

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

Liisbeth Kose

***Pseudomonas putida* füsioloogilise seisundi ja regulaatori Fis mõju
GacS/GacA süsteemi alumiste geenide transkriptsioonile**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja PhD Riho Teras

TARTU 2016

INFOLEHT

***Pseudomonas putida* füsioloogilise seisundi ja regulaatori Fis mõju GacS/GacA süsteemi alumiste geenide transkriptsioonile**

P. putida on mullabakter, kes on võimeline koloniseerima taimejuuri ning moodustama biofilmi. Biofilm on taimele kasulik, kuna bakter kaitseb taime fütopatogeenide eest, taim eritab vastukaaluks keskkonda toitaineid. Biofilmi teke on kompleksne protsess, seetõttu on olulised mitmed signaalrajad ja globaalsed regulaatorid, näiteks GacS/GacA süsteem ning Fis. Käesolevas töös uuriti, kas Fis reguleerib GacS/GacA süsteemi kuuluvate *rsmA* ja sRNA-de transkriptsiooni ning kas nende geenide transkriptsioon sõltub bakteri füsioloogilisest seisundist. Katsetest järeldus, et Fis mõjutab sRNA-de transkriptsiooni negatiivselt, *rsmA*-de transkriptsiooni positiivselt ning geeniregulatsioon sõltub bakteri füsioloogilisest seisundist. Seega Fis reguleerib GacS/GacA süsteemi gene ning võib seeläbi mõjutada ka biofilmi tekkeks vajalike geenide transkriptsiooni.

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Märksõnad: *Pseudomonas putida*, Fis, GacS/GacA, *rsmA*, sRNA-d.

The effect of physiology of *Pseudomonas putida* and Fis on the transcription of lower genes in GacS/GacA system

P. putida is a rhizospheric bacterium, that colonizes plant roots and develops biofilm. Biofilm is beneficial to plant as it protects against phytopathogens. Biofilm formation is intricately regulated, therefore many signalling networks and global regulators are needed, for example GacS/GacA system and Fis. The aim of this paper was to investigate, whether Fis influences the genes in GacS/GacA (*rsmA* and sRNA genes) signalling pathway and whether their transcription depends on the physiological activity of the bacterium. Experiments showed that Fis regulates *rsmA* transcription positively and sRNA genes negatively. Also, their transcription depended on the physiological activity of the bacterium. Fis regulates the genes in GacS/GacA system and could thereby also regulate the genes necessary for biofilm formation.

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Keywords: *Pseudomonas putida*, Fis, GacS/GacA, *rsmA*, sRNA-s.

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
I KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Risosfäärne bakter <i>Pseudomonas putida</i>	7
1.2 Biofilm ja selle tähtsus	7
1.2.1 Biofilmi arenguetapid.....	8
1.2.2 Perekonna <i>Pseudomonas</i> liikide biofilmi maatriks	10
1.3 Biofilmi regulatsioon.....	11
1.3.1 GacS/GacA signaalirada	11
1.3.2 Rsm süsteem.....	13
1.4 Globaalne regulaatorvalk Fis	15
II EKSPERIMENTAALNE OSA	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Töös kasutatud tüved ja plasmiidid	18
2.2.2 Söötmed ja kasvatamine	19
2.2.3 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon.....	19
2.2.4 DNA geelelektroforees.....	20
2.2.5 <i>P. putida</i> elektroporatsioon ja transformatsioon	21
2.2.6 B-galaktosidaasi mõõtmine	21
2.2.7 Uuritavate geenide transkriptsiooni sõltuvuse hindamine <i>P. putida</i> füsioloogilisest seisundist ja Fis-st.....	22
2.2.8 Fis-i seondumisjärjestuste ennustamine <i>in silico</i>	24
2.2.9 DNaaS I jalajälje analüüs.....	24
2.2.10 Statistiline analüüs.....	25
2.3 Tulemused.....	26
2.3.1 Geeni <i>rsmA1</i> transkriptsiooni regulatsioon	27
2.3.2 Geeni <i>rsmA2</i> transkriptsiooni regulatsioon	28
2.3.3 Geeni <i>rsmA3</i> transkriptsiooni regulatsioon	31
2.3.4 Geeni <i>rsmX</i> transkriptsiooni regulatsioon	32
2.3.5 Geeni <i>rsmY</i> transkriptsiooni regulatsioon	34
2.3.6 Geeni <i>rsmZ</i> transkriptsiooni regulatsioon	35

2.3.7 Uuritavate geenide transkriptsiooni sõltuvus hapniku sisaldusest söötmes	38
2.3.8 Fis-i seondumine <i>rsmA1</i> ja <i>rsmY</i> geeni promootoralale.....	42
2.3 Arutelu.....	46
KOKKUVÕTE.....	52
SUMMARY	53
TÄNUSÕNAD.....	54
KASUTATUD KIRJANDUS	55
LIHTLITSENTS	66

KASUTATUD LÜHENDID

c-di-GMP – tsükliline diguanosiinmonofosfaat (ingl k *cyclic dimeric guanosine monophosphate*)

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

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

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

Gm – gentamütsiin

IPTG – isopropüül-β-tioglaktoosiid

Km – kanamütsiin

LadS – kahekomponendilises süsteemis GacS/GacA osalev sensor (ingl k *lost adherence sensor*)

LB – lüsogeenne sööde

nt – nukleotiid

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

ONPG – orto-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid

RetS – kahekomponendilises süsteemis GacS/GacA osalev sensor (ingl k *regulator of exopolysaccharide and type III secretion*)

Rsm – sekundaarsete metaboliitide regulaator (ingl k *regulator of secondary metabolites*)

RsmX, RsmY, RsmZ – väikesed mittekodeeriv sRNA-d

Sm – streptomütsiin

sRNA – väike mittekodeeriv RNA (ingl k *small non-coding RNA*)

UAS – sRNA-de ekspressiooni aktiveerimiseks vajalik ülesvoolu jääv konserveerunud järjestus (ingl k *upstream activating sequence*)

SISSEJUHATUS

Pseudomonas putida on keskkonnas laialt levinud mullabakter, kes on võimeline koloniseerima taime risosfääri. Taime risosfääris elamine on kasulik mõlemale osapoolale: *P. putida* kaitseb taime fütopatogeenide eest ning taim eritab bakterile vajalikke toitaineid. *P. putida* kaitsev efekt taimepatogeenide eest tuleneb tema võimest moodustada taime juure pinnal biofilmi. Biofilm on pinnale kinnitunud ja maatriksiga kaetud agregeerunud bakterite kogum. Biofilmi moodustumine võimaldab bakteril püsida taime juurtel ning kaitseb baktereid ebasoodsate keskkonnatingimuste eest.

Biofilmi moodustumist ja püsijäämist mõjutavad erinevad signaalrajad ja globaalsed regulaatorid, mis reageerivad keskkonnast tulevatele signaalidele ning bakteri füsioloogilisele seisundile. Taolisteks biofilmi mõjutavateks regulaatoriteks on näiteks GacS/GacA süsteem ning globaalne regulaator Fis.

GacS/GacA süsteem on paljudes bakterites leiduv signaalirada, mis pärsib bakterite liikumisvõimet ning soodustab biofilmi teket. Globaalsel regulaatoril Fis (ingl k *factor for inversion stimulation*) on samuti näidatud biofilmi soodustav toime. Seost Fis-i ja GacS/GacA signaaliraja vahel on meie laboris eelnevalt uuritud. Fis aktiveerib *gacS*-i transkriptsiooni, kuid ainult teatud tingimustes. Seega võib arvata, et *gacS*-i transkriptsioon on keeruliselt reguleeritud ning lisaks Fis-ile võivad seda mõjutada veel teisedki faktorid.

P. putida biofilmi maatriks koosneb peamiselt valkudest, milleks on LapA ja LapF. Meie laboris on uuritud *lapA* transkriptsiooni ning nähtud, et Fis-i üleekspressiooniga *P. putida* tüves on *lapA* transkriptsioon väga kõikuv, sõltudes rakkude vanusest ja aeratsioonist. Geeni *lapA* transkriptsiooni kõikumine võib tuleneda asjaolust, et Fis mõjutab regulaatorit, mis kontrollib biofilmiks vajalike geenide transkriptsiooni, mille ekspressioon sõltub rakkude füsioloogilisest seisundist. Üheks selliseks regulaatoriks võib olla RsmA, mis reguleerib GacS/GacA raja signaali, seondes biofilmi moodustumiseks vajalike geenide mRNA-dega.

Tuginedes eelnevale, on käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kas Fis reguleerib GacS/GacA raja alumiste geenide (*rsmA* ja sRNA-geenide) transkriptsiooni. Lisaks, kas nende geenide transkriptsioon sõltub bakteri füsioloogilisest seisundist (bakterite vanusest tardsöötmele ja aeratsiooni lakkamisest).

I KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Risosfäärne bakter *Pseudomonas putida*

Perekonda *Pseudomonas* kuuluvad liigid on gram-negatiivsed gammaproteobakterid, kes on väga kohanemisvõimelised. Nende hulka kuulub nii patogeenseid kui saprofüütseid liike, mille tõttu on pseudomoonaseid leitud nii õhust, veest, mullast kui ka eukarüootidest (Palleroni, 1992; Schroth *et al.*, 1992). Pseudomoonaste võime toime tulla väga erinevate keskkonnatingimustega tuleneb metaboolsest ja geneetilisest plastilisusest (Dos Santos *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2002; Timmis, 2002). Pseudomoonased on fakultatiivsed aeroobid (Palleroni, 1984) ning heterotroofid, kes suudavad energia saamiseks kasutada üle saja erineva süsinikuallika, mille hulgas on toksilisi ja aromaatsid ühendeid, samuti lämmastikuühendeid ning ksenobiootikume (Timmis, 2002). Lisaks eelnevale on perekonna *Pseudomonas* liigid sageli resistentsed antibiootikumide, desinfitseerimiseks kasutatavate üldkemikaalide, detergentide kui ka raskemetallide suhtes ning võivad adapteeruda orgaaniliste lahustitega, mis lagundavad rakumembraani (Ramos *et al.*, 2002).

Pseudomoonased on mulla mikrobiotas äärmiselt olulised ning neid võib sageli isoleerida taimejuurtelt. Juurte koloniseerimise edukus tuleneb ühelt poolt bakteri võimest kinnituda taimetele (Duque *et al.*, 1993) ning teisalt võimest kasvava juurega kaasa liikuda. Samuti tuleb koloniseerimisel kasuks pseudomoonastele iseloomulik metaboolne mitmekülgus (Molina *et al.*, 2000). Bakteri ja taime omavahelised interaktsioonid on kasulikud mõlemale osapooltele. Taimejuurte pind ja juurt ümbritsev mõne millimeetri paksune muld, mida kutsutakse risosfääriks, on bakteritele soodne elukeskkond, kuna taimed eritavad juurte kaudu mulda toitained, mida on mikroorganismidel kerge omastada. Vastukaaluks eritavad pseudomoonased fütohormoone, mis stimuleerivad taimede kasvu, ja/või metaboliite, mis pärssivad patogeenide kasvu (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002).

1.2 Biofilm ja selle tähtsus

Biofilmiks nimetatakse agregeerunud bakterite kogumit, kus tihedalt koos asuvad bakterid reageerivad keskkonnasignaalidele koordineeritult signaaliradade ja hulgatunnetuse abil (Nadell *et al.*, 2008). Biofilmis elavad bakterid on kinnitunud pinnale ning ümbritsevad ennast

isetoodeid polümeerse maatriksiga (Costerton *et al.*, 1995). Valdav osa bakteritest on võimelised mingil eluetapil biofilmi moodustama. On leitud, et koguni 90% bakteritest elab teatud aja biofilmi koosseisus (Costerton, 1995; Geesey, 1977). Kuna biofilm on keskkonnas, samuti taimsetes ja loomsetes peremeestes, üsna laialdaselt levinud, võib arvata, et grupis elamine on evolutsiooniliselt kinnistunud kui bakteri eluks kasulik fenotüüp (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Kinnitunud eluviis pakub bakteritele mitmeid eeliseid vabalt elavate bakterite ees, kaitstes baktereid nii abiootiliste kui ka biootiliste tegurite eest. Võrreldes vabalt elavate bakteritega, on biofilmis elavad bakterid paremini kohanenud toitainete puuduse, pH muutuste, hapnikuradikaalide ja bakteritele kahjulike ainetega (Costerton *et al.*, 1995). Lisaks eelnenule võimaldab biofilmi moodustumine bakteril sobivasse keskkonda pikemaks ajaks püsima jääda (Timmis, 2002).

Taimejuurtel olev kasulike bakterite biofilm kaitseb taime patogeenide eest. Näiteks *Bacillus subtilis* kaitseb *Arabidopsis*'t patogeeni *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 eest, moodustades *Arabidopsis*'e juurtele biofilmi (Bais *et al.*, 2004). Agregeerunud bakterid mõjutavad ka inimeste elu. Biofilmi koosseisus olevad rakud tunduvad võrreldes planktiliselt elavate rakkudega olevat antibiootikumide suhtes tolerantsemad, olles seega ka paljude krooniliste haiguste põhjustajateks (Watnik ja Kolter, 1999; Stewart, 2002; Mah *et al.*, 2003; Heithoff ja Mahan, 2004; Costerton *et al.*, 2005; Fux *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Obst *et al.*, 2006; Manos *et al.*, 2007). Tsüstilist fibroosi põdevate inimeste kopsudes areneb *P. aeruginosa* biofilm, kus bakterid on kaitstud antibiootikumide ja organismi enda kaitsevõime eest (Davies, 2002). Samuti on näidatud, et mikroorganismid koloniseerivad mitmeid meditsiinilisi seadmeid ja implanteeritavaid proteese (Costerton *et al.*, 1999; Donlan, 2001). Näiteks *E. coli*, *P. aeruginosa* ja teised gram-negatiivsed bakterid võivad moodustada biofilmi kateetritel (Stickler, 1996).

1.2.1 Biofilmi arenguetapid

Biofilmi moodustumine on kompleksne protsess, mida mõjutavad mitmesugused keskkonnast tulevad signaalid (Danhorn ja Fuqua, 2007; Lugtenberg *et al.*, 1999; O'Toole ja Kolter, 1998; Rudrappa *et al.*, 2007; Sauer ja Camper, 2001). Üleminekul planktiliselt kasvult

kinnitunud olekusse muutub geenide ekspressioon (Mathesius, 2009; Matilla *et al.*, 2011; Ramos-Gonzales *et al.*, 2005). Võrreldes planktilise eluviisiga bakteritega, on biofilmis elavatel bakteritel ekspresseeritud väga väike osa geenidest. Näiteks on nii *P. aeruginosa*'l, *Vibrio cholerae*'l, *E. coli*'l kui ka *Staphylococcus aerus*'el biofilmi koosseisus olles ekspresseeritud umbes 10% geenidest, võrreldes planktiliselt elavate rakkudega (Schoolnik *et al.*, 2001; Whiteley *et al.*, 2001; Schembri *et al.*, 2003; Beenken *et al.*, 2004).

Biofilmi teke on mitmeetapiline (Stoodley *et al.*, 2002). Esimeses etapis toimub planktiliste rakkude kinnitumine pinnale. Kinnitumine võib olla nii juhuslik kui ka keemilistest atraktantidest põhjustatud (Freter ja O'Brien, 1981; Pratt ja Kolter, 1998; Meibom *et al.*, 2004). Esmane kinnitumine on sageli pöörduv ning bakterid võivad pinna küljest eemalduda (Klausen *et al.*, 2003). Püsiva kinnitumise järel jätkavad bakterid kasvamist ja jagunemist, mis lõpeb tiheda rakukogumi ehk mikrokoloonia tekkega. Mikrokolooniat peetakse biofilmi teiseks etapiks. Küpse biofilmi ehk kolmanda etapi kujunemiseks on oluline bakterite ekstratsellulaarne maatriks, mida eritatakse väliskeskkonda ning mis moodustab peamise kaitsva kihi bakterite ümber. Maatriks võib olla erineva koostisega, kuid peamiselt koosneb see veest ja erinevatest polümeeridest: polüsahhariididest, ekstratsellulaarsest DNAST ja/või valkudest (Flemming *et al.*, 2007; Flemming ja Wingender, 2010; Ryder *et al.*, 2007). Kypses biofilmis olevad geneetiliselt identsed rakud võivad biofilmi koosseisus erineda metaboolse aktiivsuse (Xu *et al.*, 1998), antibiootikumide tolerantsuse (Balaban *et al.*, 2004), spooride moodustumise (Branda *et al.*, 2001) või ekstratsellulaarsete polümeeride sekretsiooni poolest (Vasseur *et al.*, 2005; Vlamakis *et al.*, 2008).

Biofilmi neljas ja viimane etapp on biofilmi lagunemine ehk rakkude vabanemine biofilmist. Kypsest biofilmist eraldumiseks peavad üksikbakterid vabanema ekstratsellulaarsest maatriksist. See võib toimuda nii passiivselt kui aktiivselt. Passiivse, välistegurite abil, eraldumise näiteks on bakterite irdumine biofilmist vedelikuvoolu järsu tugevnemise tulemusena (Telgmann *et al.*, 2004). Bakterite eraldumise üheks aktiivseks näiteks on *V. cholerae*, kes eritab väliskeskkonda ensüüme, mis lõhuvad rakke ümbritsevat maatriksit nii, et rakud pääsevad biofilmist välja (Hammer ja Bassler, 2003; Zhu ja Mekalanos, 2003; Heithoff ja Mahan, 2004; Liu *et al.*, 2007).

1.2.2 Perekonna *Pseudomonas* liikide biofilmi maatriks

Perekonna *Pseudomonas* liikide biofilmi maatriksi peamiseks komponendiks võivad olla polüsahhariidid või valgud. Näiteks *P. aeruginosa* maatriks on peamiselt polüsahhariidne, koosnedes kas alginaadist või Pel- ja Psl-polüsahhariididest (Ryder *et al.*, 2007). Samas *P. fluorescens*'i ja *P. putida* maatriksi peamiseks komponendiks on valk LapA (Boyd *et al.*, 2014; Gjermansen *et al.*, 2010; Hinsa *et al.*, 2003; Moor *et al.*, 2014).

LapA on *P. putida* suurim valk, millele analoogseid valke on leitud ka teistes bakterites (Lasa ja Penades, 2006; Yousef ja Espinosa-Urgel, 2007). LapA on vajalik rakkude kinnitumiseks pinnale, seega adhesiin on oluline biofilmi moodustumise varajases etapis, kui toimub pöördvalt kinnitumiselt üleminek pöördumatuks (Hinsa *et al.*, 2003). *P. putida* lapA mutant moodustab oluliselt vähem biofilmi nii läbivoolukultuuris (Nelson *et al.*, 2002) kui suletud süsteemis (Moor *et al.*, 2014). *P. fluorescens*'i lapA mutandil säilib küll võime biofilmi moodustada, olgugi et paljud eksopolüsahhariide kodeerivad geenid on inaktiveerunud (Nilsson *et al.*, 2011).

P. putida'l on lisaks veel üks biofilmiks oluline adhesiin – LapF (Martinez-Gil, 2010), mis *P. fluorescens*'il puudub (Fuqua, 2010). LapF on oluline *P. putida* küpses biofilmis, vastutades rakk-rakk interaktsioonide eest (Fuqua, 2010; Martinez-Gil *et al.*, 2010).

LapA ja LapF-i hulka rakus mõjutab globaalne regulaatorvalk Fis (ptk 1.4). Fis-i üleekspressiooni korral *P. putida* rakkudes suureneb LapA hulk 1,6 korda (Moor *et al.*, 2014) ja biofilmi moodustumine ligikaudu kolm korda, võrreldes metsiktüvega (Jakovleva *et al.*, 2012; Moor *et al.*, 2014). Samuti on näidatud, et Fis represserib *P. putida*'s lapF-i transkriptsiooni (Lahesaare *et al.*, 2014), samas LapF-i puudumine ei mõjuta *P. putida* biofilmi moodustumist (Moor *et al.*, 2014). Vastupidiselt Fis-ile võimendab statsionaarse faasi sigmafaktor RpoS LapF-i ekspressiooni. RpoS-i ekspresseeritakse nälja- ja stressitingimustes, seega suureneb ka LapF ekspressioon rakkude statsionaarsesse kasvufaasi jõudes (Martinez-Gil *et al.*, 2010), kiirelt kasvavates rakkudes LapF-i ei ekspresseerita (Lahesaare *et al.*, 2014; Martinez-Gil *et al.*, 2014; Moor *et al.*, 2014).

Geenide lapA ja lapF-i transkriptsioon on GacS/GacA kahekomponentse süsteemi (ptk 1.3.1) kontrolli all. Geeni gacS katkestamine indutseerib *P. aeruginosa* läbivoolukultuuris küll rakkude kinnitumist pinnale, kuid samas pole kinnitumine piisavalt tugev ning rakud eemalduvad

pinnalt üsna kergelt (Petrova ja Sauer, 2012). Samas *gacA* mutant näitas defektset biofilmi moodustamist (Parkins *et al.*, 2001). *P. fluorescens*’is tekitavad mutatsioonid *gacA* või *gacS* geenides hüperliikuva fenotüübi (Martinez-Granero *et al.*, 2006; Navazo *et al.*, 2009). Martinez-Gil *et al.* näitasid 2014. aastal, et nii *lapA* kui ka *lapF*-i transkriptsioon on *P. putida* GacS-defektses tüves madalam kui metsiktüves (Martinez-Gil *et al.*, 2014).

