

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

***Pseudomonas putida* geenide *pfeR-II* ja *gacS* promootorite asukoht ja võimalik regulatsioon
ekskludoniga**

Magistritöö
30 EAP
Johanna Hendrikson

Juhendaja PhD Riho Teras

TARTU 2022

Infoleht

***Pseudomonas putida* geenide *pfeR-II* ja *gacS* promoitorite asukoht ja võimalik regulatsioon ekskludoniga**

P. putida on laialdase levikuga bakter, mis muuhulgas koloniseerib risosfääri ning millel on kirjeldatud taimekasvu soodustavat mõju. Biofilmi moodustumisel on taimejuurte koloniseerimises oluline roll. GacS-GacA on kahekomponendiline süsteem, mille aktivatsioon soodustab biofilmi teket. PfeR-II valgus funktsioon ei ole teada, kuid võib olla seotud raua omastamisega. Antud töö käigus tuvastati *P. putida* geenide *gacS* ja *pfeR-II* promoitorid ning uuriti antud promoitorite sõltuvust alternatiivsest sigma faktorist RpoS ja globaalse regulaatorvalgus Fis mõju. Lisaks hinnati erinevate faktorite mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile.

Märksõnad: *Pseudomonas putida* KT2440, GacS-GacA signaalsüsteem, PfeR-II, promoitor, ekskludon **CERCS kood ja nimetus:** B220 – geneetika, tsütogeneetika, B230 – mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Identification of the *gacS* and *pfeR-II* promoters in *Pseudomonas putida* and possible regulation of gene expression by excludon

P. putida is a plant growth-promoting bacteria. The efficiency of biocontrol is linked to successful root colonization, in which the ability to form biofilms plays an important role. Two-component system GacS-GacA positively regulates biofilm formation. The function of PfeR-II is not known. However, it could be involved in iron acquisition. This study has identified promoters for genes *gacS* and *pfeR-II*. Furthermore, the study also explored the impact of global transcription regulator Fis and alternative sigma-factor RpoS on *pfeR-II* transcription. In addition, the impact of a variety of factors on *pfeR-II* transcription was assessed.

Keywords: *Pseudomonas putida* KT2440, GacS-GacA two-component signal transduction system, PfeR-II, promoter, excludon **CERCS code and designation:** B220 – genetics, cytogenetics, B230 – microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
Sissejuhatus	4
Lühendid	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 GacS-GacA signaaliülekanesüsteem	6
1.2 Raua omastamine ja geen <i>pfeR-II</i> (PP_1651).....	8
1.3 Ekskludon	13
2. Eksperimentaalosa	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved, nende kasvatamistingimused ja plasmiidid	17
2.2.2 5' RACE	20
2.2.3 Promootorala konstruktide tegemine ja klonimine transkriptsioonivektorisse pBLKT'	21
2.2.4 Polümeraasi ahelreaktsioon	22
2.2.5 Plasmidse DNA eraldamine.....	23
2.2.6 Gelelektroforees	23
2.2.7 DNA sekveneerimine	23
2.2.8 Kompetentide valmistamine ja elektroporatsioon	24
2.2.9 <i>pfeR-II</i> deletsioontüve konstrueerimine I-SceI süsteemiga	24
2.2.10 β - galaktosidaasi eraktiivsuse mõõtmine.....	25
2.2.11 Statistiline analüüs.....	26
2.3 Tulemused ja arutelu	27
2.3.1 Geeni <i>gacS</i> promootorite kindlakstegemine ja iseloomustamine	27
2.3.2 Geeni <i>pfeR-II</i> promootorite kindlakstegemine ja kirjeldamine	33
2.3.3 Erinevate faktorite mõju geeni <i>pfeR-II</i> transkriptsioonile.....	38
Kokkuvõte	46
Summary.....	47
Kasutatud kirjandus	49
Lisa 1. Töös kasutatud oligonukleotiidid	61

Sissejuhatus

Mikroorganismidel risosfääris võib olla mõju taimede kasvule. *P. putida* on gramnegatiivne mullabakter, mis koloniseerib taimejuuri ja millel on kirjeldatud taimekasvu soodustavat võimet. Edukas kolonisatsioon mängib rolli biofilmi moodustamine, mis aitab taimejuurtele püsida jääda ning pakub kaitset keskkonnatingimuste eest. Üks biofilmi geenide regulaatoreid on kahekomponendiline süsteem (KKS) GacS-GacA, mis inhibeerib liikumisega seotud gene ning mille aktivatsioon suurendab biofilmi moodustamist läbi mõju adhesiivalkude ekspressiooni. PfeR-II on hüpoteetiline KKS vastuserregulaator, mis võib olla seotud enterobaktiini sõltuva raua omastamisega. Antud geenide transkriptsiooni regulatsiooni uurides leidsin oma bakaluresetöö raames kummalegi geenile kaks potentsiaalset promootorit, selle tõttu tekkis küsimus, kas geenide *gacS* ja *pfeR-II* regulatsiooni võib kirjeldab ekskludoni kontsept, seetõttu sai käesoleva töö esimeseks ülesandeks eelnimetatud geenide promootorite asukoha määramine.

Lühendid

ENT– siderofoor enterobaktiin

Fis– reguleeriv valk (*factor for inversion stimulation*)

Fur– globaalne regulaatorvalk (*ferric uptake regulator*)

GacS– kahekomponendilise süsteemi GacS-GacA sensorikinaas (*global activator of secondary metabolism*)

Gm– antibiootikum gentamütsiin

KKS– kahekomponendiline süsteem

Km– antibiootikum kanamütsiin

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

MÜ– Milleri ühik

nt– nukleotiid

OD– optiline tihedus (*optical density*)

PB– antibiootikum polümüksiin B

PCH– siderofoor püoheliin

Pn– antibiootikum penitsilliin

PVD– siderofoor püoverdiin

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

ROS– reaktiivsed hapniku osakesed (*reactive oxygen species*)

RpoS– alternatiivne stressi sigma faktor

Sm– antibiootikum streptomütsiin

TBDT– TonB- sõltuv transporter (*TonB dependent transporter*)

TdT– terminaalne desoksünukleotidüüli transferaas

TFS– Thermo Fisher Scientific

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 GacS-GacA signaaliülekanDESüsteem

GacS-GacA on kahekomponendiline signaalirada (KKS), mis koosneb tsütoplasmamembraaniseoselisest sensorkinaasist GacS ja tsütoplasmas paiknevast vastuse regulaatorist GacA (Pernestig et al., 2001). *P. putida* tüves KT2440 kodeerib GacS valku geen koodiga PP_1650.

GacS-GacA süsteemi aktivatsioon toimub järgmiselt: tundmatu signaali mõjul toimub GacS-i HPT domeenil (*histidine-containing phosphotransfer*) oleva histidiini jäägi (H1) autofosforülatsioon, vajalik fosforüülrühm saadakse ATP-lt. CA domeen (*catalytic ATP binding*) seob ATP-d ja katalüüsib fosforüülrühma ülekannet. Läbi fosforelee kantakse fosforüülrühm REC-domeeni (*receiver*) aspartaadi jäägile (D) ja sealt edasi teisele histidiini jäägile (H2) Hpt domeenis (*histidine phosphotransferase*). Fosforüülrühma ülekanne GacS-i H2-lt GacA N-terminuses asuvale aspartaadijäägile (D2) aktiveerib vastuse-regulaatori GacA (Chambonnier et al., 2016; Dutta et al., 1999; Gao ja Stock, 2009; Laub ja Goulian, 2007).

P. putida's ei ole GacS-GacA süsteemi aktiveerivat signaali kirjeldatud. Tõenäoliselt on tegu metaboliidiga, mille ekspressioon on seotud kõrge rakutiheduse juures tekkiva toitainete puudusega ning mis ilmub kasvukeskkonda hilises eksponentsiaalses kasvufaasis (Latour, 2020; Takeuchi et al., 2009). *E. coli* GacS-i homoloog BarE tunnetab glükoosi metabolismi kõrvalproduktide, nagu atsetaadi ja formiaadi kogunemist keskkonnas (Chavez et al., 2010). *P. protegenes*'i tüve CHA0 puhul on arvatud, et GacS-i signaalmolekul võib olla alifaatne orgaaniline hape (Dubuis, 2005). Samas arvatakse, et bakteritel ei pruugi olla ühtset GacS-i aktiveerivat signaali, kuna sensor-domeen on bakteri liikide vahel halvasti konserveerunud.

Pseudomonastes seondub GacA sRNA geenide ette ning aktiveerib nende transkriptsiooni. *P. putida*'s on kolm sRNA-d, mille transkriptsiooni GacA aktiveerib, nendeks on RsmX, RsmY ja RsmZ. *P. aeruginosa*'s reguleerib GacA kahe sRNA geeni RsmX ja RsmY transkriptsiooni (Winsor et al., 2016). Arvatakse, et kolme sRNA olemasolu võimaldab bakteril täpsemalt ja paindlikumalt reguleerida enda füsioloogiat vastusena keskkonناسignaalidele (Kay et al., 2005).

Need sRNA-d mõjutavad post-transkriptsioonilise regulaatori RsmA (*regulator of secondary metabolism*) aktiivsust, kuna sisaldavad mitmes korduses RsmA seondumisjärjestust A(N)GGA (kus N on ükskõik milline nukleotiid). sRNA-de seondumine Rsm-valkudega vähendab vaba Rsm-valkude hulka, mis saaksid seonduda oma sihtmärkjärjestustele mRNA-l. RsmA seondumisjärjestusi võib leida ribosoomi seondumisjärjestuse läheduses, sellega reguleerib RsmA sihtmärk mRNA-de translatsiooni initsiatsiooni (Heurlier et al., 2004; Huertas-Rosales et al., 2016a; Liu et al., 1997). *P. putida*'s on kirjeldatud kolme Rsm-valku: RsmA, RsmE ja RsmI, kõigi ekspressioon on erinevalt reguleeritud ning ka nende sihtmärkgeenid ei kattu täielikult (Brencic et al., 2009). Rsm-valkudel on ulatuslik mõju *P. putida* füsioloogiale seondudes ligi 12 % kõigist transkriptidest ning mõjutades nende translatsiooni. Rsm-valgud võivad sihtmärkgeenide ekspressiooni mõjutada ka kaudselt, näiteks läbi teiste regulaatorite nagu stressi sigma-faktori RpoS, mis on vajalik kleepvalgu LapF transkriptsiooniks (Martínez-Gil, 2014). Lisaks on vähemalt kolm *lapA* kuuest promootorist osaliselt RpoS-sõltuvad (Ainelo et al., 2017; Martínez-Gil et al., 2010; Monds et al., 2007). *P. putida* kolm Rsm-valku ei ole võrdsed, neil on erinev ekspressioonimuster: RsmA ja RsmE-d ekspresseeritakse esimesena, eksponentsiaalses kasvufaasis, ja RsmI-d alles statsionaarse kasvufaasi ajal. Rsm-d mõjutavad ka erinevaid geene, 437 RNA transkriptist, millele Rsm valgud seonduvad ainult 75 olid ühised kõigile kolmele Rsm-le. Näiteks bakterite kinnitumise moduleerimises on peamine roll RsmE-l, mis mõjutab adhesiinide LapA ja LapF ekspressiooni. Seetõttu on ka RsmE üleekspressioonil biofilmi moodustamine tugevalt häiritud (Huertas-Rosales et al., 2016b, 2021).

Üheks olulisemaks fenotüübiks, mida GacS-GacA KKS signaalirada reguleerib on eluvorm, GacS-GacA aktivatsiooni tulemusena toimub üleminek planktiliselt eluvormilt sessiilseks, inhibeeritakse liikumisega, virulentsusfaktorite sünteesi ja T3SS seotud geenide ekspressiooni ja soodustatakse hulgatunnetusmolekulide, T4SS ja biofilmi maatriksi jaoks vajalike eksopolüsahhariidide ekspressiooni. See on eriti oluline *P. aeruginosa* kroonilise infektsiooni väljakujunemisel, mida iseloomustab biofilmi moodustumine, mis on pinnale kinnitunud sessiilsete struktureeritud mikroorganismide kogumik ning mis toodab biopolümeerset maatriksit. Ka *P. putida* sessiilse eluvormi ehk biofilmi kujunemisel on GacS-GacA signaalirada olulise tähtsusega (Duque et al., 2013; Martínez-Gil et al., 2010). Biofilmi maatriksi koostis on kombinatsioon erinevatest

eksopolüsahhariididest, valkudest, RNA- st, eDNA-st ja veest. Konkreetne koostis sõltub bakteriliigist ja keskkonnatingimustest (Jahn et al., 1999).

P. putida puhul on biofilmi maatriksis olulised suured ekstratsellulaarsed adhesiivalgud LapA (8682 aminohapet) ja LapF (6310 aminohapet), mis mängivad rolli interaktsioonides abiootiliste ja biootiliste pindadega ning on biofilmi moodustamiseks hädavajalikud (Fuqua, 2010; Hinsä et al., 2003; Yousef ja Espinosa-Urgel, 2007; Puhm et al., 2022). LapA on seotud peamiselt varajase biofilmiga, vahendades rakkude pöördumatut kinnitumist pinnale. LapF mängib rolli hilises biofilmis vahendades rakkude vahelisi interaktsioone (Martínez-Gil et al., 2010). Sealjuures on LapA vWFa domeen vajalik peptiide poolt vahendatud biofilmi võimendavaks efektiks (Puhm et al., 2022).

P. fluorescens on *P. putida*'le lähedane liik, mõlemad on risosfääri bakterid, mille osadel tüvedel on täheldatud biokontrolli võimet ja taime kasvu soodustavaid omadusi (Ortiz-Castro et al., 2020).

P. fluorescens'i tüves Pf-5 on kirjeldatud GacS-GacA signaalsüsteemi negatiivset mõju raua metabolismis osalevate geenide ekspressioonile (sealhulgas siderofooride püoverdiin ja püoheliin süntees, TonB- sõltuvad transporterid) (Cheng et al., 2013; Hassan et al., 2010; Yu et al., 2014). *P. aeruginosa*'s on kirjeldatud nii Gac/Rsm süsteemi negatiivset kui positiivset mõju raua homöostaasis osalevatele geenidele, tõenäoliselt sõltub efekt rakutihedusest, mille juures Gac/Rsm mõju mõõdeti (Brencic et al., 2009; Burrowes, 2006; Frangipani et al., 2014). *P. aeruginosa*'s inhibeerib RsmA siderofoori püoverdiin tootmist vähendades alternatiivse sigma faktori PvdS transkriptsiooni, mis on vajalik siderofoori püoverdiin sünteesiks. Võimalik, et Rsm-valk mõjutab siderofooride sünteesi moduleerides c-di-GMP kontsentratsiooni rakus (Frangipani et al., 2014).

1.2 Raua omastamine ja geen *pfeR-II* (PP_1651)

Kuigi raud on neljas kõige levinum element maakoos (Taylor, 1964), siis aeroobsetes tingimustes neutraalsel pH-l on bioloogiliselt aktiivse raua hulk väike ning üldjuhul elusorganismid elavad rauapuuduses. Füsioloogilistel tingimustel on olulised kaks raua oksüdatsiooniastet. Raud(II), mille lahustuvus on 0,1 M pH 7,0 juures ning mis oksüdeerub aeroobsetel tingimustel,

pH-I üle 3 kiiresti raud(III) ja moodustab lahustumatuid hüdroksiide. Raud(III) lahustuvus vees neutraalsel pH-I 7,0 juures on väga halb (10^{-18} M) ning see piirab tugevalt raua kättesaadavust mikroorganismidele ja muudab raua oluliseks kasvu limiteerivaks toitaineks. Seevastu mikroaeroobsetes või anaeroobsetes tingimustes ja/või väga happelises keskkonnas on levinum vees lahustuv Fe(II) (Andrews et al., 2003).

Raua hulk rakus on rangelt kontrollitud, sest vaba raua akumulatsioonil võivad Fentoni protsessi käigus tekkida reaktiivsed hapniku ühendid (ROS- *reactive oxygen species*)(Kehrer, 2000). Fentoni protsessis tekivad neutraalsel või happelises keskkonnas hüdroksüülradikaalid (OH•) vesinikperoksiidi (H₂O₂) lagundamisel katalüsaatori Fe(II) juuresolekul. Hüdroksüülradikaal on tugev oksüdant, mis kahjustab kõiki rakule olulisi biopolümeere nii DNA-d, valke kui lipiide. pH mõjutab reaktsiooni kiirust (Gligorovski et al., 2015; Imlay ja Linn, 1988; Winterbourn, 1995). Fentoni-laadses protsessis võib hüdroksüülradikaalide teke toimuda ka teistest peroksiidest ning kasutada katalüsaatorina Cu või raua hüdroksiide (Pereira et al., 2012).

Raud on hädavajalik kõigile organismidele, väheste eranditega, nagu näiteks bakterid *Borrelia burgdorferi* ja *Lactobacillus plantarum*, kus raua ülesandeid täidab mangaan. Rauda sisaldavate ensüümide puudumine on tõenäoliselt kohastumus, kuna selgroogses peremeesorganismis on vaba raua hulk väike (Archibald, 1983; Posey ja Gherardini, 2000). Hea redokspotentsiaali tõttu on raud tihti valkude aktiivsentsis. Raud võib olla heemsete valkude nt ferritiini koosseisus, heemi koosseisus, nt tsütokroomides või raud- väävel klastrites osana raud-väävel valkudest. Rauda on vaja nii oksüdatiivsel fosforüülimisel (NADH dehüdrogenaas, peroksidaasid, superoksiidi dismutaas, flavoproteiinid, pürovaadi süntetaas, tsütokroom), DNA sünteesis ning parandamisel (ribonukleotiidi reduktaas), fotosünteesil (ferredoksiin), lämmastiku metabolismis (nitrogenaas, glutamaadi süntetaas) kui ka aromaatsete ühendite biosünteesis (Andrews et al., 2003; Anjem ja Imlay, 2012; Cornelis, 2010; Jang ja Imlay, 2007; Krewulak ja Vogel, 2008; Messenger ja Barclay, 1983).

Raskesti kättesaadava, kuid elutähtsa raua omastamiseks kasutavad ja sünteesivad bakterid rauda kelaativaid ühendeid siderofoore (Neilands, 1995). Siderofoorid on madalamolekulaarsed raua kelaatorid, mis seovad keskkonnast vees lahustumatut raud(III), seejärel seonduvad tekkinud raud(III)-siderofoor kompleksid raku pinnal olevate TonB-sõltuvate siderofoori retseptoritega, kompleks transporditakse raku ja redutseeritakse (Noinaj et al., 2010). *P. putida*

on võimeline tootma siderofoori püoverdiin (PVD) (Matthijs et al., 2009; Meyer ja Abdallah, 1978). *P. putida* erinevaid tüvesid analüüsid on leitud 35 erineva struktuuriga PVD-d (Meyer et al., 2007). Erinevalt teistest pseudomonastest, näiteks *P. aeruginosa*, mis sünteesib lisaks madalama afiinsusega püoheliini, *P. putida* sekundaarseid endogeenseid siderofoore ei sünteesi (Matthijs et al., 2009). Seevastu on *P. putida* võimeline kasutama teiste mikroorganismide toodetud eksogeenseid siderofoore, näiteks enterobaktiini, pseudobaktiin-358 ja aerobaktiini (Loper ja Henkels, 1999; Meyer, 1992). Suutlikus kasutada erinevaid siderofoore parandab võimet hankida rauda erinevates keskkonnatingimustes ja vähendab difusiooni tõttu siderofooride kadumise mõju (Kramer et al., 2020).

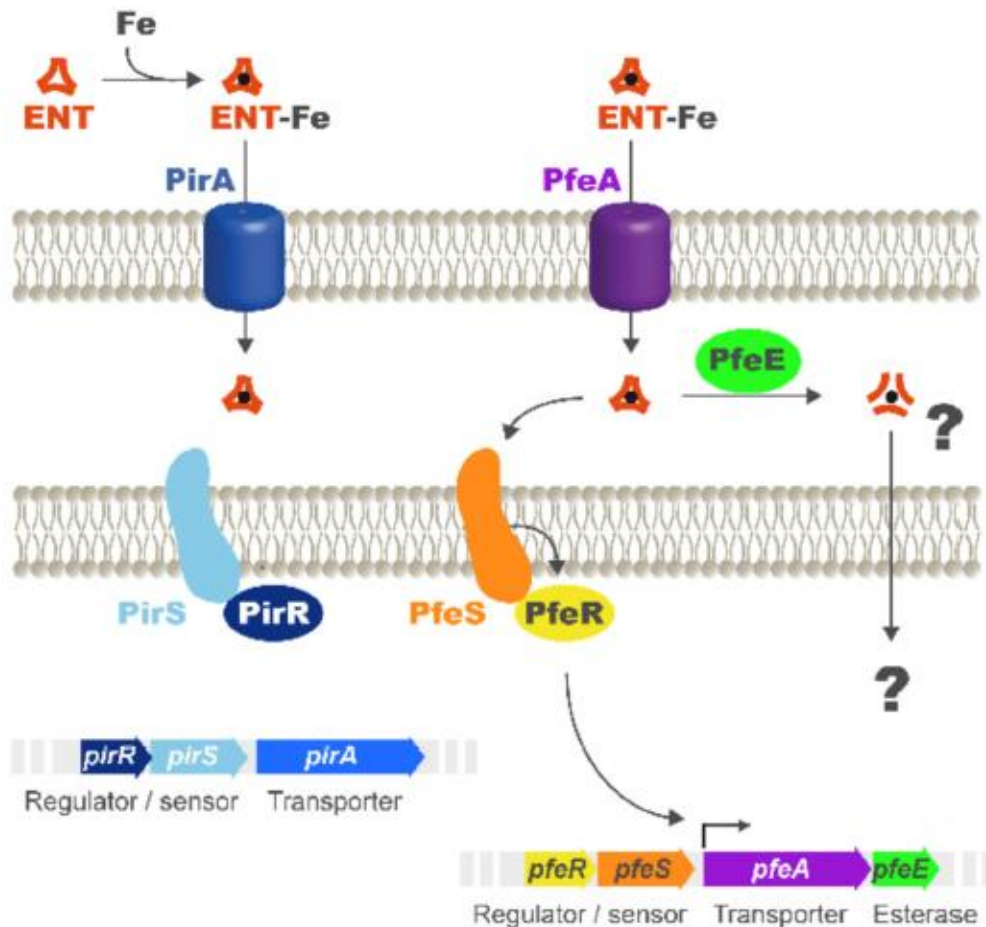
Enterobaktiin (ENT), tuntud ka kui enterokeliin on katehooli tüüpi siderofoor on Fe(III) suhtes väga kõrge afiinsusega ($K_D = 10^{52} \text{ M}^{-1}$). Tugeva afiinsuse tõttu on enterobaktiin võimeline rauda kelaatima väga rauavaestes tingimustes (Harris et al., 1979). ENT-i toodavad mitmed gramnegatiivse *Enterobacteriaceae* sugukonna liikmed, näiteks *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Erwinia carotovora*, aga ka mõned grampositiivse *Streptomyces* perekonna liikmed (Fiedler et al., 2001; Gasser et al., 2021; Payne, 1988).

