

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Mullabakter *Pseudomonas putida* GacS-GacA signaaliraja osalus statsionaarse  
kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i regulatsioonis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Grete Anton

Juhendajad PhD Heili Ilves

MSc Lea Ets

TARTU 2023

## INFOLEHT

### **Mullabakter *Pseudomonas putida* GacS-GacA signaaliraja osalus statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i regulatsioonis**

Bakterid, nagu ka teised elusorganismid, on stressile vastuvõtlikud. Bakterirakud tunnetavad keskkonnast tulenevaid muutusi signaalsüsteemidega, mis vahendavad muutusi rakkude füsioloogiasse. Gram-negatiivsetel bakteritel on üheks selliseks konserveerunud GacS-GacA kahekomponentne signaalsüsteem. Stressitingimustes on  $\sigma$ -faktorid olulised transkriptsiooni reguleerimiseks, võimaldades stressiga toimetulekuks vajalike geenide avaldumist. Osades pseudomonaadides on kirjeldatud, et GacS-GacA signaalsüsteem võib reguleerida üldise stressispetsiifilise sigmafaktor RpoS-i hulka rakus. Käesoleva töö eesmärk oli leida, kas GacS-GacA signaalirada mõjutab statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i valgu hulka mullabakter *Pseudomonas putida* rakkudes.

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, GacS-GacA signaalsüsteem, kahekomponentne signaalsüsteem, sigmafaktor RpoS

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **The two-component signal system's GacS-GacA participatory in stationary phase sigma factor RpoS in *Pseudomonas putida***

Bacteria, just like every living organism, are receptive to environmental stress. By sensing environmental conditions through two-component signal systems, they can change the physiology of the cell. The GacS-GacA two-component signal system is conserved among Gram-negative bacteria. To regulate transcription during the environmental stress, bacteria have  $\sigma$ -factors which regulate the expression of genes only needed during stress conditions. It has been noticed that in pseudomonades the GacS-GacA signalling system might regulate the expression of RpoS. The aim of this study was to determine if GacS-GacA signal pathway affects the regulation of stationary phase sigma factor RpoS in *Pseudomonas putida*.

Keywords: *Pseudomonas putida*, GacS-GacA signal system, two-component system, sigma factor RpoS

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

Infoleht .....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Kahekomponentsed signaalsüsteemid .....	7
1.1.1. Histidiinkinaas.....	8
1.1.2. Vastuse regulaator .....	10
1.2. Kahekomponentne signaalsüsteem GacS-GacA.....	11
1.3. Üldine stressivastus.....	14
1.3.1. Stressispetsiifiline sigmafaktor RpoS.....	14
2. Eksperimentaalne osa .....	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjal ja meetodika .....	17
2.2.1. Kasutatud plasmiid, söötmed, bakteritüved ning bakterite kasvutingimused ....	17
2.2.2. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon.....	18
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	19
2.2.4. Geelelektroforees.....	20
2.2.5. RpoS-sõltuvalt promootorilt lähtuv $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsuse määramine fenool-minimaaltardsöötmel nälgivatest rakkudest.....	20
2.2.6. Nälgitud <i>P. putida</i> rakkude ettevalmistus proteoomi analüüsiks ja proteoomi andmete analüüs .....	21
2.2.7. <i>P. putida</i> nälgiva populatsiooni elumuse määramine fenool-minimaalsöötmele.....	22
2.2.8. <i>Pseudomonas putida</i> kasvukiiruste määramine.....	23

2.3. Tulemused.....	23
2.3.1. Sigmafaktor RpoS-st sõltuva <i>tnpA</i> geeni promootori aktiivsus <i>P. putida</i> PaW85, <i>gacS::Sm</i> , <i>gacA::Sm</i> ja $\Delta$ <i>rpoS</i> tüvedes .....	23
2.3.2. <i>Pseudomonas putida</i> nälgivate rakkude elumus ning plasmidi stabiilsus.....	25
2.3.3. <i>P. putida</i> tüvede PaW85, <i>gacS::Sm</i> , <i>gacA::Sm</i> ja $\Delta$ <i>rpoS</i> kasvukiiruste võrdlus plasmidi olemasolul ja ilma.....	26
2.3.4. <i>Pseudomonas putida</i> PaW85 ja <i>gacA::Sm</i> statsionaarse kasvufaasi rakkude proteoomi analüüs .....	28
2.4. Arutelu .....	29
Kokkuvõte .....	32
Summary.....	33
Kirjanduse loetelu.....	34

## KASUTATUD LÜHENDID

CAA – kaseiini hüdroolüsaat (ingl k – *casamino acids*)

glc – glükoos

HK – histidiini kinaas

LB – lüsogeenne sööde (ingl k – *lysogeny broth*)

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

pen – penitsilliin

phe – fenool (ingl k – *phenol*)

VR – vastuse regulaator

wt – metsiktüvi (ingl k – *wild-type*)

## SISSEJUHATUS

Bakterid on kiired kohanema ümbritsevate keskkonnatingimustega. Kuna keskkonnas on väga erinevaid stiimuleid, siis on bakteritel olemas mitmeid signaalsüsteeme, mis on olulised näiteks biofilmi tekkel, hulgatunnetusel, antibiootikumi resistentsuse tagamisel ning virulentsusel. Enamlevinuid signaalsüsteemid on kahekomponentsed, koosnedes keskkonnasignaale tunnetavast sensorvalgust ning vastuse regulaatorist, mis aktiveerudes käivitab edasise geeniekspressiooni. Gram-negatiivsete bakterite seas on tuntuim kahekomponentne signaalsüsteem GacS-GacA (Falke jt., 1997; Heeb ja Haas, 2001; Lautour, 2020; Wang jt., 2021).

Pseudomonaadide puhul on teada, et Gac-signaalsüsteem reguleerib sRNA-sid, millest edasi aktiveeruvad sekundaarsete metaboliitide sünteesid (Brencic jt., 2009). Lisaks on varasemas kirjanduses toodud, et pseudomonaadide puhul mõjutab GacS-GacA signaalsüsteem stressivastuse olulise sigmafaktor RpoS-i taset (Whistler jt., 1998; Martinez-Gil jt., 2014; Kang jt., 2004). Meie uurimisgrupis on varasemalt näidatud, et kahekomponentse GacS-GacA signaalsüsteemi sensori GacS-i defektsus suurendab mullabakteri *Pseudomonas putida* PaW85 statsionaarse kasvufaasi rakkudes mutageneesi ligi kümme korda ning ei välistatud võimalust, et GacS-GacA signaaliraja defektsus võib mõjutada stressispetsiifilise sigmafaktor RpoS-i taset (Tagel jt., 2016). Bakteri *P. fluorescens* näitel on selgunud, et Gac-signaalirada mõjutab rakkudes RpoS-i kuhjumist ning *rpoS*-i transkribeerimist (Whistler jt., 1998). Kuna sigmafaktor RpoS mängib olulist rolli eriti statsionaarse kasvufaasi rakkudes, siis ekspresseeritakse nälgivates rakkudes RpoS-i intensiivsemalt, kuna keskkonnas pole piisavalt toitaineid (Tanaka jt., 1993).

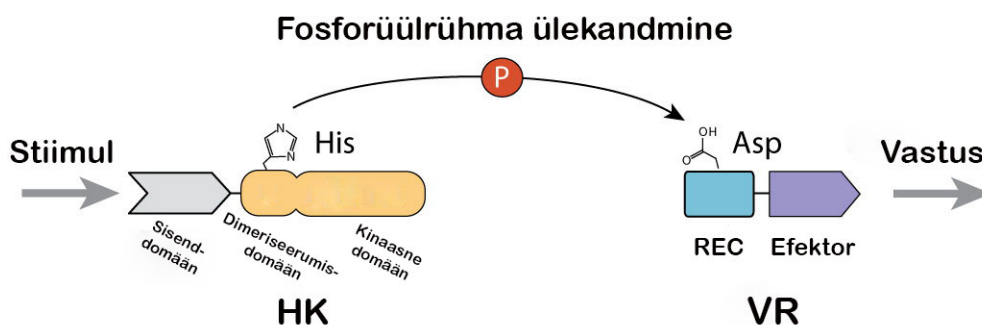
Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on välja selgitada, kas GacS-GacA signaalirada mõjutab statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i valgu hulka mullabakter *Pseudomonas putida* rakkudes.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Kahekomponentsed signaalsüsteemid

Bakteritel nagu kõigil teistel elusorganismidelgi, on võime kohaneda keskkonnast tulevate mõjudega. Nii Gram-negatiivsetes kui ka Gram-positiivsetes bakterites on olemas mitmeid signaalsüsteeme, mis reguleerivad keskkonnamõjudest tulenevaid raku füsioloogilisi vastuseid (Bhate jt., 2015; Stock jt., 2000).

Kahekomponentsed signaalsüsteemid koosnevad enamasti kahest valgust: sensorkinaasist ehk histidiini kinaasist (HK) ning vastuse regulaatorist (VR) (Joonis 1). Kahekomponendilised signaalsüsteemid toimivad järgnevalt: kui väliskeskkonnast saabub signaal, siis autofosforüleerub transmembraanne sensorvalk. Järgnevalt kantakse fosforüülrühm üle vastuse regulaatorile. VR-i fosforüülimine kutsub esile regulaatori konformatsioonilise muutuse, mis seejärel enamasti toimib transkriptsiooni regulaatorina, kas aktiveerides või represserides oma sihtmärkgeenide avaldumist (Gao ja Stock, 2009).



**Joonis 1.** Kahekomponentse signaalsüsteemi üldine ülesehitus. Süsteem koosneb histidiini kinaasist (joonisel HK) ning vastuse regulaatorist (joonisel VR). Keskkonnast saabuv stiimul läheb sisend-domeeni, mis kannab signaali edasi kinaassele domeenile. Sisend-domeenis tekivad konformatsioonilised muutused tulenevad stiimuli tunnetamisest. Edasi toimub dimeriseerumisdomeenis aset leidev histidiini jäägi autofosforüleerumine (ATP-sõltuv). Regulaatoripiirkonnas (joonisel REC) olevalle aspartaadi jäägile kantakse fosforüülrühm üle, mis aktiveerib vastuse regulaatori. (Gao ja Stock, 2009; muudetud)

Kahekomponentsete signaalsüsteemide arv võib liigiti erineda – *Escherichia coli*'s on teada 62 kahekomponentse signaalsüsteemi valku, *Streptococcus pneumoniae*'s aga 70 valku (Robinson jt., 2000). Erinevad kahekomponentsed signaalsüsteemid reguleerivad näiteks virulentsust, biofilmi moodustumist, tolerantsust antibiootikumidele ja stressile, raku jagunemist, metaboliitide utiliseerimist (Falke jt., 1997).

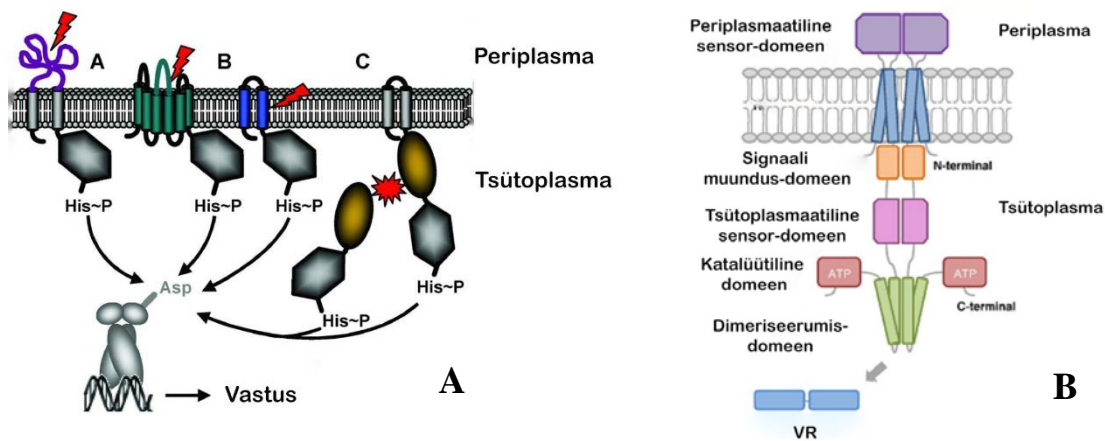
Näiteks on bakteril *Escherichia coli* kahekomponentne signaalsüsteem EnvZ-OmpR, mille sensor EnvZ tunnetab keskkonna osmootsuse muutumist, ning regulaator OmpR fosforüülitud kujul reguleerib membraaniporiinide OmpC ja OmpF transkriptsiooni (Egger jt., 1997; Pratt ja Silhavy, 1995). Kõrge toitainete kontsentratsiooni korral ekspresseerivad rakud valku OmpC, mis tekitab membraani väiksema diameetriga poriini, kuid madalama toitainete hulga puhul ekspresseeritakse valku OmpF, mis tekitab suurema poriini, et võimalikult palju toitained jõuaks rakuni. Rakk toimib nii just seetõttu, et OmpF poriinist toimub elementide ülekanne kiiremini kui OmpC poriini teel (Slauch ja Silhavy, 1996; Egger jt., 1997).

