

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

**Kahekomponentse signaalsüsteemi GacS-GacA mõju mullabakter *Pseudomonas putida*
mutatsioonisagedusele**

Magistritöö

30 EAP

Triin Uussaar

Juhendajad PhD Heili Ilves

MSc Karl Jürgenstein

TARTU 2022

Kahekomponentse signaalsüsteemi GacS-GacA mõju mullabakter *Pseudomonas putida* mutatsioonisagedusele

Bakterite elukeskkond on kiirelt muutuv. Keskkonnatingimuste tunnetamiseks on bakterites signaalsüsteemid, mis vastavalt keskkonnas toimunud muutustele muudavad bakteriraku füsioloogiat. Gram-negatiivsete bakterite seas on konserveerunud GacS-GacA kahekomponentne signaalsüsteem. Pseudomonaadides reguleerib GacS-GacA signaalsüsteem vastusena keskkonnastiimulitele nii sekundaarsete metaboliitide sünteesi, virulentsust kui biofilmi moodustumist. Lisaks on leitud, et *Pseudomonas putida* rakkudes põhjustab *gacS*-i defektsus mutatsioonisageduse tõusu. Käesoleva töö eesmärk oli leida, kas sensorvalgu GacS-i efekt mutatsioonisagedusele toimib läbi regulaatorvalgu GacA. Leiti, et *P. putida* PaW85 *gacS*- ning *gacA*-defektse tüve puhul on suurenenud mutatsioonisagedus nälgivates rakkudes ning lisaks uuriti mutatsioonisageduse tõusu põhjuseid.

Märksõnad: GacS-GacA signaalsüsteem, ROS, mutatsioonisagedus

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The effect of two-component signal system GacS-GacA on mutagenesis in *Pseudomonas putida*

The living environment of bacteria is rapidly changing. To sense environmental conditions, bacteria have signalling systems that change the physiology of the bacterial cell according to the changes in environment. The GacS-GacA two-component signal system is conserved among Gram-negative bacteria. In pseudomonads, the GacS-GacA signalling system regulates the synthesis of the secondary metabolites, virulence, and biofilm formation in response to environmental stimuli. In addition, defective *gacS* has been found to increase the mutation rate in *Pseudomonas putida*. The aim of this study was to determine whether the effect of the sensor protein GacS on the mutation rate is mediated by the regulatory protein GacA. It was found that the *Pseudomonas putida* PaW85 *gacS*- and *gacA*-defective strains have an increased mutation rate in starving cells and the causes of the mutation rate was investigated.

Keywords: GacS-GacA signal system, ROS, mutagenesis

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	6
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1 Kahekomponentsed signaalsüsteemid	8
1.2 Kahekomponentne signaalsüsteem GacS - GacA	10
1.2.1 GacS – GacA kahekomponentse signaalsüsteemi sensor GacS	12
1.2.2 GacS – GacA kahekomponentse signaalsüsteemi regulaator GacA.....	14
1.3 Mutatsiooniprotsessid bakterirakkudes.....	15
1.3.1 Üldine stressivastus.....	15
1.3.2 SOS-vastus	16
1.3.3 Oksüdatiivne stress ja reaktiivsed hapnikuühendid (ROS).....	17
1.3.3.1 Oksüdatiivne stressivastus	18
2. Eksperimentaalne osa	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja metoodika.....	20
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid, bakteritüved ja bakterite kasvutingimused	20
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	22
2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	23
2.2.4 Plasmidse DNA eraldamine	23
2.2.5 Kloneerimine	24
2.2.6 PCR produktide, restriksioonanalüüsi ja ligaasireaktsiooni sadestamine	24
2.2.7 Geelelektroforees.....	24
2.2.8 Sekvencerimine	25
2.2.9 <i>P. putida</i> rif-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine	25
2.2.10 Statsionaarse kasvufaasi mutatsioonide tekkesageduse määramine <i>P. putida</i> rakkudes plasmidse pKTpheA22TAG ja pKTpheA56+A testsüsteemi abil.....	26
2.2.11 <i>P. putida</i> populatsiooni elumuse määramine fenool-minimaalsöötmelt	26
2.2.12 Bakteripopulatsioonide analüüs läbivoolutsütomeetril	27
2.2.13 <i>P. putida gacA</i> -komplementatsioonitüve <i>gacA</i> + <i>tacgacA</i> konstrueerimine	27
2.2.14 Endogeensete reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) detekteerimine <i>P. putida</i> rakkudes	28
2.2.15 <i>P. putida</i> PaW85, <i>gacA</i> ::Sm ja <i>gacS</i> ::Sm rakkude mikroskopeerimine	28
2.2.16 <i>P. putida</i> PaW85, <i>gacA</i> ::Sm ja <i>gacS</i> ::Sm tüvede eksponentsiaalses- ja statsionaarses kasvufaasi täisproteoomide analüüs	29

2.3 Tulemused	29
2.3.1 GacS – GacA signaalsüsteem ei mõjuta mutatsioonide teket <i>Pseudomonas putida</i> kasvavates rakkudes	29
2.3.2 GacS – GacA signaalsüsteem mõjutab mutatsioonide teket <i>Pseudomonas putida</i> statsionaarse kasvufaasi rakkudes	30
2.3.2.1 GacS - GacA signaalsüsteem mõjutab asendusmutatsioonide teket <i>Pseudomonas putida</i> nälgivates rakkudes	31
2.3.2.2 GacS - GacA signaalsüsteem ei mõjuta raaminihke mutatsioonide teket <i>Pseudomonas putida</i> nälgivates rakkudes	32
2.3.2.3 GacS – GacA signaalsüsteemi defektsuse mõju <i>Pseudomonas putida</i> nälgivate rakkude elumusele ja morfoloogiale	33
2.3.3 GacS – GacA signaalsüsteemi defektsus mõjutab <i>Pseudomonas putida</i> rakkudes endogeenset ROS-ide taset	35
2.3.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> gac-defektsete tüvede ROS-ide tasemed viie nälgimispäeva jooksul ei muutu	37
2.3.4 <i>Pseudomonas putida</i> PaW85 ja gacS- ning gacA-defektsete tüvede täisproteoomide analüüs	38
2.3.4.1 <i>Pseudomonas putida</i> PaW85, gacA::Sm ja gacS::Sm eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest täisproteoomide analüüs	38
2.3.4.2 <i>Pseudomonas putida</i> PaW85, gacA::Sm ja gacS::Sm statsionaarse kasvufaasi täisproteoomide analüüs	40
2.3.4.3 <i>Pseudomonas putida</i> PaW85, gacA::Sm ja gacS::Sm statsionaarse ja eksponentsiaalse kasvufaasi täisproteoomide analüüsi võrdlus	42
2.3.5 <i>Pseudomonas putida</i> PaW85, KT2440Rif ^R , PP_2006::Km, PP_2007::Km, ΔPP_4100 spontaansete mutatsioonide teke statsionaarses kasvufaasis	43
3. Arutelu	44
3.1 <i>Pseudomonas putida</i> gac-defektsete tüvede metsiktüvest madalam ROS-ide tase	47
Kokkuvõte	50
Summary	51
Kasutatud kirjandus	52
Kasutatud veebilehed	57
Lisad	58
Lisa 1. Töös kasutatud praimerid ja nende kirjeldus	58
Lisa 2: GacS valgud domeenide järjestused	58
Lisa 3: GacA valgud domeenide järjestused	59

Lisa 4: Mikroskopeerimised.....	59
Lisa 5: <i>P. putida</i> PaW85, <i>gacA</i> ::Sm ja <i>gacS</i> ::Sm eksponentsiaalse kasvufaasi täisproteoomanalüüs	60
Lisa 6: <i>P. putida</i> PaW85, <i>gacA</i> ::Sm ja <i>gacS</i> ::Sm statsionaarse kasvufaasi täisproteoomanalüüs .	62
Lisa 7: ROS-ide tase <i>P. putida</i> tüvedes PaW85, <i>gacS</i> ::Sm ja <i>gacA</i> ::Sm parakvaadiga	64
Lisa 8: <i>P. putida</i> <i>gac</i> -defektsete tüvede statsionaarse kasvufaasi proteoomanalüüs	64

Kasutatud lühendid

Amp – ampitsilliin

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

CFU – kolooniat moodustav ühik (ingl k – *colony-forming unit*)

glc – glükoos (ingl k – *glucose*)

Gm – gentamütsiin

Km – kanamütsiin

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

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

pen – penitsilliin

phe – fenool (ingl k – *phenol*)

PI – propiidiumjodiid

rif – rifampitsiin

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl k – *reactive oxygen species*)

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

Sissejuhatus

Bakterid kohanevad kiirelt muutuvate keskkonnatingimustega. Erinevate keskkonnastiimulite tunnetamiseks on bakteritel signaalsüsteemid, mis reguleerivad näiteks rakkude jagunemist, virulentsust ja resistentsust antibiootikumidele. Kahekomponentsed signaalsüsteemid koosnevad enamasti kahest valgust – sensorist ja regulaatorist. Sensor tunnetab keskkonnast tulevaid signaale ja aktiveerib regulaatori, mis omakorda käivitab muutused geeniekspressioonis. Gram-negatiivsete bakterite seas on konserveerunud kahekomponentne signaalsüsteem GacS-GacA (Falke jt., 1997; Hellingwerf jt., 1998; Blumer jt., 1999; Heeb ja Haas, 2001; Wang jt., 2021).

Gac-signaalsüsteem on globaalne antibiootikumi ja tsüaniidi sünteesi aktivaator (Lapouge jt., 2008). *Pseudomonas* sp. on leitud, et GacS-GacA signaalsüsteem reguleerib sRNA-sid, mis omakorda aktiveerivad sekundaarsete metaboliitide sünteesi (Brecic jt., 2009). On kirjeldatud, et defektse Gac-signaalsüsteemi puhul pole *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* võimeline põhjustama oataimedel bakteriaalset pruunlaiksust (Willis jt., 1990; Hrabak ja Willis, 1992) ning *Pseudomonas fluorescens*-is väheneb fungitsiidse toimega sekundaarsete metaboliitide produktsioon (Laville jt., 1992). Meie laboris on varasemalt näidatud, et GacS-GacA signaalsüsteemi sensori GacS-i defektsuse korral suureneb mutatsioonisagedus *Pseudomonas putida* PaW85 statsionaarse kasvufaasi rakkudes (Tagel jt., 2016). Mutatsioonisagedust statsionaarses kasvufaasis võivad mõjutada reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) kuhjumine (Lemire jt., 2017), vigutegevate DNA polümeraaside kasutuselevõtt (Foster, 2005; Foster, 2007) ja DNA reparatsioonimehhanismi valkude ekspressiooni mahasurumine (Foster, 2005; Foster, 2007; Matic, 2016).

Käesoleva töö eesmärgiks on välja selgitada, kas töögrupi varasemates katsetes nähtud Gac-signaalsüsteemi sensorivalgu GacS-i mõju *Pseudomonas putida* mutatsioonisagedusele statsionaarses faasis toimib läbi signaaliraja regulaatorivalgu GacA ning mis võiksid olla suurenenud mutatsioonisageduse põhjused.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Kahekomponentsed signaalsüsteemid

Bakterid kohanevad kiirelt muutuvate keskkonnatingimustega. Muutunud tingimustele reageerimist võimaldavad signaalsüsteemid, mille abil on bakterirakk võimeline tunnetama keskkonnast tulevat signaali, mis võib olla nii abiootilist (pH, temperatuur, osmolaarsus jt.) kui biootilist (kvoorumi tunnetamine, bakteriraku vanus) päritolu. Signaalsüsteemid reguleerivad bakterites näiteks rakkude jagunemist, virulentsust, antibiootikumide resistentsust, liikumist atraktandi poole või repellendist eemale (Falke jt., 1997; Hellingwerf jt., 1998; Blumer jt., 1999; Heeb ja Haas, 2001; Wang jt., 2021).

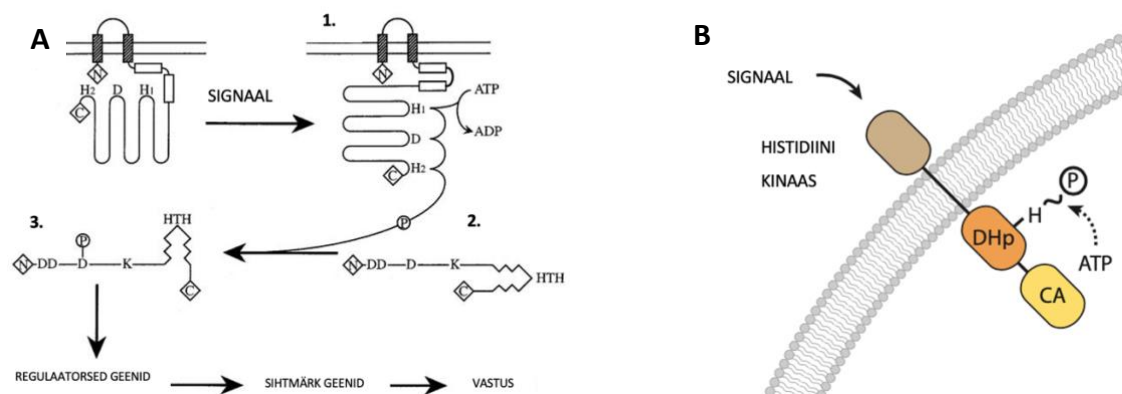
Näiteks *Escherichia coli* kahekomponentse signaalsüsteemi EnvZ-OmpR sensor EnvZ tunnetab muutunud osmolaarsust. Signaalsüsteemi regulaator OmpR kontrollib membraaniporiinide OmpC ja OmpF transkriptsiooni. OmpF ja OmpC membraaniporiinid lasevad läbi väikeseid hüdrofiilseid molekule nagu suhkrud ja peptiidid. Kui *E. coli* elab keskkonnas, kus on kõrges kontsentratsioonis toitaineid, nagu imetajate soolestik, siis ekspresseeritakse rakkudes valku OmpC, mis moodustab väiksema diameetriga poriini. Kui keskkonna toitaainesisaldus on väiksem, näiteks veekogus, siis sünteesitakse suuremat valku OmpF, mis moodustab suurema poriini. OmpF poriini kaudu toimub molekulide liikumine rakku 10 korda kiiremini kui läbi OmpC poriini (Slauch ja Silhavy, 1996; Egger jt., 1997).

Agrobacterium tumefaciens-i VirA-VirG signaalsüsteem tunnetab taime eksudaate ning vastusena aktiveerib virulentsusega seotud *vir* geenide ekspressiooni. Sensor VirA tunnetab keskkonnas olevaid fenooliühendeid, monosahhariide ning madalat pH-d, mis viitavad taimekahjustusele ning aktiveerib signaalsüsteemi regulaatori VirG. VirG on transkriptsiooni regulaator, mis aktiveerib *vir*-geenide (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*) ekspressiooni. *Vir*-geenide ekspressioon on oluline bakterile taime nakatamiseks – VirC suunab endonukleaasi VirD T-DNA otstesse, VirB muudab bakterimembraani arhitektuuri, et saaks toimuda T-DNA ülekande taimerakkudesse, üheaahelalist T-DNA-d „kaitseb“ nukleasidest VirE (Gelvin ja Habeck, 1989; Gross jt., 1989; Pazour ja Das, 1989; Wise ja Binns, 2016).

Bakteritel on keskkonna tunnetamiseks mitmeid signaalsüsteeme, mis kõik võivad töötada paralleelselt või hierarhiliselt (Hellingwerf jt., 1998). Näiteks on *Escherichia coli* tüves K12 leitud 28 sensorkinaasi ning 32 vastuse regulaatorit ning *Pseudomonas aeruginosa* tüves PAO1 vastavalt 63 ja 64 (Sultan jt., 2021). Signaalsüsteemide paralleelsest tööst annab aimu *Bacillus subtilis*-e Spo süsteem, mis on seotud sporulatsiooni reguleerimisega ning kus üks

sensorkinaas aktiveerib rohkem kui ühe regulaatori (Burbulys jt., 1991). Samuti on võimalik, et üht regulaatorit fosforüülivad mitmed sensorkinaasid. Näiteks *E. coli* nitraaditundlikus Nar süsteemis fosforüülivad regulaatorit NarL kaks sensorit – NarQ ja NarX (Schröder jt., 1994).

Kahekomponentsed signaalsüsteemid koosnevad enamasti kahest valgust – sensorist ja regulaatorist. Sensor tunnetab keskkonnast tulevaid signaale ning regulaator käivitab muutused geeniekspressioonis (joonis 1A) (Falke jt., 1997; Hellingwerf jt., 1998; Heeb ja Haas, 2001; Wang jt., 2021). Enamasti on sensoriks histidiinkinaasse aktiivsusega valk. Sensori N-terminuses asub vähemalt kaks transmembraanset α -heeliksit, mis ankurdavad valgu membraani. Tsütoplasmaatilises C-terminuses asub histidiinkinaasne osa, mis signaali olemasolul autofosforüleerub. Kõigil histidiini kinaasidel on kaks äärmiselt konserveerunud domeeni: dimerisatsiooni- ja histidiini fosfotransferaasi ehk DHp domeen ning katalüütilis- ja ATP sidumisdomeen ehk CA (joonis 1B).



