start	5`-GGGTACAAGCATGGGCACAT-3`	positsioonid 468-488 <i>oprQ</i> geeni startkoodonist ülesvoolu
268gatc	5`-ATCCAGCCGGGTGGGCCGA-3`	positsioonid 86-104 <i>oprQ</i> geeni startkoodonist ülesvoolu
OprQ	5`-CACGCTCTGCCTGCTCCCAG-3`	positsioonid 332-351 <i>oprQ</i> geeni startkoodonist ülesvoolu
PP1289stopp	5`-ATCACCCCGCGGAGTGAGC-3`	komplementaarne järjestusega <i>algD</i> geenist ülesvoolu positsioonides 818 kuni 836
algDprom	5`-TTCTCATGGCGGGCAGTGG-3`	komplementaarne järjestusega <i>algD</i> geenist ülesvoolu positsioonides 357 kuni 375
ompAATG	5`-TAATCAGACGACGCATGGTG-3`	komplementaarne <i>ompA</i> startkoodoni ja ümbritseva järjestusega
ompASma	5`-ATACCCCGGGCTCGATGAG-3`	positsioonid 338-357 <i>ompA</i> geeni startkoodonist ülesvoolu
Csuylemine	5`-GGCAACCGATCAGTTCGCG-3`	positsioonid 371-389 <i>csuB</i> geeni startkoodonist ülesvoolu
CsuBalg	5`-GTAGCAGTGAGGCGGCGCA-3`	komplementaarne <i>csuB</i> geeniga positsioonides 14 kuni 32

6. DNA sekveneerimine

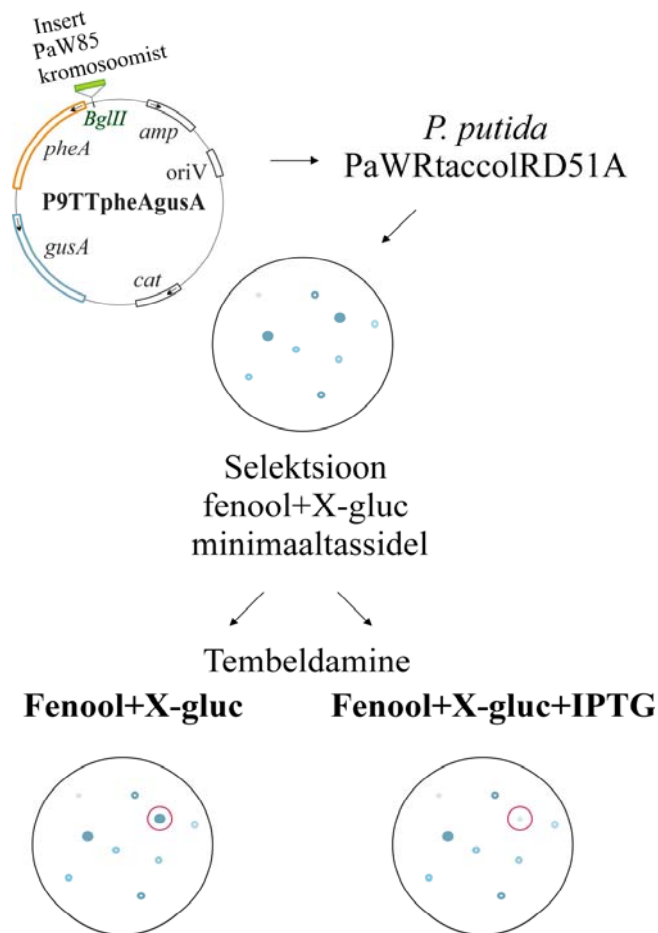
DNA järjestused määrati automaatsekvenaatori ABI Prism 377 DNA Sequencer abil. PCR-is erinevate praimeritega amplifitseeritud DNA-d võeti sekveneerimisreaktsiooni ~0,5 µg ning proovid valmistati DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit'i ("Amersham Pharmacia Biotech Inc") ja vastava protokolliga abil. Sekveneerimisel kasutati praimerina (~4 pmol) fenooli monooksügenaasi (*pheA*) geeni järjestusega komplementaarset praimerit pheAval ja plasmidi pPR9TT polülimeri regioonis komplementaarset praimerit T1T2 (Tabel 2).

7. Kromosoomse DNA eraldamine

Kromosoomi eraldamiseks kasvatati *P. putida* PaW85 rakke üleöö 4 ml-s LB-puljongis. Rakud tsentrifugeeriti söötmetest välja, pesti 1 ml NaCl-ga (1 M), külmutati – 70°C juures ning seejärel sulatati jääl. Rakkudele lisati 400 µl TE10/1, 50 µl 5 M NaCl, 50 µl 10 % SDS, 25 µl proteinaas K lahust (20 mg/ml), suspendeeriti korralikult ja inkubeeriti üleöö 37°C juures. Kromosoom sadestati 2 mahu etanooliga (96 %) ja lahustati RNAasi sisaldavas vees (40 µg/ml) ning hoiti 30 minutit 37°C juures. Seejärel ekstraheeriti kromosoomi sisaldavat lahust fenooli ja kloroformiga ning DNA sadestati 1/10 mahu 5 M NaCl juuresolekul võrdse mahu 96 % etanooliga – 20°C juures. Kromosoomisade eraldati tsentrifugeerimisel 4°C juures, pesti etanooliga (75 %) ja lahustati TE10/1 puhvril (10 mM TrisHCl; 1 mM EDTA; pH 7,4).

8. *Pseudomonas putida* promootor-raamatukogu konstrueerimine ja ColR-sõltuvate promootorite tuvastamine

P. putida PaW85 kromosoomile tehti osaline lõikus ensüümiga Sau3AI. Fragmendid eraldati elektroforeesil, kasutades madalal temperatuuril sulavat agarosi (Sigma). Ligikaudu 1 kb pikkused fragmendid kioneeriti ensüümiga BglII avatud plasmidi p9TtpheAgusA promootorita reporter geenide *pheA* ja *gusA* ette (Tabel 1 ja Joonis 3).



Joonis 3. ColR-sõltuvate promootorite selektsiooniskeem. Joonisel on kujutatud plasmiid p9TTpheAgusA, mida kasutati PaW85 kromosomaalse promootor-raamatukogu konstrueerimiseks. *pheA*, *gusA*, *amp* ja *cat* tähistavad joonisel vastavalt fenooli monooksügenaasi, β -glukuronidaasi, ampitsilliini/karbenitsilliini ja klooramfenikooli geene. ColR-sõltuvate promootorite tuvastamiseks elektroporeeriti raamatukogu *P. putida* tüvesse PaWRtaccolRD51A ja promootoriga inserte sisaldavad plasmiidid selekteeriti välja fenool-minimaaltassidel, mis sisaldasid X-Gluc-i. PaWRtaccolRD51A tüves saab IPTG lisamisel indutseerida fosforüleerumisvõimetu ColR-i ekspressiooni ja seetõttu võimaldab kolooniate paralleelne tembeldamine IPTG-ga ja ilma fenooli tassidele väljaselgitada ColR-sõltuvaid promootoreid.