1.3 Biofilmi regulatsioon

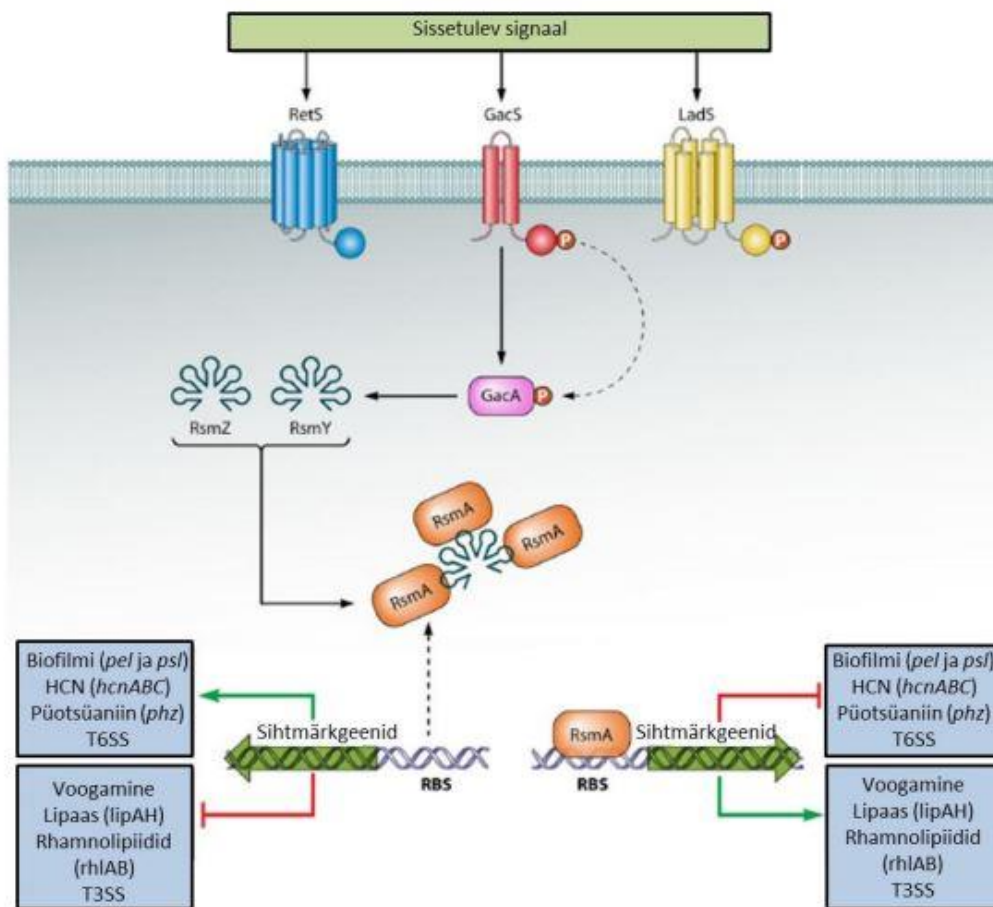
Biofilmi teke on keeruline protsess, kaasates mitmeid signaaliradu ja –molekule. Näiteks eubakterite universaalne signaalmolekul tsükliline diaganosiin - 5'- monofosfaat (c-di-GMP; ingl k *cyclic dimeric guanosine monophosphate*) reguleerib bakteri liikumist, virulentsusfaktorite sünteesi, sekundaarset metabolismi, adhesiooni ja biofilmi moodustumist (Hengge, 2009; Jenal ja Malone, 2006; Römling *et al.*, 2013). Kõrgenenud c-di-GMP tase indutseerib *P. aeruginosa*’s adhesiinide ja ekstratsellulaarse maatriksi komponentide produktsiooni, mis on vajalikud biofilmi moodustumiseks. Madal c-di-GMP tase aga vähendab adhesiinide ja ekstratsellulaarse maatriksi komponentide sünteesi ning bakterid lähevad paiksest eluviisilt üle planktilisele (Römling *et al.*, 2013; Hengge, 2009; Fazli *et al.*, 2014).

Kahekomponentsed regulatsioonisüsteemid võimaldavad bakteritel kiiresti reageerida keskkonnasignaalidele, võttes keskkonnast tuleva signaali rakku ning reguleerides vajalike geenide avaldumist (Gao *et al.*, 2007). Näiteks GacS/GacA kahekomponente süsteem, mis on leitud paljudest gamma-proteobakteritest, reguleerib bakteri virulentsusfaktorite sünteesi (Heeb ja Haas, 2001; Lapouge *et al.*, 2008) ja stimuleerib biofilmi moodustumist (Barahona *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013; Duque *et al.*, 2013).

1.3.1 GacS/GacA signaalirada

Kuigi GacS/GacA kahekomponentne süsteem koosneb tüüpilisest sensorikinaasist ja vastuseregulaatorist, siis signaali edasikandumisest biofilmi moodustumiseks vajalike geenide regulatsioonini võtab osa veel regulaatoreid. Sellest lähtuvalt on otstarbekas rääkida signaalirajast, mis algab signaali vastuvõtmisega, signaali kaskaadse ülekandega tsütoplasmas

ning biofilmiks vajalike valkude ekspressiooni reguleerimisega. GacS/GacA signaalirada koosneb membraanseoselisest sensorvalgust GacS ja signaali vastuvõtvast regulaatorvalgust GacA, mis aktiveerib sRNA-de transkriptsiooni. Need RNA-d reguleerivad RsmA aktiivsust, mis omakorda reguleerib mRNAde translatsiooni (Jimenez *et al.*, 2012). Signaalirada on täpsemalt lahti kirjutatud joonisel 1.



Joonis 1. *Pseudomonas aeruginosa* GacS/GacA signaalirada. GacS võtab väliskeskkonnast vastu seni teadmata signaali, mille tulemusena ta autofosforüleerub. GacS kannab fosfaatjäägi üle GacA-le, mis aktiveerub. GacA aktiveerib omakorda väikeste reguleerivate RNA-de – RsmZ ja RsmY – transkriptsiooni. Väikesed reguleerivad RNA-d inaktiveerivad seondumisega RsmA. RsmA puudumisel aktiveeritakse virulentsusfaktoreid ja biofilmi tekkeks vajalike eksopolüsahhariidide sünteesi. Sensorkinaas LadS soodustab signaali ülekandmist GacS-lt GacA-le, aktiveerides sRNA-de sünteesi, samas kui sensorkinaas RetS moodustab kompleksi GacS-iga, mis blokeerib signaali ülekande GacA-le ning sRNA-de sünteesi (Jimenez *et al.*, 2012; modifitseeritud).

Keskkonnafaktoreid, mille tunneb ära GacS sensorkinaas, pole veel suudetud täpselt kindlaks teha. Siiski näitavad katsed *E. coli*, *V. cholerae*, *P. fluorescens*'i ja *P. wasabiae*'ga, et GacS/GacA signaalirada aktiveeritakse, kui rakkude tihedus on piisavalt suur. Täheldatud on ka signaaliraja aktivatsiooni bakterite kasvukiiruse aeglustumisel statsionaarse kasvufaasi alguses (Heeb ja Haas, 2001; Hyytiäinen *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2005,2006; Lenz *et al.*, 2006; Molofsky ja Swanson, 2003; Weilbacher *et al.*, 2003).

Meie laboris on *gacS* geenist ülesvoolu ennustatud kaks Fis-i seondumisjärjestust, FisII ja FisIII, ja näidatud ka Fis-i seondumine neile järjestatustele *in vitro* (Lahesaare magistr töö, 2011). Samuti on näidatud, et Fis-i üleekspressioon aktiveerib *gacS*-i transkriptsiooni, kuid ainult M9 glükoos-CAA-söötmes, mitte LB-s. Fis aktiveeris transkriptsiooni M9 söötmes ka siis, kui FisII seondumisjärjestus *gacS* promootori ees on muteeritud (Moor bakalaureusetöö, 2011). Samas on näidatud, et *in vitro* muteeritud FisII järjestusele Fis ei seonu (Lahesaare magistr töö, 2011). Seega võib arvata, et *gacS*-i transkriptsioon on keeruline ning selle regulatsioonis osaleb Fis-ile lisaks veel teisi faktoreid.

1.3.2 Rsm süsteem

Rsm (ingl k *regulator of secondary metabolites*) süsteem kuulub samasse signaalratta koos GacS/GacA kahekomponendilise süsteemiga ja koosneb translatsiooni repressorist RsmA-st (või RsmE-st) ja väikestest mittekodeerivatest RNA-dest (Jimenez *et al.*, 2012). RsmA reguleerib *P. aeruginosa*'s lausa ~9% 5570-st ennustatud lugemisraamist (Brenic ja Lory, 2009; Burrowes *et al.*, 2005) RsmA kontrollib *P. aeruginosa*'s patogeensust, vesiniktsüaniidi sünteesi (Pessi ja Haas, 2001), tüüp IV piilide ekspressiooni (Brenic ja Lory, 2009), hulgatunnetust (Heurlier *et al.*, 2001) ning tüüp III ja tüüp VI sekretsioonisüsteeme (Brenic ja Lory, 2009). Taimejuuri koloniseerivas bakteris *P. fluorescens* kontrollivad RsmA ja RsmE nii sekundaarsete metaboliitide kui ka eksoensüümide produktsiooni (Heeb *et al.*, 2002).

RsmA inaktiveeritakse, kui temaga seonduvad sRNA-d (Jimenez *et al.*, 2012). RsmA seondumine sRNA-dega sõltub sRNA-de sekundaarstruktuuris olevatest GGA motiividest (Valverde *et al.*, 2004). Korduvad GGA järjestused on olulised sRNA-de seondumiseks nii RsmA-ga kui ka homoloogsete repressorvalkudega (Lapouge *et al.*, 2008). Regulaatorsete sRNA-de puudumisel rakus käituvad RsmA ja RsmE repressoritena: RsmA ja RsmE blokeerivad

ribosoomi seondumissaidi ning takistavad seeläbi translatsiooni (Reimann *et al.*, 2005; Brenic ja Lory, 2009).

Bakterites *P. wasabiae* ja *P. aeruginosa* on identifitseeritud üks RsmA homoloog (Blumer *et al.*, 1999; Chatterjee *et al.*, 1995), *P. fluorescens*’is kaks homoloogi – RsmA ja RsmE (Reimann *et al.*, 2005) ning *P. putida*’s on valgu järjestuse sarnasuse põhjal identifitseeritud lausa kolm RsmA homoloogi – RsmA1 (PP_1746), RsmA2 (PP_3832) ja RsmA3 (PP_4472) (Riho Teras avaldamata andmed). Bakteris *P. fluorescens* CHA0 on kolm reguloorset RNA-d: RsmX, RsmY, RsmZ (Blumer *et al.*, 2005; Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2005; Reimann *et al.*, 1997; Valverde *et al.*, 2003). Vastavad homoloogid RsmX-ile, RsmY-ile ning RsmZ-ile on ennustatud ka *P. putida*’s. Regulaatorsete sRNA-de geenid paiknevad *P. putida* genoomis järgnevalt: RsmX (PP_4049-PP_4050) RsmY (PP_0370-PP_0371) RsmZ (PP_1624-PP_1625) (Riho Teras avaldamata andmed).

Regulaatorsete RNA-de, *rsmX*-i ja *rsmY*-i transkriptsioon sõltub rakutihedusest, suurenedes terve kasvufaasi vältel (Valverde *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005). *RsmZ*-i ekspressioon saavutab maksimumi ekponentsiaalse kasvufaasi lõpuks (Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2005). Kõigi eespool mainitud sRNA-de ekspressiooni aktiveerimiseks on vajalik ülesvoolu jääv konserveerunud järjestus UAS (ingl k *upstream activating sequence*), millega seondub GacA (Humair *et al.*, 2010). Antud 18 nt pikkune konserveerunud järjestus on leitav nii *rsmX*-i, *rsmY*-i, *rsmZ*-i kui ka paljudes teistes gammaproteobakterite sRNA-des (Kulkarni *et al.*, 2006; Lenz *et al.*, 2005). *P. aeruginosa*’s on antud järjestus *rsmY* geeni ees TGTAAGCATTAACCTTACA ja *rsmZ* geeni ees TGTAAGCCAAGGCTTACA (Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006). Antud järjestuse deleteerimine *rsmZ* geeni eest *P. fluorescens*’i tüves CHA0 langetas *rsmZ* ekspressiooni märgatavalt ning kadus sõltuvus GacA-st (Heeb *et al.*, 2002).

Sageli sarnanevad deletsioonid või mutatsioonid sRNA geenides fenotüübilt GacS/GacA mutantidega. Näiteks *P. aeruginosa* $\Delta rsmYZ$ ja $\Delta gacA$ mutantidel on mõlemal häiritud ekstratsellulaarsete virulentsusfaktorite, nagu vesiniktsüaniidi, protsüaniini, elastaasi, kitinaasi süntees ja biofilmi moodustumine (Kay *et al.*, 2006; Brenic *et al.*, 2009). Sarnasusi *rsm* ja *gac* mutantide fenotüüpides on täheldatud ka *Pectobacterium wasabiae*’s (Liu *et al.*, 2008).

1.4 Globaalne regulaatorvalk Fis

Fis (ingl *k factor for inversion stimulation*) on väike DNA-seoseline homodimeerne valk, mis osaleb nii DNA kokkupakkimisel, kuid samas võib käituda ka kui globaalne transkriptsiooniregulaator (Beach ja Osuna, 1998). Üldiselt on Fis levinud γ -proteobakterites ning on suhteliselt hästi konserveerunud (Beach ja Osuna, 1998; Boswell *et al.*, 2004). Näiteks *E. coli* ja *P. putida* Fis valgud on oma aminohappelise järjestuse põhjal 64,8% ulatuses identsed ja 81,7% ulatuses sarnased (www.tigr.org). *E. coli* Fis valgu subühik on 11,2 kDa raskune ning koosneb 98 aminohappest (Safo jt, 1997), *P. putida* Fis on 11,8 kD raskune ning koosneb 106 aminohappest (www.tigr.org). Lisaks on näidatud, et DNA-ga seondumiseks vajalikud aminohapped on Fis valgus konserveerunud (Boswell *et al.*, 2004). Samas Fis-i tähtsus bakterile võib olla erinev. Kui varasemalt on näidatud, et *E. coli* Fis-defektsed tüved on elujõulised, siis pseudomoonaste korral on *fis* geeni muteerimine bakterile surmav ning *fis* tüve pole suudetud konstrueerida (Jakovleva *et al.*, 2012; Liberati *et al.*, 2006; Teras *et al.*, 2009).

Fis-i olemasolu, funktsiooni ja regulatsiooni kohta teistes bakterites, kui *E. coli* ja *Salmonella typhimurium*, on vähe teada (Ball *et al.*, 1992; Finkel ja Johnson, 1992; Ninnemann *et al.*, 1992; Osuna *et al.*, 1995; Pratt *et al.*, 1997). Seega põhineb suur osa Fis-i kohta käivast informatsioonist kahel eespool mainitud bakteril. Samas tuleb arvestada, et kuigi *E. coli* ja *P. putida* Fis valkude omavaheline identsus on üsna suur (64,8%), võivad Fis valgud erinevates bakterites omada erinevaid sihtmärkgeene ja reguloorseid funktsioone (Osuna *et al.*, 1995; Bradley *et al.*, 2007).

DNA järjestus, millega seondub *E. coli* Fis valk, pole väga tugevalt konserveerunud ning sellest tulenevalt võib Fis seonduda teatud juhtudel DNA-ga mittespetsiifiliselt. (Ball *et al.*, 1992). DNA konsensus, millega *E. coli* Fis valk seondub, on GNTYAAAWTTTRANC, kus Y on pürimidiin, R puriin, W adeniin/tümiin ja N mis tahes nukleotiid. Fis-i efektiivseks seondumiseks on olulised järjestuse alguses olev G ning lõpus olev C, lisaks A/T nukleotiidid. (Shao *et al.*, 2008) Fis-i seondumiseks DNA-ga toimub DNA paindumine, mitte valgu konformatsiooni muutus (Stella *et al.*, 2010). Seetõttu on AT-rikkus seondumisjärjestuses oluline vajaliku DNA painde tekkimiseks, mis võib ulatuda 40 kraadist kuni 90 kraadi (Pan *et al.*, 1996; Kostrewa *et al.*, 1991)

Fis valgu ekspressioon sõltub bakterite kasvufaasist. *E. coli*'s ekspresseeritakse Fis-i enim varajases eksponentsiaalses kasvufaasis, mil Fis-i molekulide arv raku koha võib ulatuda kuni 100 000-ni. Edasise bakteripopulatsiooni kasvu jooksul Fis-i ekspressioon väheneb ning statsionaarses faasis on *E. coli*'s praktiliselt detekteerimatu (Ali Azam *et al.*, 1999; Ball *et al.*, 1992).

E. coli's mõjutab Fis enda geeni transkriptsiooni nii otseselt kui kaudselt (Ball *et al.* 1992). *E. coli* *fis*-i promootoralas on kuus Fis-i seodumisjärjestust, millest kaks kattuvad promootoriga, takistades transkriptsiooni initsiatsiooni (Ball *et al.*, 1992; Ninnemann *et al.*, 1992). Kuna *fis*-i promootor aktiveerub tugeva negatiivse superspiralisatsiooni tingimustes ning Fis reguleerib *E. coli* DNA topoisomeraaside ekspressiooni, siis Fis-i hulk mõjutab läbi DNA topoloogia *fis*-i transkriptsiooni (Schneider *et al.*, 2000).

Fis reguleerib geenide transkriptsiooni, mis vastutavad liikumise, energia metabolismi, aminohapete ja nukleotiidide biosünteesi ning toitainete transpordi eest (Bradley *et al.*, 2007). Lisaks on *E. coli*'s ja *S. typhimurium*'s näidatud Fis-i osalust ka virulentsusesgeenide regulatsioonis (Kelly *et al.*, 2004; Blot *et al.*, 2006; Croinin *et al.*, 2006). *E. coli*'s on näidatud, et *fis*-i deleteerimine mõjutab ligi 21% geenidest (Cho *et al.*, 2008). Fis aktiveerib *E. coli*'s rRNA ja tRNA geenide transkriptsiooni ja tagada rRNA ja tRNA molekulide kõrge tase rakkude eksponentsiaalses kasvufaasis, kui valgusüntees on kõige aktiivsem (Xu ja Johnson, 1995).

Fis-i mõju biofilmile võib olla nii positiivne kui negatiivne. Näiteks *E. coli* tüves 042 aktiveerib Fis *aaf* piilide geene, mis on olulised bakteri kinnitumiseks sooleepiteelile ja biofilmi tekkeks (Chaudhuri *et al.*, 2010; Czczulin *et al.*, 1997; Sheikh *et al.*, 2001). Samas represserib Fis *E. coli* tüves E2348/69 *csg* piilide geene (Saldana *et al.*, 2009) ja *Dickeya dadantii*'s tselluloosi sünteesi (Prigent-Combaret *et al.*, 2012), mis on kummalegi bakterile vajalikud biofilmi moodustamiseks. *P. putida*'s mõjutab Fis biofilmi teket positiivselt. Jakovleva *et al.* (2012) näitasid, et Fis vähendab *P. putida* PaW85 liikumist ning indutseerib biofilmi teket.

II EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Kirjandusest on teada, et GacS-i puudumisel langeb *P. putida*'s LapA ekspressioon (Martinez-Gil *et al.*, 2014) ning meie laboris on näidatud, et Fis-i üleekspressioon soodustab *P. putida* biofilmi teket (Jakovleva *et al.*, 2012; Moor *et al.*, 2014). Seost Fis-i ja GacS/GacA signaaliraja vahel on meie laboris juba uuritud. Hanna Moor leidis oma bakalaureusetöös (2011) et *P. putida gacS* geeni ees on vähemalt kaks Fis-i seondumisjärjestust ning Fis-i mõju *gacS*-i transkriptsioonile sõltus söötimest, aktiveerides transkriptsiooni M9 glükoos-CAA söötmes, kuid mitte LB-s (Hanna Moor bakalaureusetöö, 2011). Lisaks eelnevale on meie laboris nähtud, et *lapA* transkriptsioon on Fis-i üleekspressiooniga *P. putida* tüves väga kõikuv. See sõltub rakkude vanusest LB tardsöötmele ning β -galaktosidaasi mõõtmiseks kasvatatud rakkude aeratsiooni lakkamisest (Hanna Moor avaldamata andmed). Geeni *lapA* transkriptsiooni kõikumine Fis-i üleekspressioonitüves võib tuleneda asjaolust, et Fis mõjutab *lapA* transkriptsiooni mõne regulaatori kaudu, mille ekspressioon sõltub bakteri füsioloogilisest seisundist. Üheks võimaluseks on, et Fis reguleerib GacS/GacA signaaliraja alumiste geenide, *rsmA* ja sRNA geenide transkriptsiooni. Sest teada on, et *lapA* transkriptsioon sõltub GacS/GacA signaalirajast ning reguleerides raja alumisi geene on võimalik muuta signaali jõudmist sihtmärkgeenini.

Tuginedes eelnevatele tulemustele, on käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kas Fis reguleerib GacS/GacA raja alumiste geenide (*rsmA* ja sRNA-geenide) transkriptsiooni. Lisaks, kas nende geenide transkriptsioon sõltub bakteri füsioloogilisest seisundist (rakkude seismisest tardsöötmele ning laual).