Joonis 1: A. Signaali ülekanne kahekomponentses signaalsüsteemis. Transmembraanne aktiveerunud sensor (1), sensori konserveerunud histidiinilt fosforüülrühma ülekanne (2), aktiveeritud regulaator (3) (Heeb ja Haas, 2001, muudetud).

B. Kahekomponentse signaalsüsteemi sensor. Dimerisatsiooni- ja histidiini fosfotransferaasi ehk DHp domeen, katalüütilis- ja ATP sidumisdomeen ehk CA (Capra ja Laub, 2012, muudetud).

Signaali äratundmisel toimub sensoris autofosforülatiooni reaktsioon, kus leiab aset ATP-seoseline histidiini fosforüülimine. Konserveerunud histidiini jäägilt kantakse fosforüülrühm edasi regulaatori N-terminuses konserveerunud aspartaadijäägile, kus regulaatori fosforüülimine kutsub esile viimase konformatsioonilise muutuse. Selline konformatsiooniline muutus on oluline sihtmärk geenide ekspressiooni reguleerimiseks (joonis 1A) (Hellingwerf jt., 1998; Pirrung, 1999; Capra ja Laub, 2012).

1.2 Kahekomponentne signaalsüsteem GacS - GacA

Kahekomponentne signaalsüsteem GacS-GacA on konserveerunud Gram-negatiivsete bakterite seas. Gac-lühend tuleneb valgu funktsioonist, mis on globaalne antibiootikumi ja tsüaniidi sünteesi aktivaator (Lapouge jt., 2008). Esmalt kirjeldati 1990. aastal taimepatogeenil *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (isolaadil B728a) *gacS* geen, mida tol ajal nimetati *lemA* (Willis jt., 1990). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolaat B728a põhjustab oataimedel bakteriaalset pruunlaiksust. Leidmaks *P. syringae* geene, mis põhjustavad bakteriaalset pruunlaiksust, analüüsiti *P. syringae* isolaadi B728a transposoonmutante, kes ei suutnud laiike tekitada. Leiti, et minitransposooni sisenemisel *lemA* geeni olid *P. syringae* rakud kaotanud võime tekitada oataime lehtedel ja kaunadel pruune laiike (Willis jt., 1990; Hrabak ja Willis, 1992). Lisaks leiti, et *P. syringae* *lemA* mutandil oli vähenenud proteaaside ning toksiini süringomütsiini produktsioon (Hrabak ja Willis, 1992). Samuti on näidatud, et *Pseudomonas putida* tüves PaW85 mitte-funktsioneeriva GacS valgu korral on suurenenud mutatsioonisagedus statsionaarses kasvufaasis (Tagel jt., 2016).

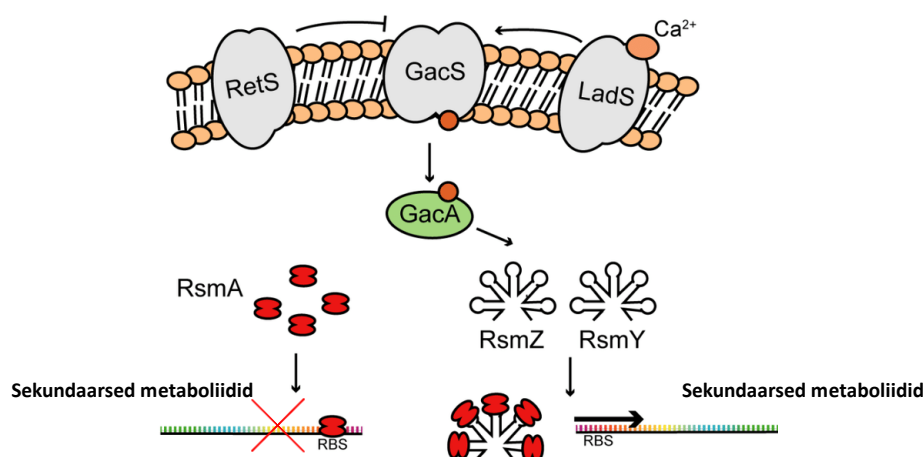
gacA geeni kirjeldati esmalt bakteris *Pseudomonas fluorescens*, kus näidati, et selle puudumine vähendab fungitsiidse toimega sekundaarsete metaboliitide produktsiooni (Laville jt., 1992). Paar aastat hiljem leiti, et GacA moodustab GacS-iga signaalsüsteemi. Nimelt otsisid Rich ja kolleegid *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* spontaanseid mutante, kelle fenotüüp oleks *gacS* mutandi sarnane – vähenenud ekstratsellulaarsete proteaaside ja toksiini süringomütsiini tootmine ning samuti vähenenud oataime nakatamisvõime. Leiti *gacS* mutandi fenotüübiga sarnaseid spontaanseid mutante, kelle fenotüüp ei taastunud, kui rakkudesse viidi *gacS* geen. Rich ja kolleegid spekuleerisid, et sellised spontaansed mutatsioonid, mistõttu on fenotüüp sarnane *gacS* mutandi fenotüübiga, saavad olla GacS reguleeritavas valgus. Võttes aluseks Laville ja kolleegide andmed (1992), tuvastatigi *gacA* geen ning näidati, et see on Gac-signaalsüsteemi regulaator (Rich jt., 1994).

GacS-GacA signaalsüsteem kontrollib pseudomonaadides positiivselt RsmX/Y/Z sRNA-de ekspressiooni, mis seonduvad sekundaarse metabolismi repressori RsmA-ga ning aktiveerivad seetõttu sekundaarsete metaboliitide sünteesi. *Pseudomonas aeruginosa*-s reguleerib GacA otseselt sRNA geene, milleks on *rsmY* (äratundmisjärjestus: TGTAAGCCAAGGCTTACA) ja *rsmZ* (äratundmisjärjestus: TGTAAGCATTAACTTACA) (Brecic jt., 2009). *P. aeruginosa*-s reguleerivad RsmY ja RsmZ sRNA-d kvoorumitunnetust ning ekstratsellulaarsete ühendite produktsiooni (Kay jt., 2006). *Pseudomonas fluorescens*-i tüves CHA0 oleneb RsmY-i ekspressioon GacS-GacA signaalsüsteemist ning suureneb rakkude

tiheduse kasvuga. Blumer ja Haas (2000) leidsid, et *P. fluorescens*-i tüves CHA0 *rsmA* geeni üleekspressioneerides väheneb sekundaarse metaboliidi vesiniksüaniidi ekspressioon seitse korda (Blumer ja Haas, 2000). Samuti näidati, et RsmY ja RsmZ reguleerivad RsmA-d seda inhibeerides (joonis 2) (Valverde jt., 2003). Seetõttu on nimetatud seda signaalvõrgustikku ka Gac-Rsm signaaliülekanne rajaks (Chatterjee jt., 1995; Cui jt., 2001; Lapouge jt., 2008; Latour, 2020).

On leitud, et GacS-i funktsiooni kadu vähendab mullabakter *Pseudomonas putida* KT2440 tüve kinnitumist erinevatele pindadele (Duque jt., 2013). *In silico* leiti *P. putida*-s ortoloogsed geenid, mis on seotud biofilmi moodustumisega *Pseudomonas aeruginosa*-s. Samuti näidati, et *Pseudomonas putida* KT2440 *gacS* mutantides oli vähenenud biofilmi moodustumise võime ning samuti oli vähenenud kahe peamise biofilmi struktuurivalgu LapA ja LapF ekspressioon. Selleks, et teada saada, kas GacS valgu puudumine mõjutab biofilmi moodustumist läbi LapA ja/või LapF valgu, vaatasid Martinez-Gil ja kolleegid *lapA* ja *lapF* transkriptsioonitaset *P. putida gacS* mutantides. Nad leidsid, et LapA ja LapF valkude ekspressioon oli metsiktüvest madalam nii *gacS* kui ka *gacA* mutantides, ning järeldasid, et GacS-GacA signaalsüsteem reguleerib *lapA* ja *lapF* geenide ekspressiooni (Martinez-Gil jt., 2014).

Bakteris *Pseudomonas aeruginosa* leiti GacS-GacA signaalsüsteemi inhibiitor, milleks on histidiini kinaas RetS. RetS on võimeline GacS-iga moodustama heterodimeeri, mis ei ole võimeline fosforüülima GacA-d ja seetõttu jääb signaaliülekanne poolikuks (joonised 2 ja 3) (Goodman jt., 2009).



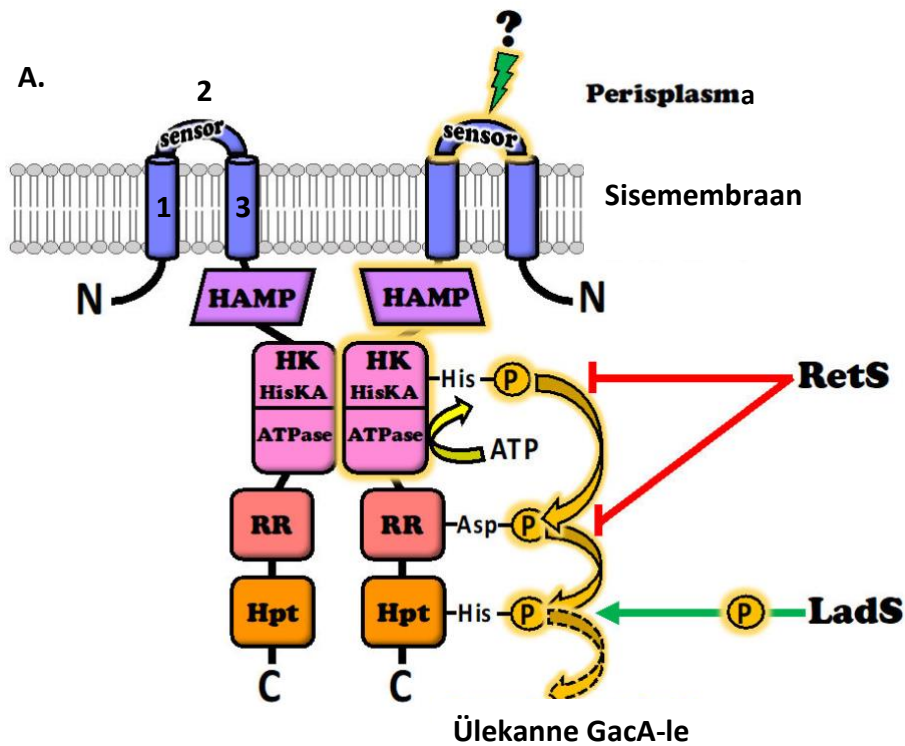
Joonis 2: Gac-Rsm rada. Aktiveerunud GacS aktiveerib GacA, mis omakorda aktiveerib RsmZ-i ja RsmY-i. Viimased inhibeervad RsmA-d, aktiveerides sellega sekundaarsete metaboliitide ekspressiooni. Histidiini kinaas RetS on võimeline moodustama GacS-iga heterodimeeri, mis repressseerib GacS-GacA signaalsüsteemi. Sensorikinaas LadS aktiveerib samuti RsmZ ja RsmY. RBS tähistab ribosomaalset seondumissaiti (Pissaridou, 2018, muudetud).

Tõenäoliselt on *retS* geeni regulaatoriteks aga RsmZ ja RsmY, mistõttu autoreguleerib GacS-GacA süsteem end ise (Brencic jt., 2009). Samuti leiti *Pseudomonas aeruginosa*-s sensorkinaas LadS, mille domeenide arhitektuur meenutab RetS-i, kuid käitub vastupidiselt. Nimelt aktiveerib LadS sarnaselt GacS-iga RsmZ-i (Ventre jt., 2005). Seega RetS ning LadS moodustavad GacS-GacA-ga ühe terve signaalsüsteemi võrgustiku.

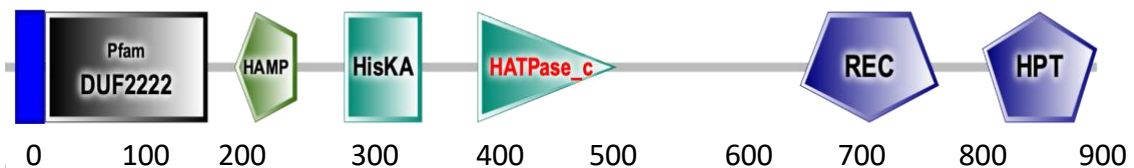
1.2.1 GacS – GacA kahekomponentse signaalsüsteemi sensor GacS

GacS-GacA kahekomponentse signaalsüsteemi sensorvalk GacS on NarL perekonda kuuluv histidiini kinaas. NarL perekonda kuuluvad histidiini kinaasid on lämmastikutundlikud ning seotud nitraadi ja nitriti metabolismiga (Yoshida jt., 2015). Sensor GacS on 917 aminohapet pikk histidiini kinaas, millel on nii signaali vastuvõttev domeen kui ka signaali edasikandev domeen ([lisa 2](#)) (Heeb ja Haas, 2001). GacS monomeer koosneb N-terminuses paiknevast α -heeliksist, millele järgneb periplasmas asuv silmus (DUF2222), mis tunnetab keskkonnasignaale. Kuna GacS periplasmaatiline osa pole tugevalt konserveerunud, pole seepärast ka teada signaal või ligand, mille sensor ära tunneb (Heeb ja Haas, 2001). Periplasmaatilisele silmusele järgneb teine transmembraanne α -heeliks, mis on seotud tsütoplasmaatilise osaga (joonis 3) (Latour 2020; Lapouge jt, 2008).

GacS tsütoplasmaatilisse ossa kuulub HAMP domeen (**h**istidiini kinaas, **a**denülaadi tsüklaas, **m**etüülrühma vastuvõttev osa, fosfataas (ingl k – *phosphatase*)) (joonis 3) (Williams ja Stuart, 1999; Heeb ja Haas, 2001; Latour, 2020). Tegemist on α -heeliks regiooniga, mis reguleerib sensori fosforüleerimist või metüleerimist (Aravind ja Ponting, 1999). HAMP domeenile järgneb HisKA domeen, mis on dimerisatsiooni- ja histidiini kinaasi domeen. HisKA domeen viib läbi sensori autofosforülatiooni reaktsiooni, kus ATP-lt kantakse fosforüülrühm üle konserveerunud histidiini jäägile (Vierstra ja Davis, 2000; Heeb ja Haas, 2001; Latour, 2020).



B.



Joonis 3: GacS valk. Transmembraansed regioonid on valgu positsioonides 12-32 (aminohape, AH) ning 170-189 (AH), nende vahele jääb periplasmaatiline DUF2222 domeen, mis tunnetab keskkonnasignaali. HAMP domeeni kuuluvad histidiini kinaas, adenüülsüklaas, metüülrühma vastuvõttev osa ja fosfataas. Sellele järgneb HisKA domeen, mis on dimerisatsiooni ja histidiini kinaasi domeen. HATPase_c domeeni kuulub ATPaas, REC (RR) domeeni vastuse regulaator ehk fosfoaktseptor ning HPT domeeni histidiini fosfotransferaas

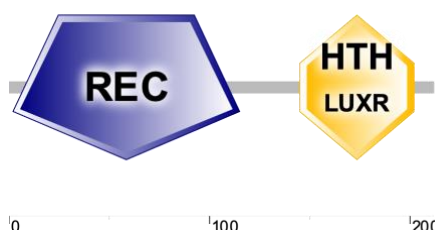
A. GacS N-terminuse n.ö saba asub tsütoplasmas, sellele järgneb transmembraanne α -heeliks (1), seejärel periplasmaatiline silmus (2) ning jälle transmembraanne osa (3) (Latour, 2020, muudetud).

B. *Pseudomonas putida* GacS valgu domeenide skeem (smart.embl.de/GacS).

Esimese histidiini jäägi fosforüülimine aktiveerib GacS sensori ja kutsub esile fosforüülrühma ülekande histidiini jäägilt REC (ka RR) ehk fosfoaktseptordomeeni aspartadijäägile. Sealt kantakse fosforüülrühm edasi HPT ehk histidiini fosfotransferaasi domeeni histidiini jäägile (Heeb ja Haas, 2001; Latour, 2020). HPT domeen on fosforüülrühma edasikandja GacS-ilt regulaatori konserveerunud aspartadijäägile (Skerker jt., 2005).

1.2.2 GacS – GacA kahekomponentse signaalsüsteemi regulaator GacA

GacS-GacA kahekomponentses signaalsüsteemis on vastusregulaatoriks FixJ perekonda kuuluv valk GacA (Laville jt., 1992, Rich jt., 1994). FixJ perekonna vastuseregulaatorid on hapnikutundlikud ning olulised lämmastiku sidumise reguleerimisel (Liu jt., 2021). *Pseudomonas putida* GacA on 212 aminohappe pikkune kahekomponentse signaalsüsteemi regulaator, mille aktiveerib süsteemi sensor GacS. Valgu domeenideks on REC domeen, mis on fosforüülgrupi aktseptor ning HTH LuxR domeen, mis on heeliks-pööre-heeliks DNA-ga seondumise domeen (joonis 4 ja [lisa 3](#)) (Laville jt., 1992; Maris jt., 2002).