Kahekomponentsed süsteemid pole ainsad signaalrajad, mida bakterites leidub. Leidub ka rohkem kui kahest valgust koosnevaid süsteeme, näiteks *Bacillus subtilis*'e Spo-süsteem reguleerib sporulatsiooni, kus üks sensorkinaas saab aktiveerida korraga mitut regulaatorit (Burbulys jt., 1991; Vishnoi jt., 2013).

### **1.1.1. Histidiinkinaas**

Histidiinkinaasid (HK) on membraaniseoselised homodimeerse struktuuriga sensorvalgud, mis koosnevad periplasmaatilise N-terminaalsest sisend-domeenist ning tsütoplasmas olevast C-terminaalsest kinaasest domeenist (Robinson jt., 2000). Kinaasne domeen suudab signaali saabudes seonduda ATP-ga, mis toob kaasa dimeriseerumispirkonnas oleva histidiinjäägi autofosforüleerumise (Yamanda jt., 2009).

HK-i sisend-domeenid on erinevate signaalsüsteemide puhul suure variatsiooniga, mistõttu on neil võimalik detekteerida erisuguseid signaale. Histidiinkinaasid jagatakse signaali tunnetuse asukoha põhjal kolme gruppi: periplasmaatilise, tsütoplasmaatilise ning membraaniseoselise tunnetusega HK (Mascher jt., 2006; Gao ja Stock, 2009).



**Joonis 2.** Histidiinkinaaside jaotus signaalitunnetuse põhjal. (A) joonisel tähistab A) periplasmaatilise signaalitunnetusega HK-d. B) membraaniseoselise signaalitunnetusega HK-d ning C) tsütoplasmaatilise signaalitunnetusega HK, mis võib olla vabalt tsütoplasmas või membraani külge ankurdatult. Stiimul on joonisel esindatud punasega ning signaali tajuvad osad on toodud lilla, rohelse, sinise ning pruuni värviga. (Mascher jt., 2006; muudetud) (B) Skemaatiline joonis membraaniseoselisest histidiinkinaasist. Joonisel on näha olulisemad domeenid, mida signaal läbib vastuse regulaatorini jõudmiseks. VR tähistab vastuse regulaatorit. (Zschiedrich jt., 2016; muudetud)

HK-ide tüüpidest suurim on periplasmaatilise (ekstratsellulaarse) signaalitunnetusega sensorvalgud, mille sisend-domeen asub periplasmas ning kinaasne tuum tsütoplasmas (Mascher jt., 2006). Kuna HK-i sisend-domeen ning kinaasne domeen paiknevad kahes erinevas raku sektsioonis, siis on siinkohal oluline transmembraanne (TM) signaalülekanne, mille puhul tunnetavad membraaniseoselised sensorid keskkonnas lahustunud aineid. Näiteks on bakterites *E.coli* ning *Salmonella enterica* kahekomponentne signaalsüsteem NarXL, mille histidiinkinaas NarX tunnetab lahustunud nitraati (Stewart, 2003; Williams ja Stewart, 1997).

Teine grupp sisaldab membraaniseoselisi HK-sid, millel on tsütoplasmaatiline kinaasne domeen ja sisend-domeen, ning on rakumembraanist mitmeid kordi läbi põimunud. Signaali ülekanne algab rakumembraanist, jõudes tsütoplasmas olevasse kinaasne domeeni. Tunnetamiseks signaali, on membraaniseoselise HK-i sisend-domeeni suurus vahemikus kaks kuni kakskümmend transmembraanset regiooni, mis on omavahel seotud lühikeste intra- või ekstratsellulaarsete linkeritega. Membraaniseoselised HK-d tunnetavad stiimuleid, mis tekivad membraani omaduste muutumisel, näiteks mehaanilise stressi või raku rõhumuutuste korral. *Bacillus subtilis*-e näitel on üks stiimuli põhjustajaid temperatuur, mis mõjutab rakumembraani viskoossust. On teada, et kõrgemal temperatuuril on rakumembraan voolavam, kuid

temperatuuri langedes muutub tahkemaks. Selleks reguleerib *B. subtilis* kahekomponentse signaalsüsteemi DesRK sensorkinaasi DesK abil membraani funktsionaalsust, sh voolavust. Des geenid, mille avaldumine on DesRK signaalsüsteemi poolt kontrollitud, kodeerivad rasvhapete desaturaase. Kõrgemal temperatuuril ehk voolavam membraani korral, kui rasvhapetel on küllastumata *cis*-sidemed, on DesK fosforüleerimata, kuid temperatuuri langedes DesK aktiveerub, mis omakorda aktiveerib vastuse regulaatori DesR, mis käivitab *des* geenide ekspressiooni (Aguilar jt., 1998; Aguilar jt., 1999). Desaturaas sünteesib membraani fosfolipiidide rasvhapete vahele kahekordseid sidemeid, mille suurenenud hulk tähendab, et membraan on voolavam (Aguilar jt., 2001).

Kolmandasse gruppi kuuluvad tsütoplasmaatilise signaalitunnetusega HK-id. Need HK-id on kas sisend-domeeni kaudu tsütoplasma membraani ankurdatud või siis paiknevad täiesti tsütoplasmas. Bakteris *Bradyrhizobium japonicum* on olemas hapniku kontsentratsiooni tunnetav histidiinkinaas FixL, mis saadab signaali VR-ile FixJ. VR siin puhul reguleerib N<sub>2</sub> fikseerimiseks vajalike geenide transkriptsiooni. Kuna hapniku (O<sub>2</sub>) kontsentratsioon on muutlik, siis madalama kontsentratsiooni korral on FixL aktiivses olekus, mistõttu saab toimuda signaaliülekanne FixJ-ile – toimub N<sub>2</sub> fikseerivate geenide ekspressiooni suurenemine. Kõrgema hapnikukontsentratsiooni korral seondub hapnik FixL-iga, mis tähendab, et FixL on inaktiveeritud kujul ning signaaliülekannet ei toimu. (Mascher jt., 2006; Gilles-Gonzalez ja Gonzalez, 1993; Gong jt., 2000)

### 1.1.2. Vastuse regulaator

Vastuse regulaator on kahekomponendilistes signaalsüsteemides väljundiks, reguleerides signaali saabudes sihtmärkgeenide ekspressiooni. Nii, nagu HK-i puhul, on ka VR-i teatud domeenid tugevalt konserveerunud. VR moodustub kahest domeenist, milleks on N-terminaalne konserveerunud REC-domeen ning C-terminaalne varieeruv efektor-domeen. REC siinkohal tähendab regulatoorset domääni. (Gao ja Stock, 2009).

REC-domeen katalüüsib HK-ilt fosfaatrühma ülekande sensori histidiinjäägilt oma aspartaadijäägile. Inhibeerivate ning aktiveerivate, igale VR-ile spetsiifiliste, interaktsioonide konformatsioonilised REC-domeeni muutused kontrollivad efektor-domeeni aktiivust. Kui

vastuse regulaator on fosforüülitud kujul, siis on efektor-domeen aktiivne. VR-i efektor-domeene liigitatakse toimemehhanismi alusel nelja gruppi: enamik neist on DNA-ga seonduvad (63%); kuid leidub ka ensümaatilisi domeene (13%); ning osad seonduvad valkude ja RNA-ga. (West ja Stock, 2001; Gao ja Stock, 2009)

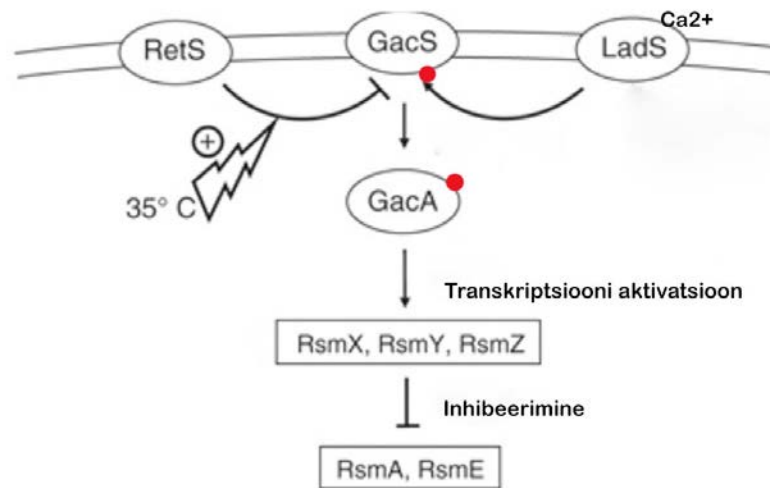
Bakteris *E.coli* on CheA-CheY signaalsüsteem, mida saab tuua näitena ainult ühest domeenist (REC-domeen) koosnevast VR-ist (Gao ja Stock, 2009). Kui kemoretseptorile CheA saabub signaal, siis kannab ta fosforüülühme edasi VR-ile. Fosforüleeritud kujul süsteemi VR CheY on suuteline muutama bakteriviburi päripäeva pöörlevaks, kuna VR seondub lülitikompleksi moororvalguga FliN (Sarkar jt., 2010). Juhul, kui signaali ei saabu, jätkub viburi pöörlemine vastupäeva.

Effektor-domeenide geeniekspressiooni regulatsioonimehhanismid võivad sõltuvalt efektor-domeeni struktuurist olla erinevad. VR seondub DNA-ga oma seonduvadomeenis olevate motiividega, näiteks HTH ehk „*helix-turn-helix*“ või WH ehk „*winged helix*“ kaudu (Gao ja Stock, 2009). Kahekomponentse signaalsüsteemi FixL-FixJ, millest oli juttu ka eelmises alapeatükis, vastuse regulaator FixJ on näide seondumisest HTH motiivi läbi (Wright jt., 2018).

Ensümaatiliste VR efektor-domeenide hulka kuulub ca 13% vastuse regulaatoritest. Põhiosa neist VR-idest reguleerivad c-di-GMP rada. C-di-GMP reguleerib biofilmi moodustumist, liikuvust, patogeensust ning virulentsust (Rajeev jt., 2014; Romling jt., 2013).

## **1.2. Kahekomponentne signaalsüsteem GacS-GacA**

Gram-negatiivsete bakterite seas on laialt levinud konserveerunud kahekomponentne signaalsüsteem GacS-GacA, mis koosneb histidiini kinaasi valgust GacS ja vastuse regulaatorist GacA. GacS-GacA põhifunktsioon on reguleerida raku füsioloogilist aktiivsust läbi konserveerunud Gac-Rsm signaaliülekaneraja (joonisel 3) (Latour, 2020; Ferreira ja Gallegos, 2021; Song jt., 2023). Kuna kahekomponentsed signaalsüsteemid, sealhulgas ka GacS-GacA, reguleerivad virulentsust ning resistentsust antibiootikumidele, siis nähakse seda rada kui potentsiaalset antibakteriaalse ravimi sihtmärki (Gotoh jt., 2010; Bem jt., 2015).



**Joonis 3.** Gac-Rsm signaaliraja skemaatiline mudel bakteris *Pseudomonas fluorescens* CHA0. GacS aktiveerib GacA, mis omakorda aktiveerib RsmX-i, RsmZ-i ning RsmY sRNA-d. Toimub sekundaarsete metaboliitide ekspressioon, kuna RsmX/Y/Z inhibeervad RsmA ja RsmE. Kui histidiinkinaas RetS ja gacS moodustavad heterodimeeri, siis on GacS-GacA signaalsüsteem represseritud. Sensorikinaas LadS on samuti RsmX/Y/Z-i aktivaator. (Humair jt., 2009; muudetud)

GacS-GacA signaaliraja uuringud said alguse juba 1990. aastate algul, kui selgus, et GacA on GacS-i homoloogne vastuse regulaator, ning koos moodustavad mõlemad valgud ühe signaalsüsteemi (Rich jt., 1994; Pernestig jt., 2001). Arvati, et globaalne vastuse regulaator GacA kontrollib geenide ekspressiooni ainult transkriptsioonitasemel, kuid selgus, et mainitud süsteem reguleerib Rsm/Csr süsteemi post-transkriptsiooni tasemel. Rsm/Csr süsteem koosneb RNA-d siduvatest valkudest, mis reguleerivad geeniekspressiooni, ja mittekodeerivatest sRNA-dest; Csr viitab süsiniku talletamise regulaatorile ning Rsm on sekundaarse metabolismi repressoriks (Sonnleitner ja Haas, 2011; Kusmierek ja Dersch, 2018; Kay jt., 2005). sRNA-d suudavad geenide kindlaks tegemiseks reguleerida RNA seondumisvalkude aktiveerimist ning inhibeerimist. Seetõttu on kindel, et Gac/Rsm signaaliraja kaudu käib mitmete fenotüübiliste geenide regulatsioon post-transkriptsioonilisel tasemel (Babitzke ja Romeo, 2007; Song jt., 2023).

