

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

Geeni *lapG* transkriptsiooni regulatsioon *Pseudomonas putida*'s

Bakalaureusetöö

12 EAP

Gea Maris Räis

Juhendajad

PhD Riho Teras

MSc Johanna Hendrikson

TARTU 2024

Geeni *lapG* transkriptsiooni regulatsioon *Pseudomonas putida*'s

Käesolevas töös uuritakse *Pseudomonas putida* geeni *lapG* ning PP_0163 transkriptsiooni regulatsiooni sõltuvust sigmafaktorist RpoS, globaalsest regulaatorist Fis ja keskkonnas olevast fosforist. *P. putida* on risosfäärne bakter, mis eelistab elada biofilmina taimejuurtel, kuna seal on rohkem toitaineid, kui risosfäärist kaugemal 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 *lapG* transkriptsiooni. Käesolevas töös leiti, et *lapG* promootor(id) asub/asuvad geenidevahelisel alal ning geenil PP_0163 võib olla isegi kaks promootorit, millest üks asub geenidevahelisel alal, teine *lapG*-s.

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

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

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

In this work, the dependence of the transcriptional regulation of the *Pseudomonas putida* gene *lapG* and PP_0163 on the sigma factor RpoS, the global regulator Fis and phosphorus in the environment is investigated. *P. putida* is a rhizospheric bacterium that prefers to form biofilm on plant roots because there are more nutrients than in the bulk soil. Previously, the regulation of some *lap* genes, central genes for *P. putida* biofilm formation, like the post-transcriptional regulation of *lapA* and the transcriptional regulation of *lapE* has been studied. Posttranslational regulation has been studied for the protein LapG, but transcriptional regulation of *lapG* has been studied less. In this work, it was found that the promoter(s) of the *lapG* is/are located in the intergenic region, and the gene PP_0163 may have two promoters, one of which is located in the intergenic region, the other in the *lapG* gene.

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

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> kui mullabakter	6
1.2. Mikroorganismide biofilm inimese vaatevinklist	6
1.3. Biofilmi moodustumine ja <i>P. putida</i> LapABCEDG süsteem	7
1.4. Fosfori tähtsus biofilmi moodustumisele.....	9
1.5. Sigmafaktorid RpoD ja RpoS ning promootorite ehitus	9
1.6. Globaalne transkriptsioonifaktor Fis.....	11
2. EKSPERIMENTAALOSA	12
2.1. Töö eesmärgid.....	12
2.2. Materjal ja meetodika.....	12
2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid, bakterid, bakterite kasvatustingimused	12
2.2.2. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)	13
2.2.3. Plasmiidide valmistamine	14
2.2.4. Transformatsiooniks vajalike kompetentide valmistamine ja rakkude elektroporatsioon	16
2.2.5. Geelelektroforees	16
2.2.6. DNA sekveneerimine.....	16
2.2.7. Plasmiidse DNA eraldamine.....	17
2.2.8. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine.....	17
2.2.9. Promootorite ennustamine ja statistiline analüüs	18
2.3. Tulemused.....	19
2.4. Arutelu.....	25
KOKKUVÕTE	28
SUMMARY	29
VIITED	30
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	40
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS	41

KASUTATUD LÜHENDID

c-di-GMP – tsükliline diguanosiinmonofosfaat (ingl k *cyclic diguanosine-5'-monophosphate*)

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

Gm – gentamütsiin

Km – kanamütsiin

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

MÜ – Milleri ühik

ONPG – orto-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid

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

Sm – streptomütsiin

Tühi plasmiid – pBLKT3 plasmiid, mis ei sisalda promootoreid/promootorala reportergeeni *lacZ* ees

SISSEJUHATUS

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

Siiski, bakterite biofilmi nähakse pigem halvas valguses, nagu näiteks resistentsete haigustekitajate kujul, ning kiputakse unustama biofilmi kasulikkus põllumajanduses ja bioremediatsioonis. Oma bakalaureusetöös 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 naabergeenid, 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 lokaliseerida geenide *lapG* ja PP_0163 geenieelsed alad, mis võiks sisaldada promootoreid ning teha kindlaks võimalike promootorite sõltuvus sigmafaktorist RpoS, globaalsest regulaatorist Fis ja keskkonnas olevast fosforist.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Pseudomonas putida* kui mullabakter

Perekonna *Pseudomonas* liigid on gramnegatiivsed aeroobsed või fakultatiivsed anaeroobsed gammaproteobakterid, mida leidub nii mullas, vees kui ka õhus. Pseudomoonased on laialdaselt kasutatavad mudelorganismid, sest nad on laboritingimustes kasvatatavad ning nende genoomi on lihtne manipuleerida (Timmis, 2002). *Pseudomonas putida* KT2440 tüve genoom on umbes 6 miljoni aluspaari pikkune (Ramos-Díaz & Ramos, 1998). Kuna *P. putida*'s on mitmeid metabolismiradu, mis võimaldavad bakteril kasutada väga palju erinevaid süsinikuallikaid, näiteks glükoosi või laktaati (Valentini jt., 2014), ning isegi aromaarse tuumaga saasteaineid, näiteks bensoaati või toluaati (Nelson jt., 2002), seega on see bakter oluline uurimisobjekt seoses potentsiaaliga kasutada seda bioremedatsiooniks.

P. putida suudab mullas elada nii planktiliselt kui kinnitununa taimede juurtele (Timmis, 2002). Kinnitumine taime juurtele on eelistatud kuna taim eritab juure apikaalse meristeemi kaudu mulda bakteritele kergesti omastatavaid süsiniku- ja energiaallikaid, näiteks aminohappeid ja sahhariide, näiteks eritab maisi juur päevas umbes 2% juures olevast glükoosist mulda (Farrar jt., 2003), ning loob sellega bakterile sobiva elu- ja kasvukeskkonna (Dennis jt., 2010). Samas, olles taime juurel ning moodustades sinna biofilmi, konkureerib *P. putida* teiste bakterite ja taimepatogeenidega ja kaitseb seeläbi taime (Weller, 1988). Sellest johtuvalt on *P. putida* oluline ka põllumajanduslikult kui kultuurtaimede patogeenide antagonist.

1.2. Mikroorganismide biofilm inimese vaatevinklist

Biofilm on biootilistele ja abiootilistele pindadele kinnitunud maatriksiga ümbritsetud mikroobikooslused, mis võivad olla inimesele nii kasulikud kui kahjulikud (Wingender jt., 1999). Patogeensete bakterite biofilm on tõsine probleem meditsiinis, sest see põhjustab kroonilisi infektsioone, mida on keeruline ravida. Lisaks patogeenste bakterite kinnitumine meditsiinis kasutatavatele pindadele ja tööriistadele, proteesidele ja implantaatidele suurendab infektsioonide püsimist ja bakterite levikut (Passerini jt., 1992). Seetõttu otsitakse aktiivselt materjale, millele bakterid ei saaks hästi kinnituda. Biofilmis olevad mikroobid on vastupidavamad antibiootikumidele ning kasutatavatele puhastusvahenditele, mis on üks peamisi põhjuseid, miks kroonilised infektsioonid on raskesti ravitavad (K. Smith & Hunter, 2008), nagu näiteks tsüstilist fibroosi põdevate inimeste puhul *Pseudomonas aeruginosa* põhjustatud kopsupõletik (Lyczak jt., 2002). Zolini jt 2018. aasta uuringus suri respiratoorsete haiguste tagajärjel 57% uuringus olnud inimestest, millest 41,4% oli *P. aeruginosa* põhjustatud (Zolin jt., 2018). Teise näitena võib välja tuua igapäevaelus tuntud hambakatu, millest võib

halva suuhügeeni korral areneda paradontiit (*Fusobacterium nucleatum*'i põhjustatud) (Jamal jt., 2018). Samuti võib biofilm tekkida ka joogiveega seotud pindadele, mis muutub tarbijatele ohtlikuks siis, kui tekkinud biofilmi kinnituvad patogeeneid, oportunistlikud bakterid, viirused (rotaviirus, adenoviirus), parasiitsed algloomad nagu *Cryptosporidium parvum* (Wingender & Flemming, 2011).

Samal ajal on biofilm kasulik põllumajanduses, kus biofilmi moodustanud bakterid võivad aidata taimi kaitsta patogeeneid eest. Näiteks harilikul müürloogal (lad k. *Arabidopsis thaliana*) hoida ära *Botrytis cinerea* põhjustatud haigusi (esineb marjakultuuridel hallhallitusena) või *Aspergillus niger*'i põhjustatud juuremädanikku (Asari, 2015; Haggag & Timmusk, 2008). Samuti saab biofilmi kasutada biotervenduse eesmärgil, et lagundada saasteaineid, näiteks fenooli, (Irankhah jt., 2019) ja ennetada korrodeerumist: merevett imiteerivas söötmes ennetas *Pseudomonas mendocina* korrodeerumist kõige edukamalt; süsinikterasest lehe massikadu vähenes 10 korda võrreldes steriilse söötmega (Jayaraman jt., 1997).

1.3. Biofilmi moodustumine ja *P. putida* LapABCEDG süsteem

Biofilm on oma funktsioonilt universaalne – tagab bakteritele homogeense keskkonna, mis aitaks bakteritel toituda, kaitseb baktereid abiootiliste ja biootiliste faktorite eest ning võimaldab bakteritel levida. Kuigi biofilmi teke, areng ja struktuur sõltub mikroorganismi liikidest, mis biofilmi moodustavad, ning keskkonnatingimustest, kus biofilm tekib, on biofilmi arenguetapid bakteritel üldiselt sarnased (Kirisits & Parsek, 2006; G. O'Toole jt., 2000; Stanley & Lazazzera, 2004).

Biofilmi moodustumise peamised etapid on järgmised:

- (i) kinnitumine (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; G. O'Toole jt., 2000; Stanley & Lazazzera, 2004)

Biofilmi moodustamiseks peab rakk esmalt kinnituma pinnale, mis võib olla nii abiootiline kui ka biootiline. Kinnitumine võib toimuda nii spetsiifiliste retseptorite abil, kui ja mittespetsiifiliselt adhesiinide abil, mis ei tunne ära spetsiifilisi ligande. Näiteks *P. aeruginosa*

kinnitub pinnale viburi abil. (G. O'Toole jt., 2000) Pinnale kinnitumise järel moodustavad bakterid mikrokolooniad, mis võib toimub eri viisidel: kas bakterite kinnitumisega teistele bakteritele (Lappin-Scott & Bass, 2001) või, nagu biofilmi mudelorganismi *P. aeruginosa* puhul on selgunud, läbi raku jagunemise (Klausen jt., 2003). Seega mikrokoloonia tekib, kas teiste bakterite kinnitumisega esmaste kinnitujate peale või esmakinnitujate paljunemise tagajärjel (G. A. O'Toole & Kolter, 1998). Biofilmi kuju (näiteks sile/kare, lame/kohev) ja seeläbi ka suurust mõjutab rakke ümbritsev maatriks, mille jaoks toodavad rakud ekstratsellulaarseid polümeerseid aineid (EPS) (Flemming & Wingender, 2010). Rakke ümbritsev maatriks kaitseb baktereid väliste mõjude eest ja aitab seeläbi bakteritel keskkonnas paremini hakkama saada (Donlan, 2002). Samas ei jää rakud alatiseks biofilmiga seotuks. Näiteks *Pseudomonas syringae* rakud võivad biofilmist lahkumiseks lahustada maatriksit (Ott jt., 2001).