Joonis 4: *Pseudomonas putida* GacA valgu skeem. Positsioonis 2-115 (aminohape, AH) asub valgu REC domeen, mis on fosforüülgrupi aktseptor ning 145-202 (AH) on HTH LuxR domeen, mis on heeliks-pööre-heeliks DNA-ga seondumise domeen (smart.embl.de/GacA).

HTH LuxR domeeni järgi on tehtud kindlaks DNA järjestused, kuhu GacA seondub. Tegemist on Rsm sRNA geenidega, mis on sekundaarse metabolismi regulaatorid (Brecic jt., 2009). Pseudomonaadides inhibeerivad RsmX/Y/Z sRNA-d sekundaarse metabolismi repressorit RsmA-d (joonis 2) (Lapouge jt, 2008; Latour, 2020). RsmA ei lase ribosoomil seonduda sekundaarse metabolismiga seotud geenide mRNA-le.

Laville (1992) ning Yu ja kolleegid (2014) leidsid, et *Pseudomonas fluorescens*-i CHA0 *gacA* mutantis tüves on suurenenud fluorestseeruvate siderofooride, eelkõige püoverdiini, tootmine ning mutantide koloonia morfoloogia on samuti muutunud – agaril on kolooniad muutunud suuremaks, madalamaks ning lapikumaks (Laville jt., 1992, Yu jt., 2014). Kuna GacA on globaalne regulaator, on muutused selle geeni järjestuses olulised kogu raku füsioloogia kontekstis. On leitud, et laboritingimustes, kus bakterid kasvavad toitainete külluses, on *Pseudomonas syringae* CHA0 tüves saanud spontaansed mutatsioonid nii *gacS* kui *gacA* geenis ning seega GacA funktsiooni kadu võib laboritingimustes anda bakterile kasvueelise (Bull jt., 2001).

1.3 Mutatsiooniprotsessid bakterirakkudes

Erinevad keskkonnatingimused võivad tekitada bakterirakkudes stressi, mis omakorda suurendab mutatsioonide tekke tõenäosust. Stressi võivad tekitada toitainete puudus, kõrge osmolaarsus, ebasobiv pH või temperatuur (Landini jt, 2014).

Otsesed eksogeensed mutageenid võivad olla erinevad keemilis-füüsikalised ühendid, ja UV-kiirgus (Matic, 2016). Samuti võivad mutatsioonid tekkida endogeenselt, näiteks tänu vigadele DNA replikatsioonis või transkriptsioonis. Viimased võivad viia lõpuks reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) tekkeni, mis on võimelised läbi oksüdeerimise DNA-d veelgi kahjustama (Schroeder jt., 2017). Kui mutatsioonisagedus rakkudes on mõõdukas, siis võib see anda bakterile eelise antud keskkonnas kasvamiseks ja evolutsioneerumiseks. Kui aga mutatsioonisagedus tõuseb liiga kõrgeks, võib see muutuda rakkudele kahjulikuks, isegi letaalseks (Foster, 2007).

Stressori olemasolul aktiveerub rakkudes stressivastus, mida on erinevat tüüpi. Näiteks DNA kahjustuste korral aktiveerub SOS-vastus, ebasobiv temperatuur aktiveerib kuuma- või külmašoki vastuse, toidunappus aga „poomisvastuse“ (Gottesman, 2019; Matic, 2016; Foster 2005).

1.3.1 Üldine stressivastus

Stressitingimustes muudavad bakterirakud oma geeniekspressiooni. Transkriptsioonitaseme muutusel mängib olulist rolli RNA polümeraasi σ -faktor, mis suunab polümeraasi transkribeerima spetsiifilisi geene (Landini jt, 2014). Iga σ -faktor koordineerib spetsiifilise geenikomplekti transkriptsiooni, mis võimaldab väga täpselt kontrollida ja muuta kohanemist erinevates keskkonnatingimustes (Matic, 2016). Üheks alternatiivseks σ -faktoriks *Escherichia coli*-s on *rpoS* geeni produkt σ^S , mis on üldise stressivastuse regulaator (Hengge-Aronis, 1996). *E. coli* tüves K12 on näidatud, et mitmed erinevad signaalid ning erinevatel tasemetel reguleerimine aktiveerib RpoS-i kuhjumise ja aktiveerumise statsionaarses kasvufaasis (Gottesman, 2019). *Pseudomonas protegens*-ise tüves Pf-5 (varasemalt *Pseudomonas fluorescens* Pf-5) suurenes RpoS tase statsionaarses faasis võrreldes eksponentsiaalse faasiga 500% (Whistler jt, 1998).

RpoS reguleerib positiivselt DNA polümeraas IV induktsiooni *Escherichia coli*-s. RpoS aktiveerib Pol IV nii tema promootoralaga otseselt seondudes, kui ka kaudselt läbi teiste valkude (Storvik ja Foster, 2010). *Pseudomonas putida*-s on aga näidatud, et Pol IV ekspressioon ei ole RpoS sõltuv (Tegova jt., 2014). Statsionaarses faasis võetakse kasutusele

Pol IV, mis suudab stressitingimustes DNA-d replitseerida, kuid teeb samal ajal DNA-sse vigu, mis tõstab rakkudes mutatsioonitaset (Foster, 2005; Foster, 2007). Lisaks on leitud, et RpoS-i puudumine *P. putida* rakkudes suurendab mutatsioonisagedust statsionaarses kasvufaasis (Tarassova jt., 2009). Mutatsioonisageduse suurenemine *rpoS*-defektses tüves on põhjustatud superoksiidi dismutaasi ning katalaasi vähenenud ekspressioonitasemest, mistõttu muutub oksüdatiivne stress rakkudele isegi letaalseks. Samuti reguleerib *E. coli*-s RpoS negatiivselt DNA paardumisvigade parandismehhanismi valku MutS (Foster, 2005; Foster, 2007; Matic, 2016). MutS on valk, mis leiab DNA-s paardumisvead ja aktiveerib paardumisvigade parandamise mehhanismi (MMR) (Tessmer jt., 2008). *Pseudomonas* sp. tüves PCL1171 sõltub MutS valgu tase mitte ainult RpoS-ist, vaid ka GacS valgu olemasolust (van der Broek jt., 2005). Leiti, et *mutS* ekspressioonitase suurenes, kui *rpoS* ning *gacS* olid defektsed. Kuna RpoS-i kuhjumise korral surutakse maha MutS tase, siis DNA-s tekkinud vigu ei parandata ning need kanduvad edasi (Foster, 2005; Foster, 2007; Matic, 2016).

Whistler ja kolleegid (1998) toovad välja, et *Pseudomonas protegens* Pf-5 tüves vähendasid mutatsioonid *gacS* või *gacA* geenis RpoS-i taset 20%, järeldades sellest, et GacS-GacA kahekomponentne signaalsüsteem reguleerib RpoS-i. Samas on RpoS-i taseme regulatsioon väga kompleksne, kuna RpoS-i reguleeritakse nii transkriptsiooni-, translatsiooni- kui ka proteolüütilisel tasemel (Landini 2013; Matic, 2016; Gottesman, 2019).

1.3.2 SOS-vastus

DNA kahjustused aktiveerivad *Escherichia coli*-s üle 50 geeni ekspressiooni. Sellist DNA kahjustusest aktiveeritud kaitsemehhanismi nimetatakse SOS-vastuseks (Foster, 2005; Matic, 2016). DNA kahjustuste korral tekivad üheaheelalise-DNA (ssDNA) piirkonnad, mis saavad tekkida otseselt tänu kahjustavale faktorile, näiteks UV-kiirgusele, või kaudselt, kui DNA parandamise käigus on replikatsioon seisma jäänud (Foster, 2007). SOS-vastuse võib jagada kaheks: DNA kahjustuste elimineerimine või nende „tolereerimine“. Kui DNA kahjustusi ei tolereeritaks, muutuksid rakud DNA kahjustusi põhjustavate ekso-ja endogeensete faktorite suhtes äärmiselt tundlikuks. *Escherichia coli*-s aitavad DNA kahjustusi tolereerida DNA polümeraasid IV ja V, mis suudavad DNA kahjustuste korral peatunud replikatsiooni jätkata (Foster, 2005; Foster, 2007; Matic, 2016).

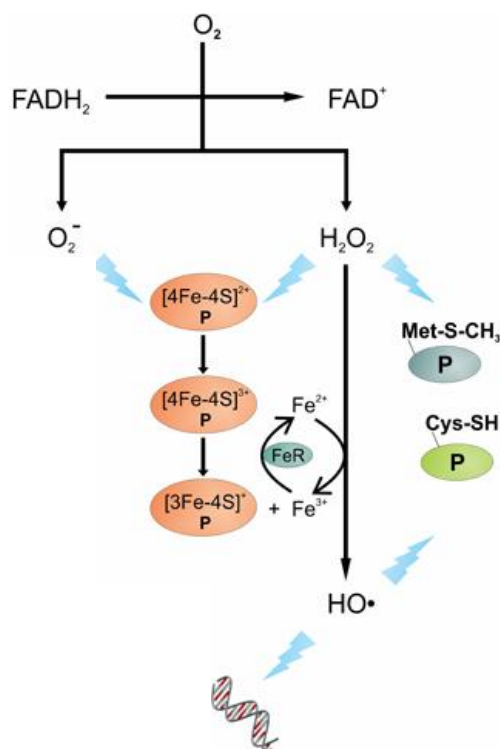
SOS-vastuse mehhanism toimib läbi transkriptsiooni repressori LexA katalüüsi. LexA repressseerib geene, mis on vajalikud DNA parandamise, rekombinatsiooni ja DNA sünteesi läbiviimiseks (Foster, 2007). DNA katkestused aktiveerivad valgu RecA, mis aitab kaasa LexA

autokatalüütilisele lagundamisele. Kui LexA represseeriv efekt kaob, indutseeritakse SOS-geenid, mis on stressivastuses väga olulised (Eisen ja Hanawalt, 1999). Ühed SOS-geenid, mis aktiveeritakse *Escherichia coli*-s on DNA polümeraasid IV (*dinB*) ja V (*umuDC*). Neil polümeraasidel puudub 3'→5' suunaline eksonukleasne aktiivsus, mistõttu ei parandata DNA replikatsioonis tekkinud vigu. Kui DNA polümeraas III jääb kahjustuse juures seisma, siis polümeraas V suudab neist üle replitseerida. Polümeraas IV suudab samuti vigadest üle replitseerida, kuid selle võimekus oleneb nii kahjustusest kui ka DNA järjestusest (Foster, 2005; Matic, 2016; Schroeder jt., 2018).

Polümeraas IV on mitme erineva stressivastuse komponent. Seda reguleerib nii üldise stressivastuse valk RpoS kui ka kuumashoki vastuse valk GroE (Foster, 2005; Matic, 2016). Pol IV üle-ekspressioon võib nii eksponentsiaalse kui ka statsionaarse kasvufaasi rakkudes mutatsioonisagedust tõsta (Kim jt., 1997; Foster, 2007). Kuna Pol IV geenid on tugevalt konserveerunud paljudes elusorganismides, on sellel oluline roll rakkude ellujäämisel ja kohanemisel.

1.3.3 Oksüdatiivne stress ja reaktiivsed hapnikuühendid (ROS)

Bakterid, kes kasutavad elutegevuseks hapnikku peavad toime tulema ka hingamise käigus tekkivate reaktiivsete hapnikuühenditega (ROS). ROS-ideks on näiteks superoksiidi anioon (O_2^-), hüdroksüülradikaal ($OH^\cdot$) ja vesinikperoksiid (H_2O_2) (Fridovich, 1978; Imlay, 2008). ROS-id on ühed tüüpilisemad endogeensed faktorid, mis võivad kahjustada DNA-d, RNA-d, lipiide ja valke (joonis 5) (Lemire jt., 2017).



Joonis 5: ROS-ide tekkimine ja nende sihtmärgid rakkudes. Elektronide ülekanne redutseeritud redoksensüümilt hapnikule tekitab superoksiidi aniooni (O_2^-) ja vesinikperoksiidi (H_2O_2). Fe^{3+} redutseerimist katalüüsib raud(III)reduktaas (FeR). Tekkinud Fe^{2+} reageerib H_2O_2 -ga, mistõttu tekib $OH^\bullet$. Tekkivaid kahjustusi näitavad helesinised nooled, täht „P“ tähistab valke (Gaupp jt., 2012, muudetud).

O_2^- ja H_2O_2 tekivad rakkudes juhuslikult. Rakkudesse difundeerunud O_2 oksüdeerib redoksensüüme ning hapnikule kantud üks või kaks elektroni moodustavad vastavalt O_2^- ja H_2O_2 . Kui Fe^{2+} kannab elektroni H_2O_2 -le, tekib $OH^\bullet$ (Imlay, 2003; Gaupp jt., 2012). O_2^- ja H_2O_2 seonduvad Fe-S klastriga ensüümide aktiivsai. Aktiivsaiis seonduvad O_2^- ja H_2O_2 raua-aatomiga ning oksüdeerivad selle, mistõttu muutub ensüüm ebastabiilseks (Imlay, 2008). Samuti oksüdeerib H_2O_2 väävlit sisaldavaid aminohappeid. $OH^\bullet$ on samuti võimeline oksüdeerima valke, mistõttu need kaotavad oma struktuuri ja funktsiooni. Samuti on ROS-id võimelised kahjustama DNA-d (Gaupp jt., 2012; Lemire jt., 2017). DNA, RNA või valkude struktuuri ja funktsiooni muutused võivad aga suurendada rakkudes mutatsioonisagedust.

1.3.3.1 Oksüdatiivne stressivastus

Superoksiidi dismutaasid (SOD) katalüüsivad O_2^- dismutatsiooni hapnikuks ja vesinikperoksiidiks. Vesinikperoksiidi on võimalik edasi redutseerida rakkudele ohutuks veeks ja hapnikuks (Fridovich, 1975). H_2O_2 redutseerivad ensüümid on katalaasid (*kat*-geenid) ja alküülhüdroperoksiidi reduktaasid (*ahp*-geenid) (Seaver ja Imlay, 2001). Nimetatud ensüümide aktiveerimine toimub siis, kui rakk on tunnetanud ROS-ide kuhjumist. ROS-e

tunnetavad rakkudes erinevad süsteemid, näiteks regulaatorid SoxR, OxyR, HexR ja FinR (Kim ja Park, 2014).

Escherichia coli-is on SoxR transkriptsiooni aktivaator. Kui SoxR Fe-S klaster on oksüdeeritud, muutub see aktiivseks ning aktiveerib SoxS-i. Aktiveeritud SoxS on samuti transkriptsiooni regulaator, mis otseselt reguleerib oksüdatiivse stressivastusega seotud geenide ekspressiooni (Kim ja Park, 2014). *Pseudomonas putida* tüves KT2440 on leitud küll SoxR homoloog, kuid puudub SoxS homoloog. Kui *E. coli*-s reguleerib SoxR positiivselt geenide *fpr* (ferredoksiin), *fumC-1* (fumaraas C), *sodA* (superoksiidi dismutaas), *zwf-1* (glükoos-6-fosfaat-1-dehüdrogenaas) transkriptsiooni, siis *P. putida* SoxR mutandis ei ole nende geenide ekspressioonitasemes erinevust metsiktüvest (Park jt., 2006).

OxyR on samuti transkriptsiooni aktivaator, mis *E. coli*-s tunnetab vesinikperoksiidi olemasolu. OxyR-i ekspresseeritakse rakkudes konstitutiivselt ning see aktiveerub, kui vesinikperoksiid oksüdeerib valgu tsüsteiini. Oksüdeeritud OxyR seondub sihtmärkgeenide promootoralaga ning RNA polümeraasiga (Kullik jt., 1995; Lee jt., 2004; Kim ja Park, 2014). *P. putida*-s reguleerib OxyR otseselt oksüdatiivse stressivastusega seotud geenide ekspressiooni. Näiteks aktiveerib OxyR kataalaaside A ja B, alküülhüdroperoksiidi reduktaasi AhpC ja tioredoksiini TrxB ekspressiooni (Fukumori ja Kishii, 2001).

Kui OxyR on otsene oksüdatiivse stressivastuse aktivaator, siis HexR ja FinR on kaudsed regulaatorid. FinR reguleerib ferredoksiini (*fpr*) ning HexR glükoos-6-fosfaat-1-dehüdrogenaasi (*zwf-1*) ekspressiooni. Ferredoksiin on ensüüm, mis viib läbi elektronide ülekannet NADP(H) ja ühe-elektronilise kandja vahel. *zwf-1* geeni ekspressioon toob kaasa NADPH kontsentratsiooni suurenemise. NAD(P)H oksüdeerimine võimaldab rakkudes taastada redokstasakaalu, mis on häiritud oksüdatiivse stressi korral (Kim ja Park, 2014).