On teada, et GacS-GacA signaalrada kontrollib pseudomonaadides RsmX/Y/Z sRNA-de ekspressiooni, seondudes RsmA-ga, mis on sekundaarse metabolismi repressoriks (Song jt., 2023). Bakteris *Pseudomonas aeruginosa* kontrollib GacA otseselt kahe sRNA – RsmY ning RsmZ – ekspressiooni (Brencic jt., 2009). *Pseudomonas fluorescens*-i puhul reguleerib GacA

kolme sRNA (RsmX, RsmY ja RsmZ) transkriptsiooni, mis ühiselt reguleerivad sekundaarse metaboliidi vesiniktsüaniidi ekspressiooni, kergendades RsmA ning RsmE sekundaarset metabolismi inhibeerivat mõju (Kay jt., 2005; Humair jt., 2010; Zhang jt., 2020).

Duque ja tema kolleegide katses selgus, et GacS-i puudumisel väheneb *Pseudomonas putida* tüve KT2440 kinnitumisvõime erinevatele biotilistele ja abiootilistele pindadele (Duque jt., 2013). Sama *P. putida* tüve *gacS* mutantides oli märgata vähenenud biofilmi moodustumise võime ning samuti oli vähenenud ka biofilmi struktuurivalkude LapA ja LapF-i ekspressioonitase (Duque jt., 2013; Martinez-Gil jt., 2014). Martinez-Gil'i ja ta kolleegide huvitas, kas LapA/LapF valgud võivad mõjutada biofilmi moodustumist, kui valk GacS on puudu. Eksperimendist jõuti järeldusele, et Gac-signaalsüsteem reguleerib *lapA* ning *lapF* geenide ekspressiooni, kuna mõlema valgu ekspresseerimine oli võrreldes metsiktüvega madalam mõlemas *gac* (*gacA* ja *gacS*) mutandis, kuid nad ei välistanud võimalust, et ka teised biofilmi struktuurikomponendid võivad olla Gac-signaalsüsteemi kontrolli all (Martinez-Gil jt., 2014).

*Pseudomonas aeruginosa* puhul on avastatud, et histidiini kinaas RetS inhibeerib GacS-GacA signaalsüsteemi. Kuna GacS ja RetS on võimelised koos moodustama heterodimeeri, siis on nii GacS-i autofosforüleerimine kui ka GacA fosforüleerimine blokeeritud ja edasine signaaliülekanne pole võimalik (Goodman jt., 2009). Samal aastal uuris Brencic oma kolleegidega *P. aeruginosa* sRNA-de RsmZ/Y ekspressiooni, kust tuli vihje, et RsmZ ning RsmY on *retS* geeni regulaatorid (Brencic jt. 2009). *P. aeruginosa*-s on RetS-ile sarnane sensorikinaas LadS, mis käitub GacS-ile sarnaselt, aktiveerides RsmZ-i, viidates fakte, et GacS-GacA ja LadS/RetS koos moodustavad ühise signaalsüsteemi (Ventre jt., 2005).

Meie uurimisgrupis on Tagel jt. (2016) leidnud, et *gacS*-i puudumisel tõuseb *Pseudomonas putida* statsionaarse kasvufaasi rakkudes mutatsioonide tekkesagedus ligi kümme korda. See on esmakordne kirje GacS-i osalusest bakterite mutatsiooniprotsessides (Tagel jt., 2016). Ka Phan jt. (2020) kirjeldas oma bakalaureusetöös, et Gac-signaaliraja regulaatori GacA defektsuse korral suureneb *P. putida* rakkudes mutantide tekkesagedus (Phan jt., 2020). Tageli jt. (2016) artiklis ei välistatud võimalust, et Gac-signaaliraja defektsus võib mõjutada stressispetsiifilise sigmafaktori RpoS-i taset ja see võibki olla põhjuseks, miks *gacS*-i puudumisel tõuseb statsionaarse kasvufaasi mutatsioonide hulk *P. putida* nälgivates rakkudes.

### 1.3. Üldine stressivastus

Kõik elusorganismid on mingil moel vastuvõtlikud stressile. Stressitingimustes on bakterirakkudel oluline muuta geenide ekspressiooni, et stressiga paremini toime tulla. RNA polümeraasi  $\sigma$ -faktorid on olulised transkriptsiooni reguleerimiseks, suunates ekspressiooni vajalikele geenidele (Landini jt., 2014). Transkriptsiooni alustamiseks on vajalik sigmafaktori ja RNA polümeraasi apoensüümi seondumine. Erinevate  $\sigma$ -faktorite funktsioon on varieeruv, nad jagunevad kahte rühma: „koduhooldjad“ ehk  $\sigma^D$  või  $\sigma^{70}$ , ning alternatiivsed sigmafaktorid. Bakteris *Escherichia coli* on kuus alternatiivset sigmafaktorit –  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^I$ ,  $\sigma^N$  ning  $\sigma^S$  (Gourse jt., 2006). Iga sigmafaktor võimaldab bakterirakul kohaneda keskkonnatingimustega, koordineerides spetsiifiliste geenide transkriptsiooni (Gourse jt., 2006; Landini jt., 2014). *P. aeruginosa*-s teadaolevad sigmafaktorid on RpoD, RpoH, RpoF, RpoS ning RpoN (Potvin jt., 2008). RpoD vastutab eksponentsiaalses faasis raku põhifunktsioone reguleerivate geenide eest, RpoH aktiveerib gene kuumašoki tingimustel, RpoF regulatsioon kontrollib viburite sünteesi ning RpoN on rakule oluline lämmastiku omastamisel (Potvin jt., 2008). RpoS-ist annan ülevaate järgnevas peatükis.

#### 1.3.1. Stressispetsiifiline sigmafaktor RpoS

Keskkonnamõjutustest tulenevad muutused võivad rakkudes kajastuda stressi kujul. Tihti piisab juba väikesest temperatuurimuutusest või vähesest toitainete kogusest, et bakterirakkude kasv pidurduks. *Escherichia coli*-s on avastatud alternatiivne sigmafaktor RpoS ( $\sigma^S$ ), mis on bakteri üldiseks stressivastuse regulaatoriks (Hengge-Aronis, 1996). RpoS on statsionaarse kasvufaasi spetsiifiline sigmafaktor, mis lisaks stressiga kohanemisele mängib olulist rolli ka biofilmi moodustumisel, virulentsuses ning antibiootikumiresistentsuse tekkes (Battesti jt., 2011; Schellhorn, 2014). On teada, et *rpoS*-i puudumine ei mõjuta rakkude kasvamist soodsates tingimustes, kuid bakteritüved, mis kannavad *rpoS*-i aktiivsust mõjutavaid mutatsioone, on stressitingimuste suhtes ülitundlikud (Loewen ja Hengge-Aronis, 1994). *E. coli* tüve K12 näitel on selgunud, et RpoS-i valgu hulk suureneb statsionaarses kasvufaasis (Gottesman, 2019). Nagu teistegi sigmafaktorite puhul, siis ka RpoS seondub RNA polümeraasi apoensüümiga,

moodustades haloensüümi, mis seondub transkriptsiooni alustamiseks promootorjärjestusele (Battesti jt., 2011).

*E. coli*-s on näidatud, kuidas rakusisene RpoS-i tase muutub, kui keskkonnas on toitainete puudus. Nimelt ekspresseeritakse statsionaarse faasi rakkudes RpoS-i intensiivsemalt (Tanaka jt., 1993). Limiteeritud toitainete korral, nt süsinikunälg või rauapuudus, kui rakkudes on kasv pidurdunud, energiat on vähe ning RpoS-i toodetakse rohkem, on täheldatud, et *rpoS*-i ekspresseerimiseks vajalik signaal võib olla tingitud rakusisese ATP kontsentratsiooni vähesuse tunnetamisest (Ihssen ja Egli, 2004).

RpoS-i kodeeriva geeni enda regulatsioon toimub nii transkriptsiooni, translatsiooni kui ka post-translatsiooni tasemel. Stressi tunnetamisel tekivad rakku sRNA-d, mis aktiveerivad *rpoS*-i mRNA transleerimise või tekitavad hetkelise  $\sigma^S$ -i stabiliseerumise (Hengge, 2009). *E. coli*-s on *rpoS* geen mitme promootori kontrolli all. Statsionaarses faasis transkribeerimiseks olulisimaks peetakse promootorit  $P_{rpoS}$ , mis asub eelneva geeni *nlpD* lugemisraamis (Lange jt., 1995).  $P_{rpoS}$  promootorilt lähtuvat transkriptsiooni reguleerivad mitmed transkriptsioonifaktorid, näiteks signaalsüsteemi ArcAB fosforüleeritud VR ArcA-le. Transkriptsiooni repressioon ArcA kaudu on seotud raku energiataseme ning redokspotentsiaali tunnetamisega, mis ühiselt limiteerivad *rpoS*-i ekspresseerumist statsionaarses faasis (Mika ja Hengge, 2005). Samuti on ArcA sõltuv regulatsioon seotud valguga CRP, mis vastab glükoosipuudusest tingitud stressile (Kolb jt., 1993). *E. coli*-s kattuvad ArcA ja CRP seondumiskohad, mistõttu *rpoS*-i repressioon toimub läbi CRP-poolse transkriptsiooni aktivatsiooni inhibeerimise (Mika ja Hengge, 2005).

Varasemalt on meie uurimisgrupi poolt näidatud, et RpoS-i puudumisel suureneb statsionaarse kasvufaasi mutagenees *P. putida* rakkudes (Tarassova jt., 2009). Bertani ja kolleegid selgitasid välja, et *Pseudomonas aeruginosa* puhul mängib nii hilises eksponentsiaalses kui ka statsionaarses kasvufaasis *rpoS*-i transkriptsioonis olulist rolli PsrA (Bertani jt., 2003).

Lisaks on kirjanduses näidatud, et kahekomponentne GacS-GacA signaalsüsteem ning hulgatunnetus mõlemad mõjutavad *rpoS*-i ekspressiooni, kuid lisaks neile teeb sama ka PsrA regulaator, mis seondub otseselt ja statsionaarses faasis aktiveerib *rpoS* promootori (Potvin jt., 2008). Bakteris *P. fluorescens*-is näidati, et RpoS oli GacA poolt positiivselt kontrollitud, kuid RsmA poolt represseeritud (Heeb jt., 2004). *P. fluorescens*-i tüves CHA0 leiti, et Gac-Rsm

signaalirajaga paralleelselt töötab ka *rpoS*-i ekspressioon – Gac-Rsm panustab läbi sigmafaktori RpoS bakteri oksüdatiivsesse stressivastusesse (Humair jt., 2009). Sama bakteri tüve Pf-5 põhjal on avastatud, et GacS-GacA mõjutavad rakkudes RpoS-i kuhjumist ning *rpoS*-i transkribeerimist (Whistler jt., 1998). Whistler ja kollegid järeldasid, et mutatsioonid *gacS*-is ning *gacA*-s vähendasid RpoS-i kuhjumist, ning mutatsioonid mõjutasid *rpoS*-i transkriptsiooni eksponentsiaalses kasvufaasis rohkem kui statsionaarses faasis. Bakteritüved, mis on RpoS-negatiivsed, on statsionaarses kasvufaasis vähem tolerantsed näiteks vesinikperoksiidile, kõrgetele temperatuuridele ning madalale pH tasemele (Jorgensen jt., 1999; Cochran jt., 2000).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Meie uurimisgrupis on varasemalt näidatud, et kahekomponentse GacS-GacA signaalsüsteemi sensori GacS-i defektsus suurendab mullabakteri *Pseudomonas putida* PaW85 statsionaarse kasvufaasi rakkudes mutageneesi ligi kümme korda (Tagel jt., 2016). Kirjandusest on teada, et pseudomonaadides mõjutab GacS-GacA signaalsüsteem stressivastuse olulise sigmafaktor RpoS-i taset (Whistler jt., 1998; Martinez-Gil jt., 2014; Kang jt., 2004). Lisaks oli eelnevalt teada, et sigmafaktor RpoS-i puudumine põhjustab mutatsioonisageduse suurenemist *P. putida* statsionaarses kasvufaasis rakkudes (Tarassova jt., 2009).