Fe(III)-siderofoor kompleksid on liiga suured (piiriks on 600 Da) ning nende kontsentratsioon keskkonnas madal, mis teeb passiivselt poriinide kaudu läbi välismembraani liikumise ebaefektiivseks, seetõttu kasutatakse välismembraani TonB-sõltuvaid transportereid (TBDT) (Moeck ja Coulton, 2002; Postle, 1993). Iga TBDT tunneb ära ja transpordib ühte spetsiifilist siderofoori, äärmuslikul juhul mõnda struktuurset saranst siderofoori (Budzikiewicz, 2004). Näiteks *P. aeruginosa*'l on kaks sellist enterobaktiini omastamise süsteemi, madalama efektiivsusega PirA, mis ei ole ENT sõltuv ja suurema afiinsusega PfeA, mis on ekspresseeritud rauavaeguse tingimustes ENT juuresolekul (Dean ja Poole, 1993a, 1993b; Ghysels et al., 2005; Poole et al., 1990).

Transport nõuab energiat, mis saadakse tsütoplasma membraanil prootonite liikumapaneva jõu (PMF) ülekandmisel välismembraanile läbi TonB kompleksi. Arvatavasti toimub PMF toimel TonB konformatsiooni muutus, mis võimaldab TonB-l interakteeruda välismembraani retseptoriga TBDT ja lubada transporti (Noinaj et al., 2010; Postle, 1993; Postle ja Larsen, 2007).

TBDT koosneb kahest domeenist, C-terminaalne transmembrane 22 ahelast koosnev β -silinder, mille sees on globulaarne N-terminaalne, circa 150 aminohappe järgist koosnev, kork (*plug*)

domeen. TBDT N-terminaalses regioonis paikneb TonB-box, mis vahendab signaali ülekannet TonB-le. Korgi domeen koos ekstratsellullarsete loopidega osaleb siderofoori seondumistasku loomises (Klebba et al., 2021). Peale kompleksi seondumist teeb korgi domeen läbi konformatsioonilise muutuse ja liigub osaliselt silindrist välja, et transportida Fe(III)-siderofoor kompleksi (Annamalai et al., 2004; Klebba et al., 2021; Majumdar et al., 2020; Moynié et al., 2019; Noinaj et al., 2010).



Joonis 1. Rauda omastamine siderofoori enterobaktiin kaudu bakteris *P. aeruginosa*. Siderofoor enterobaktiin kelaadib Fe(III), mis transporditakse raku läbi TBDT PheA või PirA. Fe(III)-ENT hüdrolüüsitakse PheE poolt, kuid on ebaselge, kas raua redutseerimine ja vabanemine enterobaktiini küljest toimub periplasmaatilises ruumis või tsütoplasmas. Fe(III)-ENT kompleksi tunneb ära KKS sensorinaas PheS, mis autofosforeerub ja läbi fosforelee fosforüleerib vastuse regulaatori PheR. PheR seondub geenide *pfeA* ja *pfeE* promootoralale ja indutseerib antud geenide ekspressiooni. Modifitseeritud (Gasser et al., 2021).

PfeS-PfeR on KKS, mis reguleerib TBDT PfeA ekspressiooni (joonis 1). PfeA aktivatsioon on ENT-ist sõltuv, kuid seejuures ei ole vajalik ENT seandumine PfeA-le, piisab ka PirA kaudu rakku toodud enetrobaktiinist, et PfeS-i stimuleerida (Dean ja Poole, 1993a, 1993b). Tsütoplasma membraanis paiknev sensor PfeS tunneb ära signaali Fe(III)-ENT kompleksi kujul ja läbi His-Asp fosforelee fosforüleerib vastuse regulaatori PfeR (Stock, 1989). PfeR seondub järjestusele *circa* 179 nt *pfeA* geeni algusest allavoolu ja aktiveerib *pfeA* ekspressiooni (Dean et al., 1996).

Geenide *pfeS* ja *pfeR* ekspressioon on rauast sõltuv, mida vahendab Fur (Dean et al., 1996). Fur on globaalne raua metabolismis osalevate geenide transkriptsiooni regulaator. Raua juuresolekul kasutab Fur Fe(II) korepressorina ja seondub homodimeerinena DNA-l Fur-box järjestusega, mis viib rauatundlike geenide transkriptsiooni inhibeerimisele (Bagg ja Neilands, 1987; Cornelis, 2010; Ochsner ja Vasil, 1996; Prince et al., 1993).

Geeni *pfeA* kõrval on kromosoomis *pfeE*, mis kodeerib periplasmaatilist esteraasi, mis hüdrolüüsib Fe(III)-ENT lagundamist Fe(III)-(DHBS)₃. Seda, kas Fe(III)-(DHBS)₃ reduktsioon raua vabanemiseks toimub periplasmaatilises ruumis või tsütoplasmas ei ole teda (Perraud et al., 2018). Fe(III) redutseeritakse Fe(II), mis hoiustatakse, liidetakse ensüümide koosseisu. Liigne Fe seondub Fur repressorvalguga (Noinaj et al., 2010).

Muuhulgas pärsib ENT olemasolu söötmes *P. aeruginosa*'s geenide transkriptsiooni, mis osalevad endogeense siderofoori PCH kaudu raua omastamises. Eelistatud raua omastamise meetod korreleerub siderofooride affinusega, enerobaktiini eelistatakse püoverdiinile ning viimane eelistatud püoheliinile (Dean ja Poole, 1993b; Gasser et al., 2021).

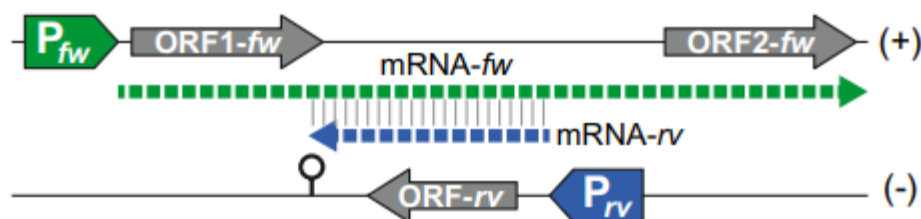
P. putida's on KEGG andmebaasi järgi kaks KKS, mis on määratletud kui PfeS-PfeR: PP_0533-PP_0534 (Pfe-I) ja PP_1651-PP_1652 (Pfe-II). Nende süsteemide vastuseregulaatoreid kodeerivad PP_0534 (edaspidi *pfeR-I*) ja PP_1651 (edaspidi nimetatud *pfeR-II*). Vastuseregulaatorite geenide nukleotiidsete järjestuse vaheline sarnasus on 66 % ($E= 6 \times 10^{-34}$) ning valkude sarnasus on 53 % ($E= 6 \times 10^{-76}$) (Ogata et al., 1999).

Selline kahe sarnase geeni olemasolu on tekkinud, kas läbi geenide duplikatsiooni (paraloog) või horisontaalse geeniülekanne (ortoloog). *P. putida* näol on tegemist keskkonnabakteriga, mille elukeskkond on väga muutlik ning geenide duplitseerimine on üks peamisi viise, kuidas saavad tekivad uue funktsiooniga geenid, mis võivad parandada ellujäämist muutunud elukeskkonnas (Bratlie et al., 2010; Gevers et al., 2004; Kondrashov et al., 2002).

1.3 Ekskludon

Ekskludon on geeniekspressiooni reguleerimise mehhanism, milles mRNA-d käituvad asRNA-dena ning reguleerivad geeniekspressiooni. Ekskludonis asuvad geenid lähestikku vastassuunaliselt, niimoodi, et osa ühe geeni mRNA-st on komplementaarne vastassuunaliselt transkribeeritud geeni mRNA-ga ja seetõttu käitub selle suhtes asRNA-na. Ehk ekskludoni mRNA-del on kahetine funktsioon, transkripti distaalne osa käitub mRNA-na ja võimendab geeni ekspressiooni ning samaaegselt 5' UTR osa on komplementaarne vastasahelal oleva geeniga ja läbi dupleksi moodustamise inhibeerib selle geeni ekspressiooni. Kattuvate geenide ekspressioon sõltub nende promootorite erinevast aktivatsioonist, mitmes ekskludonis on üks promootor konstitutiivne ja teine mõne alternatiivse sigma-faktori (nt SigB) kontrolli all (Lebreton ja Cossart, 2016; Sesto et al., 2013; Toledo-Arana et al., 2009; Wurtzel et al., 2012).

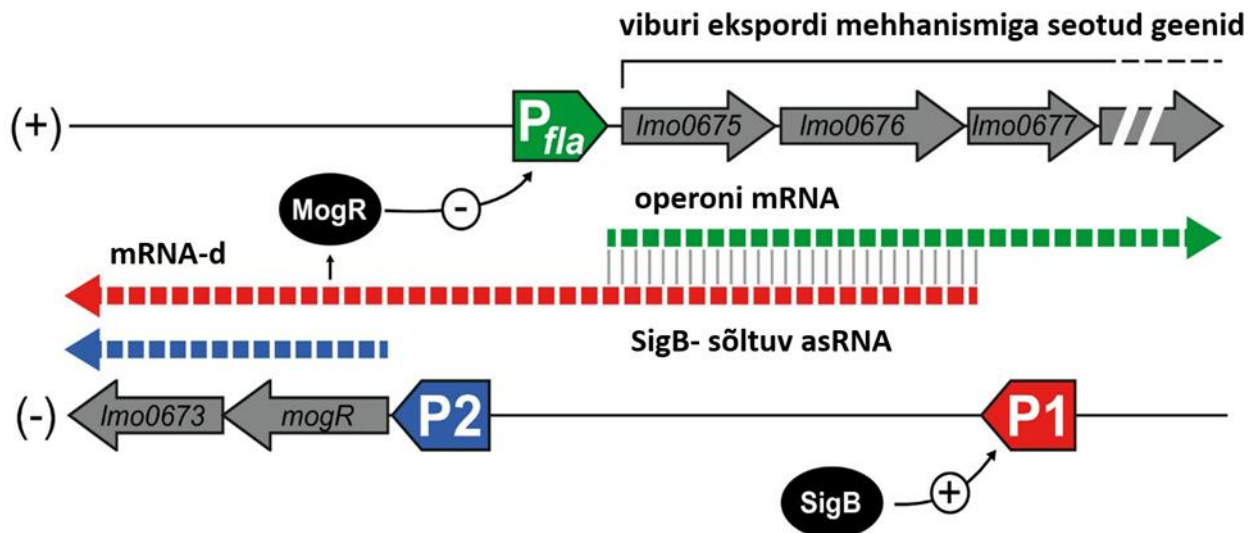
Ekskludoni kirjeldati esimesena grampositiivse patogeeni *Listeria monocytogenes*'l, mille genoomis tuvastati kokku 13 geenide paiknemist, mille ekspressioon võiks olla reguleeritud ekskludoniga (Toledo-Arana et al., 2009; Wurtzel et al., 2012). Ekskludonile iseloomuliku geenide paigutust on kirjeldatud ka *Listeria welshimeri*'l ja *Clostridium difficile*'l ning tsüanobakteril *Synechocystis* sp. PCC6803 (Georg ja Hess, 2011; Wurtzel et al., 2012). Kasutades transkriptoomi andmeid on *in silico* analüüsid ennustanud võimalike ekskludone ka gramnegatiivsetele bakteritele näiteks *Escherichia coli* tüvele K-12 (Chia et al., 2021; Lybecker et al., 2014). Ekskludoni äärmuslikumat varianti n-ö *noncontiguous operon*-i (katkendlik operon) on kirjeldatud ka *Staphylococcus aureus*'l- *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* (joonis 2).



Joonis 2. *Noncontiguous operon*. Forward ahelal (+) olevat operoni poolitab vastasahelalt transkribeeritav ORF-rv. Tekib kaks kattuvat mRNA-d, mis on vastastiku reguleeritud. Viisnurgad tähistavad promootoreid, hallid nooled avatud lugemisraame, forward ahela mRNA on tähistatud rohelse katkendjoone- ja reverse ahela transkript sinise katkendjoonega, hallid jooned transkriptide vahel tähistavad paardunud aluseid, ring- transkriptsiooni terminaatorit. Modifitseeritud (Toledo-Arana ja Lasa, 2020).

Noncontiguous operon kirjeldab olukorda kui üks operon sisaldab geeni, mida ekspresseeritakse vastassuunas teistest operonis olevatest genidest ja seejuures mõjutavad vastasahelatelt tulevad transkriptid üksteise ekspressiooni, mis on vahendatud kaheaahelaliste dupleksite tekke ja nende lagundamisega endoribonukleaside poolt ning läbi transkriptsioonilise interferentsi (Sáenz-Lahoya et al., 2019). Hästi kirjeldatud ekskludoni näide on *mogR—lmo0675* lookus *Listeria monocytogenes*'e genoomis (joonis 3), mis reguleerib bakteri viburite sünteesi ning seeläbi ka liikumist (Toledo-Arana et al., 2009).

asRNA vahendatud viburi geenide ekspressiooni repressioon



Joonis 3. Viburi geenide ekspressiooni regulatsioon läbi ekskludoni *L. monocytogenes*-is. *P_{fla}* on promootor, mis kontrollib polütsistronse mRNA transkripti sünteesi, mille pealt kodeeritakse osad viburi ekspordi mehhanismi valke. *Fla* operoni mRNA on tähistatud rohelise katkendjoonega. *MogR* on *P_{fla}* operoni transkriptsiooniline repressor. *MogR—lmo0673* operoni mRNA-d ekspresseeritakse kahelt promootorilt- *P1* ja *P2*. Sinine katkendjoon on promootorilt *P2* ekspresseeritud *mogR-lmo0673* mRNA. Punane katkendjoon tähistab promootorilt *P1* ekspresseeritud ekskludoni transkripti, mille pikk 5' UTR on komplementaarne ja antisens vastasahela *fla* operoni transkriptiga ning mille distaalne osa on *mogR-lmo0673* mRNA. Promootor *P1* on *SigB* kontrolli all. Modifitseeritud (Toledo-Arana ja Lasa, 2020).

L. monocytogenes'e liikumine sõltub temperatuurist, 30 °C juures ning madalamatel temperatuuridel on bakteril palju vibureid ja bakter on liikuv. Seevastu temperatuuril 37 °C, peremeesorganismis, on bakteri liikumine inhibeeritud (Peel et al., 1988). Bakteri nn liikumislookus koosneb lähestikku vastasahelatelt paiknevatest geenist *mogR* ja *lmo* operonist, mis

koosneb kolmest geenist, mis kodeerivad viburi ekspordi masinavärgis osalevaid valke. *Imo0675* kodeeritava valgu funktsioon ei ole teada, kuid *Imo0676* ja *Imo0677* kodeerivad vastavalt valke FliP ja FliQ, mis koos FliR-iga moodustavad viburi ekspordi masinavärgi. MogR on *Imo* operoni temperatuuri sõltuv transkriptsiooni repressor (Gründling et al., 2004; Kamp ja Higgins, 2011). Geeni *mogR* transkribeeritakse kahelt promootorilt: konstitutiivne promootor P2, mis asub 45 nt geenist ülesvoolu ja P1, mis asub 1697 nt ülesvoolu. P1 on kontrollitud alternatiivse stressi sigmafaktoriga SigB. Transkriptsioon SigB kontrolli all olevalt promootorilt P1 annab ekskludonile iseloomuliku transkripti, mille proksimaalne 5'UTR osa on asRNA geenidele *Imo0675-0670-0677* ja mille distaalne osa on *mogR* kodeerimisjärjestus. Ekskludonile iseloomulik transkript mõjutab negatiivselt viburi ekspordi valkude translatsiooni, kuid suurendab nende repressori *mogR* ekspressiooni. Kaks sõltumatut mehhanismi- vastasahela mRNA translatsiooni inhibitsioon ja suurenenud repressori *mogR* ekspressioon tagab, et viburi sünteesi ei toimu (Sesto et al., 2013; Toledo-Arana et al., 2009; Wurtzel et al., 2012). Ekskludon on kui genoomne lüliti, mis võimaldab ühel keskkonnasignaali koordineeritult reguleerida samas lookuses ja seotud funktsiooniga geenide ekspressiooni.

asRNA-d võivad olla eraldiseisvad transkriptid, aga võivad ka pärineda mRNA 5' või 3' UTR otstest. asRNA-d võivad mõjutada oma komplementaarse geeni ekspressiooni, kas (i) transkriptsiooni regulatsiooni tasemel, soodustades transkriptsiooni attenuatsiooni või interferentsi (Callen et al., 2004; Stork et al., 2007); (ii) translatsiooni regulatsiooniga, blokeerides ribosoomi seondumist mRNA-le (Kawano et al., 2007) või (iii) läbi mRNA stabiilsuse. asRNA-na käituv mRNA moodustab vastasahelalt transkribeeritud mRNA-ga dupletsi, mis võib viia kaheaheelalise RNA dupletsi selektiivse degradatsioonini näiteks RNAas III poolt (Lasa et al., 2011; Lybecker et al., 2014). Alternatiivselt võib dupletsis olemine kaitsta *sense* transkripte lagundamise eest endo- ja eksoribonukleaside nt RNase E abil või käivitada nende spetsiifilise lõikamise (Opdyke et al., 2011; Sesto et al., 2013; Stazic et al., 2011). Ekskludoni vahendatud regulatsioon toimub tõenäoliselt läbi dsRNA lagundamise RNase III abil (Lasa et al., 2011; Wurtzel et al., 2012).

Antisens ekspressioon koos RNase III võimega lagundada duplette võib ka olla võimalus tekkinud transkriptsioonilise müra likvideerimiseks, mis muidu võiks hakata võistlema vajalike transkriptidega protsessimise ja translatsiooni pärast. Kui geeni ekspresseeritakse sihipäraselt, siis sens RNA hulk ületaks antisens oma ja paardumata *sense* transkriptid ei ole RNase III

sihtmärk. Lisaks võimaldab kontrollida sensis transkripti hulka läbi antisenss ekspressiooni reguleerimise. Antisenss võib ka aidata vältida 5' või 3' üleulatuvate transkriptide samaaegset ekspressiooni rakus. (Lasa et al., 2011). *MogR-fli* operoni puhul näiteks toetab ekskludon motiilise ja sessiilise eluviisi eraldust.

Ülegenoomsete meetodite, nagu ahelaspetsiifilise RNA-seq ja oligonukleotiid- mikrokiip kasutuselevõtt on näidanud, et antisenss transkriptsioon on laialt levinud kõigis eludomeenides sealhulgas prokarüootides (Georg ja Hess, 2018; Georg et al., 2009; Güell et al., 2009; Yelin et al., 2003). Gómez-Lozano et al., 2014 töös kasvatati *P. aeruginosa* rakke erinevatel tingimustel ja kasutades RNA-seq-i tuvastati genoomis 232 asRNA transkripti. Sõltuvalt tööst varieerub leitud asRNA-de hulk palju, kolmes *P. aeruginosa*-ga tehtud uurimuses erines leitud asRNA-de hulk pea kümme korda. Kõikumine võib tulla erinevustest cDNA raamatukogu ettevalmistamises, kasutatud sekveneerimistehnoloogias, katvusest, erinevusest asRNA defineerimisel. Lisaks on asRNA-de ekspressioon tugevalt sõltuv keskkonnatingimustest, mida näitab ka fakt, et näiteks *B. subtilis*-es on poolte asRNA-de transkriptsioon initsieeritud mingisuguse alternatiivse sigma faktori ja mitte sigma70 poolt, sama näitaja valku kodeerivate geenide puhul on 26 % (Gómez-Lozano et al., 2014; Nicolas et al., 2012; Thomason et al., 2015; Wurtzel et al., 2012). Suurema osa antisenss transkriptide roll geeniregulatsioonis teadmata (Thomason ja Storz, 2010). Võimalik, et enamus on mitte- funktsionaalsed ja lihtsalt transkriptsioonilise müra kõrvalprodukt, sellele viitab asRNA-de vähene konserveerumine isegi lähedaste liikide vahel (Raghavan et al., 2012).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli uurida geenide *gacS* ja *pfeR-II* transkriptsiooni regulatsiooni. Sealjuures kontrollida hüpoteesi, et geenide *gacS* ja *pfeR-II* transkriptsioon on reguleeritud läbi ekskludoni. Sellest tulenevalt oli esimeseks sammuks antud geenide promootorite tuvastamine ja kirjeldamine. Teiseks töö osaks kujunes geeni *pfeR-II* funktsiooni uurimine, kirjeldades tundmatu funktsiooniga *pfeR-II* transkriptsiooni mõjutavaid faktoreid. Varasemalt on meie laboris tehtud töödest teada, et globaalne regulaator Fis seondub *gacS*-i promootoralale. Seetõttu oli kontrolliti ka Fis-i mõju *gacS* ja *pfeR-II* transkriptsioonile.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved, nende kasvatamistingimused ja plasmiidid

Tabelis 1 on ära toodud kasutatud bakteritüved ja tabelis 2 plasmiidid. Töös kasutatud oligonukleotiidid on Lisa 1.