P. putida'l pole kirjeldatud biofilmi moodustumiseks spetsiifiliste retseptorite olemasolu ning kinnitumine toimub peamiselt adhesiinide LapA ja ka LapF-i abil. Biofilmi formeerumist initsieerib peamiselt LapA, kuid selleks tuleb kleepvalk LapA transportida raku pinnale, (Hinsa jt., 2003; Hinsa & O'Toole, 2006; Puhm, jt., 2022). Selleks on rakus olemas I tüüpi sekretsioonisüsteem (T1SS), mis koosneb LapB, LapC ja LapE valkudest (Hinsa jt., 2003). LapE toimib LapA suhtes välismembraanse ankruna, sest LapA jääb N-terminuse kaudu LapEga seotuks (Boyd jt., 2014; El-Kirat-Chatel jt., 2014a; El-Kirat-Chatel jt., 2014b; Ivanov jt., 2012). LapA välismembraanil püsimist ja seeläbi raku biofilmis olemist kontrollivad valgud LapD ja LapG (Gjermansen jt., 2005; Hinsa jt., 2003). LapG on periplasmaatiline proteaas, mis eemaldab LapA-lt N-terminuse ning LapA eraldub keskkonda põhjustades biofilmi nõrgenemist või raku lahkumist pinnalt (Boyd jt., 2012, 2014; Newell jt., 2011; Puhm jt., 2022; T. J. Smith jt., 2018, lk 1). LapG aktiivsust reguleerib valk LapD. LapD on sukeldunud sisemembraani ning tunnetab c-di-GMP kontsentratsiooni rakus (Chatterjee jt., 2014; Cooley jt., 2016; Navarro jt., 2011; Newell jt., 2009, 2011). Kui tsütoplasmaatilise c-di-GMP kontsentratsioon on kõrge ning c-di-GMP on seondunud LapD-ga, on soodustatud LapD seondumine periplasmaatilise LapG-ga, ning viimase inaktiveerumine. Seevastu c-di-GMP madala kontsentratsiooni korral, näiteks kui rakul on toitainete puudus (Díaz-Salazar jt., 2017), ei seondu LapD LapG-ga ning LapG on aktiivne. (Chatterjee jt., 2012, 2014; Navarro jt., 2011; Newell jt., 2009, 2011).

P. putida $\Delta lapG$ mutant moodustab väga palju biofilmi (Díaz-Salazar jt., 2017; Puhm, jt., 2022). Samasugune biofilmi fenotüüp esineb kaltsiumi madalama kontsentratsiooni korral *Pseudomonas fluorescens*'l (Dawson jt., 2002; Tsien, 1980; Boyd jt., 2012). Katses, kus uuriti metallide olulisust LapG aktiivsusele, eemaldati Ca^{2+} -ioonid keskkonnast EGTA abil, mis

kelaadib afiinsemalt Ca^{2+} -ioone ning vähem Mg^{2+} -ioone. Kui EGTA-d sisaldavasse söötmesse lisati täiendavalt CaCl_2 , siis LapA vabanes keskkonda, millest järeldati LapG proteaasse aktiivsuse taastumine *Pseudomonas fluorescens*'il (Boyd jt., 2012). Samas, täiendava MgCl_2 lisamisel EGTA söötmesse LapA-d ei lõigatud, millest järeldati LapG inaktiivsust ja Ca^{2+} -ioonide vajalikkust LapG aktiivsuseks (Boyd jt., 2012).

Meie laboris on varem püütud kindlaks määrata *lapG* promootorite asukohta. RACE-meetodil leiti statsionaarse faasi *P. putida*'st kolm *lapG* mRNA 5' otsa (joonis 1 lk 18, Hanna Ainele avaldamata andmed). Kuid paraku kindlaks määratud 5' otsast ülesvoolu ei suudetud tuvastada võimalike promootorite järjestusi. Üheks põhjuseks võib olla see, et tuvastati rakulise nukleaasiga lõigatud mRNA 5' otsad, mis enam ei kajasta promootori(te) asukohta. Lisaks eelnevale on Andrio Lahesaare kindlaks teinud DnaasI *footprint assay*'ga, et *lapG* geenist ülesoolu asub kaks võimalikku Fis-i seondumisjärjestust (asukoht on toodud joonisel 1 lk 18; *footprint assay* tulemusi ei ole siin töös toodud). Samas, eelnevalt on uuritud transkriptsiooni regulatsiooni ainult *lapG* suunas, kuid kahe naabergeeni korraga reguleeritavust pole hinnatud.

1.4. Fosfori tähtsus biofilmi moodustumisele

Fosforil on biofilmi moodustumisel oluline roll. Kui *P. fluorescens*'i jaoks on rakus fosfori kontsentratsioon madal, siis suureneb fosfodiesterasidemeid lõhkuv *rapA* ekspressioon (Monds jt., 2007). See omakorda vähendab c-di-GMP kontsentratsiooni rakus ning seeläbi väheneb raku kinnitumine, kuna LapD ei seo LapG-d ning LapG saab raku küljest lahti lõigata kleepvalgu LapA (Newell jt., 2009). Katsetest on teada, et *P. fluorescens* kogub kinnitumisel fosforit keskkonnast rakku, mis vähendab RapA aktiivsust (Kemner jt., 2004). Samuti on fosfori vaeguse korral alla reguleeritud LapE tootmine, mis omakorda tähendab, et bakteril on vähem võimalusi LapA-ga pinnale kinnitumiseks (Monds jt., 2007).

1.5. Sigmafaktorid RpoD ja RpoS ning promootorite ehitus

Selleks, et RNA polümeraas oleks võimeline alustama transkriptsiooni, on vaja sigmafaktoreid, et moodustuks promootorit äratundev holoensüüm (Burgess jt., 1969; Fassler & Gussin, 1996). Bakterirakus on eri tüüpi sigmafaktoreid: raku eluks ja kasvuks hädavajalik koduhoidja σ^{70} (RpoD), mis on alati rakus olemas ja mille abil transkribeeritakse enamikke geene (Murakami & Darst, 2003) ja σ -faktorid, mis initseerivad transkriptsiooni spetsiifiliste (keskkonna) signaalide korral (C. Gross jt., 1998). Eri σ -faktorite kasutamine võimaldab bakteritel kohandada füsioloogiat kiiresti vastavalt keskkonnamuutustele, näiteks σ^{38} (RpoS), mis on vajalik kasvu aeglustumisel ja stressitingimustel ellu jäämiseks (Lange & Hengge-Aronis,

1991), σ^{32} (RpoH) kuumašokiga toime tulemiseks (Grossman jt., 1987), σ^{54} (RpoN) lämmastiku metabolismiks N-nälja korral (Köhler jt., 1989). Samuti on olemas eri tüüpi promootoreid (σ^{70} ja σ^S näitel): promootor, mida tunneb ära i) ainult σ^{70} ii) ainult σ^S iii) mõlemad sigmafaktorid, nii σ^{70} kui ka σ^S (Hengge-Aronis, 1999).

Sigma-faktoritel on suhteliselt tugevalt konserveerunud DNA järjestused, mida nad ära tunnevad ja millega seonduvad (Harley & Reynolds, 1987) (Tabel 1). Sigma70 perekonna sigmafaktorid, kuhu kuuluvad lisaks σ^{70} (RpoD)-le eelnevalt nimetatutest kõik peale σ^{54} , tunnevad ära ja seonduvad -10 ja -35 elementidele või nendega sarnastele elementidele (Lonetto jt., 1992). Samas ei ole RpoS-l -35 elemendil konserveerunud järjestust (Typas & Hengge, 2006; Weber jt., 2005). RpoN kuulub ainukesena σ^{54} perekonda (Gruber & Gross, 2003; Sasse-Dwight & Gralia, 1990), mis tunneb ära DNA-s -12 ja -24 elemente ning seondub neile (Merrick, 1993).

Tabel 1. Sigmafaktorite DNA seondumiskonsensused

σ^{70} perekond	Sigmafaktor	-35 element	-10 element ¹	Aluspaaride hulk elementide vahel	Allikas
	σ^{70} (RpoD)	TTGACA	TATAAT	16 – 18	(Harley & Reynolds, 1987)
	σ^S (σ^{38} /RpoS)		KCTATACTTAA²		(Typas & Hengge, 2006; Weber jt., 2005)
	σ^{32} (RpoH) ³	CTTGAAA	CCCATnT ⁴	11 – 16	(Gross, 1996)
σ^{54} perekond	Sigmafaktor	-24 element	-12 element	Aluspaaride hulk elementide vahel	Allikas
	σ^{54} (RpoN)	TGGCAC	TTGCW ⁵	5	(Merrick, 1993)

¹Tugevas kirjas on välja toodud -10 seondumisjärjestuse kõige tugevamini konserveerunud nukleotiidid

² K on T või G

³ RpoH on toodud sigma70 perekonna sigmafaktori näitena, mille konsensus on sigma70 suhteliselt erinev

⁴ n on A, T, G või C

⁵ W on A või T

1.6. Globaalne transkriptsioonifaktor Fis

Globaalset transkriptsiooniregulaatorit Fis, mis on DNA-ga seonduv ning seda painutav valk (Finkel & Johnson, 1992; Pan jt., 1996; Shao jt., 2008), on leitud *Enterobacteriaceae* ja *Pseudomonadaceae* sugukonna bakterites (Beach & Osuna, 1998; Boswell jt., 2004). *Escherichia coli*'s muutub Fis-i hulk rakus väga järsult, see suureneb mõnesajast molekulist mitmesaja tuhande molekulini varajases eksponentsiaalses kasvufaasis ning langeb suhteliselt kiiresti, kui rakud on hakanud kasvama ning paljunema. Statsionaarses kasvufaasis on Fis-i rakus jälle mõnisada molekuli (Ball jt., 1992). Ka *P. putida*'s on Fis-i hulk kõrgeim bakteripopulatsiooni eksponentsiaalses kasvufaasis ning langeb bakteripopulatsiooni statsionaarsesse faasi jõudes kaks kuni kolm korda; *P. putida*'s Fis-i hulk küll muutub, kuid mitte sellisel määral kui *E. coli*'s. (Yuste jt., 2006).