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud tüved ja plasmiidid

Töös kasutatud tüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tüvi või plasmiid	Genotüüp, iseloomustus	Allikas, viide
<i>P. putida</i>		
PSm	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7-ΩSm kassett (Sm ^R)	Jakovleva jt, 2012
F15	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7-term- <i>lacI</i> ^q - <i>P</i> _{tac} - <i>fis</i> -T1T2- ΩGm kassett (Gm ^R)	Jakovleva jt, 2012
Plasmiid		
pBLKT	Test-vektor <i>lacZ</i> geeni ja T1T2 terminaatoriga (Km ^R)	Moor, 2011
pBLKT-rsmA1	BamHI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>rsmA1</i> (PP_1746) 157 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Moor avaldamata andmed
pBLKT-rsmA2	BamHI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>rsmA2</i> (PP_3832) 432 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Moor avaldamata andmed
pBLKT-rsmA3	BamHI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>rsmA3</i> (PP_4472) 333 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Moor avaldamata andmed
pBLKT-rsmX	BamHI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>rsmX</i> (PP_4049-PP_4050) 363 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Moor avaldamata andmed
pBLKT-rsmY	BamHI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>rsmY</i> (PP_0370-PP_0371) 321 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Moor avaldamata andmed
pBLKT-rsmZ	BamHI-ga avatud pBLKT-sse on inserteeritud <i>rsmZ</i> (PP_1624-PP_1625) 234 nt pikkune promootorala (Km ^R)	Moor avaldamata andmed

2.2.2 Söötmed ja kasvatamine

P. putida rakke kasvatati temperatuuril 30 °C. Rakke kasvatati LB vedelsöötmes, aereerides kultuure loksutil 180 rpm/min. LB tardsöötmele kasvatati rakke temperatuuril 30 °C või toatemperatuuril. Vajadusel lisati söötmesse järgmisi antibiootikume: streptomütsiin (Sm; 200 µg/ml), gentamütsiin (Gm; 10 µg/ml), kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), ning Fis-i ekspressiooni indutseerimiseks IPTG-d (isopropüül-β-tiogalaktosiid, 1 mM). B-galaktosidaasi mõõtmiseks kasutatavate rakkude söötmesse lisati alati kanamütsiini, teisi antibiootikume ei lisatud.

Kontrollimaks, kas laual seismisel vedelsöötmes hapniku sisaldus langeb, pandi söötmesse metüleensinist. Metüleensinine on redoksreaktiivne värv, mis hapniku puudumisel muutub läbipaistvaks ehk valastub (Campbell, 1963). Üleöö 5 ml LB vedelsöötmes kasvanud rakud võeti loksutilt, katseklaasidesse lisati 15 µl metüleensinist ning jäeti lauale seisma kuni 4 tunniks.

2.2.3 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon

PCR-i reaktsioonisegu üldmahuga 20 µl sisaldas: 2µl 10x PCR puhvrit (75 mM Tris HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM tartrasiin; 0,2 mM dNTP; 0,5% Ficoll 40), 0,1 µl Taq DNA polümeraasi (5 U/µl), 10 pmol kumbagi praimerit, matriits DNA ja lõppmahuni destilleeritud vett. Töös kasutatud praimerid on toodud tabelis 2.

PCR-i etapid:

1. DNA esialgne denaturatsioon: 95 °C 3 min
2. DNA denaturatsioon: 95 °C 30 sek
3. Praimerite seondumine DNA ahelaga: 53-55 °C 30 sek
4. DNA süntees: 72 °C 30 sek 2 min

Etappe 2-4 korrati 25 korda

Tabel 2. Kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Praimeri järjestus (5'→3')	Seandumiskoht
LacZ-AB	GTGTTACCCAGAGTCAGC	-20...-3 nt <i>lacZ</i> geenist ülesvoolu
PP1746-Fw	AAGGATCCAACCTGAAACGCCAGGCC	-212...-187 nt <i>PP_1746</i> geenist
PP1746-Rev	AAGGATCCTGCGAAAGGGAAAACCG	-25 nt <i>PP_1746</i> geenist ülesvoolu
PP3832-Fw	AAGGATCCGGAGAGTGAAGCCAAA	-482...-458 nt <i>PP_3832</i> geenist ülesvoolu
PP4472-Fw	TTGGATCCAACATAGCTTTCTCCTTAC	-274...-247 nt <i>PP_4472</i> geenist ülesvoolu
RsmX-Fw	AAGGATCCGCTGGTGGCTTCGG	-402...-382 nt <i>rsmX</i> geenist ülesvoolu
RsmY-Fw	AAGGATCCGCTGGTGGCTTCGC	-264...-242 nt <i>rsmY</i> geenist ülesvoolu
RsmY-Rev	TCCTGTGCACAGTTCGAATAC	-8 nt <i>rsmY</i> geenist üles- ja +11 nt allavoolu
RsmZ-Fw	AAGGATCCGGTGGTGTGAGAGGAC	-346...-322 nt <i>rsmZ</i> geenist ülesvoolu
RsmY-Fw2	ACAGGTATCGCCTAAGTTTG	-144...-124 nt <i>rsmY</i> geenist ülesvoolu
RsmY-Rev2	CTGGCAGGTGGTCCTTC	+46...+63 nt <i>rsmY</i> geenist ülesvoolu

2.2.4 DNA geelelektroforees

DNA fragmentide olemasolu ja pikkuste kontrollimiseks kasutati geelelektroforeesi. PCR-i proov kanti agarosgeelile (1% agarosi TAE puhvis: 50mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi (0,25 µg/ml). Elektroforees toimus 10 V/cm juures TAE puhvis ning geeli pilt visualiseeriti UV valguses.

2.2.5 *P. putida* elektroporatsioon ja transformatsioon

P. putida rakke kasvatati üleöö 5 ml vajadusel antibiootikumi sisaldavas LB söötmes temperatuuril 30 °C. Rakud tsentrifugeeriti põhja (16000 g, 60 sek) ning pesti seejärel kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeeriti 500 µl 300 mM sahharoosi lahuses.

Plasmiidse DNA viimiseks bakterirakkudesse kasutati elektroporatsiooni. Selleks lisati 50 µl kompetentsetele rakkudele ~10 ng plasmiidset DNA-d. Elektroporatsioon toimus BioRad-i elektroporaatoriga pingel 2500 V. Rakud pesti küvetist välja 1 ml LB-söötmega ning asetati vähemalt 45 minutiks temperatuurile 30 °C aereerima. Aereerimise järel tsentrifugeeriti bakterirakud söötmest välja ning plaaditi selektiivtassile.

Transformatsiooniks vajalike kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati *P. putida* rakke üleöö temperatuuril 30 °C. Üleöökuultuurist tehti 50 x lahendus 5 ml LB söötmesse ning kasvatati kuni tiheduseni $OD_{580} = 0,5$. Seejärel jahutati bakterikultuur, hoides katseklaase 5 min jäävees. Eppendorfi tuubi valati 1,5 ml bakterikultuuri, rakud tsentrifugeeriti põhja (16000 g 60 sek) ja supernatant eemaldati. Rakkudele lisati 1 ml jääkülma 100 mM $CaCl_2$ lahust ja suspendeeriti hoolikalt. Rakke hoiti 10 min jääs. Seejärel tsentrifugeeriti rakud põhja (3300 g, 60 sek), supernatant eemaldati, rakkudele lisati 100 µl jääkülma 100 mM $CaCl_2$ lahust ja suspendeeriti hoolikalt. Rakke hoiti 30 minutit jääs. 30 minuti möödudes lisati 100 µl kompetentsetele rakkudele 10 ng DNA-d. Rakkudele tehti kuumašokk, hoides rakke temperatuuril 42 °C 1,5 minutit, misjärel asetati rakud koheselt 5 minutiks tagasi jääle. Seejärel pipeteeriti transformatsioonisegule 1 ml LB söödet ning aereeriti 1 h temperatuuril 30 °C. Aereerimise järel tsentrifugeeriti bakterirakud söötmest kokku 16000 g 60 sek ning plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.6 B-galaktosidaasi mõõtmine

Geenide transkriptsiooni aktiivsuse uurimiseks kasutati Milleri meetodikat, mis põhineb reportergeeni *lacZ* kasutamisel promootori aktiivsuse hindamisel (Miller, 1972). Kõigil juhtudel kasvatati *P. putida*'t β-galaktosidaasi eriaktiivsuse hindamiseks järgnevalt: 5 ml LB-vedelsöödet inokuleeriti *P. putida*'ga ning bakterit kasvatati 18 h temperatuuril 30 °C, aereerides bakterikultuuri loksutil 180 rpm/min. Vajadusel lisati söötmesse 1 mM IPTG-d.

B-galaktosidaasi eriaktiivsust mõõdeti kollase produkti, orto-nitrofenooli tekkimise järgi raku kohta. Rakutihedus mõõdeti spektrofotomeetriga 580 nm juures. Eriaktiivsuse mõõtmiseks tehti reaktsioonisegu, mis sisaldas 800 µl Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 28 mM β-merkaptotetanool; pH 7), 50 µl kloroformi, 1-40 µl bakterikultuuri ja 200 µl ONPG-d (orto-nitrofenüül- β-D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml). Reaktsioon peatati kollase värvuse tekkimisel 500 µl 1 M Na₂CO₃-ga.

Eriaktiivsuse arvutamiseks mõõdeti kollase värvuse tekkimiseks kulunud reaktsiooniaeg. Reaktsioonis tekkinud produkti, orto-nitrofenooli hulk määrati spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 420 nm ja lüüsitud rakkude tihedus lainepikkusel 550 nm. β-galaktosidaasi eriaktiivsus E arvutati valemiga:

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

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

2.2.7 Uuritavate geenide transkriptsiooni sõltuvuse hindamine *P. putida* füsioloogilisest seisundist ja Fis-st

Aeratsiooni mõju hindamiseks kasvatati bakterit LB vedelsöötmes 18 tundi, aereerides bakterikultuuri loksutil. Aereeritud rakukultuurist mõõdeti β-galaktosidaasi eriaktiivsust kohe bakterikultuuri loksutil võtmise järel (0-ajapunkt). Aeratsiooni peatamise mõju hindamiseks hoiti 18 tundi kasvatatud rakke laual 2 ja 4 tundi (vastavalt 2 tunni ja 4 tunni ajapunkt). Kasvama pandi kaks komplekti katseklaase: üks komplekt 0 tunni jaoks ning teine komplekt 2 ja 4 tunni jaoks. Kõik mõõtmised on tehtud vähemalt 2 bioloogilise kordusena, mis antud juhul tähendab 2 erinevat poreerimist. Iga bioloogilise korduse puhul mõõdeti β-galaktosidaasi 5 erineva koloonia rakkudest.

Bakterite LB tardsöötmele seismise ehk vanuse mõju hindamiseks uuritavate geenide transkriptsioonile toimiti järgnevalt. Vajalik plasmiid viidi elektroporatsiooniga *P. putida*'sse,

selekteeriti üksikolooniad ning üksikkolooniad külvati edasi sektorisse LB tardsöötmele, millele oli lisatud vastav antibiootikum. LB tardsöötme sektoris olevaid baktereid kasvatati üleöö 30 °C termostaadis (värsked rakud) ja lisaks sellele veel 4 ööpäeva toatemperatuuril (vanad rakud). Tardsöötmele kasvanud värsked ja vanu rakke kasutati LB vedelsöötme inokuleerimiseks ning β -galaktosidaasi mõõtmiseks nagu eespool kirjeldatud.

Uuritavate geenide transkriptsiooni sõltuvust Fis-st hinnati *P. putida* Fis-i üleekspressioonitüves F15. Fis-i üleekspressiooniks lisati söötmesse IPTG-d, lõppkontsentratsiooniga 1 mM.

Elektrišoki mõju uuritavate geenide transkriptsioonile. Esmalt mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivust värsketest rakkudest, millesse viidi vastav plasmiid elektroporatsiooniga ja transformatsiooniga sisse. Seejärel hinnati elektrišoki mõju nn vanadele rakkudele, kuhu oli juba eelnevalt plasmiid sisse viidud. Selleks kraabiti neli päeva LB tardsöötmele kasvanud rakud kokku, suspendeeriti 1 ml LB vedelsöötmes ning jätkati nende töötlust nagu kompetentsete rakkude valmistamisel (ptk 2.2.5). Saadud rakuksuspensioon jagati kaheks, millest üht osa mõjutati elektriga, teist mitte. Ülejäänud osas töödeldi rakke sarnaselt. Elektriga mõjutamiseks pipeteeriti rakuksuspensioon küveti ning pulseeriti pingel 2500 V. Seejärel pesti rakud küvetist välja, pandi kasvama 5 ml LB söötmesse ning aereeriti loksutil temperatuuril 30 °C üks tund. Tunni aja möödudes lisati katseklaasidesse sobiv antibiootikum ning 18 h möödudes määrati rakkudest β -galaktosidaasi eriaktiivsus.

Kontrollimaks, kas kolooniaks kasvamine mõjutab geeni transkriptsiooni, viidi läbi eespool kirjeldatule sarnane katse, kus elektriga mõjutatud ja mõjutamata rakud selekteeriti tardsöötmele üksikkolooniateks ja seejärel külvati sektorisse. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse hindamiseks inokuleeriti vedelsööde sektoris üleskasvanud bakteritega.

Mikroaeroobsuse tekitamiseks kasvatati rakke 3 ml LB vedelsöötmes, 200 rpm/min juures. Katseklaasid asetati kilekottidesse, millesse lisati CampyGen CNOO25A kotike (Oxoid, LTD; UK) ning suleti klambriga. CampyGen kotike sisaldab redutseeritud askorbiinhapet, mis seob kotis oleva hapniku ning tekitab mikroaeroobse keskkonna. Tootja andmeil tekib keskkond, kus on 6% hapnikku ning 14% süsihappegaasi. Mikroaeroobses keskkonnas olevad bakteritega inokuleeritud katseklaasid pandi sarnaselt aeroobses keskkonnas olevate bakteritega loksutile. Kasvama pandi kaks komplekti katseklaase CampyGen kottides: üks 0 h jaoks ja teine 4 h jaoks.

18 h möödudes võeti mõlemad komplektid loksutilt: üks komplekt avati ning mõõdeti kohe β -galaktosidaasi eriaktiivsusi (0 h), teisel komplektil lasti laual seista 4 h ning mõõdeti siis β -galaktosidaasi eriaktiivsust (4 h).

2.2.8 Fis-i seondumisjärjestuste ennustamine *in silico*

Fis-i seondumissaitide ennustamiseks GacS/GacA signaaliraja alumiste geenide ette kasutati arvutiprogrammi *RSA-tools-matrix-scan* (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsa-tools/>). Taustmudeliks (*Background model*) valiti Markovi suurusklass 0 (*Markov order 0*), olulisusnivooks (α) võeti 10^{-3} , ülejäänuid programmi poolt sätestatud tingimusi ei muudetud. Maatriksina kasutati *E. coli* Fis-i seondumisjärjestuste maatriksit (Gama-Castro *et al.*, 2010). *E. coli* maatriksi koostamisel on aluseks võetud 213 DNA järjestust, mille korral on katseliselt näidatud *E. coli* Fis-i seondumine.

2.2.9 DNAas I jalajälje analüüs

Fis valgu *in vitro* seondumise uurimiseks kasutati Dnaas I jalajälje analüüsi. Esmalt kineeriti soovitud praimerit 5' otsa [γ - 32 P] ATP. Reaktsioonisegu lõppmahuga 20 μ l sisaldas 10 pmol praimerit, 5 μ Ci [γ - 32 P] ATP-d, Fermentase kineerimispuhvrit A (50 mM TrisHCl, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,1 mM spermidiin; 0,1 mM EDTA), 5 U T4 polinukleotiid kinaasi (Fermentas) ja lõppmahuni vett. Reaktsioonisegu inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 37 °C. Seejärel sadestati proov 1/10 mahu 5 M NaCl ja 3 mahu 96% etanooliga temperatuuril -20 °C 10 minutit ning tsentrifuugiti 16000 g 10 minutit. Sadet pesti 75% etanooliga ning tsentrifuugiti 10 minutit 16000 g. Proovi kuivatati 5 minutit temperatuuril 37 °C ja lahustati 6 μ l-s vees.

Radioaktiivse proovi saamiseks amplifitseeriti soovitud DNA lõik PCR-iga, kus üheks praimeriks oli eespool saadud radioaktiivselt märgistatud praimer, teine märgistamata, tavaline praimer. Primereid võeti 10 pmol. Saadud produkt puhastati läbi 5% polüakrüülamiidgeeli, jooksutamiseks kasutati TBE puhvrit (45 mM TrisHCl; 45 mM boorhape; 0,9 mM EDTA, pH 7,5), lisati ka 1 μ l etiidiumbromiidi (0,25 μ g/ml). Geelelektroforees toimus pingel 12 V/cm. DNA fragmendid lõigati välja ultravioletvalguses ning elueeriti üleöö 500 μ l-s elueerimispuhvris (0,5

M NH₄Ac; 10 mM MgAc; 1 mM EDTA; 0,1% SDS) 37 °C loksutil. Geelitükkidest lahusesse imunud radioaktiivne proov sadestati 2 mahu 96% etanooliga temperatuuril -20 °C 10 minutit ning tsentrifugeeriti 10 minutit 16000 g. Sadet pesti 75% etanooliga ja tsentrifugeeriti 5 minutit 16000 g. Proov kuivatati 3 minutit temperatuuril 37 °C ning lahustati 100 µl-s vees. Proovi radioaktiivsus mõõdeti *Liquid Scintillation Analyzer* (Perkin Elmer) masinaga.

Valgu seondumisreaktsiooniks DNA-le tehti reaktsioonisegu, lõppmahuga 50 µl, mis sisaldas 1 x jalajälje puhvrit (25 mM TrisHCl, pH 7.5; 0,1 mM EDTA; 50 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 5% glütserool), 1 µg SS, 5 Mg BSA, 30000 CPM-i radioaktiivset proovi, erineva kontsentratsiooniga Fis valku ning lõppmahuni vett. Reaktsioon toimus toatemperatuuril 20 minuti jooksul. Seejärel töödeldi proove 0,075 U DNAas I-ga 1-3 minutit, olenevalt Fis valgu kontsentratsioonist, reaktsioon peatati 50 µl stopp-lahusega (20 mM TrisHCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 0,8% SDS; 0,1 µg/µl SS). Seejärel proovid ekstraheeriti, lisades 50 µl fenooli ja 50 µl kloroformi ning tsentrifugeeriti 16000 g 5 minutit. Proovid sadestati 1/10 mahu 5 M NaCl ja 3 mahu 96% etanooliga. Sadet pesti 75% etanooliga, kuivatati 3 minutit temperatuuril 37 °C ning lahustati 3 µl-s vees. Enne geelile kandmist lisati proovidele 3 µl sekvensivärvi (10 mM EDTA; 0,3% broomfenoolsinine; 0,3% ksüleentsüanool) ja kuumutati 3 minutit temperatuuril 96 °C. DNA sekveneerimisreaktsioonide valmistamiseks kasutati Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit-i (USB Corporation) ensüüme ja lahuseid. Reaktsioon teostati, kasutades tootja protokollid.

Proovid lahutati 6.5% polüakrüülamiidgeelis, mis sisaldas 8 M uuread. Jooksupuhvriks kasutati 0,5x TBE-d. Elektroforees toimus temperatuuril 53 °C, pingel 2000 V. Geel kuivatati vaakumkuivatis ja eksponeeriti Phosphoimageri ekraanile (Amersham Bioscience) ning ilmutati *Phosphoimager Typhoon III* masinaga.

2.2.10 Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati paketti Statistica 13. Tulemusi analüüsiti multifaktoriaalse ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. P-väärtused arvutati Bonferroni testiga programmis PostHoc. Joonistel on näidatud keskmised koos 95% usalduspiiridega. Statistilist analüüsi tehti PSm ja F15 rakkudele eraldi.

2.3 Tulemused

Meie laboris on eelnevalt mõõdetud *lapA* transkriptsiooni testvektoriga pBLKT (tabel 1), mis põhineb uuritava geeni promootorala kloonimisel *lacZ* geeni ette ja β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmisel. Panime tähele, et *lapA* promootorala korral sõltus β -galaktosidaasi eriaktiivsus ettekasvatatud bakterite seismisest laual ehk aeratsiooni peatumisest. Tulemused muutusid, kui katseklaasid jäid lauale seisma umbes 10 – 20 minutiks (Hanna Moor avaldamata andmed). Võimalik, et *lapA* transkriptsiooni kõikumised tulenesid asjaolust, et Fis mõjutab regulaatorit, mis kontrollib biofilmiks vajalike geenide transkriptsiooni, kuid mille enda ekspressioon sõltub rakkude füsioloogilisest seisundist. Tähelepanu koondus GacS/GacA signaaliraja alumiste geenidele, nagu *rsmA* ja sRNA geenid. Sellest tulenevalt sai töö eesmärgiks välja selgitada, kas Fis reguleerib GacS/GacA raja alumiste geenide transkriptsiooni ning kas nende geenide transkriptsioon sõltub rakkude füsioloogilisest seisundist. Seetõttu hinnati kolme faktori mõju GacS/GacA signaaliraja alumiste geenide transkriptsioonile:

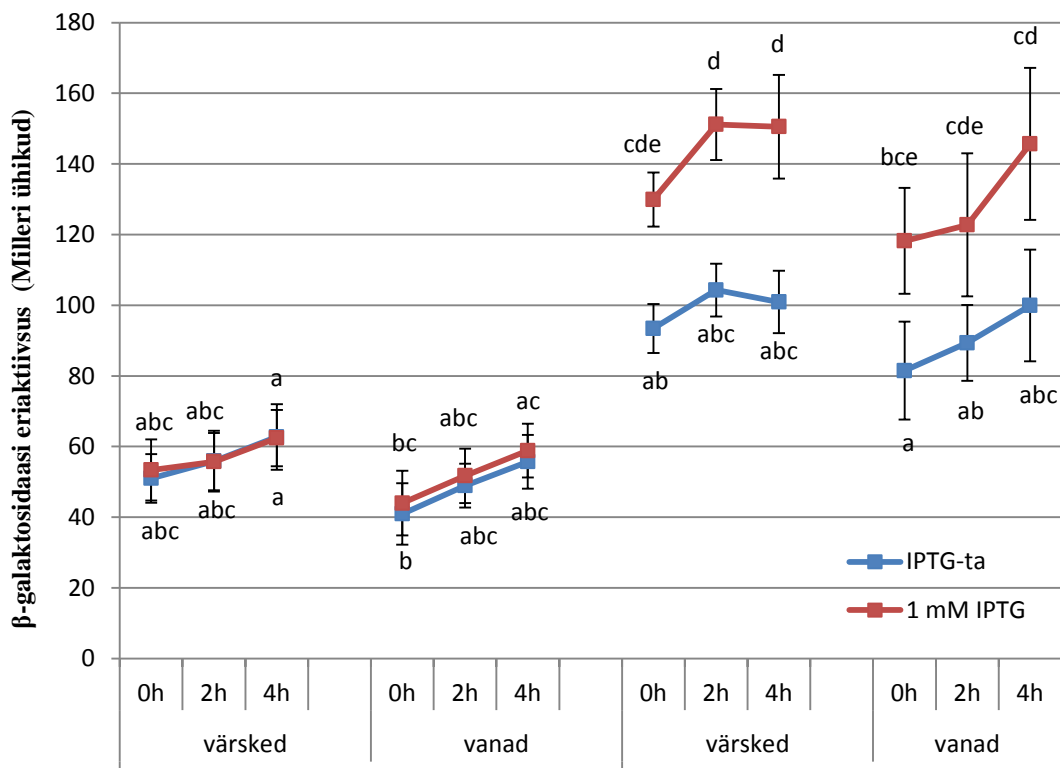
1. rakkude oldud aeg LB-tardsöötmele enne vedelsöötmesse külvamist (nn rakkude vanus)
2. LB vedelsöötmes kasvatamise järel aeratsiooni lakkamine (nn laual seismine laual)
3. sõltuvust Fis-st.