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Meie uurimisgrupis on varasemalt näidatud, et GacS-GacA signaalsüsteemi sensorvalgu GacS-i defektsus tõstab mutatsioonisagedust mullabakter *Pseudomonas putida* PaW85 statsionaarse faasi rakkudes ligikaudu suurusjärgu võrra, kuid kasvavates rakkudes mõjutab mutatsioonisagedust vähesel määral (Tagel jt., 2016). Selleks, et välja selgitada, kas signaaliraja sensorvalgu GacS-i efekt mutatsioonisagedusele toimib signaaliraja regulaatorvalgu GacA vahendusel, hindasin mutantide tekkesagedust nii *P. putida* algtüves, *gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes, kui ka *gacA* komplementatsioonitüves *gacA+tacgacA*, ja seda nii kasvavates kui statsionaarse faasi rakkudes.

Meie laboris oli lisaks *Pseudomonas putida gacS*-defektsele tüvele varasemalt olemas ka *gacA*-defektne *P. putida* tüvi (konstrueerinud Rita Hõrak, avaldamata), mille baasil konstrueerisin *gacA* komplementatsioonitüve *gacA+tacgacA*. Selles *gacA*-defektsetes *P. putida* tüves on genoomi viidud *gacA* geen *lacI* repressori ja *tac* promootori kontrolli all, mistõttu saab *gacA* ekspressiooni reguleerida IPTG lisamisega.

Käesoleva uurimistöö eesmärkideks olid:

- teha kindlaks, kas Gac-signaalsüsteemi regulaatorvalk GacA mõjutab mutatsioonisagedust *Pseudomonas putida* nälgivates rakkudes;
- välja selgitada põhjused, miks Gac-signaalsüsteemi defektsetes *P. putida* statsionaarse kasvufaasi rakkudes suureneb mutatsioonisagedus.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid, bakteritüved ja bakterite kasvutingimused

Bakterite kasvatamine toimus kas LB (ingl k - *lysogeny broth*) täissöötmes (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl) (Miller, 1992) või M9-glükoos-CAA minimaalsöötmes (edaspidi glc-CAA) (Adams, 1959), mille valmistamiseks lisasin 1 x M9 puhvrissi mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 µM MgO, 50 µM CaCO₃, 40 µM FeSO₄, 12,5 µM ZnSO₄, 12,5 µM MnSO₄, 2,5 µM CuSO₄, 2,5 µM, CoSO₄, 1,9 µM H₃BO₄), süsinikuallikana glükoosi (glc; lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ja aminohapete hüdrolüsaati (CAA; lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Tardsöötme saamiseks lisasin söötmele agarit 15 g/l.

Bakterite kasvatamisel kasutasin selektsioonimarkeritena järgmisi antibiootikume: kanamütsiin (Km; lõppkontsentratsioon 50 µg/ml), ampitsilliin (Amp, lõppkontsentratsioon 100 µg/ml), gentamütsiin (Gm; lõppkontsentratsioon 10 µg/ml), penitsilliin (pen; lõppkontsentratsioon 2 mg/ml) ja rifampitsiin (rif; 100 µg/ml). Vajadusel lisasin söötmele fenooli (phe, lõppkontsentratsioon 2,5 mM), 0,5 mM isopropüültio-β-galaktosiidi (IPTG), 100 µg/ml X-gali (5-bromo-4-kloro-3-indolüül-D-galaktopüranosiid) ja parakvaati (lõppkontsentratsiooniga 0,15 mM).

E. coli rakke kasvasin temperatuuril 37°C ja *P. putida* rakke temperatuuril 30°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisin kultuure loksutil (180 rpm). Töös kasutatud bakteritüved on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
Pseudomonas putida		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	Bayley jt., 1977
PaW85 <i>gacS</i> ::Sm (edaspidi <i>gacS</i> ::Sm)	PaW85 tüvest <i>gacS</i> ::Sm katkestustüvi	Tagel jt., 2016
PaW85 <i>gacA</i> ::Sm (edaspidi <i>gacA</i> ::Sm)	PaW85 tüvest <i>gacA</i> ::Sm katkestustüvi	R. Hõrak, avaldamata
PaW85 <i>gacA</i> ::Sm-Tn7- <i>lacI</i> - <i>tac-gacA</i> (edaspidi <i>gacA</i> + <i>tacgacA</i>)	PaW85 tüvest <i>gacA</i> -defektne tüvi, mille kromosoomi on viidud mini-Tn7 (Gm ^R) koosseisus <i>lacI</i> repressori ja P _{tac} promootori kontrolli all olev <i>gacA</i> geen	Käesolev töö
KT2440-Tn7	Tüvesse KT2440 on viidud mini-Tn7 (Gm ^R)	H. Ilves, avaldamata
KT2440Rif ^R	KT2440 tüvest Rif ^R tüvi	Juan L. Ramos'e kingitus R. Hõrakule
KT2440Rif ^R <i>PP_2006</i> ::Km (edaspidi <i>PP_2006</i> ::Km)	KT2440Rif ^R tüvest geeni <i>PP_2006</i> -defektne tüvi	Juan L. Ramos'e kingitus R. Hõrakule
KT2440Rif ^R <i>PP_2007</i> ::Km (edaspidi <i>PP_2007</i> ::Km)	KT2440Rif ^R tüvest geeni <i>PP_2007</i> -defektne tüvi	Juan L. Ramos'e kingitus R. Hõrakule
PaW85Δ <i>PP_4100</i> (edaspidi Δ <i>PP_4100</i>)	PaW85 tüvest geeni <i>PP_4100</i> deletsioontüvi	Juan L. Ramos'e kingitus R. Hõrakule
Escherichia coli		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1endA1 gyr A96 thi-1 relA1</i>	Miller, 1992
CC118λpir	Δ(<i>ara-leu</i>) <i>araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rspE rpo B argE (Apm)</i>	Herrero jt., 1990
Plasmiidid	Iseloomustus	Allikas

pKT <i>pheA</i> 56+A	pKT240, mis kannab <i>pheA</i> geeni, mille algusesse on lisatud A nukleotiid, geeni transkribeeritakse konstitutiivselt promootorilt	Tegova jt., 2004
pKT <i>pheA</i> 22TAG	pKT240, mis kannab <i>pheA</i> geeni, mille CTG koodon on muudetud TAG stop-koodoniks	Tegova jt., 2004
pBluescript II KS	<i>E. coli</i> kloneerimisvektor (Amp ^R)	Stratagene
pBluescript-KS- <i>gacA</i>	pBluescript II KS vektor, mille <i>Hind</i> III ja <i>Sall</i> saiti on kloneeritud <i>gacA</i> geen (Amp ^R)	Käesolev töö
pGP704L-Tn7(Gm ^R)	Vektor mini-Tn7 genoomi viimiseks, Amp ^R , Gm ^R	Pavel jt., 1994
pGP704L-Tn7(Gm ^R)- <i>lacI</i> -tac- <i>gacA</i>	pGP704L-Tn7 vektor, kuhu on <i>Not</i> I saiti viidud <i>lacI</i> repressori ja P _{tac} promootori kontrolli all olev <i>gacA</i> geen	Käesolev töö
puxBF13(Tn7 <i>tnpA</i>)	Vektor Tn7 genoomi viimiseks, kannab Tn7 transposaasi geeni, (Amp ^R)	Bao jt., 1991
pSEVA- <i>lacI</i> -tac	<i>lacI</i> repressorit ja P _{tac} promootorit kandev pSEVA vektor, (Km ^R)	Tagel jt., 2020
pSEVA- <i>lacI</i> -tac- <i>gacA</i>	pSEVA- <i>lacI</i> -tac vektor, mille <i>Hind</i> III saidis on <i>lacI</i> repressori ja P _{tac} promootori kontrolli all olev <i>gacA</i> geen, (Km ^R)	Käesolev töö

2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

P. putida rakke kasvasin üleöö 4 ml-s LB-vedelsöötmes. 300 µl üleöökuultuuri tsentrifuugisin kokku (45 sek, 12000 x g) ning pesin kolm korda 300 µl 300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeerisin 100 µl 300 mM sahharoosi lahuses.

E. coli rakke kasvasin üleöö 4 ml-s LB-vedelsöötmes. Kompetentsete rakkude saamiseks lahjendasin üleöökuultuuri värskesse LB-söötmesse tiheduseni 0,1 (OD₅₈₀) ja kasvasin loksutil tiheduseni ca 1. Tsentrifugisin kogu rakukultuuri söötmet välja (60 sek, 12000 x g), pesin kolm korda 700 µl 10% glütserooliga. Seejärel suspendeerisin rakud 10% glütseroolis. Rakke ja töölahuseid hoidsin pidevalt jääl.

Plasmiidse DNA viimiseks kompetentsetesse rakkudesse kasutasin elektroporatsiooni. Kompetentsetele rakkudele lisasin ca 100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning viisin segu elektroporatsiooniküveti. Kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 1. Elektroporatsiooni viisin läbi firma *BioRad* elektroporaatoriga „*Micropulser*“ pingel 2,5 kV. Pärast elektroporeerimist lisasin rakkudele 600 µl LB-vedelsöödet ning pesin rakud küvetist välja.

Seejärel kasvasin rakke üks või kolm tundi temperatuuril 37°C (*E. coli*) või 30°C (*P. putida*), misjärel tsentrifuugisin rakud kokku (12000 x g) ning plaatisin selektiivsöötmel.

2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR (ingl k – *Polymerase Chain Reaction*) meetodit kasutasin eelnevalt eraldatud plasmiidse DNA amplifitseerimiseks ja konstruktide kontrolliks. PCR reaktsioonisegu oli lõppmahuga 20 µl, kui kasutasin Taq polümeraasi, või 50 µl, kui kasutasin Phusion HotStart polümeraasi. PCR segu sisaldas, 1 x Dream Taq *green*, Phusion HF või Phusion GC puhvrit (puhvrid sisaldavad 2,5 mM MgCl₂), 0,2 mM dNTP-d, 0,5 ühikut Taq polümeraasi või Phusion HotStart polümeraasi ja 10 pmol kumbagi praimerit. Töös kasutatud praimerid on välja loodud lisas 1.

PCR Taq polümeraasiga viisin läbi 25 tsüklit järgnevatel tingimustel:

1. DNA denaturatsioon 96°C 45 sekundit,
2. Praimerite seondumine matriitsile 54°C-56°C (olenevalt praimeripaarist) 30-60 sekundit,
3. DNA süntees 72°C 60–90 sekundit.

Tsüklitele eelnes paariminutiline kuumutamine temperatuuril 96°C rakkude lõhkumiseks ning järgnes 2-4 minuti pikkune süntees temperatuuril 72°C, et kõik pooleliolevad fragmendid sünteesitaks lõpuni.

PCR Phusion HotStart polümeraasiga viisin läbi 35 tsüklit järgnevatel tingimustel:

1. DNA denaturatsioon 98°C 10 sekundit,
2. Praimerite seondumine matriitsile 56°C 30 sekundit,
3. DNA süntees 72°C 60 sekundit.

Tsüklitele eelnes 30 sekundiline kuumutamine temperatuuril 98°C rakkude lõhkumiseks ning järgnes 4-10 minuti pikkune süntees temperatuuril 72°C, et kõik pooleliolevad fragmendid sünteesitaks lõpuni.

2.2.4 Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmiidse DNA eralduseks kasutasin firma *Favorgen* plasmidi eralduse komplekti *Favorprep Plasmid Extraction Mini Kit*, järgides tootja protokollit.

2.2.5 Kloneerimine

Restriktsoonanalüüsi viisin läbi mahus 20 µl ning segu sisaldas firma *Thermo Scientific* 1 x FastDigest restriktsoonipuhvrit, kloonimisvektorit või kloonitavat DNA-d, 2,5 ühikut (U) restriктаasi ja lõppmahu viisin 20 µl-ni veega. Pärast restriktsooni töötlesin kloonimisvektorit firma *Thermo Scientific* 1 U aluselise fosfataasiga FastAP 15 minutit 37°C juures, et vältida vektori iseendaga kokku ligeerumist. Restriктаaside ja FastAP inaktiveerimiseks tegin reaktsioonisegule termotöötlus vastavalt tootja tingimustele. Seejärel toimus restriktsoonisegude sadestamine („Materjal ja metoodika“, peatükk [2.2.6](#)).

Restriktsoonfragmentide ligeerimiseks lahustasin sadestatud DNA vees ja valmistasin ligeerimisreaktsiooni segu. Ligeerimise viisin läbi mahus 15 µl ning segu sisaldas ligeeritavaid DNA-sid, firma *Thermo Scientific* 1 x T4 DNA ligeerimispuhvrit, 1 mM ATP-d ja firma *Thermo Scientific* 0,5 U T4 ligaasi. Reaktsiooni viisin läbi üleöö toatemperatuuril (21°C), misjärel toimus ligaasi inaktiveerimine 80°C 10 min ning ligaasisegu sadestamine („Materjal ja metoodika“, peatükk [2.2.6](#)). Sadestatud DNA lahustasin vees ja viisin elektroporatsiooniga bakterirakkudesse.

2.2.6 PCR produktide, restriktsoonanalüüsi ja ligaasireaktsiooni sadestamine

Sadestamiseks viisin reaktsioonisegu mahu veega 100 µl-ni, millele lisasin 2,5 mahtu 96% etanooli ja 1/10 mahtu 5 M NaCl. Sadenemine toimus vähemalt 10 minutit temperatuuril -20°C. Seejärel tsentrifuugisin (12000 x g) sademe 10 minuti jooksul 4°C juures põhja. Pesemiseks kasutasin 150 µl 80% etanooli ning kuivatasin DNA sademe 37°C juures.

2.2.7 Geelelektroforees

PCR produkte ja restriktsoonanalüüsi analüüsisin geelelektroforeesil. Selleks kandsin 5 µl PCR produkti või 20 µl restriktsoonisegu 1% agarosgeelile 1 x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. Vajadusel lisasin PCR produktile 4 µl foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutasin firma *Thermo Scientific* DNA markerit *ZipRuler Express DNA Ladder 1* või *ZipRuler Express DNA Ladder 2*. Elektroforeesi viisin läbi pingel 130-135 V ning DNA visualiseerisin UV valguses.

2.2.8 Sekveneerimine

Sekveneerimiseks töötlesin PCR produkte 2,5 U *E. coli* Exol ja 1 U aluselise fosfataasiga (FastAP) temperatuuril 37°C 30 minutit. Reaktsiooni peatamine toimus temperatuuril 80°C 15 minuti jooksul. Kasutades firma *Applied Biosystems BigDye Terminator v3.1* sekveneerimiskomplekti ja modifitseeritud kujul tootja protokoll, valmistasin ette sekveneerimisproovid. Reaktsioonisegu lõppmahuga 10 µl sisaldas 2 µl 5 x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂); 1,6 pmol praimerit; 0,7 µl premix'i (BigDye PR-100 mix v3.1); 1 µl sekveneeritavat PCR-i produkti ja vett lõppmahuni. Sekveneerimisreaktsiooni viisin läbi 30 tsükli järgnevatel tingimustel:

1. 15 sekundit temperatuuril 95°C,
2. 10 sekundit temperatuuril 55°C,
3. 45 sekundit temperatuuril 60°C.

Reaktsioonile järgnes DNA sadestamine, milleks lisasin segusse 2 µl dekstraani ja 30 µl 96% etanooli. Sadestamist viisin läbi temperatuuril -20°C 15 minutit. Seejärel tsentrifuugisin 4°C, 16100 g juures 10 minuti jooksul sademe põhja, pesin sadet kaks korda 150 µl 75% etanooliga ja lasin kuivada. DNA võtsin üles 10 µl-is 70% formamiidis ja säilitasin sekveneerimiseks temperatuuril -20°C. Kasutasin Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveneerimisteenust ja DNA sekveneeriti ABI PrismTM3730xl kapillaarsekvenaatoriga. Saadud järjestusi analüüsisin programmiga *Clustal Omega*.

2.2.9 *P. putida* rif-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine

Spontaansete mutatsioonide tuvastamiseks kasvavates *P. putida* rakkudes kasutasin rif resistentsete (Rif^R) kolooniate tekkel põhinevat testsüsteemi. Rif^R kolooniate teket võimaldavad spontaansed mutatsioonid *rpoB* geenis. Katseks kasvasin rakke kuus tundi glc-CAA söötmes temperatuuril 30°C aereerides kultuure loksutil (180 rpm) ning seejärel tegin bakterikultuurist 10⁵-kordse lahjenduse. Rakud jagasin 2,3 ml kaupa katseklaasidesse ning kasvasin 18-20 h temperatuuril 30°C, aereerides kultuure loksutil (180 rpm). Pärast 18-20 h kasvatamist plaatisin katseklaasidest 500 µl üleöö kultuuri rifampitsiini sisaldavale LB-söötmele ja inkubeerisin 48 h temperatuuril 30°C. Selektiivsöötmele tekkinud Rif^R kolooniaid loendasin kahel päeval.

