

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

***Pseudomonas putida* geeni *lapG* ekspressiooni regulatsioon**

Magistritöö
30 EAP
Gea Maris Räis

Juhendajad
PhD Riho Teras
MSc Johanna Hendrikson

TARTU 2025

INFOLEHT

***Pseudomonas putida* geeni *lapG* ekspressiooni regulatsioon**

Käesolevas töös uuritakse *Pseudomonas putida* geeni *lapG* ning PP_0163 transkriptsiooni regulatsiooni sõltuvust sigmafaktorist globaalsetest regulaatoritest Fis ja ArgR, samuti püüti määrata mõlema geeni mRNA 5' otsa. *P. putida* on risosfäärne bakter, mis eelistab elada biofilmina taimejuurtel, kuna seal on rohkem toitaineid, kui risosfäärist eemal olevas mullas. Varasemalt on uuritud põhjalikult *P. putida* biofilmi jaoks oluliste *lap* geenide, nagu *lapA* posttranskriptsioonilist regulatsiooni ning *lapE* transkriptsioonilist regulatsiooni. Samas, LapG puhul on uuritud posttranslatsioonilist regulatsiooni kuid vähem on uuritud *lapG* transkriptsiooni.

Märksõnad: *Pseudomonas putida* KT2440, biofilm, LapABCEGD süsteem, LapG

CERCS kood ja nimetus: B220 - Geneetika, tsütogeneetika, B230 - Mikrobioloogia, bakterioloogia

Regulation of gene *lapG* expression in *Pseudomonas putida*

In this work, the roles of the transcriptional regulators Fis and ArgR in controlling the expression of genes LapG and PP_0163 was examined. Additionally, an attempt is made to determine the 5' end of the mRNA of both genes. *P. putida* is a rhizosphere bacterium that prefers to live as a biofilm on plant roots, as there are more nutrients there than in the soil further away from the rhizosphere. Previously, the post-transcriptional regulation of *lap* genes, such as *lapA*, and the transcriptional regulation of *lapE* has been studied extensively. However, in the case of LapG, post-translational regulation has been studied but the transcription of the said gene hasn't been studied as much.

Keywords: *Pseudomonas putida* KT2440, biofilm, LapABCEGD system, LapG

CERCS coda and designation: B220 - genetics, cytogenetics, B230 - microbiology, bacteriology

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. <i>Pseudomonas putida</i>	6
1.2. Biofilm.....	6
1.3. <i>P. putida</i> LapABCEDG süsteem.....	7
1.5. Transkriptsioonifaktor OxyR.....	10
1.6. Globaalne transkriptsioonifaktor ArgR	10
1.7. Fluorestseeruvad valgud	11
1.8. Ekskludon.....	11
2. EKSPERIMENTAALOSA	12
2.1. Eesmärgid.....	12
2.2. Materjal ja meetodika	12
2.2.1 Kasutatud plasmiidid, bakterid, kasvatustingimused	12
2.2.2. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon).....	13
2.2.3. Plasmiidide konstrueerimine	14
2.2.4. Transformatsiooniks vajaminevate kompetentide valmistamine ja rakkude elektroporatsioon	15
2.2.5. Geelelektroforees	15
2.2.6. DNA sekveneerimine	16
2.2.7. Plasmiidse DNA eraldamine	16
2.2.8. <i>In silico</i> transkriptsiooniregulaatorite seondumisjärjestuste ennustamine	16
2.2.9. Mikrotiiterplaadiga rakkude fluorestsentsi mõõtmine	17
2.2.10. RNA eraldamine	17
2.2.11. RACE'ga lapG mRNA 5' otsa määramine	17
2.2.12. Statistiline analüüs	18
2.3. Tulemused.....	19
ARUTELU	33
KOKKUVÕTE	37
SUMMARY	38
KASUTATUD KIRJANDUS	39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
LISAD	50
LIHTLITSENTS	54

KASUTATUD LÜHENDID

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

Gm – gentamütsiin

Pn – penitsilliin G

LB – Luria-Bertani täissööde (*lysogeny broth*)

RACE - RNA 5' otsa määramise meetod (*rapid amplification of cDNA ends*)

SISSEJUHATUS

Enamik erinevates ökosüsteemides elavaid baktereid eelistab elada biofilmis, erandiks pole ka antud töös uuritav mullabakter *Pseudomonas putida*. Biofilm pakub bakteritele mitmeid eelised planktilise elu ees, kaitstes neid ebasobivate keskkonnatingimuste, näiteks toitainete puuduse, UV kiirguse, antibiootikumide eest. Samuti soodustab biofilm bakterite jäämist soodsasse keskkonda kauemaks.

Inimene näeb bakterite biofilmi pigem halvas valguses, nagu näiteks resistentsete haigustekitajate või saastajate kujul, ning unustama biofilmi kasulikkuse põllumajanduses ja bioremediatsioonis. Oma magistritöös uurin taimejuurtele biofilmi moodustavat risosfäärset bakterit *Pseudomonas putida*, mille biofilm sõltub nii adhesiooni soodustavatest teguritest kui ka biofilmi lagundavatest teguritest, näiteks biofilmist lahkumiseks on vajalik proteaasi LapG aktiivsus.

Geenid *lapG* ja PP_0163 on vastassuunalised naaber geenid, mis jagavad ühist promootorala. Kuna geenide promootorid peavad asuma suhteliselt lühikeses geenidevahelisel alal või, veelgi enam, vastasgeenide sees, siis ühe geeni ekspressioon (nii transkriptsioon kui ka translatsioon) võib mõjutada teise geeni ekspressiooni. Samas, seniajani pole teada, kus asuvad *lapG* promootorid ega ole uuritud ja transkriptsiooni regulatsiooni.

Minu töö eesmärgiks oli täpsustada geenide *lapG* ja PP_0163 geenieelsed alad, mis võiks sisaldada promootoreid ning teha kindlaks võimalike promootorite sõltuvus regulaatoritest Fis, ArgR ja OxyR.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida on gammaproteobakterite klassi, *Pseudomonadaceae* sugukonda kuuluv gramnegatiivne bakter, kes on laialt levinud, nii õhus, vees kui ka mullas, kuid elab eelistatult risosfääris (Timmis & Ramos, 2015). Kui vaadata kirjeldatud *P. putida* tüvesid, siis saab öelda, et see liik on suure metaboolse võimekusega, mis väljendub bakteri võimes kasutada erinevaid süsinikuallikaid, nagu glükoos, fruktoos ja laktaat, aga ka aromaatsaid ühendeid, nagu bensoaat ja toluaat (Nelson jt., 2002), millest viimased kaks on levinud ka tööstusjäätmete poolt saastunud keskkonnas (Zaveri & others, 2021). Pseudomoonaste perekonda kuuluvad bakterid on laialdaselt levinud mudelorganismid kuna nende genoom on lihtsasti manipuleeritav ja bakter on hästi laboritingimustes kultiveeritav (Timmis, 2002).

1.2. Biofilm

Biofilm on biotilistele ja abiotilistele pindadele kinnitunud maatriksiga ümbritsetud mikroobikooslused. Biofilmil on universaalne funktsioon – tagada bakteritele soodsam keskkond, teatud olukordades nagu veresoontes, ojabes soodustada bakteritel toitainete omastamist parandades nende kättesaadavust, kaitsta baktereid abiotiliste ja biotiliste faktorite eest ning võimaldada bakteritel levida. Kuigi biofilmi teke, areng ja struktuur sõltub biofilmi moodustavatest mikroorganismidest ja keskkonnast, on biofilmi arenguetapid bakteritel muidu üldiselt sarnased.

Biofilmi moodustumise peamised etapid on järgmised:

- (i) kinnitumine (kas spetsiifiliste retseptorite abil või mittespetsiifiliselt rakupinnaga)
- (ii) biofilmi küpsemise faas, mille käigus bakterirakud sünteesivad ja vabastavad signaalmolekule, et tajuda üksteise olemasolu, soodustades mikrokolooniate moodustumist ja biofilmi küpsemist;
- (iii) lagunemise faas, kus bakterirakud lahkuvad biofilmidest ja naasevad iseseisvasse planktoni eluvormi. (Kirisits & Parsek, 2006; O'Toole jt., 2000; Stanley & Lazazzera, 2004)

Samas, kui lähtuda antropotsentristlikust maailmapildist, siis mikroobide biofilm võibolla inimesele nii kahjulikud kui kasulikud (Wender jt., 1999). Biofilmi kahjulikkus on tõsine probleem näiteks meditsiinis ja toiduainete tööstuses, kus biofilm moodustub sageli kasutatavatele pindadele, seadmetele ja tööriistadele nagu näiteks erinevad implantaadid

meditsiinis (Mukherjee jt., 2024; Passerini jt., 1992). Teisalt võib biofilm moodustuda koduses majapidamises pindadele, mis puutuvad kokku toiduga nagu lõikelauad (Farias jt., 2021), muutes biofilmiga kaetud pinna potentsiaalseks nakkusallikaks. Teisalt võib biofilm kanduda ühelt pinnalt teisele ja nii tekitada ristsaastumist (Farias jt., 2021) või vähendab bakterite tundlikust biotsiidetele ja antibiootilistele ainetele, kahjustades inimese tervist kaudselt (Passerini jt., 1992). Mõlemale olukorrale on leitud ka mõningane lahendus: meditsiini valdkonnas on võetud kasutusele tserageniine (ingl k *ceragenin*) ehk katioonseid steroidseid antimikroobikume (ingl k *cationic steroid antimicrobials*) nende kasutamine kontaktläätsedes ja luumurdude fikseerimisplaatides vähendab biofilmi moodustumist (Gu jt., 2013; Mills jt., 2020). Toiduainetetööstuse kasutatakse vanemaid, kuid hästi tuntud ja juurdunud keemilisi ja füüsikalisi meetodeid nagu desinfektseerimine kloori või vesinikperoksiidiga ning pindade kuumtöötlus ja UV-valgusega kiiritamine, mille suhtes pole bakteritel spetsiifilist resistentsust (Farias jt., 2021; Leszczyńska jt., 2023).

Biofilmi kasulikkus inimesele ilmneb eriti ilmekalt põllumajanduses, kus risosfäärsed bakterid konkureerivad süsinikuallika ja ruumi pärast ning konkureerivad taime juurtelt välja patogeene, samas soodustades taimede kasvu, sellisteks bakteriteks on näiteks *Pseudomonas fluorescens* ja *Bacillus cereus* (Chang jt., 2007; Chilukoti Neeraja jt., 2010) või soodustavad ainult taimede kasvu nagu *Lysinibacillus macroides* (Das jt., 2024).

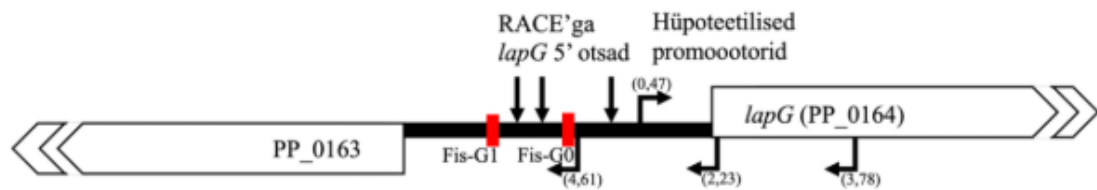
1.3. *P. putida* LapABCEDG süsteem

Pseudomonas fluorescens'l ja *P. putida*'l on biofilmi moodustamiseks ja sellest lahkumiseks olemas sarnane LapABCEDG süsteem. *P. fluorescens*'i LapA-l on põhjalikult kirjeldatud valgud domeene ja transporti (Boyd et al., 2014a), kuid *P. putida* LapA-l on kirjeldatud pigem tema funktsionaalsust ja füsioloogilist efekti (Puhm et al., 2022). Pinnale kinnitumiseks ja biofilmi moodustamise initsieerimiseks kasutavad mõlemad liigid peamiselt adhesiini LapA (Hinsa jt., 2003; Puhm jt., 2022). Teadaolevalt on LapA raskeim valk, mida *P. putida* ekspresseerib. *P. putida* *lapA* on 26 kb pikkune, kodeerides 8682 aminohappest koosnevat valku, mille molekulaarne kaal on umbes 888 kDa (Hinsa et al., 2003; www.pseudomonas.com). Mõlemal liigil on transportkompleksi olemasolu vajalik, et bakter moodustaks biofilmi. (Hinsa et al., 2003; Lopez-Sanchez et al., 2016). *P. fluorescens*'l on näidatud, et LapA transporditakse raku pinnale I tüüpi sekretsioonisüsteemiga, mis koosneb valkudest LapB, LapC ja LapE, kus LapE toimib LapA-d N-terminuse kaudu raku külge aheldava ankruna (Boyd jt., 2014; El-Kirat-Chatel, Beaussart, jt., 2014; El-Kirat-Chatel, Boyd, jt., 2014; Hinsa jt., 2003; Hinsa & O'Toole,

2006; Ivanov jt., 2012). *P. putida*'l on näidatud, et vaatamata LapA ekspressioonile, on bakteril biofilmi moodustamise võime tugevasti langenud, kui kromosoomist deleteeriti *lapE* (Puhm et al., 2022). *P. fluorescens*'i LapB-d on ennustatud kui 74 kDa, LapC-d 50 kDa ja LapE-d 48 kDa raskuste valkudena (www.pseudomonas.com), mis arvatakse sobituvat omavahel täpselt kokku LapA-d rakupinnale laskvaks kanaliks ning milles ükskõik milline mutatsioon mõjutab märgatavalt LapA rakupinnal hoidmise võimet ja seeläbi bakteriraku pinnaga seondumise võimet (Hinsa jt., 2003).

Biofilmist lahkumiseks on vajalik LapA eemaldamine raku pinnalt (Hinsa jt., 2003; Puhm jt., 2022). LapA seotust LapE-ga mõjutab 26 kDa raskune periplasmaatiline proteaas LapG, mis lõikab LapA-d N-terminuse lähedalt, põhjustades seeläbi LapA eraldumise LapE-st ja raku pinnalt keskkonda (Boyd jt., 2012; Newell jt., 2011; Puhm jt., 2022; Smith jt., 2018; www.pseudomonas.com). LapG proteaaset aktiivsust mõjutab *P. fluorescens*'i sisemembraani sukeldunud ja tsütoplasmas oleva c-di-GMP hulka tunnetav LapD. Kui c-di-GMP kontsentratsioon tsütoplasmas on kõrge, siis on soodustatud selle molekuli seondumine LapD-ga ning seejärel kompleksi seondumine LapG-ga, inaktiveerides selle; sarnast efekti on nähtud ka *P. putida*'s. (Chatterjee et al., 2014; Cooley et al., 2016; Espinosa-Urgel & Ramos-González, 2023; Navarro et al., 2011; Newell et al., 2009, 2011) Samas madala tsütoplasmaatilise c-di-GMP kontsentratsiooni korral seondumine LapD-ga ja hiljem LapG-ga on vähenenud ning LapG proteaasne aktiivsus säilib (Chatterjee jt., 2014; Navarro jt., 2011; Newell jt., 2009, 2011).

Varasemalt on meie laboris püütud kindlaks määrata *lapG* mRNA 5' otsa RACE-meetodil (Hanna Ainele avaldamata andmed). Katsete tulemuste põhjal järeldati, et *lapG* mRNA 5' ots võib olla sekundaarstruktuuriga, mis tehniliselt raskendab 5' otsa määramist, või ei kasutatud mRNA pöörtranskriptaasi reaktsiooni ja edasise amplifikatsiooni jaoks piisavalt hästi töötavaid oligonukleotiide. Seetõttu kasutati laboris promootorala 5' otsa lühendamise meetodikat võimalike promootorite tuvastamiseks (Räis, 2024). Meetodika seisneb selles, et reportergeeni ette (tolles töös kasutati reporteriks *lacZ* geeni) kloneeritakse promootorala, mis on sama 3' otsaga, kuid iga uus lõik on 5' otsast lühem. Kui deleteeritud DNA alas on promootor või osa sellest, siis reportervalg annab nõrgema signaali (antud töös β -galaktosidaasi kogunemise järgi hindamine). Meetodika miinuseks on see, et deleteeritud DNA alas võib olla transkriptsiooni regulatoorne ala, mis samuti mõjutab reportergeeni ekspressiooni, ning tulemustest võib teha valejärelduse. Siiski, *LacZ* katsetest järeldati, et *lapG* promootor(id) asub/asuvad *lapG* ja tema vastasgeeni PP_0163 vahelisel alal, on tõenäoliselt Sigma70-tüüpi (Räis, 2024). Samas järeldati, et geenil PP_0163 on kaks või enam promootorit, millest üks asub geenidevahelisel alal, aga osa *lapG* geenis, ning need promootorid on RpoS-st sõltuvad (joonis 1; Räis, 2024).



Joonis 1. *P. putida* geenide PP_0163 ja *lapG* promootorala. Punaste kastidega on märgitud Fis-i võimalikud seondumiskohad (Andrio Lahesaare avaldamata andmed). Painutatud nooltega on näidatud Softberry-ga ennustatud hüpoteetilised promootorid koos sama programmi määratud skooridega. Suunatud kastidega on näidatud geenid PP_0163 ja *lapG*. Jämeda musta joonena PP_0163-*lapG* vaheline promootorala. (Räis, 2024)

Lisaks on DnaaI *footprint assay*'ga tehtud kindlaks kaks Fis-i nörka seondumisjärjestust *lapG*-PP_0163 vahelisel promootoralal (Andrio Lahesaare avaldamata andmed; joonis 1). Hiljem leiti, et *lapG* ekspressioon ei sõltu β -galaktosidaasiga mõõdetuna Fis-st, kuid seevastu PP_0163 promootorid on Fis-st sõltuvad (Räis, 2024).

Kuna kahe geeni kaugus üksteisest on ainult 626 nt ja PP_0163 promootor võib asuda *lapG* geenis, siis suure tõenäosusega PP_0163 mRNA-l on 5' otsas järjestus, mis on komplementaarne *lapG* mRNA 5' otsaga ning seetõttu on alust oletada, et *lapG* transkriptsiooni regulatsioon võib olla mõjutatud ekskludonist, mehhanismist kus kahe vastasgeeni mRNA-d käituvad üksteise suhtes asRNA-dena. Samas ekskludoni pole varem sellisel kujul gramnegatiivsetel bakteritel kirjeldatud.