Ligeerimissegu elektroporeeriti *E. coli* tüvesse DH5 α ja kasvatati tund aega 37°C juures. Seejärel külvati rakud 2 liitrisse LB-sse, kuhu oli lisatud klooramfenikooli raamatukogu-plasmiidide amplifitseerimiseks ja kasvatati 37°C juures optilise tiheduseni 0,6 (OD₅₈₀). Rakud tsentrifuugiti söötmest välja ja eraldati plasmiidne DNA. Enne amplifitseerimise etappi plaaditi 1/100 rakukultuurist klooramfenikooliga LB tassile ja seal kasvama hakanud kolooniate arvu järgi võib öelda, et konstrueeritud raamatukogu sisaldab ligikaudu 130 000 kloni plasmiidset DNA-d. Analüüs PCR meetodil praimeritega

pheAval ja T1T2 (Tabel 2) paljastas, et umbes 80 % kloonidest sisaldab reportergeenide ees *P. putida* kromosoomi fragmenti. Kloneerunud fragmentidest pooled olid 1 kb pikkused ja pooled olid 2-3 kb pikkused. Hilisem sekveneerimine näitas, et pikkade fragmentide korral oli vektorisse inserteerunud mitu erinevat fragmenti PaW85 kromosoomist.

Raamatukogust ColR-sõltuvate promootorite väljasõelumiseks elektroporeeriti raamatukogu-plasmiidid *P. putida* tüvesse PaWRtaccolRD51A (Tabel 1) ja selekteeriti fenool-minimaaltassidel, millele oli lisatud X-Gluc-i. Ainult promootorit sisaldava plasmiidiga rakud suudavad hakata kasvama fenoolil. Tekkinud kolooniad värvuvad X-gluc-i juuresolekul siniseks vastavalt *gusA* geenilt toimuva transkriptsiooni aktiivsusele. PaWRtaccolRD51A tüves on võimalik indutseerida fosforüleerumisvõimetu ColR valgu ekspressioon IPTG lisamisel. Seetõttu tembeldati kolooniad paralleelselt IPTG-ga ja ilma IPTG-ta fenooli tassidele ja võrreldi paralleeltassidele tekkivate kolooniate kasvu ja värvust (Joonis 3). ColR-sõltuvust näidanud kloonidest eraldati raamatukogu-plasmiidid. Huvipakkuvates plasmiidides leiduva promootori ColR-sõltuvuse kinnitamiseks elektroporeeriti nad metsiktüüpi PaW85 ja ColR defektsesse PaWcolR *P. putida* tüvesse ja mõõdeti β -glukuronidaasi aktiivsused eelnevalt kirjeldatud protokoll järgi (Hõrak and Kivisaar 1999).

9. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramine

β -galaktosidaasi aktiivsused määrati *P. putida* rakkudest, mis sisaldasid plasmidi, milles *lacZ* geeni ette oli kloneeritud *oprQ*, *algD*, *ompA*_{PP0773} ja *csuB* promootorid. Vastavad plasmiidid saadi Rita Hõrakult. *P. putida* PaW85 ja PaWcolR rakke, mis sisaldasid *oprQ*, *algD*, *ompA*_{PP0773} või *csuB* promootoreid kandvaid plasmide, kasvatati nii glükoosi tassidel kui ka glükoosi ja fenooliga minimaaltassidel. Rakud kraabiti tassidelt tikuga ja suspendeeriti 200 μ l 1 x M9 puhvris. Rakususpensiooni tihedus mõõdeti spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 580 nm. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks segati valmis reaktsioonisegu, mis sisaldas: 1,6 ml Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β -merkaptotetanool; 0,0005 % SDS; pH 7), 0,4 ml ONGP-lahust (o-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml) ja 0,1 ml

kloroformi. Reaktsioonisegusse lisati 100-200 µl rakususpensiooni ja fikseeriti aeg rakkude lisamisest kuni reaktsiooni peatamiseni, mis toimus 1 ml Na₂CO₃ (1 M) lisamisega. β-galaktosidaasi aktiivsus määrati spektrofotomeetriselt lainepikkusel 420 nm valgust neelava produkti o-nitrofenooli tekkimisega ajaühikus rakkude hulga kohta (Miller 1992).

10. Valkude puhastamine

N-terminaalse histidiini sabaga vastuse regulaator-valgu His₆-ColR üleekspresseerimiseks kasutati plasmidi pET11c/hiscolR ja histidiini sabaga sensorvalgu tsütoplasmaatilise domääni ColS-his₆ üleekspresseerimiseks kasutati plasmidi pET11c/Δ158colShis ning valgud puhastati varem välja töödatud protokoll järgi (Hörak *et al.* 2004).

11. DNA *gel mobility shift* analüüs

Valk-DNA komplekside analüüsiks vajalikud DNA proovid amplifitseeriti *P. putida* kromosoomist PCR meetodil järgmiste praimeritega (Tabel 2): 267start ja 268gatc (453 bp pikkune *oprQ* promootorala), PP1289stopp ja algDprom (461 bp pikkune *algD* promootorala), ompAATG ja ompASma (373 bp pikkune *ompA* promootorala), Csuylemine ja CsuBalg (421 bp pikkune *csuB* promootorala). Radioaktiivseks märgistamiseks fosforüleeriti iga proovi amplifitseerimisel kasutatava ühe praimeriga ots [γ-³²P]ATP-ga. Märgistatud DNA fragmendid puhastati elektroforeesil 5 % polüakrüülamiidgeelis, elueeriti geelist, sadestati ja võeti üles vees. Puhastatud DNA proove (1000 c.p.m.) inkubeeriti koos erineva kontsentratsiooniga ColR valguga 20 minuti jooksul 20 µl reaktsiooniseguses [25 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 0,05 mM EDTA; 50 mM KCl; veise seerumi albumiin (BSA) (50 µg/ml); lõhe spermi DNA (SS) (100 µg/ml); 5 % glütserool]. Fosforüleeritud ColR valgu seondumise katsetamiseks esmalt ColS valk autofosforüleeriti 0,1 mM ATP juuresolekul reaktsiooniseguses 15 minuti jooksul. Seejärel lisati ColR valk ja inkubeeriti veel 15 minutit ning siis lisati reaktsioonisegusse märgistatud DNA. Proovidel ja ColR valgul

lasti seonduda 20 minutit ja seejärel kanti nad 5 % polüakrüülamiidgeelile. Elektroforeesi puhvriks oli 0,5 x Tris-boraat-EDTA (pH 7,5) ja elektroforees toimus 4°C juures pingel 120-150 V kolm tundi. Geelid kuivatati vaakumpumbaga ja eksponeeriti PhosphorImager kassetile (Molecular Dynamics).

12. DNase I footprint analüüs

DNase I footprint analüüsiks vajalikud radioaktiivselt märgistatud *oprQ* ja *algD* promootorit sisaldavad DNA proovid tekitati 11. peatükis kirjeldatud meetodil. DNA ja valgu seondumisreaktsioon toimus samuti eespool kirjeldatud tingimustel, kuid reaktsiooni maht viidi 100 µl-ni ja märgistatud DNA-d oli reaktsioonides 30 000 c.p.m. Seondumisele järgnes DNA osaline lõikus 0,3 ühiku DNase I-ga (Promega) 4 minuti jooksul. DNase I töötlus peatati lahusega, mis sisaldas 0,1 M EDTA-d; 0,1 % naatriumdodetsüülsulfaati (SDS); 1,6 M ammooniumatsetaati ja lõhe spermi DNA-d (20 µg/ml). Seejärel teostati reaktsioonidele fenool-kloroform töötlus ja DNA sadestati 96 % etanooliga. Proovid võeti üles 7 µl-s lahuses, mis sisaldas 10 mM EDTA-d; 0,3 % broomfenoolsinist ja 0,3 % ksüleentsüanaoli ning kanti 6,5 % polüakrüülamiidgeelile, mis sisaldas 8 M uuread. *oprQ* ja *algD* promootori järjestus määrati kasutades Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (US Biochemicals) lahuseid ja ensüüme ning kanti samale geelile. Elektroforees toimus toatemperatuuril pingel 2200 V kolm tundi. Seejärel geel kuivatati vaakumpumba abil ja eksponeeriti PhosphorImager kassetile (Molecular Dynamics).