Selleks, et mõõta Rif^R mutantide tekkesagedust, määrasin üleöö kultuurist ka elusrakkude arvukus. Selleks tegin rakukultuurist lahjenduste rea 1 x M9 puhvrissse ja tegin 5 µl tilkkülvi LB-tardsöötmele. Elusrakkude hulk 1 ml kultuuri kohta arvutasin välja, arvestades

tehtud lahjendust ja tekkinud kolooniate arvu. Rif^R mutantide tekkesageduse andsin 1 ml üleöö kultuuris elusrakkude kohta ja arvutasin ümber 10⁹ raku kohta. Erinevate tüvede omavahelise Rif^R tekkesageduse statistiliseks analüüsiks kasutasin Student'i T-testi.

2.2.10 Statsionaarse kasvufaasi mutatsioonide tekkesageduse määramine *P. putida* rakkudes plasmiidse pKT*pheA22TAG* ja pKT*pheA56+A* testsüsteemi abil

Selleks, et tuvastada mutatsioonisagedust nälgivas bakteripopulatsioonis, kasutasin plasmiidseid fenooli monooksügenaasi *pheA* geeni aktivatsioonil põhinevaid testsüsteeme. Plasmidi pKT240 on viidud *pheA* geen, mille 22.koodon (Leu) on asendatud stopp-koodoniga TAG (plasmiid pKT*pheA22TAG*) või on lisatud *pheA* geeni algusesse üks nukleotiid (plasmiid pKT*pheA56+A*) (Tegova jt, 2004). Seega nende testsüsteemi plasmiididega saab tuvastada asendus- või raaminihkemutatsioone, mis taastavad *pheA* geeni funktsionaalsuse.

Uuritavatesse bakteritüvedesse elektroporeerisin plasmidi pKT*pheA22TAG* või pKT*pheA56+A* ning baktereid kasvasin samamoodi nagu spontaansete mutatsioonide tuvastamisel rif-söötmele („Materjal ja meetoodika“, peatükk [2.2.9](#)). Kuuetunnisel ettekasvatusel oli glc-CAA söötmele lisatud ka plasmidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi penitsilliini (pen). Üleöö kasvanud kultuuridest plaatisin minimaaltassidele 500 µl rakke.

Minimaaltasside ainsaks süsinikuallikaks oli fenool. Fenooli tassidel suudavad üles kasvada vaid need rakud, kus enneaegne stopp-koodon *pheA* geenis on muteerunud või on taastunud *pheA* lugemisraam. Fenooli tassidel jälgisin kolooniate teket 10-14 päeva jooksul ning Phe⁺ revertantide tekkesageduse arvutasin nälgivas populatsioonis olevate elusrakkude kohta. Statistiliseks analüüsiks võrdlesin tüvesid Student'i T-testiga ning kasutasin Bonferroni korrigeerimist.

2.2.11 *P. putida* populatsiooni elumuse määramine fenool-minimaalsöötmele

Bakterirakkude elumuse määrasin kolooniaid moodustavate rakkude (CFU; ingl k – *colony-forming unit*) arvukuse alusel kogu nälgimisperioodi jooksul. Samadelt tassidelt, millel jälgisin Phe⁺ kolooniate teket, lõikasin steriilse 1 ml pipetiotsikuga välja agaritükk ning panin selle 1 ml 1 x M9 puhvrissi 30 minutiks loksuma 30°C juurde. Agaritüki väljalõikamisel vältisin Phe⁺ kolooniaid. 30 minuti pärast tegin agaritüki lahusest lahjendused ja kandsin need tilkkülvinas LB-penitsilliini tassile. CFU arvutamisel lähtusin sellest, et väljalõigatud agaritükk moodustab ca 1/100 kogu tassi pindalast. Arvestades LB-penitsilliini tassile tekkinud

kolooniate arvu, lahjendusfaktorit ja agaritüki suurust, arvutasin elusrakkude arv, kasutades järgmist valemit: **elusrakkude arv = (kolooniate arv • lahjendusfaktor) / 10⁻²**

2.2.12 Bakteripopulatsioonide analüüs läbivoolutsütomeetril

Läbivoolutsütomeetria abil uurisin rakke, mida oli värvitud firma *Thermo Scientific* LIVE/DEAD *BacLight* komplekti DNA-ga seonduvate fluorestseeruvate värvidega propiidiumjodiid (PI) ja SYTO9. SYTO9 fluorestseerub roheliselt ja suudab siseneda kõikidesse rakkudesse, PI fluorestseerub punaselt ja suudab siseneda vaid suurenenud membraani läbilaskvusega rakkudesse ning sel juhul varjestab SYTO9 fluorestsentsi. Analüüsides nende värvide suhet, on võimalik eristada erineva membraani läbilaskvusega alampopulatsioone. Läbivoolutsütomeeter võimaldab bakteripopulatsiooni analüüsida üksiku raku tasemel.

Proovide ettevalmistamiseks kasvasin rakke neli päeva temperatuuril 30°C fenooli (lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM) sisaldaval 10 x M9-CAA vesiagar tardsöötmel. Tassidelt pesin 1 x M9 puhvriga rakud maha ning lahjendasin filtreeritud 1 x M9 puhvrisse nii, et proovi OD₅₈₀ = 2,25. 75 µl-ile lahjendusele lisasin 3,75 µl värvisegu (3% SYTO9, 3% PI filtreeritud 1 x M9 puhvriss) ning lasin värvil mõjuda 30 minutit 30°C pimedas. Tulemusi analüüsisin programmiga *Flowing Software* 2.5.1.

2.2.13 *P. putida gacA*-komplementatsioonitüve *gacA+tacgacA* konstrueerimine

gacA-komplementatsioonitüve konstrueerimiseks amplifitseerisin 50x *P. putida* PaW85 kromosoomi lahjenduselt *gacA* geeni kasutades Phusion HotStart polümeraasi (praimerid *gacAstartHIII* ja *gacAstopSall*, praimerid on toodud lisas 1). *gacA* kloneerisin pBluescript II KS plasmidi ning kloneeritud *gacA* järjestust kontrollisin nii PCR-iga (praimerid *gacAstartHIII* ja *gacAstopSall*) kui sekveneerimisega.

Seejärel tõstsin pBluescript-KS-*gacA* plasmiidist *gacA* geeni *HindIII* ja *Sall* fragmendina *HindIII*-*Sall*-ga avatud pSEVA-lacI-tac vektorisse. Kloneeritud konstrukti kontrollisin PCR-iga (praimerid *prTac* ja *gacAstopSall*) ning restriksiooniga. Vektorist pSEVA-lacI-tac-*gacA* tõstsin lacI-tac-*gacA* geenikasseti *NotI*-fragmendina Tn7 minitransposooni koosseisu, avades *NotI*-ga minitransposooni sisaldava vektori pGP704L-Tn7(Gm^R). pGP704L-Tn7(Gm^R)-lacI-tac-*gacA* konstrukti kontrollisin nii PCR-iga (praimerid *gacAstartHIII* ja *gacAstopSall*) kui restriksiooniga.

P. putida PaW85*gacA::Sm* rakkudesse elektroporeerisin korraga kaks vektorit: pGP704L-Tn7(Gm^R)-lacI-tac-*gacA* vektori ja Tn7 transposaasi geeni järjestust kandev vektor puxBF13(Tn7*tnpA*). Pärast elektroporatsiooni kasvasin rakke kolm tundi 30°C juures ja

plaatisin Gm sisaldavale tardsöötmele. Järgmisel päeval ilmunud Gm^R kolooniatele tegin kontroll-PCR-i (praimerid Tn7glmS ja Tn7109R), et kinnitada lacI-tac-*gacA* geenikasseti kandva Tn7 minitransposooni sisenemine kromosoomis vahetult *glmS* geeni järgsesse alasse.

2.2.14 Endogeensete reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) detekteerimine *P. putida* rakkudes

Reaktiivsete hapnikuühendite tuvastamiseks kasutasin H₂DCFDA värvilahust ja Svenningsen jt. väljatöötatud meetodikat (Svenningsen jt., 2015). H₂DCFDA on rakumembraani läbiv ester, mida deatsetüleerivad rakkudes esteraasid. Tekkinud ühend (H₂DCF) on võimeline reageerima reaktiivsete hapnikuühenditega, muutudes roheliselt fluorestseeruvaks ühendiks 2,7-diklorofluorestsiniiks (DCF) (Rastogi jt, 2010).

Endogeense ROS-ide taseme määramiseks võtsin üleöö glc-CAA söötmes kasvanud vedelkultuuridest analüüsimiseks 1 ml (kolm paralleeli iga bakteritüve kohta) ja nälgivate rakkude analüüsimiseks pesin 2,5 mM fenool-minimaaltasside agarpinda kaks korda 1 ml 1 x M9-ga. Rakud tsentrifuugisin põhja 45 sek (12000 x g) ning võtsin üles 1 ml 1 x M9 puhvris. Proovidele lisasin 20 µl firma *Cayman Chemical* H₂DCFDA värvilahust (1 mg/ml, lahustatud DMSO-s), lasin sel mõjuda toatemperatuuril pimedas 30 minutit.

Seejärel tsentrifuugisin rakud põhja, pesin 1 x M9 puhvriga, tsentrifuugisin uuesti põhja ning võtsin üles 1 ml 1 x M9 puhvris. *Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol* mikrotiiterplaadile kandsin igast proovist 100 µl viies korduses ning mõõtsin rakukultuuri optilise tiheduse (OD₆₀₀) ja fluorestsentsi intensiivsuse (emissioon 525 nm ja ergastus 485 nm) kasutades *TECAN infinite M200 Pro* mikrotiiterplaadilugejat.

2.2.15 *P. putida* PaW85, *gacA::Sm* ja *gacS::Sm* rakkude mikroskopeerimine

Rakkude vaatlemiseks mikroskoobis kasvasin rakke 2,5 ml-s glc-CAA söötmes ning mikroskopeerisin rakutihedusel OD₅₈₀ = 1, seejärel 18.- ja 24.- kasvutunnil. 5 µl bakterikultuuri värvisin 5 µl PI/SYTO9 (3% SYTO9, 3% PI filtreeritud 1 x M9 puhvris) värvilahuse 100x lahjendusega. Minimaal-agartassilt lõikasin 1,5 x 1,5 cm tüki, kuhu tilgutasin 10 µl PI/SYTO9-ga värvitud bakterikultuuri ning lasin 10 minutit kuivada. Seejärel mikroskopeerisin 1000x suurendusega konfokaalmikroskoobiga.

2.2.16 *P. putida* PaW85, *gacA*::Sm ja *gacS*::Sm tüvede eksponentsiaalses- ja statsionaarses kasvufaasi täisproteoomide analüüs

P. putida PaW85, *gacA*::Sm ja *gacS*::Sm tüvede täisproteoomide analüüsi jaoks kasvasin rakke 2,5 ml-s glc-CAA söötmes 20 tundi. Seejärel mõõtsin optiline tihedus (OD_{580}) 10x lahjendusest ning inokuleerisin 50 ml glc-CAA söödet kultuuriga nii, et arvutuslikult $OD_{580} = 0,1$. Eksponentsiaalse kasvufaasi proteoomi analüüsi jaoks kasvasin baktereid 2,5 tundi loksutil (150 rpm) 30°C juures ($OD_{580} = 1$) ja statsionaarse kasvufaasi rakkude analüüsiks jätkasin rakkude kasvatamist kuni 24 tunnini ($OD_{580} = 5$). Seejärel tsentrifuugisin 4°C juures põhja 2 x 1,4 ml bakterikultuuri 4 minuti jooksul (6000 rpm) ning külmutasin sademe vedelas lämmastikus, kus hoidsin seda proovi analüüsimiseni. Igast bakteritüvest lasin analüüsida kolm proovi.

Tulemusi analüüsisin programmiga *Perseus* v2.0.3.0. Analüüsi teostasid paarikaupa, korraga võrdlesin alati ainult kahte tüve. Analüüsitava andmestikku jätsin vaid andmerekoodi, kus üks valk esines vähemalt kõigis ühe tüve proovides. Seejärel imputeerisin puuduvad väärtused normaaljaotusest, kasutades Tyanova jt. eeldusi, mille kohaselt puuduolevad väärtused võivad tuleneda valkude madalast ekspressioonitasemest (Tyanova jt., 2016). Viimaks viisin programmis läbi kahepoolse kahe valimi T-testi, millele rakendasin Benjamini-Hochberg'i korrigeerimist (valepositiivsete määr ehk FDR=0,05), mis minimeerib valepositiivseid väärtusi, ning kus p-väärtuseks on võetud 0,05.

2.3 Tulemused

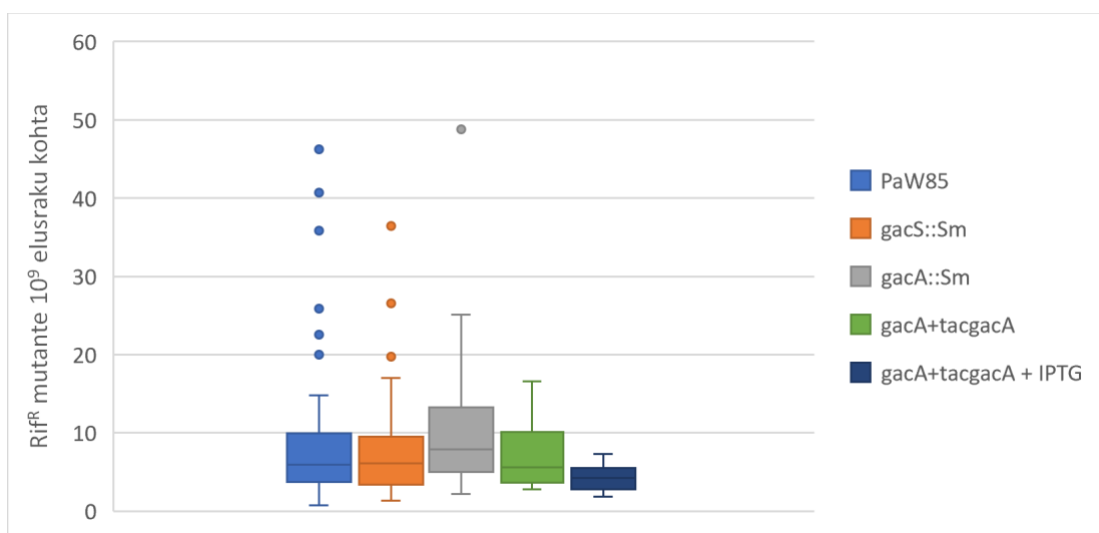
2.3.1 *GacS* – *GacA* signaalsüsteem ei mõjuta mutatsioonide teket *Pseudomonas putida* kasvavates rakkudes

Selleks, et hinnata *GacS*-*GacA* signaaliraja mõju spontaansete mutatsioonide tekkele kasvavates *P. putida* rakkudes, kasutasin rifampitsiini (rif) resistentsuse tekkel põhinevat Rif^R testsüsteemi. Rif on bakteritsiidse toimega antibiootikum, mis seondub RNA polümeraasi β -subühikuga ja seeläbi takistab RNA sünteesi. Spontaansed asendusmutatsioonid RNA polümeraasi β -subühikut kodeerivas *rpoB* geenis võimaldavad Rif^R kolooniate tekke kahe päeva jooksul pärast plaatimist rifampitsiini sisaldavale tardsöötmele.

Spontaansete mutantide teket kasvavates rakkudes hindasin *Pseudomonas putida* tüvedes PaW85, *gacS*::Sm, *gacA*::Sm, *gacA*+*tacgacA*. *P. putida* *gacA*-komplementatsioonitüve *gacA*+*tacgacA* tegemiseks viisin *P. putida* *gacA*-defektse tüve genoomi P_{tac} promootori ja *lacI*

repressori kontrolli all oleva *gacA* geeni („Materjal ja metoodika“, peatükk [2.2.13](#)) ning Rif^R mutantide teket võrdlesin nii IPTG-ga indutseeritud kui ka indutseerimata tingimustes.

Joonisel 6 esitatud tulemustest on näha, et võrreldes *P. putida* metsiktüvega PaW85 pole *gacS*::Sm, *gacA*::Sm ega ka *gacA* üleekspressiooni korral spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedus muutunud. Seega GacS-GacA signaalirada ei mõjuta mutantide tekkesagedust *P. putida* kasvavates rakkude.