Erinevalt *E. coli* tüvedest, kus *fis* on deleteeritud (Koch jt., 1988), ei suuda pseudomonased taluda Fis valgu puudumist rakus (Liberati jt., 2006; Teras jt., 2009; Yeung jt., 2009). Meie laboris on samuti proovitud teha *fis knockout* mutante, kuid *fis* geeni deleteerimine on olnud rakkudele letaalne (Teras jt., 2009).

Olles DNA-le seonduv ja seda painutav valk, saab Fis geeni transkriptsiooni otseselt mõjutada kas negatiivselt, seondudes promootorile ja blokeerides nii RNA polümeraasi seondumiskoha (Grainger jt., 2008; Schneider jt., 1999), või positiivselt, seondudes promootori lähedale ning interakteerudes RNA polümeraasiga või soodustades RNA polümeraasi avatud kompleksi teket (Opel jt., 2004).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks on:

- kindlaks teha *Pseudomonas putida* geenide PP_0163 ja *lapG* (PP_0164) promootorite võimalikud asukohad;
- välja selgitada võimalikelt promootoritelt lähtuva transkriptsiooni sõltuvus sigmafaktorist RpoS, globaalsest regulaatorist Fis ning keskkonnas olevast fosforist.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid, bakterid, bakterite kasvatustingimused

Baktereid kasvatati LB (Luria-Bertani) söötmes (Miller, 1992) või K10T π söötmes (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,2% trüptooni, 0,15% glütserooli, 0,61 mM MgSO₄), milles on fosfaati arvutuslikult 0,14 mM (Monds jt., 2006). Tegemist on nn vähese fosfaatide sisaldusega söötmega. K10T π söötmesse lisati 2,5ml/l mikroelementide lahust (667 μ M MgO, 50 μ M CaCO₃, 40 μ M FeSO₄, 12,5 μ M MnSO₄, 12,5 μ M ZnSO₄, 2,5 μ M CuSO₄, 2,5 μ M CoSO₄, 1,9 μ M H₃BO₄), süsinikuallikana glükoosi 0,2% lõppkontsentratsiooniga ning kaaliumfosfaati (K₃PO₄) lõppkontsentratsioonidega 4,22 mM, 10,56 mM, 26,4 mM ja 66 mM. Seleksioonimarkeritena kasutati kanamütsiini (Km, 50 μ g/ml), gentamütsiini (Gm, 10 μ g/ml), streptomütsiini (Sm, 200 μ g/ml) ja X-Gal-i (0,1 μ g/ml). F15 ja PSm tüvede puhul kasutati lisaks ka 1 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG-d.

Tabel 2. Töös kasutatud bakterid 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> PaW85 Δ rpoS	PaW85 tüvi, millest on <i>rpoS</i> geen deleteeritud.	Konstrueeris Hanna Ainelu
<i>P. putida</i> F15	PaW85; mini-Tn7-term- <i>lacI</i> ^q - <i>Ptac-fis</i> -T1T2- Ω Gm kassett (Gm ^r)	(Jakovleva jt., 2012)
<i>P. putida</i> PSm	PaW85; mini-Tn7- Ω Sm kassett (Sm ^r); kontrolltüvi F15-le	(Jakovleva jt., 2012)
Plasmiid		

pBLKT3	<i>lacZ</i> -reporterplasmiid promootorite aktiivuse uurmiseks (Km ^F)	Riho Teras
pB_0164-P4s	pBLKT3 reportergeeni <i>lacZ</i> ette kloneeritud 626 nukleotiidi pikkune ala <i>lapG</i> (PP_0164) eest	Käesolev töö
pB_0164-P4	pBLKT3 reportergeeni <i>lacZ</i> ette kloneeritud 1032 nt pikkune <i>lapG</i> promootorala (626 nt geenide PP_0163 ja <i>lapG</i> vaheala ning 406 nt PP_0163 algusest)	Käesolev töö
pB_0163-P3s	pBLKT3 reportergeeni <i>lacZ</i> ette kloneeritud 626 nukleotiidi pikkune ala PP_0163 eest	Käesolev töö
pB_0163-P3	pBLKT3 reportergeeni <i>lacZ</i> ette kloneeritud 1050 ala pikkune PP_0163 promootorala (626 nt geenide PP_0163 ja <i>lapG</i> vaheala ning 424 nt <i>lapG</i> geeni algusest)	Käesolev töö

2.2.2. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

Promootorala kloneerimiseks vektorisse pBLKT3 (Tabel 2) amplifitseeriti vajaliku ala *P. putida* kromosoomist PCR-ga. PCR 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 kumbagi praimerit, 0,15 U Taq DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Ameerika Ühendriigid), mQ-vett vajaliku mahu saavutamiseks ja matriits-DNA-d. Matriits-DNA-na kasutati *P. putida* kuumutamisel (PCR-i esimene tsükkel) vabanenud DNA-d.

PCR tsüklid: 2 minutit 96 °C algseks bakterite lõhkumiseks ja DNA denatureerimiseks, 45 sekundit 96 °C DNA denatureerimiseks, 45 sekundit 58 °C praimerite matriitsile seondumiseks, 1 minut 72 °C uue DNA ahela sünteesimiseks. Kolm viimast etappi viidi läbi 25 korda. Viimase DNA ahela sünteesi järel toimus etapp 5 minutit 72 °C, et lõpetada DNA ahelate süntees.

Tabel 3. Töös kasutatud primerid

Praimeri nimi	Praimeri järjestus 5'-3' suunas	Seandumiskoht
PP_0163-II-Bgl-II	AAA <u>AGATCT</u> CCAGTGC GTTGTGATCGTC	-1032...-1014 nt <i>lapG</i> geeni algusest; suunaga <i>lapG</i> geeni poole; alla joonitud Bgl-II lõikejärjestus
PP_0163-I-Bgl-II	AAA <u>AGATCT</u> GCGACTGACGCCGTACAG	-627...-609 nt <i>lapG</i> geeni algusest; suunaga <i>lapG</i> geeni poole
PP_0164-II-Bgl-II	AAA <u>AGATCT</u> CCTTCTTGTTCCCTGCCGC	+406...+424 nt <i>lapG</i> geeni algusest; suunaga <i>PP_0163</i> geeni poole
PP_0164-I-Bgl-II	AAA <u>AGATCT</u> CAGGCTCTGCCAGGCATC	-18...-1 nt <i>lapG</i> geeni algusest; suunaga <i>PP_0163</i> geeni poole
lacZseq	GGGGATGTGCTGCAAGGCG	+94...+112 nt <i>lacZ</i> geeni algusest; suunaga <i>lacZ</i> alguse poole (pBLKT3-s)
T1T2	TGGCCTTTTTGCGTAGATC	106 – 125 nt <i>lacZ</i> geenist ülesvoolu suunaga geeni alguse poole (pBLKT3-s)
T2K	GCCAGGCATCAAATTAAGCAG	-83...-63 nt <i>lacZ</i> geeni algusest; suunaga <i>lacZ</i> poole (pBLKT3-s)
PP0164-down	GGCAAAGCCGACATAGC	-149...-133 nt <i>lapG</i> geeni algusest; suunaga <i>PP_0163</i> poole
LapGI	CTTTCGACTGGTCTGAACAG	-212...-193 nt <i>lapG</i> geeni algusest; suunaga <i>lapG</i> poole
LapGII	AGTCGCACGTCAAAGGAAG	-335...-317 nt <i>lapG</i> geeni algusest; suunaga <i>lapG</i> poole

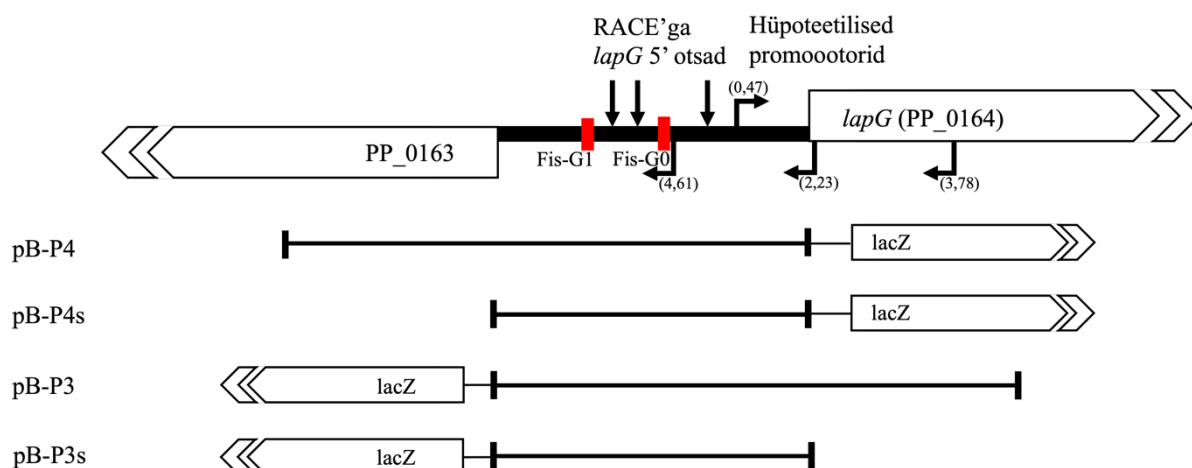
2.2.3. Plasmiidide valmistamine

Promootorite leidmiseks konstrueeriti neli plasmidi, mis sisaldasid uuritavate geenide promootoralasid reportergeeni *lacZ* ees. Reporterplasmidiks kasutati pBLKT3, mille BamHI lõikejärjestusse kloneeriti promootoralad, mille sain PCR-ga.