1.4. Globaalne transkriptsioonifaktor Fis

Globaalne transkriptsioonifaktor Fis on DNA-ga seonduv ja seda painutav valk (Finkel & Johnson, 1992; Pan jt., 1996; Shao jt., 2008), mida on leitud *Enterobacteriaceae* ja *Pseudomonadaceae* sugukonna bakterites (Beach & Osuna, 1998; Moor jt., 2014; Shao jt., 2008). *Escherichia coli*'s muutub Fis-i hulk raku erinevates kasvufaasides väga järsult, suurenedes varajases eksponentsiaalses faasis mõnesajast molekulist mõnesaja tuhande molekulini ning langedes kiiresti hilises eksponentsiaalses faasis (Ball jt., 1992). Statsionaarsesse faasi jõudes on Fis-i hulk raku tagasi algse mõnesaja molekuli juures (Ball jt., 1992). Fis-i hulk *P. putida*'s on reguleeritud sarnaselt: Fis-i hulk raku tõuseb eksponentsiaalses faasis ning langeb statsionaarsesse faasi jõudes (Yuste jt., 2006). Erinevus *E. coli* ja erinevate *Pseudomonas* liikidel vahel on, et *E. coli* suudab hakkama saada ka ilma Fis

valguta (Koch jt., 1988), kuid pseudomonased selle puudumist ei talu (Liberati jt., 2006; Yeung jt., 2009). Meie laboris prooviti samuti teha *P. putida fis knockout* mutante, kuid *fis* geeni deleteerimine osutus rakkudele letaalseks, kinnitades eelnevaid andmeid (Teras jt., 2009).

Töögrupi varasematest katsest on teada, *fis*-i üleekspressiooni korral *P. putida* biofilm võimendub ning ühe võimalusena arvati, et Fis võiks represseerida *lapG* transkriptsiooni (Puhm jt., 2022). Lisaks oli näidatud, et geenide PP_0163 ja *lapG* vahelisel alal on kaks võimalikku Fis-i seondumisjärjestust (Andrio Lahesaare avaldamata andmed). Kuid *lacZ* reportersüsteemi järgi *lapG* transkriptsioon ei sõltunud Fis-i hulgast, kuid seevastu *lapG* vastasgeeni PP_0163 transkriptsioon oli represseritud (Räis, 2024).

1.5. Transkriptsioonifaktor OxyR

Transkriptsioonifaktor OxyR on oksüdatiivsele stressile reageerimiseks vajalik valk, mida on leitud *Enterobacteriaceae* ja *Pseudomonadaceae* sugukonna bakterites (Christman jt., 1989; Hishinuma jt., 2006). *P. putida*'l on OxyR vajalik peamiselt vesinikperoksiidi (H₂O₂) põhjustatud oksüdatiivsele stressile reageerimiseks, mõjutades umbes kolmandiku geenide ekspressiooni 7 minuti jooksul peale H₂O₂ lisamist. Kuigi OxyR mõjutab geenide ekspressiooni kiiresti ja suures ulatuses, siis lahtub OxyR-i mõju ka suhteliselt kiiresti, tunni aja möödudes oli erinevalt ekspresseerunud geenide arv langenud 15,2%-ni. (Bojanovič jt., 2017)

1.6. Globaalne transkriptsioonifaktor ArgR

Transkriptsioonifaktor ArgR on arginiini biosünteesi ja transporti kontrolliv valk (Barrientos-Moreno jt., 2022), mida on leitud *Enterobacteriaceae* ja *Pseudomonadaceae* sugukonna bakterites (Barrientos-Moreno jt., 2020; Lim jt., 1987). ArgR puudumisel halveneb rakkude kasv, kui arginiin on ainukeseks süsiniku- või lämmastikuallikaks (Barrientos-Moreno jt., 2020). Lisaks *P. aeruginosa* rakkude kasvu halvenemisele on ArgR puudumisel vähenenud rakkude liikuvus ja soodustatud biofilmi formatsioon (Barrientos-Moreno jt., 2022), kuna need on seotud c-di-GMP ja arginiini kaudu ArgR-ga (Bernier jt., 2011; Simm jt., 2004; Valentini & Filloux, 2016). Kuna varasematest töödest on teada, et ArgR reguleerib *P. putida* teise pinnaadhesiini *lapF* ekspressiooni (Barrientos-Moreno et al., 2022), siis võib arvata, et ArgR osaleb ka teiste geenide, mis vastutavad *P. putida* biofilmi tekke eest, regulatsioonis. Meie laboris konstrueeriti *P. putida argR knockout* tüvi PaW85ΔargR (Riho Teras avaldamata andmed).

1.7. Fluorestseeruvad valgud

Fluorestseeruvad valgud on valgud, mis on võimelised helenduma, kui neid ergastada erinevate lainepikkustega, ergastamine toimub lühema lainepikkusega ning helendumine toimub suuremal lainepikkusel. Näiteks fluorestseeruvatel valgudel nagu SYFP2 on maksimaalne ergastumine lainepikkusel 515 nm (ex: 515 nm) ja valguse emissioon lainepikkusel 527 nm, (em: 527 nm; Kremers jt., 2006); Scarlet-I3-l aga vastavalt ex: 568 nm, em: 592 nm (Gadella Jr jt., 2023) (Pakhomov & Martynov, 2008). Konkreetset reporterüsteemi korral võivad ergastus ja emissiooni lainepikkused maksimaalsest erineda, sõltuvalt söötimest ja peremeesorganismist, mida uurimiseks kasutatakse. Näiteks meie töörühmas, tulenevalt *P. putida* endofluorestsentsist ja LB söötmekomponentidest raskendatud alla 530 nm valguse emissiooni mõõta, millest tulenevalt on ergastus ja emissiooni lainepikkusi kohandatud (Hendrikson jt. avaldamisel). Tegu on mugava biotehnoloogilise tööriistaga, mille abil saab uurida näiteks geenide ekspressiooni ja valkude lokalisatsiooni elusates rakkudes, kuna tööle hakkamiseks ei ole vaja rakku lisaks sisse viia kofaktoreid või ensüüme (Heim jt., 1994; Sample jt., 2009).

1.8. Ekskludon

Ekskludon on geeniekspressiooni regulatsioonimehhanism, mille käigus käituvad mRNA-d asRNA-dena, reguleerides-represseerides teineteise geeniekspressiooni (Sesto et al., 2013). Selle juhtumiseks peaksid transkribeeritud RNA-d olema pikad ning asuma piisavalt lähedastikku, et RNA-del oleks võimalus teineteisega kattuda (Toledo-Arana & Lasa, 2020). Esimest korda kirjeldati ekskludoni *Listeria monocytogenes*, kus see mehhanism reguleerib näiteks viburi operoni geene läbi repressori *mogR* transkriptsiooni (Sesto et al., 2013). Selline mehhanism võimaldab kiiresti ühest seisundist teise (*L. monocytogenes*'e puhul liikuvus) ümber lülitada. Selline süsteem võiks aset leida ka *P. putida* *lapG_PP_0163* transkriptsiooni regulatsiooni korral, kuna nende kahe geeni vaheline ala on suhteliselt lühike ning katseliselt on leitud, et *PP_0163* üks mitmest promootorist asub *lapG*-s samal ajal kui *lapG* promootor(id) on geenide vahelises alas (Räis, 2024).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on: 1) hinnata *lapG* geeni ekspressiooni uue kahes suunas transkriptsiooni uurimist võimaldava reporterplasmiidiga, 2) võrrelda madala koopiaarvuga plasmidi (RK2 *oriV*-ga plasmiidid) ja keskmise koopiaarvuga plasmidi (BBR1 *oriV*-ga plasmiidid) sobilikkust geeniekspressiooni regulatsiooni uurimiseks, 3) välja selgitada RACE-meetodil *lapG* transkriptsiooni alguspunkt.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud plasmiidid, bakterid, kasvatustingimused

Baktereid kasvatati LB (Luria-Bertani) söötmes (Miller, 1992). Seleksioonimarkeritena kasutati penitsilliin G-d (Pn, 1 mg/ml) või gentamüsiini (Gm, 10 µg/ml). F15 tüve puhul lisati söötmesse vajadusel 0,5 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG-d.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakter	Iseloomustus/genotüüp	Allikas
<i>P. putida</i> PaW85	Metsiktüvi, mis on isogeenne KT2440 tüvega (täielikult sekveneeritud)	(Bayley jt., 1977)
<i>P. putida</i> F15	PaW85; mini-Tn7-term- <i>lacI</i> ^q - <i>P</i> _{tac} - <i>fis</i> -T1T2-ΩGm kasset (Gm ^r)	(Jakovleva jt., 2012)
<i>P. putida</i> PaW85Δ <i>argR</i>	PaW85 tüvi, millest on <i>argR</i> geen deleteeritud	Riho Teras 2025
Plasmiid		
pA7	Kahe fluoreseeruva valgu geeniga (Scarlet-I3 ja SYFP2) reportersüsteem kahes suunas transkriptsiooni regulatsiooni uurimiseks, BBR1 <i>oriV</i> -ga; <i>hok-sok</i> toksiin-antitoksiin süsteem; Pn ^r	Konstrueeritud meie töögrupis (2024), lisa 1.
pYR7	Kahe fluoreseeruva valgu geeniga (Scarlet-I3 ja SYFP2) reportersüsteem kahes suunas transkriptsiooni regulatsiooniuurimiseks, <i>hok-sok</i> toksiin-antitoksiin süsteem, RK2 <i>oriV</i> -ga (madala koopiaarvuga plasmiid; Pn ^r)	Konstrueeritud meie töögrupis (2024), lisa 2

Tabel 1. jätk

Plasmiid		
pA7_P-S (pYR7_P-S)	pA7 (pYR7), millesse on ScarletI3 ja SYFP2 vahel asuvasse BamHI lõikesaiti kioneeritud	Käesolev töö, joonis 2

	1456 nt pikkune lõik geenidest PP_0163- <i>lapG</i> , mis sisaldab geenide vahelist 626 nt pikkus ala ja u 400 nt pikkust ala mõlemast geenist. Potentsiaalsed <i>lapG</i> promootorid on Scarlet-I3 geeni suunas. DNA-lõik amplifitseeriti oligonukleotiididega PP_0163-II-Bgl-II ja PP_0164-II-Bgl-II.	
pA7_L-S (pYR7_L-S)	pA7 (pYR7), millesse on ScarletI3 ja SYFP2 vahel asuvasse BamHI lõikesaiti kloonitud 626 nt pikkune lõik geenidest PP_0163- <i>lapG</i> vahealast. Potentsiaalsed <i>lapG</i> promootorid on Scarlet-I3 geeni suunas. DNA-lõik amplifitseeriti origonukleotiididega PP_0163-I-Bgl-II ja PP_0164-I-Bgl-II.	Käesolev töö, joonis 2
pA7_G-S (pYR7_G-S)	pA7 (pYR7), millesse on ScarletI3 ja SYFP2 vahel asuvasse BamHI lõikesaiti kloonitud 1050 nt pikkune lõik geenidest PP_0163- <i>lapG</i> , mis sisaldab geenide vahelist 626 nt pikkus ala ning u 400 nt pikkust ala <i>lapG</i> geenist. Potentsiaalsed <i>lapG</i> promootorid on Scarlet-I3 geeni suunas. DNA-lõik amplifitseeriti origonukleotiididega PP_0163-I-Bgl-II ja PP_0164-II-Bgl-II.	Käesolev töö, joonis 2
pA7_63-S (pYR7_63-S)	pA7 (pYR7), millesse on ScarletI3 ja SYFP2 vahel asuvasse BamHI lõikesaiti kloonitud 1032 nt pikkune lõik geenidest PP_0163- <i>lapG</i> , mis sisaldab geenide vahelist 626 nt pikkus ala ja u 400 nt pikkust ala PP_0163 geenist. Potentsiaalsed <i>lapG</i> promootorid on Scarlet-I3 geeni suunas. DNA-lõik amplifitseeriti origonukleotiididega PP_0163-II-Bgl-II ja PP_0164-II-Bgl-I.	Käesolev töö, joonis 2

2.2.2. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

Promootorala pA7 ja pYR7 (Tabel 1) vektoritesse kloonimiseks amplifitseeriti *P. putida* kromosoomist vajalik ala PCR-ga. PCR reaktsioon toimus 50 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas PCR puhvrit (750 mM Tris- HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X-100; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Ameerika Ühendriigid), 0,2 mM dNTP-d, 10 pmol vajaminevaid primereid (Tabel 2), 0,15 U Taq DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Ameerika Ühendriigid), matriits-DNA-d ja vajaliku mahu

saavutamiseks MQ-vett. Matriits-DNA-na kasutati *P. putida* rakkudest PCR-i esimese tsükli kuumutamisel vabanenud DNA-d.

PCR tsüklid: 96 °C 2 min DNA vabastamiseks rakkudest ja DNA denatureerimiseks (esimeses tsükli), 96 °C 45 sekundit DNA denatureerimiseks, 58°C 45 sekundit praimerite matriits-DNA-le seondumiseks, 72 °C 1,5 minutit uue DNA ahela sünteesimiseks. Kolm viimast etappi korrati 25 korda. Peale viimast tsükli toimus lisaetapp 72 °C 5 minutit, et lõpetada DNA ahelate süntees.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Praimeri järjestus 5'-3' suunas; alla joonituna on märgitud Bgl-II lõikesait	Ostarve
PP_0163-I-Bgl-II	AAAAGATCTCCAGTGC GTTGTGATCGTC	PP_0163-lapG promootorala amplifitseerimine, kloneerimine
PP_0163-II-Bgl-II	AAAAGATCTGCGACTGACGCCGTACAG	
PP_0164-I-Bgl-II	AAAAGATCTCAGGCTCTGCCAGGCATC	
PP_0164-II-Bgl-II	AAAAGATCTCCTTCTTGTTCCCTGCCGC	
Scarlet-K2	TCACTTTCAGTTTCGCGGTCTG	sekveneerimine
Venus-K2	GTTTACCGGTGGTGCAAATCAG	
lapG-RACE-1-uus	TATTGGCGATGGCGTAATCCT	mRNA 5' otsa määramine RACE meetodil
lapG-RACE-1a	ACAGGTGTGGCCAGTAG	
lapG-RACE-2-uus	GGTTGAAGAAGCGGTTGACC	
PP_0163-RACE-1	CCCTTGTCATCTCCACTTTC	
PP_0163-RACE-2	TGTCGCTGGCATCAAGCA	
Adapt_pikkC	GACTCGAGTCGACATCGACCCCCCCCCCCCCCCC CCC	
Adapt-lyh	GACTCGAGTCGACATCG	

2.2.3. Plasmiidide konstrueerimine

Töö käigus konstrueeriti 8 plasmidi, mis sisaldasid uuritavate geenide *lapG* ja PP_0163 promootoralasid reporteri Scarlet-I3 ja SYFP2 geenide vahel plasmides pA7 ja pYR7 (tabelid 1 ja 3, joonis 2). Kloneerimiseks kasutati klassikalist restriksioon-ligeerimis meetodit ThermoFisher ensüümidega firma protokollide järgi (Waltham, Massachusetts, USA). pA7 ja pYR7-s (lisa 1 ja 2) on reporter-kasset sama, kuid erineb peamiselt plasmidi *oriV* poolest,

plasmiididest kodeeritud reporterid on varustatud C-terminuses AAV/ASV täägiga, mis vähendab reporteri poolt eluiga teoreetiliselt 1 tunnini (Andersen jt., 1998).

Tabel 3. Kahe kasutatud plasmidi võrdlus

	A7	YR7
Koopiaarv rakus	Keskmine	Madal
fluorestsentsi tugevus	Tugevam	Nõrgem
<i>oriV</i>	BBR1	RK2
Fluoresseeruvad valgud	ScarletI3, SYFP2	ScarletI3, SYFP2
RBS olemasolu	Jah	Jah
Reportervalkude teoreetiline pool eluiga	1 tundi	3 tundi

2.2.4. Transformatsiooniks vajaminevate kompetentide valmistamine ja rakkude elektroporatsioon

P. putida kompetentide tegemiseks kasvatati rakke 5 ml LB vedelsöötmes 30 °C loksutis 180 rpm üleöö, millest edaspidiseks kasutamiseks tsentrifuugiti kokku 3 ml rakke (60 sek 12100 g). Fuugitud rakke pesti kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosilahusega (90 sek 12100 g), seejärel suspendeeriti 500-700 µl 300 mM sahharoosilahuses ja kasutati elektroporatsiooniks samal päeval.

80 µl sahharoosilahuses olevatele kompetentsetele rakkudele lisati 5 µl soolavaba ligaasisegu või 0,1 ng plasmiidset DNA-d. Rakud koos DNA-ga pipeteeriti elektroporatsiooniküveti ning poreeriti elektroporaatoriga (BioRad, Dubai, Araabia Ühendemiraadid) pingel 2500 V. Küvetist pesti rakud välja LB vedelsöötmega ning elektroporatsiooniga rakkude kasvatati 2 ml LB vedelsöötmes 30 °C loksutis 180 rpm 1 tund. Seejärel tsentrifuugiti rakud kokku (60 sek 12100 g) ja plaaditi LB tardsöötmele, millele oli lisatud vajalik antibiootikum.

2.2.5. Geelelektroforees

PCR-produkte ja eraldatud plasmiidset DNA-d kontrolliti 1% agarosgeelil TAE puhvris (5 mM Trisatsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2), kuhu oli lisatud etiidiumbromiidi (0,20 µg/ml). mQ-vees lahustatud plasmiidsele DNA-le lisati 5 µl kohta 2 µl laadimispuhvrit (0,04 % broomfenool-sinise lahus 50 % glütseroolis). Selleks, et hinnata DNA pikkust, lisati eraldi agarosgeeli hambasse Thermo Fisher Scientific ZipRuler Express suurusmarkerit 1 või 2.