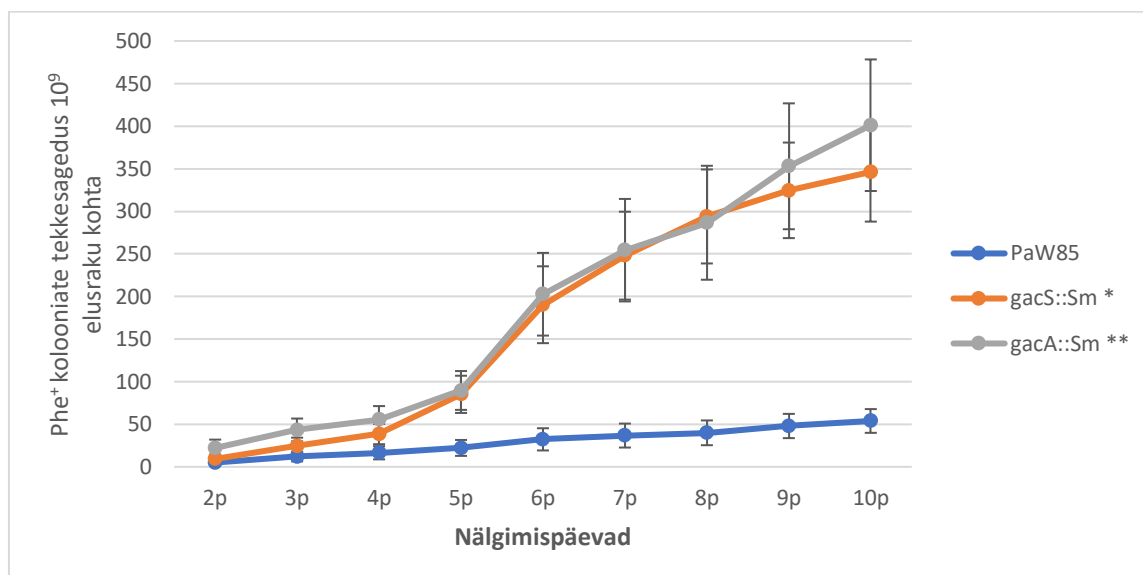
Joonis 6: Spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedus *P. putida* metsiktüves PaW85 ning *gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes, *gacA-tacgacA* tüves nii ilma kui 0,5 mM IPTG juuresolekul. Kastvurrud joonisel on esitatud iga tüve kohta kuni 48 sõltumatu kultuuri mediaan väärtused kuni kuuest sõltumatust katsest, mida tähistab kastis olev horisontaalne joon. Kast tähistab väärtuste ülemist (75%) ja alumist (25%) kvartiili. Iga tüve „vurrud“ tähistavad vähimat ja suurimat usutavat väärtust ning punktid erindeid.

2.3.2 GacS – GacA signaalsüsteem mõjutab mutatsioonide teket *Pseudomonas putida* statsionaarse kasvufaasi rakkudes

Statsionaarse kasvufaasi mutatsioonisageduse määramiseks kasutasin testsüsteeme, mis põhinesid plasmiididel pKT*pheA*22TAG ja pKT*pheA*56+A („Materjal ja metoodika“, peatükk [2.2.10](#)). Plasmidi pKT240 on viidud *pheA* geen, mille 22. koodon (Leu) on asendatud stopp-koodoniga TAG (plasmiid pKT*pheA*22TAG) või on lisatud *pheA* geeni algusesse üks lisanukleotiid (plasmiid pKT*pheA*56+A). Fenooli ainsa süsinikuallikana sisaldaval söötmel saavad kasvama hakata vaid need *P. putida* bakterirakud, kellel on toimunud vastava plasmidi *pheA* geenis kas asendus- või raaminihkemutatsioon. Statsionaarses kasvufaasis ehk nälgivas populatsioonis toimuvaid mutatsiooniprotsesse kirjeldavad alates kolmandast katsepäevast fenool-minimaal tassidel ilmunud Phe⁺ revertandid.

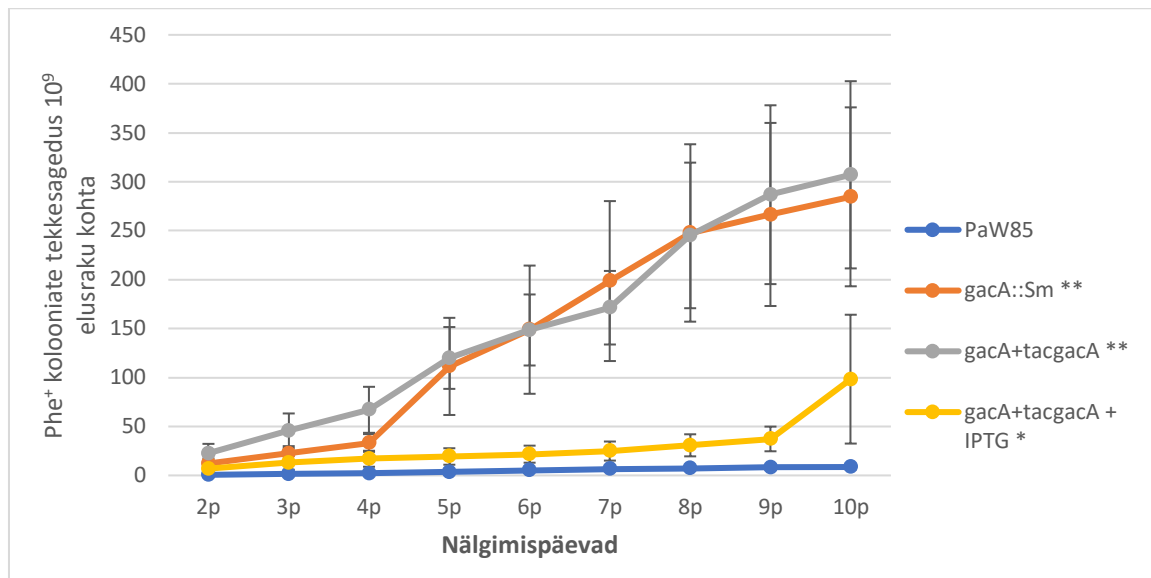
2.3.2.1 GacS - GacA signaalsüsteem mõjutab asendusmutatsioonide teket *Pseudomonas putida* nälgivates rakkudes

GacS-GacA signaaliraja osaluse uurimiseks asendusmutatsioonide tekkes *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes kasutasin pK*TpheA22TAG* testsüsteemi ja jälgin Phe⁺ revertantide teket *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes ning *gacA*-komplementatsioonitüves *gacA+tacgacA*. Joonisel 7 esitatud tulemustest on näha, et mõlemas *gac*-defektsetes tüves on mutatsioonisagedus suurem kui metsiktüvel. *P. putida gacS*-defektsetes tüves tekkis 10. päevaks Phe⁺ revertante võrreldes metsiktüvega kuus korda rohkem (Student'i T-testi p-väärtus 0,006) ja *gacA*-defektsetes tüves seitse korda rohkem (Student'i T-testi p-väärtus 0,004), millest saab järeldada, et GacS-GacA signaalirada osaleb GacA regulaatorvalgu vahendusel asendusmutatsioonide ärahoidmises *P. putida* nälgivates rakkudes.



Joonis 7: Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ kolooniate akumulatsioon 10 päeva jooksul *P. putida* metsiktüves PaW85, *gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes. Esitatud on iga tüve 30 sõltumatu kultuuri Phe⁺ mutantide arvu keskväärtused 10⁹ elusraku kohta koos 95%-usaldusintervallidega kolmest bioloogiliselt sõltumatust katsest. * tähistab võrdlust 10.päeva Phe⁺ kolooniate koguarvust metsiktüvega ning p-väärtust < 0,025, ** tähistab p-väärtust < 0,005.

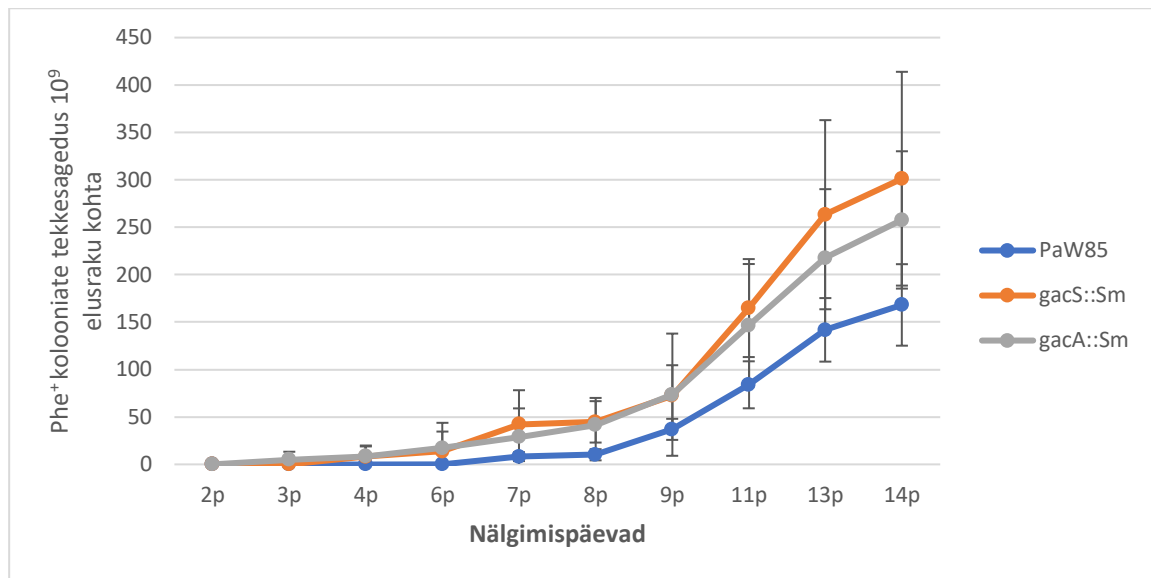
Joonisel 8 on esitatud Phe⁺ revertantide teke *P. putida gacA*-komplementatsioonitüves *gacA+tacgacA*. Tulemustest on näha, et *P. putida gacA+tacgacA* tüvi käitub võrreldavalt *gacA*-defektse tüvega, kuid *gacA* ekspressiooni induktsioon 0,5 mM IPTG-ga taastab selles tüves Phe⁺ revertantide teke metsiktüve tasemele (joonis 8).



Joonis 8: Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ kolooniate akumulatsioon 10 päeva jooksul *P. putida* metsiktüves PaW85, *gacA*-defektses tüves, *gacA+tacgacA*, 0,5 mM IPTG-ga indutseeritud *gacA+tacgacA* tüvedes. Esitatud on iga tüve kuni 30 sõltumatu kultuuri Phe⁺ mutantide arvu keskväärtused 10⁹ elusraku kohta koos 95%-usaldusintervallidega kolmest bioloogiliselt sõltumatust katsest. * tähistab võrdlust 10.päeva Phe⁺ kolooniate koguarvust metsiktüvega ning p-väärtust < 0,017, ** tähistab p-väärtust < 0,003.

2.3.2.2 GacS - GacA signaalsüsteem ei mõjuta raaminihkemutatsioonide teket *Pseudomonas putida* nälgivates rakkudes

GacS-GacA signaaliraja osaluse uurimiseks raaminihkemutatsioonide tekkes *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes kasutasin pKTpheA56+A testsüsteemi ja jälgisin Phe⁺ revertantide teket *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes ning metsiktüves PaW85. Gac-signaaliraja defektsetes tüvedes tekkis Phe⁺ revertante ligikaudu metsiktüvega võrreldavalt (joonis 9). Saadud tulemus näitab, et GacS-GacA signaalsüsteem ei mõjuta raaminihkemutatsioonide tekkesagedust *P. putida* nälgivates rakkudes.

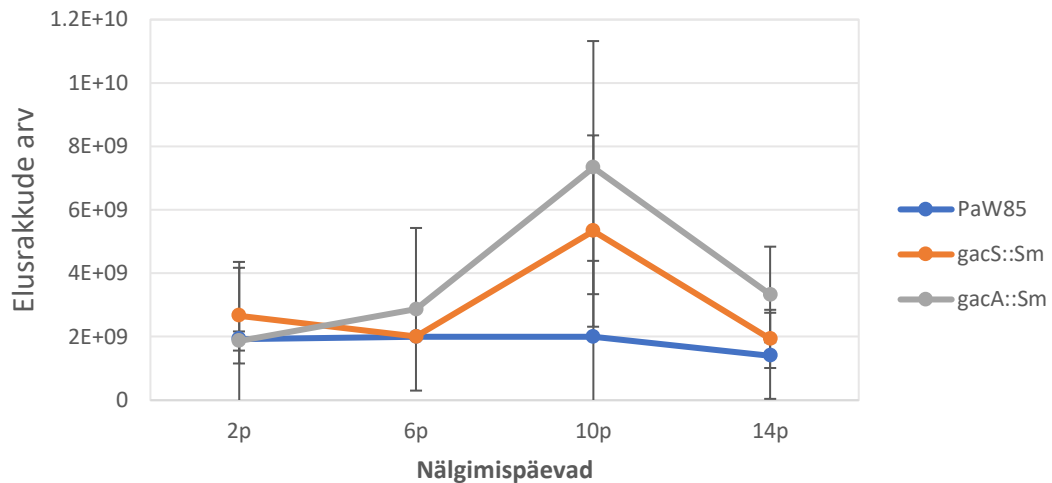


Joonis 9: Raaminihkemutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ kolooniate akumulatsioon 14 päeva jooksul *P. putida* metsiktüves PaW85, *gacS*- ja *gacA*-defektses tüves. Joonisel on esitatud iga tüve kuni 20 sõltumatu kultuuri Phe⁺ mutantide arvu keskväärtused 10⁹ elusraku kohta koos 95%-usaldusintervallidega kahest bioloogiliselt sõltumatust katsest.

2.3.2.3 GacS – GacA signaalsüsteemi defektsuse mõju *Pseudomonas putida* nälgivate rakkude elumusele ja morfoloogiale

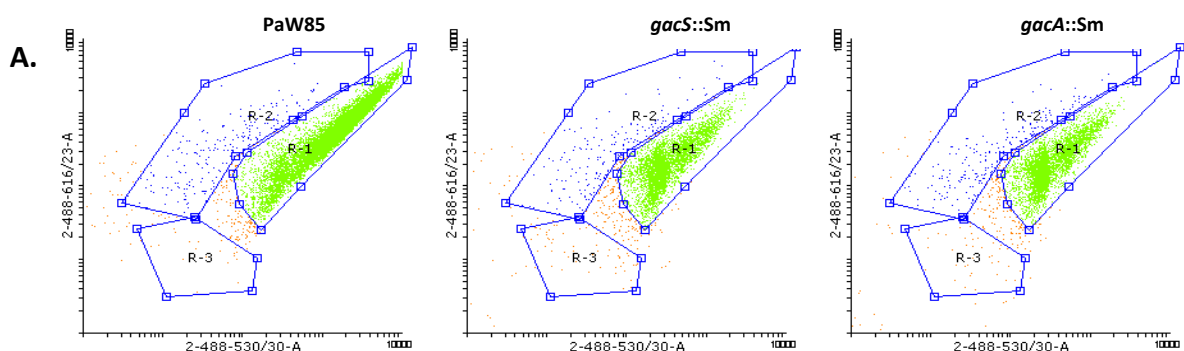
Selleks, et saada selgust, mis muutused toimuvad *P. putida* nälgivates rakkudes GacS-GacA signaaliraja defektsuse korral, vaatasin esmalt PaW85, *gacS::Sm*, *gacA::Sm* tüvede elumust 2,5 mM fenool-minimaalsöötmel 14 katsepäeva jooksul (joonis 10) ning analüüsisin neli päeva 2,5 mM fenool-minimaalsöötmel nälgunud rakke läbivoolutsütomeetriaga (joonis 11).

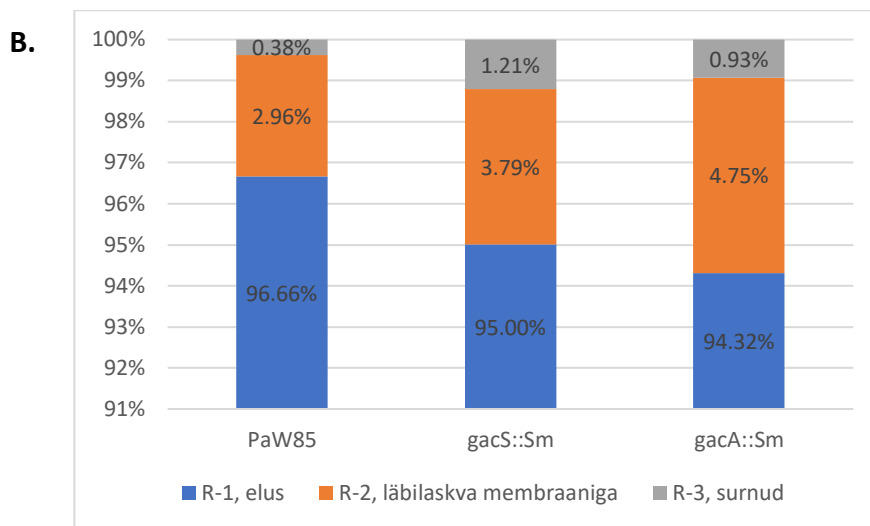
Joonise 10 tulemustest on näha, et 14 nälgimispäeva jooksul ei lange oluliselt *P. putida* PaW85 ega ka *gac*-defektsete tüvede elumus. Seega GacS-GacA signaalsüsteemi defektsus ei mõjuta fenool-minimaalsöötmel nälgivate rakkude elumust.



Joonis 10: *P. putida* tüvede PaW85 ja *gacS::Sm*, *gacA::Sm* elumus 2,5 mM fenool-minimaalsöötmel 14 nälgimispäeva jooksul. Joonisel on esitatud iga tüve kolme paralleeli elusrakkude keskvärtus koos 95%-usaldusintervallidega ühest katsest.