Bakterite füsioloogilise seisundi mõju uuritavate geenide transkriptsioonile hinnati esmajoonel *P. putida* metsiktüves PSm ning Fis-i mõju geenide transkriptsioonile tüves F15, vältimaks Fis-i üleekspressiooni tüvest lähtuvat valeintepretatsiooni ning töö mahu tarbetut suurenemist.

Kuna *fis* geeni deleteerimine arvatakse olevat *P. putidale* letaalne (Jakovleva *et al.*, 2012; Liberati *et al.*, 2006; Teras *et al.*, 2009), siis Fis-i rolli uurimiseks on kasutusel *P. putida* Fis-i üleekspressioonitüvi F15. *P. putida* F15 tüve kromosoomi on viidud P_{tac} -kontrolli all olev *fis*-üleekspressioonikassett ning IPTG lisamine söötmesse aktiveerib Fis-i ekspressiooni nimetatult kassetilt. Sellest lähtuvalt hinnati esmalt IPTG mõju *P. putida* metsiktüvele PSm ning leiti, et IPTG lisamine söötmesse ei mõjutanud mitte üheski katses *P. putida* PSm-s β -galaktosidaasi eriaktiivsust (joonised 2, 3, 5, 6, 7, 9)

2.3.1 Geeni *rsmA1* transkriptsiooni regulatsioon

Aeratsiooni lakkamine ei mõjuta *rsmA1* transkriptsiooni *P. putida*'s. Kui võrrelda β -galaktosidaasi eriaktiivsusi ajapunktides 0, 2 ja 4 tundi, siis võib täheldada β -galaktosidaasi eriaktiivsuste mõningast suurenemist, kuid erinevused pole statistiliselt olulised (joonis 2).



Joonis 2. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm ja F15 rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-*rsmA1* plasmidi. *P. putida* tüvesid PSm ja F15 kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmel üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardsöötmel neli päeva. Tulemuste artimeetilised keskmised on leitud 2 bioloogiliselt sõltumatu katse 10 paralleelist. Esitatud on artimeetilise keskmise 95% usalduspiirid ja homogeenusrühmad.

P. putida seismine tardsöötmel ei mõjuta *rsmA1* transkriptsiooni. Võrreldes värskete ja vanade rakkude β -galaktosidaasi eriaktiivsusi, siis β -galaktosidaasi eriaktiivsused langevad väga hästi kokku ning nende vahel pole statistiliselt olulisi erinevusi (joonis 2).

Fis-i üleekspressioon *P. putidas* võimendab *rsmA1* transkriptsiooni. Võrreldes F15 IPTG-ta ja 1 mM IPTG-ga LB-s kasvanud rakkude β -galaktosidaasi eriaktiivust, siis IPTG-ga kasvanud rakkudest mõõdetud LacZ-eriaktiivsus oli alati statistiliselt olulisel määral kõrgem kui

IPTG-ta kasvanud rakkudes, välja arvatud F15 vanad rakud, mis olid laual seisnud 4 tundi (joonis 2). Fis-i üleekspressioon suurendas LacZ-eriaktiivsust 1,4 kuni 1,5 korda, väikseim erinevus oli värskete rakkude 2 h punktis ($p = 0,003$), suurim erinevusvärskete rakkude 4 h punktis ($p = 0,002$) vanades rakkudes (joonis 2).

Nendest tulemustest lähtuvalt: *rsmA1* transkriptsioon ei sõltu *P. putida* aeratsiooni lakkamisest ega vanusest LB tardsöötmele, küll aga Fis-st, mis aktiveerib *rsmA1* transkriptsiooni sõltumata rakkude füsioloogilisest seisundist.

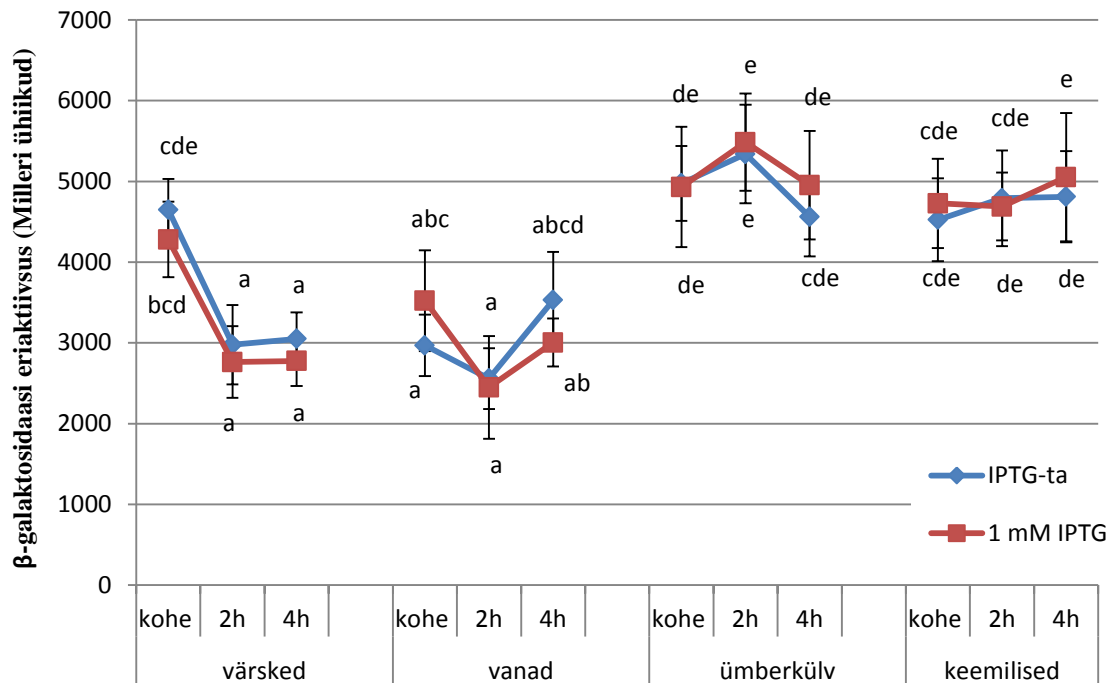
2.3.2 Geeni *rsmA2* transkriptsiooni regulatsioon

***P. putida* metsiktüves PSm langeb *rsmA2* transkriptsioon aeratsiooni lakkamisel.** PSm värsketes rakkudes, mis on kasvanud IPTG-ta, väheneb 0 h ja 4 h ajapunkti vahel β -galaktosidaasi eriaktiivsus 1,5 korda ($p < 0,001$; joonis 4). Samas, PSm vanades rakkudes ei mõjuta aeratsiooni lakkamine statistiliselt olulisel määral transkriptsiooni aktiivsust (joonis 3).

***P. putida* PSm-i vanus tardsöötmele pärsib *rsmA2* transkriptsiooni.** Rakkude seismine LB tardsöötmele mõjutab β -galaktosidaasi eriaktiivsust *P. putida* IPTG-ta kasvanud värsketes rakkudes (joonis 3). Kui võrrelda omavahel PSm värskete rakkude 0 h punkti vanade rakkude 0 h punktiga, siis transkriptsiooni aktiivsus on langenud 1,6 korda ($p < 0,001$), samas IPTG juuresolekul kasvanud rakkudes on β -galaktosidaasi eriaktiivsused langenud 1,2 korda ($p = 1$). Lisaks kui võtta arvesse, et laual seismine mõjutab transkriptsiooni *rsmA2* promootoralalt värsketes rakkudes ja mitte vanades rakkudes (joonis 3), siis LB tardsöötmele rakkude seismine mõjutab *rsmA2* transkriptsiooni.

Kontrollimaks, kas PSm vanade rakkude transkriptsiooni aktiivsuse langus võib tuleneda toitainetepuudusest tardsöötmele, külvati 4 päeva tassil seisnud rakud uuele LB tardsöötmele, millega taastati rakkudele vajaliku süsinikuallika olemasolu. Ümber külvatud rakkude transkriptsiooni aktiivsus on IPTG-ta söötmes nullpunktis ligikaudu 1,7 korda kõrgem ($p < 0,001$) ja IPTG-ga ligikaudu 1,4 korda kõrgem kui vastavates vanades rakkudes ($p < 0,001$; joonis 3). Ümberkülvatud rakkude IPTG-ta kasvanud rakkude 0 h punkt sarnaneb statistiliselt värskete rakkude 0 h punktiga ($p = 1$) ja erineb statistiliselt vanade rakkude 0 h punktiga ($p < 0,001$). Ka ümberkülvatud rakkude IPTG-ga kasvanud rakkude 0 h punkt sarnaneb statistiliselt

värskete rakkude 0 h punktiga ($p = 1$) ning erineb vanade rakkude 0 h punktist ($p < 0,001$). Seega ümberkülvamise uuele söötmele taastab rakkude *rsmA2* aktiivsuse värskete rakkude 0 h väärtuste tasemele (joonis 3). Samas ümberkülvatud rakkudel laual seismisest tulenevalt β -galaktosidaasi eriaktiivsuse langust polnud (joonis 3).

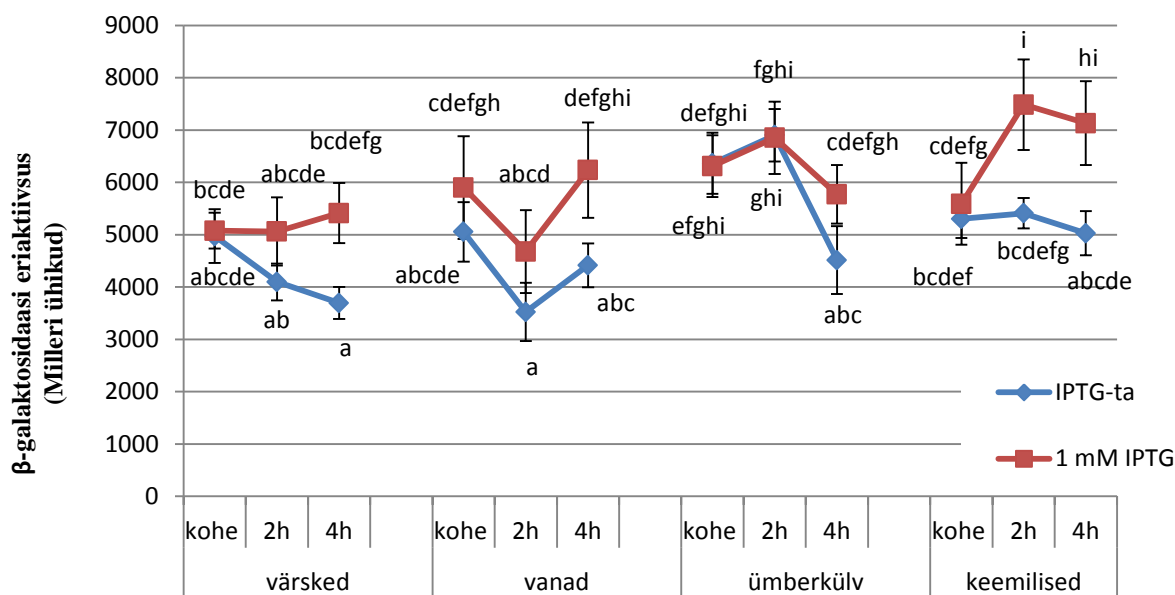


Joonis 3. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmA2 plasmidi. *P. putida* tüve PSm kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmele üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardöötmele neli päeva. Ümberkülv - neli päeva LB tardsöötmele olnud rakud, mis on külvatud uuele LB tardsöötmele. Keemilised – DNA on rakkudesse viidud transformatsiooniga. Tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud 3 bioloogiliselt sõltumatu katse 15 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

Kuna vanade rakkude ümberkülvamisel LB tardsöötmele ei taastunud β -galaktosidaasi eriaktiivsuse sõltuvus aeratsiooni lakkamisest, vaid säilis vanade rakkude fenotüüp, uuriti kas DNA viimine rakkudesse elektroporatsiooni teel võib sellist efekti esile kutsuda. Selleks kasutati keemiliselt töödeldud rakkude transformatsiooni temperatuurišoki abil ning rakke kasvatati sarnaselt kui elektroporeeritud värsked rakke. Võrreldes omavahel transformeeritud rakkude 0 h punkti ja värskete rakkude 0 h punkti, siis väärtused on omavahel sarnased ($p = 1$).

Transformeeritud rakkude korral ei esine aga 0 h ja 4 h ajapunktis β -galaktosidaasi eriaktiivsuse langust, vaid eriaktiivsus jääb mõlemas ajapunktis värskete rakkude 0 punkti tasemele, sõltumata laual seismisest. Järelikult sõltub PSm rakkudes transkriptsiooni aktiivsus sellest, mil viisil on pBLKT-rsmA2 rakkudesse viidud.

Fis mõjutab *rsmA2* transkriptsiooni positiivselt aeratsiooni vähenemisel. Taoline efekt püsib kõigis mõõdetud katsevariantides, erandiks on vaid ümber külvatud rakud, kus Fis suurendab 4 tunni punktis β -galaktosidaasi eriaktiivsust 1,3 korda ($p = 1$; joonis 4). Värsketes rakkudes suurendab Fis laual seistes β -galaktosidaasi eriaktiivsust 4 h ajapunktis 1,5 korda ($p < 0,001$), vanades rakkudes 4 h ajapunktis 1,4 korda ($p = 0,017$) ja transformeeritud rakkudes 4 h ajapunktis 1,4 korda ($p < 0,001$).



Joonis 4. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* F15 rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmA2 plasmidi. *P. putida* tüve F15 kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmele üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardsöötmele neli päeva. Ümberkülvl - neli päeva LB tardsöötmele olnud rakud, mis on külvatud uuele LB tardsöötmele. Keemilised – DNA on rakkudesse viidud transformatsiooniga. Tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud 3 bioloogiliselt sõltumatu katse 15 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

Geeni *rsmA2* transkriptsiooni mõjutab metsiktüves rakkude seismine tardsöötmele, toitainete olemasolu ja DNA rakku sisseviimise meetod. Fis aktiveerib *rsmA2* transkriptsiooni, siis kui rakke enam ei aereerita. Täpsemalt öeldes, Fis-i üleekspressioon hoiab ära *rsmA2* transkriptsiooni languse pärast aeratsiooni lakkamist.

2.3.3 Geeni *rsmA3* transkriptsiooni regulatsioon

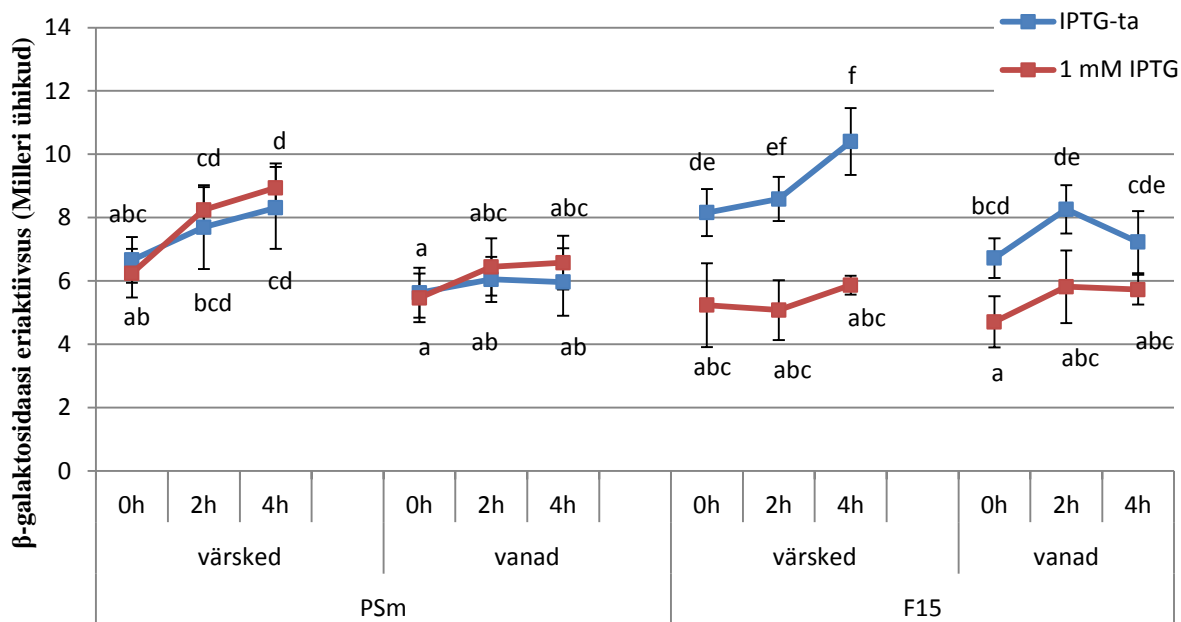
Geeni *rsmA3* transkriptsioon on LB söötmes väga madal (joonis 5). Tühja pBLKT plasmidi korral on *P. putida*'s β -galaktosidaasi eriaktiivsus 0,9 Milleri ühikut (Lahesaare *et al.*, 2014). Seega pole *rsmX* LB söötmes aktiivne või on tegemist väga madala transkriptsiooniga. Seetõttu on LB tardagaril seismise, aeratsiooni ning Fis-i mõju hindamine geeni transkriptsioonile raskendatud.

Aeratsiooni lakkamise mõju *P. putida* *rsmA3* transkriptsioonile on keeruline üheselt hinnata. *P. putida* metsiktüves PSm IPTG-ga LB-s kasvanud värsketes rakkudes tõuseb β -galaktosidaasi eriaktiivsus laual seismisel 1,4 korda ($p = 0,001$), kuid IPTG-ta kasvanud värsketes rakkudes laual seismine β -galaktosidaasi eriaktiivsust ei mõjuta ($p = 0,299$). *P. putida* vanades rakkudes laual seismine β -galaktosidaasi eriaktiivsust ei mõjuta (joonis 3).

Rakkude LB-tardsöötmele seismise mõju *rsmA3* transkriptsioonile on keeruline üheselt hinnata. Kui võrrelda PSm värskete ja vanade rakkude nullpunkte, siis on LB tardsöötmele seisnud rakkudes β -galaktosidaasi eriaktiivsus mõningal määral langenud (kuni 1,2 korda). Siiski see langus pole statistiliselt oluline erinevus (joonis 5). Kui võrrelda β -galaktosidaasi eriaktiivsuste muutust aeratsioonita rakkudes, siis on märgata, et värsked ja vanad rakud käituvad erinevalt. Võrreldes *P. putida* metsiktüve PSm-i vanade ja värskete rakkude β -galaktosidaasi eriaktiivsusi, mis on seisnud 4 tundi laual, siis nii IPTG-ta ($p = 0,004$) kui ka IPTG-ga kasvanud ($p = 0,010$) rakkude tulevad välja statistiliselt olulised erinevused.

Fis-i üleekspressioon F15 tüves vähendab β -galaktosidaasi eriaktiivust. Võrreldes F15 IPTG-ta ja 1 mM IPTG-ga LB-s kasvanud rakkude nullpunkte, siis IPTG lisamine söötmesse vähendab β -galaktosidaasi eriaktiivust värsketes rakkudes 1,6 korda ($p < 0,001$) ja vanades rakkudes 1,4 korda ($p = 0,023$; joonis 5). Kui *rsmA2* promootori korral tuli Fis-i efekt välja alles laual seistes 4 tundi (joonis 5), siis *rsmA3* korral mõjutab Fis transkriptsiooni antud promootorilt

kõigis mõõdetud ajapunktides, välja arvatud vanade rakkude 4 h ajapunktis, kus β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtuste vahel statistilist olulisi erinevusi pole ($p = 1$).



Joonis 5. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm ja F15 rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmA3 plasmidi. *P. putida* tüve PSm ja F15 rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmele üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardöötmele neli päeva. Tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud 2 bioloogiliselt sõltumatu katse 10 paralleelset. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeenisrühmad.