Agaroosgeeli voolutati pingel 5 V/cm ning DNA visuliseerimiseks pildistati geeli UV- laual lainepikkusel 302 nm.

2.2.6. DNA sekveneerimine

Kloneeritud promootoralade järjestust kontrolliti DNA sekveneerimisega. Selleks amplifitseeriti kontrollitav DNA-lõik praimeritega Venus-K2 ja Scarlet-K2 (Tabel 2) ning PCR-produkti pikkust kontrolliti geel-elektroforeesiga võrreldes PCR-produkti Thermo Scientific ZipRuler Express DNA Ladder 1-ga või 2-ga (Waltham, Massachusetts, Ameerika Ühendriigid). Sekveneerimine toimus Tartu Ülikooli geneetika instituudi tuumiklaboris täissekveneerimise teenusena. Saadud tulemusi analüüsiti SnapGene 8.0.3 programmiga (GSL Biotech LLC, Boston USA).

2.2.7. Plasmiidse DNA eraldamine

Rakkudest plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit-i (Viin, Austria) ning eraldus viidi läbi vastavalt fima tootejuhistele. Eraldatud DNA võeti üles 70 µl MQ-vees, kontrolliti 1% agarosgeelil ning hoiustati -20 °C temperatuuril.

2.2.8. *In silico* transkriptsiooniregulaatorite seondumisjärjestuste ennustamine

Ennustamiseks kasutatud maatriksid on koostatud DNA järjestuste põhjal, millele on eksperimentaalselt näidatud *E. coli* Fis-i, OxyR või ArgR seondumine. Maatriksid saadi RegulonDB veebilehelt (<https://regulondb.ccg.unam.mx>), lisas 3 on välja toodud ennustatud transkriptsiooniregulaatorite kõikide nukleotiidide esinemistõenäosused iga positsiooni kohta. *In silico* OxyR-i, Fis-i ja ArgR-i seondumisjärjestuste ennustamiseks DNA-le kasutati veebipõhist ennustusprogrammi RSA-tools-matrix-scan (RSAT) (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>). Programmis valiti taustmudeliks (*Background model*) Markovi suurusklass 1 (*Markov order 1*). Nukleotiidide esinemissageduse arvutamiseks kasutati *P. putida* geenieelsete (626 nt) alade nukleotiidide esinemissagedusi, mida tegi programm automaatselt. Ennustamiseks kasutati u 1400 nt pikkuseid DNA lõike, mis sisaldasid 626 nt *lapG* ja PP_0163 geenide vahelist ala ning umbes 400 nt mõlema geeni algusest. Olulisusnivooks (α) võeti Fis-i seondumisjärjestusi ennustades 1×10^{-3} ning OxyR ja ArgR seondumisjärjestusi ennustades 1×10^{-4} , järjestuste leidmiseks arvestati nii skoori kui p-väärtust. Ülejäänud tingimusi programmis ei muudetud.

2.2.9. Mikrotiiterplaadiga rakkude fluorestsentsi mõõtmine

Mikrotiiterplaadil mõõtmiste tegemiseks kasvatati *P. putida* PaW85, *P. putida* PaW85 Δ argR ja F15 tüvede rakke, millesse oli poreeritud uuritava promootoralaga pA7 või pYR7 plasmiid (Tabel 1), LB vedelsöötmes ja penitsilliin G juuresolekul üleöö temperatuuril 30 °C. Lahjendus värskesse söötmesse tehti nii, et rakutihedus oleks arvutuslikult 0,1. Mikrotiiterplaadi igasse kannu pipeteeriti 200 μ l rakkudega inokuleeritud LB söödet ja kasvatati 22 tundi temperatuuril 30 °C. Iga 20 min järel mõõdeti plaadilugejas Agilent Bio Tek Synergy H1 rakutihedus (580 nm) ning Scarlet-I3-AAV (Ex 570 nm (\pm 20) ja Em 600 nm (\pm 20)) ja SYFP2-AAV (Ex 505 nm (\pm 10) ja Em 540 nm (\pm 10)) fluorestsents.

Selleks, et analüüsimisel vältida vektori ja *P. putida* endast tulenevat fluorestsentsi muutust, kasutati RFU väärtusi, mille saamiseks lahutati *lapG*-PP_0163 promootorala sisaldavate plasmiidide fluorestsentsist maha tühja (pA7 või pYR7) plasmidi sisaldavate rakkude fluorestsents ning alles siis jagati saadud tulemust rakutihedusega.

2.2.10. RNA eraldamine

Rakkudest RNA eraldamiseks kasutati Macherey-Nagel NucleoSpin RNA Kit-i (Düren, Saksamaa) järgides firma tootejuhiseid. RNA võeti üles 50 μ l nukleaasivabas vees, jagati kahte kuni kolme Eppendorfi tuubi, et vältida kogu eraldatud RNA korduvat ülessulatamist, kontrolliti 2% ilma etiidumbromiidita agarosgeelil ja NanoDropi spektrofotomeetriga ning hoiustati -80 °C temperatuuril.

RNA eraldati *P. putida* PaW85 rakkudest, mida kasvatati LB vedelsöötmes üleöö temperatuuril 30 °C. Järgmisel hommikul tehti ümberkülv üleöökultuurist 5 ml LB-sse kasvatati kuni rakutihedus oli 580 nm juures umbes 0,8-1.

2.2.11. RACE'ga *lapG* mRNA 5' otsa määramine

Geenide *lapG* ja PP_0163 mRNA 5' otsa määramiseks kasutati RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) meetodikat, järgides modifitseeritud Sambrooki protokollit (Sambrook, 2001).

Esimeseks etapiks oli cDNA esimese ahela sünteesimine. Selleks kasutati RNA-d *P. putida* PaW85 rakkudest. 1,5 μ g RNA kohta kasutati 50 pmol geenispetsiifilist praimerit (Tabel 2) ja nukleaasivaba vett mahuni 12,5 μ l, kuumutati 70 °C juures 5 min ja jahutati jääl. Lahusele lisati 0,5 μ l Ribolock Rnase Inhibitor-it (40 U/ μ l), 2 μ l dNTP-d (10 mM), 4 μ l

pöördtranstriptaasipuhvrit ning inkubeeriti 37 °C juures 5 min. Seejärel lisati 1,5 µl pöördtranskriptaasi ning kuumutati 42 °C juures 1,5h ja 70 °C juures 10 min.

Teiseks etapiks oli sünteesitud cDNA-le 3' otsa polünukleotiidsaba sünteesimine. Selleks lisati saadud cDNA-le 1,5 µl TdT-d (terminaalne desoksünukleotidüül transferaas; 30 U), 4 µl TdT puhvrit ja 4 µl dGPT-d (1mM) ning inkubeeriti 30 °C juures 20 min ja 70 °C juures 10 min.

Kolmaks etapiks oli cDNA-le teise ahela sünteesimine, kus kasutati 0,5 µl polünukleotiidsabaga seonduvat praimerit Adapt_pikkC (Tabel 2), 4 µl Taq puhvrit ja 0,1 µl Dream Taq DNA-polümeraasi. Etapis kasutati järgnevat PCR programmi: 95 °C juures 5 min; 55-65 °C nii, et 10 min jooksul tõuseb temperatuur üks kraad minutis; 70 °C juures 10 min.

Saadud cDNA amplifitseerimiseks kasutasin 2 µl cDNA-d, 2,5 µl Taq puhvrit, 0,1 µl Dream Taq DNA-polümeraasi, 0,1 µl Adapt-lyh-i, mis seondub Adapt_pikkC külge (Tabel 2), ning 0,1 µl geenispetsiifilist praimerit (Tabel 2). Saadud produkti sekveneerimiseks kasutati Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklabori täissekveneerimise teenust (vt peatükk 2.2.6.).

Etappide vahel kasutati DNA puhastamiseks ZymoResearch DNA Clean & Concentrator-5 puhastuskomplekti.

2.2.12. Statistiline analüüs

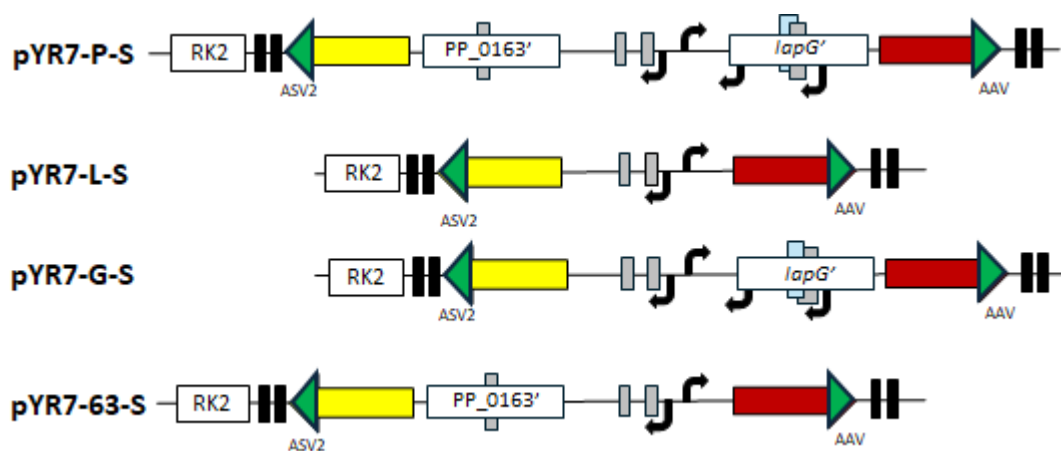
Statistiliseks analüüsiks kasutati Statistica 14.0.1.25 programmi (TIBCO, San Ramon, USA). Punktmõõtmiste tulemusi analüüsiti One-Way ANOVA-ga usaldusnivool 0,05; mikrotiiterplaadil kasvatuskatsete tulemusi analüüsiti multifaktoriaalse ANOVA-ga. Nii One-Way kui multifaktoriaalse ANOVA järel arvutati P-väärtused Statistica paketi PostHok osas oleva Bonferroni järeldustega. Vajadusel leiti mikrotiiterplaadil saadud korduvmõõtmistel hinnatud keskmised GLM (*general linear models*) analüüsiga, võttes arvesse efektori, konstrukti ja aja mõjusid rakkude fluorestsentsile, sellisel juhul on arvesse võetud fluorestsentsi väärtused alates viiendast tunnist ning sellele tuginedes on y-telje tähistuseks „Kohandatud RFU“. Gruppide erinevuste mugavaks mõistmiseks on joonistel välja toodud homogeensusgruppid tähtedega. Sama tähe korral pole gruppide vahel erinevusi ($p \geq 0,05$).

2.3. Tulemused

Kuigi töögrupis pole õnnestunud RACE-ga määrata *lapG* mRNA 5' otsa, oli töö esimeseks eesmärgiks teha kindlaks *lapG* ja PP_0163 mRNA-de 5' otsad. Selleks muudeti RACE jaoks kasutatavate geenispetsiifiliste oligonukleotiidide seondumise asukohti (Tabel 2). Kahjuks ei õnnestunud RACE meetodikat kasutades kindlaks määrata ei *lapG* ega PP_0163 mRNA-de 5' otsi (tulemusi pole toodud). RACE luhtumist võis takistada ühise promootorala GC-korduste hulk, mis võivad moodustada omavahel sekundaarstruktuure ja seeläbi raskendada DNA amplifitseerimist.

Kuna RACE meetodikaga PP_0163 ja *lapG* mRNA-de 5' otste määramine ebaõnnestus, siis võeti kasutusele laboris konstrueeritud fluorestseeruvate valkude geenidega reporterplasmiidid pA7 ja pYR7 (tabel 1, lisa 1 ja 2), kuhu kloneeriti PP_0163 ja *lapG* ühine promootorala (joonis 2). Need geenid on *P. putida* kromosoomis vastassuunaliselt orienteeritud ning jagavad ühist promootorala, kusjuures osa regulaatorsest DNAST võib asuda vastasgeenis (joonis 1).

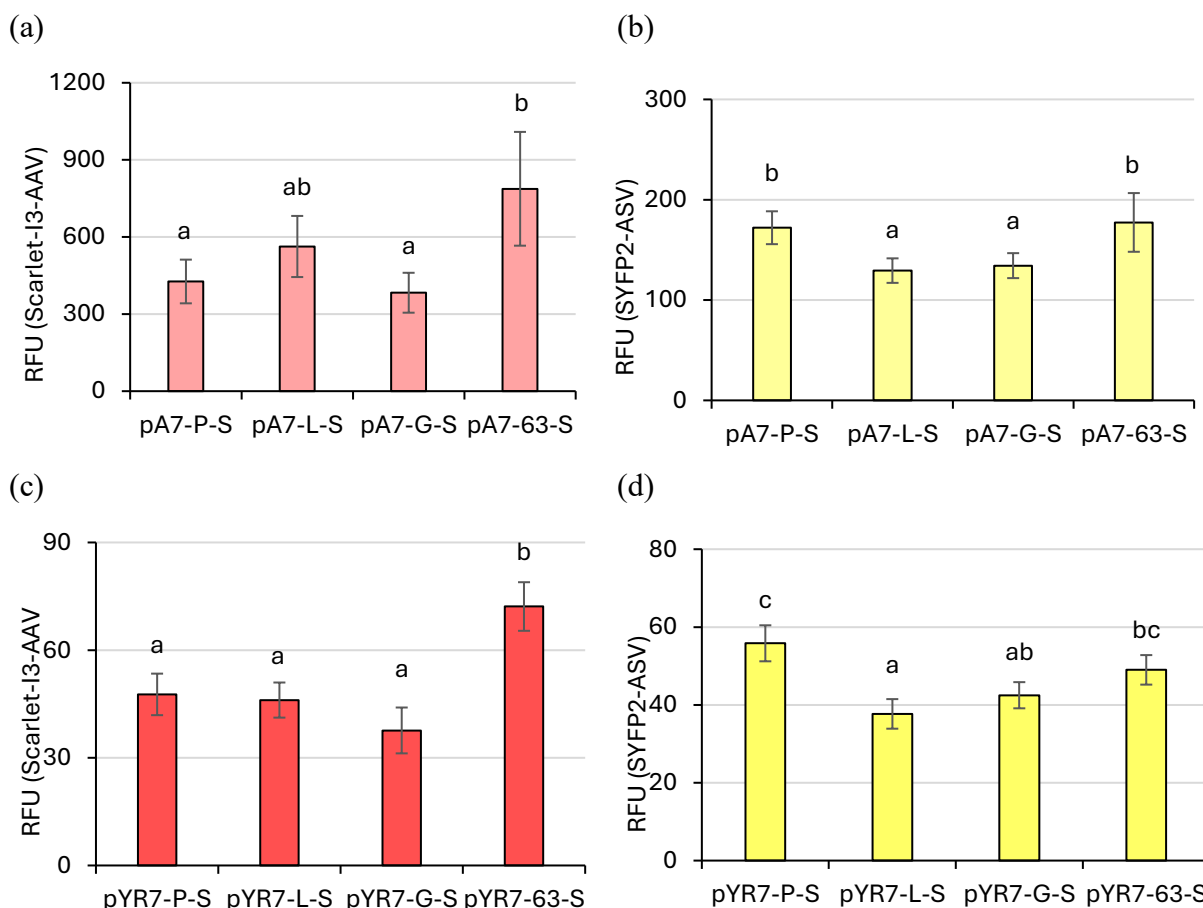
Geenide transkriptsiooni regulatsiooni kloneeriti reporterplasmiididesse neli erineva pikkusega promootorala lõiku: 1) ainult geenidevaheline 626 nt pikkune ala (tähistatud kui L, nt pA7-L-S), 2) lisaks geenidevahelisele alale u 400 nt kummastki geenist (konstruktid on



Joonis 2. Kloneeritud pYR7 konstruktide skeemid reporter-kasseti piirkonnast. Reporter-geen Scarlet-I3 on näidatud punase ja SYFP2 kollase noolena, mille 3' otsas on ASV2 ja AAV täkkide järjestused, mille vahele on kloneeritud uuritav promootorala. Mustade väikeste kastidega on märgitud transkriptsiooniterminaatorid. Joonise vasakus servas on toodud plasmidi nimi. Valgete kastidega on märgitud PP_0163 ja *lapG* 5' otsast umbes 400 nt pikad DNA lõigud. Hallide kastidega on toodud *in silico* ennustatud Fis-i seondumisjärjestused, helesinise kastiga *in silico* ennustatud OxyR seondumisjärjestus. Skeem pole mõõtkavas.

tähis P, nt pA7-P-S), 3) geenidevahelisele alale on lisaks u 400 nt ainult *lapG* geenist (tähistatud kui G, nt pA7-G-S) ja 4) geenidevahelisele alale on lisaks u 400 nt PP_0163 geenist (tähistatud

kui 63, nt pA7-63-S; Tabel 1). Kloneeriti nii, et võimalikud *lapG* promootorid asusid alati Scarlet-I3 geeni ees. Reporteriteks kasutati fluorestseeruvaid valke Scarlet-I3-AAV ja SYFP2-ASV2, mille teoreetiline pool eluiga on hinnanguliselt 1 tund (Andersen jt., 1998). Esimeses etapis mõõdeti rakkude fluorestsentsi punktmõõtmistena ehk 18 tundi kasvanud rakkudest, otsustamaks, millise koopiaarvuga plasmidi geeniregulatsiooni uurimiseks kasutada (joonis 2).



Joonis 3. Geenide *lapG* ja PP_0163 ekspressioon *P. putida* PaW85s. Ülemisel real (alajoonised a ja b) on toodud pA7 konstruktid, kus uuritavad promootorid on kloneeritud keskmise koopiaarvuga plasmidi, alumisel real (alajoonised c ja d) on toodud pYR7 konstruktid, mis on madala koopiaarvuga plasmidis. Rakke kasvatati 18 tundi LB+Pn-s ning mõõdeti rakkude (a ja c) Scarlet-I3-AAV fluorestsents, mis väljendab *lapG* ekspressiooni ning (b ja d) SYFP2-ASV fluorestsents, mis väljendab PP_0163 ekspressiooni. Joonistel on toodud aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega. Tulpade peal on toodud homogeensusrühmad (kui homogeensusrühmad sisaldavad samu tähti, siis $p \geq 0,05$). Bioloogiliste paralleelide ($n \geq 18$).