Selleks, et saada täpsemat ülevaadet elus ja surnud rakkude osakaaludest fenoolil nälgivates rakupopulatsioonides, analüüsisin *P. putida* metsiktüve ja *gac*-defektsete tüvede PI/SYTO9 värvilahusega värvitud rakke läbivoolutsütomeetriaga („Materjal ja meetoodika“, peatükk [2.2.12](#)). Tulemustest selgub, et *gac*-defektsed tüved ja *P. putida* wt rakupopulatsioonid on suhteliselt sarnased (joonis 11 A), kuid *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* tüvede populatsioonis on läbilaskva rakumembraaniga rakke ca kaks korda rohkem kui metsiktüve populatsioonis (joonis 11 B). Seega võib sellest tulemusest järeldada, et GacS-GacA signaaliraja defektsus mõjutab rakumembraani permeaablust fenoolil nälgides, kuid samas see *P. putida* rakkude elumust ei mõjuta.





Joonis 11: *P. putida* PaW85, *gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede rakupopulatsioonid pärast nelja päeva nälgimist 2,5 mM fenool-minimaaltassil, värvitud PI/SYTO9 värvilahusega. R-1 tähistab terve rakumembraaniga rakupopulatsiooni ehk elus rakke, R-2 tähistab läbilaskva membraaniga rakupopulatsiooni ja R-3 surnud rakupopulatsiooni. Katset on korratud ühe korra.

A. Joonistel on y-teljele märgitud propiidiumjodiidi fluorestsents ja x-teljele SYTO9 fluorestsents.

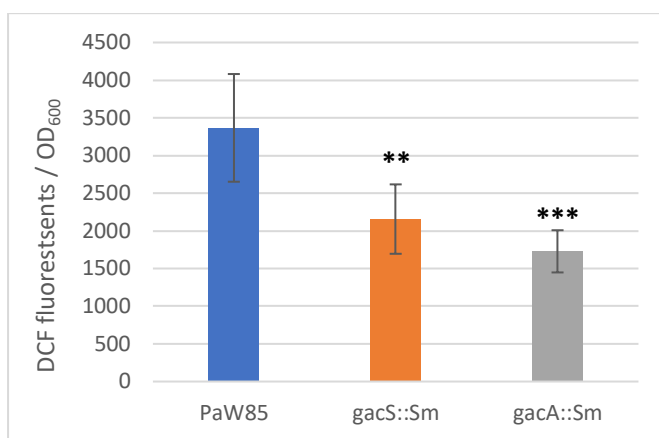
B. Joonisel on välja toodud tüvede rakupopulatsioonid, kus R-1, R-2 ja R-3 kokku moodustavad 100%.

Lisaks vaatasin *P. putida* PaW85, *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* tüvede rakke ka valgusmikroskoobi all ning värvisin PI/SYTO9 värvilahusega (LIVE/DEAD komplekt), kuid *gac*-defektsete tüvedes morfoloogias ei täheldanud erinevust metsiktüvest ([lisa 4](#), joonised 16 ja 17).

2.3.3 GacS – GacA signaalsüsteemi defektsus mõjutab *Pseudomonas putida* rakkudes endogeenset ROS-ide taset

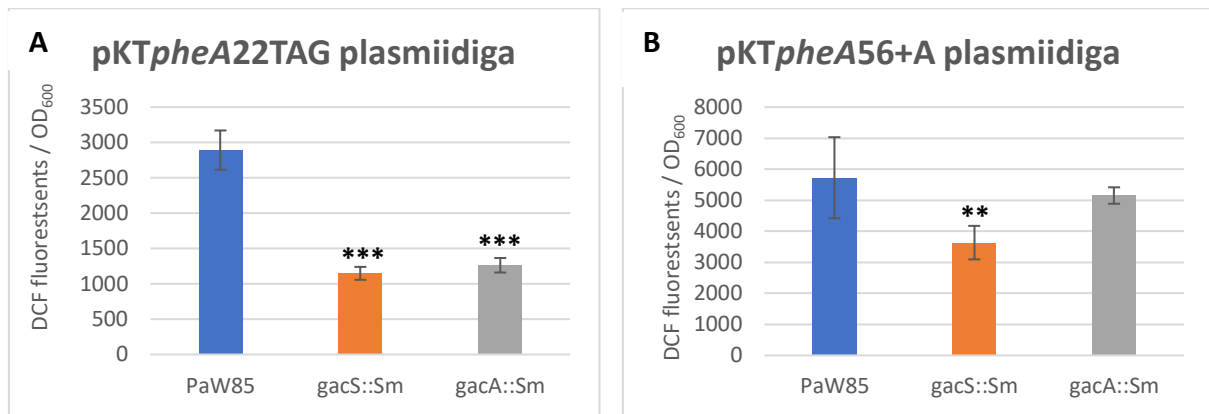
Varasemast kirjandusest on teada, et *Pseudomonas protegens* Pf-5 *gac*-defektsed tüved on tundlikud oksüdatiivse stressi suhtes (Whistler jt., 1998). Seetõttu määrasin endogeensete ROS-ide taset nii spontaansete rif mutantide kui Phe⁺ revertantide katse rakukultuuridest vahetult enne rakkude plaatimist selektiivsöötmel, kasutades Svenningsen jt. väljatöötatud meetodikat, („Materjal ja meetodika“, peatükk [2.2.14](#)). Selleks kasutasin H₂DCFDA värvilahust, mis on võimeline rakumembraani läbima ning ühendi deatsetüleeritud vorm, reageerides ROS-idega, muutub spektrofotomeetriliselt detekteeritavaks roheliselt fluorestseeruvaks ühendiks DCF.

Joonisel 12 esitatud tulemustest on näha, et *P. putida gacS::Sm* kui ka *gacA::Sm* tüvede üleöö glükoos-minimaalsöötmes CAA juuresolekul kasvanud rakkudes oli ROS-ide tase madalam kui metsiktüves (Student'i T-testi p-väärtused vastavalt 0,002 ja $1,24 \cdot 10^{-5}$).



Joonis 12: Endogeensete ROS-ide tase *P. putida* metsiktüves PaW85 võrreldes *gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvedega enne rifampitsiini sisaldavale söötmele plaatimist. Joonisel on toodud iga tüve viie tehnilise paralleeli keskmised väärtused kuni kuuest bioloogiliselt sõltumatust katsest, kus y-teljele on märgitud DCF keskmise fluorestsentsi intensiivsuse ja keskmise optilise tiheduse (OD₆₀₀) suhe koos 95%-usaldusintervallidega. ** tähistab võrdlust metsiktüvega ning p-väärtust < 0,005, *** tähistab p-väärtust < 0,0005.

Samuti mõõtsin ROS-ide taset plasmiidset testsüsteemi sisaldavates *P. putida* rakukultuurides enne rakkude plaatimist fenool-minimaalsöötmele. Joonisel 13 esitatud tulemustest selgus, et nii pKT*pheA22TAG* kui pKT*pheA56+A* testplasmiidiga *P. putida* metsiktüves on ROS-ide hulk tunduvalt suurem, kui *gacS*- või *gacA*-defektsetes tüvedes (Student'i T-testi p-väärtused pKT*pheA22TAG* plasmidi korral vastavalt $6,05 \cdot 10^{-18}$ ja $1,23 \cdot 10^{-16}$ ning pKT*pheA56+A* plasmidi korral *gacS::Sm* 0,0047). Seega vahetult enne rakkude plaatimist Rif^R ja Phe⁺ tekkesageduse määramise katsetes olid *P. putida gac*-defektsetes tüvedes endogeensete ROS-ide tase 1,1-2,5 korda madalam kui metsiktüves PaW85.



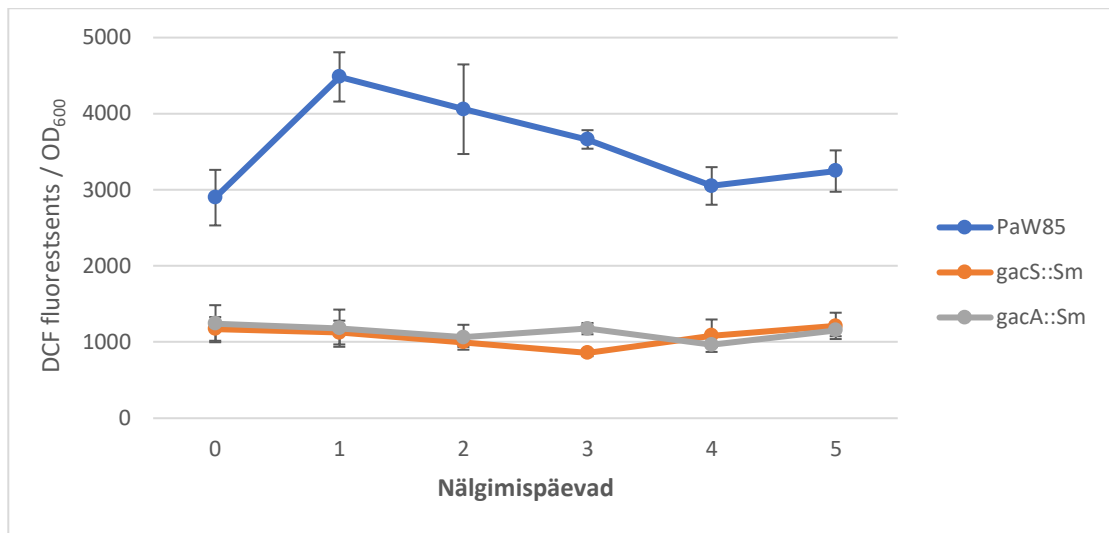
Joonis 13: Endogeensete ROS-ide tase plasmiidse testsüsteemiga *P. putida* tüvedes enne fenool-minimaalsöötmel plaatumist. Joonise A osal on pKTpheA22TAG plasmiidiga ja joonise B osal pKTpheA56+A plasmiidiga *P. putida* metsiktüve PaW85 ning *gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede ROS-ide tasemed. ** tähistab võrdlust metsiktüvega ning p-väärtust < 0,005, *** tähistab p-väärtust < 0,0005.

A. Joonisel on esitatud 10 tehnilise paralleeli DCF fluorestsentsi intensiivsuse ja kultuuri optilise tiheduse (OD₆₀₀) suhe kolmest bioloogiliselt sõltumatust katsest koos 95%-usaldusintervallidega.

B. Joonisel on esitatud kuni kaheksa tehnilise paralleeli DCF fluorestsentsi intensiivsuse ja kultuuri optilise tiheduse (OD₆₀₀) suhe ühest bioloogiliselt sõltumatust katsest koos 95%-usaldusintervallidega.

2.3.3.1 *Pseudomonas putida* *gac*-defektsete tüvede ROS-ide tasemed viie nälgimispäeva jooksul ei muutu

Kuna *P. putida* *gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes suureneb Phe⁺ mutantide arv rakkude pikema-ajalisel nälgimisel alates viiendast nälgimispäevast (joonised 7 ja 8), siis tekkis küsimus, kas ROS-ide kuhjumine viie nälgimispäeva jooksul võib olla tõusnud Phe⁺ mutantide tekkesageduse põhjuseks. Selleks mõõtsin 2,5 mM fenooli tassidel nälgivate PaW85, *gacS*::Sm ja *gacA*::Sm tüvede rakkudest endogeensete ROS-ide taset viie nälgimispäeva jooksul („Materjal ja meetodika“, peatükk [2.2.14](#)). Jooniselt 14 on näha, et *gac*-defektsete tüvede ROS-ide tase on tunduvalt madalam kui *P. putida* wt oma ning viie päeva jooksul ei toimu märgatavat ROS-ide taseme muutust. Seega ei ole *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes nälgivas rakupopulatsioonis mutatsioonisageduse tõusu taga oksüdatiivne stressivastus.



Joonis 14: ROS-ide taseme muutus 2,5 mM fenoolil nälgides viie päeva jooksul. x-teljele on märgitud nälgimispäevad ning y-teljele iga kultuuri viie tehnilise paralleeli DCF fluorestsentsi intensiivsuse ja kultuuri optilise tiheduse (OD_{600}) suhe kahest bioloogiliselt sõltumatust katsest koos standardhällbega.

2.3.4 *Pseudomonas putida* PaW85 ja *gacS*- ning *gacA*-defektsete tüvede täisproteoomide analüüs

Selleks, et saada teada, millised valgud on erinevalt ekspresseeritud *gac*-defektsetes tüvedes võrreldes *P. putida* metsiktüvega PaW85, tegin PaW85, *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* tüvedele täisproteoom analüüs („Materjal ja metoodika“, peatükk [2.2.16](#)) eksponentsiaalsest ja statsionaarsest kasvufaasist. Edasiseks analüüsiks valisin proteoomist välja valgud, mille tase oli statistiliselt oluliselt erinev metsiktüve valgutasemest ning seejärel vaatasin neid valke, mille tase oli muutunud neli või enam korda võrreldes metsiktüvega.

2.3.4.1 *Pseudomonas putida* PaW85, *gacA::Sm* ja *gacS::Sm* eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest täisproteoomide analüüs

Ekspponentsiaalse kasvufaasi täisproteoomist on näha vaid valke, mis on *P. putida gac*-defektsetes tüvedes alla reguleeritud või on neid mutantide rakkudes vähem. Valke, mis olid *gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes sarnaselt alla reguleeritud, kuid erinesid metsiktüve valgutasemest, oli kokku 26 ning on toodud tabelis 2, joonisena [lisas 5](#).

Tabel 2: *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede eksponentsiaalse kasvufaasi valgud, mis on metsiktüvega võrreldes vähemalt neli korda alla reguleeritud. Samasse operoni kuuluvad geenid on märgitud sama värviga.

Geen	Valgu nimi	Muutus tüves <i>gacS</i> võrreldes <i>wt</i> (kordades)	Muutus tüves <i>gacA</i> võrreldes <i>wt</i> (kordades)
<i>PP_0173</i>	Oletatav transkriptsioonifaktor	-5,00	-4,89
<i>PP_1245</i>	SH3b domeeni sisaldav valk	-6,88	-7,04
<i>PP_1246</i>	Kirjeldamata valk	-10,68	-10,17
<i>PP_1659</i>	Kirjeldamata valk	-9,41	-7,39
<i>PP_2007</i>	p-47 sarnane valk	-4,36	-5,67
<i>PP_2170</i>	Khorsimaadi mutaas	-5,36	-5,65
<i>PP_2258</i>	Sensor-domeeniga valk	-6,00	-6,27
<i>PP_2359</i>	Oletatav tüüp 1 piili valgu subühik CsuA/B	-4,74	-4,33
<i>PP_3089</i>	Kirjeldamata valk	-4,39	-4,17
<i>PP_3775</i>	Oletatav sarkosiini oksüdaas	-5,12	-5,44
<i>PP_3808</i>	Antibiootikumi sünteesi valk MbtH	-7,33	-7,42
<i>PP_4218</i>	Lipaasi/esteraasi perekonna valk	-5,29	-4,89
<i>PP_4222</i>	Oletatav SyrP valk	-5,85	-6,89
<i>PP_4364</i>	Oletatav anti-sigma faktori F antagonist	-6,78	-7,53
<i>PP_4834</i>	SPFH domeen/ Band 7 perekonna valk	-4,13	-4,32
<i>PP_5451</i>	Kirjeldamata valk	-4,46	-5,28
<i>PP_5467</i>	Kirjeldamata valk	-7,68	-7,63
<i>PP_5641</i>	Kirjeldamata valk	-4,83	-4,20
<i>proC</i>	Pürroliin-5-karboksüülreduktaas	-8,25	-7,06
<i>pvdA</i>	L-ornitiin-5-monooksügenaas	-9,61	-8,16
<i>pvdH</i>	Diaminobutüraat-2- oksüglutaraadi transaminaas	-9,31	-8,73
<i>pvdL</i>	Ferribaktiini süntaasi subühik	-7,40	-7,01
<i>pvdM</i>	Oletatav dipeptidaas	-5,66	-6,68
<i>pvdN</i>	Püoverdiini biosünteesiga seotud valk	-5,02	-4,83
<i>pvdO</i>	Püoverdiini biosünteesiga seotud valk	-6,73	-6,28
<i>pvdQ</i>	Atsüül-homoseriin laktooni atsülaas pvdQ	-5,50	-5,39

P. putida PaW85, *gacS*-ja *gacA*-defektsete tüvede eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude võrdlusest selgus, et mitmed hüpoteetilised, oletatava funktsiooniga ning metabolismiga seotud valgud on alla reguleeritud *gac*-defektsetes tüvedes. Samuti on näha, et siderofoori püoverdiini (*pvdN* ja *pvdO*) tootmine on Gac-signaalsüsteemi defektsuse korral häiritud. *Gac*-defektsetes tüvedes on püoverdiinid alla reguleeritud 4,8-6,7 korda võrreldes *P. putida* metsiktüvega PaW85.