Tabel 1. Bakteritüved

<i>Pseudomonas putida</i> tüvi	Kirjeldus	Allikas
PaW85	Metsiktüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud tüvega KT2440	(Bayley et al., 1977)
PaW85Δ <i>rpoS</i>	<i>rpoS</i> geen deleteeritud	Konstrueeris Hanna Ainelu
PSm	PaW85- I põhinev tüvi, geeni <i>glmS</i> järele on inserteeritud mini- Tn7- ΩSm kassett, (Sm ^R)	(Teppo, 2010)
F15	PaW85; <i>glmS</i> geeni järele inserteeritud mini-Tn7-term- <i>lacI</i> ^q - P _{<i>tac</i>} - <i>fis</i> -T1T2-ΩGm, (Gm ^R)	(Jakovleva et al., 2012)

Tabel 2. Plasmiidid

Plasmiidi nimi	Kirjeldus	Allikas
pB_P _{gacS} -0	Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSdownBHI ja gacSupBamHI 290 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	(Hendrikson, 2019)
pB_P _{gacS} -P1m	Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI, gacSdownBHI ja gacS_P1_mut4 290 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_P _{gacS} -P2m	Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI, gacSdownBHI ja asgacS-pr2-mut 290 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_P _{gacS} -P1mP2m	Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSmutpikk ja gacSupBamHI 290 nt pikkune järjestus, (Km ^R). Matriits plasmiid pB_P _{gacS} -p1mutp2mutlühike	Käesolev töö
pB_P _{pfeRII} -1	Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja gacSdown4BamHI 354 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	R. Teras
pB_P _{pfeRII} -4	Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja gacSdownfisdown2 159 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	R. Teras
pB_P _{pfeRII} -5	Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja asgacS-P1-0 126 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	(Hendrikson, 2019)
pB_P _{pfeRII} -5/6-5	Amplifitseeritud oligonukleotiididega PferRII-5/6-5 ja asgacSP1-0 35 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_P _{pfeRII} -5/6-4	Amplifitseeritud oligonukleotiididega PferRII-5/6-4 ja asgacSP1-0 46 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_P _{pfeRII} -5/6-3	Amplifitseeritud oligonukleotiididega PferRII-5/6-3 ja asgacSP1-0 55 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_P _{pfeRII} -5/6-2	Amplifitseeritud oligonukleotiididega PferRII-5/6-2 ja asgacSP1-0 66 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö

Tabel 2 jätk. Plasmiidid

pB_ P _{pfeRII} -5/6-1	Amplifitseeritud oligonukleotiididega P _{pfeRII} -1 ja asgacSP1-0 82 nt pikkune järjestus, (Km ^R). Matriitsiks PaW85 rakud	Käesolev töö
pB_ P _{pfeRII} -2/3-6	Amplifitseeritud oligonukleotiididega P _{pfeRII} -2/3-6 ja gacSdown3BHI 34 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_ P _{pfeRII} -2/3-5	Amplifitseeritud oligonukleotiididega P _{pfeRII} -2/3-5 ja gacSdown3BHI 44 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_ P _{pfeRII} -2/3-4	Amplifitseeritud oligonukleotiididega P _{pfeRII} -2/3-4 ja gacSdown3BHI 54 nt pikkune järjestus, (Km ^R)	Käesolev töö
pB_ P _{pfeRII} -2/3-2	Amplifitseeritud oligonukleotiididega P _{pfeRII} -2/3-2 ja gacSdown3BHI 84 nt pikkune järjestus, (Km ^R) matriitsiks PaW85 rakud	Käesolev töö
pB_ P _{pfeRII} -pr1mut	Amplifitseeritud oligonukleotiididega P _{pfeRII} pr1mut, gacSdown4BHI ja gacSpr2BHI 354 nt pikkune järjestus, (Km ^R). Matriitsiks PaW85 rakud	Käesolev töö
pBLKT'	Vektor, mis sisaldab ilma promootorita reportergeeni <i>lacZ</i> ja mille ees on transkriptsiooniterminaator T1T2 ja Km ^R	(Moor, 2011)
pEMG	Suitsiidplasmiid deletsioontüvede tegemiseks, sisaldab endonukleaasi I-SceI lõikesaite ja multikloneerimisjärjestust, (Km ^R)	(Martínez-García ja de Lorenzo, 2011)
pSW	Abiplasmiid, mis sisaldab I-SceI endonukleaasi kodeerivat geeni, (Pn ^R)	(Wong ja Mekalanos, 2000)

Bakterite kasvatamiseks kasutati kas Luria Bertani täissöödet (LB), mis sisaldab 10 g/l NaCl, 5 g/l pärmiekstrakti ja 10 g/l trüptooni (Miller, 1992); M9-minimaalsöödet, mis sisaldab M9 puhvrit (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl ja 9 mM NaCl), 0,2 % glükoosi, 2,5 ml/l rauaga või rauavabasid mikroelemente (667 µM MgO, 50 µM CaCO₃, 40 µM FeSO₄, 12,5 µM MnSO₄, 12,5 µM ZnSO₄, 2,5 µM CuSO₄, 2,5 µM CoSO₄, 1,9 µM H₃BO₄) ja 0,4% kaseiini hüdrolysaati koos L-

trüptofaaniga (20 µg/ml) (CAA-Trp) (Miller, 1972) või K10Tπ söödet, mis sisaldab 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,2 % trüptooni, 0,15 % glütserooli ja 0,61 mM MgSO₄ (Monds et al., 2006).

Tardsöötme saamiseks lisati enne autoklaavimist agarit (15 g/l). Baktereid kasvatati temperatuuril 30 °C, vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti bakterikultuuri loksutil (katseklaaside puhul 180 pööret/min). Söötmesse lisati vastavalt vajadusele seleksioonimarkerina 50 µg/ml antibiootikumi kanamütsiin (Km), 200 µg/ml streptomütsiin (Sm) või gentamütsiini lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml (Gm). *P_{tac}* promootori indutseerimiseks F15 tüves kasutati IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 1 mM.

Raua efekti määramiseks kasvatati rakke M9-söötmes, kasutades ilma rauata mikroelementide lahust ja kuhu kuhu tiitriti sisse raud(II)sulfaati. Raua lõppkontsentratsioonid söötmes olid järgmised: 0 µM, 0,156 µM, 0,625 µM, 2,5 µM, 10 µM, 40 µM. Fosfori mõju hindamiseks kasvatati rakke fosforivaeses (0, 14 mM P_i) K10Tπ söötmes (Monds et al., 2006), kaaliumfosfaati lisati niimoodi juurde, et fosfori lõppkontsentratsioonid olid 0,14 mM, 1,68 mM, 4,22 mM, 10,56 mM, 26,4 mM ja 66 mM.

2.2.2 5' RACE

mRNA 5' otsade kindlaks tegemiseks kasutati 5' RACE meetodit (*rapid amplification of cDNA ends*) järgides modifitseeritud Sambrooki protokollit (Sambrook, 2001).

P. putida PaW85 rakke kasvasin LB-söötmes 24h 30 °C juures, eksponentsiaalses kasvufaasis rakkude saamiseks tegin üleöö kultuurist ümberkülvi puhtasse söötmesse ja kasvasin 4h. RNA eraldamiseks kasutasin Thermo Fisher Scientific GeneJet RNAPurification Kit-i järgides kaasasolevat protokollit. Eraldasin RNA 400 µl statsionaarse kasvufaasi rakkudest või 1 ml eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest. RNA eralduse kvaliteedi hindamiseks kontrollisin saadud produkti geelelektroforeesiga (vt peatükk 2.2.6).

Järgnes genoomse DNA eraldamine RNA lahusest. 1 µg RNA kohta kasutasin 1µl TFS *DNase Rnase-free* ensüümi, 1 µl TFS 10x reaktsioonipuhvrit koos MgCl₂, ja RNA lagunemise pidurdamiseks TFS RiboLock RNase Inhibitor'i lõppkontsentratsiooniga 1U/µl kohta ning 10 µl mahuni DEPC- ga

töödeldud vett. Inkubeerisin lahust 30 min 37°C juures, mida peale lisasin lahusele 1 µl EDTA-d ja inkubeerisin 65° kraadi juures 10 min, et ensüümi inaktiveerida.

Eraldatud RNA puhastamiseks kasutasin TFS GeneJET RNA Purification Kit'i, järgides kaasasolevat protokollit.

RNA hulga ja kvaliteedi määramiseks lahusest kasutasin NanoDrop spektrofotomeetrit.

RACE-i analüüsi esimeseks etapiks oli komplementaarse cDNA ahela süntees, mille jaoks kasutati TFS või Promega pöördtranskriptaasi ja geenispetsiifilist praimerit. Geeni *pfeR-II* jaoks praimer *gacSRACE1*, *gacS*-i jaoks *gacSup* või *gacSupup*, positiivseks kontrolliks oli geen *lapA* praimeriga *lapARACE1*. Etappide vahel kasutati puhastamiseks cDNA ZymoResearch DNA Clean&Concentrator-5 komplekti. Järgmiseks sammuks oli polünukleotiidsaba sünteesimine 3' otsa kasutades TFS TdT-i (terminaalse desoksünukleotidüül transferaas), mida lisati reaktsioonisegusse 30 U/1,5 µl, lisaks 4 µl 1mM dGTP ja 4 µl 5x TdT puhvrit. Segu inkubeeriti 20 min 30°C juures ja 10 min 70°. Järgnes teise DNA ahel süntees TFS Taq- polümeraasiga, kasutades polü-sabaga seonduvat praimerit (*Adapt_pikkC* või *Adapt_pikkT*). Kasutati järgnevat PCR-i programmi: 95°C 5min→55- 65°C niimoodi, et temperatuur tõuseb kümne minuti jooksul üks kraad minutis→ 72°C 10 min. Sihtmärk cDNA amplifitseerimiseks kasutasin Solis BioDyne HOT FIREPol MIX'i, geenispetsiifilist praimerit 2 (*pfeR-II- gacSRACE2/gacSRACE*, *gacS- gacSpr1BHI/GacSfis3*, *lapA- lapARACE2*) ja *Adapt_pikkC/T* külge seonduvat *Adaptlyh*-i. Saadud produkt Sanger- sekveneeriti TÜ genoomika instituudi tuumiklaboris.

2.2.3 Promootorala konstruktid tegemine ja kloneerimine transkriptsioonivektorisse pBLKT'

Geenide *gacS* ja *pfeR-II* promootorala konstruktid tegemiseks amplifitseeriti PCR-iga soovitud promootorala regioon, kasutades oligonukleotiidide, mille 5' otsas oli restrikaasi BamHI lõikejärjestus. Konstruktid tegemiseks, mille oodatavad -10 konsensusjärjestused oleks ära muteeritud ja promootorid seeläbi inaktiivseks muutunud kasutati veega oligonukleotiide. Nii PCR produkte kui vektorit pBLKT (Moor, 2011) lõigati BamHI ensüümiga. Kokku ligeerimiseks kasutati TFS T4- ligaasi. Kloneerimisel kasutati firma Thermo Fisher Scientific ensüüme. Kloneerimise õnnestumist kontrolliti PCR reaktsiooniga ja kloneeritud ala sekveneerimisega. Kloneeritud

fragmendi orientatsiooni kontrollisin paari oligonukleotiididega, millest üks seondub vektorile (näiteks LacZseq) ning teine fragmendile. Kloneeritud ala sekveneerimiseks kasutasin oligonukleotiide, mis seonduvad vektorile, et kogu fragment ülesamplifitseerida.

Sadestamiseks lisati PCR proovile 450 µl vett, 1/10 mahtu 5 M NaCl ja kaks mahtu 96 % etanooli ja hoiti 10 min -20 °C juures. Geneetiline materjali sadestati põhja külmsentrifuugis (kiirusega 15 115 g x 10 min jooksul). Supernatant eemaldati ja sadet pesti 150 µl 75 % etanooliga ja peale kuivatamist võeti sade üles 30 µl vees.

Restriksiooniks kasutati TFS BamHI restrikaasi ja ligeerimiseks sama firma T4 DNA ligaasi. Restriksioon ja ligeerimine teostati vastavalt tootja protokollile. Ligeerimisseguga mahuga 15 µl sisaldas ligikaudu 0,1 µg plasmidi, 0,125 µg fragmenti, TFS 10x T4 DNA Ligase Buffer (400 mM Tris- HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP), 1 mM ATP-d, 0,5 U ligaasi ja mahuni vett. Ligeerimisreaktsiooni toimumiseks hoiti reaktsioonisegu üleöö toatemperatuuril. Peale ligaasisegu sadestamist ja puhastamist sarnaselt eelpool kirjeldatule, viidi ligaasisegu elektroporatsiooniga kompetentsetesse rakkudesse. Rakud plaaditi selektiivsele tardsöötmele ja kolooniate õigsust kontrolliti PCR-iga.

2.2.4 Polümeraasi ahelreaktsioon

PCR- reaktsiooni kasutati nii kloneerimiseks kui konstruktide õigsuse kontrollimiseks. PCR-reaktsioonid viidi läbi Biometra või Eppendorf termotsükleriga. Sõltuvalt katsest oli reaktsioonisegu maht 25–50 µl ja sisaldas PCR- puhvrit (750 mM Tris- HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X-100), 0,2 mM dNTP-d, 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol spetsiifilist praimerit, 0,15 U Taq-polümeraasi, denoniseeritud vett vajaliku mahuni ning matriitsiks termilise töötlemisega PaW85 bakterirakkudest vabanenud DNA-d või plasmidi. GC- rohkete järjestuste korral lisasin ka 3 µl Solis BioDyne GC- segu. Alternatiivselt kasutati Solis BioDyne FIREPol Mastermix-i, sel juhul sisaldas reaktsioon 10 pmol spetsiifilist praimerit, matriitsi ja mahuni vett. PCR-programm koosnes 25–30 tsüklist, mis sisaldasid järgmisi etappe: 30–60 s 96°C DNA denatureerimiseks, 30–60 s 58°C praimerite seondumiseks matriitsahelale ning sõltuvalt amplifitseeritava ala pikkusest 30–60 s 72°C DNA sünteesiks. Juhul kui reaktsioonis kasutati kuumutamata bakterirakke lisati enne tsükli algust 2 min etapp 96°C juures, et bakterirakke lõhkuda. Kui kasutati Solis BioDyne

FIREPol Mastermixi kuumutati segu 12 min 96°C juures, et aktiveerida termostabiilne DNA polümeraas.

2.2.5 Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmiidse DNA eraldamiseks rakkudest kasutati Favorgen-i DNA FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit-i järgides tootja protokoll. DNA võeti üles 70 µl-s eludeerimispuhvr, kontrolliti geelil ja hoiustati -20 °C juures.

2.2.6 Geelelektroforees

Nii PCR-produktide kui plasmiidse DNA analüüsimiseks kanti DNA, vastavalt produktide suurusele 1- või 2 % agarosgeelile 1x TAE puhvr (50 mM Trisatsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2), kuhu oli visualiseerimiseks lisatud etiidiumbromiidi (0,20 µg/ml). DNA pikkuse hindamiseks kanti geelile ka TFS ZipRulerExpress suurusmarker 1 või 2. Vees lahustatud DNA-le lisati 5 µl 3 µl laadimispuhvit (0,04 % broomfenool-sinise lahus 50 % glütseroolis). Geeli voolutati pingel 5 V/cm. DNA visuliseerimiseks pildistati geeli UV- laual, lainepikkusel 302 nm.

Peale RNA eraldust saadud materjali kvaliteedi hindamiseks kasutati etiidiumbromiidita 1 % TAE-puhvr agarosgeeli. Võrdluseks oli varem eraldatud RNA. Geel värviti voolutamise järel hoides geeli 10 min etiidiumbromiidi sisaldavas vesilahuses.

2.2.7 DNA sekveneerimine

DNA nukleotiitse järjestuse kontrollimiseks proovid sekveneeriti. Kasutamata jäänud oligonukleotiidide eemaldamiseks töödeldi PCR proove 2,5 U *E.coli* ExoI-i ja 1 U aluselise fosfataasiga (FastAP) 30 min jooksul 37°C juures, reaktsiooni peatamiseks hoiti proove 15 min 80°C juures. Sekveneerimisreaktsioon lõppmahuga 10 µl sisaldas 2 µl 5x lahjenduspuhvit (200 mM Tris pH 9,0, 6 mM MgCl₂), 0,7 µl BigDye Premix-i, 1 µl vastavat praimerit (1,6 pmol), 1 µl puhastatud PCR- i produkti ning mahuni deioniseeritud vett. Proovide sekveneerimiseks kasutati firma Applied Biosystems BigDye Terminator v3.1 sekveneerimiskomplekti järgides tootja

protokollil omapoolsete modifikatsioonidega. Sekvenerimisreaktsioon koosnes 30 tsüklist järgmistel tingimustel: 15 s 95 °C, 10 s 58 °C ja 45 s 60 °C. Reaktsioonisegu sadestati 2 µl dekstraani ja 30 µl külma 96 % etanooliga. Sadet pesti kaks korda 180 µl 75 % etanooliga, supernatant eemaldati ja hoiti 65°C juures kuni etanool oli aurunud. Proov võeti üles 10 µl 70 % formamiidis. Kasutati TÜ genoomika instituudi sekvenerimise tuumiklabori teenust Sanger- tüüpi sekvenerimiseks. Saadud sekvensi analüüsiti programmiga SnapGene Viewer 4.2.11.

2.2.8 Kompetentide valmistamine ja elektroporatsioon

Kompetentide tegemiseks kasvatati *P. putida* PaW85 rakke üleöö 5 ml LB- söötmes. Tsentrifugeeriti kokku 1,5 ml bakterikultuuri 90 s (11 000 g), supernatant eemaldati ja rakke pesti kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega. Peale viimast tsentrifugeerimist eemaldati supernatant ja rakud resuspendeeriti 0,5 ml 300 mM sahharoosi lahuses.

Plasmiidse DNA või ligaasisegu viimiseks rakkudesse kasutati elektroporatsiooni. 70 µl kompetentsetele rakkudele lisati ligikaudu 20 ng plasmiidset DNA-d, saadud segu pipeteeriti küveti ning elektroporatsioon viidi läbi firma BioRad elektroporaatoriga *E. coli* pulser pingel 2500 V. Küvetist välja pestud rakke kasvatati 1,5 ml LB-s 45- 60 min, rakud kontsentreeriti tsentrifugeerimisega ja plaaditi kanamütsiini sisaldavale LB-tardagarile, millele oli lisatud X- gal-i (0,1 µg/ml).

2.2.9 *pfeR-II* deletsioontüve konstrueerimine I-SceI süsteemiga

Tüve saamiseks, kus geen *pfeR-II* ja *pfeS-II* oleks deleteeritud, konstrueeriti pEMG-pfeRS plasmiid. Selleks kasutati *circular polymerase extension cloning* (CPEC) protokoll (Quan and Tian, 2011), kus amplifitseeriti *pfeRS-II* operoni eelnev (TS1) ja järgnev ala (TS2) ning vektori pEMG (Martínez-García ja de Lorenzo, 2011) DNA nii, et PCR-produktide otsad on produktidel kattuvad. Saadud PCR produktid ühendati järgneva PCR-ga. Selleks kasutati praimeripaari 5.8-*pfeSII-5'* ja 2.8-EMG-SceI *pfeSII-3'*, mille abil amplifitseeriti üles 740 nt pikkune DNA lõik *pfeS-II* geeni järelt ning praimeripaari 4.8-*pheRII-5'* ja 6.8-*S5'-pheRII-3'* abil 631 nt pikkune DNA lõik *pfeR-II* geeni eest ning vektori pEMG amplifitseeriti kasutades primereid 3.8-*pfeS-SceI-EMG3* ja 1.2-EMG5'.