Mõlema reporterplasmidi puhul on *lapG* ekspressioon kõrgem 63-S konstruktidelt võrrelduna G-S konstruktidega, mis viitab *lapG* jaoks olulisele reguleerivale alale PP_0163 geenis (joonis 1a ja 1c). PP_0163 ekspressioon on kõrgem P-S ja 63-S konstruktidel korral, mis viitab mitmest faktorist sõltuvale regulatsioonile (joonis 1b ja 1d). Kuigi nii pA7 kui ka pYR7 tagavad

rakkudes sarnase geeniekspressioonimustri, on *lapG* ekspressiooni on lihtsamini interpreteeritav pYR7 konstruktide korral ja PP_0163 aga pA7 konstruktide korral.

Teades, et Fis represserib PP_0163 transkriptsiooni, otsiti käesoleva töö pikimale promootoralale (1456 nt) Fis-i, OxyR ja ArgR-i seondumisjärjestusi *in silico* (Tabel 4). Leiti üks OxyR-i seondumisjärjestus, mis asub *lapG* geenis sees (Tabel 4, Joonis 2). Fis-le leiti *in silico* neli piirkonda, kuhu regulaatorvalk võiks seonduda. Nendest kaks on *lapG*-PP_0163 geenide vahelises alas, üks *lapG* ning üks PP_0163 geenis (Tabel 4, Joonis 2). ArgR-i seondumisjärjestusi uuritud 1456 nt pikkuses promootoralas *in silico* ei leitud.

Tabel 4. *In silico* ennustatud regulaatorite seondumisjärjestused töös kasutatud PP_0163-*lapG* täispikas (1456 nt) promootoralas.

Regulaator	DNA ahel (<i>lapG</i> järgi)	Ennustatud seondumisjärjestus	Skoor	p väärtus	Kaugus <i>lapG</i> geeni algusest
OxyR ¹	Ülemine	ATGGTCCTGACCTATTATT	9,8	$3,8 \times 10^{-6}$	+264...+283 nt
Fis ²	Ülemine	TCCTGACCTATTATTCAA	5,3	$6,8 \times 10^{-4}$	+268...+286 nt
	Alumine	GGCTGAATAATAGGTCA	5,3	$6,8 \times 10^{-4}$	+271...+289 nt
	Ülemine	AGCAGAAAGTATAGGCGG	4,9	$1,0 \times 10^{-3}$	-297...-279 nt
	Alumine	TGCTTACATCTTTCTATA	5,8	$4,0 \times 10^{-4}$	-311...-293 nt
	Ülemine	TGACTGTATTGGATCCAA	5,6	$4,9 \times 10^{-4}$	-436...-418 nt
	Alumine	TGGATCCAATACAGTCAT	5,3	$6,8 \times 10^{-4}$	-437...-419 nt
	Alumine	CGCGGGTATATCCAGCAA	5,8	$4,0 \times 10^{-4}$	-836...-818 nt
ArgR	-	Seondumiskohti ei leitud	-	-	-

¹ Min skoor -31 ja max skoor 15,3

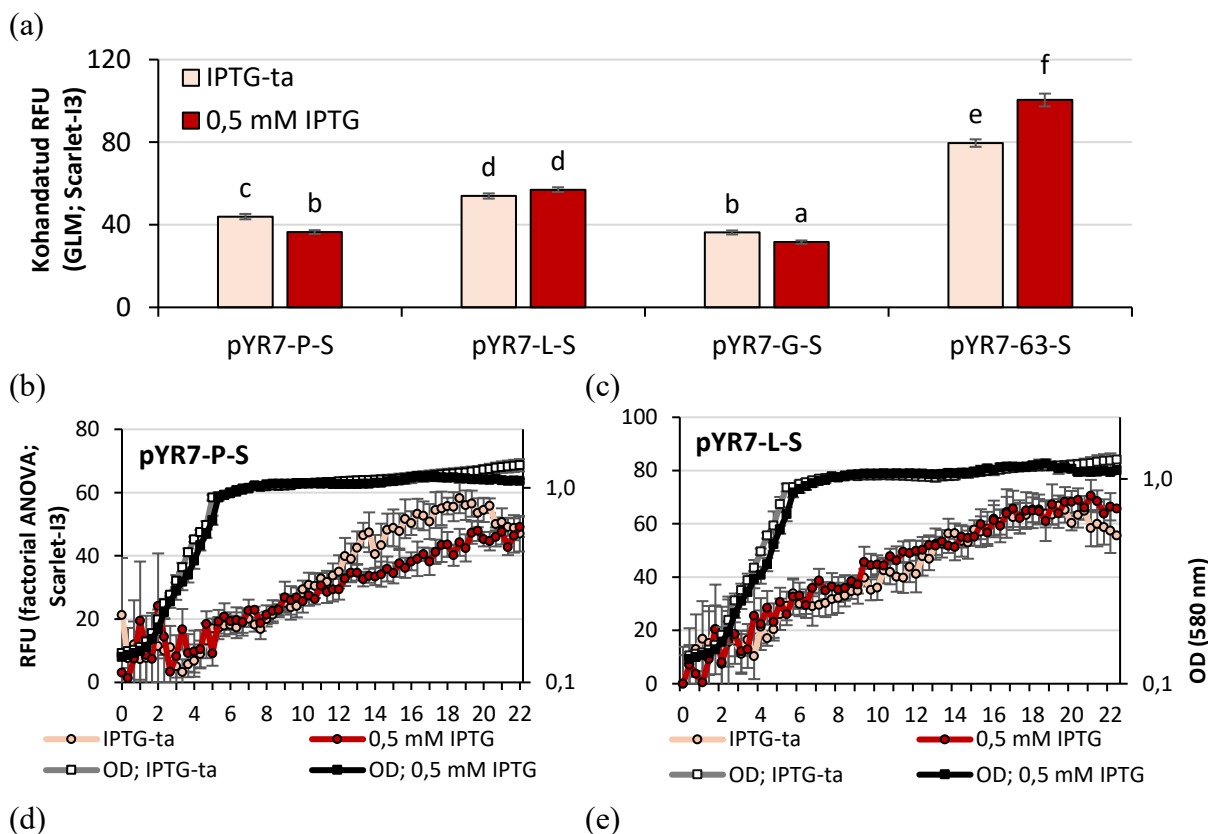
² Min skoor -20,6 ja max skoor 14,2

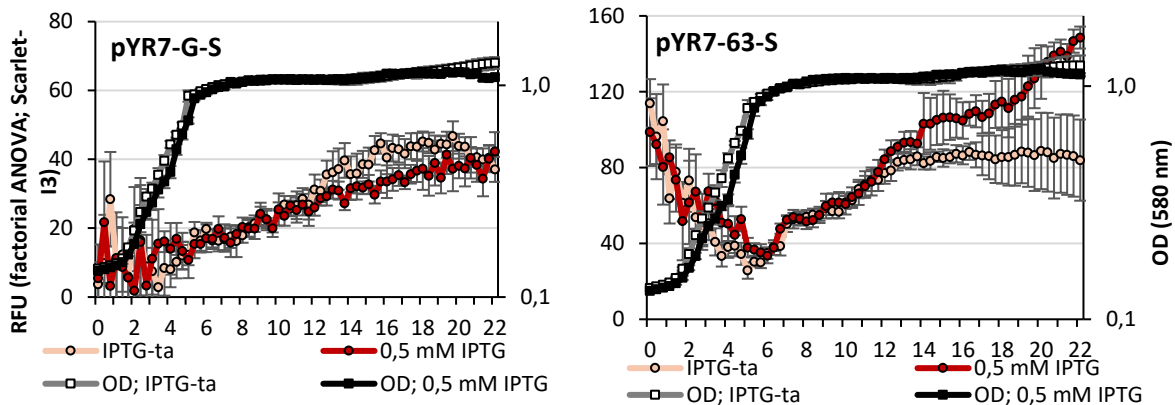
Kuna punktmõõtmised näitavad ainult teatud ajahetkel geeni ekspressiooni, siis täpsemaks regulatsiooni uurimiseks valiti mikrotiiterplaatidel rakkude fluorestsentsi korduvmõõtmised. Fis-i mõju uurimiseks geenide transkriptsioonile kasutati *P. putida* *fis*-i üleekspressioonitüve F15 (Tabel 2), mis tagab *fis* geeni lisaekspressiooni kui söötmesse lisada IPTG-d. Eelnevalt on näidatud, et IPTG lisamine söötmesse suurendab Fis-i hulka F15-s (Jakovleva jt., 2012).

Kui hinnati *lapG* ekspressiooni sõltuvust Fis-st, siis selgus, et võrreldes *fis*-i üleekspressiooni korral *P. putida* F15 rakkude fluorestsents vähenes, kui rakkudes oli nn täispikk promootorala

(pYR7-P-S; $p < 0,01$; joonis 4a ja 4b) või PP_0163 geeni DNA-ta promotoralaga konstrukt pYR7-G-S; $p < 0,01$; joonis 4a ja 4d). Samas *fis*-i üleekspressiooni korral suurenes pYR7-63-S-ga (puudub *lapG* geeni algus) rakkude fluorestsents ($p < 0,01$; joonis 4a ja 4e), kuid *fis*-i üleekspressioon ei mõjutanud rakkude fluorestsentsi, mis sisaldasid ainult geenidevahelist alaga konstrukti (pYR7-L-S; $p < 0,01$, Joonis 4a ja 4c). Seega, 400 nt pikkuses *lapG*-i alguses on lokaliseerunud oluline reguleeriv ala, mis on Fis-st sõltuv ning pärsib *lapG* ekspressiooni.

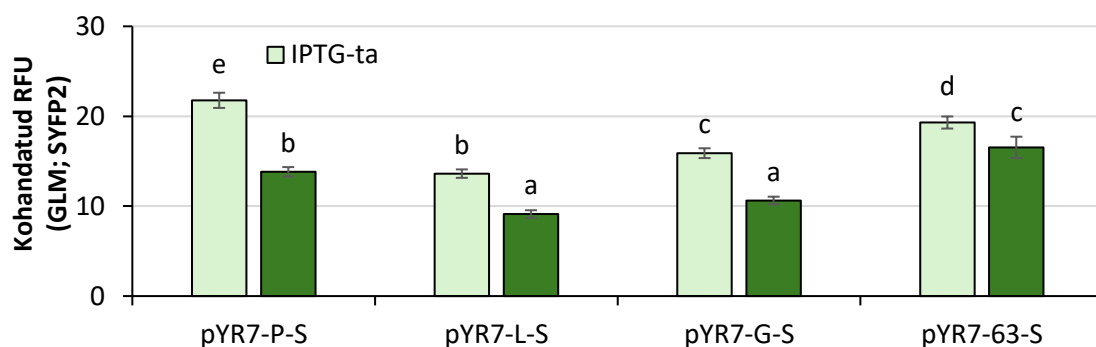
Kui uuriti *lapG* vastasgeeni PP_0163 sõltuvust Fis-st, siis *fis*-i üleekspressiooni korral vähenes *P. putida* F15 fluorestsents sõltumata pYR7 konstruktist (pYR7-P-S; $p < 0,01$; joonis 5a ja 5b; pYR7-L-S; $p < 0,01$, 5a ja 5c; pYR7-G-S; $p < 0,01$, 5a ja 5d; pYR7-63-S; $p < 0,01$, 5a ja 5e). Seega on Fis-st sõltuv reguleeriv ala, mis mõjutab PP_0163 ekspressiooni, *lapG* ja PP_0163 vahelises alas.



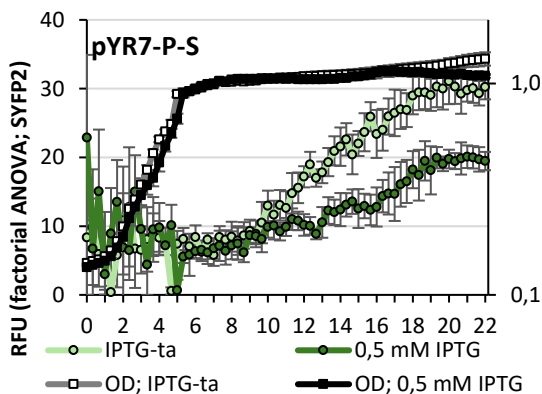


Joonis 4. *lapG* ekspressioon *P. putida* F15-s. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C. *Fis*-i ekspressiooniks kasutati 0,5 mM IPTG, kontrollvariandil IPTG-d söötesse ei lisatud. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tiheduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (roosa ja punane joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 8. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*). Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeldestiga homogeensusgrupid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$.

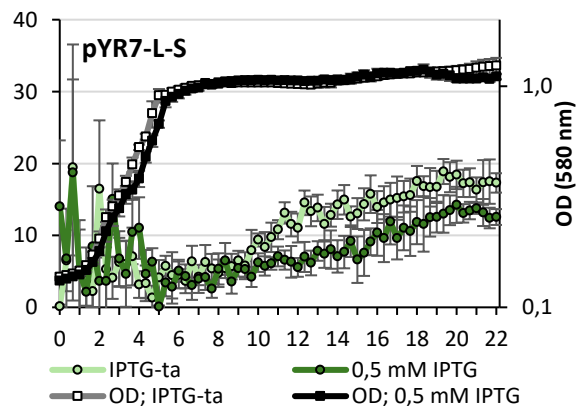
(a)



(b)

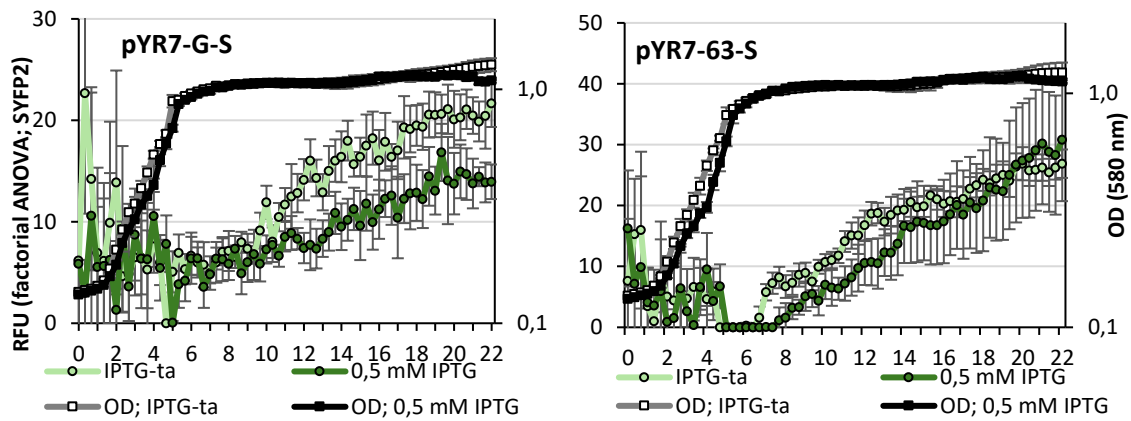


(c)



(d)

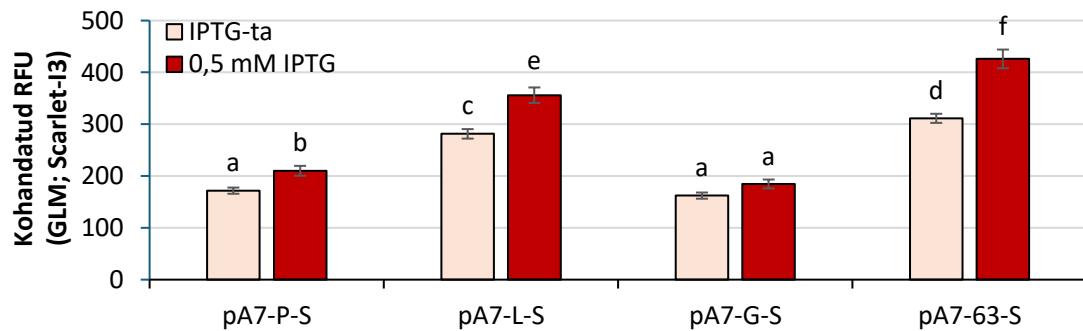
(e)



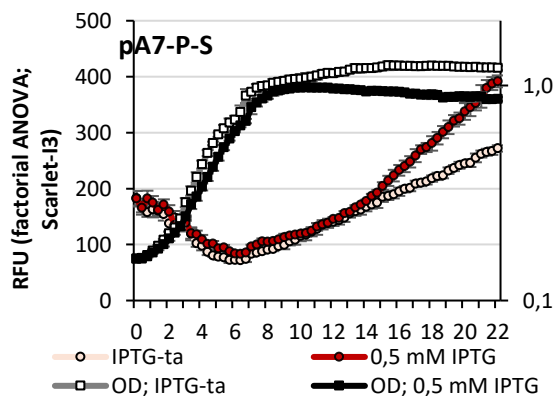
Joonis 5. PP_0163 ekspressioon *P. putida* F15-s. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C. *Fis*-i ekspressiooniks kasutati 0,5 mM IPTG, kontrollvariandil IPTG-d söötmesse ei lisatud. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tiheduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (hele- ja tumeroheline joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 8. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*). Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeltestiga homogeensusgrupid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$.

Korrates samu katseid pA7 konstruktidega, ilmnes, et *fis*-i üleekspressiooni korral *P. putida* F15 fluorestsents suurenes valguse punases spektriosas (*lapG*) pA7-P-S, pA7-L-S ja pA7-63-S konstruktidest ($p < 0,01$, joonis 6a).