Vektor pBLKT3 avati restriiktaasiga BamHI ning inserteerisin sinna BglII-ga lõigatud PCR-i fragmendid. Ligeerimiseks kasutati T4 ligaasi. Konstruktide valmistamiseks (ligeerimiseks ja restriksiooniks) kasutati firma Thermo Fisher Scientific ensüüme ning protseduurid viidi läbi vastavalt firma tootejuhistele.

pB_0163-P3s saamiseks kloneeriti pBLKT3 BamHI lõikejärjestusse 626 nt pikkune PP_0163 promootorala (praimerid PP_0163-I-Bgl-II ja PP_0164-I-Bgl-II). pB_0163-P3 saamiseks kloneeriti pBLKT3 BamHI lõikejärjestusse 1050 nt pikkune PP_0163 promootorala (praimerid PP_0163-I-Bgl-II ja PP_0164-II-Bgl-II). pB_0164-P4s saamiseks kloneeriti pBLKT3 BamHI lõikejärjestusse 626 nt pikkune *lapG* promootorala (praimerid PP_0163-I-Bgl-II ja PP_0164-I-Bgl-II). pB_0164-P4 saamiseks kloneeriti pBLKT3 BamHI lõikejärjestusse 1032 nt pikkune *lapG* promootorala (praimerid PP_0163-II-Bgl-II ja PP_0164-I-Bgl-II). (Joonis 1)

Promootorala orientatsiooni kontrolliti PCR reaktsiooniga, kus kasutati praimeripaare, millest üks seondub üles amplifitseeritud alaga (vastavalt kas PP_0163-I-Bgl-II, PP_0163-II-Bgl-II, PP_0164-I-Bgl-II või PP_0164-II-Bgl-II, tabel 3) ning teine vektoriga (LacZseq, tabel 3) ning DNA korrektsust DNA sekveneerimisega.



Joonis 1. *P. putida* geenide PP_0163 ja *lapG* promootorala ja sellest valmistatud konstruktide kaart. Kaart on koostatud, et anda visuaalne ülevaade, millised PCR-produktid pBLKT3 vektorisse kloneeriti. Punaste kastidega on märgitud Fis-i 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, *lapG* ja reportergeen *lacZ*. Jämeda musta joonena PP_0163-*lapG* vaheline ala. Keskmise musta joonega reportervektoris kloneeritud uuritava geeni promootorala ning peene musta joonega reportervektori DNA.

2.2.4. Transformatsiooniks vajalike kompetentide valmistamine ja rakkude elektroporatsioon

P. putida kompetentide tegemiseks kasvatati rakke 5 ml LB vedelsöötmes 30 °C loksutis 180 rpm üleöö, millest edasiseks kasutamiseks tsentrifuugiti kokku 3 ml rakke (1 min 12100 g). Rakke pesti kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega, seejärel rakud suspendeeriti 500 µl 300 mM sahharoosilahuses ning kasutati elektroporeerimiseks samal päeval.

70 µl sahharoosilahuses olevatele kompetentsetele rakkudele lisati pool soolavaba ligaasisegu (5 µl) või 0,1 ng plasmiidset DNA-d. Rakud koos DNA-ga pipeteeriti elektroporatsiooni küveti ning poreeriti elektroporaatoriga (BioRad, Dubai, Araabia Ühendemiraadid) pingel 2500 V. Rakud pesti küvetist välja LB vedelsöötmega. Elektroporeeritud rakke kasvatati 30 °C loksutis 180 rpm 1 tund 2 ml LB-s. Seejärel tsentrifuugiti rakud põhja (1 min 12100 g) ning plaaditi LB-tardsöötmele, millele oli lisatud vajalik antibiootikum ja X-Gal.

2.2.5. Geelelektroforees

PCR produkte ja eraldatud plasmiidset DNA-d kontrolliti 1% agarosgeelil TAE puhvril (50 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 laadimispuhtrit (0,04 % broomfenool-sinise lahuse 50 % glütseroolis). Selleks, et hinnata DNA pikkust, lisati eraldi agarosgeeli hambasse Thermo Fisher Scientific ZipRuler Express suurusmarkerit 1 või 2. Agarosgeeli voolutati pingel 5 V/cm ning DNA visuliseerimiseks pildistati geeli UV- laual lainepikkusel 302 nm.

2.2.6. DNA sekveneerimine

Kloneeritud promotoraalade järjestust kontrolliti DNA sekveneerimisega. Selleks amplifitseeriti kontrollitav DNA-lõik praimeritega T2K ja LacZseq (Tabel 3) ning PCR-i produkti pikkust kontrolliti geel-elektroforeesiga. Sekveneerimiseks tehti PCR produktile Exo-Sap töötlus, et eemaldada PCR reaktsiooni käigus kasutamata jäänud praimerid ja nukleotiidid. Selleks lisati PCR segule 1 U aluselist fosfataasi ja 2,5 U ExoI-te ning töödeldi 15 minutit 37 °C juures. Reaktsiooni peatamiseks tõsteti temperatuuri 15 minutiks 80°C-ni. Edasi valmistati sekveneerimisreaktsioon lõppmahuga 10 µl, milles oli 2 µl 5x puhtrit (200 mM Tris pH 9,0, 6 mM MgCl₂), 0,7 µl BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix-i, 1 µl praimerit (1,6 pmol), 1 µl Exo-Sap töötlusega puhastatud PCR-i produkti ning mQ-vett vajaliku mahu saavutamiseks. Sekveneerimisreaktsioon sadestati 2 µl dekstraani ja 30 µl külma 96% etanooliga, hoides segu 10 min -20 °C ning tsentrifuugides 15 min. Supernatant eemaldati ning allesjäänud sadet pesti

kaks korda 70% etanooliga 5 min tsentrifuugides. Kogu etanooli eemaldamiseks hoiti PCR tuube kuni 3 min 60 °C kapis ning sade lahustati seejärel 70% formamiidis. Sekvencerimine toimus Tartu Ülikooli geneetika instituudi tuumiklaboris, tulemusi analüüsiti BioEdit ja SnapGene programmidega.

2.2.7. Plasmidse DNA eraldamine

Rakkudest plasmidse DNA eraldamiseks kasutati firma FavorGen FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit-i (Viin, Austria) ning protseduurid viidi läbi vastavalt firma tootejuhiste. DNA võeti üles 70 µl elueerimispuhvril, kontrolliti 1% agarosgeelil ning hoiustati -20 °C temperatuuril.

2.2.8. β-galaktosidaasi eraktiivsuse mõõtmine

Uuritavate promootorite aktiivsuse ja erinevatest faktoritest sõltuvuse mõõtmiseks kasutati β-galaktosidaasi eraktiivsuse mõõtmist, mille jaoks kloneeriti *lacZ* reportergeeni ette PP_0163 ja *lapG* promootoralad (Joonis 1). Rakke kasvatati 30 °C juures 18 tundi 5 ml vedelsöötmes, millele lisati kanamütsiini (lõppkontsentratsioon 1 µg/ml) loksutil aereerides (180 rpm). Fis-i mõju uurimiseks kasvatati rakke vedelsöötmes, millele lisati IPTG lõppkontsentratsiooniga 1 mM, ning võrreldi rakkudega, mis olid kasvanud IPTG-ta vedelsöötmes.

LacZ eraktiivsuse mõõtmiseks lisati 800 µl Z-puhvrile (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄ · H₂O, 10mM KCl, 1mM MgSO₄ · 7×H₂O, 0,0094mM, 10% SDS, 28 mM β-merkaptotetanooli), 50 µl kloroformi ning 20 µl üleöö kasvanud rakukultuuri. Segu segati intensiivselt vorteksil (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) 10 sekundit. Seejärel lisati 200 µl ONPG (orto-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml) lahust, mille järel segati reaktsioonisegu veelkord vorteksil. ONPG lisamisel mõõdeti reaktsiooniaeg ning reaktsioon peatati 500 µl 1 M Na₂CO₃ lahusega, kui segu oli saavutanud visuaalsel hindamisel piisavalt kollase värvuse.

Produkti hulk reaktsioonis mõõdeti spektrofotomeetriga A (neelduvus) 420 nm juures ning rakuprügi 550 nm juures. Lisaks mõõdeti üleöö kasvanud rakkude tihedus ühekordses M9-puhvril 580 nm juures. β-galaktosidaasi eraktiivsus E (Milleri ühikutes) arvutati valemiga:

$$E = \frac{1000 \times (A_{420} - 1,75 \times A_{550})}{T \times V \times A_{580}}$$

, kus A_{420} on 420 nm juures mõõdetud produkti orto-nitrofenooli neeldumine, A_{550} on 550 nm juures mõõdetud „rakuprügi“, T on reaktsiooniaeg minutites, V on reaktsioonisegusse lisatud bakterite hulk milliliitrites ning A_{580} on üleöö kasvanud rakukultuuri tihedus.

2.2.9. Promootorite ennustamine ja statistiline analüüs

Promootorite ennustamiseks *in silico* kasutati Softberry vabavara, täpsemalt BPROM (ingl. *bacterial promoter prediction program*) programmi. *Softberry* ennustab sigma 70 tüüpi promootorite esinemise võimalust (Tabel 4).

Statistiliseks analüüsiks kasutati Statistica 14.0.1.25 programmi. Katsete tulemusi analüüsiti multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. P-väärtused arvutati Bonferroni järeltestiga Statistica paketi PostHok osas.

2.3. Tulemused

Töö eesmärgiks oli leida kahe vastassuunalise orientatsiooniga geeni ühiselt promootoralalt promootoreid. Nimelt, geenide PP_0163 ja *lapG* (PP_0164) vahel olevalt 626 nt pikkuselt DNA lõigult peab transkriptsiooni initsieerima mõlemas suunas ning on võimalik, et promootorid asuvad teineteisele nii lähedal, et geenide transkriptsiooni initsiatsioon on reguleeritud samade faktorite abil. Varasemalt on töögrupis määratud *lapG* mRNA 5' otsad RACE'ga ning ennustatud *in silico* promootoreid umbes 1400 nukleotiidi pikkuselt alalt programmiga *Softberry*, kuid saadud tulemused ei langenud omavahel kokku (Joonis 1). *Softberry* ennustas *lapG*-le ühe promotoori geenidevahelise alasse ning kolm promootorit PP_0163-le, millest ühe geenidevahelisse alasse ning kaks *lapG* geeni sisse (Joonis 1, Tabel 4).

Tabel 4. σ^{70} ja σ^S konsensusjärjestused ja programmiga *Softberry* ennustatud promootorid

Geen	Promootor	Järjestus			Skoor	Positsioon geenist
		-35		-10		
	σ^{70} (RpoD)	TTGACA	N _{17(±1)}	TATAAT		
	σ^S (σ^{38} /RpoS)			TATACT		
PP_0163	P _{H3-1}	ATCACG	N ₂₀	TATACT	4,61	-337...-368
	P _{H3-2}	TTGCAA	N ₁₄	TACCCT	2,23	-643...-668
	P _{H3-3}	TTGAAG	N ₂₂	TACGCT	3,78	-973...-1006
<i>lapG</i> (PP_0164)	P _{HG-1}	TGAACA	N ₁₇	TATCCT	0,47	-171... -199

Softberry ennustatud promootorite asukohtade järgi võiks olla võimalik, et vastassuunaliste naabergeenide mRNAde 5' otsad on komplementaarsed ning võivad paarduda, mis takistab translatsiooni initsiatsiooni, samuti võib geenide ekspressioon olla reguleeritud ekskludoniga (Chia jt., 2021). Seega on *lapG* ja PP_0163 promootorite leidmine oluline ning selleks, et leida nende geenide promootoreid, kasutati *lacZ*-l põhinevat reportersüsteemi.