Selleks, et välja selgitada, kas GacS-GacA signaalirada mõjutab stressivastuses olulise sigmafaktor RpoS-i valgu hulka *P. putida* PaW85 nälgivates rakkudes ja võiks seeläbi mõjutada statsionaarse kasvufaasi mutatsioonide teket,

- uurisin RpoS-i taset fenool-minimaaltardsöötmel nälgivates *P. putida* tüvede PaW85, *gacS*- ja *gacA*-defektsete ning  $\Delta rpoS$  rakkudes, kasutades selleks RpoS-sõltuva promootori aktiivsuse mõõtmist;
- analüüsisin fenool-minimaaltardsöötmel viis päeva nälgitud *P. putida* metsiktüve ja *gacA*-defektse tüve proteoomi andmestikku, et välja selgitada Gac-signaaliraja mõju RpoS-i valgu hulgale;
- lisaks iseloomustasin *P. putida* PaW85, *gacS*- ja *gacA*-defektsete ning  $\Delta rpoS$  rakkude kasvumist nii plasmidi juuresolekul kui ilma.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Kasutatud plasmidid, söötmed, bakteritüved ning bakterite kasvutingimused

Baktereid kasvasin defineeritud M9-glükoos-CAA minimaalsöötmes (glc-CAA) (Adams, 1959), mille valmistamiseks lisasin 1 x M9 puhvrissi (42 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19 mM NH<sub>4</sub>Cl, 9 mM NaCl) mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 µM MgO,

50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCO}_3$ , 40  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 2,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 2,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CoSO}_4$ , 1,9  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ ), süsinikuallikana glükoosi (glc; lõppkontsentratsioon 0,2 %) ning aminohapete hüdroliisaati (CAA; lõppkontsentratsioon 0,2%) või klassikalises LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöötmes (sisaldab 1% trüptooni, 0,5% pärmiekstrakti, 0,5% NaCl) (Miller, 1992). Tardsöötme saamiseks lisasin söötmele agarit 15 g/l.

Selektsiooniks kasutasin antibiootikumidest penitsilliini (Pen 200; lõppkontsentratsioon 1,5 mg/ml). Vajadusel lisasin söötmetesse süsinikuallikana fenooli (phe; lõppkontsentratsioon 2,5 mM). *lacZ* geeni ekspressiooni tuvastamiseks lisasin LB-agarsöötmele X-gali (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (5-bromo-4-kloro-3-indolüül-D-galaktopüranosiid).

*Pseudomonas putida* rakke kasvasin 30 °C juures. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisin kultuure loksutil (180 rpm). Töös kasutatud bakteritüved ning plasmiid on toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiid.

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85 (metsiktüvi ehk wt)	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	Bayley et al., 1977
<i>gacS</i> ::Sm	PaW85 tüvi, <i>gacS</i> on katkestatud streptomütsiini (Sm) geeniga	Tagel et al., 2016
<i>gacA</i> ::Sm	PaW85 tüvi, <i>gacA</i> on katkestatud streptomütsiini (Sm) geeniga	R. Hõrak, avaldamata
<i>ΔrpoS</i>	Deletsioontüvi, kus terve <i>rpoS</i> geen on deleteeritud	R. Teras, avaldamata
Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
S/CpKTlacZ	<i>lacZ</i> geen on transposoon Tn4652 transposaasi promootori kontrolli all	Hõrak ja Kivisaar, 1998

### 2.2.2. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Tabelis 1 toodud *P. putida* tüvede rakke kasvasin loksutil üleöö (u 18 tundi) 4 ml-s LB-vedelsöötmes. 350  $\mu\text{l}$  üleöökultuuri tsentrifugeerisin kokku (60 sek, 12000 x g) ning seejärel pesin rakke kolm korda 300  $\mu\text{l}$  300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeerisin 100  $\mu\text{l}$  300 mM sahharoosi lahuses. Lisasin veel rakkudele ligikaudu 100 ng plasmiidset DNA-d.

Plasmiidi S/CpKtlacZ (toodud tabelis 1) viisin kompetentsetesse rakkudesse elektroporatsiooni teel. Elektroporatsiooni teostas firma BioRad elektroporaatoriga „*Micropulser*“, mis töötab pingel 2,5 kV. Pärast elektroporatsioonist lisasin rakkudele 700 µl värsket LB-vedelsöödet ja kasvasin rakke loksutil 45 minutit. Plasmiidi seleksiooniks plaatsin rakud penitsilliini sisaldavale selektiivsöötlele.

### 2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i (ingl k – *Polymerase Chain Reaction*) kasutasin tüvede kontrollimiseks, et näha, kas plasmiid on rakkudes olemas. Reaktsioonisegu lõppmahuks oli 20 µl, sisaldades lisaks maatriksina kasutatud bakterirakkudele 1x PCR puhvrit (*Thermo Scientific, DreamTaq™ Green Buffer* (10X), mis sisaldas 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM dNTP, 0,5 ühikut Taq-polümeraasi reaktsiooni kohta ja praimereid, mida kumbagi oli 10 pmol ühe reaktsiooni kohta. Kasutatud praimerid on esitatud tabelis 2.

PCR koosnes 25 tsüklist, tingimustel:

- 1) DNA denaturatsioon; 96 °C, 30 sekundit
- 2) Praimerite seandumile matriitsile; 54 °C, 45 sekundit
- 3) DNA süntees temperatuuril 72 °C, 45 sekundit.

Tsüklile eelnes 4 minutit kestev rakkude lõhkumiseks vajalik eelkuumutamine temperatuuril 96 °C, järgnes järelsüntees 72 °C (4 min) juures, mis sünteesis kõik pooleliolnud fragmendid lõpuni. Kogu programm kestis 1 h 13 min.

**Tabel 2.** Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestus	Iseloomustus
IHFpra	5'-CGTGAGCTCTGTAAATATATGATTTAAAAGG-3'	Seondub Tn4652 parempoolse pöördkordusjärjestusele
lacZ-seq	5'-GGG GAT GTG CTG CAA GGC G-3'	Seondub <i>lacZ</i> geeni algusega

#### 2.2.4. Geelektroforees

PCR-i tulemusi analüüsisin geelektroforeesil. Selleks lisisin PCR reaktsioonisegule 5 µl foresivärvi (0,04 % broomfenoolsinine 50 % glütseroolis). Kogu segust kandsin 5 µl PCR produktisegu 1% agarosgeelile 1 x TAE puhvril (50 mM Tris- atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi (kontsentratsioon 0,33 µg/ml). Kui PCR reaktsioonipuhver sisaldas juba eelnevalt värvi, siis polnud vajadust geelektroforeesiks enam värvi juurde lisada. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutasin firma *Thermo Scientific* DNA markerit *ZipRuler Express DNA Ladder 1* või *ZipRuler Express DNA Ladder 2*. Elektroforees toimus pingel 135 V (10 minutit) ning DNA visualiseerimiseks kasutasin UV-valgust.

#### 2.2.5. RpoS-sõltuvalt promootorilt lähtuv β-galaktosidaasi aktiivsuse määramine fenool-minimaaltardsöötmele nälgivatest rakkudest

Transposoon Tn4652 transposaasi *mpA* promootori aktiivsuse mõõtmiseks kasutasin plasmidi S/CpKTlacZ, kus *mpA* promootorala on kloonitud β-galaktosidaasi kodeeriva *lacZ* reportergeeni ette. *mpA* promootorit kasutan seetõttu, et transposoon Tn4652 transposaasi kodeeriva geeni *mpA* promootorilt lähtuv transkriptsioon on tugevalt RpoS-sõltuv, nii saame kaudselt hinnata RpoS-i hulka *gac*-defektsetes *P. putida* rakkudes, et kas rakud on metsiktüvega võrreldavad või mitte (Ilves jt., 2001).

Minu katse hõlmas β-galaktosidaasi aktiivsuste määramist statsionaarse kasvufaasi rakkudest. Üleöö kasvatatud bakterikultuurist plaatisin 500 µl fenool-minimaal tassidele (200 ml vesiagar, 50 µl fenool, 20 ml 10 x M9, 500 µl mikroelemendid).

Rakke pesin tassidelt maha plaatimise päeval (üks tass tüve kohta), teisel päeval peale plaatimist (kaks tassi tüve kohta) ning neljandal päeval peale plaatimist (kaks tassi tüve kohta). Pesemiseks kasutasin 2 ml 1 x M9 lahust tassi kohta. Kogutud raku suspensiooni tõstsin katsutisse. Kogutud rakke tsentrifuugisin 60 sek, 12000 x g, eemaldasid supernatandi ning lisisin rakkudele uuesti peale 1 ml värsket 1 x M9. Supernatant eemaldatakse selleks, et lahti saada võimalikest üleliigsetest rakuosistest. Saadud raku suspensiooni kasutasin β-galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks.

$\beta$ -galaktosidaasi aktiivsuseid määrasin *P. putida* PaW85, *gacS::Sm*, *gacA::Sm* ning *ArpoS* rakkudest, kõik tüved sisaldasid S/CpKTLacZ plasmidi. Selleks, et määrata  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsust, kasvasin bakterirakke üleöö (u 18 tundi; 30 °C) 5 ml-s glc-CAA vedelsöötmes koos penitsilliiniga (lõppkontsentratsioon 1,5 mg/ml), mis oli plasmidi stabiilsuse tagamiseks. Katse käivitamiseks vajalik reaktsioonisegu sisaldas 1,6 ml Z-puhvrit (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 50 mM  $\beta$ -merkaptopetaanool; 0,0005 % naatriumdodetsüülsulfaat (SDS); pH 7), 0,4 ml ONPG-lahust (o-nitrofenüül- $\beta$ -D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml) ning 0,1 ml kloroformi. Plaatimise päeval teostatud mõõtmisel käivitasin  $\beta$ -galaktosidaasi reaktsiooni peale tassilt maha pestud 100  $\mu$ l bakterikultuuri lisamisega, kuid järgnevatel mõõtmistel kasutasin tassilt maha pestud bakterikultuure koguses 120  $\mu$ l, sest rakke oli tassilt keeruline kätte saada ning see võinuks mõjutada nälgivate statsionaarse kasvufaasi rakkude eriaktiivsust. Aega fikseerisin sellest hetkest kuni reaktsiooni peatamiseni. Reaktsioon peatati reaktsioonisegu piisavalt kollaseks muutumisel. Reaktsiooni peatamiseks kasutasin 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M).

Eriaktiivsuse arvutamiseks kasutasin aega, mille jooksul segu värvus kollaseks, kollase värvi intensiivsust (O-nitrofenool) ning rakukultuuri tihedust. Tekkinud laguprodukti orto-nitrofenooli hulga määramiseks kasutasin spektrofotomeetrit lainepikkusel 420 nm. Lüüsitud rakkude tiheduse jaoks kasutasin lainepikkust 550 nm.  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuse arvutamiseks (Milleri ühikutes) kasutasin valemit:  $E = (1000 \times (OD_{420} - 1,75 \times OD_{550})) \div (t \times V \times OD_{580})$ , kus t on reaktsiooniks kulunud aeg, V on kasutatud bakterikultuuri maht (ml), OD<sub>420</sub> on neeldumine 420 nm juures ehk tekkinud produkti hulk, OD<sub>550</sub> on neeldumine 550 nm juures (lüüsunud rakkude hulk) ja OD<sub>580</sub> on kasutatud rakukultuuri tihedus, mõõdetuna 580 nm juures (Miller, 1972). Edasisi arvutusi tegin programmis Microsoft Excel 2016.

#### **2.2.6. Nälgitud *P. putida* rakkude ettevalmistus proteoomi analüüsiks ja proteoomi andmete analüüs**

Selleks, et välja selgitada, kas GacS-GacA signaalirada osaleb statsionaarse faasi sigmafaktor RpoS-i regulatsioonis, otsustas meie uurimisgrupp tellida TÜ Tehnoloogiainstituudi proteoomika tuumiklaborilt fenool-minimaaltardsöötmel viis päeva nälgitud *P. putida*

metsiktüve ja *gacA::Sm* rakkudest märkevaba täisproteoomi analüüsi, mille ettevalmistuses osalesin ka mina. Proteoomi analüüsiks kasvasime kolmes tehnilises korduses *P. putida* metsiktüve ja *gacA::Sm* tüve *glc-CAA* vedelsöötmes lokutis üleöö 180 rpm ja 30°C juures. Metsiktüve igast tehnilisest replikaadist plaatisime kümnele fenool-minimaaltassidele 500 µl üleöö kasvanud rakukultuuri (metsiktüve kohta kokku 30 fenool-minimaaltassi), samas *gacA::Sm* tüve igast tehnilisest replikaadist plaatisime vaid viiele fenool-minimaaltassile 500 µl üleöö kasvanud rakukultuuri (tüve kohta kokku 15 fenool-minimaaltassi). Tasse inkubeerit 30 °C termostaadis neli päeva ja viiendal päeval pesime 1 x M9 puhvriga rakud tassidelt maha, kasutades selleks klaaskuule ja 1 x M9 lahuse pipeteerimist n-ö survepesu meetodil.