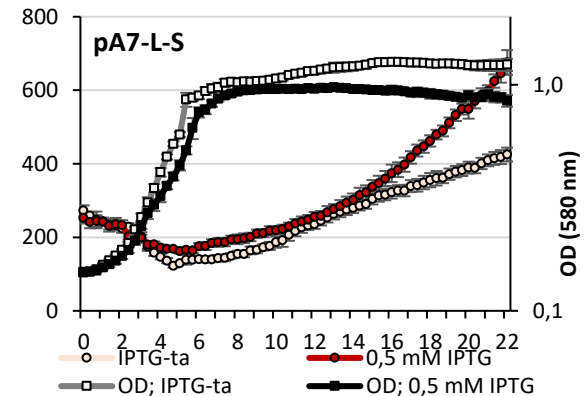
(a)



(b)

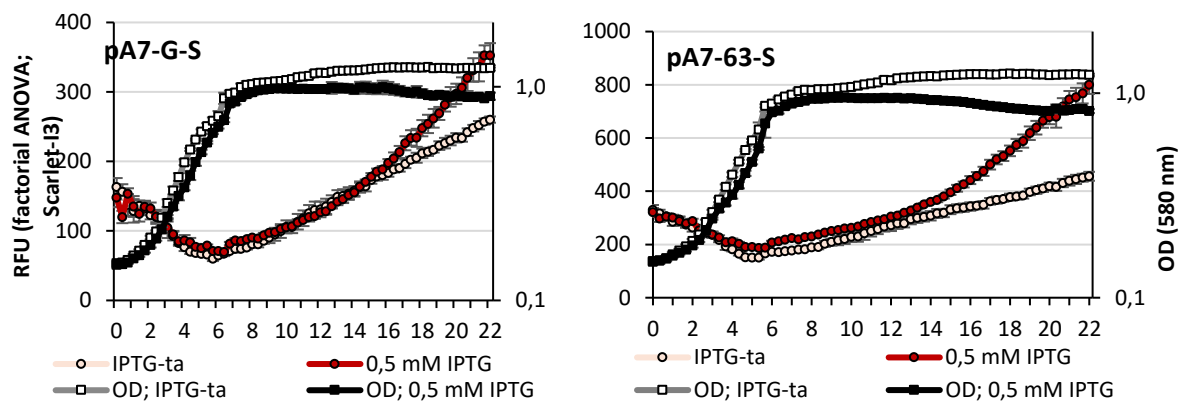


(c)



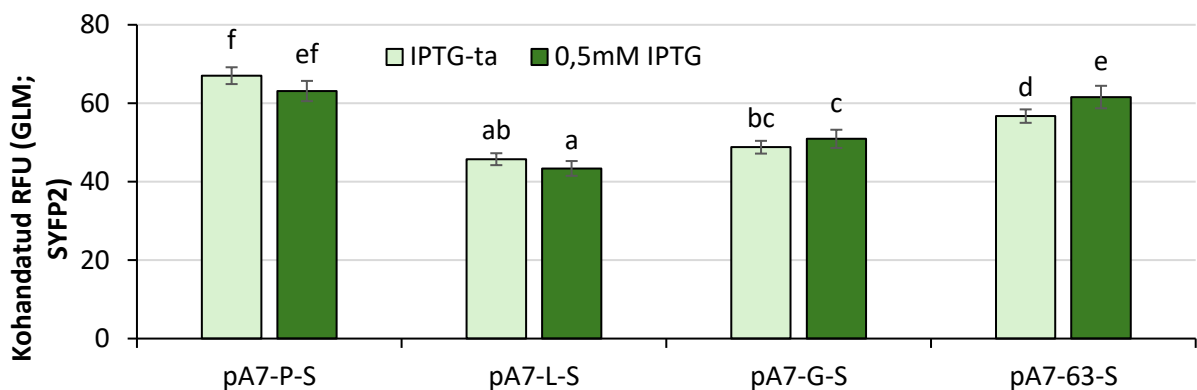
(d)

(e)

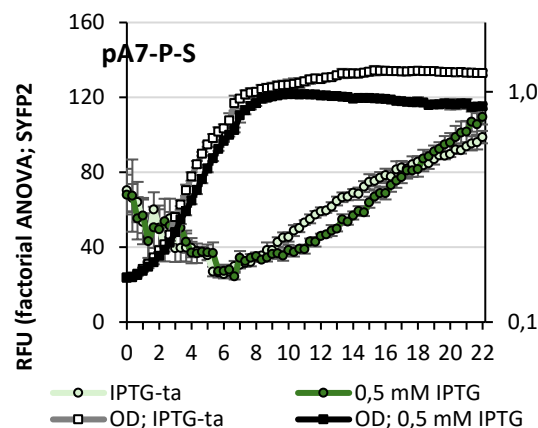


Joonis 6. *lapG* ekspressioon *P. putida* F15-s. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C. *Fis*-i ekspressiooniks kasutati 0,5 mM IPTG, kontrollvariandil IPTG-d sööttesse ei lisatud. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tihenduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (roosa ja punane joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 8. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*). Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeldestiga homogeensusgrupid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$.

(a)

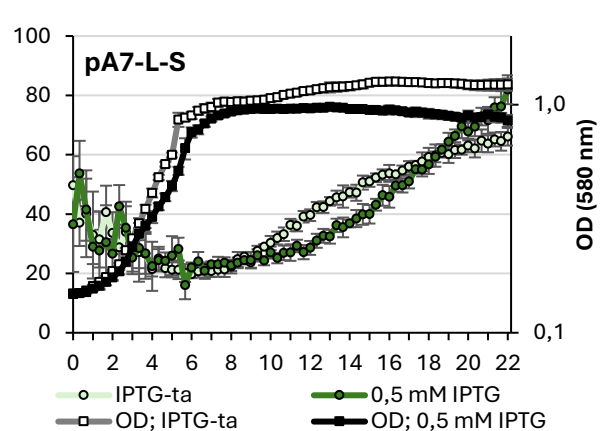


(b)

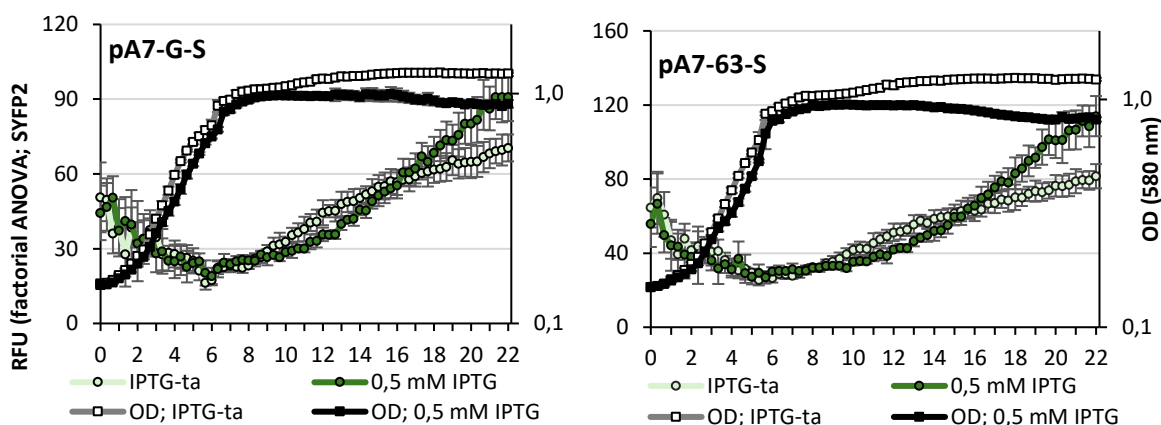


(d)

(c)



(e)



Joonis 7. PP_0163 ekspressioon *P. putida* F15-s. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C. *Fis*-i ekspressiooniks kasutati 0,5 mM IPTG, kontrollvariandil IPTG-d söötmesse ei lisatud. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tiheduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (hele- ja tumeroheline joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 8. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*). Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeltestiga homogeensusgrupid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$.

Tähelepanuväärne on see, et 0,5 mM IPTG lisamisel söötmesse langes rakkutihedus märgatavalt (joonis 6), mis viitab kõrgema koopiaarvuga reporterplasmidi koormavale mõjule rakkudele, mis omakorda võib põhjustada valetulemusi.

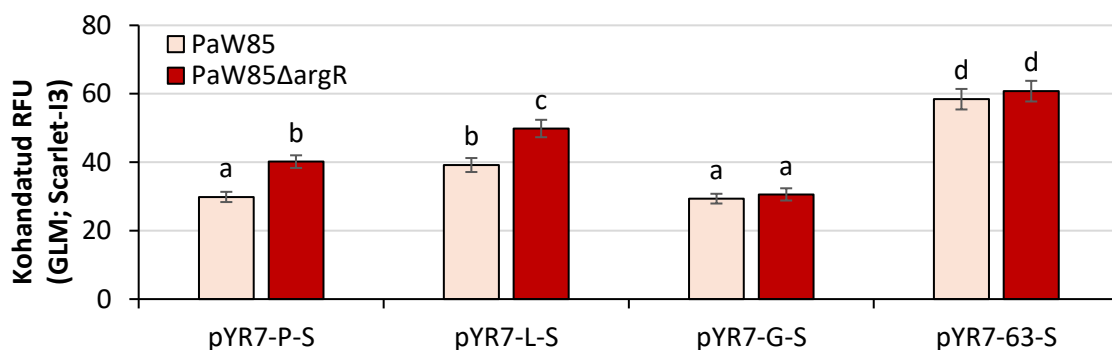
Hinnates pA7 konstruktidega PP_0163 ekspressiooni ilmneb, et geeni repressioon IPTG lisamisel pole enam nii ilmselge (Joonis 7). Kuigi umbes 10 – 16 tunnini on PP_0163 repressioon IPTG lisamisega näha (võrrelduna IPTG-ta variantidega), siis IPTG lisamisel söötmesse tõusis rakkude fluorestsents alates 18-st tunnist (Joonis 7). Sellest johtuvalt on ka GLM abil leitud kohandatud pigem sarnased IPTG-ga ja IPTG-ta variantide vahel (joonis 7a).

Kuna *P. putida* biofilmi teke ja areng ei ole lõpuni uuritud, siis võib eeldada, et samad regulaatorid mõjutavad biofilmi moodustumisel oluliste geenide ekspressiooni. Seetõttu kontrolliti võimalust, et PP_0163-*lapG* promootoralalt võiks transkriptsiooni reguleerida erinevad transkriptsiooniregulaatorid nagu ArgR, mille osalust *lapF* transkriptsiooni regulatsioonis on varasemalt kirjeldatud (Barrientos-Moreno et al., 2022). Kuigi *in silico* leiti võimalikud seondumisjärjestused ainult Fis-le ja OxyR-le, otsustati uurida katseliselt ka ArgR mõju *lapG* ja PP_0163 transkriptsioonile. Sellest tulenevalt konstrueeriti laboris *argR* deletsioonitüvi *P. putida* tüvi PaW85 Δ *argR* ning hinnati geenide ekspressiooni deletanttüves võrrelduna metsiktüvega PaW85.

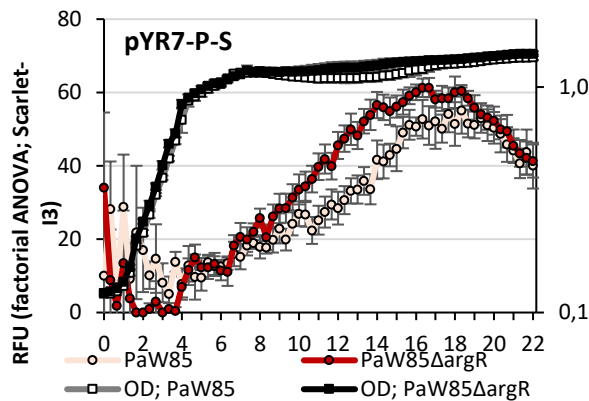
Katsest selgus, et pYR7 konstruktidega rakkude kasvu LB-s arginiinist sõltuva regulaatori ArgR puudumine või juuresolek ei mõjutanud olulisel määral rakkude kasvu (joonis 8). Esmalt torkab

silma, et *lapG* ekspressioon on kasvufaasist sõltuv, langedes statsionaarses faasis (vt PaW85 fluorestsentsi joonisel 8). Samas, *lapG* ekspressioon näib olevat ArgR-st negatiivselt sõltuv, sest ArgR-i puudumisel on pYR7-P-S ja pYR7-L-S plasmiididega PaW85 Δ argR fluorestsents suurem kui selle olemasolul PaW85-s ($p < 0,01$, Joonis 8a, b ja c). Kui kasutati pYR7-G-S ja pYR-63-S konstrukte, siis nii mõlemad tüved fluorestseerusid sarnaselt (Joonis 8a, d ja e). Kuid PP_0163 ekspressioon on LB-s *P. putida*'t kasvatades pidurdub statsionaarses faasis, kuid ei lange nagu *lapG*-l ning on ArgR-st sõltumatu (joonis 9).

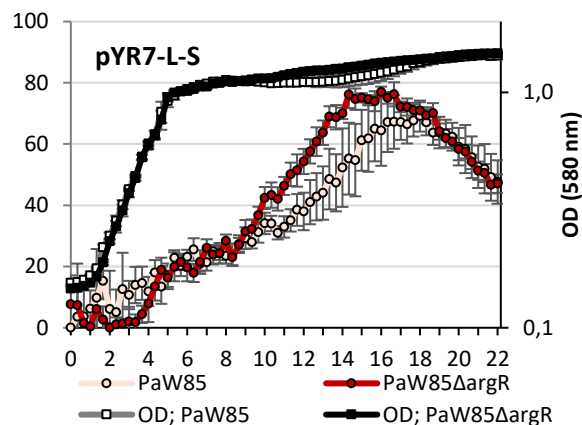
(a)

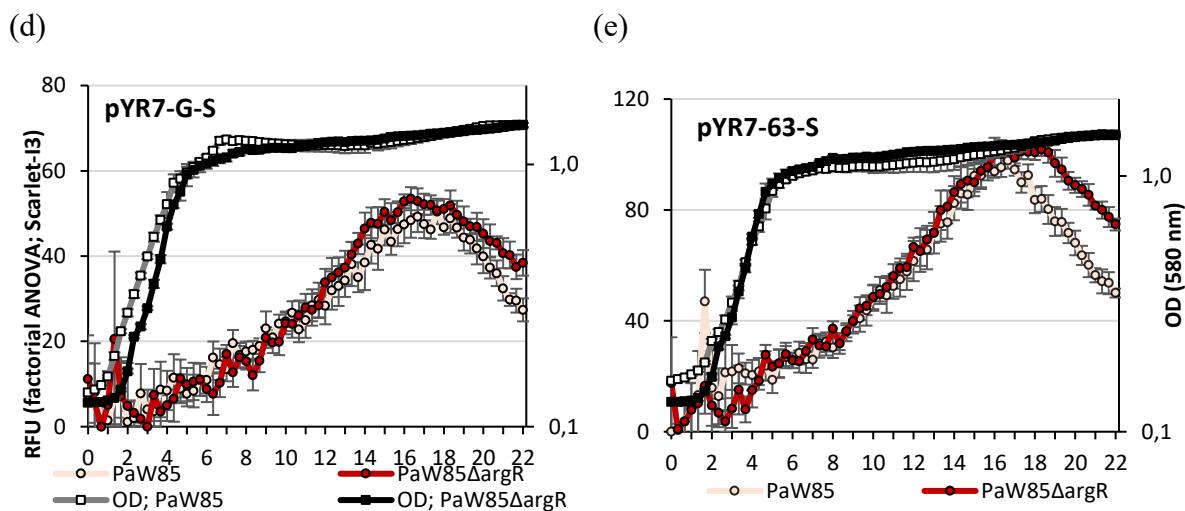


(b)