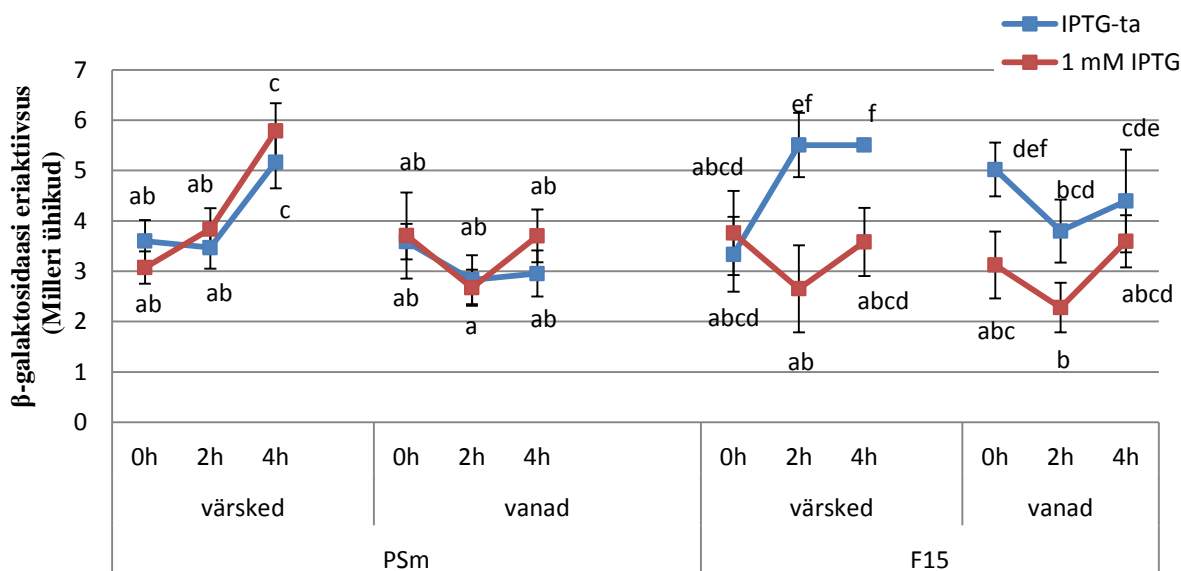
Geeni *rsmA3* transkriptsioon LB söötmes on väga madal ning võimalik, et pole leitud tingimusi, kus antud geen oleks aktiivne. Antud geeni korral võib LB tardsöötmele seismine ning laual seismine mõjutada geeni transkriptsiooni, kuid antud tulemuste puhul seda kindlalt väita ei saa. Fis avaldab *rsmA3* transkriptsioonile negatiivset mõju, kusjuures Fis-i inhibeeriv efekt ei sõltu rakkude aeratsioonist ega vanusest.

2.3.4 Geeni *rsmX* transkriptsiooni regulatsioon

Sarnaselt *rsmA3* transkriptsioonile, on *rsmX*-i transkriptsioon LB söötmes madal ning võimalik, et geen on aktiivne teistuguses keskkonnatingimustes.

Aeratsiooni lakkamine aktiveerib *rsmX* transkriptsiooni värsketes PSm rakkudes. IPTG-ta LB-s kasvanud rakkude korral tõuseb β -galaktosidaasi eriaktiivsus neljatunnilise laual seismisega 1,4 korda ($p < 0,001$), IPTG-ga söötmes kasvanud rakkude korral aga 1,9 korda ($p < 0,001$).

Sarnaselt *rsmA3* transkriptsioonile on ka LB tardsöötmel rakkude seismise mõju *rsmX* transkriptsioonile keeruline üheselt hinnata (joonis 6). *P. putida* PSm-i vanade ja värskete rakkude nullpunktides mõõdetud β -galaktosidaasi eriaktiivsused on sarnased. 4 tundi laual seistes on vanade rakkude β -galaktosidaasi eriaktiivsus on võrreldes värskete rakkudega IPTG-ta kasvanud rakkudes 1,7 korda madalam ($p < 0,001$) ja IPTG-ga kasvanud rakkudes 1,6 korda madalam ($p < 0,001$). See viitab *rsmX*-i transkriptsiooni sõltuvusele bakteri füsioloogiast, mis tekib LB tardsöötmel seistes (joonis 6).



Joonis 6. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm ja F15 rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-*rsmX* plasmidi. *P. putida* tüve PSm ja F15 rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmel üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardsöötmel neli päeva. Tulemuste artimeetilised keskmised on leitud 2 bioloogiliselt sõltumatu katse 10 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

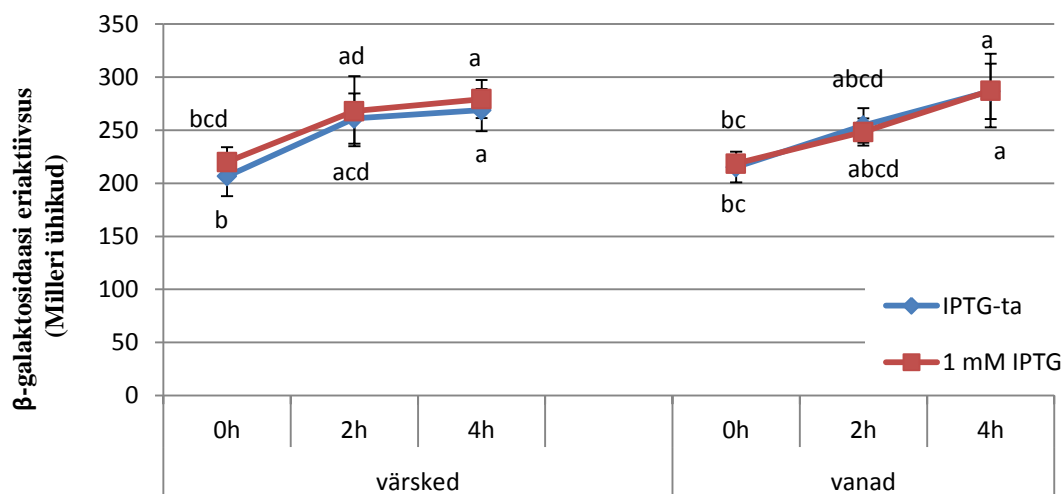
Fis represserib *rsmX* transkriptsiooni. Fis-i suurim negatiivne mõju on F15 värsketes rakkudes teisel tunnil, kus Fis inhibeerib transkriptsiooni aktiivsust 2,1 korda ($p = 0,007$), võrreldes IPTG-ta kasvanud rakkudega. Fis-i mõju ei tule statistiliselt välja F15 värskete rakkude nullpunktis ($p = 1$) ning F15 vanade rakkude neljandal tunnil ($p = 1$). Huvitav on asjaolu, et Fis-i

negatiivne mõju *rsmX*-i transkriptsioonile ilmneb värsketes rakkudes alles laual seistes, vanades rakkudes on repressioon ilmne aga ka 0-punktis ning väheneb rakkude seismisel laual (joonis 6).

Geeni *rsmX* transkriptsioon LB söötmes on väga madal ning tõenäoliselt pole leitud tingimusi, kus antud geen oleks aktiivne. Antud geeni korral võib LB tardsöötmele seismine mõjutada geeni transkriptsiooni, kuid see ei pruugi nii olla tingimustes, kus geen on aktiivne. Laual seismine mõjutab geeni *rsmX* transkriptsiooni ning Fis-i üleekspressioon pärsib *rsmX* transkriptsiooni ning see efekt sõltub bakteri füsioloogilisest seisundist.

2.3.5 Geeni *rsmY* transkriptsiooni regulatsioon

P. putida vanus LB-tardsöötmele ei mõjuta *rsmY* transkriptsiooni PSm-s. β -galaktosidaasi eriaktiivsused on PSm värsketes ja vanades rakkudes sarnased (joonis 7).

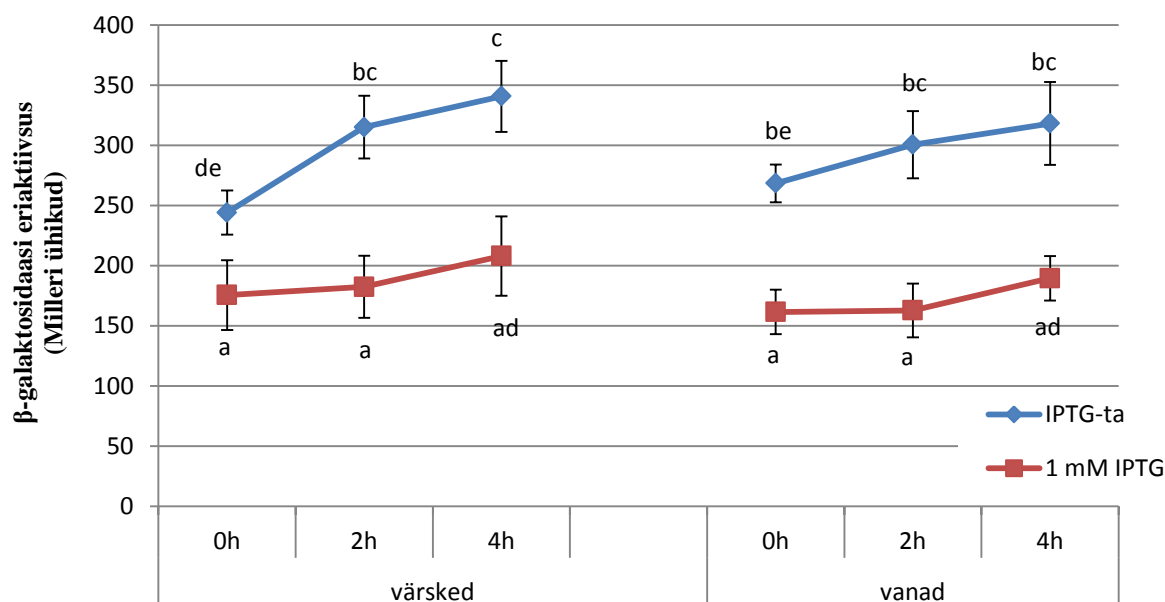


Joonis 7. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-*rsmY* plasmidi. *P. putida* tüve PSm rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmele üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardsöötmele neli päeva. Tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud 3 bioloogiliselt sõltumatu katse 15 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeenusrühmad.

Aeratsiooni lakkamine aktiveerib *rsmY* transkriptsiooni PSm-s. PSm värsketes ja vanades rakkudes suurendab laual seismine β -galaktosidaasi eriaktiivsusi 1,3 korda ($p < 0,001$).

Fis represserib *rsmY* transkriptsiooni. Väiksem Fis-i efekt ilmneb värskete F15 rakkude nullpunktis, kus Fis-i üleekspressioon vähendab β -galaktosidaasi eriaktiivsusi 1,4 korda ($p = 0,002$), suurim erinevus vanade F15 rakkude neljatunnisel laual seismisel, kus Fis-i üleekspressioon vähendab β -galaktosidaasi eriaktiivsust 1,7 korda ($p < 0,001$).

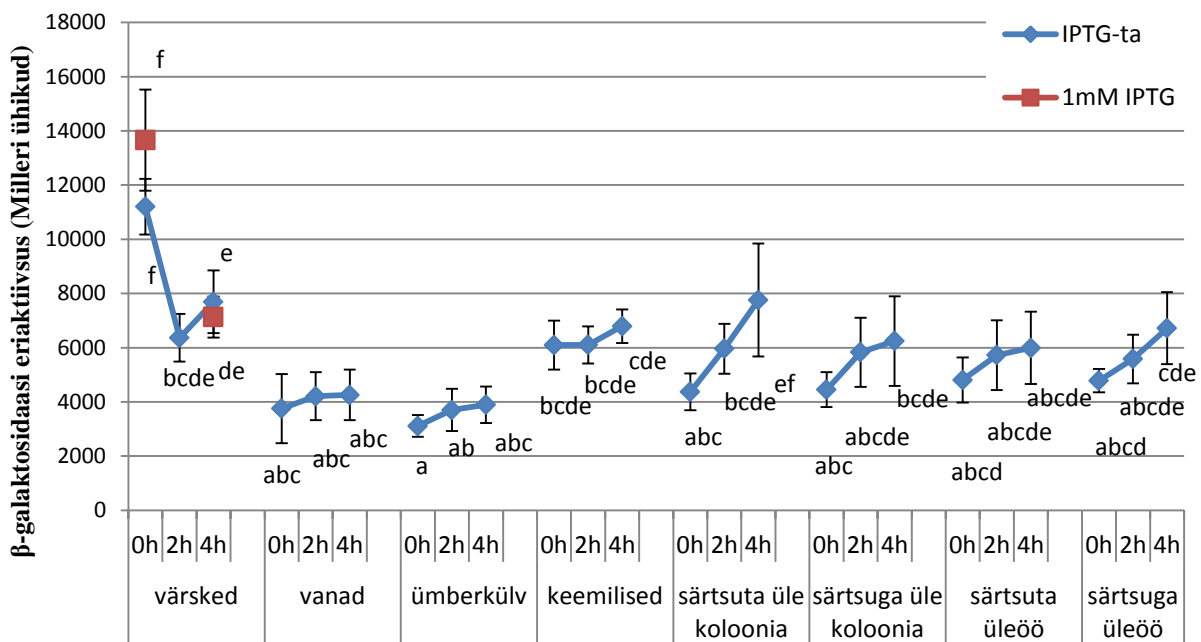
Geeni *rsmY* transkriptsioon *P. putida*'s sõltub aeratsiooni lakkamisest, kuid mitte rakkude vanusest LB-tardsöötmel. Fis-i üleekspressioon represserib *rsmY* transkriptsiooni.



Joonis 8. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* F15 rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-*rsmY* plasmidi. *P. putida* tüve F15 rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmel üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardsöötmel neli päeva. Tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud 3 bioloogiliselt sõltumatu katse 15 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

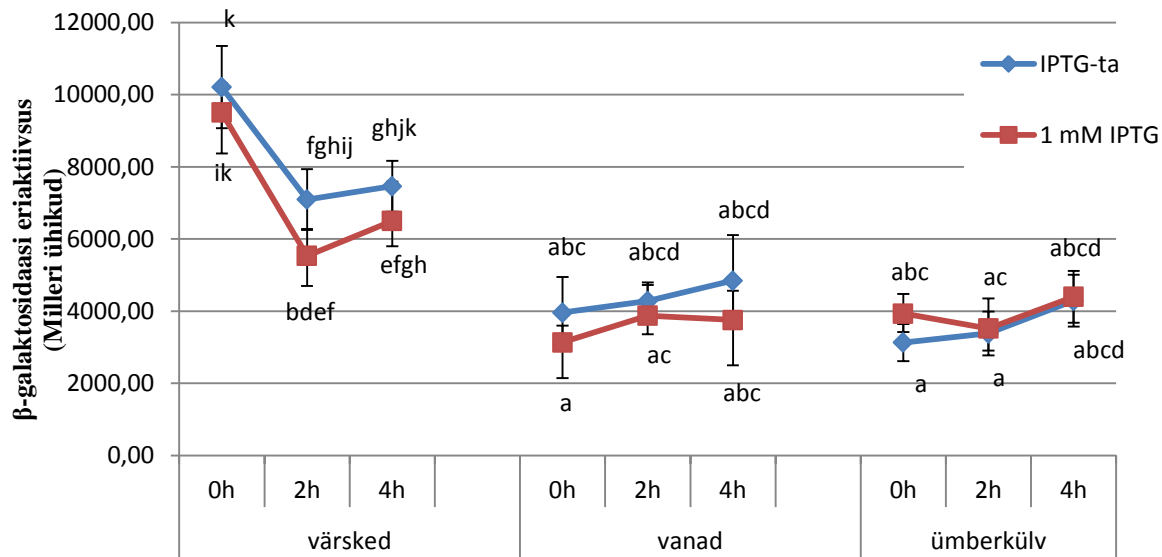
2.3.6 Geeni *rsmZ* transkriptsiooni regulatsioon

Geeni *rsmZ* transkriptsiooni regulatsiooni uurimisel keskenduti β -galaktosidaasi eriaktiivsusele *P. putida* metsiktüves PSm (joonis 9), sest Fis ei mõjutanud *rsmZ* transkriptsiooni (joonis 10). Sellest lähtuvalt mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsust IPTG-ga kasvatatud PSm-s ainult värsketest rakkudest, kontrollimaks, kas IPTG-l on mõju *rsmZ* transkriptsioonile metsiktüves (joonis 9).



Joonis 9. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmZ plasmidi. *P. putida* tüve F15 rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmele üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardöötmele neli päeva. Ümberkülv - neli päeva LB tardsöötmele olnud rakud, mis on külvatud uuele LB tardöötmele. Keemilised – DNA on rakkudesse viidud transformatsiooniga. Särtsuta üle koloonia – elektriga mõjutamata rakud, mis on selekteeritud üksikkolooniateks. Särtsuga üle koloonia – elektriga mõjutatud rakud, mis on selekteeritud üksikkolooniateks. Särtsuta üleöö – elektriga mõjutamata rakud, rakud mis on kasvanud LB vedelsöötmes üleöö. Särtsuga üleöö – elektriga mõjutatud rakud, mis on kasvanud LB vedelsöötmes üleöö. Tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud 3 bioloogiliselt sõltumatu katse 15 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeenusgrupid.

Geeni *rsmZ* transkriptsioon sõltub rakkude aeratsiooni lakkamisest. Värsketes PSm rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmZ plasmidi, langeb β -galaktosidaasi eriaktiivsus 4 tunniga laual seistes 1,5 korda ($p < 0,001$; joonis 9). Vanades, ümberkülvatud ja transformeeritud rakkudes on kõik mõõdetud ajapunktid omavahel väga hästi võrreldavad ning laual seismine transkriptsiooni aktiivsust antud rakkudes ei mõjuta.



Joonis 10. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* F15 rakkudes, mis sisaldavad pBLKTP-rsmZ plasmidi. *P. putida* tüve F15 rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, millele lisati või jäeti lisamata 1 mM IPTG. Värsked - rakud on seisnud LB tardsöötmele üleöö. Vanad- rakud on seisnud LB tardsöötmele neli päeva. Ümberkülv - neli päeva LB tardsöötmele olnud rakud, mis on külvatud uuele LB tardsöötmele. Tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud 3 bioloogiliselt sõltumatu katse 15 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

***P. putida* PSm seismine LB tardsöötmele vähendab *rsmZ* β -galaktosidaasi eriaktiivsust IPTG-ta kasvanud rakkudes.** Võrreldes vanade ja värskete rakkude nullpunkte, on β -galaktosidaasi eriaktiivsus PSm-i vanades rakkudes ligikaudu 3 korda madalam, kuid 4 tundi seinud rakkudes 1,7 korda madalam ($p < 0,001$; joonis 9). Kontrollimaks, kas taoline langus võib olla tingitud toitainetepuudusest tardsöötmes nagu *rsmA2* puhul (joonis 3), külvati rakud uuele LB tardsöötmele. Rakkude ümberkülvamine ei taastanud värskete rakkudega võrreldavat β -galaktosidaasi eriaktiivsust. Ümber külvatud rakkude nullpunkt ei erine vanade rakkude nullpunktist ($p = 1$), küll aga erineb värskete rakkude nullpunktist ($p < 0,001$). Seega ei ole vanade rakkude madalama transkriptsiooni aktiivsuse põhjuseks toitainetepuudus LB tardsöötmes.

Kontrollimaks, kas värskete ja vanade rakkude erinevus β -galaktosidaasi eriaktiivsustes võib tuleneda DNA raku viimise meetodist, viidi pBLKT-rsmZ PSm rakkudesse transformatsiooniga. Sellistes rakkudes ei sõltunud β -galaktosidaasi eriaktiivsus laual seismisest ning oli võrreldav värskete rakkude 4 tunni ajapunktiga ($p = 1$), erinedes aga värskete rakkude

nüllpunktist ($p < 0,001$). Seega värsketes rakkudes esinenud järsk langus transkriptsiooni aktiivsuses 0 ja 4 tunni ajapunkti vahel on transformeeritud rakkudes kadunud (joonis 9).

Võimalik, et elektroporatsiooni käigus rakkudele tehtav elektrišokk võib põhjustada raku füsioloogias muutusi, mille tõttu aktiveeritakse *rsmZ* geeni transkriptsioon. Kui vaadata värskete rakkude 0 ja 4 tunni β -galaktosidaasi eriaktiivsusi, siis aeratsiooni lakkamisel eriaktiivus langeb 1,6 korda ($p < 0,001$). Kontrollimaks elektrišoki mõju *rsmZ* transkriptsioonile, tehti järgnev katse. Vanad rakud kraabitakse LB tardsöötmetelt kokku, suspendeeriti 1 ml-s LB vedelsöötmes ning jätkati nende töötlust nagu kompetentsete rakkude valmistamisel (2.2.5.) Saadud raku suspensioon jagati kaheks, millest üht osa kasutati elektriga mõjutamiseks (joonis 9, särtsuga rakud üleöö), teine osa jäi kontrolliks (särtsuta rakud üleöö) (ptk 2.2.7). Paralleelselt eespool kirjeldatud katsega viidi läbi ka katse, kus elektroporeeritud rakud (joonis 9, särtsuga rakud üle koloonia) ja elektroporeerimata rakud (särtsuta rakud üle koloonia) selekteeriti üksikkolooniateks (ptk 2.2.7).

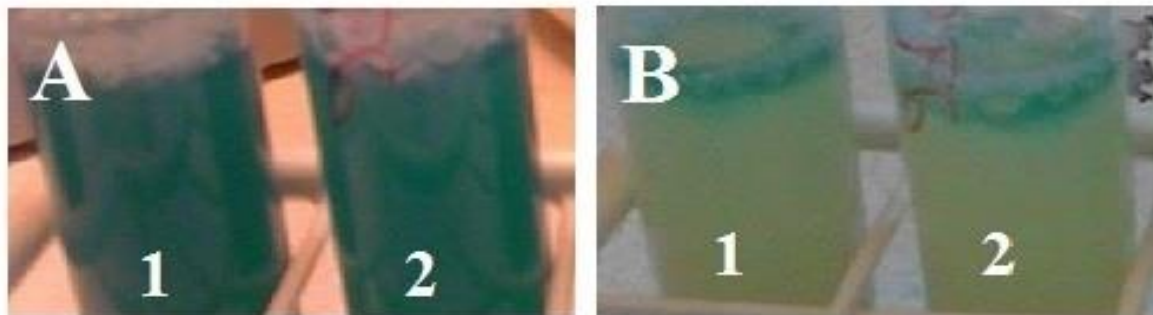
Mõlemast katsest järeldus, et tassilt kraabitud PSm-i rakkudes, mis juba sisaldavad pBLKT-*rsmZ* vektorit, elektrišokk ei mõjuta *rsmZ* transkriptsiooni (joonis 9). Rakkudes, millele anti elektrišokk, ning rakkudes, mida kasutati kontrollina laual seismine transkriptsiooni aktiivsust ei mõjuta. Kõigil juhtudel võib näha mõningast β -galaktosidaasi eriaktiivsuste tõusu, kuid vaid särtsuta üle koloonia kasvanud rakkudes on antud tõus statistiliselt oluline ($p < 0,001$).