Kui rakud olid kätte saadud ja neid pestud 2 korda 1 x M9 puhvriga, siis viisime tüvede optilise tiheduse ( $OD_{580}$ ) samaväärseks – 0,05; ning tsentrifuugisime 4°C juures 50 ml rakususpensioonist rakud kokku ning rakusademed kiirkülmutati vedelas lämmastikus. Proovid analüüsiti TÜ Tehnoloogiainstituudi Proteoomika tuumiklaboris. Tulemuste analüüsi teostas in programmiga *Perseus* v2.0.3.0

### **2.2.7. *P. putida* nälgiva populatsiooni elumuse määramine fenool-minimaalsöötmetl**

Igal β-galaktosidaasi mõõtmise päeval (0. päeval, 2. ning 4. päeval) tegin paralleelselt LB-penitsilliini ning LB söötmetassidele lahjendused, et hinnata elusrakkude hulka ja testerplasmidi stabiilsust fenool-minimaaltardsöötmetl nälginud rakkudest. Elumuse uurimiseks kogusin rakukultuuri β-galaktosidaasi mõõtmisele eelnevalt. Peale rakkude pesemist 1 x M9 lahusega ning 1 ml-s 1 x M9 lahuses üles võtmist viisin bakterirakkude optilised tihedused võrdväärseks – 0,05. Seejärel valmistasin lahjendusteread mikrotiiterplaadile, mahuga 100 µl (90 µl 1 x M9 + 10 µl rakukultuur). Tassidele tegin kaks 5 µl täppi tüve kohta.

Plaatimise päeval tegin tabelis 1 toodud bakterikultuuridest  $10^9$ -,  $10^8$ - ning  $10^7$ -kordsed lahjendused. Teisel päeval olid lahjendused  $10^8$ -,  $10^7$ - ning  $10^6$ -kordsed ning neljandal päeval  $10^7$ -,  $10^6$ - ning  $10^5$ -kordsed. Tekkinud kolooniaid lugesin pärast 21 tunni möödumist.

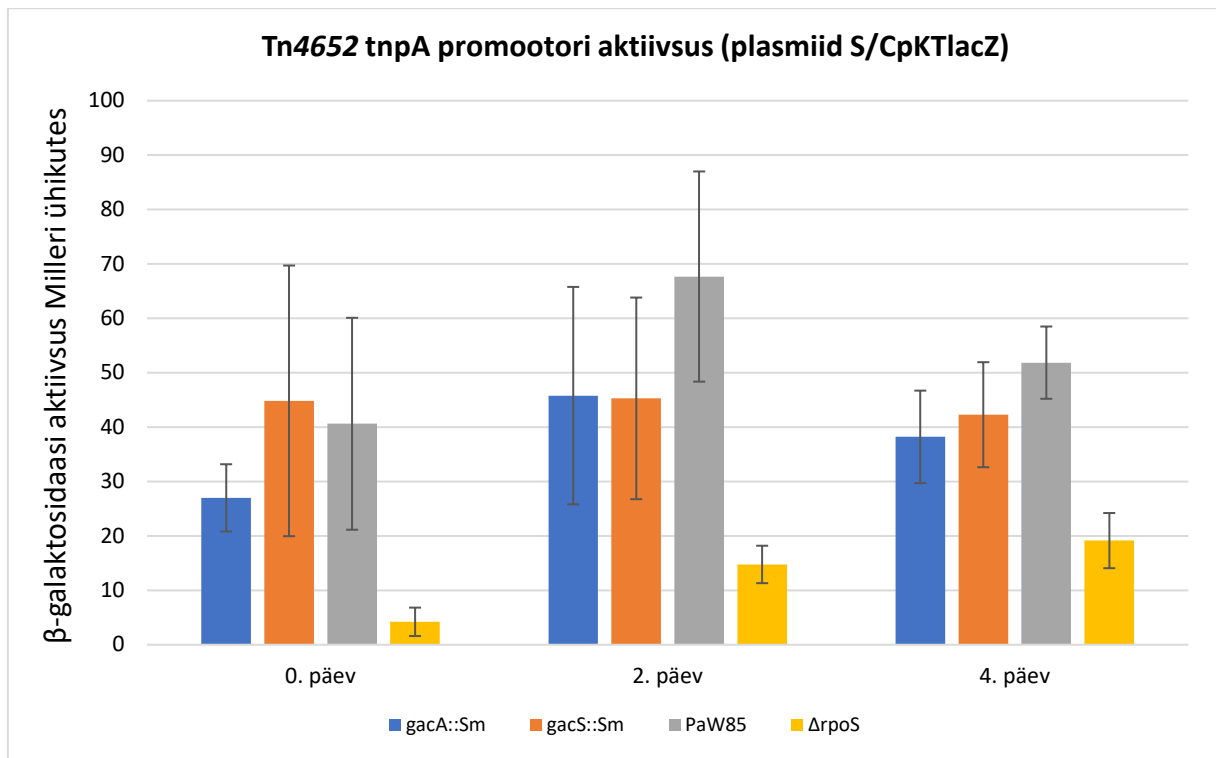
### **2.2.8. *Pseudomonas putida* kasvukiiruste määramine**

*P. putida* tüvede kasvukiiruste mõõtmiseks kasvasin uuritavaid tüvesid (PaW85, *gacS*::Sm, *gacA*::Sm ning *ArpoS*, nii koos kui ilma S/CpKTlacZ plasmiidita) loksutil (180 rpm, 30 °C) üleöö 4 ml-s glc-CAA söötmes. Plasmidi sisaldavatele tüvedele lisasin söötmesse plasmidi stabiilsuse tagamiseks penitsilliini. Pärast 18 tunni möödumist lahjendasin bakterikultuurid glc-CAA söötmesse, et kultuuri lõplik OD 580 nm juures oli 0,5. Bakteritüved kasvasid mikrotiiterplaadil glc-CAA söötmes 20 tundi (180 rpm) 30 °C juures, kultuuri OD mõõtsin lainepikkusel 580 nm. Mõõtmine toimus 10-minutiliste intervallide tagant. Katse läbiviimiseks kasutasin spektrofotomeetrit *POLARstar Omega*. Kasvukõvera joonised koostasid programmis *Microsoft Excel* 2016.

## **2.3. Tulemused**

### **2.3.1. Sigmafaktor RpoS-st sõltuva *tnpA* geeni promootori aktiivsus *P. putida* PaW85, *gacS*::Sm, *gacA*::Sm ja *ArpoS* tüvedes**

Transposoon Tn4652 transposaasi *tnpA* promootori aktiivsuse mõõtmiseks kasutasin plasmidi S/CpKTlacZ, kus *tnpA* promootorala on kloonitud  $\beta$ -galaktosidaasi kodeeriva *lacZ* reportergeeni ette. *tnpA* promootorilt lähtuvat  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsust mõõtsin fenool-minimaaltardsöötmel nälgivatest *P. putida* PaW85, *gacS*::Sm, *gacA*::Sm ning *ArpoS* tüvede rakkudest. Mõõtmise referentsina kasutasin 1 x M9 lahust.



**Joonis 4.** Tn4652 *tnpA* promootorilt lähtuv  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus *P. putida* tüvedes: PaW85, *gacS::Sm*, *gacA::Sm* ja  $\Delta rpoS$ . Rakke kasvasin glc-CAA vedelsöötmes 18 tundi enne fenool-minimaaltassidele plaatimist, mille järel toimus  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmine fenool-minimaaltassidelt maha pestud rakukultuuridest nii plaatimise päeval, 2. kui ka 4. päeval. y-teljel on näha  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus Milleri ühikutes ning x-teljel päevad, mil aktiivsuse mõõtmine toimus. Joonisel on esindatud viie sõltumatu katse keskmised tulemused koos standardhälvetega. Kontrollideks olid *P. putida* tüved PaW85 ning  $\Delta rpoS$ .

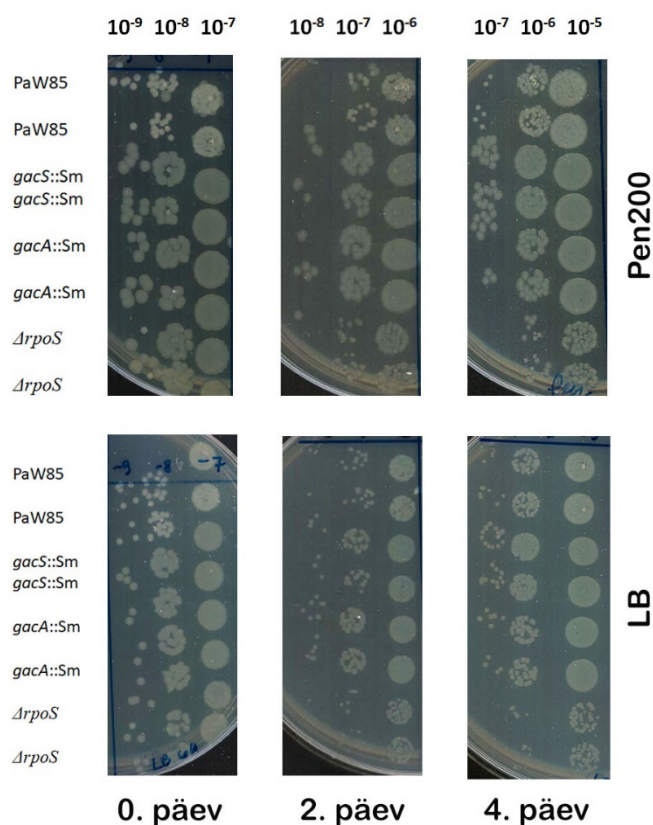
Enne rakkude plaatimist fenool-minimaaltassidele, kasvasin uuritavaid tüvesid ette üle öö (umbes 18 tundi) glc-CAA defineeritud minimaal-vedelsöötmes. Rakud plaatisin viiele fenool-minimaaltassile, Plaatimise päeval pesin rakke maha ühelt tassilt tüve kohta, teisel ning neljandal päeval kahelt tassilt tüve kohta (täpsem ülevaade katsest peatükis **2.2.5**).

Joonisel 4 esitatud tulemused nälgimispäevade lõikes näitavad, et nii *gacS::Sm* kui ka *gacA::Sm* käituvad PaW85-ga sarnaselt: aktiivsused on võrreldavad, PaW85 ega *gac*-defektsete tüvede puhul ei mõjuta *rpoS* geeni *tnpA* transkriptsiooni. On näha, et  $\Delta rpoS$ -i tase on kõigil mõõdetud päevadel samaväärne ja tunduvalt vähem aktiivsem kui teiste tüvede puhul, kuna transposaasi Tn4652 promootor on RpoS-sõltuv (Ilves et al., 2001).

Kõige otsesem viis kontrollimaks, kas RpoS-i tase muutub GacS-GacA signaalsüsteemi puudumisel, oleks olnud antikeha reaktsioon, kuid laboris puudus olemasolev antikeha ning uue tegemine oleks võtnud aega rohkem kui aasta. Seetõttu tuli teise alternatiivina kasutada proteoomi analüüsi (peatükk 2.3.4).

### 2.3.2. *Pseudomonas putida* nälgivate rakkude elumus ning plasmidi stabiilsus

Bakterirakkude elumuse ning samal ajal ka testerplasmidi stabiilsuse kontrollimiseks sai tehtud mikrotiiterplaadil nälgivatest *P. putida* rakkudest lahjendusteread (vt metoodika, 2.2.7). Täheleandis, et Pen sisaldavatel tassidel kasvasid bakteritüved kiiremini kui puhtal LB-tassil, kuigi tavaliselt peaks toimuma vastupidine. Kahjuks sellele me vastust ei leidnud, kuid katsest tekkis mõte kontrollida *P. putida* tüvede kasvukiiruseid (alapeatükis 2.3.3).