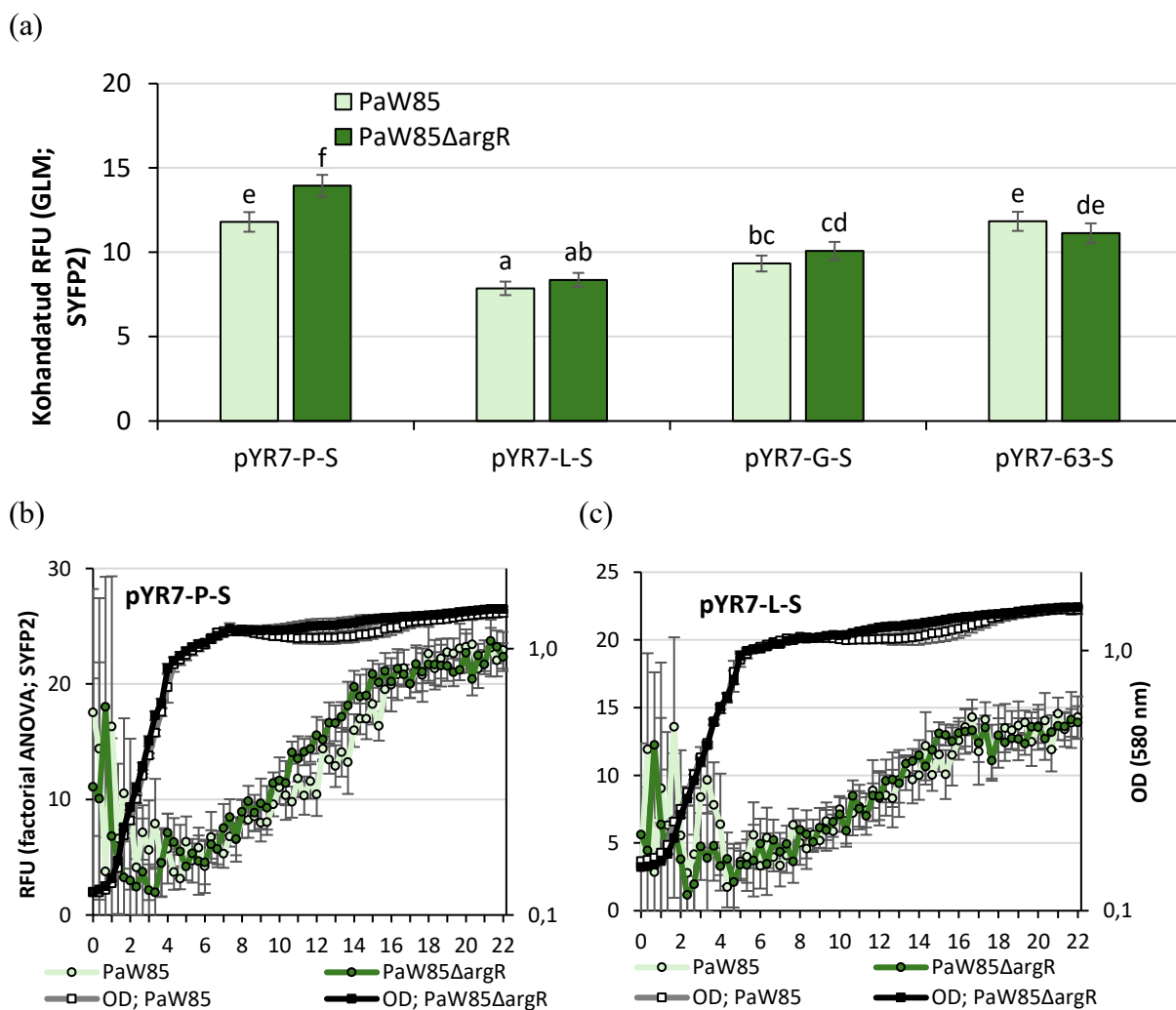


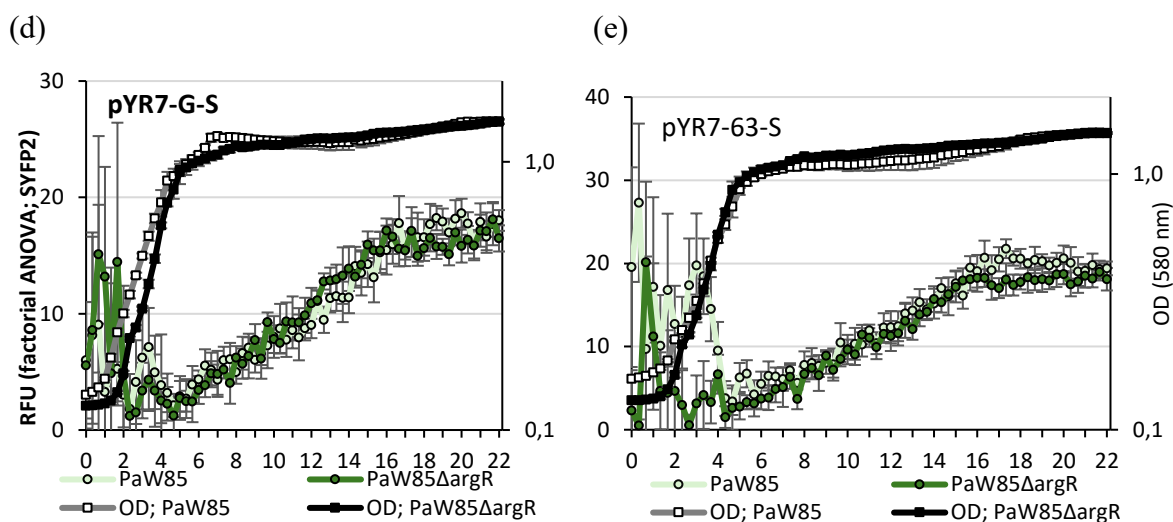
(c)





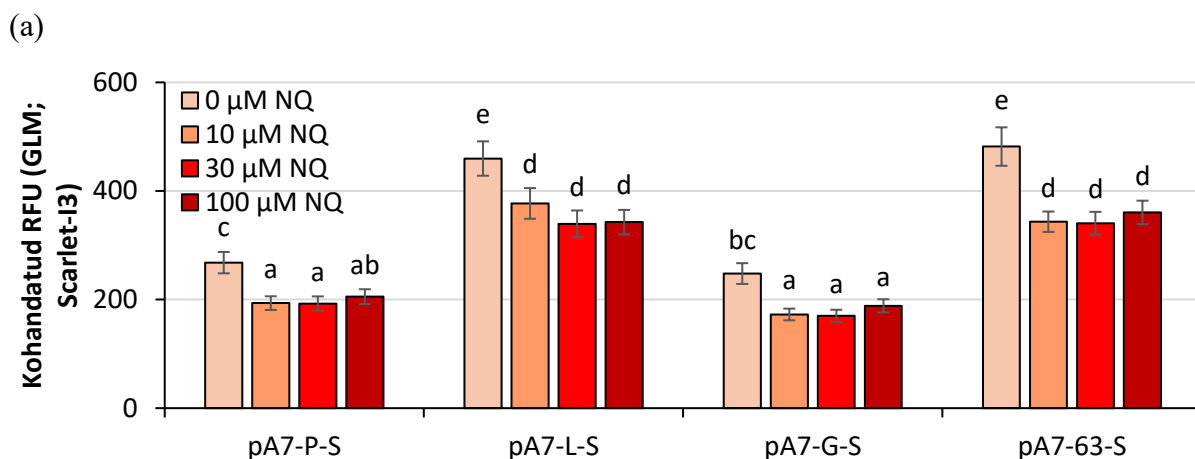
Joonis 8. *lapG* ekspressioon *P. putida* PaW85-s ja PaW85ΔargR-s. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tiheduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (roosa ja punane joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 4. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*), kasutades 6-16h andmeid. Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeltestiga homogeensusgrupid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$.

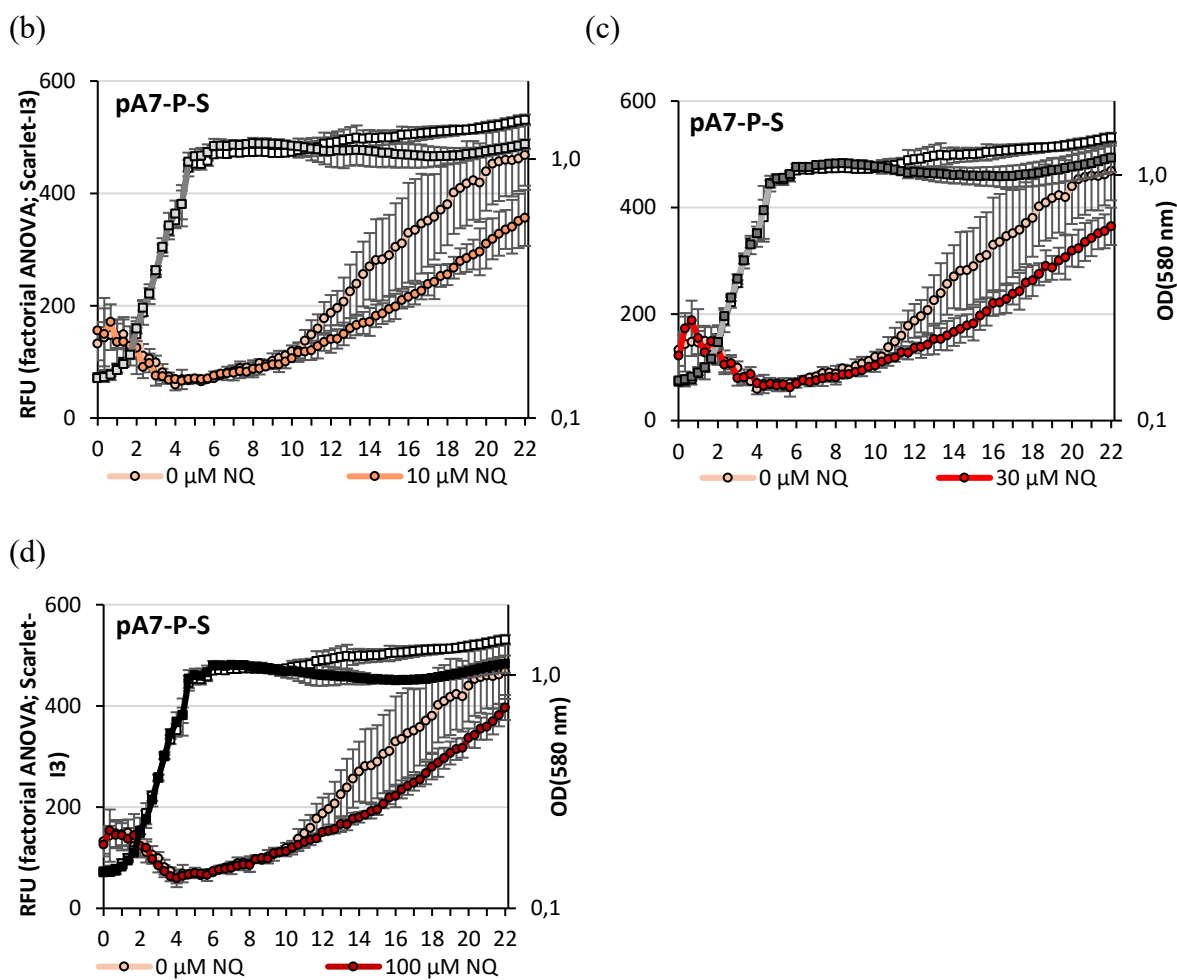




Joonis 9. PP_0163 ekspressioon *P. putida* PaW85-s ja PaW85ΔargR-s. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tiheduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (hele- ja tumeroheline joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 4. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*). Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeldustega homogeensusgrupid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$.

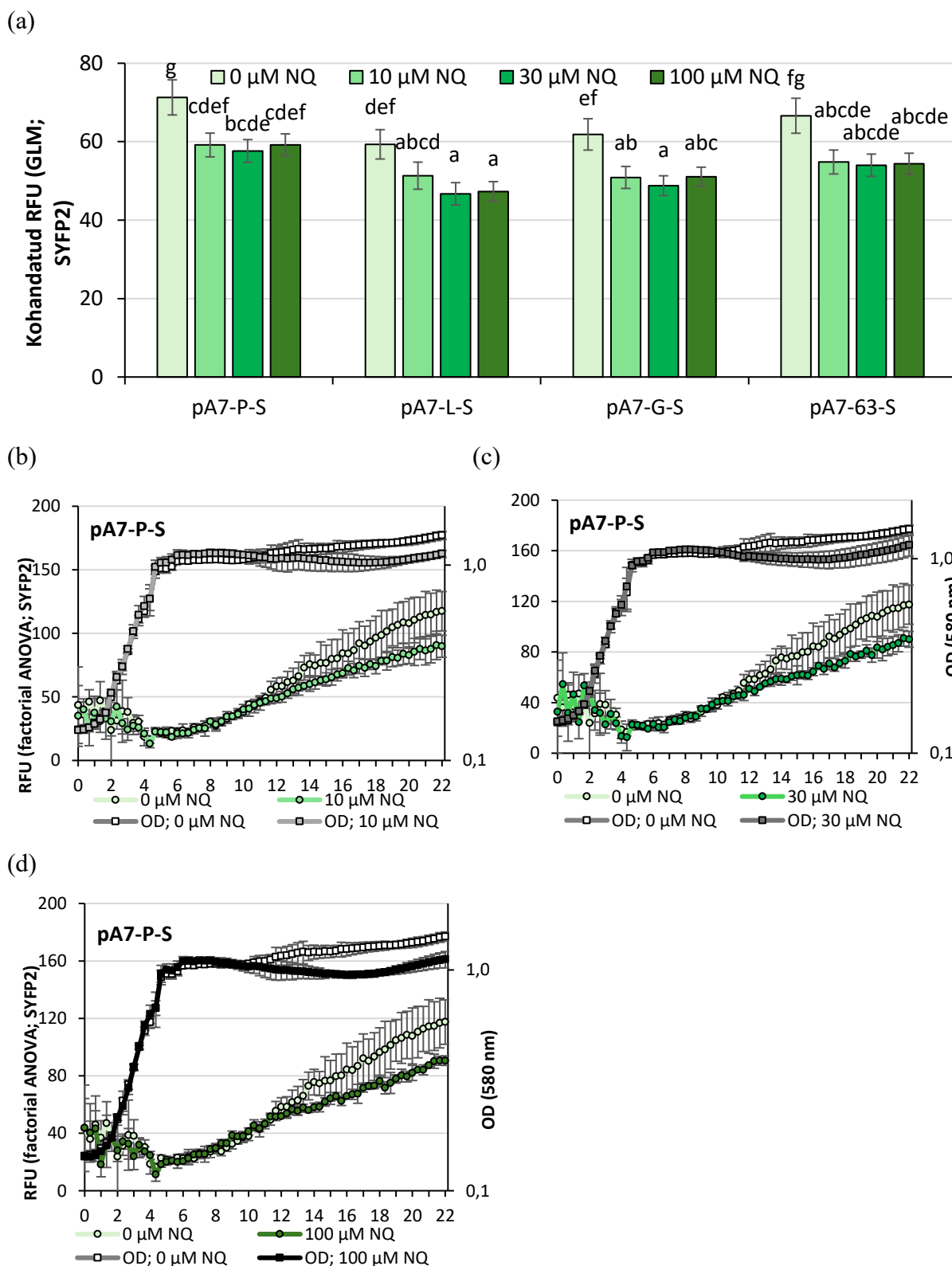
In silico ennustatud tulemuste järgi on *lapG*-s OxyR seondumisjärjestus (Tabel 4, Joonis 2), mis võiks aidata bakteril reageerida oksüdatiivsele stressile. Kuigi OxyR peamiseks aktiveerijaks on H₂O₂, siis võib ka muude ühendite, nagu nitrokinoliin (NQ), kasutamine viia rakus läbi vaheühendite H₂O₂ tekkeni. (Bojanovič jt., 2017; Christman jt., 1989; Hishinuma jt., 2006)





Joonis 10. *lapG* ekspressioon *P. putida* PaW85-s erinevate NQ kontsentratsioonide juuresolekul. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C, kuuendal tunnil lisati mikrotiiterplaadi kannudesse NQ. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tiheduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (roosa ja punane joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 4. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*). Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeltestiga homogeensusgrupid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$. Näitlikustamiseks on välja toodud ainult täispikk konstrukt.

Katsetest selgus, et nitrokinoliini lisamisel söötmesse vähenes *P. putida* PaW85 rakkude punane fluorestsents (Scarlet-I3), olenemata rakus olevast konstruktist, mis viitaks *lapG* ekspressiooni vähenemisele (joonis 10a, 10b ja 10c). Rakkude kollane fluorestsents (SYFP2), millega kontrolliti PP_0163 ekspressiooni, langes täispika konstrukti pA7-P-S ($p < 0,01$; joonis 11a, 11b, 11c, 11d), pA7-G-S ($p < 0,01$; joonis 11a) ja pA7-63-S ($p < 0,01$; joonis 11a) korral ka juba 10 μM kontsentratsiooni NQ lisamisest, kuid ainult *lapG*-PP_0163 vaheala hõlmava pA7-L-S korral toimus fluorestsentsi langus alates 30 μM kontsentratsiooni NQ lisamisest ($p < 0,01$; joonis 11a).



Joonis 11. PP_0163 ekspressioon *P. putida* PaW85-s erinevate NQ kontsentratsioonide juuresolekul. Rakke kasvatati LB + Pn söötmes mikrotiiterplaadil 22 tundi temperatuuril 30 °C, kuundal tunnil lisati mikrotiiterplaadi kannudesse NQ. Joonistel on toodud aritmeetilised optilise tihenduse (580 nm; hallid ja mustad jooned) ja rakkude fluorestsentsi (hele- ja tumeroheline joon) keskmised 95% usalduspiiridega. Bioloogiliste paralleelide arv (n) = 4. a osa analüüsimiseks on kasutatatud GLM-i (*general linear model*). Peale GLM analüüsi määrati Bonferroni järeltestiga homogeensusgruppid, kui tulpadel on samad tähed, siis $p > 0,05$. Näitlikustamiseks on välja toodud ainult täispikk konstrukt.

ARUTELU

Antud töö eesmärgiks on täpsustada biofilmis osaleva *lapG* ekspressiooni regulatsiooni. Kuna *lapG* jagab promootorala tema vastasgeeni PP_0163-ga, siis töös on uuritud kahe geeni ekspressiooni regulatsiooni korraga.

Töö on esimene etapp keeruka regulatsioonivõrgustiku lahtiharutamiseks, sest võimalusi regulatsiooniks on palju. Töös keskendutakse ennekõike küsimustele, kus on geenide promootorid, kas need mõjutavad vastastikku geeni ekspressiooni ning lähtudes *in silico* ennustustest, uuritakse leitud faktorite mõju geenide ekspressioonile.

Selles töös on kasutatud uut reporterplasmidi pA7 ja pYR7 (Tabel 1, Lisa 1 ja 2), mis võimaldab mõõta transkriptsiooni muutusi just sellistelt promootoraladelt nagu on PP_0163-*lapG* geenide vahel – vastassuunaliste geenide võimalikud promootorid asuvad suhteliselt lühikesel geenidevahelisel alal (626 nt) või vastasgeenis. Sellest johtuvalt on võimalik, et esimese geeni mRNA on 5' otsas komplementaarne teise geeni mRNAga ning toimub translatsiooni vaigistamine ehk geeniekspressiooni alla reguleerimine, mis peaks olema jälgitav ka rakkude fluorestsentsi muutusena.

Eelnevalt on hinnatud *lacZ* reportersüsteemiga PP_0163-*lapG* promootorala kolme konstruktiga (Räis, 2024). Kasutati geenidevahelist DNAd, mis vastavad praeguses töös L-konstruktidele, geenidevahelist ala koos umbes 400 aluspaariga *lapG* algusest (siin G-konstrukt) või sama pikk ala PP_0163 geeni algusest (siin 63-konstrukt) (Räis, 2024, Tabel 1). Tolles töös jõuti järelduseni, et *lapG* promootor(id) asuvad geenidevahelisel alal ja PP_0163 promootorid on nii geenidevahelisel alal kui ka *lapG* geeni alguses (Räis, 2024). Uue, fluorestsentsil põhineva, reportersüsteemiga on saadud detailsemad tulemusi, sest uus reportersüsteem pole invasiivne, tänu millele saab sama bakteripopulatsiooni jälgida läbi kasvufaaside (joonis 8, vaata PaW85 (roosana märgitud) fluorestsentsi muutust). Sellest tulenevalt teame nüüd, et *lapG* ekspressioon pole konstantne, vaid langeb kui rakud on jõudnud statsionaarsesse faasi (joonis 8). Siiski, kasvufaasist sõltuvat ekspressiooni on vaja edasipidi kontrollida, sest nitrokinoliini katses, kus kasutati pA7 konstrukte PaW85 rakkudes *lapG* ekspressioon polnud selgelt kasvufaasist sõltuv (joonis 10).