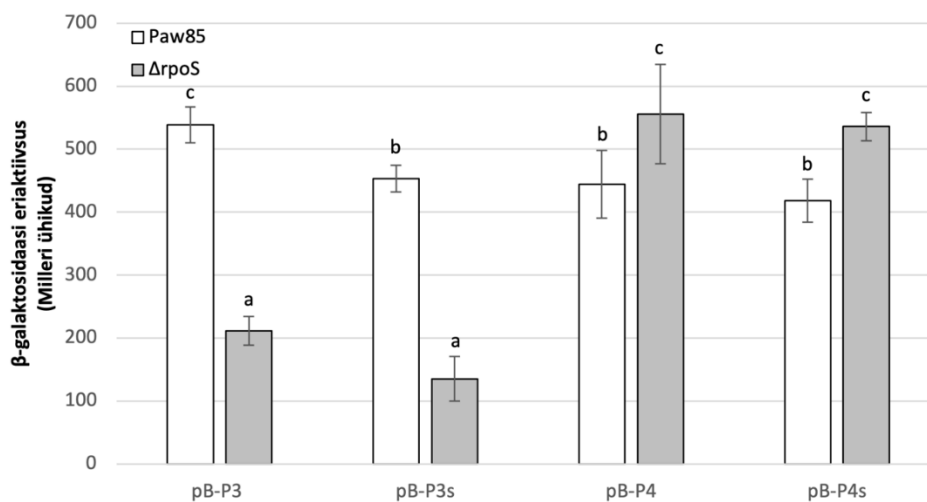
Promootoreid otsiti umbes 1000 nt pikkuselt geenile eelnevast alast, mõlema geeni puhul konstrueeriti kaks plasmidi. Üks plasmid sisaldas ainult geenidevahelist DNAd (626 nt) ning teine plasmid kätkes endas lisaks geenidevahelisele alale veel umbes 400 nt naabergeenist (Tabel 2, Joonis 1). Plasmiidid, mis sisaldasid pBLKT3-s *lacZ* geeni ees PP_0163 promootorala, tähistati pB-P3-dena ning *lapG* promootoralaga plasmiidid tähistati pB-P4-dena (Joonis 1). Kusjuures pB-P3s ja pB-P4s jaoks on kasutatud täpselt sama 626 nt pikkust DNA-

lõiku *lacZ* ees, kuid inverteeritult. (Tabel 2, Joonis 1) Võrdluseks mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsus ilma reportergeeni ees oleva promootorita pBLKT3 vektoriga rakkudest.

Esmalt taheti teada, kas võimalikud promootorid asuvad geenidevahelises alas või asub mõni promootor vahealast kaugemal, naabergeenis. Sellisel juhul peaks pikemat promootorala sisaldavad reporterplasmiidid andma rakkudes suurema LacZ eriaktiivsuse võrreldes rakkudega, mis sisaldavad *lacZ* geeni ees ainult geenidevahelist ala. Katsesest selgus, et *P. putida* metsiktüves PaW85 oli pB-P3 ja pB-P3s puhul LacZ eriaktiivsus erinev (vastavalt 539 MÜ ja 453 MÜ; $p < 0,05$). Samas ei mõjutanud *lapG* promootorala pikkus (pB-P4 ja pB-P4s) LacZ eriaktiivsust (vastavalt 444 MÜ ja 418 MÜ; Joonis 2). Seega PP_0163 puhul võib mõni promootor asuda geenidevahelisest alast väljaspool, *lapG* geeni sees. Samas, antud tingimustel paistab *lapG* (PP_0164) promootor olevat geenidevahelises alas.

Varasemalt on meie uurimisgrupis leitud, et *P. putida* moodustab biofilmi kasvuks soodsates tingimustes ning toitainete vähenemisel biofilm laguneb umbes kaks korda maksimaalsest (Moor jt., 2014). Selle põhjal võiks eeldada, et ebasoodsate keskkonnatingimuste tõttu lõikab LapG proteolüütiliselt LapA N-domeeni ning LapA vabaneb välismembraanist keskkonda, mis päädib biofilmi lagunemisega. Seetõttu sai järgmisena uuritud võimalust, et mõni *lapG* või naabergeeni PP_0163 promootor on sõltuv üldisest statsionaarse faasi sigmafaktorist RpoS. Kui promootori tunneb ära RpoS, kuid mitte RpoD, siis rakkudes, milles *rpoS* on deleteeritud, väheneb LacZ eriaktiivsus võrreldes metsiktüvega. Selleks mõõdeti LacZ eriaktiivsust kahes *P. putida* tüves: metsiktüves PaW85 ja PaW85 Δ rpoS-s, millesse oli viidud vastavad reporterplasmiidid uuritava promootorilaga (Joonis 2).

Geenide promootorid on erineva sõltuvusega RpoS-st. PP_0163 promootorilaga plasmiidide korral on LacZ eriaktiivsus *P. putida* tüves PaW85 Δ rpoS madalam kui metsiktüves PaW85 (pB-P3 puhul 211 MÜ ja pB-P3s 135 MÜ; $p < 0,05$), mis viitab promootori(te) sõltuvusele RpoS-st. Samas, *lapG* promootoriladega plasmiidide korral on LacZ eriaktiivsus just kõrgem tüves PaW85 Δ rpoS, mitte PaW85 (pB-P4 puhul 556 MÜ ja pB-P4s 536 MÜ; $p < 0,05$), mis viitab RpoS-sõltumatutele promootoritele, kuid samas keerukamale regulatsioonile. Negatiivse kontrolli jaoks mõõdeti LacZ eriaktiivsus kontrollplasmiidiga pBLKT3, milles puudus reportergeeni ees promootorala. PaW85 tüves oli see 2,8 (SH \pm 0,23) MÜ ja PaW85 Δ rpoS tüves 2,3 (SH \pm 0,25) MÜ.



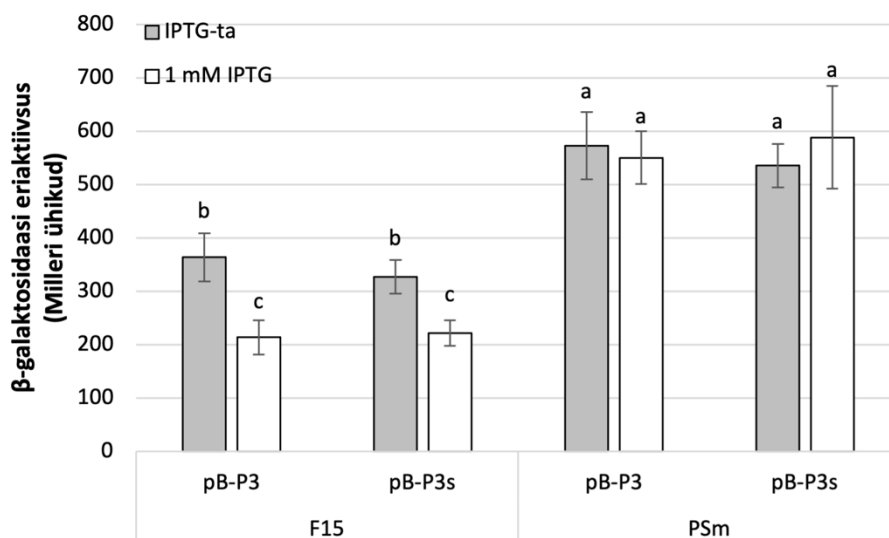
Joonis 2. *P. putida* tüvedest PaW85 ja PaW85ΔrpoS mõõdetud β-galaktosidaasi eriaktiivsus. Bakterid sisaldasid pBLKT3 plasmidi kloonituna PP_0163 (pB_0163-P3 sisaldab *lacZ* reportergeeni ees 1050 nt PP_0163 eelset DNAd, pB_0163-P3s 626 nt) või *lapG* (pB_0164-P4 sisaldab *lacZ* reportergeeni ees 1032 nt *lapG* geeni eelset DNAd, pB_0164-P4s 626 nt) promootorala. Rakke kasvatati LB söötmes 18 tundi. Joonisel on toodud aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega. Tulpade peal on toodud homogeensusrühmad (kui homogeensusrühmad sisaldavad samu tähti, siis $p \geq 0,05$). Bioloogiliste paralleelide arv (n) ≥ 12 .

Grupi eelnevatest katsetest oli teada, et *fis*-i üleekspressiooni korral *P. putida* biofilm võimendub ning ühe võimalusena arvati, et Fis võib pärssida *lapG* ekspressiooni (Puhm jt., 2022). Samuti on uurimisgrupis varasemalt leitud, et geenide PP_0163 ja *lapG* vahelisel alal on 2 Fis-i seondumiskohta. Üks Fis-i seondumiskohtadest asub -298...-277 nukleotiidi kaugusel ja teine -434...-411 nukleotiidi kaugusel *lapG* algusest (Andrio Lahesaare avaldamata andmed) (Joonis 1).