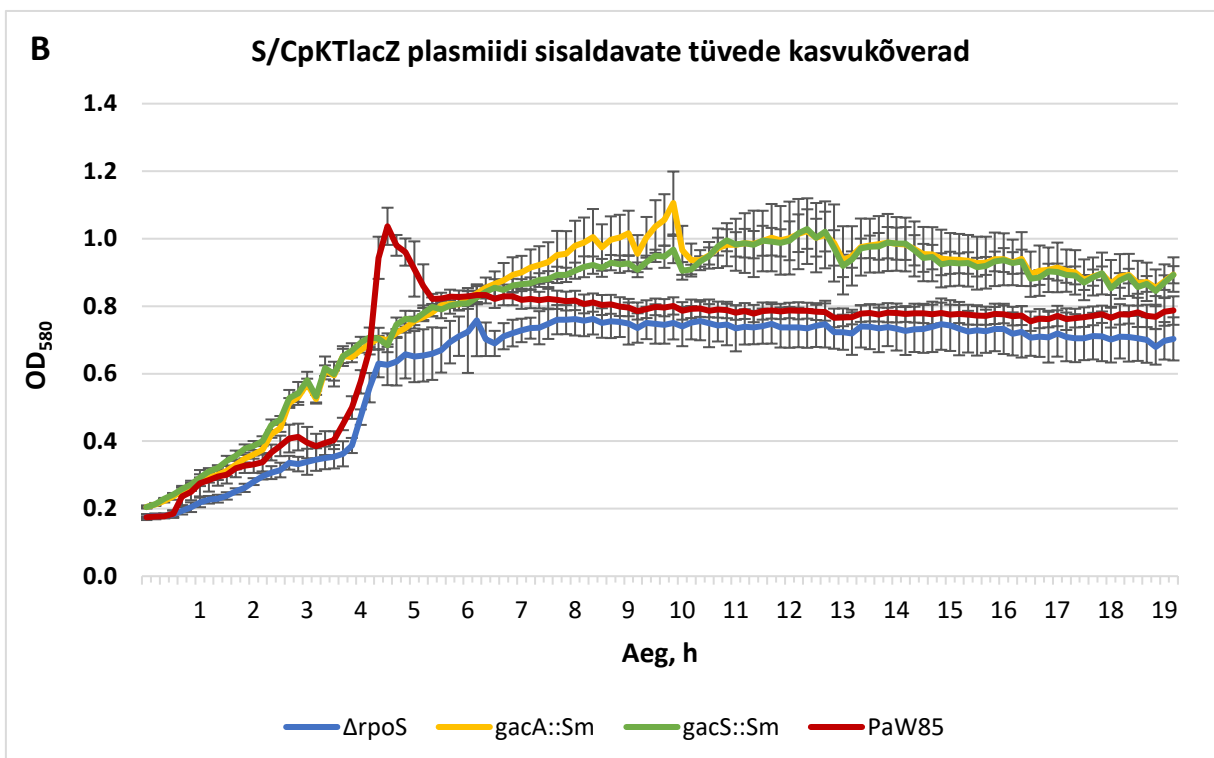
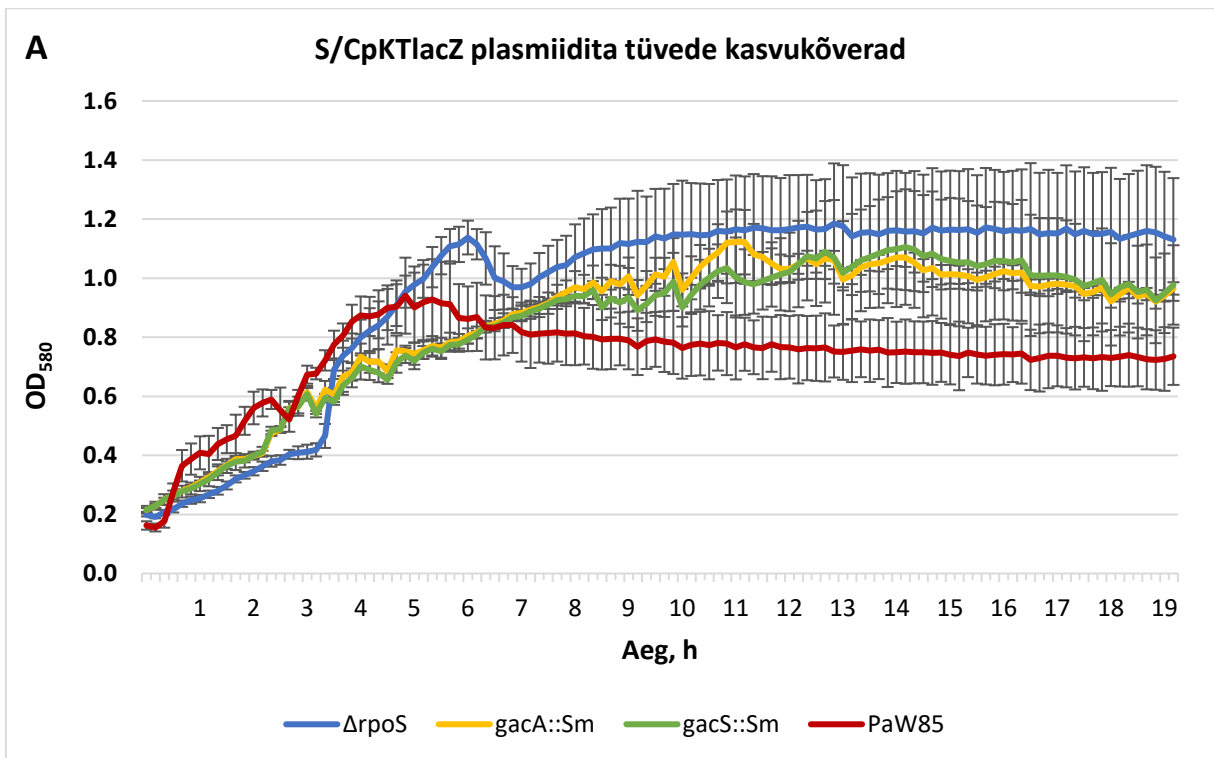
**Joonis 5.** Nälgivate bakterirakkude elumus ning plasmidi stabiilsuskontroll. Vaatlused teostasin plaatimise päeval (0. päev), 2. ning 4. päeval peale plaatimist, kui rakud olid sügavas

statsionaarses faasis. Kolmel ülemisel pildil toodud rakud on kasvanud penitsilliinitassil (Pen200), alumised kolm on kasvanud LB-agarsöötmele. Numbrid joonise kohal on lahjenduskordajad. Tassid on pildistatud peale 21 tunni möödumist.

Nelja päeva lõikes on näha, kuidas statsionaarse faasi nälgivad *ArpoS*-i rakud suurema lahjendamise korral võrreldes teistega on vähem elujõulisemad ning surevad teiste tüvede rakkudest varem. PaW85 kolooniad on teistest tüvedest eristuvalt konkreetsema piirjoonega. Plasmid on kõigis tüvedes kenasti püsima jäänud, kuna kasv penitsilliini sisaldaval tassil on kõikide tüvede puhul olemas, rakud käituvad näljatingimustes PaW85-le sarnaselt.

### **2.3.3. *P. putida* tüvede PaW85, *gacS::Sm*, *gacA::Sm* ja *ArpoS* kasvukiiruste võrdlus plasmidi olemasolul ja ilma**

Selleks, et saada ülevaade, kuidas bakterirakud taluvad plasmidi olemasolust tulenevat koormust ning iseloomustamaks bakterite kasvu, mõõtsin bakterikultuuride kasvutihedust 20 tunni jooksul. Bakterikultuuride OD-d on mõõdetud 580 nm juures, programm mõõtis automaatselt iga 10 minuti tagant. Katse teostas kaheksa tehnilise paralleeliga, mille andmed panin ühe jooniseks kokku. Joonisel 6 on toodud tehniliste paralleelide keskmised OD-d koos standardhälbega.

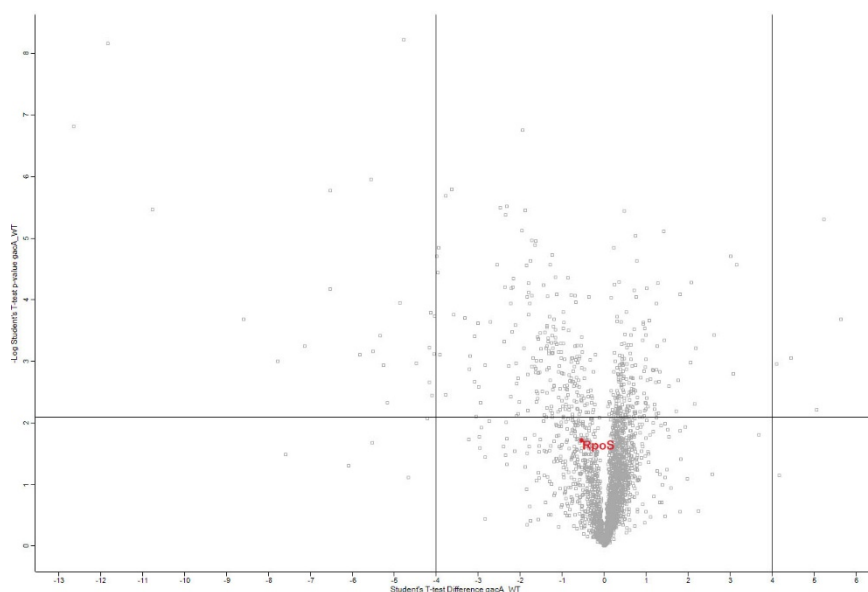


**Joonis 6.** *P. putida* tüvede PaW85, *gacS::Sm*, *gacA::Sm* ja  $\Delta rpoS$  kasvukõverad plasmiidita (A) ning plasmiidi S/CpKtlacZ sisaldavates rakkudes (B). Joonisel on esindatud kaheksa tehnilise paralleeli aritmeetiline keskmine optiline tihedus koos standardhälbega. Bakteritüvede kasvukiirust mõõdeti 20 tunni jooksul glc-CAA söötmeS.

Kasvukõverad kinnitavad, et kõik *P. putida* plasmiidita tüved (joonis 6A) kasvavad võrdväärselt. On märgata, et mõõtmise algustundidel kasvab PaW85 teistega võrreldes veidi tihedamalt, kuid *ArpoS* aga kasvab tihedamaks tundidel 5-7. Plasmidi S/CpKTlacZ sisaldavate tüvede kasvukõveralt (joonis 6B) näeme, et *P. putida* tüved PaW85 (wt), *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* taluvad plasmidi koormust võrdväärselt, kõik tüved (sh *ArpoS*) kasvavad sama hästi ning *gacS* ning *gacA* katkestusmutantide kasvueelil säilib. Huvitaval kombel talub *ArpoS* plasmidi koormust vähem kui teised tüved (joonis 6B), kuid plasmiidita tüvi kasvab teiste *P. putida* tüvedega võrdväärselt. Plasmidi olemasolu korral moodustavad *gac*-defektsed tüved omaette jaotuse, samas wt ja *ArpoS* on kasvult omavahel sarnasemad. Plasmidi sisaldavad *gac*-defektsed tüved suudavad kasvada tihedamaks kui metsiktüvi ja *rpoS*-i deletsioontüvi. Rohkema aja möödudes kasvud sisuliselt võrdsustuvad ning jäävad stabiilseks. Gac-signaalaraja defektsuse korral kasvavad *P. putida* rakud nii plasmidi juuresolekul kui ilma natukene kiiremini kui metsiktüve rakud. Samas PaW85 rakkude tihedus on teistega võrreldes madalam, mis viitab *gac*-defektsete tüvede vähesele sekundaarsete metaboliitide tootmisele (Bull jt., 2001). PaW85 puhul on märgata 4-5 tunnil, et OD hüppab järsult kõrgemale ning seejärel alaneb teistega samale tasemele tagasi, kuid tegu on ilmselt tehnilise väljalöögiga.

#### **2.3.4. *Pseudomonas putida* PaW85 ja *gacA::Sm* statsionaarse kasvufaasi rakkude proteoomi analüüs**

Selleks, et välja selgitada, kuidas GacS-GacA signaalsüsteem mõjutab *P. putida* mutatsioonisagedust – kas selleks võiks olla RpoS-i muutunud valguhulk, tellis meie uurimisgrupp neli päeva nälginud rakkudest proteoomi analüüsi, mille ettevalmistamisel osalesin. Proteoomi analüüs on täpne meetod teada saamaks, kas valku RpoS ekspresseeritakse *gac*-defektses tüves *gacA::Sm* ning PaW85-s sarnaselt või on RpoS-valgu tase *gacA* geeni puudumisel muutunud.