II Tulemused

1. ColRS signaaliraja märklaudgeenide tuvastamine *Pseudomonas putida* kromosoomse promootor-raamatukogu abil

P. putida PaW85 kromosoomist vastuse regulaatori ColR märklaudgeenide leidmiseks koostasini promootor-raamatukogu. Selleks kloneerisin PaW85 kromosoomist pärit ligikaudu 1 kb pikkused fragmendid plasmidi p9TTpheAgusA (vaata Joonis 3) kahe promootorita reportergeeni ette (raamatukogu konstrueerimise detailne kirjeldus on toodud Materjal ja meetodika peatükis). Reportergeen *pheA* kodeerib fenooli monooksügenaasi, mis võimaldab fenooli tassidel raamatukogust välja selekteerida plasmiidid, mille inserdid sisaldavad promootorit, kuna *pheA* aktiveerumisel suudab bakterirakk hakata kasvama fenoolil kui ainsal süsiniku allikal. Eelnevalt oli täheldatud, et ColRS signaaliraja suhtes mutantsetes bakterites toimub Tn4652 transpositsioon kümme korda väiksema sagedusega kui metsiktüüpi tüves PaW85 (Hõrak *et al.* 2004). Transpositsioonisagedust mõõdeti fenooli tassidel nälgivates *P. putida* rakkudes, kus Tn4652 transpositsiooni tagajärjel tekkis *pheA* geeni ette promootor, mis võimaldas bakteritel fenooli sisaldavatel minimaaltassidel kasvama hakata. Fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* valisime *P. putida* promootor-raamatukogu reporteriks sellepärast, et raamatukogu sõelumine toimuks samades tingimustes, kus eelnevalt olime täheldanud ColRS süsteemi mõju transpositsioonile. Raamatukogu-plasmiid sisaldas veel teist reporterit, milleks oli β -glukuronidaasi geen *gusA*, mis võimaldab kvantitatiivselt hinnata promootori tugevust. PaW85 promootor-raamatukogu sõelumine toimus *P. putida* tüves PaWRtaccoIRD51A, kus algne *colR* geen on katkestatud kanamütsiini geeniga ja mis kodeerib mutantset ColR valku, kus positsioonis 51 olev asparagiinhape (D) on asendatudalaniiniga (A). Fosforüleerumisvõimetu ColRD51A valgu üleekspresserimisel tõuseb Tn4652 transpositsioonitase kõrgemale kui algse ColR valgu üleekspresserimisel (Hõrak *et al.* 2004) ja seetõttu lootsime näha suuremaid ColR sõltuvaid efekte ka raamatukoguga identifitseeritavate promootorite puhul.

Raamatukogu sõelumine Materjal ja meetodika peatükis kirjeldatud strateegia abil (vaata Joonis 3) paljastas kümneid kloone, milles *pheA* ja *gusA* ekspressioon sõltus ColRD51A valgu ekspressioonitasemest. Eeldasime, et nendes kloonides olevad raamatukogu-plasmiidid sisaldavad ColR valgu poolt reguleeritavaid promotoreid. Vastavatest kloonidest eraldasime raamatukogu-plasmiidid ja viisin nad paralleelselt ColR mutantssesse ja metsiktüüpi *P. putida* tüvesse, et leida kinnitust nendes olevate promootorite ColR-sõltuvusele. Võrreldes raamatukogu-plasmiidides olevate promootorite aktiivsust alguses ja ColR defektses tüves, valisin välja neli suurima efektiga raamatukogu klooni, mille põhjalikumale analüüsimisele järgnevalt keskendusin. Enam huvi pakkunud plasmiidides sekveneerisin seal leiduvad inserdid kasutades selleks reportergeeni *pheA* alguse järjestusega komplementaarset praimerit pheAval (Tabel 2). Sekveneerimisest saadud järjestuste võrdlemine *P. putida* KT2440 täieliku genoomiga (www.tigr.org) näitas, et vahetult *pheA* geeni ees olid PP0268, PP1288, PP0773 ja PP2357 geenieelsed alad (Tabel 3). Nendest geenidest kaks (*oprQ* ja *ompA*_{PP0773}) kodeerivad poriini perekonna valke, üks (*algD*) kodeerib eksopolüsahhariidide sünteesiraja ensüümi ja üks (*csuB*) kodeerib oletatavalt pili valku (Tabel 3). Seega on kõigi nelja lookuse poolt kodeeritavad valgud seotud membraani funktsioonidega.

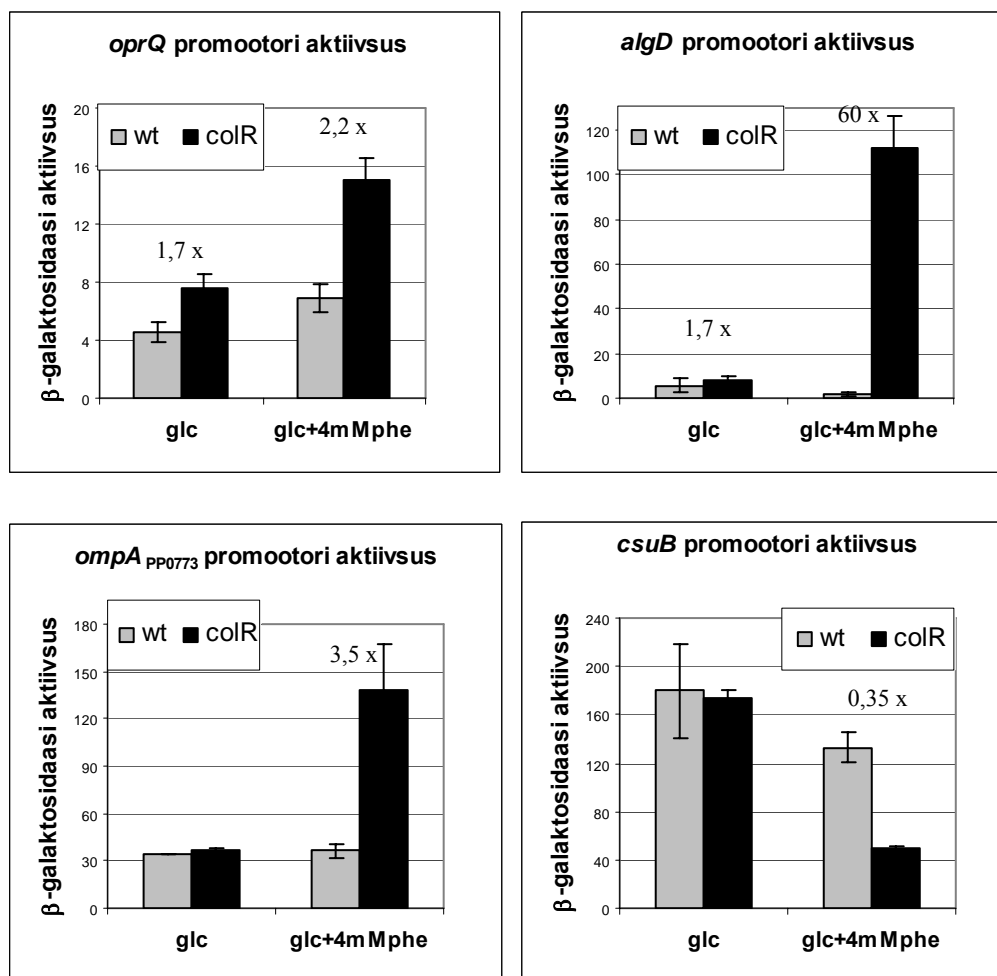
Tabel 3. Potentsiaalsed ColR märklaudgeenid