Saadud plasmiid poreeriti *P. putida* tüvesse PaW85 ning plaaditi Km sisaldavale agarile, valiti välja Km-resistentsed kointegraadi transkonjugandid, mis nimetati PaW85pEMGpfeRS. Sobivaid kolooniaid kontrolliti PCR-iga (praimerid PfeSII-KI, 4.9PfeRII-5', pfeRII-RACE) 4) Rakkudesse viidi elektroporatsiooniga plasmiid pSW (Wong ja Mekalanos, 2000), mis sisaldab restrikaasi I-SceI, et indutseerida dsRNA katkeid kromosoomi inserteerunud plasmiidis pEMG. Indutseerimaks I-SceI tegema kaheahelalisi lõiked restriksioonisaitides kasvatati rakke üleöö 5 ml LB-s koos meta-toluaadiga (1-1,5 mM), mis on I-SceI promootori induktor ja penitsilliiniga (1000), et selekteerida pSW plasmidi. Järgnes kolooniate paralleelkõlv LB ja Km sisaldavale agarile. Kui on toimunud homoloogiline rekombinatsioon TS1TS2 fragmendi ja kromosoomis oleva geeni järgse- või eelse ala vahel kaotavad rakud pEMG plasmidi kadumise tõttu võime kasvada Km- sisaldaval söötmel ehk valitakse välja Km sensitiivsed kloonid. Valitud kloone kontrolliti PCR-iga. 5) pSW plasmidist vabanemiseks kasvatatakse rakke üleöö ilma selektiivse surveta ehk ilma antibiootikumita söötmes.

2.2.10 β - galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine

Erinevate kasvutingimuste ja ainete mõju hindamiseks uuritavate geenide *gacS* ja *pfeR-II* transkriptsioonile kasutati modifitseeritud Milleri meetodit, mis põhineb reportergeeni *lacZ* kasutamisel, et hinnata promootori aktiivsust (Miller, 1972). Selle jaoks kloonitakse uuritav promootorala *lacZ* ette ja transkriptsiooni aktiivsust hinnatakse tekkiva LacZ hulga järgi, mis väljendub värvusetu substraadi ONPG lagundamisel tekkiva kollase produkti orto- nitrofenooli hulgas rakukoguse kohta.

β - galaktosidaasi testi jaoks kasvatati rakke 5 ml söötmes koos antibiootikumiga kanamütsiin nii IPTG juuresolekul (1 mM) kui puudumisel, 18 h 30 °C juures, aereerides kultuuri loksutil. Mikrotiiterplaadil tehtud katse jaoks kasutasin ettekasvatatud rakukultuuri, mida lisasin 10 ml söötme kohta 100 μ l. Pärast seda pipeteerisin segu 200 μ l kaupa mikrotiiterplaadile ja kasvasin samuti 18 h 30 °C juures.

Esialgseks skriinimiseks tehti β - galaktosidaasitest mikrotiiterplaadil, mille puhul oli reaktsioonimaht 205 μ l, see võimaldas hinnata korraga paljusid konstrukte ja mõõta mitmete tingimuste mõju transkriptsioonile üheaegselt kasutades väikest hulka reagente. Täpsemate tulemuste saamiseks kasvatati rakke katseklaasis ning produkti teket mõõdeti 1070 μ l.

Katseklaasis kasvatatud rakkudest β -galaktosidaasi eriaktiivuse määramiseks võeti: 800 μ l Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 28 mM β -merkaptotoetanool), 50 μ l kloroformi (pH 7) ja 20 μ l rakke. Reaktsioon käivitati substraadi, 200 μ l ONPG (orto-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml) lisamisega. Piisava kollase värvi formeerumisel fikseeriti reaktsiooni aeg ning peatati reaktsioon 500 μ l 1 M Na₂CO₃ lisamisega. Seejärel mõõdeti reaktsiooni tulemusena tekkinud produkti orto-nitrofenooli neeldumine lainepikkusel 420 nm ning lüüsunud rakkude optiline tihedus 550 nm juures. β -galaktosidaasi eriaktiivsus arvutati valemiga:

$$E = \frac{1000 \times (\mathbf{OD420} - 1,75 \times \mathbf{OD550})}{t \times V \times \mathbf{OD580}}$$

, kus E on β -galaktosidaasi eriaktiivsus väljendatuna Milleri ühikutes (MÜ) OD420 on 420 nm juures mõõdetud orto-nitrofenooli neeldumine, OD550 on 550 nm juures mõõdetud lüüsunud rakkude tihedus, OD580 on 580 nm juures mõõdetud rakukultuuri tihedus, t on reaktsioonile kulunud aeg minutites ja V reaktsioonisegusse lisatud bakterikultuuri maht milliliitrites.

Mikrotiiterplaadil oli reaktsioonisegu maht väiksem, sisaldades 149 μ l Z-puhvrit, 5 μ l rakke, 5 μ l kloroformi, reaktsioon käivitati 46 μ l ONPG-lahusega ja peatati lisades 85 μ l Na₂CO₃. Eriaktiivsuse arvutamise valem mikrotiiterplaadi jaoks:

$$E = \frac{100 \times (\mathbf{OD420} - 1,75 \times \mathbf{OD550})}{t \times V \times \mathbf{OD580}}$$

2.2.11 Statistiline analüüs

Statistilise analüüsi tegemiseks kasutati TIBCO Statistica tarkvarapaketi versiooni 13.5. Andmete analüüsimiseks kasutasin ühe- või mitmefaktorilist ANOVA-t ning üksikvalimite erinevuste leidmiseks Bonferroni järeltesti olulisnivooga 0,05. Joonistel on näidatud tulemuste aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega. Tulpadel näidatud homogeensusrühmad näitavad andmerühmade sarnasust. Sama tähe korral on rühmade p-väärtus üle 0,05 ehk rühmade keskmiste väärtuste vahel ei ole statistiliselt olulist erinevust.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Geeni *gacS* promootorite kindlakstegemine ja iseloomustamine

Uurimaks, kas geenide *gacS* ja *pfeR-II* transkriptsiooni regulatsiooni kirjeldab ekskludoni kontsept on oluline teada vastavate geenide promootorite paiknemist. Eelkõige, kas nende, vastassuunaliselt transkribeeritud geenide promootorid asuvad nii, et tekkivad transkriptid kattuksid. Bakalaureusetöös tuvastasin, mõõtes promootorala lühendamisel saadud konstruktide β -galaktosidaasi eriaktiivsust, geenile *gacS* kaks potentsiaalselt promootorit: P1_{*gacS*}, mille -10 heksameer asub geenist -55...-60 nt ülesvoolu (järjestus ATTGAA) ja P2_{*gacS*}, asukohaga -209...-213 nt (TAAATA) (Hendrikson, 2019).

Esimeseks eesmärgiks oli teha kindlaks eelnevalt leitud promootorite täpne asukoht 5' RACE-PCR meetodika abil, mis võimaldab kaardistada geenilt transkribeeritavate mRNA-de 5' otsi. Need omakorda viitavad promootorite asukohale. Kahjuks ei õnnestunud RACE-iga tuvastada ei geeni *gacS* ega *pfer-II* mRNA 5' alguspunkte. Kuna mRNA 5' alguspunktide määramine kontrollgeeniga *lapA* õnnestus võib välistada ebaõnnestumise tehnilistel põhjustel. RACE-i luhtumist võis põhjustada promootorala kõrge GC-korduste hulk, mis võivad raskendada DNA amplifitseerimist läbi sekundaarstruktuuride tekke.

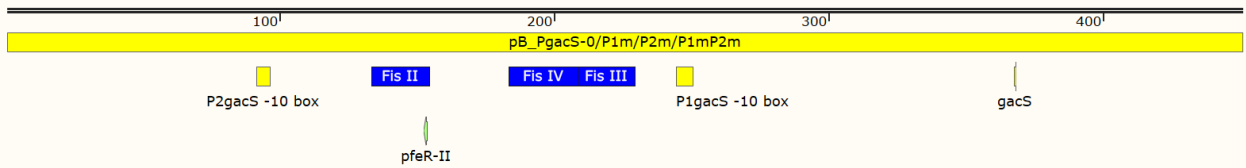
Seetõttu võtsin kasutusele bakalaureusetöö meetodika, mis põhineb uuritava promootorala fragmentide kloneerimisel reportergeeni *lacZ* ette ja transkriptsiooni aktiivsuse hindamisel β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmisega. Lisaks kasutasin promootoralade funktsionaalsuse kindlakstegemist potentsiaalsete promootorite -10 heksameeri muteerimist GC- rikkaks, mille tulemusena peaks promootori olemasolu korral LacZ eriaktiivsus tugevasti langema võrreldes muteerimata konstruktiga.

Kasutasin nelja *gacS* promootorala konstrukti (tabel 1a), mis kõik olid 290 nt pikad. Konstrukti pB_P_{*gacS*}-0 oli *gacS*-i natiivne, mutatsioonideta promootorala, pB_P_{*gacS*}-P1m ja pB_P_{*gacS*}-P2m puhul oli ära muteeritud vastavalt hüpoteetilise promootori P1_{*gacS*} (ATTGAA→GAGTGG) või P2_{*gacS*} (TAAATA→CCTCCA) -10 järjestus, pB_P_{*gacS*}-P1mP2m on ära muteeritud mõlema hüpoteetilise promootori -10 järjestused. pBLKT' on tühi vektor, mis ei sisalda *lacZ* geeni ees uuritava promootorala fragmenti, kasutasin seda kui negatiivset kontrolli. Kuna oli kahtlus, et *gacS*-i

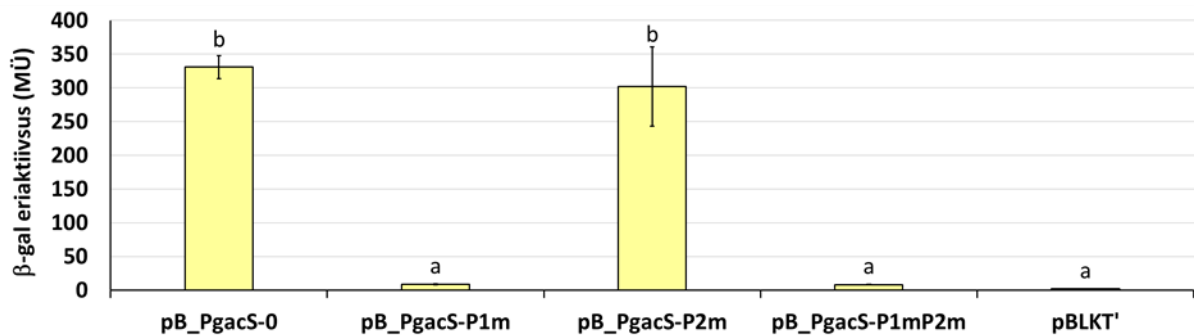
promootori(te) aktiivsus võib olla kasvufaasist sõltuv mõõtsin eriaktiivsust bakterikultuuris nii eksponentsiaalses (joonis 1b) kui statsionaarses kasvufaasis (joonis 1c).

Natiivse promootoralaga konstrukt $pB_{P_{gacS-0}}$ andis statsionaarse faasi rakkudes LacZ eriaktiivsuseks 867 MÜ (joonis 1c), eksponentsiaalses faasis aga 330 MÜ (joonis 1b). Oletatava promootori muteerimisel konstruktis $pB_{P_{gacS-P1m}}$ langeb eriaktiivsus statsionaarse faasi puhul järsult, üle kümne korra 80 MÜ-ni ja eksponentsiaalses vastavalt 8 MÜ-ni, need väärtused ei erine statistilise analüüsi järgi oluliselt tühja vektori pBLKT' tagatud LacZ eriaktiivsuse väärtusest 4 MÜ ja 2 MÜ rakkudes. Kuna promootori funktsionaalsuse häirimisel langeb transkriptsiooniline aktiivsus nn tühja vektoriga sarnaseks võib eeldada, et $P1_{gacS}$ näol on tegemist funktsionaalse promootoriga. Seevastu $P2_{gacS}$ muteeritud konstruktis $pB_{P_{gacS-P2m}}$ on β -galaktosidaasi eriaktiivsus statsionaarses faasis 740 MÜ, mis ei erine oluliselt natiivse promootoralaga $pB_{P_{gacS-0}}$ LacZ väärtusest 867 MÜ (joonis 1c). Ka eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes on eriaktiivsuse väärtused sarnased, $pB_{P_{gacS-P2m}}$ puhul 302 MÜ ja $pB_{P_{gacS-0}}$ puhul 330 MÜ, mis ei erine statistiliselt olulisel määral natiivse promootoralaga konstrukti väärtusest. Seega $P2_{gacS}$ tõenäoliselt ei ole, vähemalt antud tingimustel, funktsionaalne promootor, kuna promootori -10 konsensusjärjestuse muteerumisele ei järgne olulist eriaktiivsuse langust. Kuid tegu võib olla ka tüüp 2 statistilise veaga (vale negatiivsega), mille tõttu on $pB_{P_{gacS-P2m}}$ ja $pB_{P_{gacS-0}}$ eriaktiivsuse väärtuste vahelised erinevused tõlgendatud mitteoluliseks ja tegemist võib siiski olla väga nõrga promootoriga. Teine teoreetiline võimalus on, et muteeritud pole õige järjestus, või et sisseviidud mutatsioonid pole olnud piisavad, et promootori funktsionaalsus oleks piisavalt tugevalt häiritud ja LacZ eriaktiivsus langeks olulisel määral. Samas see võimalus on sigma70-tüüp promootorite puhul ebatõenäoline, sest potentsiaalne -10 järjestus on muudetud väga C-rikkaks (TAAATA \rightarrow CCTCCA). Muidugi potentsiaalne promootor ei pea olema sigma70-tüüpi promootor, sellisel juhul oleks sisseviidud mutatsioonidel nõrk mõju. Kolmandaks võimaluseks on, et tegemist tõesti ei ole promootoriga ning et bakalaureusetöös leitud teisele promootorile viitav eriaktiivsuse langus oli lihtsalt tingitud 3' otsa lühendamisel tekkinud artefaktse promootori välja löikamisest.

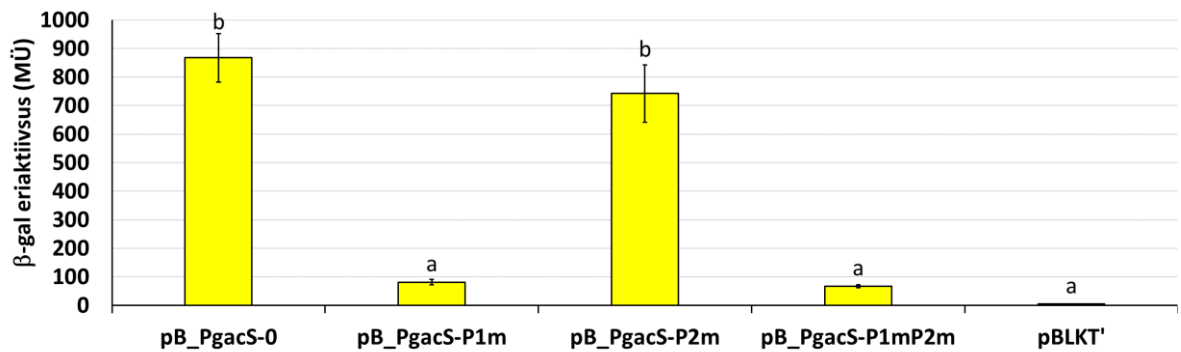
(a)



(b)

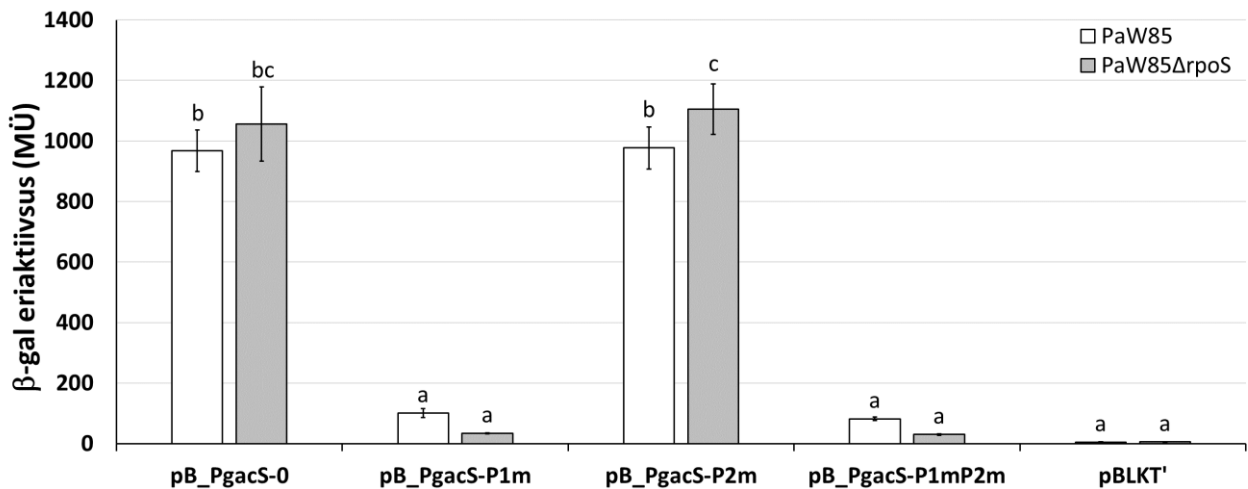


(c)



Joonis 1. *Pseudomonas putida* PaW85 *gacS* geeni promootorala ja transkriptsioon LacZ reportergeeni aktiivsuse kaudu. (a) joonis illustreerimaks geeni *gacS* promootorala konstruktide paiknemist. Pikk kollane kast tähistab konstrukte pB_PgacS-0/P1m/P2m/P1mP2m, mis kõik on sama pikkuse ja asetsusega, kuid erinevad muteeritud -10 järjestuste poolest. Sinised kastid tähistavad Fis-i seondumisjärjestusi, roheline ja kollane nool tähistavad vastavalt geenide *pfeR-II* ja *gacS* TSS. (b,c) β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused mõõdetuna LB-s kasvatatud eksponentsiaalse (b) ja statsionaarse kasvufaasi (c) bakterikultuuri rakkudest. Rakud sisaldasid plasmide pB_PgacS-0, pB_PgacS-P1m, pB_PgacS-P2m ja pB_PgacS-P1mP2m ja pBLKT'. Statsionaarse kasvufaasi andmete puhul on esitatud vähemalt 24 ja eksponentsiaalse kasvufaasi andmete puhul üheksa paralleeli aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Kuna LacZ-i eriaktiivsus oli *gacS* promootorala konstruktide puhul statsionaarse kasvufaasi rakkudes kõrgem kui eksponentsiaalses kasvufaasis, tekkis küsimus, kas P_{1gacS} võib olla sigma faktori RpoS, mis on üldine stressi sigmafaktor, kontrolli all või on lihtsalt tegu LacZ akumulatsiooniga rakkudes. Selle kontrollimiseks mõõtsin konstruktide $pB_{PgacS-0}$, $pB_{PgacS-P1m}$, $pB_{PgacS-P2m}$ ja $pB_{PgacS-P1mP2m}$ ja $pBLKT'$ eriaktiivsust PaW85 Δ rpoS tüves, kus RpoS-i kodeeriv geen on deleteeritud. Juhul kui promootor on RpoS-st sõltuv, peaks deletsioonitüves mõõdetud eriaktiivsuse väärtused olema väiksemad võrreldes PaW85, metsiktüves mõõdetutega. Natiivse promootorala konstrukti $pB_{PgacS-0}$ puhul on LacZ eriaktiivsus metsiktüüpi tüves 967 MÜ ja *rpoS*- deletandis 1055 MÜ, mis on võrreldavad tulemused (joonis 2). Kui P_{1gacS} on muteeritud konstruktis $pB_{PgacS-P1m}$, siis on LacZ eriaktiivsus vastavalt metsiktüves 100 MÜ ja *rpoS* deletanttüves 33 MÜ (joonis 2). Ehk P_{1gacS} muteerumisel langeb LacZ eriaktiivsus RpoS-i puudumisel rakkudes umbes kolm korda. Konstruktis $pB_{PgacS-P2m}$, kus on ära muteeritud P_{2gacS} on sarnaselt natiivse promootorala LacZ eriaktiivsus vastavalt 976 MÜ ja 1105 MÜ. Konstruktis, kus mõlema potentsiaalse promootori -10 heksameer on ära muteeritud $pB_{PgacS-P1mP2m}$, on LacZ eriaktiivsus metsiktüves PaW85 81 MÜ ning *rpoS*- deletsioonitüves 29 MÜ, mis on sarnane P_{1gacS} muteeritud konstrukti juures nähtud pea kolme kordne eriaktiivsuse langusega (joonis 2). Niinimetatud tühi vektor $pBLKT'$, andis mõlemas tüves LacZ eriaktiivsuseks 4-5 MÜ.