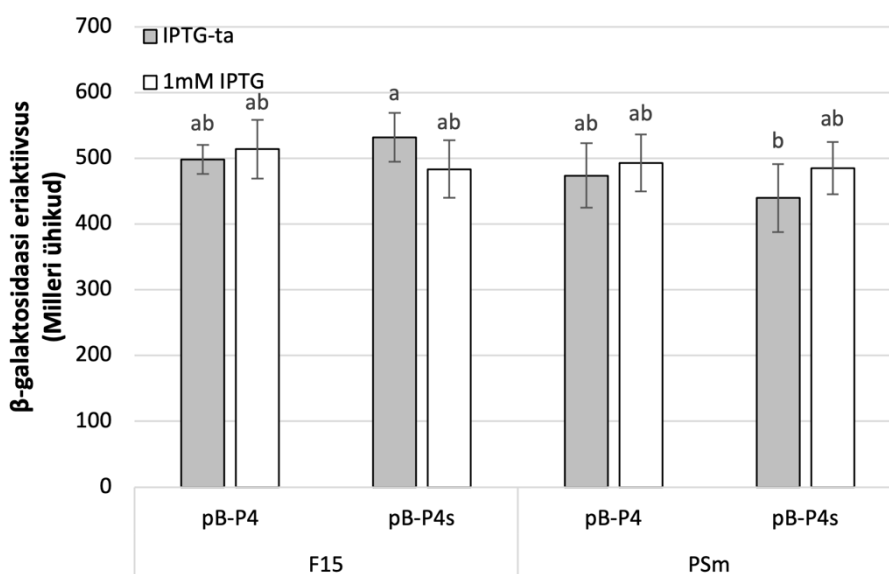
Fis-i mõju uurimiseks geenide transkriptsioonile kasutati *P. putida* kahte tüve: PSm ja F15 (Tabel 2). Neist viimane, F15, on *fis*-i üleekspressioonitüvi, kus PaW85 tüve kromosoomi on viidud mini-Tn7-ga *lacI-Ptac-fis*; Gm^r kassett, mis tagab *fis* geeni tugeva ekspressiooni kui söötmesse lisada IPTG-d. PSm on F15 nn kontrolltüvi, mida töös käsitletakse kui metsiktüve (Tabel 2). PSm-i saamiseks viidi PaW85 kromosoomi mini-Tn7-ga Sm^r geen. Töös kasutati *fis*-i üleekspressioonitüve, sest *P. putida* *fis*-i alaekspressiooni ega ka deletsioonitüve pole õnnestunud luua, tõenäoliselt seetõttu, et erinevalt *E. coli*'st on Fis *P. putida*'le hädavajalik (Jakovleva jt., 2012). Eelnevalt on teada, et IPTG lisamine söötmesse suurendab Fis-i hulka F15-s, kuid mitte PSm-s (Jakovleva jt., 2012). Vältimaks IPTG-st endast tingitud LacZ eriaktiivsuste muutust, hinnati LacZ eriaktiivsust kontrolltüves PSm ning leiti, et IPTG-l endal

pole PSm tüves *lacZ* eriaktiivsusele efekti (Joonis 3). Sellest johtuvalt, kui Fis-1 on transkriptsioonile mõju, siis IPTG lisamisel söötmesse peab F15-s LacZ eriaktiivsus muutuma.

(a)



(b)

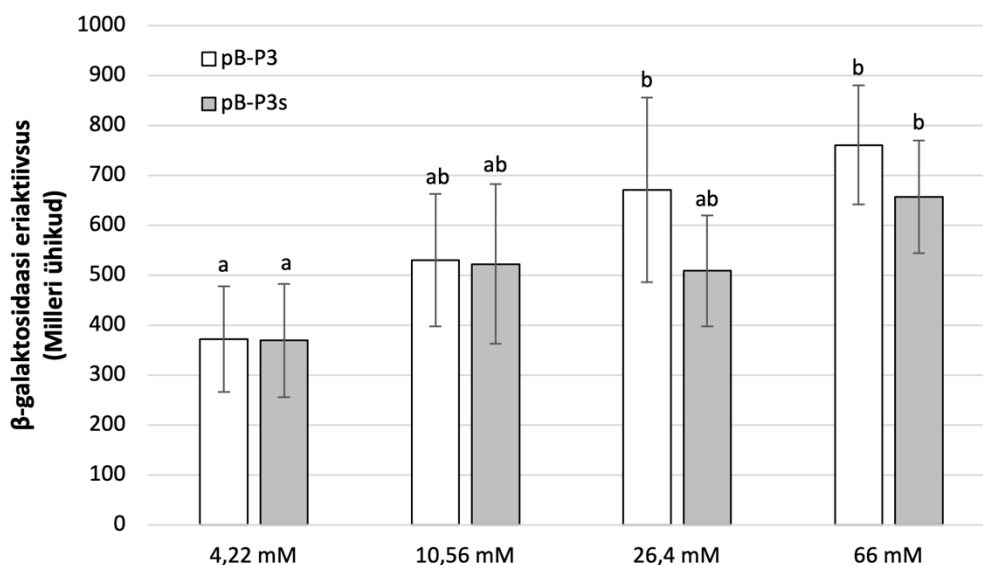


Joonis 3. Fis-i üleekspressiooni mõju geenide *lapG* ja PP_0163 ekspressioonile mõõdetud läbi *lacZ* reportergeeni aktiivsuse; *P. putida* PSm ja F15 rakud kasvasid LB-s 18 tundi ning sisaldavad pBLKT3 plasmidi kloneerituna (a) PP_0163 promootorala (pB_0163-P3 sisaldab *lacZ* reportergeeni ees 1050 nt PP_0163 eelset DNAd, pB_0163-P3s 626 nt) või (b) *lapG* promootorala (pB_0164-P4 sisaldab *lacZ* reportergeeni ees 1032 nt *lapG* geeni eelset DNAd, pB_0164-P4s 626 nt). Joonisel on toodud aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega. Tulpade peal on toodud homogeensusrühmad (kui homogeensusrühmad sisaldavad samu tähti, siis $p \geq 0,05$). Bioloogiliste paralleelide arv ($n \geq 6$).

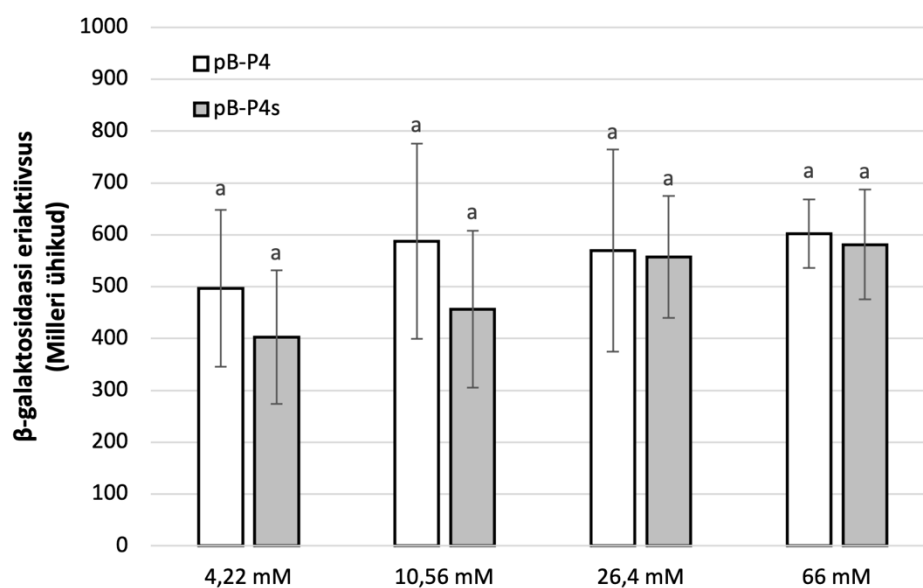
Katsest selgus, et lisades 1mM IPTG-d söötmesse langes LacZ eriaktiivsus nendes *P. putida* F15 rakkudes, mis sisaldasid geeni PP_0163 promootoraladega plasmide (pB-P3 puhul IPTG-ta 363 MÜ ja 1 mM IPTG-ga 213 MÜ ning pB-P3s puhul IPTG-ta 327 MÜ ja 1 mM IPTG-ga 221 MÜ; $p < 0,05$; joonis 3a). Seega, Fis võib represserida PP_0163 transkriptsiooni. Lisaks, PP_0163 promootoralade puhul, on F15-s LacZ eriaktiivsus madalam kui kontrolltüves PSm sõltumata IPTG lisamisest ($p < 0,001$; joonis 3a). Samas, IPTG lisamine söötmesse sisuliselt ei mõjuta LacZ eriaktiivsust, kui *P. putida* tüvedesse PSm ja F15 on sisse viidud plasmidid, mis kannavad *lapG* (PP_0164) promootorala *lacZ* ees (Joonis 3b). Sellest johtuvalt saab öelda, et Fis ei mõjuta *lapG* suunas transkriptsiooni, küll aga tõenäoliselt represserib PP_0163 suunalist transkriptsiooni.

Fosfori mõju uurimiseks lisati 2,5 kordse sammuga söötmesse K-fosfaati. Kui rakkudesse viidi PP_0163 promootoraladega plasmidid pB-P3 ja pB-P3s, siis suurenes LacZ eriaktiivsus K-fosfaadi lisamisel söötmesse (Joonis 4a). Võrreldes LacZ eriaktiivsusi PaW85, siis on pB-P3 korral näha, et söötmes, kuhu lisati kaaliumfosfaati kontsentratsiooniga 4,22 mM, on eriaktiivsus 2,0 korda väiksem selle söötme eriaktiivsusest, kuhu oli lisatud 66 mM ($p < 0,001$) ja pB-P3s puhul erinevad nimetatud kontsentratsioonide eriaktiivsused 1,8 korda ($p < 0,001$; Joonis 4a). Samasugust selget erinevust ei ole näha plasmidide pB-P4 ega ka pB-P4s puhul ning antud katsetulemuste statistilise analüüsi järgi LacZ eriaktiivsustel erinevusi pole ($p > 0,05$; Joonis 3b). Sellest johtuvalt võib öelda, et fosfaadi kontsentratsioonist söötmes sõltub PP_0163 ekspressioon, kuid mitte *lapG* transkriptsioon.

(a)



(b)



Joonis 4. β -galaktosidaasi eriaktiivsus mõõdetuna 18 tundi K10T π ilma fosforita minimalsöötmes kasvanud *P. putida* PaW85 rakkudes. (a) Rakud sisaldavad pBLKT3 plasmidi kloneerituna PP_0163 promootorala (pB_0163-P3 sisaldab *lacZ* reportergeeni ees 1050 nt PP_0163 eelset DNAd, pB_0163-P3s 626 nt) või (b) *lapG* promootorala (pB_0164-P4 sisaldab *lacZ* reportergeeni ees 1032 nt *lapG* geeni eelset DNAd, pB_0164-P4s 626 nt). Joonisel on toodud aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega. Tulpade peal on toodud homogeensusrühmad (kui homogeensusrühmad sisaldavad samu tähti, siis $p \geq 0,05$). Joonisel toodud aritmeetilised keskmised 95% usalduspiiridega, rühmade aritmeetilised keskmised on sarnased ($p > 0,05$). Bioloogiliste paralleelide arv (n) ≥ 12 .

2.4. Arutelu

Varasemalt on uuritud *P. putida* biofilmi moodustumist LapA posttranskriptsioonilise regulatsiooni (Navarrete jt., 2019; Puhm jt., 2022), *lapA* transkriptsiooni regulatsiooni (Ainele jt., 2017) ning *lapE* transkriptsioonilise regulatsiooni kaudu (Monds jt., 2007). See, et Fis mõjutab *lapA* transkriptsiooni ja selle läbi ka biofilmi, on eelnevalt kindlaks tehtud (Ainele jt., 2017; Puhm jt., 2022). Samas pole välisatud võimalust, et Fis võiks osaleda biofilmi tekkes ja arengus teiste geenide reguleerimise kaudu. Reguleerides geenide ekspressiooni positiivselt, nagu nt *lapA*, või negatiivselt, nagu näiteks *lapG* (Puhm jt., 2022). LapG puhul on varem uuritud valgu posttranslatsioonilist regulatsiooni, mis toimub läbi LapD-ga seondumise (Newell jt., 2009, 2011), kuid *lapG* transkriptsiooni regulatsiooni pole põhjalikult uuritud. Näiteks seniajani pole täpselt lokaliseeritud *lapG* promootoreid.