Geeni nimi	Oletatav funktsioon
<i>oprQ</i> (PP0268)	välimise membraani poriin, osaleb transpordis ja seondumises
<i>algD</i> (PP1288)	GDP-mannoos-6-dehüdrogenaas, osaleb eksopolüsahhariidi alginaadi sünteesis
<i>ompA</i> (PP0773)	välimise membraani poriin, osaleb transpordis ja seondumises
<i>csuB</i> (PP2357)	I tüüpi pili valk, osaleb adhesioonis

2. Potentsiaalsete ColR märklaudgeenide transkriptsiooni analüüs

Sekvenerimise käigus selgus, et raamatukogu-plasmiidid sisaldasid 1-3 kb pikkuseid inserte, millest pikimate korral oli reportergeenide ette inserteerunud mitu erinevat fragmenti *P. putida* kromosoomist ja seega võis neis sisalduda ka mitu promootorit. Selleks, et täpsemalt defineerida ColR-sõltuvate promootorite piirkonnad ja kontrollida *oprQ*, *algD*, *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootoritelt lähtuva transkriptsiooni reguleerimist ColR valgu poolt, subkloneeris Rita Hõrak nende geenide oletatavad promootorid plasmidi p9TT_BlacZ β-galaktosidaasi (*lacZ*) geeni ette. β-galaktosidaasi aktiivsused mõõdeti nii metsiktüüpi kui ka ColR mutantses *P. putida* tüves. Tulemused (Joonis 4) näitavad, et glükoosi tassil kasvades on *oprQ* ja *algD* promootoritelt lähtuv transkriptsioon ColR defektses tüves umbes 1,7 korda suurem kui algset tüüpi *P. putida*-s. Samas polnud *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootorite aktiivsus ColR-i puudumisest mõjutatud (Joonis 4). Seega on rakkude kasvamisel glükoos-minimaaltassil ainult *oprQ* ja *algD* promootorid ColR poolt reguleeritud ja mõlema promootori puhul käitub ColR transkriptsiooni repressorina.

Promootor-raamatukogu sõelumine toimus fenooli tassidel ja seal näisid kõik väljaselekteeritud promootorid ColR-st sõltuvat. Seepärast tekkis kahtlus, kas fenool võib mõjutada raamatukogust väljaselekteeritud promootoreid. Selle kontrollimiseks mõõtsime *oprQ*, *algD*, *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootorite aktiivsused ka fenooli juuresolekul. Metsiktüüpi tüve puhul oli fenooli efekt meie promootoritele väga väike või puudus hoopis (Joonis 4), kuid ColR defektses tüves mõjutas fenool kõiki promootoreid tugevasti. Fenooli juuresolekul oli *algD* promootor ColR mutantses tüves koguni 60 korda tugevam kui alguses tüves (Joonis 4). Ka *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootorid, mis glükoosil kasvavates *P. putida* rakkudes ei näidanud ColR-sõltuvust, olid ColR defektses tüves fenooli poolt mõjutatud. Fenool represseris *csuB* promootori transkriptsiooni ColR mutandis erinevalt ülejäänud kolmest promootorist, kus fenool indutseeris ColR-i puudumisel transkriptsiooni (Joonis 4). Seega mõjutab ColR-i puudumine *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootorite aktiivsust kaudselt võimaldades fenoolil mõjule pääseda. Antud tulemused viitavad, et ColR-i defektsuse korral on *P. putida* rakud fenoolile tundlikumad.



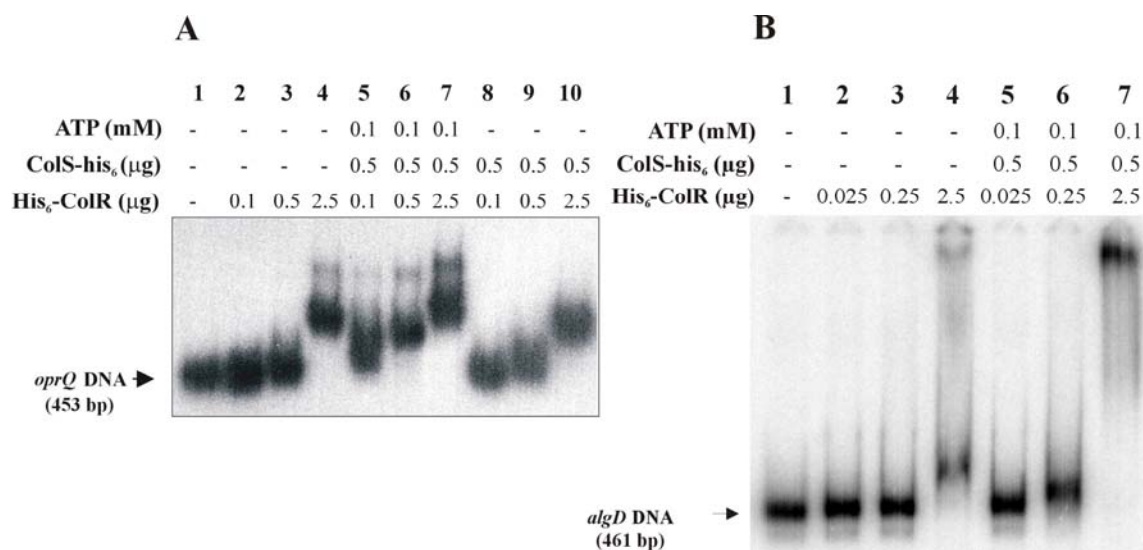
Joonis 4. Joonisel on toodud ColR märklaudgeenide *oprQ*, *algD*, *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootorite aktiivsused glükoosi (glc) ning glükoosi ja fenooliga (glc+4mMphe) tassidel *P. putida* metsiktüüpi (wt) ja ColR defektses (colR) tüves. Erinevused promootori aktiivsuses on arvuliselt välja toodud tulpade kohale. Joonisele on märgitud vähemalt kolme mõõtmise keskmine tulemus ning standardhälve.

3. ColR valk seondub *oprQ* ja *algD* promootoritele *in vitro*

oprQ ja *algD* promootorid näitasid β -galaktosidaasi aktiivsusi mõttes võrdlemisi väikest (1,7 kordset) aktiivsuse erinevust ColR mutantis ja metsiktüüpi *P. putida* tüves. Nõrk *oprQ* ja *algD* transkriptsiooni repressioon ColR juuresolekul ei pruugi peegeldada nende promootorite otsest reguleeritavust ColR valguga. Selleks, et kontrollida, kas ColR valgu olemasolu mõjutab nende promootorite aktiivsust otseselt või kaudselt, otsustasime analüüsida puhastatud ColR-i seondumist *oprQ* ja *algD* promootorite DNA-le *in vitro*. *Gel mobility shift* analüüs näitas, et ColR valk seondub

tõepoolest *oprQ* ja *algD* promootoritele (Joonis 5). Mida suurem on valgu kontsentratsioon, seda rohkem mõjutab ColR-i seondumine DNA fragmendi liikuvust geelis, mis viitab ColR valgu oligomeriseerumisele suurema kontsentratsiooni korral. ColS-i ja ATP juuresolekul oli *oprQ* ja *algD* promootorit sisaldava DNA nihutamiseks geelis vaja väiksemaid ColR-i kontsentratsioone (Joonis 5). See tähendab, et fosforüleerunud ColR omab nii *oprQ* kui ka *algD* promootori suhtes suuremat afiinsust kui fosforüleerumata vorm. Seega kinnitavad *in vitro* seondumise tulemused, et ColR reguleerib otseselt *oprQ* ja *algD* promootoritelt lähtuvat transkriptsiooni ja et sensorilt ColS saadud signaal on selles regulatsioonis osaline.