Joonis 2. RpoS-i mõju geeni *gacS* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused on mõõdetud *P. putida* PaW85 ja PaW85 Δ rpoS tüvedes. Statsionaarse kasvufaasi rakud, kasvatatud LB- söötmes. Rakud sisaldasid plasmide $pB_{PgacS-0}$, $pB_{PgacS-P1m}$, $pB_{PgacS-P2m}$ ja $pB_{PgacS-P1mP2m}$ ja $pBLKT'$. Esitatud on kaheksa paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

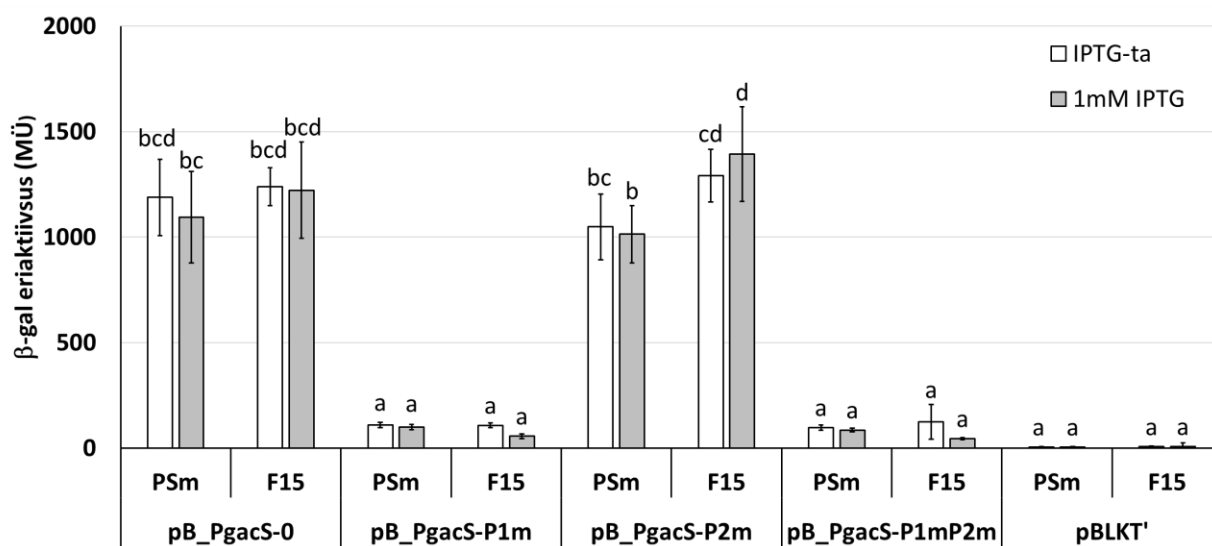
Kuna natiivse promootoralaga konstrukti pB_{P_{gacS}}-0 korral ei toimunud *rpoS*-deletantsestüves märkimisväärset eriaktiivsuse langust võrreldes metsiktüvega PaW85 ning ainult promootori P1_{gacS} muteerimise korral konstruktis pB_{P_{gacS}}-P1m toimub umbes kolme kordne LacZ eriaktiivsuse langus PaW85Δ*rpoS* tüves võrreldes PaW85, siis tõenäoliselt pole geeni *gacS* transkriptsioon sigma faktori RpoS kontrolli all. Jääb selgusetuks, miks P1_{gacS} muteerimisega LacZ eriaktiivsus kolm korda langeb. Võimalik, et P1_{gacS} muteerumisega tuleb nähtavale P2_{gacS} nõrk aktiivsus, mis on RpoS-sõltuv või mõne regulaatori kontrolli all, mille ekspressiooni RpoS kontrollib. Sest promootorita konstrukti korral, eeldusel, et P2_{gacS} promootorit pole, ei tohiks pB_{P_{gacS}}-P1m rakkus LacZ eriaktiivsus muutuda sõltumata olemasolevatest sigma faktoritest rakkus. Sarnase tulemuse saab ka topeltmuteeritud promootoritega vektoriga pB_{P_{gacS}}-P1mP2m rakkudes LacZ eriaktiivsuse mõõtmisega, mis viitab asjaolule, et ilmselt pole leitud teist promootorit, mis annaks LacZ madala eriaktiivsuse.

Meie laboris tehtud töödest on teada, et globaalne transkriptsiooni regulaator Fis seondub geeni *gacS* promootoralale *in vitro* (Lahesaare, 2011) ja avaldab teatud tingimustel näiteks M9-glc-CAA söötmes kasvatamisel nõrka positiivset mõju *gacS*-i transkriptsioonile (Moor, 2011; Moor et al., 2014). Tõllal ei olnud *gacS*-i promootorite täpsed asukohad teada ning õhku jäi võimalus, et Fis siiski avaldab mõju *gacS*-i transkriptsioonile nõrgema promootori kaudu ja tugevama promootori aktiivsus maskeerib selle.

Selleks, et uurida Fis-i mõju *gacS*-i transkriptsioonile kasutasin *P. putida fis*-i üleekspressioonitüve F15 (tabel 3). Selles tüves on kromosoomi viidud P_{tac} promootori kontrolli alla lisa *fis* geen ning IPTG lisamisega saab *fis*-i üleekspresseerida. Kuna F15-s on *fis*-i üleekspressiooni kassett viidud kromosoomi mini-Tn7-ga, siis tulemuste võrdlemiseks kasutasin referentstüve PSm. See on *P. putida* tüvi, mille kromosoomi on mini-Tn7-ga viidud Sm^R-geen (tabel 3). Kasvatasin rakke LB söötmes, millele oli või ei olnud lisatud 1 mM IPTG-d. Kuna referentstüves PSm IPTG lisamine ei põhjustanud LacZ eriaktiivsuse muutust, siis järelikult IPTG-l polnud iseseisvat mõju *lacZ* geeni ekspressioonile ning võimalik efekt saab tulla ainult *fis* geeni nn üleekspressioonist (joonis 3).

Minu töös saadud tulemus kinnitab, et esiteks *fis*-i üleekspressioon ei mõjuta LB-söötmes *gacS*-i transkriptsiooni promootorilt P1_{gacS}, sest pB_{P_{gacS}}-0 LacZ eriaktiivsuse väärtustes vahel F15 tüves- 1 mM IPTG-ga- 1238 MÜ ja IPTG-ta- 1222 MÜ ei ole olulist erinevust (joonis 3). Samuti on F15-s

LacZ eriaktiivsused sarnased, kui $P_{2_{gacS}}$ on muteeritud konstruktis pB_{PgacS} -P2m. Samas on Fis-i mõju promootorilt $P_{2_{gacS}}$ ebaselge, sest kuigi F15 pB_{PgacS} -P1m LacZ eriaktiivsused ei sõltu *fis*-i üleekspressioonist statistilise analüüsi järgi, kuid kui võrrelda eriaktiivsuse arvvaartusi, siis konstruktis pB_{PgacS} -P1m, kus ainult potentsiaalne promootor $P_{2_{gacS}}$ põhjustab *fis*-i üleekspressioonil kaks korda madalama LacZ eriaktiivsuse, 1 mM IPTG on LacZ eriaktiivsus 107 MÜ versus F15 ilma IPTG-ta 56 MÜ (joonis 3). See viitab tüüp 2 statistilisele veale. Sarnaselt eelnevatele katsetele ei tohiks konstrukt pB_{PgacS} -P1mP2m tagatud LacZ-i eriaktiivsused enam *fis*-i üleekspressioonist mõjutatud olla. Kuid sarnaselt RpoS-i sõltuvusega sain pea kolme kordse (2,7) languse kui *fis*-i ekspresiooni suurendati IPTG lisamisega.



Joonis 3. . Fis-i mõju geeni *gacS* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused *P. putida* tüvedes PSm ja F15. Statsionaarse kasvufaasi rakud, kasvatatud LB- söötmes. Rakud sisaldasid plasmide pB_{PgacS} -0, pB_{PgacS} -P1m, pB_{PgacS} -P2m ja pB_{PgacS} -P1mP2m ja pBLKT'. Tumedamad tulbad tähistavad eriaktiivsuse väärtusi kui söötmele on lisatud 1 mM IPTG-d, heledad ilma. Esitatud on viie paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Kokkuvõtvalt, *gacS*-i ees on kindlasti üks promootor, $P_{1_{gacS}}$, mis asub geenist -55...-60 nt ülesvoolu. Promootori $P_{2_{gacS}}$ olemasolu jääb praegu lahtiseks. Arvestades RpoS-i ja Fis-i katse tulemusi, siis on võimalik, et *gacS*-i ees on veel üks nõrk promootor, mille -10 heksameer asub

muteeritud järjestusest eemal. Samuti on võimalik, et antud uurimistöös kasutatud tingimustel (nt sööde, kasvutemperatuur etc.) pole P_{2gacS} piisavalt aktiivne. Teisisõnu, see promootor võib omada tähtsust kasvutingimustel, mida ma ei uurinud. LB söötmes ei ole võimalik taasluua kõiki looduses esinevaid tingimusi, mille korral teine promootor võib olla aktiveeritud ja vajalik.

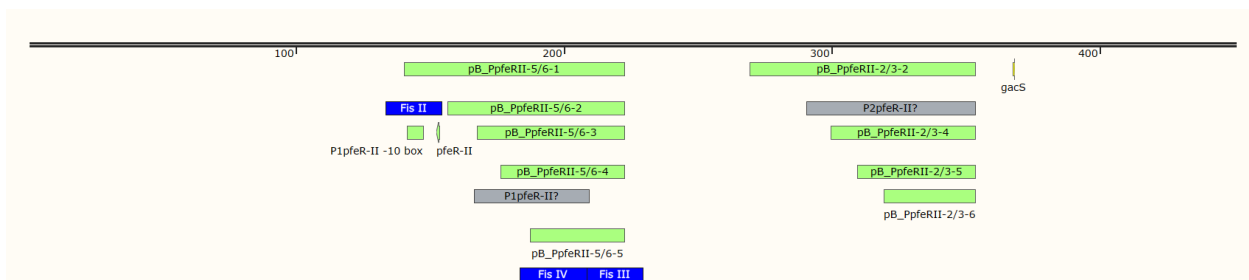
2.3.2 Geeni *pfeR-II* promootorite kindlakstegemine ja kirjeldamine

Järgmiseks sammuks oli *gacS*-i vastasahelal asuva naabergeeni *pfeR-II* (PP_1651) promootorite kindlakstegemine. Geen *pfeR-II* algus on 214 nt *gacS*-st ülesvoolu ning need geenid jagavad promootorala. Bakalaureusetöös lühendasin *pfeR-II* promootorala 5' otsast, ja mõõtsin saadud konstruktide β -galaktosidaasi eriaktiivsusi. Leidsin kaks piirkonda, kus võis olla promootor: -138...-200 nt (võimalik $P_{2pfeR-II}$) ja -14...-56 nt (võimalik $P_{1pfeR-II}$) *pfeR-II* anoteeritud alguspunkti ülesvoolu.

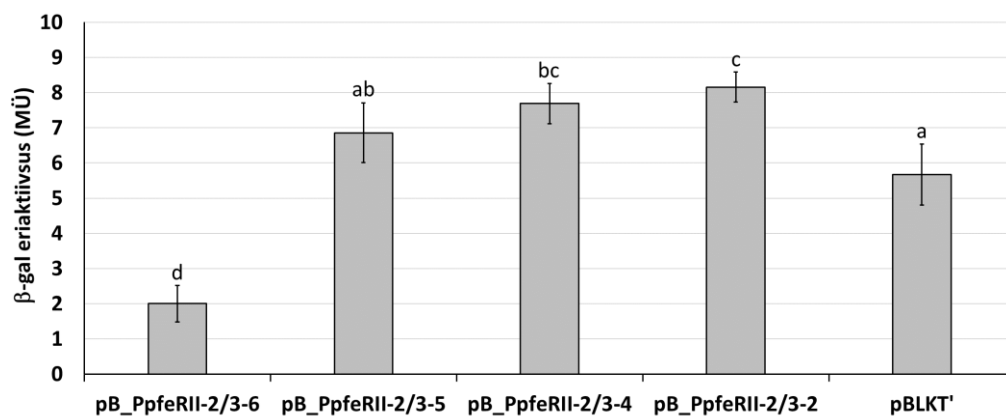
Sarnaselt *gacS*-i mRNAde 5' otsa kindlakstegemisega ebaõnnestus ka *pfeR-II* mRNA 5' otsa kindlakstegemine RACE meetodil (andmeid pole toodud). Seetõttu proovisin promootorite asukohta täpsemalt kindlaks teha lühendades promootorala samm haaval 3' otsast ja mõõtes β -galaktosidaasi eriaktiivsust, põhimõttel, et promootori -10 heksameeri katkestamisel või väljalõikamisel tekib olukord, kus eriaktiivsus langeb tühja vektori tasemele. Oletatava promootori $P_{2pfeR-II}$ kontrollimiseks tehti konstruktid $pB_P_{pfeR-II-2/3-6}$, $pB_P_{pfeR-II-2/3-5}$, $pB_P_{pfeR-II-2/3-4}$, $pB_P_{pfeR-II-2/3-2}$ (joonis 4a). Pikim konstrukti $pB_P_{pfeR-II-2/3-2}$ sisaldab kogu oletavat ala, mille äralõikamise langes eriaktiivsus aktiivsus ja kus võib olla $P_{2pfeR-II}$. Kõigi 2/3 konstruktide 5' ots on sama- 200 nt geeni algusest ülesvoolu. Saadud β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused on väga madalad, kõige lühemas konstrukti $pB_P_{pfeR-II-2/3-6}$ vaid 2 MÜ ja pikemates konstruktidest 6-8 MÜ, mis on arvvaartuselt võrreldavad tühja vektori LacZ eriaktiivsusega 6 MÜ (joonis 4b). Kuigi statistiliselt on $pB_P_{pfeR-II-2/3-2}$ ja $pB_P_{pfeR-II-2/3-4}$ oluliselt erineva väärtusega- vastavalt 8 MÜ ja 7 MÜ kui tühja vektori antud LacZ väärtus 6 MÜ, siis tõenäoliselt saadud väärtustel ei ole bioloogiliselt olulist erinevust ning leitud erinevus on statistilise analüüsi ülehinnang nõ tüüp 1 viga ja promootorit antud piirkonnas tõenäoliselt ei ole (joonis 4b).

Oletatava promootori $P_{1-pfeRII}$ kontrollimiseks konstrueeriti plasmiidid $pB_P_{pfeRII-5/6-5}$, $pB_P_{pfeRII-5/6-4}$, $pB_P_{pfeRII-5/6-3}$, $pB_P_{pfeRII-5/6-2}$ ja $pB_P_{pfeRII-5/6-1}$. Kõigi 5/6 konstruktide 5' ots on 69 nt geeni alguspunktist ülesvoolu ja 3' otsa lühendatakse (joonis 4a).

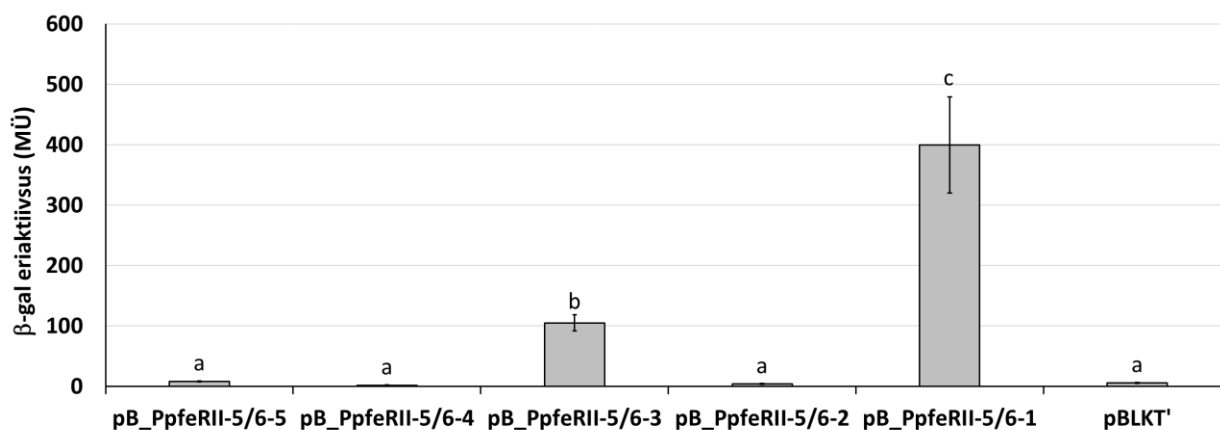
(a)



(b)



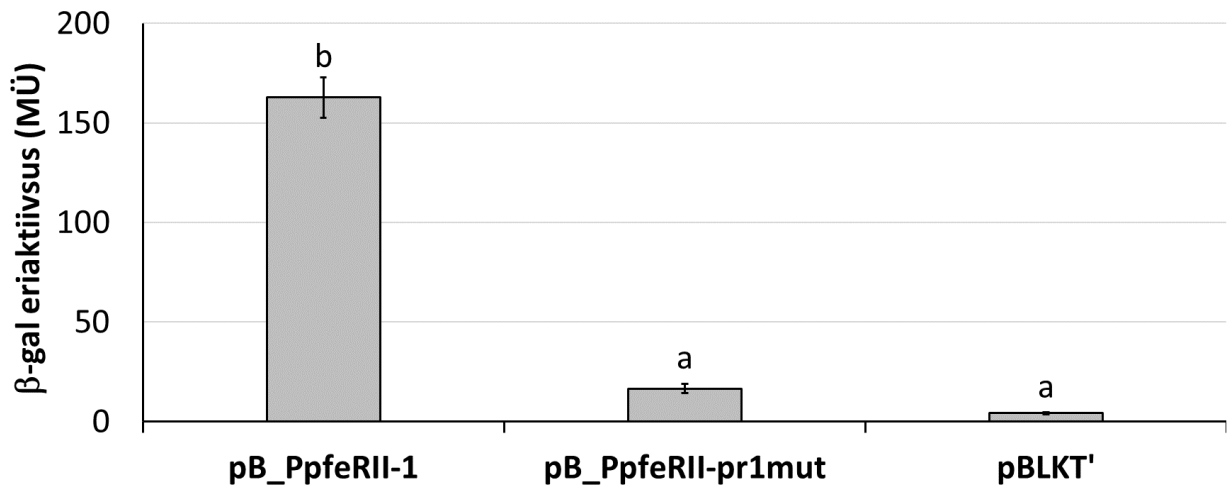
(c)



Joonis 4. *Pseudomonas putida* PaW85 *pfeR-II* geeni promootorala ja transkriptsioon LacZ reportergeeni aktiivsuse kaudu **(a)** geeni *pfeR-II* promootorala konstruktide kaart- hallid kastid tähistavad alasid, kus võib asuda promootor, rohelised kastid tähistavad promootorite olemasolu kontrollimiseks tehtud konstrukte, roheline nool tähistab geeni *pfeR-II* alguspunkti ja sinised kastid Fis-i seondumisjärjestusi **(b,c)** β - galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused mõõdetuna statsionaarse kasvufaasi, LB- söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakkudes. Rakud sisaldasid plasmideid pB_P_{pfeRII-2/3-6}, pB_P_{pfeRII-2/3-5}, pB_P_{pfeRII-2/3-4}, pB_P_{pfeRII-2/3-2}; pB_P_{pfeRII-5/6-5}, pB_P_{pfeRII-5/6-4}, pB_P_{pfeRII-5/6-3}, pB_P_{pfeRII-5/6-2} ja pB_P_{pfeRII-5/6-1} ja pBLKT'. Esitatud on kaheksa paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral (p>0,05).

β -galaktosidaasi eriaktiivsus langeb järsult konstruktil pB_P_{pfeRII-5/6-2}, mille eriaktiivsus on 4 MÜ, mis on sada korda vähem kui 16 nt pikem pB_P_{pfeRII-5/6-1}, mille eriaktiivsus on umbes 400 MÜ. Järelikult selles 16 nt osas on promootor või osa promootorist ja mille puudumine või katkestamine häirib transkriptsiooni (joonis 4c). Visuaalsel vaatlusel leiti sealt sigma70 promootori -10 konsensusjärjestusega sobiv järjestus AATAAT. 3' otsa lühendamisel on ohuks artefaktsete promootorite teke, mis kahjuks selle katse juures tekkis ja on tõenäoliselt põhjus ootamatuks eriaktiivsuse tõusuks konstrukti pB_P_{pfeRII-5/6-3} puhul. Konstrukti pB_P_{pfeRII-5/6-3} ja sellest lühemate konstruktide pB_P_{pfeRII-5/6-4} ja pB_P_{pfeRII-5/6-5} eriaktiivsuse väärtused 2 ja 8 MÜ ei erine nn tühjast vektorist pBLKT'.

Järgnes oletatava promootori P1_{pfeRII} konsensusjärjestuse muteerimine (AATAAT→CACAAC) nn täispikas konstruktis, mis sisaldas *pfeR-II* promootorala pikkusega 354 nt (joonis 6a). Juhul kui on tegu funktsionaalse promootoriga peaks promootori muteerimise tulemusena β -galaktosidaasi eriaktiivsus langema. Natiivse promootorala konstrukti pB_P_{pfeRII-1} eriaktiivsus on 160 MÜ, oletatava promootori muteerimisel konstruktis pB_P_{pfeRII-pr1mut} aga 16 MÜ, mis on võrreldav tühja vektoriga pBLKT' (joonis 5). Promootori P1_{pfeRII} muteerimise tagajärjel LacZ eriaktiivsuse langemine tühja vektoriga võrreldaks viitab, et tegu on funktsionaalse promootoriga. Seega on geenil *pfeR-II* üks promootor, mille -10 heksameer asub 6...11 nt geeni annoteeritud alguspunktist.