**Joonis 7.** *Pseudomonas putida* tüvede PaW85 ja *gacA::Sm* proteoomi *ScatterPlot* statsionaarse kasvufaasi rakkudest. Vertikaalsest joonest, alates nr 4 juurest paremale jäävad tulemused (x-teljel) on 16 x suurenenud valguhulgast, nr -4 vasakule jäävad aga 16 x vähenenud valguhulga kohta. Horisontaalsest joonest ülespoole jäävate valkude erinevus on statistiliselt oluline. Joonisel on toodud RpoS-i asukoht.

Joonis proteoomianalüüsist kinnitab, et RpoS-i hulk pole *P. putida* rakkudes statistiliselt oluliselt muutunud. Saab järeldada, et  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmine ning proteoomi analüüs kattuvad – Gac-signaalirada ei mõjuta statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i valgu hulka mullabakter *Pseudomonas putida* rakkudes.

## 2.4. Arutelu

Meie laboris on varasemalt näidatud, et defektse *gacS* geeni korral on *P. putida* statsionaarse kasvufaasi rakkudes suurenenud mutatsioonisagedus (Tagel jt., 2016). Selles töös jäi küsimuseks, kuidas GacS-GacA signaalsüsteem mutatsioonisagedust mõjutab. Spekuleeritakse, et GacS-i osalus nälgivate rakkude kõrge mutatsioonisageduses võib kaudselt olla mõjutatud statsionaarse kasvufaasi spetsiifilise sigmafaktor RpoS-i ekspressiooni muutustest, kuna näiteks bakteris *P. fluorescens* on näidatud, et Gac-signaalirada mõjutavad rakkudes RpoS-i taset (Whistler jt., 1998) ja *P. putida* statsionaarse kasvufaasi rakkudes

põhjustab sigmafaktor RpoS-i puudumine mutatsioonisageduse suurenemist (Tarassova jt., 2009). Minu bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas GacS-GacA signaalirada mõjutab statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i valgu hulka ja võiks seeläbi olla põhjuseks, miks nälgivates Gac-signaalaraja defektsetes *P. putida* rakkudes on mutatsioonisagedus suurenenud.

Põhiliselt hõlmas minu tööd transposoon Tn4652 transposaasi *tnpA* promootori aktiivsuse mõõtmine, milleks kasutasin plasmidi S/CpKTlacZ, kus *tnpA* promootorala on kioneeritud  $\beta$ -galaktosidaasi kodeeriva *lacZ* reportergeeni ette. *tnpA* promootorit sai kasutatud seetõttu, et transposoon Tn4652 transposaasi kodeeriva geeni *tnpA* promootorilt lähtuv transkriptsioon on tugevalt RpoS-sõltuv, mistõttu saame kaudselt hinnata RpoS-i hulka *gac*-defektsetes *P. putida* rakkudes, et kas rakud on metsiktüvega võrreldavad või mitte (Ilves jt., 2001). Selleks mõõtsin *P. putida* PaW85,  $\Delta rpoS$ , *gacS* ja *gacA* katkestusmutantide tüvede statsionaarse kasvufaasi rakkudest  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsust. Tageli ja kolleegide eksperimendist jäi õhku mõte, et Gac-signaalarada võib kaudselt reguleerida RpoS-i ekspresseerumist (Tagel jt., 2016), kuid käesolevas töös väide kinnitust ei leidnud. Minu katsetulemused näitasid, et võrreldes PaW85-ga ei mõjuta RpoS drastiliselt *gac*-defektsetes tüvedes geeni *tnpA* transkriptsiooni (joonis 4).  $\Delta rpoS$  tüvi oli lisaks metsiktüvele teiseks testtüveks, kuna seal puudub *rpoS* geen täielikult.

Joonisel 4 kajastatud tulemustest saan järeldada, et nii *gacS* kui ka *gacA* katkestustüvi käituvad metsiktüvega sarnaselt. Nimetatud tüvede transposaasi *tnpA* promootorilt lähtunud eriaktiivsused ei ole statistiliselt olulised. Deletsioontüve  $\Delta rpoS$ -i puhul peab paika, et promootori aktiivsus on võrreldes teiste *P. putida* tüvedega väiksem, kuna pole sigmafaktorit, mis on transposaasi promootorist sõltuv. Kui võrrelda minu läbi viidud katseid bakteril *P. putida* Whistleri jt. (1998) eksperimendi tulemustega, mis olid küll *P. fluorescens*-i Pf-5 tüve kohta, siis mina ei saa oma tulemuste põhjal, sarnaselt Whistlerile ja ta kolleegidele väita, et GacS-GacA mõjutavad hilise statsionaarse kasvufaasi rakkudes RpoS-i kuhjumist ning seeläbi *rpoS*-i transkriptsiooni (Whistler jt., 1998). Seetõttu ei ühti minu ja Whistleri tulemused.  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsusti mõõtes saadud tulemust toetab ka PaW85 ja *gacA::Sm* tüvede proteoomi analüüs. Proteoomanalüüs kinnitas ülal toodud fakti, et Gac-signaalarada ei mõjuta statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i aktiivsust (joonised 4 ning 7). Proteoomi tulemustest (joonisel 7) on näha, et RpoS-i valku ekspresseeritakse nii defektsetes *gacA::Sm*

tüves kui ka metsiktüves PaW85 sarnaselt – Gac-signaalirada ei mõjuta statsionaarse kasvufaasi rakkudes sigmafaktor RpoS-i hulka.

Lisaks vaatlesin ka plasmidi stabiilsust LB-agarsöötmel. Plasmidi stabiilsust vaatlesin selleks, et olla kindel, kas nälgivates rakkudes jääb plasmid püsima. Selleks pesin fenool-minimaaltassidelt statsionaarses kasvufaasis olevad PaW85, *ΔrpoS*, ning *gac*-katkestustüvede *gacA* ja *gacS*-i bakterirakud maha ning tegin neist mikrotiiterplaadile lahjendusread. Penitsilliini sisaldavad agartassid kinnitasid, et kõigis *P. putida* tabelis 1 esindatud tüvedes püsib plasmid stabiilselt sees. Joonisel 5 esitatud tulemuste põhjal saan öelda, et testerplasmid püsib katses olnud tüvedes kogu neljapäevase nälgimisperioodi jooksul sees. Rakkude üldine elumus oli võrreldav, statsionaarses faasis käituvad rakud metsiktüvele sarnaselt, kuid *ΔrpoS*-i puhul (joonis 5) on selgelt näha, et pikema nälgimise korral on vähem elujõulisi baktereid, sest minu deletsioontüves on puudu *rpoS* geen, mis on bakteri üldiseks stressivastuse regulaatoriks, ilma milleta ei talu bakterirakud stressi, näiteks limiteerituid toitaineid ja temperatuuri muutust (Hengge-Aronis, 1996; Tanaka jt., 1993), ning sellepärast on *ΔrpoS*-i rakkudel teiste *P. putida* tüvedega võrreldes väiksem elumus.

Võrdlesin tüvede kasvukiiruseid koos ning ilma S/CpKTlacZ plasmiidita selleks, et uurida, kuidas tabelis 1 toodud bakteri *P. putida* tüved taluvad plasmidi koormust ning samal ajal ka kasvu iseloomustamiseks. Joonisel 6 näeme, et Gac-signaaliraja defektsuse korral kasvavad *P. putida* rakud nii plasmidi juuresolekul kui ilma natukene kiiremini kui metsiktüve rakud. Plasmiidita *P. putida* tüvede puhul on näha (joonis 6A), et *ΔrpoS* kasvab teistest ligikaudu 1,2 korda tihedamalt, kuid jääb tiheduse kasvult teiste (*gac*-defektsete) tüvede veapiiridesse. On näha (joonis 6), et *P. putida* tüved PaW85, *gac* katkestustüved ning *ΔrpoS* taluvad plasmidi koormust sarnaselt (joonis 6B), kuid on *gac*-defektsed tüved kasvavad tihedamaks kui metsiktüvi PaW85 ning *ΔrpoS*.

## KOKKUVÕTE

Keskkonnatingimustega kohanemiseks ning raku füsioloogia kohandamiseks on bakterites kahekomponentsed signaalsüsteemid. Gac-signaalsüsteem on Gram-negatiivsete bakterite seas konserveerunud. Pseudomonaadides olev GacS-GacA signaalsüsteem reguleerib biofilmi moodustumist, virulentsust ning on oluline sekundaarse metabolismi regulaator. Meie uurimisgrupis on eelnevalt kirjeldatud GacS-GacA signaalsüsteemi sensorvalgu GacS-i defektsuse mõju *P. putida* mutatsioonisagedusele nii kasvavates kui ka nälgivates rakkudes. Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas GacS-GacA signaalirada mõjutab statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i valgu hulka mullabakter *Pseudomonas putida* rakkudes.

Selleks, et näha, kas Gac-signaalirada mõjutab statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i valgu hulka mullabakter *Pseudomonas putida* rakkudes, mõõtsin *P. putida* PaW85,  $\Delta rpoS$ , *gacS* ja *gacA* katkestusmutantide statsionaarse kasvufaasi rakkudest  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsust. Teostatud katsest ilmnis, et Gac-signaalirada ei reguleeri RpoS-i ekspressiooni. Saadud tulemuste kindlamaks tõlgendamiseks tegime *P. putida* PaW85 ning *gacA::Sm* tüvede statsionaarse kasvufaasi rakkude proteoomi analüüsi, mis toetas  $\beta$ -galaktosidaasi eriaktiivsuste mõõtmisel saadud tulemust – RpoS-i hulk pole rakkudes statistiliselt oluliselt muutunud, valgu ekspressioon toimub *gacA* defektses tüves metsiktüvele PaW85 sarnaselt, mistõttu kinnitus fakt, et kahekomponentne GacS-GacA signaalirada ei mõjuta statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i valgu hulka mullabakter *Pseudomonas putida* rakkudes.

Lisaks iseloomustasin *P. putida* PaW85, *gacS*- ja *gacA*-defektsete ning  $\Delta rpoS$  rakkude kasvumist nii plasmidi S/CpKTlacZ juuresolekul kui ilma. Selleks koostasid kasvukõverad, mille analüüsist selgus, et kõik tüved kasvavad võrdväärselt ning plasmidi koormusele peavad vastu kõik esindatud *P. putida* tüved.

# **The two-component signal system's GacS-GacA participatory in stationary phase sigma factor RpoS in *Pseudomonas putida***

Grete Anton

## **SUMMARY**

To survive under environmental conditions, bacteria use two-component signal systems which consist of sensor kinase and a response regulator. The GacS-GacA two-component signal system is conserved among Gram-negative bacteria. It is known that in pseudomonads, the Gac-signalling system regulates virulence, secondary metabolites, formation of biofilm and expression of different biocontrol factors. Previously, it has been shown that in *P. putida*, deficiency of *gacS* affected stationary-phase mutagenesis (Tagel et al., 2016). To regulate transcription during the environmental stress, bacteria have sigma factors which regulate the expression of genes only needed during stress conditions. Tagel and her colleagues (2016) claimed the GacS-GacA signalling system might help bacteria to regulate the expression of RpoS.

Our laboratory group has previously shown that deficiency of *gacS* affects mutagenesis in the stationary phase of *Pseudomonas putida* cells. But it is unclear if Gac-signalling system regulates the expression of stationary-phase sigma factor RpoS in any way. Therefore, the aim of this study was to determine if the GacS-GacA signal pathway affects the regulation of stationary phase sigma factor RpoS in *Pseudomonas putida*. My  $\beta$ -galactosidase experiment showed that in *gacS*- and *gacA*-defective strains the RpoS levels did not change in comparison to wild type PaW85. To be sure, we ran a proteomic analysis of *P. putida* PaW85 and *gacA*::Sm cells in stationary growth phase. This experiment affirmed our previous result about possible connection between the GacS-GacA signal pathway and sigma factor RpoS – the Gac-signalling system does not affect the regulation of stationary growth phase sigma factor RpoS.

## KIRJANDUSE LOETELU

Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers Inc., NY.

Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C., de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. The EMBO Journal 20:1681-1691. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1681>.

Aguilar, P. S., Cronan Jr, J.E., de Mendoza, D. (1998). A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J. Bacteriol. 180:2194–2200.

Aguilar, P. S., Lopez, P., de Mendoza, D. (1999). Transcriptional Control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the 5 desaturase of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181:7028–7033.