Sellest tulenevalt oli töö esmaseks eesmärgiks välja selgitada piirkonnad, kus *lapG* promootorid võiks asuda ning seejärel kontrollida hüpoteesi, et Fis pärsib *lapG* transkriptsiooni. Promootorite leidmiseks kasutati uuritava DNA reportergeeni *lacZ* ette kloonimist ning jälgiti LacZ eriaktiivsust. Selleks, et leida geenide *lapG* ja PP_0163 promootorite täpsed seondumiskohad, tuleks vähendada järjest kloneeritava promootorala DNA'd 5' otsast ning teha uuesti β -galaktosidaasi eriaktiivsuse test. Kui LacZ eriaktiivsus väheneb, siis viitab see võimalikule promootorile. Selleks, et kindlalt väita, kus on funktsionaalne promootor, tuleb potentsiaalne DNA järjestus muteerida ning jälgida, kas LacZ eriaktiivsus langeb. Kui jah, siis saab väita, et seal promootor asubki.

Kuna uuritud promootorid olid aktiivsed rakkude kasvatamisel standartsetel laboritingimustel (Joonis 2), siis tõenäoliselt on tegu Sigma70-tüüpi promootoriga, mitte spetsiifilisele keskkonnasignaalse vastavate promootoritega. Siiski, antud juhul on tegemist huvitava probleemiga, sest LacZ eriaktiivsused viitavad vähemalt keskmise tugevusega promootorile, aga varem leitud *lapG* mRNA 5' otsad ei kattu *in silico* ennustatud promootoriga (Joonis 1, Tabel 4). Seetõttu peab üks või mitu funktsionaalset *lapG* promootorit asuma leitud hüpoteetilises promootorist P_{HG-1} ülesvoolu (Joonis 1, Tabel 4). Kuna *Softberry* ennustab Sigma70 tüüpi promootorite asukohti, ja *in silico* leiti ainult üks promootor, mille järjestus sarnanes vähe konsensussega, siis peab funktsionaalne promootor olema ebatüüpiline Sigma70-tüüpi promootor või sõltuma transkriptsioonifaktori(te)st nagu Fis. Kuid kuna *lapG* jagab promootorala naabergeeniga PP_0163, siis esmakordselt sai eesmärgiks leida ka PP_0163 promootorid. Joonisel 2 toodud tulemustest järeldub, et *lapG* promootor(id) asuvad ainult geenidevahelisel alal ja PP_0163 promootoritest osa asub geenidevahelisel alal ning teine osa asub *lapG* geeni sees. Seda toetavad ka varem *in silico* ennustatud promootorite tulemused, kus

silma torkab, et PP_0163 hüpoteetilised promootorid on suure sarnasusega konsensusele, mida näitab *Softberry* ennustuste kõrge skoor (Joonis 1, Tabel 4).

PP_0163 puhul võiks olla tegu mitme promootoriga, millest vähemalt üks asub geenidevahelises alas ja teine *lapG* geenis (Joonis 2). Sellele väitele annab kaalu ka *in silico* leitud kõrge skooriga hüpoteetilised promootorid P_{H3-2} ja P_{H3-3}, mis asuvad *lapG*-s (Joonis 1, Tabel 4).

PP_0163 ja *lapG* ekspressiooni regulatsiooni teeb huvitavaks veel fakt, et PP_0163 ekspressioon on RpoS-st sõltuv, kuid *lapG* ekspressioon ei ole otseselt RpoS-st sõltuv (Joonis 2). Kuna rakkudes, millesse oli viidud pB-P4 ja pB-P4s, LacZ eriaktiivsused RpoS puudumisel tõusid, mitte ei langenud, siis võib *lapG* olla kaudselt RpoS-i kontrolli all. Sigma faktori puudumisel ei saa sellest sõltuva promootori aktiivsus suureneada. Pigem puudub sellises olukorras *lapG* geeni ekspressiooni represseriv transkriptsiooniregulaator, mille enda ekspressioon RpoS-ga aktiveeritav. Antud katsed pole piisavad sellele küsimusele vastamiseks, pigem tasub seda hüpoteesi silmas pidada, kui geenide ekspressiooni täpsemalt uuritakse.

PP_0163 geeni RpoS-st sõltuv promootor asub tõenäoliselt geenidevahelises alas, sest nii pika kui lühikese konstrukti (P3 ja P3s) puhul toimus sarnane nõrk LacZ eriaktiivsuse vähenemine RpoS puudumisel (Joonis 2). Samas on keeruline täpselt väita, kas tegu on mitme promootoriga geenide vahealal, millest osa on RpoS-sõltuvad ja osa RpoD-sõltuvad või kõik on osaliselt äratuntavad mõlema sigmafaktoriga. Samuti on ebaselge, mitu PP_0163 promootorit geenidevahelises alas asub. Samas, PP_0163 transkriptsiooni muutumine võib mõjutada *lapG* transkriptsiooni kaudselt, kasvõi seeläbi, et *Pseudomonas Genome Database*'i andmetel on PP_0163 transkriptsiooniregulaator, mille funktsiooni täpselt ei teata (www.pseudomonas.com). Selleks, et saada teada selle geeni täpsem roll, peaks bakteri kromosoomist deleteerima terve PP_0163 geeni ja jälgima *lapG* transkriptsiooni võrdlevalt metsiktüvega.

Joonisel 3b toodud tulemustest järeldub, et *lapG* geeni transkriptsioonil ei ole otsest Fis-i sõltuvust, seega on kontrollitud töögrupis eelnevalt püstitatud hüpotees, et Fis ei reguleeri otseselt *lapG* transkriptsiooni (Puhm jt., 2022). Joonise 3a tulemustest võib järeldada, et Fis represserib PP_0163 ekspressiooni. Selline tulemus on huvitav, sest kuigi Fis-i ennustatud seondumisjärjestus asus mõlema promootori lähedal, siis leiti, et Fis mõjutab ainult ühe naabergeeni ekspressiooni.

Kuna PP_0163 ja *lapG* on vastassuunaliselt transkribeeritud naabergeenid ning nende mRNAde 5' otsad võivad kattuda, on võimalik, et *lapG* ekspressioon on reguleeritud ekskludoniga. Ekskludon on geeniekspressiooni reguleerimise mehhanism, mil mRNA-d käituvad asRNA-

dena ja reguleerivad teineteise geeniekspressiooni (Sesto jt., 2013). Nimelt, kui toimub PP_0163 transkriptsioon promootorilt P_{H3-3}, siis see PP_0163 mRNA oleks osaliselt komplementaarne *lapG* mRNA-ga ning võiks RNAde dupleksi moodustumisega takistada *lapG* mRNA translatsiooni. Samal ajal PP_0163 ekspressioon sõltuks, milliselt promootorilt on mRNA transkribeeritud, sest PP_0163 geenile lähematel promootoritelt saadud mRNA ei pruugi *lapG* mRNAga komplementaarne olla. Kui lisada siia juurde promootorite sõltuvus transkriptsiooni regulaatoritest, siis saame süsteemi, mille ekskludon sõltub sellest, millal ja milliselt promootorilt toimub transkriptsioon.

Samas, Fis-i mõju hindamisel saadud tulemus ei toeta võimalikku ekskludoni esinemist ja selle tõttu biofilmi suurenemist, sest kui Fis-i juuresolekul PP_0163 transkriptsioon väheneb, siis ekskludoni efekt *lapG*-le peaks ka vähenema ja seega oleks rakus rohkem LapG-d, mis viiks *P. putida* F15 biofilmi hulga alla. Selleks, et Fis-i mõju kindlaks teha, oleks vaja kasutada praegu töögrupis loodavat reportersüsteemi, mis võimaldab mõõta naabergeenide ekspressiooni samal ajal, muteerida Fis-i seondumiskohad (Joonis 1) ning vaadata kahe reportervalgu ekspressiooni korraga.

Varasemalt on teada, et fosfori limitatsiooni korral aktiveerub *Pseudomonas fluorescens*'il LapG (Newell jt., 2009, 2011), kuid samas ei ole teada, kuidas mõjutab fosfori limitatsioon *lapG* transkriptsiooni. Kuna geenide PP_0163 ja *lapG* geenide promootoralad kattuvad geenide vahelisel 626 aluspaari pikkusel alal ja PP_0163 geeni promootor(id) on mõjutatud fosfori kontsentratsiooni muutusest ning *lapG* promootorid mitte, siis võib fosfori kontsentratsioon keskkonnas mõjutada *lapG* transkriptsiooni tema vastasgeeni kaudu. Samas ei saa nende tulemuste põhjal eeldada, et fosforil oleks sama kindel roll *lapG* transkriptsiooni regulatsioonis nagu LapG posttranslatsioonilises regulatsioonis.

Katsed PP_0163-*lapG* promootoralalt transkriptsiooni hindamiseks ilmestavad selgelt, kui keeruline on vastassuunaliste geenide transkriptsiooni regulatsiooni uurimine. Geenide *lapG* ja PP_0163 ekspressiooni uurimiseks oleks tulevikus vaja uurida erinevaid võimalikke efekte üksikshaaval. Samuti võiks kasutada teist testsüsteemi, mille reportergeeni eluiga on lühem kui LacZ eluiga ning millega saaks leida täpsema ajahetke, millal uusi mõõtmisi sooritada (labori avaldamata andmed). Seejärel võiks teha RACE PP_0163 ning uuesti RACE *lapG*-le.

KOKKUVÕTE

Biofilmi moodustamine on *P. putida*'le oluline, et kinnituda taimejuurtele. Varasemalt on uuritud biofilmi moodustumise regulatsiooni LapA posttranskriptsioonilise regulatsiooni ning *lapE* transkriptsioonilise regulatsiooni kaudu. Valgu LapG puhul on uuritud posttranslatsioonilist regulatsiooni, kuid vähem on uuritud *lapG* transkriptsiooni regulatsiooni. Lisaks pole seni ajani lokaliseeritud *lapG* promootorite asukohta. Samamoodi ei ole uuritud *lapG* vastasgeeni PP_0163, mis võib reguleerida *lapG* ekspressiooni ekskludoni või mõne muu mehhanismiga, mis häirib naabergeeni ekspressiooni. Sellepärast alustati käesolevas töös nende geenide promootorite asukoha lokaliseerimisega ning võimalikku regulatsiooni uurimisega.