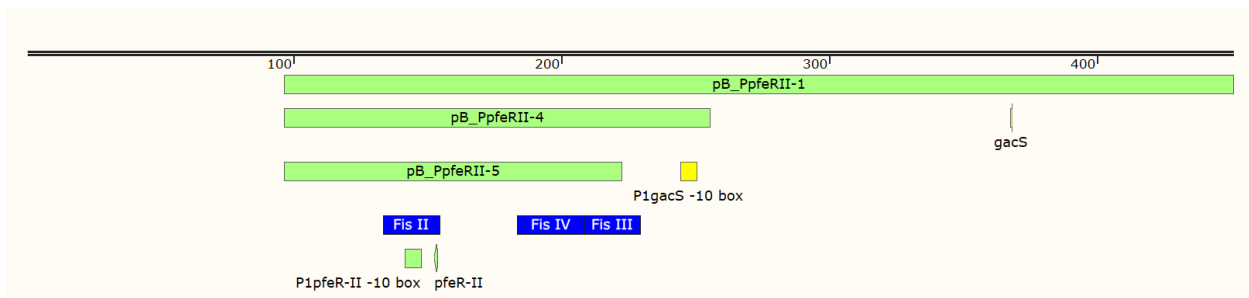
Joonis 5. Promootori muteerimise mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β- galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused mõõdetuna statsionaarse kasvufaasi, LB- söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakkudes. Rakud sisaldasid plasmide pB_P_{pfeRII}-1, pB_P_{pfeRII}-pr1mut ja pBLKT'. Esitatud on 14 paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Selleks, et uurida, kas sigma faktoril RpoS võib olla mõju *pfeR-II* transkriptsioonile mõõdeti β- galaktosidaasi eriaktiivsust kolmes erineva pikkusega *pfeR-II* promootorala konstruktis pB_P_{pfeRII}-1, pB_P_{pfeRII}-4 ja pB_P_{pfeRII}-5 tüvedes PaW85 ja PaW85ΔrpoS. pB_P_{pfeRII}-1 ja pB_P_{pfeRII}-4 sisaldavad kolme Fis- valgu seondumissaiti ja pB_P_{pfeRII}-5 kahte. PaW85ΔrpoS tüves on kõigi mõõdetud konstruktid eriaktiivsuse väärtused statistiliselt olulisel määral kõrgemad kui PaW85 tüves (joonis 6b). Kuna RpoS-i puudumine ei saa suurendada transkriptsiooni otseselt, siis tõenäoliselt on tegu mingi kolmanda regulaatori kaudse mõjuga, mis on RpoS-i kontrolli all ning transkriptsiooni regulatsioon on keerulisem, kui esialgu arvati.

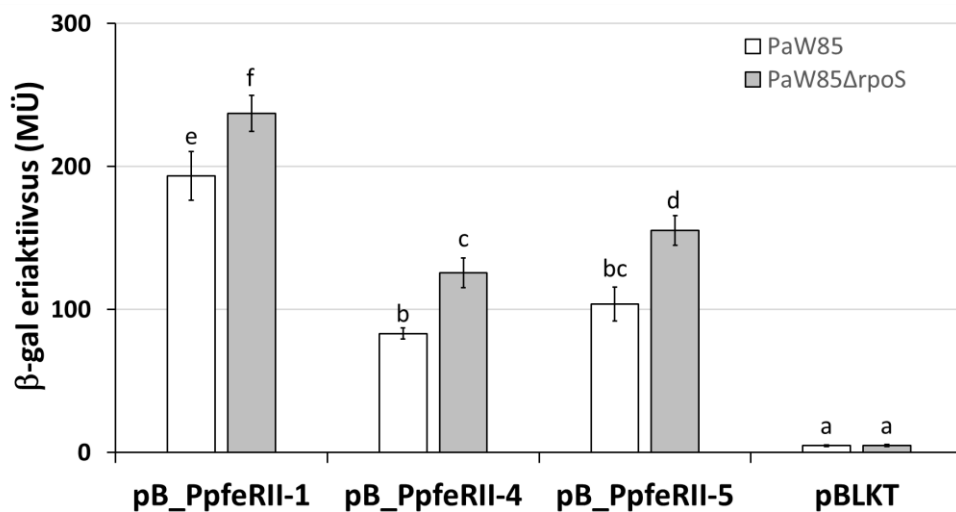
Kuna geenidel *pfeR-II* ja *gacS* on ühine promootorala ning Fis-i seondumisjärjestused asuvad ka *pfeR-II* geeni ees, siis kontrollisin sarnaselt *gacS* promootorkonstruktidega kas Fis mõjutab *pfeR-II* transkriptsiooni. IPTG ise ei mõjuta *P. putida* Psm tüves LacZ eriaktiivsust (joonis 7). Konstruktis pB_P_{pfeRII}-1, mis sisaldas reportergeeni ees nn täispikka *pfeR-II* promootorala, oli LacZ eriaktiivsus 164 MÜ IPTG-ta ja peaaegu kolm korda madalam 57 MÜ 1 mM IPTG-ga söötmes, kus *fis* on üle ekspresseritud (joonis 7). Sarnast järsku LacZ eriaktiivsuse langust *fis*-i üleekspressiooniga on näha ka lühemates konstruktidest pB_P_{pfeRII}-4 ja pB_P_{pfeRII}-5. Kuna *fis*-i üleekspressioon F15 tüves on β-

galaktosidaasi eriaktiivsuste väärtused madalamad kui samas tüves normaalsel *fis*-i tasemel, võib järeldada, et Fis-il on negatiivne mõju antud geeni transkriptsioonile. Fis-i efekti kinnitamiseks oleks vajalik teha kontrollkatse, kus promootorala konstruktidel on ära muteeritud Fis-i seondumisjärjestused.

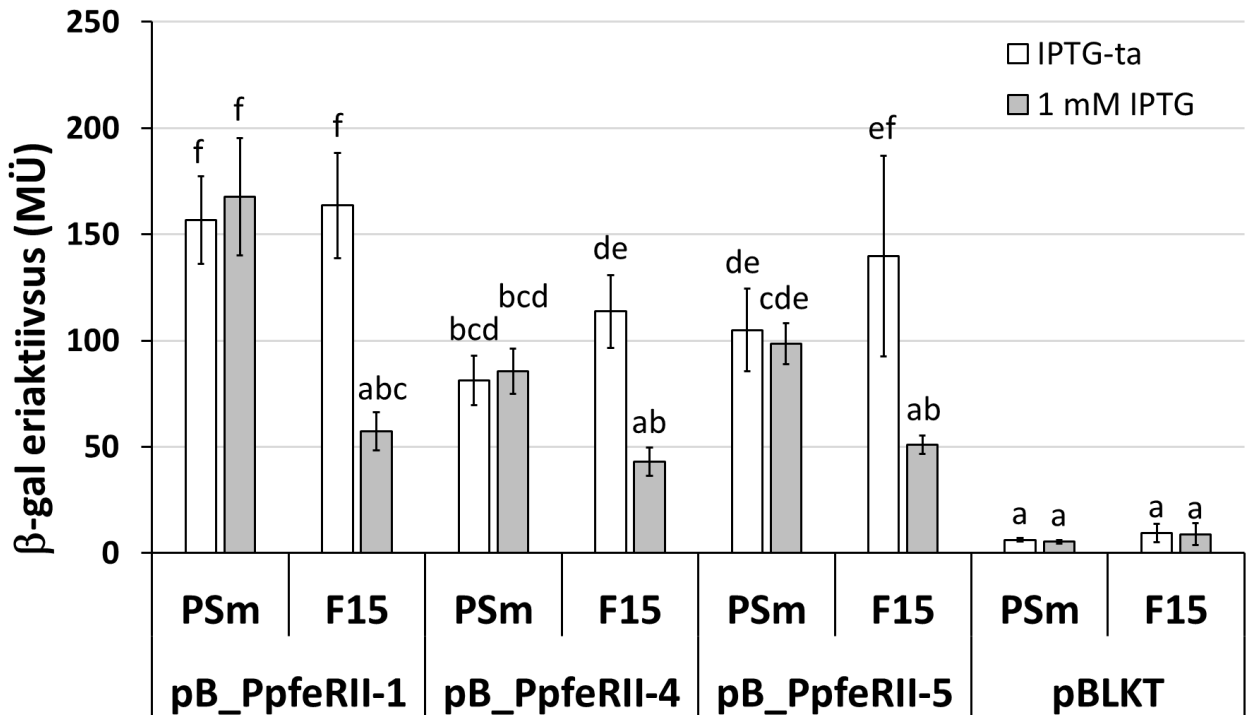
(a)



(b)



Joonis 6. (a) geeni *pfeR-II* promootorala konstruktid kaard. Seejuures on pB_PpfeRII-P1mut sama asetuse ja pikkusega kui pB_PpfeRII-1 **(b)** RpoS sigma faktori mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. Valged tulbad tähistavad PaW85 ja hallid tulbad PaW85ΔrpoS tüves mõõdetud eriaktiivsuse väärtusi. Rakke kasvatati LB söötmes ja mõõtmised on tehtud statsionaarse kasvufaasi rakkudega. Rakud sisaldasid plasmide pB_PpfeRII-1, pB_PpfeRII-4, pB_PpfeRII-5. Esitatud on 11 paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).



Joonis 7. Fis-i mõju geeni *pfeR-II* promootorala konstruktidetraskriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β -galaktosidaasi aktiivsuse väärtused *P. putida* tüvedes PSm ja F15. Statsionaarse kasvufaasi rakud, kasvatatud LB- söötmes. Rakud sisaldasid plasmide pB_PpfeRII-1, pB_PpfeRII-4, pB_PpfeRII-5 ja pBLKT'. Valged tulbad tähistavad ilma IPTG-ta paralleele, hallid 1 mM IPTG-ga. Esitatud on seitsme paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Kokkuvõtvalt, geenidel *pfeR-II* ja *gacS* on kindlalt üks promootor, mis asuvad teineteisest eemal ega anna kattuvaid mRNAsid (joonis 6a). See omakorda välistab geenide regulatsiooni ekskludoniga. Samas pole päris selge, kas *gacS*-i ees on veel mõni promootor peale P1_{gacS}, mis annaks regulatoorse võimaluse looduslikes tingimustes.

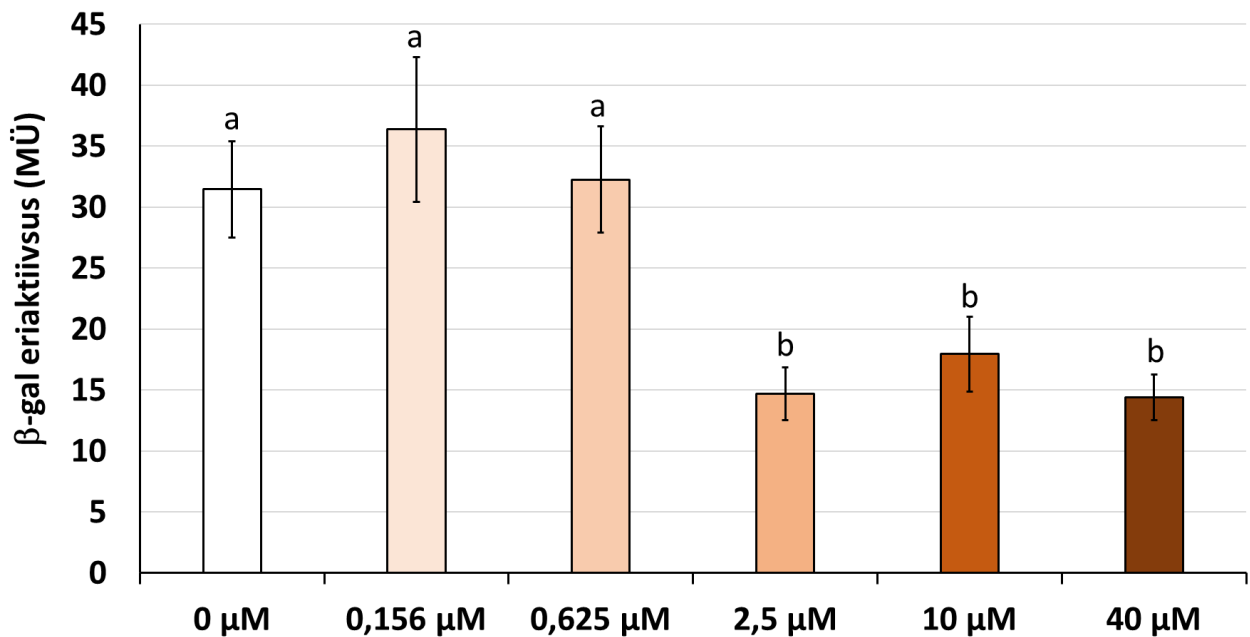
2.3.3 Erinevate faktorite mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile

Valgu funktsiooni teadmine annaks head lisainformatsiooni transkriptsiooni aktivatsiooni ja regulatsiooni kohta, kuid geen *pfeR-II* kodeerib valku, mille funktsiooni ei ole kirjeldatud. Teada on, et *P. aeruginosa*-s on *pfeR-I* seotud enterobaktiini kaudu raua omastamisega. *P. aeruginosa* (PA_2686) ja *P. putida* PfeR-I valkude sarnasus on 71 % ($E = 8 \times 10^{-112}$). PfeR-I (PP_0534) ja PfeR-II

(PP_1651) valgu sarnasuse tõttu 51%, $E = 6 \times 10^{-76}$ võib oletada, et ka PfeR-II on sarnase funktsiooniga ja osaleb raua omastamises (Winsor et al., 2016). Paremat informatsiooni PfeR-II funktsiooni kohta annaks *pfeR-II* deletsioontüvi ja deletsioontüve komplementatsioon plasmiidiselt ekspresseeritava *pfeR-II* geeniga. Kahjuks deletsioontüve tegemine ebaõnnestus (andmeid pole toodud), kuid *pfeR-II* transkriptsiooni uurimisega sain edasi minna. Uurisin, millistel tingimustel on geenide transkriptsioon muutunud. Valisin faktorid, mis mõjutavad raku erinevaid struktuure või füsioloogilisi protsesse, nt polümüksiin-B ja EDTA mõjutavad raku membraanide stabiilsust, penitsilliin häirib peptidoglükaankihi sünteesi, gentamütsiin mõjutab membraani läbilaskvust ja valkude translatsiooni, NaCl sisaldus mõjutab osmoosi, pH prootonite kättesaadavust ja kadu. Samuti mõõtsin raua mõju, sest PfeR-I on seotud raua homeostaasiga. Fosfor lisati valimise juhul juhuslikult. Mõõtsin nende faktorite mõju täispika promotoraali konstrukti pB_*P_{pfeRII}*-1 eriaktiivsusele vastavate lisanditega söötmes (joonised 8–13).

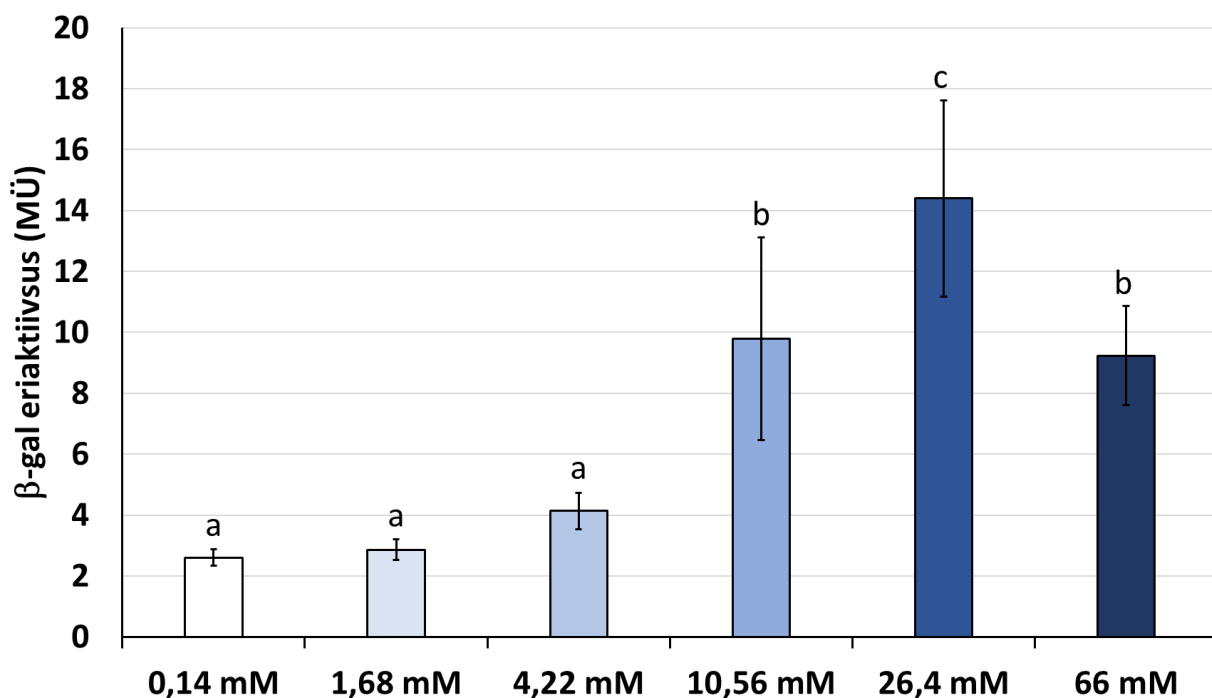
Mikroelementides, mis on bakteri standardsöötme komponent on raua lõppkontsentratsioon 40 μM . Raua mõju hindamiseks transkriptsioonile kasutasin nn rauavaba M9-söödet, kuhu ei olnud rauda lisatud. Hoolimata sellest võib sööde, kuhu tahtlikult pole rauda lisatud mingil määral rauda sisaldada teiste söotmekomponentide jääkainena, kuid sellisel juhul on söötmes rauda minimaalselt. Tegin raua sisalduse neljakordse lahjenduste rea alates 40 μM kontsentratsioonist, et jälgida LacZ eriaktiivsuse muutumist rakkudes, kuhu oli viidud konstrukti pB_*P_{pfeRII}*-1.

Väiksemal raua kontsentratsioonil (0 – 0,625 μM) on LacZ eriaktiivsus kõrgem võrreldes LacZ eriaktiivsustega söötmetes, kus on rauda 2,5 – 40 μM . Teisisõnu, geeni *pfeR-II* transkribeeritakse rohkem siis, kui keskkonnas on rauda vähe (joonis 8). See on kooskõlas PfeR-I transkriptsiooni regulatsiooniga, mis on samuti mõjutatud raua sisaldusest keskkonnas.



Joonis 8. Raua hulga mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β-galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused on mõõdetud mikrotiiterplaadil statsionaarse kasvufaasi, M9- söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakkudes, mis sisaldasid plasmidi pB_ *pfeRII*-1. Esitatud on söötmesse lisatud raua kontsentratsioonid. Esitatud on vähemalt 22 paralleeli keskmised koos 95 % usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Hindamiseks, kuidas mõjutab fosfaadi kontsentratsiooni vähenemine *pfeR-II* transkriptsiooni kasvatati rakke fosforivaeses K10Tπ söötmes, mis sisaldab vaid 0,14 mM Pi ning kuhu tiitriti sobiva kontsentratsiooni saamiseks sisse K-fosfaadi lahust. Fosfori kontsentratsiooni suurenedes tõuseb ka transkriptsiooni aktiivsus, saavutades haripunkti kontsentratsioonil 26,4 mM, mida peale langeb kergelt 66 mM juures (joonis 9).



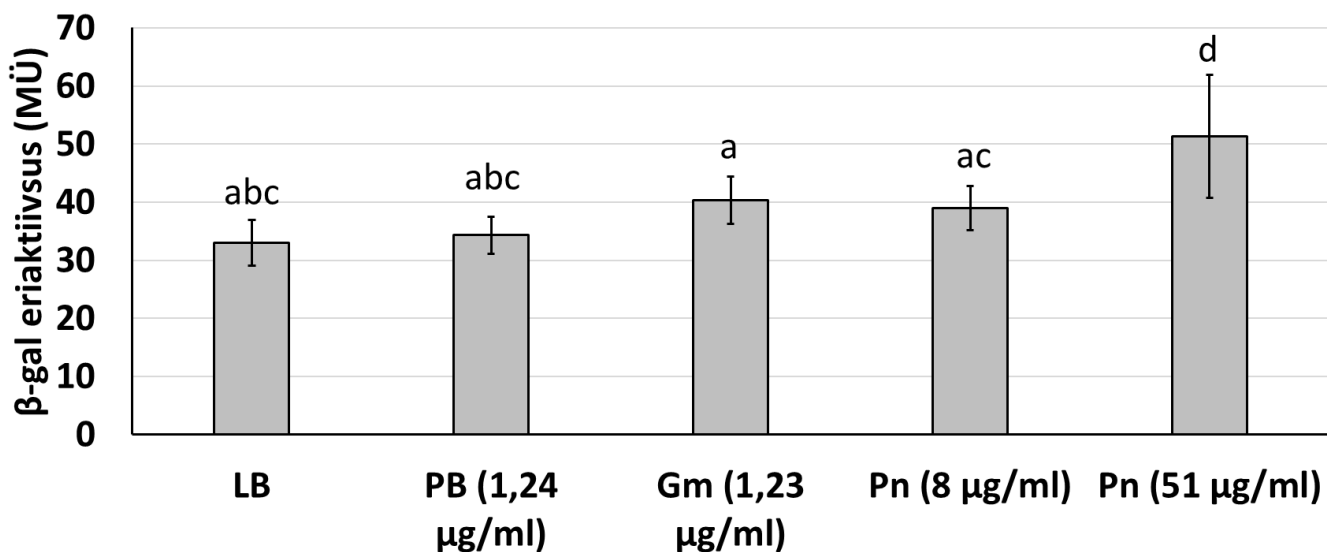
Joonis 9. Fosfori kontsentratsiooni mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. Mõõdetud mikrotiiterplaadil statsionaarse kasvufaasi, K10T π - söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakkudes, mis sisaldasid plasmidi pB_*P_{pfeRII}*-1. Esitatud on vähemalt 22 paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Polümüksiin-B (PB) kuulub polüpeptiidantibiootikumide hulka ja seondudes negatiivse laenguga lipiid A-ga lipopolüsahhariid kihis mõjutab membraanide permeaablust destabiliseerides välismembraani (Khondker et al., 2019). Gentamütsiin (Gm) on aminoglükosiid antibiootikum, mis seondub bakteriaalse ribosoomiga ja inhibeerib valkude translatsiooni, lisaks on gentamütsiinil ka väike efekt raku permeaablusele (Krause et al., 2016). Gramnegatiivseid baktereid ümbritseb peptidoglükaankiht, mis kaitseb neid osmootse rõhu eest. Penitsilliin (Pn) on β -laktaam tüüpi antibiootikum, mis häirib peptidoglükaankihi sünteesi, inhibeerides transpeptidaasireaktsioonis peptidoglükaane siduvat ensüümi DD-transpeptidaas (Yocum et al., 1980).