Analüüsisin puhastatud ColR valgu seondumist ka *ompA*_{PP0773} ja *csuB* promootor-regiooni DNA-le. Tulemused, mida ma käesolevas töös eraldi välja ei too, demonstreerisid, et ColR ei seonu *ompA*_{PP0773} ega *csuB* promootorile, ei üksi ega ka ColS-i ja ATP juuresolekul. See on kooskõlas β -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmisel saadud tulemusega, et ColR osaleb *ompA*_{PP0773} ja *csuB* promootorite regulatsioonis kaudselt.

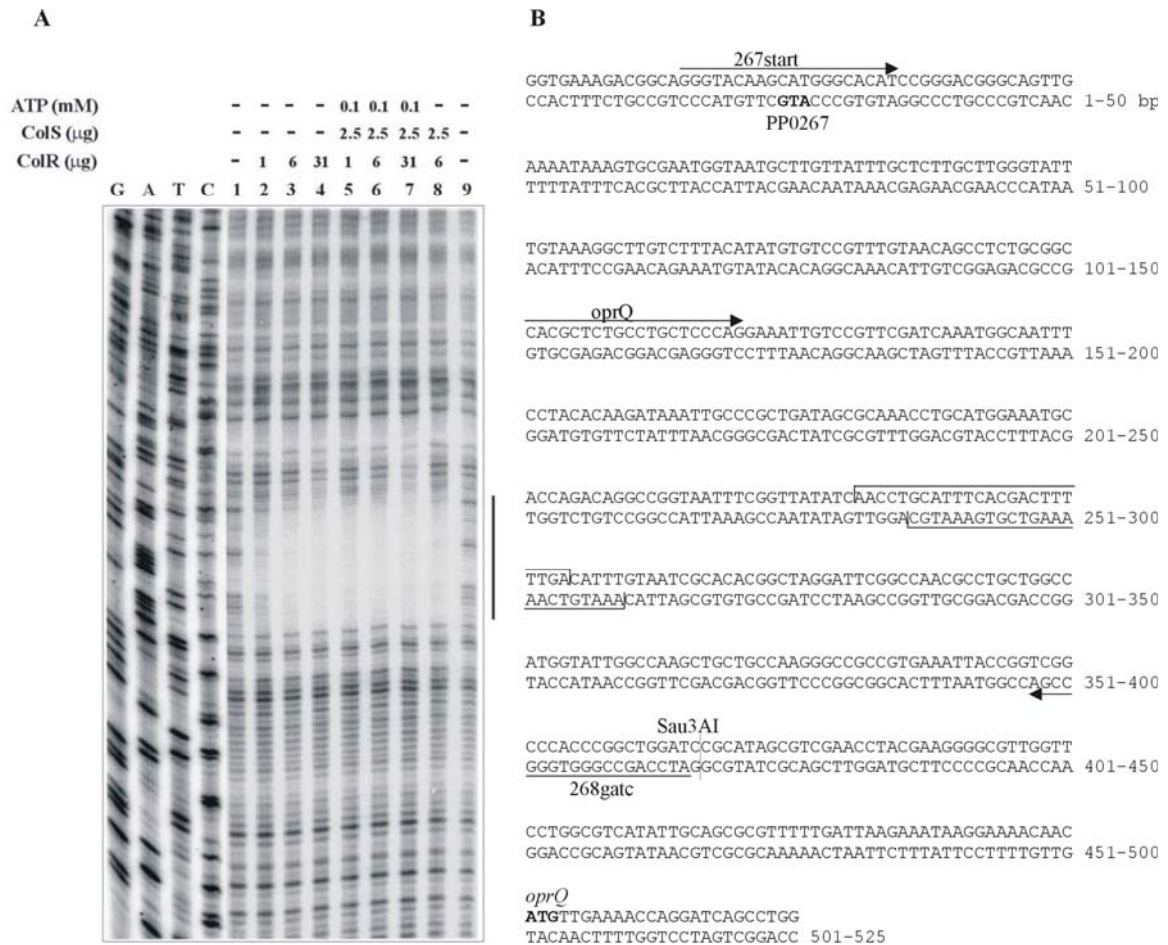


Joonis 5. **A.** ColR valgu seondumine poriini *oprQ* promootorile. **B.** ColR-i seondumine *algD* promootori DNA-le. Esimesel rajal on kontroll-DNA, kuhu valku pole lisatud. Jooniste kohal on toodud reaktsioonis kasutatud ColR ja ColS valkude ning fosforüürühma doonori ATP kogused.

4. ColR-i seondumiskoht *oprQ* promootor-regioonis

Transkriptsioonifaktoritel on tihti kindel konsensusjärjestus, millele nad seonduvad. Konsensusjärjestuse teadmisel on lihtsam leida transkriptsioonifaktori potentsiaalseid märklaudgeene, mille promootor sisaldab vastava valgu seondumiskohta. Selleks, et leida vastuse regulaatori ColR-i täpne seondumiskoht, analüüsisin ColR-i ja *oprQ* promootor-regiooni kompleksi *DNase I footprint* meetodil. DNase I töötles kasutasin *oprQ* geenieelset ala, mis oli 453 bp pikkune (Joonis 6B). ColR katab poriini *oprQ* promootoris 24 bp pikkuse ala (Joonis 6A), mis on geeni startkoodonist umbes 200 nukleotiidi ülesvoolu (Joonis 6B). ColR-i seondumisjärjestus on võrdlemisi A ja T nukleotiidi rikas. *DNase I footprint* analüüs näitab, et ColR-i poolt kaetud DNA ala suurus ei sõltu ColR valgu kontsentratsioonist (Joonis 6A). Samuti ei muutu ColR valgu poolt kaitstud ala suurus *oprQ* promootor-regioonis sensorvalgu ColS-i ja ATP lisamisel (Joonis 6A), mis tähendab, et fosforüleerunud ColR katab sama suure ala *oprQ* promootorist kui fosforüleerumata vorm. Seega erinevalt *gel mobility shift* analüüsil saadud tulemustest, ei näidanud DNase I töötlus, et fosforüleerunud ColR-i afiinsus DNA-le oleks suurem kui fosforüleerumata ColR valgul.

DNase I footprint analüüsi tegin ka *algD* promootor-regioonile, kuhu olin eelnevalt näinud ColR valgu seondumist *in vitro* (Joonis 5B). Vastavaid tulemusi ma käesolevas töös ei esita, kuna DNase I töötlus ei paljastanud ColR-i seondumisjärjestust *algD* promootoralas.



Joonis 6. A. *oprQ* promootorile tehtud *DNase I footprint* analüüs. Joonise kohal on toodud reaktsioonides kasutatud ColR ja ColS valkude ning fosforüülrühma doonori ATP kontsentratsioonid. Neli esimest rada vastavad *oprQ* promootori nukleotiidsele järjestusele. Vertikaalse kriipsuga on näidatud ColR valgu poolt kaetud ala. **B.** *oprQ* promootori järjestus. Klambritega on märgitud DNase I töötuses ColR-i poolt protekteeritav järjestus mõlemal ahelal. Sau3AI märgib restriksioonisaiti, millest ülesvoolu jääv DNA oli kloneerunud raamatukogu-plasmidi. Rasvaselt on märgitud *oprQ* (PP0268) ja PP0267 lookuste startkoodonid. Nooltega on tähistatud *oprQ* promootor-regiooni amplifitseerimisel kasutatud praimerid 267start ja 268gatc. *oprQ* ja 268gatc praimeritega amplifitseeritud fragment ei seo ColR valku *DNA mobility shift* analüüsil.