Kui võrrelda täispika ja geenidevahelise alaga konstrukte PaW85 rakkudes (vastavalt pYR7-P-S ja pYR7-L-S joonisel 8), siis need tulemused on sarnased varasemate tulemustega, et täispika ja geenidevahelise DNA konstruktid annavad *lapG* puhul metsiktüves sarnase reportergeeni ekspressiooni, mis viitab promootorite asukohale ainult geenidevahelises alas (joonis 8b ja 8c). Samas, uue reportersüsteemiga kasutati ka konstrukte, mis lisaks geenidevahelisele alale hõlmas ühe või teise geeni alguse DNAd (tabel 1, joonis 2). Need konstruktid võeti kasutusele lähtuvalt hüpoteesist, et PP_0163-*lapG* geenide ekspressioon sõltub lisaks

transkriptsiooniregulaatoritele ka ekskludonist. Ekskludoni korral peaks uuritava geeni alguse DNA lisandumisel geenidevahelisele DNAle (*lapG* korral *lapG* DNA), lisanduma ka vastasgeeni promootor, millelt transkribeeritav mRNA käitub uuritava geeni suhtes *antisense*-RNAna ning uuritava geeni ekspressioon peaks langema. Uuritava geeni vastasgeeni DNA lisamisel geenidevahelisele alale (*lapG* geeni korral PP_0163 DNA) ei tohiks represserivat efekti olla. Selle asemel võib reportergeeni ekspressioon muutuda tugevamaks, sest lisanduda võib uuritava geeni promootor või regulatoorne ala, mis on vajalik transkriptsiooni aktivatsiooniks. Kirjeldatud mustri järgi käitub *lapG* ekspressioon, *lapG* alguse DNA lisamine geenidevahelisele alale (pYR7-G-S joonisel 8d) vähendab ja PP_0163 geeni alguse DNA lisamine suurendab (pYR7-63-S joonisel 8e) metsiktüve PaW85 fluorestsentsi, mis viitab võimalikule ekskludonile. PP_0163 puhul sellist efekti ei leia, pigem pYR7-G-S ja pYR7-63-S-ga PaW85 fluorestsents sarnane (joonis 9).

Kuid ainult geenide ekspressiooniks kasutatavate reportersüsteemidega ei tõesta ekskludoni, promootorite arvu ega konkreetse regulaatorite seondumiskoha olemasolu. Promootorite asukoha leidmiseks on parim viis kindlaks teha geeni mRNA 5' ots RACE meetodil. Kuid kahjuks on nii *lapG* kui ka PP_0163 mRNA 5' otsa leidmine RACE meetodil ebaõnnestunud töögrupis korduvalt, ka käesolevas töös. Kuna *lap*-geenide mRNAde 5' otsi on varem töögrupis kindlaks määratud suhteliselt kergesti (Ainelo jt., 2017; Lahesaare jt., 2014) ning välja on vahetatud ka oligonukleotiidid, mida RACE jaoks kasutatakse, siis pigem on tõenäoline, et *lapG* ja PP_0163 mRNAdele on 5' otsa määramine raskendatud DNA järjestuse tõttu, mis on geenide ees.

Välja selgitamiseks uuritavate geenide transkriptsiooni on vaja leida võimalikud transkriptsiooniregulaatorid, mis võiks geenide ekspressiooni mõjutada. Eelnevalt on teada, et PP_0163 promootor(id) on RpoS-st ja Fis-st sõltuvad, samas, *lapG* promootor(id) ei olnud (Räis, 2024). Kuna *P. putida* biofilmi teke ja areng ei ole lõpuni uuritud, siis võib eeldada, et biofilmi püsimises antagonistlikke rolle omavate LapA ja LapG geeniekspressioonid võiksid olla reguleeritud samade faktorite poolt, näiteks on *lapA* transkriptsioon mõjutatud Fis-st (Ainelo, 2018) ning ka *lapG*-PP_0163 ühiselt promootoralalt on leitud Fis-i seondumissaite (Joonis 1, Andrio Lahesaare avaldamata andmed). Uute reportersüsteemide kasutamisega selgus, et pYR7 konstruktidega (RK2 *oriV*) tulemused sarnanesid üldiselt varasematega (Puhm jt., 2022; Räis, 2024, samas praeguste tulemuste kohaselt võib eeldada, et PP_0163 alguses on Fis-st sõltuv regulatoorne ala, mis *fis*-i üleekspressiooni korral *lapG* transkriptsiooni aktiveerib (joonis 2). Aga kuna PP_0163 täpne funktsioon rakus ei ole teada (Pseudomonas Genome DB andmetel on tegu hüpoteetilise transkriptsiooni regulaatoriga, www.pseudomonas.com), siis ei

saa kindlalt väita, et saadud tulemused on täielikult seotud Fis-i ülehulgaga rakus ja selle otsese mõjuga *lapG* transkriptsioonile.

pA7 konstruktid korral oli reportersüsteemiga tulemuste hindamine *P. putida* F15-s problemaatiline, kuna pA7 konstruktid koormasid rakke tugevalt, mistõttu saadud tulemused tuleks pigem kõrvale heita (joonised 6, 7, 10 ja 11). Samas on meie töögrupis varasemalt uuritud nõrkade promootorite transkriptsiooni sõltuvust F15-s ning nii tugevat koormust pole täheldatud. Tõenäoliselt ilmneb keskmise koopiarvuga reportersüsteemi sobimatus geeniekspressiooni uurimiseks kombinatsioonis – *P. putida* rakkude tugev suhteline fluorestsents, milles on kunstlikult suurendatud Fis-i hulka, nagu tüves F15 (joonised 6 ja 7). Seetõttu on madala koopiarvuga reporterplasmiidide (RK2 *oriV*-ga) kasutamine eelistatud tugevate promootorite korral, mille hulka võib lugeda ka *lapG* ja PP_0163 promootoreid.

Transkriptsiooniregulaator Fis osaleb promootoralalt transkriptsiooni regulatsioonis nii otseselt kui kaudselt. Fis uuritud tingimustel *lapG* geeniekspressiooni ei mõjuta (joonis 4), mis on kooskõlas ka varasemate tulemustega (Räis, 2024). Selle asemel võib transkriptsiooni reguleerimine toimuda kaudselt, kas läbi mõlema geenis asuva hüpoteetiliste Fis-i seondumisjärjestuse kaudu (Joonis 2), mis võib põhjustada DNA topoloogia muutumist, näiteks läbi aasa moodustamise, mille tulemusena on takistatud RNAP seondumine promootoriga ja transkriptsiooni initsiatsioon. Teine võimalus on intrigeerivam – *lapG* ekspressiooni mõjutab tema vastasgeeni transkriptsioon, mille tulemusena *lapG* mRNA translatsioon on inhibeeritud (joonised 4 ja 5). Võrreldes *lapG* ja PP_0163 võimalikke ekspressioonimustreid on näha, et Fis-i hulga suurenedes PP_0163 tugevneb ekspressioon ja *lapG* ekspressioon langeb samal ajal (joonised 4 ja 5; võrdle pYR7-P-S ja pYR7-G-S fluorestsentse). Kui eemaldada promootoralast *lapG* geeni lõik, ala kus võiks olla PP_0163 promootor(id), on vähenenud Fis-i positiivne mõju PP_0163 ekspressioonile ja *lapG* ekspressioon suureneb (pole sõltuv Fis-st; pYR7-L-GS) või on *fis*-i üleekspressiooni korral aktiveeritud (pYR7-63-S).

ArgR-l on LB söötmes *lapG* ekspressioonile pigem positiivne mõju ning see puudub PP_0163 (joonised 8 ja 9) kuigi *in silico* ennustuste põhjal ei tohiks *lapG*-PP_0163 ühisel promootoralal olla ühtegi ArgR seondumisjärjestust. Seniks kuni ei ole täpselt määratud ArgR seondumissait *lapG*-PP_0163 promootralal võib oletada ka, et *in silico* ennustus on õige (et ArgR seondumisjärjestus puudub) ning ArgG reguleerib *lapG* ekspressiooni kaudselt mingi teadmata faktor kaudu – sellisel juhul võiks see faktor olla *lapG* transkriptsiooni repressor ning ArgR faktor transkriptsiooni aktivaator, kuna ArgR puudumisel *lapG* ekspressioon tugevnes. LB söötme kasutamine oli alles esimene etapp, ArgR osaluse täpsustamiseks on vaja võrrelda sama reportersüsteemiga geenide ekspressiooni defineeritud söötmes, milles puudub arginiin *versus* sööde arginiiniga.

OxyR-1 on PaW85 tüves *lapG* ja ka PP_0163 ekspressioonile pigem negatiivne mõju kõikidele konstruktidele (joonised 10 ja 11). Kuna OxyR-1 oli *in silico* ennustuste järgi *lapG*-PP_0163 promootoralas seondumisjärjestus olemas, siis tasuks kindlasti edasi uurida pYR7 konstruktidega, kuidas mõjutab OxyR puudumine *lapG* ja PP_0163 transkriptsiooni, kui potentsiaalne OxyR seondumisjärjestus on promootoralal muteeritud.

KOKKUVÕTE

LapG on oluline osa biofilmi regulatsioonis, täpsemalt sellest väljumiseks. Valgu LapG puhul on uuritud posttranslatsioonilist regulatsiooni, kuid vähem on uuritud *lapG* transkriptsiooni regulatsiooni. Lisaks pole seni ajani palju infot *lapG* transkriptsiooni mõjutavate faktorite kohta. Samamoodi vähe on uuritud *lapG* vastasgeeni PP_0163. Sellepärast vaadati käesolevas töös nende geenide transkriptsiooni regulatsiooni transkriptsioonifaktorite Fis, OxyR ja ArgR kaudu. Selleks kasutati fluorestseeruvate valkudega reportersüsteeme, mis võimaldasid saada aimu *lapG* ja PP_0163 ekspressiooni kohta erinevates kasvufaasides.

Töö tulemused on järgmised:

- Fis mõjutab nii *lapG* kui ka PP_0163 transkriptsiooni
- ArgR võib mõjutada *lapG* ekspressiooni
- *lapG* ekspressioon sõltub kasvufaasist ja arvatavasti vastasgeeni transkriptsioonist
- Reporterplasmid pYR7 sobib tugevate promootorite uurimiseks ja pA7 nõrkade promootorite uurimiseks

Regulation of gene *lapG* expression in *Pseudomonas putida*

Gea Maris Räs

SUMMARY

LapG is an important part of biofilm regulation, specifically in biofilm dispersal. In the case of the protein LapG, posttranslational regulation has been well-researched, but less is known about the transcriptional regulation of *lapG*. In addition, there is not much information about the factors affecting *lapG* transcription. Similarly, little has been studied about the *lapG* adjacent divergent gene PP_0163. Therefore, the possible transcriptional regulation of these genes via the transcription factors Fis, OxyR and ArgR was investigated. For this purpose, reporter systems with fluorescent proteins were used, which allowed us to get an idea of the expression of *lapG* and PP_0163 in different growth phases.

The results of the work are as follows:

- Transcription of *lapG* as well as PP_0163 are affected by Fis
- ArgR might have an effect on *lapG* expression
- Expression of *lapG* depends on the growth phase and probably on the transcription of the counterpart gene
- Reporterplasmid pYR7 more suitable for studying strong promoters and pA7 is more suitable for studying weak promoters

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ainelo, H. (2018). *Fis regulates Pseudomonas putida biofilm formation by controlling the expression of lapA*. Tartu.
- Ainelo, H., Lahesaare, A., Teppo, A., Kivisaar, M., & Teras, R. (2017). The promoter region of *lapA* and its transcriptional regulation by *Fis* in *Pseudomonas putida*. *PLoS One*, 12(9), e0185482.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjørn, S. P., Givskov, M., & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 64(6), 2240–2246.
- Ball, C. A., Osuna, R., Ferguson, K. C., & Johnson, R. C. (1992). Dramatic changes in *Fis* levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 174(24), 8043–8056.

- Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M. A., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2020). Arginine as an environmental and metabolic cue for cyclic diguanylate signalling and biofilm formation in *Pseudomonas putida*. *Scientific reports*, *10*(1), 13623.
- Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M. A., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2022). Role of the transcriptional regulator ArgR in the connection between arginine metabolism and c-di-GMP signaling in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(7), e00064-22.
- 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. *Molecular and General Genetics MGG*, *154*, 203–204.
- Beach, M. B., & Osuna, R. (1998). Identification and characterization of the fis operon in enteric bacteria. *Journal of bacteriology*, *180*(22), 5932–5946.
- Bernier, S. P., Ha, D.-G., Khan, W., Merritt, J. H., & O'Toole, G. A. (2011). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Research in microbiology*, *162*(7), 680–688.
- Bojanovič, K., D'Arrigo, I., & Long, K. S. (2017). Global transcriptional responses to osmotic, oxidative, and imipenem stress conditions in *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*, *83*(7), e03236-16.
- Boyd, C. D., Chatterjee, D., Sondermann, H., & O'Toole, G. A. (2012). LapG, required for modulating biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, is a calcium-dependent protease. *Journal of Bacteriology*, *194*(16), 4406–4414.
- Boyd, C. D., Smith, T. J., El-Kirat-Chatel, S., Newell, P. D., Dufrêne, Y. F., & O'Toole, G. A. (2014a). Structural features of the *Pseudomonas fluorescens* biofilm adhesin

- LapA required for LapG-dependent cleavage, biofilm formation, and cell surface localization. *Journal of bacteriology*, 196(15), 2775–2788.
- Boyd, C. D., Smith, T. J., El-Kirat-Chatel, S., Newell, P. D., Dufrêne, Y. F., & O’Toole, G. A. (2014b). Structural features of the *Pseudomonas fluorescens* biofilm adhesin LapA required for LapG-dependent cleavage, biofilm formation, and cell surface localization. *Journal of bacteriology*, 196(15), 2775–2788.
- Chang, W.-T., Chen, Y.-C., & Jao, C.-L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource technology*, 98(6), 1224–1230.
- Chatterjee, D., Cooley, R. B., Boyd, C. D., Mehl, R. A., O’Toole, G. A., & Sondermann, H. (2014). Mechanistic insight into the conserved allosteric regulation of periplasmic proteolysis by the signaling molecule cyclic-di-GMP. *Elife*, 3, e03650.
- Chilukoti Neeraja, C. N., Kondreddy Anil, K. A., Pallinti Purushotham, P. P., Katta Suma, K. S., Sarma, P., Moerschbacher, B., & Podile, A. (2010). *Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants*.
- Christman, M. F., Storz, G., & Ames, B. N. (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(10), 3484–3488.
- Cooley, R. B., O’Donnell, J. P., & Sondermann, H. (2016). Coincidence detection and bi-directional transmembrane signaling control a bacterial second messenger receptor. *Elife*, 5, e21848.
- Das, P., Kumar, P., Ghosh, R., Mukherjee, S., & Das, S. K. (2024). Biofilm formation and root colonization potential of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and

- their influence on *Vigna radiata* under drought stress. *Scientific Reports*, *14*(1), 10786. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66562-4>
- El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Boyd, C. D., O'Toole, G. A., & Dufrêne, Y. F. (2014). Single-cell and single-molecule analysis deciphers the localization, adhesion, and mechanics of the biofilm adhesin LapA. *ACS chemical biology*, *9*(2), 485–494.
- El-Kirat-Chatel, S., Boyd, C. D., O'Toole, G. A., & Dufrêne, Y. F. (2014). Single-molecule analysis of *Pseudomonas fluorescens* footprints. *ACS nano*, *8*(2), 1690–1698.
- Espinosa-Urgel, M., & Ramos-González, M. I. (2023). Becoming settlers: Elements and mechanisms for surface colonization by *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, *25*(9), 1575–1593.
- Farias, R. G., do Nascimento, J. A., de Souza, E. S., & da Silva, L. das G. C. (2021). Bacterial biofilms in food processing environments: Challenges and approaches for effective control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(3), 2022–2046. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12706>
- Finkel, S. E., & Johnson, R. C. (1992). The Fis protein: It's not just for DNA inversion anymore. *Molecular microbiology*, *6*(22), 3257–3265.
- Gadella Jr, T. W., Van Weeren, L., Stouthamer, J., Hink, M. A., Wolters, A. H., Giepmans, B. N., Aumonier, S., Dupuy, J., & Royant, A. (2023). mScarlet3: A brilliant and fast-maturing red fluorescent protein. *Nature methods*, *20*(4), 541–545.
- Gu, X., Jennings, J. D., Snarr, J., Chaudhary, V., Pollard, J. E., & Savage, P. B. (2013). Optimization of ceragenins for prevention of bacterial colonization of hydrogel contact lenses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *54*(8), 5302–5309. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12378>

- Heim, R., Prasher, D. C., & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(26), 12501–12504.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12501>
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L., & O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular microbiology*, *49*(4), 905–918.
- Hinsa, S. M., & O'Toole, G. A. (2006). Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: A role for LapD. *Microbiology*, *152*(5), 1375–1383.
- Hishinuma, S., Yuki, M., Fujimura, M., & Fukumori, F. (2006). OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, *8*(12), 2115–2124.
- Ivanov, I. E., Boyd, C. D., Newell, P. D., Schwartz, M. E., Turnbull, L., Johnson, M. S., Whitchurch, C. B., O'Toole, G. A., & Camesano, T. A. (2012). Atomic force and super-resolution microscopy support a role for LapA as a cell-surface biofilm adhesin of *Pseudomonas fluorescens*. *Research in microbiology*, *163*(9–10), 685–691.
- Jakovleva, J., Teppo, A., Velts, A., Saumaa, S., Moor, H., Kivisaar, M., & Teras, R. (2012). Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology*, *158*(3), 708–720.
- Kirisits, M. J., & Parsek, M. R. (2006). Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cellular microbiology*, *8*(12), 1841–1849.