Erinevate antibiootikumide mõju pB_*P_{pfeRII}*-1 eriaktiivsusele võrreldes lisanditeta puhta LB-söötmega kirjeldab joonis 10. Kasutatud antibiootikumide kontsentratsioonid on madalamad kui eelnevalt määratud minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (andmeid pole näidatud).

Polümüksiin-B (1,24 µg/ml), gentamütsiinil (1,23 µg/ml) ja penitsilliinil kontsentratsioonil (8 µg/ml) ei olnud mõju β- galaktosidaasi eriaktiivsusele. Kuid penitsilliin kontsentratsioonil 51 µg/ml oli eriaktiivsus 51 MÜ, mis erineb statistiliselt olulisel määral puhtas LB-söötmes mõõdetud 32 MÜ (joonis 10). Seega on penitsilliinil, mis pärsib bakteriseina sünteesi, kontsentratsioon 51 µg/ml nõrk positiivne mõju geeni *pfeR-II* transkribeerimisele.

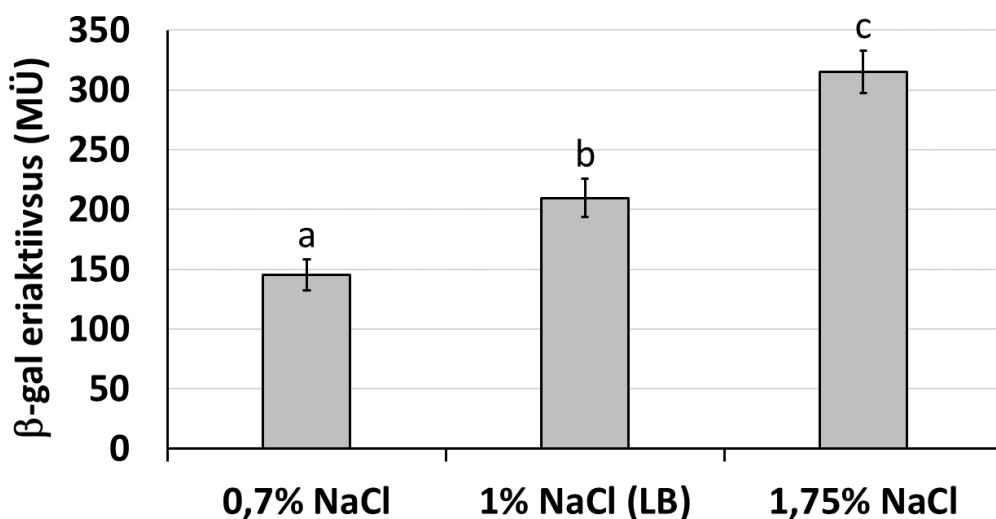
Peale antibiootikumide mõju rakuseinale, membraanide stabiilsusele või translatsioonile võivad subinhibitoorses (SI) kontsentratsioonis antibiootikumid moduleerida transkriptsiooni (Davies et al., 2006; Goh et al., 2002; Gupta et al., 2016; Laureti et al., 2013). SI kontsentratsioonis antibiootikumid põhjustavad laiaulatuslike muutusi transkriptsiooni profiilis, enamus gene, mille funktsioon on muutunud ei ole seejuures otseselt seotud antibiootikumi funktsiooniga. *P. aeruginosa*'s β-laktaam tüüpi antibiootikum imipeneem mõjutas SI kontsentratsioonis positiivselt beeta- laktamaasi, alginaadi- ja peptidoglükaani sünteesiga seotud gene ja negatiivselt viburi ja pili sünteesiga seotud gene.



Joonis 10. Erinevate antibiootikumide mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β- galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused on mõõdetud mikrotiiterplaadil statsionaarse kasvufaasi, LB- söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakkudes, mis sisaldasid plasmidi pB_ *pfeRII*-1. Esitatud on vähemalt 45 paralleeli keskmised koos 95 % usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

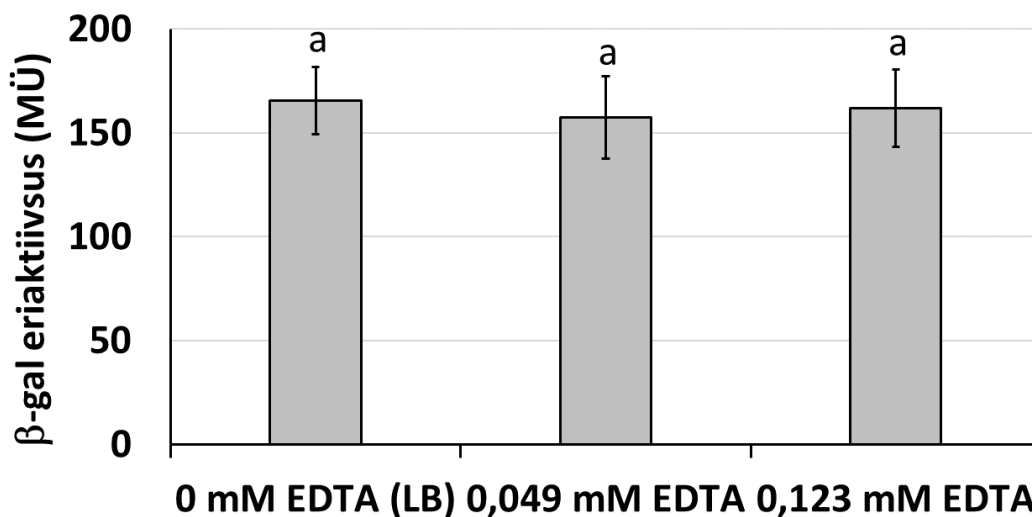
Subinhibitoorses kontsentratsioonis β -laktaamid stimuleerivad biofilmi moodustamist *P. aeruginosa*'s (Bagge et al., 2004). Gutierrez et al., 2013 näitas, et SI kontsentratsioonis võivad mitmed antibiootikumid, sealhulgas β -laktaam tüüpi antibiootikumid, indutseerida RpoS-i poolt reguleeritud üldist stressivastust mõjutades RpoS-i ekspressiooni translatsiooni ja valgu stabiilsuse tasemel.

Mõõtsin NaCl mõju $pB_{P_{pfeR-II-1}}$ eriaktiivsusele. Katseklaasis mõõdetud tulemused näitavad, et NaCl kontsentratsiooni ja geeni *pfeR-II* transkriptsiooni vahel on positiivne lineaarne seos, kõrgemal soola kontsentratsioonil 1,75 % on eriaktiivsus suurem- 315 MÜ kui 1 % või 0,7 % NaCl, vastavalt 145 MÜ ja 209 MÜ (joonis 11). Analoogsed katsed mikrotiiterplaadil andsid vastupidise tulemuse, et NaCl kontsentratsiooni tõstmine kergelt pärssis *pfeR-II* transkriptsiooni. Sellest tulenevalt on NaCl katseid vaja korrata, näiteks vaadata söötme mahu või aeratsiooni mõju *pfeR-II* transkriptsioonile, kui söötmes on tõstetud NaCl kontsentratsioon üle 0,7 %. NaCl sisalduse mõju *pfeR-II* transkriptsioonile bioloogiline tähtsus on ebaselge. Samas, näiteks *B. subtilis*'e rakkudes on näidatud, et kõrgel soola kontsentratsioonil kasvatatud rakud kogesid rauapuudust ning selle tõttu oli mitmete tuntud ja võimalike raua omastamisega seotud süsteemide ekspressioon suurenenud (Hoffmann et al., 2002).



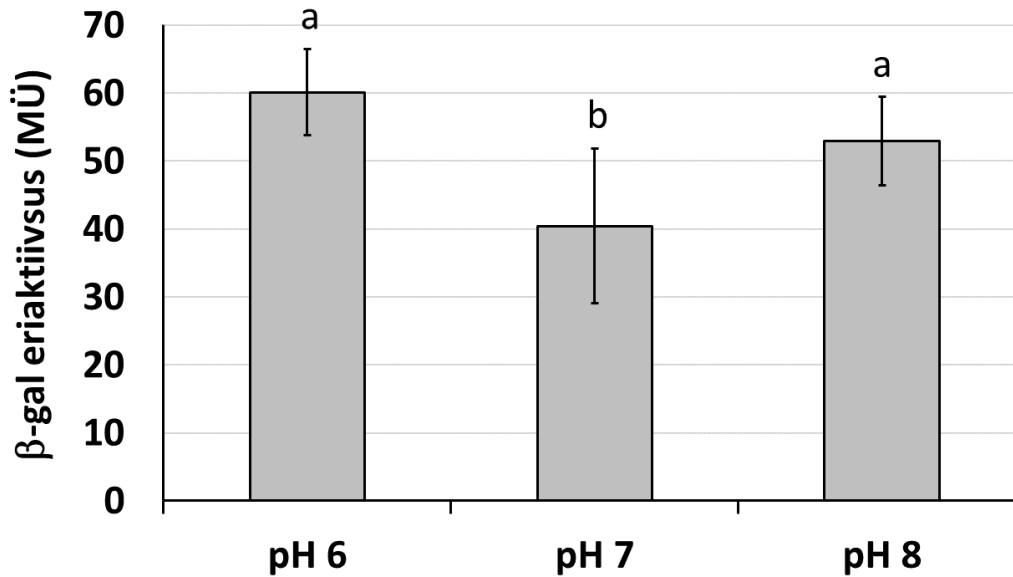
Joonis 11. NaCl kontsentratsiooni mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused on mõõdetud katseklaasis kasutades statsionaarse kasvufaasi, LB- söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakke, mis sisaldasid $pB_{P_{pfeR-II-1}}$. Esitatud on vähemalt 20 paralleeli keskmised koos 95 % usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Gramnegatiivseid baktereid ümbritseb lipopolüsahhariididest (LPS) ja fosfolipiididest koosnev välismembraan, mis kaitseb baktereid hästi mitmesuguste hüdrofoobsete detergentide ja antibiootikumide eest. Kõrvutiasuvad LPS molekulid on elektrostaatiliselt seotud divalentsete kationidega- Mg^{2+} , Ca^{2+} , mis on vajalikud LPS stabiliseerimiseks suure hulga negatiivsete laengute tõttu LPS lipiid-A osas. Kelaator EDTA mõjutab bakterite rakuseina stabiilsust sidudes nende stabiliseerimiseks vajaolevaid divalentseid katioone, mille tulemusena suureneb välismembraani permeaablus ja osa LPS-de eraldub raku pinnalt (Alakomi et al., 2006; Leive, 1974; Vaara 1992). Mõõdetud kontsentratsioonidel ei olnud EDTA-l mõju β - galaktosidaasi eriaktiivsusele (joonis 12). Kõrgemal kontsentratsioonil kui 0,123 mM inhibeerib EDTA tugevalt rakkude kasvu.



Joonis 12. EDTA mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused on mõõdetud statsionaarse kasvufaasi, LB- söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakkudes, mis sisaldasid plasmidi $pB_{pfeRII-1}$. Esitatud on kaheksa paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

pH on defineeritud kui negatiivne logaritm vesilahuse vesinikioonide kontsentratsioonist, kirjeldab prootonite keemilist kättesaadavust ja kadu bakterirakule. Prootonite tasakaal on bakterile oluline, et säilitada PMF pH-gradient. Neutraalsel pH-l 7 on eriaktiivsus 40 MÜ, pH 8 ja pH 6 on eriaktiivsuse väärtused natukene kõrgemad, vastavalt 52 MÜ aluselises ja 60 MÜ happelises keskkonnas (joonis 13).



Joonis 13. Kasvukeskkonna pH mõju geeni *pfeR-II* transkriptsioonile reportergeeni LacZ aktiivsuse kaudu. β-galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused on mõõdetud statsionaarse kasvufaasi, M9-söötmes kasvatatud *P. putida* PaW85 rakkudes, mis sisaldasid plasmidi pB_*P_{pfeRII}*-1. Esitatud on viie paralleeli keskmised koos 95% usalduspiiride ja homogeensusgruppidega. Homogeensusgruppide sarnased tähed näitavad, et aritmeetilised keskmised ei erine teineteisest olulisel määral ($p > 0,05$).

Peamine mõju *pfeR-II* transkriptsioonile oli raual ja fosforil, raud inhibeeris *pfeR-II* transkriptsiooni ning piisava fosfori olemasolul suurenes *pfeR-II* transkriptsioon. Teiste kontrollitud keskkonnafaktorite mõju transkriptsioonile oli marginaalne. Selles töös saadud tulemused annavad informatsiooni *pfeR-II* transkriptsiooni regulatsiooni kohta ega kirjelda faktorit, mis aktiveeriks Pfe-II, mille teadasaamine oleks eraldiseisev uurimistöö.

Kokkuvõte

Töö tulemused on järgmised:

- *P. putida* tüve KT2440 geeni *gacS* promootor asub -55...-60 nt geeni algusest ülesvoolu. Teise ennustatud promootori olemasolu ei leidnud kinnitust, kuid ei saa välistada, et geenil *gacS* siiski on teine, nõrk promootor, mis ei olnud antud katsetingimustel aktiivne.
- Geeni *gacS* promootor ei ole reguleeritud Fis-i valgu poolt, mis täiendab Moor et al., 2014 saadud tulemust.
- Fis represseerib *pfeR-II* transkriptsiooni.
- Geenil *pfeR-II* on üks promootor, mille -10 heksameer asub 6...11 nt geeni annoteeritud alguspunktist allavoolu.
- Kuna geenide *pfeR-II* ja *gacS* promootoritelt tulevate mRNA-de vahel ei ole üleulatuvat osa ei saa nende geenide transkriptsioon olla reguleeritud läbi ekskludoni.
- Raud pärsib geeni *pfeR-II* transkriptsiooni, see on kooskõlas *pfeR-II* ennustatud funktsiooniga.

Identification of the *gacS* and *pfeR-II* promoters in *Pseudomonas putida* and possible regulation of gene expression by excludon

Johanna Hendrikson

Summary

Pseudomonas putida is a ubiquitous gram-negative bacteria that has been shown to colonize portion of soil under the influence of plant roots, called the rhizosphere. And through a wide variety of mechanisms- for example phosphate solubilization, inducing resistance, synthesis of plant hormone precursors, antibiotics and siderophores, can enhance plant growth and act as a biocontrol agent. Biofilm formation is important for bacteria to establish stable colonization on plant roots. One of the regulators involved in biofilm formation is two component system GacS-GacA. Activation of GacS-GacA promotes biofilm formation by positively regulating the expression of adhesins. Adjacent to *gacS* is gene *pfeR-II* a probable two component response regulator involved in enterobactin-dependent iron acquisition. Excludon paradigm describes a genetic locus encoding a long asRNAs that inhibit the expression of one group of genes while enhancing the expression of a second group of genes. The objective of this research is to determine whether *gacS* and *pfeR-II* gene regulation is described by excludon concept.

The current study found that:

- *P. putida* gene *gacS* has one promoter with -10 sequence located -55...-60 nucleotides upstream of the TSS. The existence of a second promoter could not be proven. Gene *pfeR-II* has one promoter, -10 sequence located 6...11 downstream of the TSS. Hypothesis that excludon concept might describe regulation of genes *gacS* and *pfeR-II* was rejected as there was no overlap between the transcripts.
- In accordance with previous work by Moor et al. Fis did not influence *gacS* transcription. However, the results of β -galactosidase activity assay in over expressing the *fis* gene indicate that Fis represses the transcription of *pfeR-II*.
- The study also explored effect of different factors on the *pfeR-II* transcription. For example, *pfeR-II* transcription is negatively regulated by iron.

Kasutatud kirjandus

Ainelo, H., Lahesaare, A., Teppo, A., Kivisaar, M., and Teras, R. (2017). The promoter region of *lapA* and its transcriptional regulation by Fis in *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE* 12, e0185482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185482>.

Alakomi, H.-L., Paananen, A., Suihko, M.-L., Helander, I.M., and Saarela, M. (2006). Weakening Effect of Cell Permeabilizers on Gram-Negative Bacteria Causing Biodeterioration. *Appl Environ Microbiol* 72, 4695–4703. <https://doi.org/10.1128/AEM.00142-06>.

Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27, 215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X).

Anjem, A., and Imlay, J.A. (2012). Mononuclear Iron Enzymes Are Primary Targets of Hydrogen Peroxide Stress*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 15544–15556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330365>.

Annamalai, R., Jin, B., Cao, Z., Newton, S.M.C., and Klebba, P.E. (2004). Recognition of Ferric Catecholates by FepA. *J Bacteriol* 186, 3578–3589. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3578-3589.2004>.

Archibald, F. (1983). *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiology Letters* 19, 29–32. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00504.x>.

Bagg, A., and Neilands, J.B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5471–5477. <https://doi.org/10.1021/bi00391a039>.

Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P., and Høiby, N. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and β -Lactamase and Alginate Production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1175–1187. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1175-1187.2004>.

Banin, E., Brady, K.M., and Greenberg, E.P. (2006). Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl Environ Microbiol* 72, 2064–2069. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2064-2069.2006>.

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

Bratlie, M.S., Johansen, J., Sherman, B.T., Huang, D.W., Lempicki, R.A., and Drabløs, F. (2010). Gene duplications in prokaryotes can be associated with environmental adaptation. *BMC Genomics* 11, 588. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-588>.

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and 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, 434–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x>.

Budzikiewicz, H. (2004). Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent *Pseudomonas* spp.). In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, W. Herz, H. Falk, and G.W. Kirby, eds. (Vienna: Springer Vienna), pp. 81–237.

Burrowes, E. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152, 405–418. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28324-0>.

Callen, B.P., Shearwin, K.E., and Egan, J.B. (2004). Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Mol Cell* 14, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.010>.

Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., Bentzmann, S. de, and Bordi, C. (2016). The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Genetics* 12, e1006032. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006032>.

Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T., and Georgellis, D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J. Bacteriol.* 192, 2009–2012. <https://doi.org/10.1128/JB.01685-09>.

Cheng, X., de Bruijn, I., van der Voort, M., Loper, J.E., and Raaijmakers, J.M. (2013). The Gac regulon of *Pseudomonas fluorescens* SBW25: The Gac regulon of SBW25. *Environmental Microbiology Reports* 5, 608–619. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12061>.

Chia, J.Y., Khoo, K.S., Ling, T.C., Croft, L., Manickam, S., Yap, Y.J., and Show, P.L. (2021). Description and detection of excludons as transcriptional regulators in gram-positive, gram-negative and archaeal strains of prokaryotes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 32, 101933. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101933>.

Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1637–1645. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2550-2>.

Davies, J., Spiegelman, G.B., and Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* 9, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006>.

Dean, C.R., and Poole, K. (1993a). Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (pfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175, 317–324. .

Dean, C.R., and Poole, K. (1993b). Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* 8, 1095–1103. .

- Dean, C.R., Neshat, S., and Poole, K. (1996). PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 178, 5361–5369. <https://doi.org/10.1128/jb.178.18.5361-5369.1996>.
- Dubuis, C. (2005). Cell-cell communication in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Ph.D. thesis. University of Lausanne, Lausanne, Switzerland
- Duque, E., de la Torre, J., Bernal, P., Molina-Henares, M.A., Alaminos, M., Espinosa-Urgel, M., Roca, A., Fernández, M., de Bentzmann, S., and Ramos, J.-L. (2013). Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*: Microbes: surface interaction. *Environmental Microbiology* 15, 36–48. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02732.x>.
- Dutta, R., Qin, L., and Inouye, M. (1999). Histidine kinases: diversity of domain organization. *Molecular Microbiology* 34, 633–640. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01646.x>.
- Fiedler, H.-P., Krastel, P., Müller, J., Gebhardt, K., and Zeeck, A. (2001). Enterobactin: the characteristic catechololate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species. *FEMS Microbiology Letters* 196, 147–151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10556.x>.
- Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaefer, V., Cámara, M., Visca, P., and Imperi, F. (2014). The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 16, 676–688. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12164>.
- Fuqua, C. (2010). Passing the Baton Between Laps: Adhesion and Cohesion in *Pseudomonas putida* Biofilms. *Mol Microbiol* 77, 533–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07250.x>.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu Rev Microbiol* 63, 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>.
- Gasser, V., Kuhn, L., Hubert, T., Aussel, L., Hammann, P., and Schalk, I.J. (2021). The Esterase PfeE, the Achilles' Heel in the Battle for Iron between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2814. <https://doi.org/10.3390/ijms22062814>.
- Georg, J., and Hess, W.R. (2011). cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, 286–300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00032-10>.
- Georg, J., and Hess, W.R. (2018). Widespread Antisense Transcription in Prokaryotes. *Microbiology Spectrum* 6, 6.4.12. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0029-2018>.
- Georg, J., Voß, B., Scholz, I., Mitschke, J., Wilde, A., and Hess, W.R. (2009). Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol* 5, 305. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.63>.