III Arutelu

Minu töö tulemusena on selgunud esimesed *P. putida* kahekomponentse signaaliraja ColRS märklaudgeenid, mis viitavad sellele, et ColRS süsteem reguleerib mitmeid membraani funktsioone ja sealhulgas osaleb ka rakkude fenooli-tolerantsuses.

P. putida ColRS süsteemi poolt reguleeritavad geenid identifitseerisin PaW85 promotoor-raamatukogu sõelumise abil.

- Vastuse regulaator ColR mõjutab *oprQ* ja *ompA_{PP0773}* geenide ekspressiooni. Primaarjärjestuse analüüsi järgi kodeerivad *oprQ* ja *ompA_{PP0773}* bakteriraku välimises membraanis paiknevaid poriid (www.tigr.org). Poriinid moodustavad mittespetsiifilisi või ka mingite ühendite difusioonile spetsialiseerunud kanaleid gramnegatiivsete bakterite välimises membraanis (Nikaido 2003). Rakupinnale ulatuv poriini osa võib olla oluline ka bakteriraku kinnitumisel pinnale. OprQ ja OmpA_{PP0773} funktsiooni *P. putida* rakkudes ei ole uuritud, seega pole teada milliste molekulide difusiooni need poriinid võivad vahendada.
- ColR reguleerib ka 12-st geenist koosnevat *algD844KEGXLJFA* operoni, mis kodeerib eksopolüsahhariidi alginaadi biosünteesis ja degradatsioonis osalevaid ensüüme (Jain and Ohman 2005), millest olulisimaks peetakse operoni esimese geeni kodeeritud ensüümi GDP-mannoos-6-dehüdrogenaasi (AlgD). *P. aeruginosa*-l moodustub alginaadist rakkude ümber kapslilaadne limane struktuur (Jain and Ohman 2005), mis on oluline patogeneesis, kuna ta säästab bakterit peremehe kaitsemehhanismide hävitava toime eest ja aitab koloniseerida tsüstilise fibroosi patsientide kopsu. *P. aeruginosa* limasus on reguleeritud *algD* operoni transkriptsiooni taseme kaudu (Schurr *et al.* 1993) ja seda vahendavad mitmed faktorid nagu näiteks vastuse regulaator AlgR. Hiljuti näidati, et *algD* geeni ekspressioon *P. putida* rakkudes on indutseeritav taimejuurte poolt (Ramos-Gonzalez *et al.* 2005). Seega võib alginaadil olla mõlemas *Pseudomonas*-e perekonna esindajas sarnane funktsioon, selle vahega, et *P. putida*-s on ta vajalik taimejuurte koloniseerimiseks ja *P. aeruginosa*-s inimese kopsu koloniseerimiseks.

- Samuti mõjutab ColR seitsmest geenist koosneva *csuB* operoni ekspressiooni. *csuB* operoni funktsiooni kohta andmeid pole, kuid järjestuse analüüsi järgi oletatakse, et ta kodeerib valke, mis moodustavad tüüp I pilisid (www.tigr.org). Pilid on rakumembraanis paiknevad ripsmed, mis vastutavad bakteri adhesiooni eest peremehe retseptoritele (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Patogeensetel bakteritel võib ka peremehe rakkudes sisenemine toimuda pilide vahendusel (Pizarro-Cerda and Cossart 2006).

Seega on kõikide tuvastatud ColR märklaudgeenide funktsioonid seotud bakteriraku membraaniga.

Raamatukogu abil leitud ColR-sõltuvate geenide ekspressiooni analüüs näitas, et rakkude kasvamisel glükoosil oli *oprQ* ja *algD* promootorilt lähtuv transkriptsioon ColR valgu puudumisel 1,7 korda suurem kui metsiktüüpi tüves (Joonis 4). Sellest võib järeldada, et ColR osaleb otseselt *oprQ* ja *algD* geenide transkriptsiooni regulatsioonis. Ka *in vitro* seondumise tulemused kinnitasid seda, sest puhastatud ColR valk seondus *oprQ* ja *algD* promootorit sisaldavate DNA fragmentidega (Joonis 5). Tuleb mainida, et *in vivo* glükoosi tassil mõõdetud vahe *oprQ* ja *algD* promootori aktiivsuses ColR mutantses ja algset tüüpi *P. putida* tüves oli võrdlemisi väike (Joonis 4). See võib tuleneda ColRS süsteemi signaali puudumisest glükoosil kasvades. Ei ole teada, milline signaal aktiveerib sensorivalgu ColS-i ja käivitab signaaliraja, mille tagajärjel vastuse regulaator ColR fosforüleerub. Võimalik, et *in vivo* katsed peegeldavad fosforüleerumata ColR valgu mõju oma märklaudgeenide promootoritele ning et sensorilt saadud signaali tagajärjel fosforüleerunud ColR põhjustaks palju suuremaid muutusi oma märklaudgeenide transkriptsioonis. Selle oletusega lähevad kokku ka *in vitro* tulemused, mis demonstreerivad, et fosforüleerunud ColR seondub *oprQ* ja *algD* promootorite DNA-ga afiinsemalt kui fosforüleerumata valk (Joonis 5).

Raamatukogu sõelumine näitas, et kõik neli promootorit (*oprQ*, *algD*, *ompA_{PP0773}*, *csuB*) sõltuvad ColR-st. Seepärast oli ootamatu, et *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootoritel ei avaldunud glükoosi tassil kasvavates rakkudes ColR-sõltuvat efekti. Samas tuleb mainida, et raamatukogu sõelumine oli toimunud teistes tingimustes ehk fenooli tassidel. β -galaktosidaasi aktiivsuste mõõtmine fenooli juuresolekul paljastas, et kõik promootorid (*oprQ*, *algD*, *ompA_{PP0773}*, *csuB*) on ColR mutantses tüves mõjutatud fenooli poolt (Joonis 4). Seega ei reguleeri ColR *ompA_{PP0773}* ja *csuB* promootorite

ekspressiooni otseselt, vaid kaudselt, kuna fenool mõjutab nende aktiivsust ColR valgu puudumisel. Sellised tulemused on seletatavad, kui oletada, et ColR defektse tüve membraan on fenoolile läbilaskvam ja seetõttu on ColR mutantstes tüves fenooli kontsentratsioon suurem kui metsiktüüpi *P. putida*-s ning suurenenud fenooli kontsentratsioon mõjutab raamatukogust väljaselekteeritud promootorite transkriptsiooni. Ka *in vitro* tulemused kinnitavad, et ColR ei reguleeri otseselt *ompA*_{PP0773} ja *csuB* geeni ekspressiooni, kuna ColR valg ei seonu nende geenide promootoritele *DNA mobility shift* analüüsil (seda tulemust käesolevas töös ei illustreerita).

Gel mobility shift analüüsi tulemused näitavad, et sensorvalgu ColS-i ja ATP juuresolekul on ColR-i seondumiseks *oprQ* promootori DNA-le vaja väiksemaid ColR valgu kontsentratsioone kui ColS-i ja ATP puudumisel (Joonis 5A). See tähendab, et sensorvalgult saadud signaal muudab ColR-i promootorile afiinsemaks. Kuna erinevate ColR kontsentratsioonide juuresolekul tekkinud ColR valgu ja *oprQ* DNA vahelised kompleksid liiguvad geelis erinevalt (Joonis 5A), siis võib oletada, et erinevalt liikuvatele fragmentidele on seondunud erinev arv ColR valgu molekule. Sama on nähtud *Streptococcus gordonii* regulaatori ArcR seondumisel oma märklaud-promootorile (Zeng *et al.* 2006) ja selline tulemus viitab, et nii ArcR kui ka ColR seonduvad oma märklaud-promootoritele erinevate multimeeridena.