Töö tulemused on järgmised:

- Geeni *lapG* promootor(id) asub/asuvad PP_0163-*lapG* geenidevahelisel alal
- Geenil PP_0163 võib olla kaks või rohkem promootorit, millest üks asub geenidevahelisel alal, teine *lapG* geenis
- PP_0163 transkriptsioon sõltub RpoS-st otseselt
- Geeni *lapG* transkriptsioon ei sõltu söötme fosforikontsentratsioonist
- Geeni PP_0163 transkriptsioon sõltub positiivselt söötme fosforikontsentratsioonist
- *lapG* ekspressioon võib olla mõjutatud vastasgeeni transkriptsioonist

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

Gea Maris Räis

SUMMARY

Most bacteria living in different ecosystems prefer to live in a biofilm and the soil bacterium *Pseudomonas putida* studied in this work is no exception. Biofilm offers bacteria several advantages over planktic life, protecting them from unfavourable environmental conditions such as nutrient deficiency, UV radiation and antibiotics. The biofilm is also good for staying longer in a favourable environment.

Biofilm formation is important for *P. putida* to attach to plant roots. The regulation of biofilm formation through the post-transcriptional regulation of LapA and the transcriptional regulation of *lapE* has previously been studied. For the protein LapG, that is a periplasmatic protease targeting surface adhesin LapA, post-translational regulation has been studied, but transcriptional regulation of *lapG* has not been studied as much. Similarly, the neighbouring gene PP_0163, which is annotated as a hypothetical transcriptional regulator, has also not been studied much. Therefore, this study started with the localisation of the promoters of these genes and the investigation of possible regulation.

The results are as follows:

- The promoter(s) of the gene *lapG* is/are located in between of genes *lapG* and PP_0163
- Gene PP_0163 may have two or more promoters, some of which are located in the intergenic region and the others in the *lapG* gene
- PP_0163 transcription depends directly on RpoS
- Transcription of the *lapG* gene does not depend on the phosphorus concentration in the medium
- The transcription of the PP_0163 gene is positively dependent on the phosphorus concentration in the medium
- *lapG* expression can be affected by the transcription of the opposite gene

VIITED

- 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.
- Asari, S. Y. (2015). *Studies on plant-microbe interaction to improve stress tolerance in plants for sustainable agriculture* (Kd 2015). Department of Plant Biology, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Ball, C. A., Osuna, R., Ferguson, K., & Johnson, R. C. (1992). Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *174*(24), 8043–8056.
- 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.
- Boswell, S., Mathew, J., Beach, M., Osuna, R., & Colón, W. (2004). Variable contributions of tyrosine residues to the structural and spectroscopic properties of the factor for inversion stimulation. *Biochemistry*, *43*(10), 2964–2977.
- 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. (2014). 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.

- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., & Bautz, E. K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, *221*(5175), 43–46.
- Chatterjee, D., Boyd, C. D., O'Toole, G. A., & Sondermann, H. (2012). Structural characterization of a conserved, calcium-dependent periplasmic protease from *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology*, *194*(16), 4415–4425.
- 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.
- Chia, J. Y., Khoo, K. S., Ling, T. C., Croft, L., Manickam, S., Yap, Y. J., & Show, P. L. (2021). Description and detection of excludons as transcriptional regulators in gram-positive, gram-negative and archaeal strains of prokaryotes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *32*, 101933.
- 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.
- Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., & Jones, K. M. (2002). *Data for biochemical research*. Clarendon press.
- Dennis, P. G., Miller, A. J., & Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS microbiology ecology*, *72*(3), 313–327.
- Díaz-Salazar, C., Calero, P., Espinosa-Portero, R., Jiménez-Fernández, A., Wirebrand, L., Velasco-Domínguez, M. G., López-Sánchez, A., Shingler, V., & Govantes, F. (2017). The stringent response promotes biofilm dispersal in *Pseudomonas putida*. *Scientific reports*, *7*(1), 1–13.

- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- 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.
- Farrar, J., Hawes, M., Jones, D., & Lindow, S. (2003). How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology*, 84(4), 827–837.
- Fassler, J. S., & Gussin, G. N. (1996). Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: Concepts, definitions, and analogies. *Methods in enzymology*, 273, 3–29.
- Finkel, S., & Johnson, R. (1992). The Fis protein: It's not just for DNA inversion anymore. *Molecular microbiology*, 6(22), 3257–3265.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623–633.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental microbiology*, 7(6), 894–904.
- Grainger, D. C., Goldberg, M. D., Lee, D. J., & Busby, S. J. (2008). Selective repression by Fis and H-NS at the *Escherichia coli* *dps* promoter. *Molecular microbiology*, 68(6), 1366–1377.
- Gross, C. A. (1996). Function and regulation of the heat shock proteins. *E. coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, 1382–1399.

- Gross, C., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., & Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 63, 141–156.
- Grossman, A. D., Straus, D. B., Walter, W. A., & Gross, C. A. (1987). Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes & development*, 1(2), 179–184.
- Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 441–466.
- Haggag, W., & Timmusk, S. (2008). Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *Journal of applied microbiology*, 104(4), 961–969.
- Harley, C. B., & Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic acids research*, 15(5), 2343–2361.
- Hengge-Aronis, R. (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 148–152.
- 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.
- Irankhah, S., Abdi Ali, A., Mallavarapu, M., Soudi, M. R., Subashchandrabose, S., Gharavi, S., & Ayati, B. (2019). Ecological role of *Acinetobacter calcoaceticus* GSN3 in natural biofilm formation and its advantages in bioremediation. *Biofouling*, 35(4), 377–391.

- 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.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the chinese medical association*, *81*(1), 7–11.
- Jayaraman, A., Cheng, E., Earthman, J., & Wood, T. (1997). Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *18*, 396–401.
- Kemner, K. M., Kelly, S. D., Lai, B., Maser, J., O'loughlin, E. J., Sholto-Douglas, D., Cai, Z., Schneegurt, M. A., Kulpa Jr, C. F., & Nealson, K. H. (2004). Elemental and redox analysis of single bacterial cells by X-ray microbeam analysis. *Science*, *306*(5696), 686–687.
- Kirisits, M. J., & Parsek, M. R. (2006). Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cellular microbiology*, *8*(12), 1841–1849.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular microbiology*, *48*(6), 1511–1524.
- 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.

- Köhler, T., Harayama, S., Ramos, J., & Timmis, K. (1989). Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *Journal of bacteriology*, *171*(8), 4326–4333.
- Lange, R., & Hengge-Aronis, R. (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, *5*(1), 49–59.
- Lappin-Scott, H. M., & Bass, C. (2001). Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *American journal of infection control*, *29*(4), 250–251.
- 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.
- Lonetto, M., Gribkov, M., & Gross, C. A. (1992). The sigma 70 family: Sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of bacteriology*, *174*(12), 3843–3849.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2002). Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(2), 194–222.
<https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.194-222.2002>
- Merrick, M. (1993). In a class of its own—The RNA polymerase sigma factor σ_{54} (σ_N). *Molecular microbiology*, *10*(5), 903–909.
- 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.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Gross, R. H., & O’Toole, G. A. (2007). Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm

- formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Molecular microbiology*, 63(3), 656–679.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Schwartzman, J. A., & O’Toole, G. A. (2006). Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1910–1924.
- 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.
- Murakami, K. S., & Darst, S. A. (2003). Bacterial RNA polymerases: The whole story. *Current opinion in structural biology*, 13(1), 31–39.
- Navarrete, B., Leal-Morales, A., Serrano-Ron, L., Sarrió, M., Jiménez-Fernández, A., Jiménez-Díaz, L., López-Sánchez, A., & Govantes, F. (2019). Transcriptional organization, regulation and functional analysis of *flhF* and *flhN* in *Pseudomonas putida*. *PLoS One*, 14(3), e0214166.
- 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., Weinel, C., Paulsen, I., Dodson, R., Hilbert, H., Martins dos Santos, V., Fouts, D., Gill, S., Pop, M., Holmes, M., & others. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 799–808.
- 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.
- Opel, M. L., Aeling, K. A., Holmes, W. M., Johnson, R. C., Benham, C. J., & Hatfield, G. W. (2004). Activation of transcription initiation from a stable RNA promoter by a Fis protein-mediated DNA structural transmission mechanism. *Molecular microbiology*, *53*(2), 665–674.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, *30*(2), 295–304.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, *54*(1), 49–79.
- Ott, C. M., Day, D. F., Koenig, D. W., & Pierson, D. L. (2001). The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. *Current microbiology*, *42*, 78–81.
- 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.
- 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.
<https://doi.org/10.3390/ijms23115898>

- Ramos-Díaz, M. A., & Ramos, J. L. (1998). Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. *Journal of bacteriology*, *180*(23), 6352–6363.
- Sasse-Dwight, S., & Gralia, J. D. (1990). Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor σ_{54} . *Cell*, *62*(5), 945–954.
- Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T., & Muskhelishvili, G. (1999). A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, *34*(5), 953–964.
- 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.
- Smith, K., & Hunter, I. S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of medical microbiology*, *57*(8), 966–973.
- 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), e00168-18.
- Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular microbiology*, *52*(4), 917–924.
- Zolin, A., Bossi, A., Cirilli, N., Kashirskaya, N., & Padoan, R. (2018). Cystic fibrosis mortality in childhood. Data from European Cystic Fibrosis Society patient registry. *International journal of environmental research and public health*, *15*(9), 2020.

- 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, I k 779–781). Wiley Online Library.
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, *19*(11), 2396–2404.
- Typas, A., & Hengge, R. (2006). Role of the spacer between the -35 and -10 regions in σ promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, *59*(3), 1037–1051.
- Valentini, M., García-Mauriño, S. M., Pérez-Martínez, I., Santero, E., Canosa, I., & Lapouge, K. (2014). Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology*, *160*(10), 2243–2252.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of bacteriology*, *187*(5), 1591–1603.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, *26*(1), 379–407.
- Wingender, J., & Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International journal of hygiene and environmental health*, *214*(6), 417–423.
- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H.-C. (1999). *What are bacterial extracellular polymeric substances?* Springer.

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.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

www.pseudomonas.com

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Gea Maris Räis,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Geeni *lapG* transkriptsiooni regulatsioon *Pseudomonas putida*’s”, mille juhendaja on PhD Riho Teras ja kaasjuhendaja on MSc Johanna Hendrikson, 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.

Gea Maris Räis

27.05.2024