- Koch, C., Vandekerckhove, J., & Kahmann, R. (1988). Escherichia coli host factor for site-specific DNA inversion: Cloning and characterization of the fis gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(12), 4237–4241.
- Kremers, G.-J., Goedhart, J., van Munster, E. B., & Gadella, T. W. (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry*, *45*(21), 6570–6580.
- Lahesaare, A., Moor, H., Kivisaar, M., & Teras, R. (2014). Pseudomonas putida Fis binds to the lapF promoter in vitro and represses the expression of LapF. *PLoS One*, *9*(12), e115901.
- Leszczyńska, K., Michalak, M., Piasecki, T., Mroziak, W., & Mroziak, A. (2023). Emerging Strategies to Combat Biofilms in Food Processing Environments. *Antibiotics*, *14*(3), 254. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14030254>
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T., & Ausubel, F. M. (2006). An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the national academy of sciences*, *103*(8), 2833–2838.
- Lim, D. B., Oppenheim, J. D., Eckhardt, T., & Maas, W. K. (1987). Nucleotide sequence of the argR gene of Escherichia coli K-12 and isolation of its product, the arginine repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(19), 6697–6701.
- Miller, J. (1992). A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for escherichia coli and related bacteria. *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for escherichia coli and related bacteria.*, 143–149.
- Mills, R. J., Boyling, A., Cheng, T. L., Peacock, L., Savage, P. B., Tägil, M., Little, D. G., & Schindeler, A. (2020). The application of ceragenins to orthopedic surgery and

medicine. *Journal of Orthopaedic Research*, 38(9), 2065–2073.

<https://doi.org/10.1002/jor.24618>

- Moor, H., Teppo, A., Lahesaare, A., Kivisaar, M., & Teras, R. (2014). Fis overexpression enhances *Pseudomonas putida* biofilm formation by regulating the ratio of LapA and LapF. *Microbiology*, 160(12), 2681–2693.
- Mukherjee, P., Saha, S., & Majumdar, T. K. (2024). Biofilm-associated infections in hospital settings: Pathogenesis and diagnosis. *Journal of Medical Microbiology*, 73(3), 001768. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001768>
- Navarro, M. V., Newell, P. D., Krasteva, P. V., Chatterjee, D., Madden, D. R., O’Toole, G. A., & Sondermann, H. (2011). Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS biology*, 9(2), e1000588.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Newell, P. D., Boyd, C. D., Sondermann, H., & O’Toole, G. A. (2011). A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS biology*, 9(2), e1000587.
- Newell, P. D., Monds, R. D., & O’Toole, G. A. (2009). LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3461–3466.

- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, *54*(1), 49–79.
- Pakhomov, A. A., & Martynov, V. I. (2008). GFP family: Structural insights into spectral tuning. *Chemistry & biology*, *15*(8), 755–764.
- Pan, C. Q., Finkel, S. E., Cramton, S. E., Feng, J.-A., Sigman, D. S., & Johnson, R. C. (1996). Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA–protein contacts. *Journal of molecular biology*, *264*(4), 675–695.
- Passerini, L., Lam, K., Costerton, J. W., & King, E. G. (1992). Biofilms on indwelling vascular catheters. *Critical Care Medicine*, *20*(5), 665–673.
<https://doi.org/10.1097/00003246-199205000-00012>
- Puhm, M., Hendrikson, J., Kivisaar, M., & Teras, R. (2022). Pseudomonas putida biofilm depends on the vWFA-domain of LapA in peptides-containing growth medium. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11), 5898.
- Räis, G. M. (2024). *Geeni lapG transkriptsiooni regulatsioon Pseudomonas putida's* [Bachelor's thesis, Tartu Ülikool]. <https://hdl.handle.net/10062/99516>
- Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd tr). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sample, V., Newman, R. H., & Zhang, J. (2009). The structure and function of fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, *38*(10), 2852–2864.
- Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., & Cossart, P. (2013). The excludon: A new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(2), 75–82.
- Shao, Y., Feldman-Cohen, L. S., & Osuna, R. (2008). Functional characterization of the Escherichia coli Fis–DNA binding sequence. *Journal of molecular biology*, *376*(3), 771–785.

- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., & Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology*, 53(4), 1123–1134.
- Smith, T. J., Sondermann, H., & O'Toole, G. A. (2018). Type 1 does the two-step: Type 1 secretion substrates with a functional periplasmic intermediate. *Journal of Bacteriology*, 200(18), 10.1128/jb.00168-18.
- Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular microbiology*, 52(4), 917–924.
- Zaveri, M. A. & others. (2021). High expression of ring-hydroxylating dioxygenase genes ensure efficient degradation of para-toluic acid by *Comamonas testosteroni* strain 3a2. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(24), 31498–31510.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-13223-z>
- Teras, R., Jakovleva, J., & Kivisaar, M. (2009). Fis negatively affects binding of Tn 4652 transposase by out-competing IHF from the left end of Tn 4652. *Microbiology*, 155(4), 1203–1214.
- Timmis, K. N. (2002). *Pseudomonas putida*: A cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology* (Kd 4, Number 12, lk 779–781). Wiley Online Library.
- Timmis, K. N., & Ramos, J. L. (2015). *Pseudomonas putida*. *Encyclopedia of Microbiology* (3rd tr). John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
- Toledo-Arana, A., & Lasa, I. (2020). Advances in bacterial transcriptome understanding: From overlapping transcription to the excludon concept. *Molecular microbiology*, 113(3), 593–602.

- Valentini, M., & Filloux, A. (2016). Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12547–12555.
- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H.-C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances? *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 151–163.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00423.x>
- Yeung, A. T., Torfs, E. C., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R. E., & Overhage, J. (2009). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *Journal of bacteriology*, 191(18), 5592–5602.
- Yuste, L., Hervás, A. B., Canosa, I., Tobes, R., Jiménez, J. I., Nogales, J., Pérez-Pérez, M. M., Santero, E., Díaz, E., & Ramos, J.-L. (2006). Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environmental microbiology*, 8(1), 165–177.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://en.vectorbuilder.com/tool/dna-secondary-structure.html>

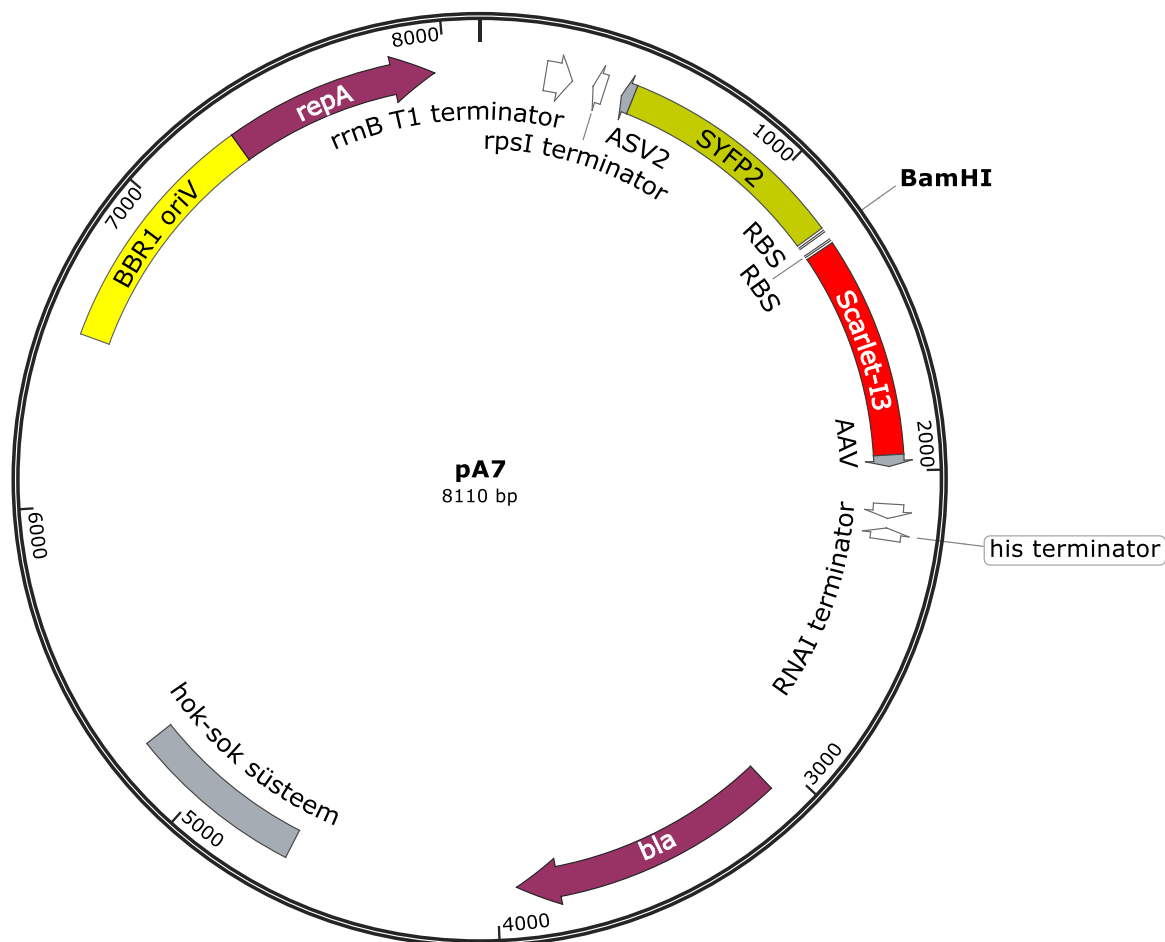
<https://www.pseudomonas.com/>

<https://regulondb.ccg.unam.mx>

LISAD

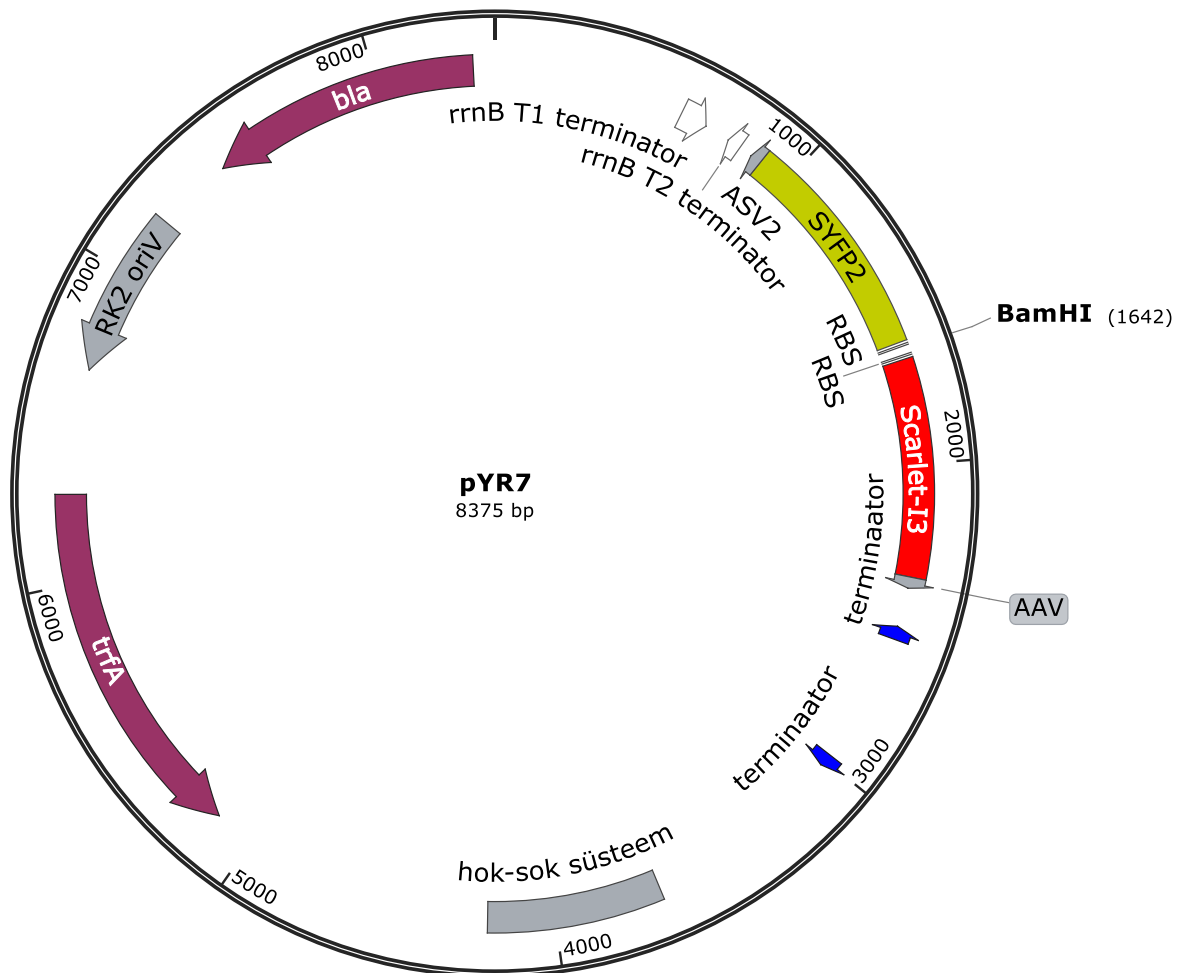
Lisa 1. Reporterplasmidi pA7 kaart (Snappgene).

Välja on toodud reporter-kassett, mis sisaldab SYFP2 ja Scarlet-I3 geene koos reporteri eluiga lühendavate täkkide ASV2 ja AAV järjestustega. Kaardil on toodud *rrnB T1*, *rpsI*, *RNAI* ja *his* transkriptsiooniterminatorid, *hok-sok* toksiin-antitoksiin süsteem, BBR1 *origin* ja replikatsiooni initsiaatorvalgu geen *repA*, lisaks on näidatud penitsilliiniresistentsust andev *bla* geen.



Lisa 2. Reporterplasmidi pYR7 kaart (Snappene).

Välja on toodud reporterkassett, mis sisaldab SYFP2 ja Scarlet-I3 gene koos reporteri eluiga lühendavate tääkide ASV2 ja AAV järjestustega. Kaardil on toodud *rrnB T1*, *rrnB T2* transkriptsiooniterminaatorid, *hok-sok* toksiin-antitoksiin süsteem, RK2 *origin* ja replikatsiooni initsiaatorvalgu geen *trfA*, lisaks on näidatud penitsilliiniresistentsust andev *bla* geen.



Lisa 3. *In silico* ennustamiseks kasutatud maatriksid (<https://regulondb.ccg.unam.mx>)

(a) OxyR

Nukleotiidide üldine esinemissagedused
A 0.203 C 0.301 G 0.300 T 0.196

MOTIF OxyR alternatiivne nimi
Nukleotiidide tõenäosusmaatriks
seondumisjärjestuste arv= 43 E= 7.6e-027

0.651163	0.023256	0.093023	0.232558
0.232558	0.162791	0.000000	0.604651
0.558140	0.209302	0.093023	0.139535
0.279070	0.093023	0.511628	0.116279
0.209302	0.162791	0.348837	0.279070
0.139535	0.232558	0.162791	0.465116
0.372093	0.209302	0.116279	0.302326
0.279070	0.139535	0.116279	0.465116
0.325581	0.023256	0.186047	0.465116
0.558140	0.046512	0.162791	0.232558
0.139535	0.465116	0.139535	0.255814
0.186047	0.674419	0.000000	0.139535
0.348837	0.069767	0.069767	0.511628
0.558140	0.116279	0.162791	0.162791
0.116279	0.000000	0.000000	0.883721
0.209302	0.372093	0.116279	0.302326
0.279070	0.093023	0.255814	0.372093
0.279070	0.325581	0.093023	0.302326
0.465116	0.046512	0.162791	0.325581

(b) Fis

Nukleotiidide üldine esinemissagedused
A 0.203 C 0.301 G 0.300 T 0.196

MOTIF Fis alternatiivne nimi
Nukleotiidide tõenäosusmaatriks:
seondumisjärjestuste arv= 228 E= 1.2e-193

0.184211	0.197368	0.096491	0.521930
0.092105	0.030702	0.798246	0.078947
0.285088	0.228070	0.232456	0.254386
0.223684	0.210526	0.175439	0.390351
0.100877	0.293860	0.184211	0.421053
0.565789	0.061404	0.280702	0.092105
0.460526	0.131579	0.074561	0.333333
0.403509	0.131579	0.122807	0.342105
0.491228	0.030702	0.070175	0.407895
0.350877	0.122807	0.114035	0.412281
0.346491	0.061404	0.118421	0.473684
0.092105	0.210526	0.048246	0.649123
0.425439	0.201754	0.228070	0.144737
0.434211	0.140351	0.228070	0.197368
0.254386	0.254386	0.276316	0.214912
0.109649	0.763158	0.030702	0.096491
0.482456	0.114035	0.206140	0.197368
0.469298	0.135965	0.171053	0.223684

(c) ArgR

Nukleotiidide taustsagedused

A 0.203 C 0.301 G 0.300 T 0.196

MOTIF ArgR alternatiivne nimi

Nukleotiidide tõenäosusmaatriks:

seondumisjärjestuste arv= 61 E= 8.4e-135

0.442623	0.114754	0.098361	0.344262
0.475410	0.098361	0.081967	0.344262
0.344262	0.196721	0.114754	0.344262
0.065574	0.180328	0.065574	0.688525
0.081967	0.065574	0.819672	0.032787
0.491803	0.360656	0.147541	0.000000
0.721311	0.065574	0.098361	0.114754
0.098361	0.049180	0.016393	0.836066
0.557377	0.016393	0.131148	0.295082
0.459016	0.032787	0.016393	0.491803
0.245902	0.081967	0.016393	0.655738
0.327869	0.196721	0.000000	0.475410
0.901639	0.000000	0.016393	0.081967
0.081967	0.065574	0.000000	0.852459
0.098361	0.016393	0.393443	0.491803
0.016393	0.885246	0.016393	0.081967
0.754098	0.081967	0.049180	0.114754
0.180328	0.262295	0.163934	0.393443
0.360656	0.147541	0.032787	0.459016
0.327869	0.131148	0.114754	0.426230

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Gea Maris Räis,

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

***Pseudomonas putida* geeni *lapG* ekspressiooni regulatsioon**

mille juhendaja(d) on PhD Riho Teras ja MSc Johanna Hendrikson,

- reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi 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.

Gea Maris Räis
29.05.2025