Huvitav on see, et kuigi *oprQ* ja *algD* promootorit sisaldavad DNA fragmendid on peaaegu ühe pikkused (vastavalt 453 bp ja 461 bp), muutub nende liikumine geelis sama hulga ColR valgu juuresolekul erinevalt (Joonis 5). *In vitro* reaktsioonis kasutatud suurima ColR valgu hulga (2,5 µg) korral kipub *algD* promootori ja ColR-i vahel moodustunud kompleks geeli hambasse kinni jääma (Joonis 5B), kuid *oprQ* DNA ja ColR-i vaheline kompleks liigub geelis ilusasti (Joonis 5A). Sellest võib järeldada, et ColR moodustab erinevatele märklaudjärjestustele seondudes erineva struktuuriga komplekse. Seda oletust toetab ka ColR valgu ja märklaud-promootorite komplekside analüüsimine DNase I töötluses. Nimelt võimaldas see meetod tuvastada ColR-i seondumiskoha *oprQ* promootor-regioonis (Joonis 6), kuid samu tingimusi kasutades ei olnud võimalik leida ColR-i seondumiskohta *algD* promootoris (seda tulemust käesolevas töös ei illustreerita).

ColR-i seondumise analüüsimine *gel mobility shift* meetodiga viitas, et erinevate ColR valgu kontsentratsioonide korral seondub *oprQ* DNA-le erineval hulgal ColR molekule (Joonis 5A). Seetõttu eeldasin, et *oprQ* promootor-regioonis on mitmeid ColR-i seondumiskohti, millele ta võiks kooperatiivselt seonduda. DNase I töötlus näitas aga, et ColR-i poolt protekteeritava ala suurus ja seondumiskohtade arv *oprQ* promootoris ei sõltu ColR-i kontsentratsioonist (Joonis 6). Seega, juhul kui ColR valk moodustab DNA-le seondudes multimeere, siis jääb DNA-ga kontaktis olev valgupind ikka samaks. Erinevalt oodatust ei paljastanud DNase I töötlus ka seda, et fosforüleeritud ColR seonduks *oprQ* DNA-ga afiinsemalt kui fosforüleerimata valk, kuna ColS-i ja ATP juuresolekul oli vaja sama suuri ColR valgu kontsentratsioone, et protekteerida *oprQ* DNA. Võimalik, et fosforüleerunud ja fosforüleerumata ColR seonduvad *oprQ* promootorile erineva afiinsusega, kuid meie ei suutnud seda vahet näha, kuna ka halvemini seonduv fosforüleerumata ColR valk seondub sedavõrd afiinselt, et suudab DNA ära protekteerida.

DNase I töötluses kasutasin suhteliselt pikka (453 bp) ala *oprQ* promootorist, kuna lühemate *oprQ* fragmentide korral ei näinud ColR valgu seondumist *gel mobility shift* analüüsis. Näiteks, kui *oprQ* promootor-regiooni proov oli amplifitseeritud praimeritega *oprQ* ja 268gatc (Joonis 6B), siis sellisele DNA-le ColR ei seondunud (tulemust pole käesolevas töös illustreeritud). ColR kattis 453 bp pikkusest fragmendist ainult 24 bp pikkuse ala, mis oli olemas ka lühemas *oprQ* promootor-fragmendis. Seega jääb lahtiseks küsimus, miks ei seondunud ColR lühema *oprQ* promootorit sisaldava fragmendiga *gel mobility shift* analüüsis (Joonis 6B). See oleks seletatav, kui *oprQ* promootorala sisaldaks veel mõnda ColR-i seondumiseks vajalikku järjestust, millele ColR seondub ajutiselt ja mida DNase I töötlus ei paljastanud. Siinkohal tasub rõhutada, et *algD* promootorilas ei paljastanud DNase I analüüs ühtegi ColR-i poolt protekteeritavat ala, kuigi *gel mobility shift* analüüs demonstreeris ColR valgu seondumist samale fragmendile. Seega võib kokkuvõtvalt öelda, et ColR valgu *in vitro* seondumise analüüsimine ei toonud täit selgust ColR-i keerulisele käitumisele märklaudgeenide promootoritele seondumisel.

P. fluorescence-i ColRS signaalirada on oluline taimejuurte koloniseerimisel (Dekkers *et al.* 1998), kuid tema täpne funktsioon selles protsessis on selgusetu. Oma töös identifitseerisin esimesed *P. putida* ColRS süsteemi märklaudgeenid ja nende põhjal

võib öelda, et ColRS signaalirada reguleerib otseselt ning teatud tingimustes (fenooli juuresolekul) ka kaudselt mitmesuguseid membraani funktsioone. Bakteriraku membraan ja temas peituvad mitmesugused determinandid puutuvad otseselt kokku rakuvälise keskkonnaga ning seetõttu ka taimejuurtega. Seega on ilmne, et membraanis toimuvad muutused võivad mõjutada mikroobi interaktsiooni taimega. Taimed eritavad mitmesuguseid fenoolseid ühendeid, mis võivad olla oluliseks signaaliks nendega interaktsioonis olevatele bakteritele. Kuna fenool mõjutab raamatukogu sõelumisest väljaselekteeritud promootorite aktiivsust ColR defektses *P. putida* tüves (Joonis 4), siis on võimalik, et meie poolt tuvastatud fenooli efektid on tingitud sellest, et ColR vahendab bakteri tundlikkust mitmesugustele taimsetele flavonoididele või muudele fenoolsetele ühenditele.

P. putida ColRS signaalsüsteem on vajalik Tn4652 transpositsiooniks fenooli sisaldavatel tassidel nälgivates rakkudes (Hõrak *et al.* 2004). Meie publitseerimata tulemused näitavad, et Tn4652 transpositsiooni sagedus on ColR defektses tüves seda enam represseritud, mida suurem on fenooli kontsentratsioon selektsiooni tassidel. Samal ajal metsiktüüpi tüves fenool ei mõjuta transpositsiooni sagedust. See viitab, et ColR mutantne *P. putida* on fenoolile tundlikum, kui algne tüvi. Sama näitab ka β -galaktosidaasi aktiivsuste mõõtmine (Joonis 4), kuna ColR defektses tüves on fenooli mõju raamatukogust väljaselekteeritud promootorite aktiivsusele suurem kui metsiktüüpi *P. putida*-s. Minu töö tulemustest selgub, et ColRS signaalirada reguleerib mitmete membraanis paiknevate valkude ekspressiooni. Järelikult toimuvad ColR defektses raku mitmesugused ümberkorraldused membraanis, mis võivad muuhulgas põhjustada ka membraani muutumise fenoolile läbilaskvamaks. Võimalik, et ColR mutantses tüves on rakusisene fenooli kontsentratsioon suurem kui metsiktüüpi *P. putida*-s ja kuna toksiliste ühendite väljapumpamine on energiat nõudev protsess, siis võib suur osa raku energiast kuluda fenooli kontsentratsiooni vähendamisele. Energia puudujääk ColR mutantses tüves võikski seletada langenud transpositsioonisagedust, kuna niigi nälgivates rakkudes ei jätku energiat DNA sünteesiks, mida on vaja transpositsiooni toimumiseks. Energiakriisi võib veelgi suurendada rakumembraani parem läbilaskvus ionidele ColRS signaaliraja puudumisel, kuna siis ei saa mikroob efektiivselt kasutada ionide kontsentratsiooni erinevust kahel pool membraani energia tootmiseks.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada kahekomponentse signaalsüsteemi ColRS funktsiooni *Pseudomonas putida* rakkudes. Vastuse regulaatori ColR märklaudgeenide leidmiseks koostasid *P. putida* PaW85 kromosoomist promootor-raamatukogu. Töö tulemused võib kokku võtta järgmiselt:

1. *P. putida* promootor-raamatukogu sõelumine tuvastas neli potentsiaalset ColR-i märklaudgeeni (*algD*, *oprQ*, *ompA_{PP0773}*, *csuB*), mis kõik on seotud membraani funktsioonidega.
2. Promootorite aktiivsuste mõõtmise tulemused paljastasid, et ColR reguleerib negatiivselt poriini OprQ ja alginaadi sünteesi võtmeensüümi AlgD ekspressiooni. Sama kinnitasid ka *in vitro* tulemused, kuna ColR seondus *oprQ* ja *algD* promootoritele. Samuti identifitseerisin 24 bp pikkuse ColR valgu seondumiskoha *oprQ* geeni startkoodonist 200 nukleotiidi ülesvoolu.
3. ColR ei mõjuta poriinigeeni *ompA_{PP0773}* ja piligeeni *csuB* ekspressiooni otseselt vaid nende geenide promootorid on mõjutatud ColR defektses tüves fenooli poolt. Kuna metsiktüüpi *P. putida* tüves pole need promootorid fenooli poolt mõjutatud, siis viitab see tulemus suurenenud fenooli kontsentratsioonile ColR defektses tüves, millest võib järeldada, et ColRS signaalirada osaleb *P. putida* fenooli-tolerantsuses.

Lühidalt kokku võttes võib öelda, et *P. putida* ColRS signaalirada osaleb mitmete bakterimembraani funktsioonide, sealhulgas ka membraani läbilaskvuse, reguleerimises. Kirjandusest on teada, et *P. fluorescens*-il on ColRS süsteem oluline taimejuurte koloniseerimiseks (Dekkers *et al.* 1998) ja minu töö tulemused aitavad seda ColRS signaaliraja funktsiooni selgitada, kuna erinevad membraansed ümberkorraldused võivad muuta taime ja bakteri vahelist interaktsiooni. Samuti on ColRS süsteem vajalik Tn4652 transpositsiooniks fenoolil nälgivates *P. putida* rakkudes (Hõrak *et al.* 2004). Oma tulemuste põhjal võin järeldada, et ColRS signaalirada reguleerib Tn4652 transpositsiooni kaudselt läbi rakkude fenooli-tolerantsuse.

Summary

Bacteria use two-component signal transduction systems to regulate their gene expression according to changing environmental conditions. *Pseudomonas fluorescence* two-component system ColRS is important for the ability of bacteria to colonise plant roots (Dekkers *et al.* 1998). Our research group showed that *Pseudomonas putida* ColRS system is required for transposition of Tn4652 under phenol selection conditions (Hörak *et al.* 2004). Yet, there is no information about the exact function of ColRS signal system. Therefore, I constructed a promoter library of *P. putida* PaW85 chromosome and screened it for ColR regulated promoters.

The results of the current study in brief are:

1. Library screen revealed four potential ColR regulated genes whose products are involved in membrane functions.
2. Testing promoter activities *in vivo* demonstrated that ColR directly regulates porin encoding *oprQ* and *algD* that encodes an enzyme involved in alginate biosynthesis. ColR binding to *oprQ* and *algD* promoter in gel mobility shift assay confirmed that ColR directly regulates these promoters. Additionally, DNase I footprinting revealed 24 bp long ColR binding site in the promoter region of *oprQ* approximately 200 bp upstream from the start codon.
3. Phenol influences porin encoding *ompA*_{PP0773} and *csuB* that encodes type I pili protein in ColR knockout strain. However, as it occurred only in ColR-minus strain and not in wild type, I suggest that *P. putida* ColR mutant strain is more susceptible to phenol than wild type.

In conclusion, *P. putida* ColRS signal transduction system is involved in regulation of membrane functions. The involvement of ColRS system in regulation of membrane functions reveals the mechanism which makes ColRS system important for the ability of bacteria to colonise plant roots. Results of my work suggest that ColRS signal transduction system regulates Tn4652 transposition indirectly being involved in phenol tolerance of *P. putida*.

Kasutatud kirjandus

- Bauchop, T., and Elsdén, S. R.** (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J Gen Microbiol* **23**, 457-69.
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., and Broda, P.** (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet* **154**, 203-4.
- Bijlsma, J. J., and Groisman, E. A.** (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol* **11**, 359-66.
- Chang, C., and Stewart, R. C.** (1998). The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol* **117**, 723-31.
- Dekkers, L. C., Bloemendaal, C. J., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., Spink, H. P., and Lugtenberg, B. J.** (1998). A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 45-56.
- Dong, Y. H., Zhang, X. F., Soo, H. M., Greenberg, E. P., and Zhang, L. H.** (2005). The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **56**, 1287-301.
- Duan, K., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H., and Surette, M. G.** (2003). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol* **50**, 1477-91.
- Ernst, R. K., Guina, T., and Miller, S. I.** (2001). Salmonella typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect.* **3**, 1327-34.
- Forst, S., Delgado, J., and Inouye, M.** (1989). Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the ompF and ompC genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6052-6.
- Groisman, E. A.** (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**, 1835-42.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hörak, R., Ilves, H., Pruunsild, P., Kuljus, M., and Kivisaar, M.** (2004). The ColR-ColS two-component signal transduction system is involved in regulation of Tn4652 transposition in *Pseudomonas putida* under starvation conditions. *Mol Microbiol* **54**, 795-807.
- Hörak, R., and Kivisaar, M.** (1999). Regulation of the transposase of Tn4652 by the transposon-encoded protein TnpC. *J Bacteriol* **181**, 6312-6318.
- Jain, S., and Ohman, D. E.** (2005). Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **73**, 6429-36.
- Kulasekara, H. D., Ventre, I., Kulasekara, B. R., Lazdunski, A., Filloux, A., and Lory, S.** (2005). A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol Microbiol.* **55**, 368-80.
- Miller, J. H.** (1972). "Experiments in Molecular Genetics." Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY,

- Miller, J. H.** (1992). "A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria." Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY,
- Mizuno, T.** (1997). Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**, 161-8.
- Mizuno, T.** (2005). Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**, 2263-76.
- Nikaido, H.** (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* **269**, 3905-8.
- Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 593-656.
- Ninfa, A. J., and Magasanik, B.** (1986). Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**, 5909-13.
- Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P.** (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* **124**, 715-27.
- Poole, K.** (2002). Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* **3**, 77-98.
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E., and Silhavy, T. J.** (1996). From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**, 911-917.
- Pratt, L. A., and Silhavy, T. J.** (1996). The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 2488-92.
- Ramos-Gonzalez, M. I., Campos, M. J., and Ramos, J. L.** (2005). Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vitro expression technology capture and identification of root-activated promoters. *J Bacteriol* **187**, 4033-4041.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V., and Foglino, M.** (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**, 498-504.
- Schurr, M. J., Martin, D. W., Mudd, M. H., Hibler, N. S., Boucher, J. C., and Deretic, V.** (1993). The *algD* promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cell Mol Biol Res.* **39**, 371-6.
- Shu, C. J., and Zhulin, I. B.** (2002). ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* **27**, 3-5.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.
- Zeng, L., Dong, Y., and Burne, R. A.** (2006). Characterization of cis-acting sites controlling arginine deiminase gene expression in *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol.* **188**, 941-9.
- West, A. H., and Stock, A. M.** (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-76.
- Yoshida, T., Qin, L., Egger, L. A., and Inouye, M.** (2006). Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR. *J Biol Chem* **17**, 17.