Geeni *rsmZ* transkriptsioon sõltub bakterite füsioloogilisest seisundist. Rakkude elektroporeerimisel on *rsmZ* transkriptsioonile mõju ainult siis, kui rakud veel ei sisalda pBLKT-*rsmZ* vektorit, samas kui vektoriga rakkude mõjutamine elektriga ei mõjuta *rsmZ* transkriptsiooni. Rakkude laual seismine pärsib *rsmZ* transkriptsiooni ainult DNA-ta rakkudesse vektori sisseviimisel. Seega *rsmZ*-i transkriptsioon sõltub bakterite füsioloogilisest seisundist, kuid täpset füsioloogilist mehhanismi käesolevas töös välja ei selgitatud. *RsmZ* geen on ainuke antud töös uuritavatest GacS/GacA süsteemi alumistest geenidest, mida Fis-i üleekspressioon ei mõjutanud (joonis 10).

2.3.7 Uuritavate geenide transkriptsiooni sõltuvus hapniku sisaldusest söötmes

Laua seismine võib mõjutada geenide transkriptsiooni mitmeti: mõju võib tuleneda mehhaanilise liikumise või aeratsiooni lakkamise kaudu. Hapniku sisalduse muutus aeratsiooni

lakkamisest tulenevalt mõõdeti metüleensinise lisamisega söötmesse, mis muutub hapnikuvaeses keskkonnas läbipaistvaks (Campbell, 1963). Aereeritud bakterikultuuri seismisel laual 2 ja 4 tundi, valastus metüleensinine juba esimese 20 – 30 minuti möödumisel (joonis 11). Joonisel 11 on toodud ainult 2 tundi laual seisnud rakud. Järelikult katseklaaside laual seismisel väheneb sealne hapnikusisaldus.

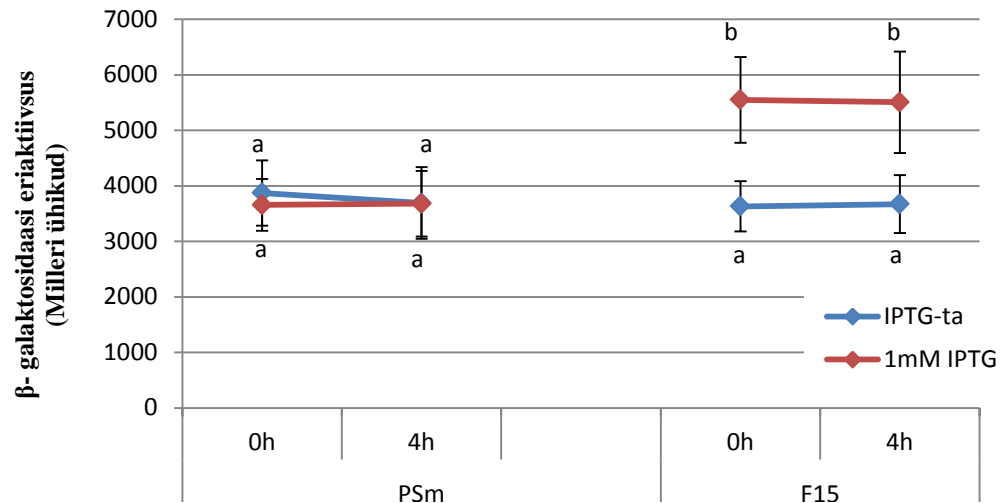


Joonis 11. Metüleensinisega värvitud (1) PSm, (2) PSm + IPTG rakud. Rakke kasvatati üleöö LB vedelsöötmes 1 mM IPTG juuresolekul või IPTG-ta 18 tundi, lisati metüleensinine ning hoiti laual 2 tundi. **A)** Rakud vahetult pärast metüleensinise lisamist, aeroobne seisund. **B)** Rakud on seisnud laual 2 tundi, anaeroobne seisund.

Kontrollimaks, kas aeratsiooni lakkamise mõju transkriptsioonile tuleneb hapniku kadumisest vedelsöötmes, kasvatati *P. putida* rakke mikroaeroobsetes tingimustes. Mikroaeroobsetes tingimustes kasvatatud rakkude β -galaktosidaasi eriaktiivsuse 0-punkt erineb 4 tunni ajapunkti omast, sest rakud on kasvanud mikroaeroobsetes tingimustes ning aeratsiooni lakkamine ei vähenda enam drastiliselt hapniku sisaldust bakterikultuuris. Uuriti *rsmA2*, *rsmY*, *rsmZ* geenide transkriptsiooni sõltuvust hapnikust, sest need geenid on LB söötmes kasvatades aktiivsed ja sõltuvad laual seismisest (joonised 3, 4, 7, 9). Geenide *rsmA1*, *rsmA3* ega *rsmX* transkriptsiooni mikroaeroobsetes tingimustesei uuritud.

Kui omavahel võrrelda PSm IPTG-ta kasvanud värskete rakkude, mis sisaldavad pBLKT-*rsmA2* plasmidi 4 h punkti mikroaeroobsetes tingimustes IPTG-ta kasvanud rakkude 0 h punktiga, siis β -galaktosidaasi eriaktiivsused on omavahel võrreldavad ($p = 1$; joonis 12) ega lange 4 tunni jooksul laual seismise ajal nagu aereeritud rakkudel (joonis 3). Siit järeldub, et

transkriptsiooni *rsmA2* promootorilt PSm rakkudes sõltub söötme aereerimisest ehk hapniku hulgast söötmes.

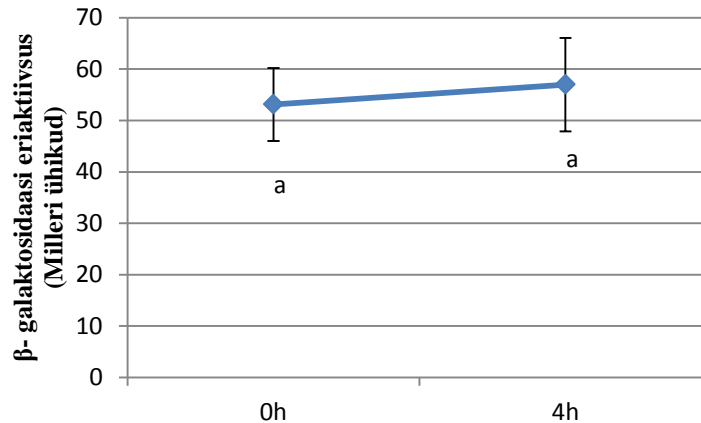


Joonis 12. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmY plasmidi, mõõdetuna mikroeroobsetes tingimustes. *P. putida* tüve PSm rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes. Tulemuste artimeetilised keskmised on leitud vähemalt 2 bioloogiliselt sõltumatu katse 8 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

Fis aktiveerib *rsmA2* transkriptsiooni, mis tuleb välja aeratsiooni vähenemisel (joonis 4). Fis-i aktiveerivat mõju *rsmA2*-le aeroobsuse vähenedes kinnitab ka mikroeroobsetes tingimustes läbi viidud katse (joonis 12), kus IPTG juuresolekul kasvanud rakkude transkriptsiooni aktiivsus nii 0 h ($p = 0,017$) kui ka 4 h ($p = 0,034$) ajapunktis on ligikaudu 1,5 korda kõrgem kui seda on IPTG-ta kasvanud rakkudes. Seega aeroobselt kasvatatud rakkude aeratsiooni lakkamisel tekivad Fis-i positiivne efekt transkriptsioonile (joonis 4) on juba olemas rakkudes, mis on kasvatatud mikroeroobsetes tingimustes (joonis 12).

Kuna aeratsiooni lakkamisel *rsmY* promootori transkriptsioon suurenes PSm rakkudes (joonis 13), viidi läbi katse, kus pBLKT-rsmY konstrukti sisaldavaid PSm rakke kasvatati mikroeroobseid tingimusi tekitavates CampyGen kottides. Aeroobselt kasvanud rakkudes β -galaktosidaasi eriaktiivsus aeratsiooni lakkamisel tõuseb nii IPTG-ta LB-s kasvanud värsketes ja vanades rakkudes 1,3 korda ($p < 0,001$; joonis 7). Mikroeroobsetes tingimustes kasvanud

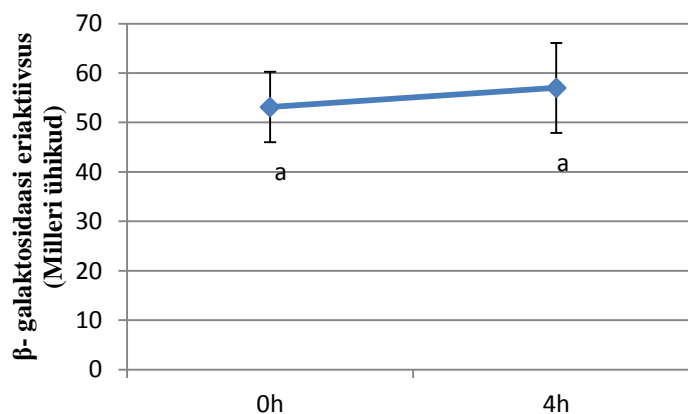
rakkude korral β -galaktosidaasi eriaktiivsus laual seistes statistiliselt ei erine ($p = 0,452$; joonis 13).



Joonis 13. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmY plasmidi, mõõdetuna mikroeroobsetes tingimustes. *P. putida* tüve PSm rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes. Tulemuste artimeetilised keskmised on leitud vähemalt 2 bioloogiliselt sõltumatu katse 8 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

PSm värsketes rakkudes, mis sisaldasid pBLKT-rsmZ plasmidi, toimus aeratsiooni lakkamisel 1,6-kordne β -galaktosidaasi eriaktiivsuse langus (joonis 9), seepärast kontrolliti aeratsiooni mõju *rsmZ* transkriptsioonile. Analoogsete rakkude kasvatamisel mikroeroobsetes tingimustes β -galaktosidaasi eriaktiivsus laual seistes statistiliselt ei erine ($p = 0,452$; joonis 14). Seega *rsmY* transkriptsioon sõltub hapniku hulgast söötmes.

Kokkuvõtvalt, kõigi geenide puhul, mille transkriptsiooni uuriti mikroaeroobses keskkonnas, laual seismine ei omanud transkriptsioonile enam efekti. Seetõttu, *rsmA2*, *rsmY* ja *rsmZ* geenide transkriptsioon on hapniku sisaldusest sõltuv.



Joonis 14. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* PSm rakkudes, mis sisaldavad pBLKT-rsmZ plasmidi, mõõdetuna mikroeroobsetes tingimustes. *P. putida* tüve PSm rakke kasvatati 18 tundi LB vedelsöötmes, tulemuste aritmeetilised keskmised on leitud vähemalt 2 bioloogiliselt sõltumatu katse 8 paralleelist. Esitatud on 95% usalduspiirid ja homogeensusrühmad.

2.3.8 Fis-i seondumine *rsmA1* ja *rsmY* geeni promotoralale

Fis võib mõjutada geenide transkriptsiooni otseselt, seondudes geeni promotoralaga, või kaudselt, läbi mõne teise transkriptsioonifaktori. Käesolevas töös uuriti Fis-i seondumist ainult geenide *rsmA1* ja *rsmY* eelsele DNA-le. Teised geenid jäid ajapuudusel uurimise alt välja.

Arvutiprogrammiga RSA-tools (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsa-tools/>) ennustati Fis-i seondumisjärjestus vaid *rsmA1* geeni ette (Tabel 3). Regulaatorse RNA geenide ja *rsmY* ette *E. coli* Fis-i seondumisjärjestuste maatriksiga Fis-i seondumisjärjestusi ei leitud.

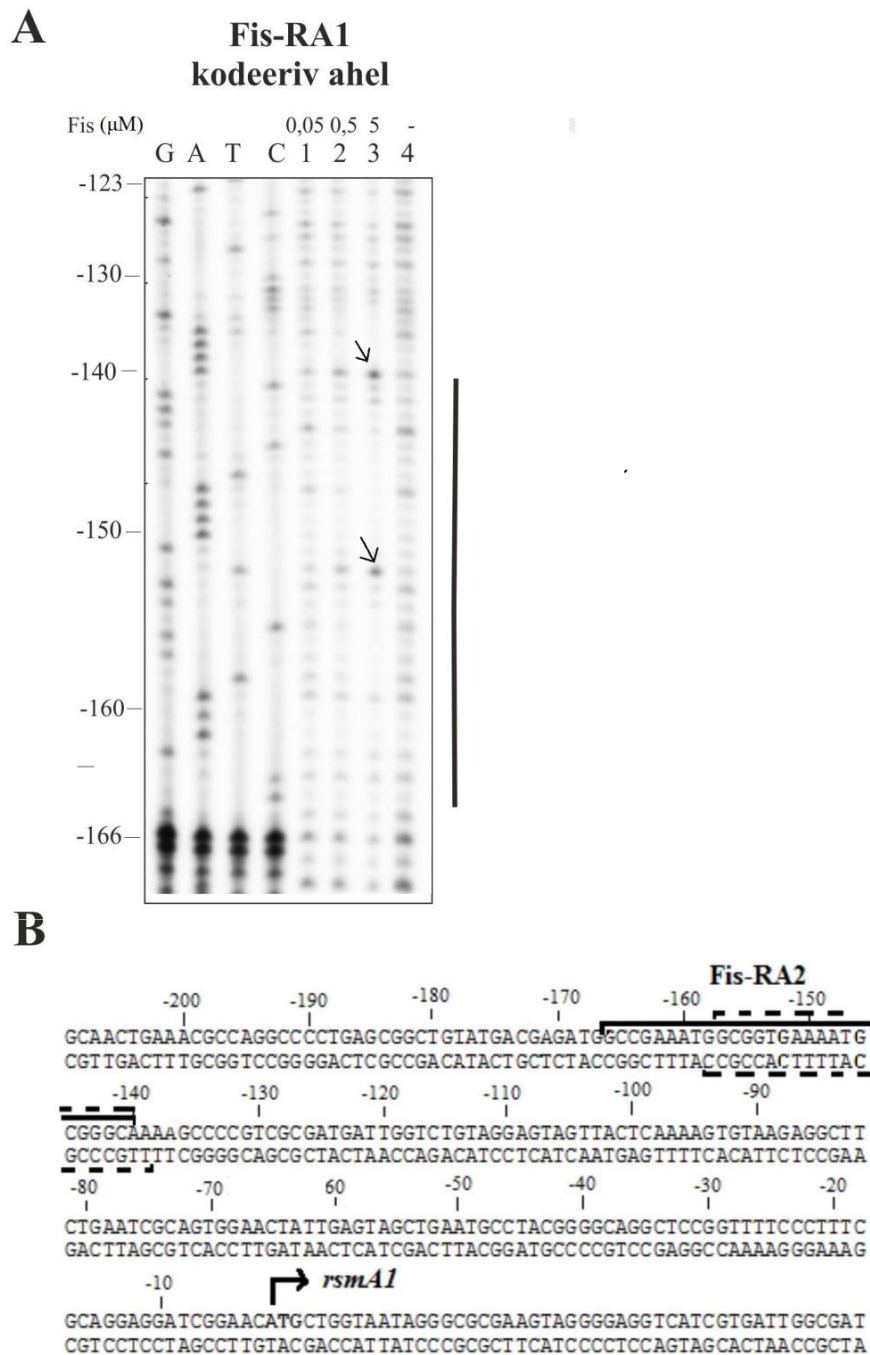
Tabel 3. Ennustatud Fis-i seondumisjärjestused *rsmA1* promotoralas

Geen	Ahel	Ennustatud Fisi seondumisjärjestus	Skoor	p-väärtus	Kaugus geeni algusest
<i>rsmA1</i>	Kodeeriv ahel	GCGGTGAAATGCGGGCAA	5,4	$6,2 \times 10^{-4}$	-157...-138
	Matriitsahel	CCGCCACTTTTACGCCCGTT	4,9	$6,2 \times 10^{-4}$	-158...-139

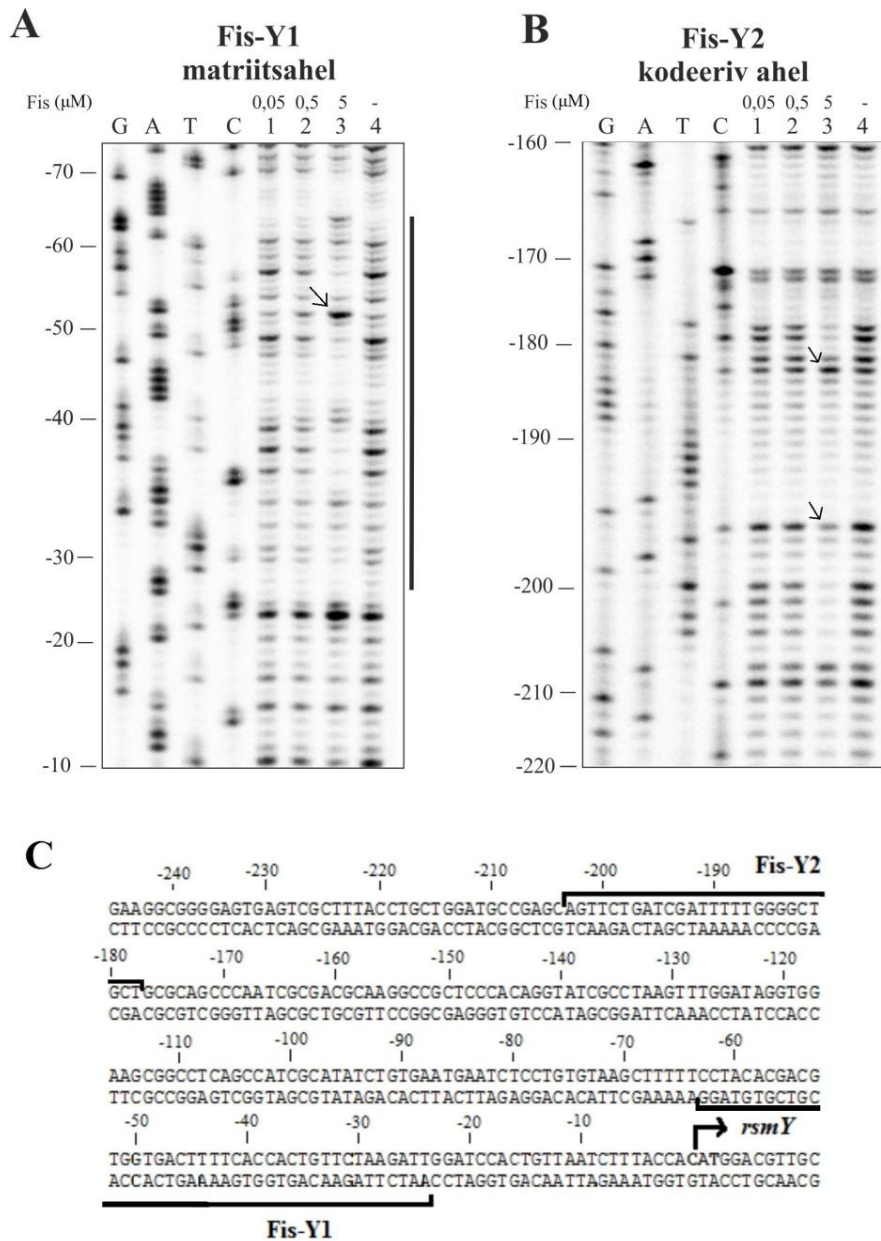
Fis seondub *rsmA1* promootoralale *in vitro*. Kuna Fis mõjutas *rsmA1* transkriptsiooni β -galaktosidaasi eriaktiivsuste põhjal positiivselt (joonis 2), uuriti Fis-i seondumist *in vitro* DNAas I jalajälje analüüsiga *in silico* ennustatud järjestustele. Joonisel 15B on katkendjoonega näidatud Fis-i seondumisjärjestused kodeerival ahelal positsioonides -157...-140 nt geeni algusest ja matriitsahelal positsioonides -138...-158 nt geeni algusest. Joonisel 15A on musta joonega märgitud Fis-i tegelik seondumisjärjestus positsioonides -166...-140 nt geeni algusest (Fis-RA2). Positsioonides -152 ja -140 on nooltega märgitud nukleotiidid, mis on DNAas I suhtes hüpersensitiivsed nukleotiidid.

Fis seondub *rsmY* promootorpiirkonda *in vitro*. Fis mõjutas *rsmY* transkriptsiooni β -galaktosidaasi eriaktiivsuste põhjal negatiivselt. Olgugi et *E. coli* Fis-i maatriksiga seondumisjärjestusi *rsmY* geeni ette ei ennustatud, uuriti Fis-i seondumist *in vitro*, sest Fis mõjutas *rsmY* transkriptsiooni β -galaktosidaasi eriaktiivsuste põhjal negatiivselt (joonis 8).