Alex LA, Borkovich KA, Simon MI. (1996). Hyphal development in *Neurospora crassa*. Involvement of a 2-component histidine kinase. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:3416–21. [PubMed: 8622950]

Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB. (1996). Signal transduction via the multistep phosphorelay. Not necessarily a road less traveled. Cell 1996; 86:845–48. [PubMed: 8808618]

Babitzke, P., Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA binding regulatory proteins, Curr. Opin. Microbiol. 10 (2007) 156–163, doi:10.1016/j.mib.2007.03.007.

Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. 65 (2011) 189–213.

Bayley, S. A., Duggleby, C.J., Worsey, M.J., Williams, P.A., Hardy, K.G., Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. Mol Gen Genet 154(2): 203-204.

Bem, A.E., Velikova, N., Pellicer, M.T., Baarlen, P., Marina, A., Wells, J.M. (2015). Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. ACS Chem. Biol. 10 (2015) 13–224, doi:10.1021/cb5007135.

Bhate, M.P.; Molnar, K.S.; Goulian, M.; William, F.; DeGrado, W.F. (2015). Signal transduction in histidine kinases: Insights from new structures. *Structure* 2015, 23, 981–994. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.002>.

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol. Microbiol.* 73 (2009) 434–445, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x.

Bull, C.T., Duffy, B., Voisard, C., Defago, G., Keel, C., Haas, D. (2001) Characterization of spontaneous gacS and gacA regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 79: 327–336.

Burbulys, David, Trach, Kathleen A., Hoch, James A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, Volume 64, Issue 3, 1991, Pages 545-552.

Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 66, pp. 325–347).

Chang C. (1996). The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm. *Trends. Biochem Sci* 1996;21:129–33. [PubMed: 8701469]

Cochran, W.L., Suh, S.J., McFeters, G.A., Stewart, P.S. (2000). Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 88: 546–553.

Duque, E., de la Torre, J., Bernal, P., Molina-Henares, M. A., Alaminos, M., Espinosa-Urgel, M., Roca, A., Fernández, M., de Bentzmann, S., & Ramos, J. L. (2013). Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 15(1), 36–48.

Egger, L.A., Park, H., Inouye, M. (1997). Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* 2: 167–184.

Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., & Danielson, M. A. (1997). The Two-Component Signaling Pathway Of Bacterial Chemotaxis: A Molecular View of Signal

Transduction by Receptors, Kinases, and Adaptation Enzymes. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 13).

Ferreiro, M.D., Gallegos, M.T. (2021). Distinctive features of the Gac-Rsm pathway in plant-associated *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 23 (2021) 5670–5689, doi: 10.1111/1462-2920.15558.

Gao, R. and A. M. Stock (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63: 133-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>

Gao, R., Mack, T.R, Stock, A.M. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci* 32 (2007) 225–234, DOI: 10.1016/j.tibs.2007.03.002.

Gilles-Gonzalez, M. A., Gonzalez, G. (1993). Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 268:16293–16297.

Gong, W., Hao, B., Chan, M.K. (2000). New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL. *Biochemistry* 39:3955–3962.

Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., Lory, S. (2008). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotype in a bacterial pathogen.“ In *Genes & Dev* (2009). 23: 249-259.

Gotoh, Y., Eguchi, Y., Watanabe, T., Okamoto, S., Doi, A., Utsumi, R. (2010). Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (2010) 232–239, doi:10.1016/j.mib.2010.01.008.

Gottesman, S. (2019). Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 294, Issue 31, pp. 11685–11700). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.

Gourse, R.L., Ross, W., and Rutherford, S.T. (2006). General pathway for turning on promoters transcribed by RNA polymerases containing alternative sigma factors. *JBacteriol*188: 4589–4591.

- Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria. (Vol. 14, Issue 12).
- Heeb S., Valverde, C., Gigot-Bonnefoy, C., Haas, D. (2004). Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. FEMS Microbiology Letters 243 (2005) 251–258.
- Hellingwerf, K. J., Crielaard, W. C., Joost Teixeira De Mattos, M., Hoff, W. D., Kort, R., Verhamme, D. T., & Avignone-Rossa, C. (1998). Current topics in signal transduction in bacteria. In Antonie van Leeuwenhoek (Vol. 74).
- Hengge-Aronis R. (1996). Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 1996 Sep;21(5):887-93.
- Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N., Fischer, D. (1993). Osmotic regulation of rpoS-dependent genes in *Escherichia coli*. J Bacteriol 175: 259–265.
- Humair, B., Gonzalez, N., Mossialos, D., Reimann, C., Haas, D. (2009). Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. The ISME Journal (2009) 3, 955–965.
- Humair, B., Wackwitz, B., Haas, D. (2010). GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 76 (2010) 1497–1506, doi: 10.1128/AEM.02014-09.
- Hörak, R., Kivisaar M. (1998). Expression of the transposase gene *tnpA* of Tn4652 is positively affected by integration host factor. J Bacteriol 180(11): 2822-2829.
- Ihssen, J., Egli, T. (2004). Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. Microbiology 150:1637–1648
- Ilves, H., Hörak, R., Kivisaar, M. (2001) Involvement of sigma(S) in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652. J Bacteriol. 2001 Sep;183(18):5445-8. doi: 10.1128/JB.183.18.5445-5448.2001.
- Jorgensen, F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Michel, G., Lazdunski, A., Williams, P., Stewart, G.S. (1999). RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 145: 835–844.

- Kang, B.R., Cho, B.H., Anderson, A.J., Kim, Y.C. (2004). The global regulator GacS of a biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 regulates transcription from the *rpoS* gene encoding a stationary-phase sigma factor and affects survival in oxidative stress. *Gene* 325 (2004) 137–143.
- Kay, E., Dubuis, C., Haas, D. (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 17136–17141, doi: 10.1073/pnas.0505673102.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* 62:749–795
- Kusmieriek, M., Dersch, P. (2018). Regulation of host-pathogen interactions via the post-transcriptional Csr/Rsm system. *Curr. Opin. Microbiol.* 41 (2018) 58–67, doi: 10.1016/j.mib.2017.11.022.
- Landini, P., Egli, T., Wolf, J., & Lacour, S. (2014). SigmaS, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: Role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environmental Microbiology Reports*, 6(1), 1–13.
- Lange, R., Fischer, D., Hengge-Aronis, R. (1995). Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *JBacteriol*177:4676–4680
- Latour, X. (2020). „The evanescent GacS signal.“ *Microorganisms* 8 (2020), doi: 10.3390/microorganisms8111746.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Defago, G., Haas, D. (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Volume 89, Issue 5, p. 1562–1566). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1562>.
- Loewen, P.C., and Hengge-Aronis, R. (1994). The role of the sigma factor sigmaS (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* 48: 53–80.

- Martínez-Gil, M., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2014). Roles of cyclic Di-GMP and the Gac system in transcriptional control of the genes coding for the *Pseudomonas putida* adhesins LapA and LapF. *Journal of Bacteriology*, 196(8), 1484–1495.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4): 910-38.
- Mika, F., Hengge, R. (2005). A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev* 19:2770–2781.
- Miller, J. H. (1972). Assay of  $\beta$ -galactosidase. *Experiments in molecular genetics*.
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. *Biochimie* 75(6): 456.
- Pernestig, A.K., Melefors, O., Georgellis, D. (2001). Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 225–231, doi: 10.1074/jbc.M001550200.
- Phan, Huynh Ngoc Chau; Kivisaar, Maia; Ilmjärv, Tanel. (2020). Bakalaureusetöö „GacA/S signaalraja puudumine mõjutab raaminihke- ja asendusmutatsioonide tekkesagedust *Pseudomonas putida* KT2440 tüves.“ <http://hdl.handle.net/10062/72092>.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., Levesque, R.C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 32, Issue 1, January 2008, Pages 38–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x>.
- Pratt, L. A., T. J. Silhavy. (1995). Identification of base pairs important for OmpR- DNA interaction. *Mol Microbiol* 17(3): 565-73.
- Rajeev, L., Luning, E.G., Altenburg, S., Zane, G.M., Baidoo, E.E.K., Catena, M., Keasling, J.D., Wall, J.D., Fields, M.W., Mukhopadhyay, A. (2014). Identification of a cyclic-di-GMP-modulating response regulator that impacts biofilm formation in a model sulfate reducing bacterium. *Front. Microbiol.*, 29 July 2014. Sec. Terrestrial Microbiology, Volume 5 – 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00382>.

- Rich, J.J., Kinscherf, T.G., Kitten, T., Willis, D.K. (1994). Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 176 (1994) 7468–7475, doi: 10.1128/jb.176.24.7468-7475.
- Robinson, V. L., Buckler, D.R., Stock, A.M. (2000). A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* 7(8): 626-33.
- Romling, U., Galperin, M. Y., and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 1–52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12.
- Sarkar, M. K., Paul, K., Blair, D. (2010). Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(20): 9370-9375. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000935107>.
- Schuster SC, Noegel AA, Oeme F, Gerish G, Simon MI. (1996). The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. *EMBO J* 1996;15:3880–89. [PubMed: 8670893]
- Schellhorn, H.E. (2014). Elucidating the function of the RpoS regulon. *Future Microbiol.* 9 (2014) 497–507.
- Slauch, J.M., Silhavy, T.J. (1996). The porin regulon: a paradigm for the two- component regulatory systems. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*. Lin, E.C.C. and Lynch, A.S. (eds). New York: Chapman & Hall, pp. 383–417
- Song, H., Li, Y., Wang, Y. (2023). Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors. *Engineering Microbiology* (3), issue 1. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100051>.
- Sonnleitner, E., Haas, D. (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 63–79, doi: 10.1007/s00253-011-3332-1.
- Stewart, V. (2003). Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 31:1–10.

Stock, A.M, Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000), p. 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>.

Swanson RV, Alex LA, Simon MI. (1994). Histidine and aspartate phosphorylation: two component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* 1994;19:485–90. [PubMed: 7855892]

Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A., Takahashi, H. (1993). Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3511–3515

Tarassova, K., Tegova, R., Tover, A., Teras, R., Tark, M., Saumaa, S., & Kivisaar, M. (2009). Elevated mutation frequency in surviving populations of carbon-starved *rpoS*-deficient *Pseudomonas putida* is caused by reduced expression of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3604–3614.

Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S, Filloux A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan 3;103(1):171-6.

Zhang, Y., Zhang, B., Wu, H., Wu, X., Yan, Q., Zhang, L.Q. (2020). Pleiotropic effects of RsmA and RsmE proteins in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *BMC Microbiol.* 20 (2020) 191, doi: 10.1186/s12866-020-01880-x.

Zschiedrich, C.P., Keidel, V., Szurmant, H. (2016). Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *J Mol Biol.* 2016 September 25; 428(19): 3752–3775. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.003.

Vishnoi, M., Narula, J., Devi, S.N., Dao, H-A., Igoshin, O.A., Fujita, M. (2013). Triggering sporulation in *Bacillus subtilis* with artificial two-component systems reveals the importance of proper Spo0A activation dynamics. *Molecular Microbiology*, 90(1): 181-194.

- Wang, B. X., Wheeler, K. M., Cady, K. C., Lehoux, S., Cummings, R. D., Laub, M. T., Ribbeck, K. (2021). Mucin Glycans Signal through the Sensor Kinase RetS to Inhibit Virulence-Associated Traits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Biology*, 31(1), 90- 102.e7.
- Wang N, Shaulsky G, Escalante R, Loomis WF. (1996). A 2-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *EMBO J* 1996;15:3890–98. [PubMed: 8670894]
- West, A. H., Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26(6): 369-76.
- Whistler, C.A., Corbell N.A., Sarniguet, A., Ream, W., Loper, J.E. (1998). The Two-Component Regulators GacS and GacA Influence Accumulation of the Stationary-Phase Sigma Factor  $\sigma^S$  and the Stress Response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol.* 1998 Dec; 180(24): 6635–6641. doi: 10.1128/jb.180.24.6635-6641.1998.
- Williams, S. B., and V. Stewart. (1997). Discrimination between structurally related ligands nitrate and nitrite controls autokinase activity of the NarX transmembrane signal transducer of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 26:911–925.
- Wright, G.S.A., Saeki, A., Hikima, T., ... Sawai, H. (2018). Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system. *SCIENCE SIGNALING*, 10 Apr 2018, Vol 11, Issue 525. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag0825>.
- Yamada, S., Sugimoto, H., Kobayashi, M., Ohno, A., Nakamura, H., Shiro, Y. (2009). "Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex. *Structure*, Volume 17, Issue 10, 14 October 2009, Pages 1333-1344. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.07.016>.

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

Mina, **Grete Anton**,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

**„Mullabakter *Pseudomonas putida* GacS-GacA signaaliraja osalus statsionaarse kasvufaasi sigmafaktor RpoS-i regulatsioonis“**,

mille juhendajad on Heili Ilves PhD ja Lea Ets MSc,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Grete Anton

29.05.2023