- Gevers, D., Vandepoele, K., Simillion, C., and Van de Peer, Y. (2004). Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends in Microbiology* *12*, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.02.007>.
- Ghysels, B., Ochsner, U., Möllman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P., and Matthijs, S. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* *pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catechololate analogues. *FEMS Microbiology Letters* *246*, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.010>.
- Gligorovski, S., Strekowski, R., Barbati, S., and Vione, D. (2015). Environmental Implications of Hydroxyl Radicals ($\bullet\text{OH}$). *Chem. Rev.* *115*, 13051–13092. <https://doi.org/10.1021/cr500310b>.
- Goh, E.-B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G., and Davies, J. (2002). Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 17025–17030. <https://doi.org/10.1073/pnas.252607699>.
- Gómez-Lozano, M., Marvig, R.L., Tulstrup, M.V., and Molin, S. (2014). Expression of antisense small RNAs in response to stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* *15*, 783. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-783>.
- Gründling, A., Burrack, L.S., Bouwer, H.G.A., and Higgins, D.E. (2004). *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 12318–12323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404924101>.
- Güell, M., van Noort, V., Yus, E., Chen, W.-H., Leigh-Bell, J., Michalodimitrakis, K., Yamada, T., Arumugam, M., Doerks, T., Kühner, S., et al. (2009). Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science* *326*, 1268–1271. <https://doi.org/10.1126/science.1176951>.
- Gupta, P., Chhibber, S., and Harjai, K. (2016). Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian J Med Res* *143*, 643–651. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.187114>.
- Gutierrez, A., Laureti, L., Crussard, S., Abida, H., Rodríguez-Rojas, A., Blázquez, J., Baharoglu, Z., Mazel, D., Darfeuille, F., Vogel, J., et al. (2013). β -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat Commun* *4*, 1610. <https://doi.org/10.1038/ncomms2607>.
- H. Miller, J. (1972). Miller JH.. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Harris, W.R., Carrano, C.J., Cooper, S.R., Sofen, S.R., Avdeef, A.E., McArdle, J.V., and Raymond, K.N. (1979). Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 19. Stability constants and electrochemical behavior of ferric enterobactin and model complexes. *J. Am. Chem. Soc.* *101*, 6097–6104. <https://doi.org/10.1021/ja00514a037>.

- Hassan, K.A., Johnson, A., Shaffer, B.T., Ren, Q., Kidarsa, T.A., Elbourne, L.D.H., Hartney, S., Duboy, R., Goebel, N.C., Zabriskie, T.M., et al. (2010). Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. *Environmental Microbiology* *12*, 899–915. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02134.x>.
- Hendrikson, J. (2019). *Pseudomonas putida* geenide *gacS* ja *PP_1651* promootorid. Thesis. Tartu Ülikool.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Cámara, M., Williams, P., and Haas, D. (2004). Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* *186*, 2936–2945. <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.2936-2945.2004>.
- Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., and 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x>.
- Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U., and Bremer, E. (2002). High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* *184*, 718–727. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.718-727.2002>.
- Huertas-Rosales, Ó., Ramos-González, M.I., and Espinosa-Urgel, M. (2016a). Self-Regulation and Interplay of Rsm Family Proteins Modulate the Lifestyle of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology* *82*, 5673–5686. <https://doi.org/10.1128/AEM.01724-16>.
- Huertas-Rosales, Ó., Ramos-González, M.I., and Espinosa-Urgel, M. (2016b). Self-Regulation and Interplay of Rsm Family Proteins Modulate the Lifestyle of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* *82*, 5673–5686. <https://doi.org/10.1128/AEM.01724-16>.
- Huertas-Rosales, Ó., Romero, M., Chan, K.-G., Hong, K.-W., Cámara, M., Heeb, S., Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M.A., Travieso, M.L., Ramos-González, M.I., et al. (2021). Genome-Wide Analysis of Targets for Post-Transcriptional Regulation by Rsm Proteins in *Pseudomonas putida*. *Frontiers in Molecular Biosciences* *8*. .
- Imlay, J.A., and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* *240*, 1302–1309. <https://doi.org/10.1126/science.3287616>.
- Jahn, A., Griebe, T., and Nielsen, P.H. (1999). Composition of *pseudomonas putida* biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling* *14*, 49–57. <https://doi.org/10.1080/08927019909378396>.
- Jakovleva, J., Teppo, A., Velts, A., Saumaa, S., Moor, H., Kivisaar, M., and Teras, R. (2012). Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology* *158*, 708–720. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053355-0>.

Jang, S., and Imlay, J.A. (2007). Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J Biol Chem* 282, 929–937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607646200>.

Kamp, H.D., and Higgins, D.E. (2011). A Protein Thermometer Controls Temperature-Dependent Transcription of Flagellar Motility Genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 7, e1002153. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002153>.

Kawano, M., Aravind, L., and Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol Microbiol* 64, 738–754. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05688.x>.

Kay, E., Dubuis, C., and Haas, D. (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *PNAS* 102, 17136–17141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505673102>.

Kehrer, J.P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6).

Khondker, A., Dhaliwal, A.K., Saem, S., Mahmood, A., Fradin, C., Moran-Mirabal, J., and Rheinstädter, M.C. (2019). Membrane charge and lipid packing determine polymyxin-induced membrane damage. *Commun Biol* 2, 67. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0297-6>.

Klebba, P.E., Newton, S.M.C., Six, D.A., Kumar, A., Yang, T., Nairn, B.L., Munger, C., and Chakravorty, S. (2021). Iron Acquisition Systems of Gram-negative Bacterial Pathogens Define TonB-Dependent Pathways to Novel Antibiotics. *Chem. Rev.* 121, 5193–5239. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01005>.

Kondrashov, F.A., Rogozin, I.B., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2002). Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biology* 3, research0008.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-2-research0008>.

Kramer, J., Özkaya, Ö., and Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 18, 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>.

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., and Connolly, L.E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>.

Krewulak, K.D., and Vogel, H.J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>.

Laheasaare, A. LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT GENEETIKA ÖPPETOOL. 64. .

Lasa, I., Toledo-Arana, A., Dobin, A., Villanueva, M., de los Mozos, I.R., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Fagegaltier, D., Penadés, J.R., Valle, J., et al. (2011). Genome-wide antisense

transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20172–20177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113521108>.

Latour, X. (2020). The Evanescent GacS Signal. *Microorganisms* 8, 1746. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111746>.

Laub, M.T., and Goulian, M. (2007). Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu. Rev. Genet.* 41, 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.170548>.

Laureti, L., Matic, I., and Gutierrez, A. (2013). Bacterial Responses and Genome Instability Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics. *Antibiotics (Basel)* 2, 100–114. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2010100>.

Lebreton, A., and Cossart, P. (2016). RNA- and protein-mediated control of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *RNA Biol* 14, 460–470. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1189069>.

Leive, L. (1974). The Barrier Function of the Gram-Negative Envelope. *Annals of the New York Academy of Sciences* 235, 109–129. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb43261.x>.

Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., Oakford, L., Yüksel, U., Giedroc, D.P., and 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17502>.

Loper, J.E., and Henkels, M.D. (1999). Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 65, 7.

Lybecker, M., Zimmermann, B., Bilusic, I., Tukhtubaeva, N., and Schroeder, R. (2014). The double-stranded transcriptome of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 3134–3139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315974111>.

Majumdar, A., Trinh, V., Moore, K.J., Smallwood, C.R., Kumar, A., Yang, T., Scott, D.C., Long, N.J., Newton, S.M., and Klebba, P.E. (2020). Conformational rearrangements in the N-domain of *Escherichia coli* FepA during ferric enterobactin transport. *Journal of Biological Chemistry* 295, 4974–4984. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011850>.

Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 13, 2702–2716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>.

Martínez-Gil, 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, 1484–1495. <https://doi.org/10.1128/JB.01287-13>.

- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F., and 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07249.x>.
- Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J.-M., Abbaspour-Tehrani, K., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., and Cornelis, P. (2009). Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals* 22, 951–964. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9247-y>.
- Messenger, A.J., and Barclay, R. (1983). Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochemical Education* 11, 54–63. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90043-2).
- Meyer, J.-M. (1992). Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. *Microbiology* 138, 951–958. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-5-951>.
- Meyer, J.M., and Abdallah, M.A.-E. (1978). The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. p.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Tulkki, T., and Izard, D. 2007 Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2543–2556. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65233-0>.
- Miller, J.H. (1992). Miller, Jeffrey H. 1992. A Short Course in Bacterial Genetics: Laboratory Manual. Labo. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moeck, G.S., and Coulton, J.W. (2002). TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport[†]: TonB-dependent iron acquisition. *Molecular Microbiology* 28, 675–681. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00817.x>.
- Monds, R.D., Newell, P.D., Schwartzman, J.A., and O’Toole, G.A. (2006). Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl Environ Microbiol* 72, 1910–1924. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1910-1924.2006>.
- Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H., and O’Toole, G.A. (2007). Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* 63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05539.x>.
- Moor, H. (2011). TARTU ÜLIKOOL LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT GENEETIKA ÕPPETOOL. 41. .
- Moor, H., Teppo, A., Lahesaare, A., Kivisaar, M., and Teras, R. (2014). Fis overexpression enhances *Pseudomonas putida* biofilm formation by regulating the ratio of LapA and LapF. *Microbiology* 160, 2681–2693. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082503-0>.

- Moynié, L., Milenkovic, S., Mislin, G.L.A., Gasser, V., Mallocci, G., Baco, E., McCaughan, R.P., Page, M.G.P., Schalk, I.J., Ceccarelli, M., et al. (2019). The complex of ferric-enterobactin with its transporter from *Pseudomonas aeruginosa* suggests a two-site model. *Nat Commun* 10, 3673. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11508-y>.
- Neilands, J.B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., et al. (2012). Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335, 1103–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1206848>.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., and Buchanan, S.K. (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* 64, 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>.
- Ochsner, U.A., and Vasil, M.L. (1996). Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4409–4414. .
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., and Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 27, 29–34. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>.
- Opdyke, J.A., Fozo, E.M., Hemm, M.R., and Storz, G. (2011). RNase III Participates in GadY-Dependent Cleavage of the gadX-gadW mRNA. *Journal of Molecular Biology* 406, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.009>.
- Ortiz-Castro, R., Campos-García, J., and López-Bucio, J. (2020). *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* Influence Arabidopsis Root System Architecture Through an Auxin Response Mediated by Bioactive Cyclodipeptides. *J Plant Growth Regul* 39, 254–265. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09979-w>.
- Payne, S.M. (1988). Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *Crit Rev Microbiol* 16, 81–111. <https://doi.org/10.3109/10408418809104468>.
- Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* 134, 2171–2178. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-8-2171>.
- Pereira, M.C., Oliveira, L.C.A., and Murad, E. (2012). Iron oxide catalysts: Fenton and Fentonlike reactions – a review. *Clay Miner.* 47, 285–302. <https://doi.org/10.1180/claymin.2012.047.3.01>.
- Pernestig, A.K., Melefors, O., and Georgellis, D. (2001). Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 225–231. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001550200>.

- Poole, K., Young, L., and Neshat, S. (1990). Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *172*, 6991–6996. .
- Posey, J.E., and Gherardini, F.C. (2000). Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science* *288*, 1651–1653. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1651>.
- Pósfai, G., Kolisnychenko, V., Bereczki, Z., and Blattner, F.R. (1999). Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res* *27*, 4409–4415. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4409>.
- Postle, K. (1993). TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomembr* *25*, 591–601. <https://doi.org/10.1007/BF00770246>.
- Postle, K., and Larsen, R.A. (2007). TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals* *20*, 453. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9071-6>.
- Prince, R.W., Cox, C.D., and Vasil, M.L. (1993). Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene. *J. Bacteriol.* *175*, 2589–2598.
- Puhm, M., Ainelo, H., Kivisaar, M., and Teras, R. (2022). Tryptone in Growth Media Enhances *Pseudomonas putida* Biofilm. *Microorganisms* *10*, 618. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030618>.
- Puhm, M., Hendrikson, J., Kivisaar, M., and Teras, R. (2022). *Pseudomonas putida* Biofilm Depends on the vWFA-Domain of LapA in Peptides-Containing Growth Medium. *International Journal of Molecular Sciences* *23*, 5898. <https://doi.org/10.3390/ijms23115898>.
- Quan, J., and Tian, J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc* *6*, 242–251. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>.
- Raghavan, R., Sloan, D.B., and Ochman, H. Antisense Transcription Is Pervasive but Rarely Conserved in Enteric Bacteria. *MBio* *3*, e00156-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00156-12>.
- Sáenz-Lahoya, S., Bitarte, N., García, B., Burgui, S., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Toledo-Arana, A., and Lasa, I. (2019). Noncontiguous operon is a genetic organization for coordinating bacterial gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *116*, 1733–1738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812746116>.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., and Cossart, P. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology* *11*, 75–82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2934>.

- Stazic, D., Lindell, D., and Steglich, C. (2011). Antisense RNA protects mRNA from RNase E degradation by RNA–RNA duplex formation during phage infection. *Nucleic Acids Research* 39, 4890–4899. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr037>.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T.J., and Crosa, J.H. (2007). Transcription termination within the iron transport-biosynthesis operon of *Vibrio anguillarum* requires an antisense RNA. *J Bacteriol* 189, 3479–3488. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-06>.
- Takeuchi, K., Kiefer, P., Reimann, C., Keel, C., Dubuis, C., Rolli, J., Vorholt, J.A., and Haas, D. (2009). Small RNA-dependent Expression of Secondary Metabolism Is Controlled by Krebs Cycle Function in *Pseudomonas fluorescens**. *Journal of Biological Chemistry* 284, 34976–34985. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052571>.
- Taylor, S.R. (1964). Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 28, 1273–1285. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(64\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(64)90129-2).
- Teppo, A. Fis üleekspressioonist põhjustatud *Pseudomonas putida* kasvuhäired. 56. .
- Thomason, M.K., and Storz, G. (2010). Bacterial antisense RNAs: How many are there and what are they doing? *Annu Rev Genet* 44, 167–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163523>.
- Thomason, M.K., Bischler, T., Eisenbart, S.K., Förstner, K.U., Zhang, A., Herbig, A., Nieselt, K., Sharma, C.M., and Storz, G. (2015). Global Transcriptional Start Site Mapping Using Differential RNA Sequencing Reveals Novel Antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 197, 18–28. <https://doi.org/10.1128/JB.02096-14>.
- Toledo-Arana, A., and Lasa, I. (2020). Advances in bacterial transcriptome understanding: From overlapping transcription to the excludon concept. *Molecular Microbiology* 113, 593–602. <https://doi.org/10.1111/mmi.14456>.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., et al. (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459, 950–956. <https://doi.org/10.1038/nature08080>.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S.L. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Research* 44, D646–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>.
- Winterbourn, C.C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 82–83, 969–974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-x](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-x).
- Wong, S.M., and Mekalanos, J.J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10191–10196. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>.

Wurtzel, O., Sesto, N., Mellin, J.R., Karunker, I., Edelheit, S., Bécavin, C., Archambaud, C., Cossart, P., and Sorek, R. (2012). Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Molecular Systems Biology* 8. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.11>.

Yelin, R., Dahary, D., Sorek, R., Levanon, E.Y., Goldstein, O., Shoshan, A., Diber, A., Biton, S., Tamir, Y., Khosravi, R., et al. (2003). Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat Biotechnol* 21, 379–386. <https://doi.org/10.1038/nbt808>.

Yocum, R.R., Rasmussen, J.R., and Strominger, J.L. (1980). The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 255, 3977–3986. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85621-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85621-1).

Yousef, F., and Espinosa-Urgel, M. (2007). In silico analysis of large microbial surface proteins. *Res Microbiol* 158, 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.04.006>.

Yu, X., Chen, M., Jiang, Z., Hu, Y., and Xie, Z. (2014). The Two-Component Regulators GacS and GacA Positively Regulate a Nonfluorescent Siderophore through the Gac/Rsm Signaling Cascade in High-Siderophore-Yielding *Pseudomonas* sp. Strain HYS. *Journal of Bacteriology* 196, 3259–3270. <https://doi.org/10.1128/JB.01756-14>.

Agents that increase the permeability of the outer membrane. - PMC.

Lisa 1. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Muteeritud alused on allajoonitud

Oligonuklotiidi nimi	Nuklotiidne järjestus 5' - 3' suunal
gacSdownBHI	AAG GAT CCA TGT GCC TGG ATG CCG TC
gacSupBHI	AAG GAT TCC AGG TGA CCT GGC AGC C
pfeRIIpr1mut	GGC AGG TGG CGA ATG CTC <u>CAC AAC</u> CAC GCA ATT GAG AAT GCA TG
pfeRII-1	AAG GAT CCG ATT ATT GAG CAT TCG CCA CCT GC
pfeRII-56-2	AAG GAT CCA CCT GCC AGG CAA CCG CAC TGC GAC CAA TGC CTC GGC AAC GGC GCA TAA CAC GTA CTA AAG AGA
pfeRII-56-3	AAG GAT CCG CAA CCG CAC TGC GAC CAA TGC CTC GGC AAC GGC GCA TAA CAC GTA CTA AAG AGA
pfeRII-56-4	AAG GAT CCT GCG ACC AAT GCC TCG GCA ACG GCG CAT AAC ACG TAC TAA AGA GA
pfeRII-56-5	AAG GAT CCG CCT CGG CAA CGG CGC ATA ACA CGT ACT AAA GAG A
pfeRII-23-2	AAG GAT CCT TGA CGG CAT CCA GGC ACA T
pfeRII-23-4	AAG GAT CCC GAG TGT GCT CGA TCG CTT GGG AAT CCG CAG CCG GGT ACT GCT GCT GGC ACT GC
pfeR-23-5	AAG GAT CCG ATC GCT TGG GAA TCC GCA GCC GGG TAC TGC TGC TGG CAC TGC
pfeRII-23-6	AAG GAT CCG GAA TCC GCA GCC GGG TAC TGC TGC TGG CAC TGC
gacSdown3_BHI	AAG GA T C CAG TGC CAG CAG CAG TAC CCG G
gacSRACE1	CTC CAG GGT TTG TGC GG
gacSRACE2	TGT TCG GCG ATC ATC TTG
gacSRACE	GGA CCG ACG TTG TCT TGC
gacSup	GGT GAC CTG GCA GCC GC
gacSupup	AAG GAT CCT TGC GGT TGA GGA TGT CC
gacSpr1BHI	AAG GAT CCA CCA AGC ACC GGG TCG TC
gacSfis3	GGC AAC TGC CAT GCA TTC
lapARACE1	AGC TCA GTA GTC GGG TCA A
lapARACE2	CAT CAG CCA GCT CCA AAG T
Adapt_lyh	GAC TCG AGT CGA CAT CG
Adapt-pikkC	GAC TCG AGT CGA CAT CGA CCC CCC CCC CCC CCC CC
gacSpr2BamHI	AAG GAT CCA GAT ACA GGA TTC ATT GGC AA
gacSdown4BamHI	AAG GAT CCA TCA TCT TGC CGC GCT GC
gacSdownfisdown2	AAG GAT CCG CGA AGT TAC TCC GCC TG
asgacS-P1-0	AAG GAT CCT CTC TTT AGT ACG TGT TA
gacSmutpikk	AAG GAT CCA TGT GCC TGG ATG CCG TCA AGT GGT AAC GGC CAA GCC GCG GAG TGG CTC CGC CTG CCG CAC
gacSP1mut4	GTG GTA ACG GCC AAG CCG C G <u>GAG TGG</u> CT CC G C CTG CCG

Lisa 1. Töös kasutatud oligonukleotiidid jätk

asgacSpr2mut	AAG GAT CCG TTG CCA ATG AAT CC TGT ATC <u>CCT CCA CAA CAC CAA CAT CCT TG</u>
pfeSII-KI	CCG ACA AGC TCA TCC GCA GC
4.9PfeRII-5'	TAA T A CAT CCT TGC CAT CGA GGA CG
pfeRII-RACE	GAT GTC CAG CAG GCG GTA TTC
5.8-pfeSII-5'	GCC ATT CTG ACT TGT GGG CGC AGA ATG GCA AA
2.8-EMG-Scel pfeSII-3'	GCG ACG CCC AAC CTG CCA TTA CCC TGT TAT CCC TCC GAC AAG CTC ATC CGC AGC
4.8-pheRII-5'	TAA TGT TCT GTT GCA GCC AGG TGA A
6.8-S5'-pheRII-3'	CGC CCA CAA GTC AGA ATG GCT TGG GCA GGT AAT
3.8-pfeS-Scel- EMG3	CCT GGC TGC AAC AGA ACA TTA CCC TGT TAT CCC TA C GCG AAG TCG CTC TTC TTG ATG G
1.2-EMG5'	GGC AGG TT GGG CGT CGC
lacZseq	GGG GAT GTG CTG CAA GGC G
belka	TTT GCG TAG ATC CAC TAG TG

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johanna Hendrikson,

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

***Pseudomonas putida* geenide *pfeR-II* ja *gacS* promootorite asukoht ja võimalik regulatsioon ekskludoniga,**

mille juhendaja on PhD Riho Teras,

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

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

Johanna Hendrikson

30.05.2022