Joonisel 16B on näidatud Fis-i seondumisjärjestus *in vitro* kodeerival ahelal positsioonides -203...-182 nt geeni algusest (Fis-Y2), joonisel 16A Fis-i seondumine matriitsahelal positsioonides -22...-63 nt geeni algusest (Fis-Y1). Noolega on märgitud ka DNAas I suhtes hüpersensitiivsed nukleotiidid positsioonides -188 ja -194 nt geeni algusest kodeerival ahelal (joonis 16B) ning positsioonis -52 nt geeni algusest matriitsahelal (joonis 16A).



Joonis 15. DNAas I jalajälje analüüs *rsmA1* geenile. **A)** Joonise päises on märgitud Fis valgu kontsentratsioon (μM) proovides ning vasakul kaugus geeni algusest nukleotiidides. Vertikaalse musta joonega on tähistatud Fis-i seondumisjärjestus *rsmA1* kodeeriva ahela promotoraalas positsioonides -166...-140 nt geeni algusest. Musta noolega on märgitud hüpersensitiivsed DNAas I lõikekohad. **B)** Geeni *rsmA1* promotoraala positsioonides 0...-200 nt geeni algusest. Horisontaalse musta pideva joonega on märgitud Fis-i seondumisjärjestus *rsmA1* promotoralaga. Horisontaalse katkendjoonega on märgitud Fis-i ennustatud seondumisjärjestused. Punktirjoonega on märgitud teine Fis-i võimalik *in vitro* seondumine.



Joonis 16. DNaaS I jalajälje analüüs *rsmY* geenile. **A)** Joonise päises on märgitud Fis valgu kontsentratsioon (µM) proovides ning vasakul küljel kaugus geeni algusest nukleotiidides. Vertikaalse musta joonega on tähistatud Fis-i seondumisjärjestus *rsmY* matriitsahela promootoralas positsioonides -24...-63 nt geeni algusest. Musta noolega on märgitud hüpersensitiivsed DNaaS I lõikekohad. **B)** Vertikaalse musta joonega on tähistatud Fis-i seondumisjärjestus geeni *rsmY* kodeeriva ahela promootoralas positsioonides -203...-182 nt geeni algusest. **C)** Geeni *rsmY* promootoralas positsioonides 0...-240 nt geeni algusest.

2.3 Arutelu

Risosfäärsed bakterid, sealhulgas *P. putida*, koloniseerivad taimejuuri ning on võimelised moodustama taimejuurtel biofilmi. Taime juurel olev biofilm kaitseb taime patogeenide eest ning soodustab seeläbi taimede kasvu (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002). Biofilmi teke on komplitseeritud protsess, mis on ajaliselt täpselt reguleeritud ning eeldab mitmete regulatsioonisüsteemide ja regulaatorvalkude koordineeritud tööd (Danhorn ja Fuqua, 2007; Stoodley *et al.*, 2002). Näiteks võib ühe olulise regulaatorvalguna välja tuua ka meie laboris uuritava Fis valgu, mille üleekspressioon soodustab rakkudes biofilmi teket (Jakovleva *et al.*, 2012). Kuna Fis on globaalne regulaator, siis on võimalik, et Fis reguleerib veel mõnd regulaatorit, mis omakorda reguleerib biofilmi geenide transkriptsiooni. Ühe võimalusena võib Fis läbi GacS/GacA signaaliraja mõjutada postranskriptsioonilist regulaatorit RsmA. RsmA võib seonduda biofilmi tekkeks vajalike geenide mRNA-dega ning mõjutada seeläbi nende translatsiooni. RsmA aktiivsust mõjutavad väikesed regulatoorsed sRNA-d. Sellest tulenevalt sai käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kas Fis reguleerib GacS/GacA süsteemi alumiste geenide transkriptsiooni. Samuti sooviti teada, kas antud geenide transkriptsioon sõltub rakkude seismisest tardsöötmele ning aeratsioonist.

Aeratsiooni lakkamine ehk hapniku hulga vähenemine söötmes mõjutas *P. putida* PSm värsketes rakkudes kõigi väikeste mittekodeerivate RNA-de transkriptsiooni. Geenide *rsmX* ja *rsmY* korral soodustas aeratsiooni vähenemine rakkudes transkriptsiooni (joonised 6 ja 7), samas *rsmZ* korral aeratsiooni vähenemine langestas transkriptsiooni aktiivsust (joonis 9). Aeratsiooni mõju sRNA-dele on näidatud ka varem. O'Callaghan *et al.* (2011) näitasid, et *P. aeruginosa*'s mõjutab keskkonnas olev hapnik sRNA-de hulka rakus negatiivselt. Eelpool mainitud töös mõõdeti *rsmY* ja *rsmZ* transkriptsiooni qPCR-iga, mõlema geeni RNA hulk oli mikroaeroobsetes tingimustes madalam kui aeroobsetes tingimustes kasvatatud rakkudes.

Võrreldes käesoleva töö tulemusi *P. aeruginosa*'s läbi viidud tööga, siis *rsmZ* transkriptsiooni langus hapniku vähenemisel langeb *P. putida*'s ja *P. aeruginosa*'s kokku, kuid *rsmY* korral on tulemused vastupidised. Siiski, kui vaadata mikroaeroobsetes tingimustes kasvanud rakkudest mõõdetud *rsmY* transkriptsiooni (joonis 13) ja võrrelda seda aeroobsetes tingimustes kasvanud rakkude tulemusega (joonis 7), siis on selgesti näha, et pikajaliselt mikroaeroobses keskkonnas olnud rakkudes on *rsmY* transkriptsioon promootorilt tugevalt pärssitud. Seega omab mikroaeroobsus transkriptsioonile justkui vastupidist mõju. Aeroobses ja

mikroaeroobses keskkonnas kasvanud *P. putida rsmY*-i β -galaktosidaasi eriaktiivsuste erinevus võib tuleneda rakkude kasvukiirusest, sest on teada, et *rsmY* transkriptsioon *P. aeruginosa*'s sõltub kasvufaasist (Valverde *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005). Sellest lähtuvalt ei pruugi olla aeroobses ja mikroaeroobses keskkonnas mõõdetud *P. putida rsmY* β -galaktosidaasi eriaktiivsuste absoluutväärtuste võrdlemine olla usaldusväärne. Samas kasvukiiruse ja rakutiheduse mõju rakkude seismisel 4 tundi laual on minimaalne. Sellest tulenevalt mõjutab hapniku hulga vähenemine keskkonnas *P. putida*'s *rsmY* transkriptsiooni pigem positiivselt. Siiski, hapniku hulga mõju *rsmY* transkriptsioonile võib olla ka kahetine. *P. putida* lühiajaline mikroaeroobses keskkonnas viibimine mõjub *rsmY* transkriptsioonile positiivselt, pikemaajaline mikroaeroobses keskkonnas viibimine aga negatiivselt.

Hapniku hulga vähenemine söötmes mõjutas *RsmA* geenidest kõige selgemalt *rsmA2* transkriptsiooni (joonised 3 ja 12). Teiste geenide puhul efekt puudus, *rsmA1* (joonis 2), või oli raske hinnata, kuna geeni transkriptsioon uurimistöös kasutatud söötmes oli väga madal, *rsmA3* (joonis 5). Hapniku vähenemine keskkonnas vähendas *rsmA2* transkriptsiooni PSm värsketes rakkudes (joonis 3).

Hapniku vähenemisest tingitud geenide transkriptsiooni muutus võib olla tingitud meetodist, mil viisil DNA on rakkudesse viidud. Võrreldes elektroporatsiooniga, kaotas transformatsioon *rsmA2* korral laual seismisest tuleneva järsu languse β -galaktosidaasi eriaktiivsustes (joonis 3) ehk transformatsiooni korral pole *P. putidas rsmA2* transkriptsioon sõltuv enam laual seismisest ehk hapniku hulga vähenemisest söötmes. Kui geeni *rsmA2* korral transformeeritud rakkudes laual seismine ei vähendanud transkriptsiooni ning mõõdetud β -galaktosidaasi eriaktiivsus oli võrreldav elektroporeeritud rakkude nullpunktiga (joonis 3), siis *rsmZ*-i transkribeeriti vastupidiselt *rsmA2*-le. Transformeeritud rakkudes oli *rsmZ*-i transkriptsioon kohe madal ning oli võrreldav elektroporeeritud rakkude väärtusega, mis saadi hapniku langemisel söötmes (joonis 9). Põhjuseid, miks elektroporeeritud rakkudes esineb taoline järsk transkriptsiooni aktiivsuse langus, võib olla mitmeid. Üheks võimaluseks võib olla, et elekter lõhub peptidoglükaani (Huang ja Rubinsky, 1999; Pillet *et al.*, 2016) ning lisaks tekitab membraanis poore, mis päädib prootonite liikumapaneva jõu lühiajalise langusega (Gao *et al.*, 2011). Seejärel peab rakkudes toimuma membraanide parandamine ja prootoni liikumapaneva jõu taastamine ja peptidoglükaani resünteesis.

Elektri mõju rakkudele ja *rsmZ* transkriptsioonile kirjeldavad katsed, kus neli päeva laual seisnud rakkudele anti elektsišokk (joonis 9). Huvitaval kombel mõjutab elektsišokk rakke pBLKT-*rsmZ* plasmidi sisseviimisel rakkudesse, kuid mitte neli päeva laual seisnud rakke, mis juba sisaldavad plasmidi. Samas kui võrrelda omavahel elektroporeeritud ja transformeeritud rakke, siis võib järeldada, et elektsišokil on teatud efekt ning rakkude füsioloogia on elektsišoki ja temperatuurišoki saanud rakkudel erinev (nt DNA topoloogia), kuigi sarnaselt elektsišokile langeb ka transformatsiooni korral membraani prootonite liikumapanev jõud ning tekivad membraani poorid (Pillet *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2011).

LB-tardsöötmele rakkude 4 päeva hoidmise mõju transkriptsioonile oli üllatav. Sest β -galaktosidaasi mõõtmiseks külvati rakud värskesse LB vedelsöötmesse ning rakke kasvatati 18 tundi. Sedasi rakke kasvatades läbib bakteri populatsioon kõik tüüpilised kasvufaasid: lag-, log- ja statsionaarne kasvufaas. Rakkude tardsöötmele seismise efekt võib tuleneda sellest, et populatsioon on vedelsöötmes kasvatades heterogeenne. Vaatamata enamikele rakkudele, teatud väike osa populatsioonist ei kasva või kasvab aeglasemalt, mis võib mõjutada transkriptsiooni. Siiski, bakteripopulatsiooni heterogeensus ei saa mõjutada mõõdetud β -galaktosidaasi eriaktiivsust nii tugevasti kui näiteks *rsmZ* korral, sest tavaliselt on metaboolselt inaktiivseid rakke populatsioonis väga vähe. Geeni *rsmZ* transkriptsioon on aga nn vanades rakkudes langenud umbes 3 korda, võrreldes värske rakkude nullpunktiga (joonis 9). Geenispetsiifilist regulatsiooni kinnitab ka see fakt, et osa uuritud geenide korral, nagu *rsmA1*, transkriptsioon ei sõltu LB-tardsöötmele seismisest (joonis 2).

Rakkude seismine LB tardsöötmele ehk nn rakkude vanus mõjutab *rsmZ*-i (joonised 9, 10) ning *rsmA2* korral PSm-s (joonis 3), kus rakkude vanusega transkriptsiooni aktiivsus alaneb. Transkriptsiooni aktiivsuse langus võib olla tingitud toitainetepuudusest, mis tekib LB tardsöötmele pikaajalisel kasvamisel. Seetõttu külvati rakud ümber uuele LB tardsöötmele. *P. putida* PSm tüves taastas pBLKT-*rsmA2* plasmidi sisaldavate rakkude ümberkülvamine transkriptsiooni aktiivsuse värske rakkude tasemele, kuid *rsmZ*-i korral jäid ümberülvatud rakkude β -galaktosidaasi eriaktiivsused vanade rakkude tasemele. Sellest järeldub, et *rsmA2* transkriptsioon sõltub toitainete hulgast, *rsmZ*-il sellist sõltuvust ei esine, ja seetõttu geenid reguleeritakse bakteri erineva füsioloogilise seisundiga.

Fis mõjutab sRNA-de transkriptsiooni üldjoontes negatiivselt (joonised 6-10). Kuna kirjandusest on teada, et GacA aktiveerib sRNA-de regulatsiooni (Jimenez *et al.*, 2012), siis

sRNA-de hulga vähenemine rakus viitab asjaolule, et Fis surub maha GacS/GacA signaalirajaga vahendatavat signaali. Väikesed reguleerivad RNA-d ja RsmA-d on omavahel vastastikusel seoses: mida enam on rakus sRNA-sid, seda vähemaktiivsed on RsmA-d, kuna sRNA-d seonduvad RsmA-ga ning inaktiveerivad selle (Liu *et al.*, 1997). *P. aeruginosa*'s on näidatud, et aktiivse RsmA hulga vähenemisel suureneb biofilmi moodustumine (Gooderham ja Hancock, 2009). Madal sRNA-de hulk rakus tähendaks aktiivse RsmA hulga suurenemist rakkudes ning ühtlasi biofilmi tekke vähenemist. Fis-i üleekspressiooni korral väheneb rakkudes sRNA-de hulk ning seega on rakus hulgaliselt aktiivset RsmA-d. Fis-i positiivset mõju RsmA-dele kinnitavad ka käesolevas töös tehtud katsed, kus Fis-i üleekspressioon soodustas *rsmA1* ja *rsmA2* transkriptsiooni (joonised 2, 4). Gooderham ja Hancock (2009) kirjeldasid RsmA seost biofilmiga *P. aeruginosa*'s, kus aktiivse RsmA hulga suurenemisega rakus vähenes bakterite biofilm (Gooderham ja Hancock, 2009). Seega mõjutab RsmA biofilmi moodustumist negatiivselt.

Uurimaks, kas Fis-i mõju geenidele *rsmA1* ja *rsmY* on otsene (Fis seondub geeni promotoraalale) või kaudne (mõjub läbi mõne muu regulaatori), tehti DNAas I jalajälje katse, millest järeldus, et Fis seondub nii *rsmA1* kui ka *rsmY* geeni eelsele alale *in vitro* (joonised 15, 16). DNAas I jalajälje analüüs näitas Fis-i seondumist *rsmY* geeni promotoraalale kahel järjestusel (Fis-Y2, Fis-Y1; joonis 16). Seondumisjärjestus Fis-Y2 asub -203...-182 nt kaugusel geeni algusest, seondumisjärjestus Fis-Y1 -24...-63 nt geeni algusest. Tõenäoliselt on Fis-i mõju *rsmY* transkriptsioonile reguleeritud läbi Fis-Y1 seondumisjärjestuse, kuna antud seondumisjärjestus asub üsna *rsmY* geeni alguses, suure tõenäosusega asub antud piirkonnas ka *rsmY* promootor. Ka β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmisel järeldus, et Fis mõjutab *rsmY* transkriptsiooni negatiivselt (joonis 8). Tõenäoliselt seondub Fis *rsmY* promootorile või sellest allavoolu ning represserib transkriptsiooni. Kuigi *rsmY* geeni puhul on *in vitro* näidatud seondumine kooskõlas *in vivo* mõõdetud β -galaktosidaasi eriaktiivsustega, on Fis-i otsese mõju kinnituseks vaja hinnata Fis-i seondumist Fis-Y1 ja Fis-Y2 muteeritud järjestusele. Lisaks tuleb mõõta β -galaktosidaasi eriaktiivsust *rsmY* promotoraalalt, mis sisaldab muteeritud Fis-i seondumisjärjestusi.

DNAas I jalajälje analüüs näitas Fis-i seondumist *rsmA1* geeni eelsele alale vahemikus -166...-140 nt-d geeni algusest (Fis-RA2; joonis 15). Lisaks oli näha ka võimalik Fis-i seondumine vahemikus -70...-54 nt geeni algusest, kuid DNAas I jalajälje pildi halva kvaliteedi tõttu pole täpset seondumisjärjestust võimalik määrata. Kirjandusest on teada, et transkriptsioonifaktori seondumine geeni promootorist ülesvoolu soodustab antud geeni transkriptsiooni (Ishihama,

2010). Seondumisjärjestus Fis-RA2 asetseb *rsmA1* geeni algusest sellisel kaugusel, et võimalikud promootorid asetsevad tõenäoliselt Fis-RA2 seondumisjärjestusest allavoolu, ja Fis-i seandumine soodustab *rsmA1* transkriptsiooni. Fis-i aktiveerivat mõju *rsmA1* transkriptsioonile kinnitab ka β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine (joonis 2), kus Fis-i üleekspressioon soodustas *rsmA1* transkriptsiooni. Seega on ka *rsmA2* geeni korral *in vitro* näidatud Fis-i seandumine kooskõlas *in vivo* mõõdetud β -galaktosidaasi eriaktiivsustega. Sarnaselt katsetele muteeritud Fis-i seondumisjärjestustega *rsmY* promootoralas, tuleb seda teha ka *rsmA1* promootorala puhul.

Käesolevas töös mõjutas Fis-i üleekspressioon sRNA-de produktsiooni negatiivselt ja RsmA-de transkriptsiooni positiivselt. Neist tulemustest lähtuvalt peaks *P. putida* biofilmi moodustumise võime Fis-i üleekspressiooni korral vähenema. Samas on näidatud, et Fis-i üleekspressiooni korral suureneb *P. putida* biofilmi moodustumine kuni 3 korda (Jakovleva *et al.* 2012; Moor *et al.* 2014). Fis-i üleekspressiooni tulemusena suureneb biofilmi maatriksiks vajamineva adhesiini LapA hulk, mis omakorda võimendab biofilmi moodustumist (Moor *et al.*, 2014). Seega on käesoleva töö tulemused vastuolus Moor *et al.* (2014) saadud tulemustega. *P. putida* LapA on biofilmi moodustumisel keskse rolliga (Gjermansen *et al.*, 2010). Võimalik, et Fis-i üleekspressiooni mõju LapA ekspressioonile on keerulisem ning Fis mõjutab biofilmi moodustumist, sealhulgas LapA ekspressiooni, mitme regulatoorse mehhanismi kaudu.

Geeni *lapA* transkriptsioon võib olla mitmesuguste keskkonnafaktoritega mõjutatud üle GacS/GacA signaaliraja alumiste geenide transkriptsiooni regulatsiooni. On teada, et GacS/GacA signaalirada mõjutab LapA ekspressiooni positiivselt (Martinez-Gil *et al.*, 2014) ning seetõttu võib *lapA* transkriptsioon sõltuda signaaliraja geenide transkriptsioonist, mis on tundlikud bakteri füsioloogilisele seisundile. Näiteks *rsmZ*-i transkriptsioon sõltus rakkude füsioloogilisest seisundist kõige rohkem. Olles sõtluvuses nii aeratsioonist, rakkude vanusest kui ka meetodist, mil viisil DNA on rakkudesse viidud (joonis 9). Geeni *rsmA2* korral tuli Fis-i positiivne efekt välja alles mikroaeroobsetes tingimustes (joonised 4 ja 12). Taolised transkriptsiooni aktiivsuste sõltuvused bakteri füsioloogilisest seisundist võivad mõju avaldada ka *lapA* transkriptsioonile ning põhjustada *lapA* tulemuste kõikumist.

Hapniku kättesaadavus on risosfäärsetele bakteritele sageli limiteerivaks faktoriks. *P. aeruginosa* puhul on näidatud, et biofilmi sügavamates kihtides leidub hapniku vähem kui pealmistes (de Beer *et al.*, 1994). Samuti on *P. aeruginosa*'s näidatud, et biofilmi koosseisus olevate bakterite füsioloogiline seisund on varieeruv ning et antud varieeruvus tuleneb hapniku

kättesaadavusest (Xu et al., 1998). Samuti võib olla muutunud ka GacS/GacA signaaliraja geenide regulatsioon. Näiteks käesolevas töös mõõdetud *rsmA2* geen, kus Fis-i positiivne mõju transkriptsioonile ilmnis alles mikroaeroobsetes tingimustes (joonis 4).

Lisaks eelnevale ilmneb, et vähemalt teatud geenide transkriptsioon sõltub DNA rakkudesse viimise meetodist, mille tõttu võib eksperimentaator jõuda vastupidiste järeldusteni. Näiteks kasutades elektroporeerimist võib *rsmZ* geeni korral teha järelduse, et geeni transkriptsioon pärsitakse hapniku kadumisega keskkonnast (joonis 9). Samas, kasutades transformatsiooni võib sama geeni puhul teha vastupidise järelduse, transkriptsioon ei sõltu hapniku hulgast söötmes (joonis 9). Tõenäoliselt pole enamike geenide transkriptsioon DNA rakkudesse viimise meetodist siiski tundlik, vaid pigem on seda globaalsete regulaatorite geenide transkriptsioon. Sest globaalsete regulaatorite abil bakter reageerib keskkonnast tulnud signaalidele.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas Fis mõjutab GacS/GacA signaaliraja alumiste geenide (*rsmA* ja sRNA-geenide) transkriptsiooni. Samuti, kas antud geenide transkriptsioon sõltub rakkude seismisest tardsöötmele ning aeratsioonist. Tulemustest järeldus, et Fis mõjutab üldjoontes *rsmA* geenide transkriptsiooni positiivselt, ning sRNA-geenide transkriptsiooni negatiivselt. Lisaks sõltus GacS/GacA signaaliraja geenide transkriptsioon bakteri füsioloogilisest seisundist.

KOKKUVÕTE

Pseudomonas putida peab muutuvate ning sageli ebasoodsate keskkonnatingimustega kohanemiseks olema piisavalt konkurentsivõimeline. Selleks peab bakteril olema süsteeme ning regulaatoreid, mis võimaldaksid kiiresti ning täpselt keskkonnasignaalidele reageerida ning muuta oma füsioloogiat. Taolisteks regulaatoriteks *Pseudomonas putidas* on näiteks GacS/GacA süsteem ning Fis valk. Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas Fis reguleerib GacS/GacA raja alumiste geenide (*rsmA* ja sRNA-geenide) transkriptsiooni. Samuti, kas nende geenide transkriptsioon sõltub rakkude seismisest tardsöötmele ning aeratsiooni vähenemisest.

Töö peamised tulemused on järgmised:

- Tardsöötmele seismine ehk rakkude vanus mõjutab transkriptsiooni *rsmA2* ja *rsmZ* promootoritelt PSm-s.
- Hapniku hulga vähenemine söötmes mõjutas kõigi väikeste mittekodeerivate sRNA-de transkriptsiooni PSm-s. Geenide *rsmX* ja *rsmY* korral soodustas aeratsiooni vähenemine rakkude transkriptsiooni, *rsmZ* korral vähendas.
- Geeni *rsmZ* transkriptsioon sõltus bakteri füsioloogilisest seisundist enim. Olles sõltuvuses nii aeratsioonist, rakkude vanusest, kui ka DNA rakkudesse viimise meetodist.
- Hapniku hulga vähenemine söötmes mõjutas *rsmA* geenidest selgemalt *rsmA2* transkriptsiooni. Ka Fis-i efekt aeroobselt kasvatatud rakkudes ilmnes hapniku kadumisel söötmele.
- Fis mõjutab sRNA-de transkriptsiooni üldjoontes negatiivselt. Fis represserib transkriptsiooni *rsmX* ja *rsmY* promootoritelt, kuid ei mõjuta *rsmZ* transkriptsiooni.
- Fis mõjutab *rsmA* geenide transkriptsiooni üldjoontes positiivselt. Fis soodustab *rsmA1* ja *rsmA2* transkriptsiooni, kuid mõjutab negatiivselt transkriptsiooni *rsmA3* promootorilt.
- Fis seondub geenide *rsmA1* ja *rsmY* eelsele alale *in vitro*.
- Fis mõjutab GacS/GacA signaaliraja geene ning võib seeläbi mõjutada ka biofilmi tekkeks vajalikke geenide transkriptsiooni.

The effect of physiology of *Pseudomonas putida* and Fis on the transcription of lower genes in GacS/GacA system

Liisbeth Kose

SUMMARY

Pseudomonas putida is a rhizospheric bacterium, that colonizes plant roots and develops biofilm. Biofilm on plant roots is beneficial to both parts: bacterium protects plant from phytopathogens and plant releases root exudates providing bacterium with nutrients and carbon sources.

Biofilm formation is a complicated process, where many signalling networks and global regulators are involved, for example GacS/GacA two-component system and global regulator Fis.

P. putida's biofilm matrix is mainly composed of large adhesins LapA and LapF in *P. putida*. It has been previously shown in our laboratory, that the transcription of *lapA* in *P. putida* varies on the presence of Fis overexpression. This variation could be explained by Fis influencing a regulator, that affects the expression of genes needed for biofilm formation. It is possible that Fis influences a post-transcriptional regulator called RsmA. RsmA is part of a GacS/GacA signalling pathway and its' expression is controlled by the level of sRNA-s in the cell. RsmA as a RNA-binding protein can bind to mRNA-s of genes that affect biofilm formation, therefore regulating their translation.

The aim of this paper was to investigate, whether Fis influences the genes in GacS/GacA (*rsmA* and sRNA genes) signalling pathway and whether their transcription depends on the physiological activity of the bacterium. Experiments showed that Fis regulates *rsmA* transcription positively and sRNA genes negatively. Also, their transcription depended on the physiological activity of the bacterium. Fis regulates the genes in GacS/GacA system and could thereby regulate the translation of genes necessary in biofilm formation.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Riho Terast toetava ja kannatliku suhtumise eest. Samuti Hanna Moori abivalmiduse ja asjalike nõuannete eest ning Andrio Lahesaaret, kes oli abiks DNaaS jalajälje analüüsil. Loomulikult ka kõiki teisi laborikaaslasi, kes alati vajadusel lahkesti aitasid.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A.,** (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol.* 181(20):6361-70.
- Bais, H. P., Fall, R., Vivanco, J. M.** (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology* 134, 307-319.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S.** (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science.* 305:1622–1625.
- Ball, C. A., Osuna, R., Ferguson, K. C., Johnson, R. C.** (1992). Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 174, 8043-8056.
- Barahona, E., Navazo, A., Yousef-Coronado, F., Aguirre de Cárcer, D., Martínez-Granero, F., Espinosa-Urgel, M., Martín, M., Rivilla, R.** (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ Microbiol.* 12(12):3185-95.
- Beach, M. B., Osuna, R.** (1998). Identification and characterization of the *fis* operon in enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 180: 5932–5946.
- Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F. et al.** (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186:4665–4684.
- Blot, N., Mavathur, R., Geertz, M., Travers, A., Muskhelishvili, G.** (2006). Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep* 7, 710–715.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., Haas, D.** (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* Nov 23; 96(24): 14073–14078.
- Boswell, S., Mathew, J., Beach, M., Osuna, R., Colon, W.** (2004). Variable contributions of tyrosine residues to the structural and spectroscopic properties of the factor for inversion stimulation. *Biochemistry.* 43: 2964-2977.
- Boyd, C., Smith, T., El-Kirat-Chatel, S., Newell, P., Dufrene, Y. and O'Toole, G.** (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), pp.2775-2788.
- Bradley, M. D., Beach, M. B., de Koning, A. P., Pratt, T. S., Osuna, R.** (2007). Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology* 153, 2922-2940.
- Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R.** (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:11621–1162
- Brencic, A., Lory, S.** (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* 72:612–632.

- Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., Lory, S.** (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol.* 73: 434-45.
- Burrowes, E., Abbas, A., O'Neill, A., Adams, C., O'Gara, F.** (2005). Characterisation of the regulatory RNA RsmB from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res Microbiol* 156, 7–16.
- Campbell, J. A.** (1963). Kinetics – Early and Often. *J. Chem. Edu.* 40, 578-583.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C.K., Chatterjee, A.K.** (1995). Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora subsp. carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohe anoyl)-L-homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol* 61:1959–1967
- Chaudhuri, R. R., Sebahia, M., Hobman, J. L., Webber, M. A., Leyton, D. L., Goldberg, M. D., Cunningham, A. F., Scott-Tucker, A., Ferguson, P. R., et al.** (2010). Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PLoS ONE* 5, Jan 20;5(1):e8801.
- Cheng, X., de Bruijn, I., van der Voort, M., Loper, J.E., Raaijmakers, J.M.** (2013). The *Gac* regulon of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environ Microbiol Rep*5: 608–619.
- Cho, B., Knight, E., Barrett, C., Palsson, B.** (2008). Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome Research*, 18(6), pp.900-910.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M.** (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 711-45.
- Costerton, J.W., Montanaro, L., Arciola, C.R.** (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs.* Nov;28(11):1062-8.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Cróinín, T.O, Dorman, C.J.** (2007). Expression of the Fis protein is sustained in late-exponential- and stationary-phase cultures of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* grown in the absence of aeration. *Molecular Microbiology* 66 (1), 237–2.
- Czczulin, J.R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M.H., Navarro-Garcia, F., Nataro, J.P.** (1997). Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* Oct;65(10):4135-45.
- Danhorn, T., Fuqua, C.** (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 61:401-22.
- Davies, J.C.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev.* Jun;3(2):128-34.

- de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z.** (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng.* 43:1131–1138.
- Donlan, R.M.** (2001) Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33:1387–1392.
- Dos Santos, V.A., Heim, S., Moore, E.R., Strätz, M., Timmis, K.N.** (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 6:1264–1286.
- Duque, E., Haidour, A., Godoy, F., Ramos, J.L.** (1993). Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. *J Bacteriol.* 175:2278–2283.
- Duque, E., de la Torre, J., Bernal, P. et al.** (2013). Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environmental microbiology* 15, 36-48.
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., Ramos, J. L.** (2002). Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* 148, 341-343.
- Fazli, M., Almlblad, H., Rybtke, M.L., Givskov, M., Eberl, L., Tolker-Nielsen, T.** (2014) Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol* 16:1961–1981.
- Finkel, S. E., Johnson, R. C.** (1992). The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Molecular microbiology* 6, 3257-3265.
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J.** (2007). The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells“. *J Bacteriol.* 189(22): 7945–7947
- Flemming, H.-C., Wingender, J.** (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8: 623–633.
- Freter, R., O'Brien, P.C.M.** (1981) Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal-mucosa–chemotactic responses of *Vibrio cholerae* and description of motile non-chemotactic mutants. *Infect Immun* 34: 215–221.
- Fuqua, C.** (2010). Passing the baton between laps: adhesion and cohesion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Molecular microbiology* 77, 533-536.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P.** (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13: 34–40.
- Gama-Castro, S., Salgado, H., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Muniz-Rascado, L., Solano-Lira, H., Jimenez-Jacinto, V., Weiss, V., Garcia-Sotelo, J.S., Lopez-Fuentes, A., Porrón-Sotelo, L., Alquicira-Hernandez, S., Medina-Rivera, A., Martínez-Flores, I., Alquicira-Hernandez, K., Martínez-Adame, R., Bonavides-Martínez, C., Miranda-Ríos, J., Huerta, A.M., Mendoza-Vargas, A., Collado-Torres, L., Taboada, B., Vega-Alvarado, L., Olvera, M., Olvera, L., Grande, R., Morett, E., and Collado-Vides, J.** (2007). RegulonDB version 7.0: transcriptional regulation of *Escherichia coli* K-12 integrated within genetic sensory response units (Gensor Units). *Nucleic Acids Res* 39: D98-105
- Gao, R., Mack, T.R., Stock, A.M.** (2007). Bacterial response regulators: Versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* 32(5):225–234.

- Gao, R., Zhang, X., Sun, Y., Kamimura, Y., Mogilner, A., Devreotes, P. N., Zhao, M.** (2011). Different Roles of Membrane Potentials in Electrotaxis and Chemotaxis of Dictyostelium Cells . Eukaryotic Cell September 2011 vol. 10 no. 9 1251-1256.
- Geesey, G.G., Richardson, W.T., Yeomans, H.G., Irvin, R.T., Costerton, J.W.** (1977). Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. Can. J. Microbiol. 23:1733–1736.
- Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L., Tolker-Nielsen, T.** (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. Mol. Microbiol. 75:815– 826.
- Gooderham, W. J. & Hancock, R. E.** (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology reviews* **33**, 279-294.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P.** (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature reviews Microbiology 2, 95-108.
- Hammer, B.K., Bassler, B.L.** (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol 50:101–104.
- Heeb, S., Blumer, C., Haas, D.** (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. J Bacteriol 184:1046–1056.
- Heeb, S., Haas, D.** (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. Mol Plant Microbe Interact. 14: 1351-63.
- Heithoff, D., Mahan, M.** (2004). *Vibrio cholerae* biofilms: stuck between a rock and a hard place. J Bacteriol 186: 4835–4837
- Hengge, R.** (2009). Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. Res Microbiol 160:667–676.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D, Cámara, M., Williams, P., Haas, D.** (2004). Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. May 2004 vol. 186 no. 10 2936-2945.
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L., O'Toole, G. A.** (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. Molecular microbiology 49, 905-918.
- Huang, Y., Rubinsky, B.** (1999). Micro-electroporation: improving the efficiency and understanding of electrical permeabilization of cells. Biomedl Microdevices 2, 145-150.
- Humair, B., Wackwitz, B., Haas, D.** (2010). GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. Appl Environ Microbiol 76:1497–1506.

- Hyytiäinen, H., Montesano, M., Palva, E. T.** (2001). Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 931–938.
- Ishihama, A.** (2010). Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS microbiology reviews* 34, 628-645.
- Jakovleva, J., Teppo, A., Velts, A., Saumaa, S., Moor, H., Kivisaar, M., Teras, R.** (2012). Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology* 158, 708-720.
- Jenal, U., Malone, J.** (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual review of genetics* 40, 385-407.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., Quax, W. J.** (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 76, 46-65.
- Kay, E., Dubuis, C., Haas, D.** (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:17136–17141.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., Haas, D.** (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188, 6026-6033.
- Kelly, A., Goldberg, M.D., Carroll, R.K., Danino, V., Hinton, J.C.D., Dorman, C.** (2004). A global role of Fis in the transcriptional control of metabolism type III in *Salmonella enterica* serovar *Thyphimurium*. *Microbiology* 150: 000-000.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T.** (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 50 : 61–68.
- Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H.W., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R., Saenger, W.** (1991). Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS. *Nature*. 10: 178-80.
- Kulkarni, P.R., Cui, X., Williams, J.W., Stevens, A.M., Kulkarni, R.V.** (2006). Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res* 34:3361–3369.
- Lahesaare, A.** (2011). Globaalse regulaatorvalgu Fis-i seondumine *Pseudomonas putida* raua metabolismis ja biofilmi moodustamises osalevate geenide ette *in vitro*. Magistritöö. Tartu Ülikool.
- 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): e11590.

- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H., Haas, D.** (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* 67:241–253.
- Lasa, I., Penadés, J.R.** (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157:99–107.
- Lee, B., Haagensen, J.A.J., Ciof, O., Andersen, J.B., Hoiby, N., Molin, S.** (2005). Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 43: 5247–5255.
- Lenz, D.H., Miller, M.B., Zhu, J., Kulkarni, R.V., Bassler, B.L.** (2005). CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 58:1186–1202.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21;103(8):2833-8.
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F. 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D.P., Romeo, T.** (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272:17502–17510.
- Liu, Z., Stirling, F., Zhu, J.** (2007). Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. *Infect Immun* 75 : 122–126.
- Liu, H., Coulthurst, S., Pritchard, L., Hedley, P., Ravensdale, M. et al** (2008). Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLOS Pathog*4 (6): e1000093.
- Lugtenberg, B.J., Kravchenko, L.V., Simons, M.** (1999). Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ Microbiol.* 1999 Oct;1(5):439-46.
- Mah, T.F.C., O’Toole, G.A.** (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34–39.
- Manos, J., Curtis, M., Tingpej, P., Arthur, J., Rose, B., Bye, P.T., Harbour, C.** (2007). Enhanced biofilm formation and downregulation of gene expression are features of a transmissible *Pseudomonas aeruginosa* clone from cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulm* 325.
- Martinez-Gil, M., Yousef-Coronado, F., Espinosa-Urgel, M.** (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular microbiology* 77, 549-561.
- Martinez-Gil, M., Ramos-Gonzalez, M., Espinosa-Urgel, M.** (2014). Roles of Cyclic Di-GMP and the Gac System in Transcriptional Control of the Genes Coding for the *Pseudomonas putida* Adhesins LapA and LapF. *Journal of Bacteriology*, 196(8), pp.1484-1495.

- Martínez-Granero, F., Rivilla, R., Martín, M.** (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl Environ Microbiol.* 72(5):3429-34.
- Mathesius, U.** (2009). Comparative proteomic studies of root-microbe interactions. *J Proteomics.* 13;72(3):353-66.
- Matilla, M.A., Travieso, M.L., Ramos, J.L., Ramos-González, M.I.** (2011). Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ Microbiol.* 13(7):1745-66.
- Meibom, K.L., Li, X.B., Nielsen, A.T., Wu, C.Y., Roseman, S., Schoolnik, G.K.** (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *P Natl Acad Sci USA* 101: 2524–2529.
- Miller, J. H.** (1972). *Experiments in Molecular Genetics.* New York: Cold Spring harbor Laboratory Press.
- Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L., Ramos, J.L.** (2000). Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 32 (2000) 315-321.
- Molofsky, A.B., Swanson, M.S.** (2003). *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol Microbiol* 50:445–461.
- Moor, H.** (2011). *Pseudomonas putida* Fis-i osalemine bakteri liikumise ja biofilmi moodustumise regulatsioonis. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- 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(Pt_12), pp.2681-2693.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S.A., Foster, K.R.** (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol* 6: e14.
- Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., Martín, M.** (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol.* 2:489–498.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H. et al.** (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4:799–808.
- Nilsson, M., Chiang, W.-C., Fazli, M., Gjermansen, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T.** (2011). Influence of putative exopolysaccharide genes on *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm stability. *Environ. Microbiol.* 13:1357–1369.
- Ninnemann, O., Koch, C., Kahmann, R.** (1992). The *E.coli* *fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *The EMBO journal* 11, 1075-1083.

- O'Callaghan, J., Reen, F.J., Adams, C., O'Gara, F.** (2011). Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs *rsmZ* and *rsmY*. *Microbiology*.157(Pt 12):3417-28.
- O'Toole, G. A., Kolter, R.** (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* 28, 449-461.
- Obst, U., Schwartz, T., Volkmann, H.** (2006) Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms. *Int J Artif Organs* 29: 387–394.
- Osuna, R., Lienau, D., Hughes, K. T., Johnson, R. C.** (1995). Sequence, regulation, and functions of *fis* in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 177, 2021–2032.
- Palleroni, N. J.** (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984, 237AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141–199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Palleroni, N. J.** (1992). Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads. In: E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (Eds.) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, DC. 105–115.
- Pan, C. Q., Finkel, S. E., Cramton, S. E., Feng, J. A., Sigman, D. S., Johnson, R. C.** (1996). Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *Journal of molecular biology* 264, 675-695.
- Pessi, G., Haas, D.** (2001). Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS microbiology letters* 200, 73-78.
- Petrova, O.E., Sauer, K.** (2012). Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *J. Bacteriol.* 194:2413–2425.
- Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., Rols, M. P.** (2016). Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci. Rep.* 6, 19778.
- Pratt, T.S., Steiner, T., Feldman, L.S., Walker, K.A., Osuna, R.** (1997). Deletion analysis of the *fis* promoter region in *Escherichia coli*: antagonistic effects of integration host factor and Fis. *J Bacteriol.* 179: 6367-77.
- Pratt, L.A., Kolter, R.** (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285–293.
- Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouزيد, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S., Nasser, W.** (2012). The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Molecular microbiology* 86, 172-186.

- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W., Segura, A.** (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56: 743–768.
- Ramos-Gonzalez, M.I., Campos, M.J., Ramos, J.L.** (2005). Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: *in vitro* expression technology capture and identification of rootactivated promoters. *J. Bacteriol.* 187:4033–4041. (Erratum, 187:5504.)
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., Haas, D.** (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molecular microbiology* 24, 309-319.
- Reimmann, C., Valverde, C., Kay, E., Haas, D.** (2005). Posttranscriptional Repression of GacS/GacA-Controlled Genes by the RNA-Binding Protein RsmE Acting Together with RsmA in the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology.* 187: 276–285.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., Bais, H. P.** (2008). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 153-166.
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M.** (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77:1–52.
- Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D. J.** (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology* 10, 644-648.
- Safo, M.K., Yang, W.Z., Corselli, L., Cramton, S.E., Yuan, H.S., Johnson, R.C.** (1997). The transactivation region of the Fis protein that controls site-specific DNA inversion contains extended mobile beta-hairpin arms. *EMBO J.* 16(22):6860-73.
- Saldana, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L., Giron, J. A.** (2009). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environmental microbiology* 11, 992-1006.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P.** (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48: 253–267.
- Schoolnik, G.K., Voskuil, M.I., Schnappinger, D. et al.** (2001). Whole genome DNA microarray expression analysis of biofilm development by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microb Growth Biofilms, Pt A* 336: 3–18.
- Schneider, R., Travers, A., Muskhelishvili, G.** (2000). The expression of the *Escherichia coli* fis gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Molecular microbiology* 38, 167-175.

- Schroth, M., Hildebrand, D.C., Panopoulos, N.** (1992). Phytopathogenic pseudomonads and plant-associated pseudomonads. In: Balows, H.G. Trüper, M., Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Ed.). *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York, NY. 3:3104-3131.
- Shao, Y., Feldman-Cohen, L. S., Osuna, R.** (2008). Functional characterization of the *Escherichia coli* Fis-DNA binding sequence. *Journal of molecular biology* 376, 771-785.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D., Nataro, J. P.** (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 41, 983-997.
- Stella, S., Cascio, D., Johnson, R.C.** (2010). The shape of the DNA minor groove directs binding by the DNA bending protein Fis. *Genes Dev.* 24(8):814-26.
- Stewart, P.S.** (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292: 107–113
- Stickler, D. J.** (1996). Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling* 94:293–305.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J. W.** (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187–209.
- Telgmann, U., Horn, H., Morgenroth, E.** (2004). Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Res* 38: 3671–3684.
- Teras, R., Jakovleva, J., Kivisaar, M.** (2009). Fis negatively affects binding of Tn4652 transposase by outcompeting IHF from the left end of Tn4652. *Microbiology*. 155(Pt 4):1203-14.
- Timmis, K.N.** (2002). *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* 4:779–781.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., Haas, D.** (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* 50: 1361– 1379.
- Valverde, C., Lindell, M., Wagner, E. G., Haas, D.** (2004). A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* 279, 25066–25074.
- Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S., Filloux, A.** (2005). The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* 151: 985–997.
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R.** (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Gene Dev* 22: 945–953.
- Watnik, P., Kolter, R.** (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* 34: 586–595.

Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T. (2003). A novel Srna component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48:657–670.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413: 860–864.

Xu, K.D., Stewart, P.S., Xia, F., Huang, C.T., McFeters, G.A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microb* 64: 4035–4039.

Xu, J., Johnson, R.C. (1995). Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodulate growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 177: 938-947.

Yousef, F., Espinosa-Urgel, M. (2007). *In silico* analysis of large microbial surface proteins. *Res Microbiol* 158: 545–550.

Zhu, J., Mekalanos, J.J. (2003). Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* 5:647–656.

KASUTATUD VEEBILEHEKÜLJED

<http://embnet.ccg.unam.mx/rsa-tools/>

www.tigr.org

LIHTLITSENTS

Mina, Liisbeth Kose (30.03.1991)

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

***Pseudomonas putida* füsioloogilise seisundi ja regulaatori Fis mõju GacS/GacA süsteemi
alumiste geenide transkriptsioonile,**

mille juhendaja on Riho Teras

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **27.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016