2.3.4.2 *Pseudomonas putida* PaW85, *gacA::Sm* ja *gacS::Sm* statsionaarse kasvufaasi täisproteoomide analüüs

Kuna mutatsioonisageduses on näha erinevusi *P. putida* *gac*-defektsete tüvede ja metsiktüve vahel statsionaarses kasvufaasis, siis uurisin täpsemalt statsionaarse kasvufaasi täisproteoomi. Ka sel juhul olid *gac*-defektsetes tüvedes enamus valkudest alla reguleeritud, kuid leidis ka üles reguleeritud valke, mis erinesid metsiktüve valgutasemest (tabel 3, [lisa 6](#)).

Tabel 3: *P. putida* *gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede statsionaarses kasvufaasis valgud, mis on metsiktüvega võrreldes vähemalt neli korda üles- või alla reguleeritud. Samasse operoni kuuluvad geenid on märgitud sama värviga.

Geen	Valgu nimi	Muutus tüves <i>gacS::Sm</i> võrreldes wt (kordades)	Muutus tüves <i>gacA::Sm</i> võrreldes wt (kordades)
<i>bioB</i>	Biotiini süntaas	+7,68	+8,27
<i>ligB</i>	DNA ligaas B	+5,52	+5,16
<i>PP_0207</i>	Nitraadi transporter	+6,46	+6,74
<i>PP_2097</i>	Sensor-domeeniga valk	+4,75	+7,28
<i>PP_2765</i>	Sulfonaadi monooksügenaas, MsuD	+4,48	+4,35
<i>PP_3562</i>	Hüdrolaas 2 domeeni sisaldav valk	+6,91	+5,77
<i>PP_0173</i>	Oletatav transkriptsioonifaktor	-4,03	-5,89
<i>PP_0203</i>	Oletatav dipeptidaas	-5,75	-5,44
<i>PP_0574</i>	LuxR perekonna vastuseregulaator	-5,95	-6,13
<i>PP_0806</i>	Pinnaadhesiooni valk LapF	-9,16	-10,53
<i>PP_1154</i>	Sensor-domeeniga valk	-5,38	-5,51
<i>PP_1245</i>	SH3b domeeni sisaldav valk	-5,75	-4,25
<i>PP_1246</i>	Kirjeldamata valk	-5,43	-5,29
<i>PP_1659</i>	Kirjeldamata valk	-10,66	-12,56
<i>PP_1660</i>	Kirjeldamata valk	-9,90	-8,90
<i>PP_1661</i>	Oletatav dehüdrogenaasi subühik	-14,15	-14,03

PP_2006	Kirjeldamata valk	-15,54	-14,70
PP_2007	p-47 sarnane valk	-12,67	-14,15
PP_2357	Oletatav tüüp 1 piili valk CsuB	-5,13	-5,42
PP_2358	Oletatav tüüp 1 piili valgu subühik CsuA/B	-5,32	-5,55
PP_2359	Oletatav tüüp 1 piili valgu subühik CsuA/B	-4,45	-4,64
PP_2942	Vastuse regulaator	-7,00	-6,85
PP_2943	Oletatav tsütokroom c551 peroksüdaas	-4,40	-4,25
PP_2945	Histidiini kinaas	-6,29	-6,81
PP_3019	Süsinik-lämmastik hüdrolaasi perekonna valk	-5,25	-5,16
PP_3089	Kirjeldamata valk	-4,85	-4,92
PP_3100	Kirjeldamata valk	-4,77	-4,71
puuD	Urikaas/uraadi oksüdaas	-10,46	-10,46
PP_3638	Oletatav Acyl-CoA dehüdrogenaas	-5,56	-5,85
PP_3775	Oletatav sarkosiini oksüdaas	-9,15	-8,73
proC	Pürroliin-5-karboksülaadi reduktaas	-6,04	-5,76
PP_4100	Cro/Ci perekonna transkriptsiooniregulaator	-4,30	-4,74
PP_4362	HPT domeeni sisaldav valk	-5,05	-4,58
PP_4363	Sensor histidiin kinaas / vastuseregulaator	-7,70	-7,56
PP_4364	Oletatav anti-sigma faktori F antagonist	-5,30	-4,91
PP_4959	Diguanülaadi tsüklaas	-7,33	-8,61
PP_5008	Polügraanulitega seotud valk	-4,32	-5,46
PP_5451	Kirjeldamata valk	-8,67	-7,91
PP_5516	Kirjeldamata valk	-6,26	-5,51
PP_5531	Kirjeldamata valk	-5,13	-4,82
PP_5641	Kirjeldamata valk	-4,47	-4,08
PP_5643	Kirjeldamata valk	-4,04	-4,29

P. putida *gac*-defektsete tüvede puhul on märgata mitmeid piilide valke kodeerivaid geene (*PP_2357*, *PP_2358*, *PP_2359*), mis on alla reguleeritud ca viis korda võrreldes metsiktüvega. Samuti on *gac*-defektsetes tüvedes võrreldes metsiktüvega alla reguleeritud ca 10 korda pinna-adhesiooni valk LapF. Nende valkude madalam ekspressioonitase viitab

sellele, et *P. putida gac*-defektsetes tüvedes on häiritud piili-tõmbumine ning samuti biofilmi süntees.

2.3.4.3 *Pseudomonas putida* PaW85, *gacA::Sm* ja *gacS::Sm* statsionaarse ja eksponentsiaalse kasvufaasi täisproteoomide analüüsi võrdlus

Kui võrdlesin omavahel *P. putida gacS::Sm* ja *gacA::Sm* eksponentsiaalse ja statsionaarse kasvufaasi täisproteoomi, siis on näha 12 valgu geenid, mis olid alla reguleeritud mõlemas kasvufaasis (tabel 4). Eriti jääb silma PP_2007 valk, mille tase mõlemas *gac*-defektsetes tüves on statsionaarses kasvufaasis veel ligi kolm korda vähenenud võrreldes eksponentsiaalse kasvufaasiga.

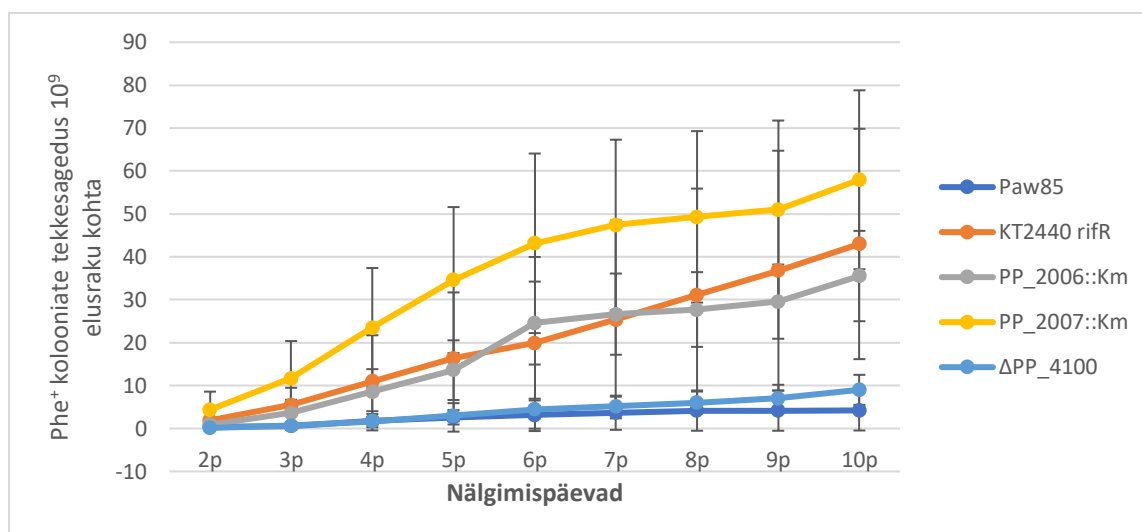
Tabel 4: *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede statsionaarse ja eksponentsiaalse kasvufaasi valgud, mis on metsiktüvega võrreldes vähemalt neli korda alla reguleeritud. Samasse operoni kuuluvad geenid on märgitud sama värviga.

Geen	Valk	Muutus tüves <i>gacS::Sm</i> võrreldes <i>wt</i> (kordades)		Muutus tüves <i>gacA::Sm</i> võrreldes <i>wt</i> (kordades)	
		Eksp. kasvufaasis	Stats. kasvufaasis	Eksp. kasvufaasis	Stats. kasvufaasis
<i>PP_0173</i>	Oletatav transkriptsioonifaktor	-5,00	-4,03	-4,89	-5,89
<i>PP_1245</i>	SH3b domeeni sisaldav valk	-6,88	-5,75	-7,04	-4,25
<i>PP_1246</i>	Kirjeldamata valk	-10,68	-5,43	-10,17	-5,29
<i>PP_1659</i>	Kirjeldamata valk	-9,41	-10,66	-7,39	-12,56
<i>PP_2007</i>	p-47 sarnane valk	-4,36	-12,67	-5,67	-14,15
<i>PP_2359</i>	Oletatav tüüp 1 piili valgu subühik CsuA/B	-4,74	-4,45	-4,33	-4,64
<i>PP_3089</i>	Kirjeldamata valk	-4,39	- 4,85	-4,17	-4,92
<i>proC</i>	Pürroliin-5-karboksülaadi reduktaas	-8,25	-6,04	-7,06	-5,76
<i>PP_3775</i>	Oletatav sarkosiini oksüdaas	-5,12	-9,15	-5,44	-8,73
<i>PP_4364</i>	Oletatav anti-sigma faktori F antagonist	-6,78	-5,30	-7,53	-4,91
<i>PP_5451</i>	Kirjeldamata valk	-4,46	-8,67	-5,28	-7,91
<i>PP_5641</i>	Kirjeldamata valk	-4,83	-4,47	-4,20	-4,08

2.3.5 *Pseudomonas putida* PaW85, KT2440Rif^R, PP_2006::Km, PP_2007::Km, ΔPP_4100 spontaansete mutatsioonide teke statsionaarses kasvufaasis

Kuna *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes on näha mutatsioonisageduse tõusu statsionaarses kasvufaasis, siis analüüsisin täpsemalt *P. putida*, *gacS*::Sm ja *gacA*::Sm tüvede statsionaarse kasvufaasi proteoomanalüüsi. Tabelist 3 on näha, et *gac*-defektsetes tüvedes on võrreldes *P. putida* metsiktüvega kõige tugevamalt alla reguleeritud valgud PP_2006 ja PP_2007. Samuti on *gac*-defektsetes tüvedes alla reguleeritud Cro/Ci perekonna transkriptsioonifaktor PP_4100. Kuna mainitud kolme geeni *P. putida* mutandid on meie laboris olemas, siis vaatasin nende valkude osalust mutatsioonisageduse tõusus.

Valkude PP_2006, PP_2007 ja PP_4100 osaluse uurimiseks asendusmutatsioonide tekkes *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes, kasutasin pKT*pheA*22TAG testsüsteemi („Materjal ja meetodika“, peatükk [2.2.10](#)) ja jälgisin Phe⁺ revertantide teket *P. putida* KT2440Rif^R PP_2006 ja PP_2007 defektsetes tüvedes ning PaW85 PP_4100 deletsioontüves, mis on kingitud Juan L. Ramos'elt Rita Hõrakule. Joonisel 15 esitatud tulemusest on näha, et võrreldes *P. putida* metsiktüvega KT2440Rif^R ei ole PP_2006::Km ega PP_2007::Km tüvedes mutatsioonisagedus muutunud. Samuti ei ole tüves ΔPP_4100 muutunud mutatsioonisagedus võrreldes *P. putida* metsiktüvega PaW85. Seega võib järeldada, et *gac*-defektsete tüvede mutatsioonisageduse tõusu ainupõhjuseks pole PP_2006, PP_2007 ega PP_4100 valkude puudumine.



Joonis 15: Asendusmutatsioonide tekkesagedus *P. putida* metsiktüvedes PaW85 ja KT2440Rif^R ning vastavalt nende deletsioontüves ΔPP_4100 ja PP_2006::Km, PP_2007::Km katkestustüvedes 10 nälgimispäeva jooksul. Joonisel on esitatud iga tüve 15 sõltumatu kultuuri Phe⁺ mutantide arvu keskväärtused 10⁹ elusraku kohta koos 95%-usaldusintervallidega kahest bioloogiliselt sõltumatust katsest.

3. Arutelu

Varasemalt on meie laboris näidatud, et *gacS*-defektsus tõstab mutatsioonisagedust eelkõige *P. putida* statsionaarse kasvufaasi rakkudes (Tagel jt., 2016), kuid Gac-signaalsüsteemi regulaatori GacA mõju mutatsioonisagedusele antud töös ei uuritud. Samuti ei tehtud kindlaks, kuidas Gac-signaalsüsteem võiks mõjutada mutatsioonisagedust, kuid spekuleeriti, et see võib toimida läbi langenud RpoS-i taseme *gacS*-defektses tüves. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli kindlaks teha, kas Gac-signaalsüsteemi efekt *P. putida* mutatsioonisagedusele toimib signaaliraja regulaatorvalgu GacA vahendusel ning samas proovida välja selgitada põhjused, miks *gac*-defektsetes *P. putida* tüvedes suureneb mutatsioonisagedus statsionaarses kasvufaasis.

Esmalt analüüsisin spontaansete mutatsioonide tekkimist *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede kasvavates rakkudes kasutades Rif^R kolooniate tekkel põhinevat testsüsteemi. Kui varasemalt olid Tagel jt. (2016) näidanud, et *gacS*-defektsus mõjutab ligikaudu kaks korda Rif^R kolooniate tekkesagedust eksponentsiaalses kasvufaasis (Tagel jt., 2016), siis käesolevas töös see efekt kinnitust ei leidnud. Leidsin, et *P. putida* kasvavates rakkudes *gacS*- ega ka *gacA*-defektsus spontaansete mutatsioonide teket ei mõjuta (joonis 6). Samuti ei mõjuta *gacA* üle-ekspressioon *P. putida* kasvavate rakkude mutatsioonisagedust (joonis 6). Samas statsionaarse kasvufaasi mutageneesi analüüsimisest selgus, et Gac-signaalsüsteem on oluline *P. putida* rakkudes asendusmutatsioonide ärahoidmises (joonis 7) ning raaminihkemutatsioonide teket ei mõjuta (joonis 9). Spontaansete asendusmutatsioonide tekkesagedus oli *P. putida gacS*-defektses tüves 6,4 korda kõrgem kui metsiktüves PaW85, mis on kooskõlas Tagel ja kolleegide tulemustega (Tagel jt., 2016). *gacA*-defektses tüves oli mutatsioonisagedus 7,5 korda kõrgem kui *P. putida* metsiktüves. Kuna mutatsioonisagedus on nii *gacS*- kui ka *gacA*-defektses tüves suurenenud võrreldes *P. putida* metsiktüvega, viitab see, et efekt mutatsioonisagedusele toimib läbi signaalsüsteemi regulaatorvalgu GacA. *P. putida gacA*-defektses tüves *gacA* geeni üle-ekspressioneerides on näha, et spontaansete asendusmutatsioonide tekkesagedus langeb *P. putida* metsiktüve mutatsioonide tasemeni (joonis 8). Seetõttu võib väita, et GacA on *P. putida* rakkudes oluline asendusmutatsioonide ärahoidmises.

Kui analüüsisin *gac*-defektsete tüvede eksponentsiaalse kasvufaasi proteoomi, siis metsiktüvest neljakordse erinevusega tulid välja vaid alla reguleeritud valgud (tabel 2 ja [lisa 5](#)). Leidsin, et *gacS*- ja *gacA*-defektsetes *P. putida* tüvedes on alla reguleeritud mitmed teadmata funktsiooniga ning metabolismiga seotud valgud, nende hulgas näiteks

transkriptsioonifaktor *PP_0173*, oksüdaas *PP_3775*, püoverdiinid *pvdN* ja *pvdO*. Kuigi kasvavates *gac*-defektsetes *P. putida* rakkudes ei ole muutunud spontaansete mutatsioonide tekkesagedus võrreldes metsiktüvega PaW85, ei tähenda see, et alla reguleeritud valgud ei võiks mõjutada mutatsioonisagedust statsionaarses kasvufaasis. Näiteks transkriptsioonifaktor *PP_0173*, mis on alla reguleeritud eksponentsiaalses faasis, on alla reguleeritud ka statsionaarses kasvufaasis võrreldes metsiktüvega (tabel 4). Samuti on nii eksponentsiaalses kui ka statsionaarses kasvufaasis alla reguleeritud valk *PP_2007*. *Gac*-defektsetes *P. putida* tüvedes on eksponentsiaalses kasvufaasis alla reguleeritud *PP_2007* ca neli korda, ning statsionaarses kasvufaasis 12 korda (tabel 4). Mutatsioonisagedus *gac*-defektsetes tüvedes on statsionaarses kasvufaasis suurenenud võrreldes *P. putida* metsiktüvega, seega võidakse mõnda valku reguleerida alla juba eksponentsiaalses kasvufaasis, kuid selle mõju mutatsioonisagedusele ilmneb alles statsionaarses kasvufaasis.

Valgusmikroskoobis vaadeldud PaW85, *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* statsionaarse kasvufaasi rakud olid sarnase kujuga – rakud olid ümarad ja võrreldes eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudega väiksemad. Kuna rakud olid värvitud PI/SYTO9 värvilahusega, oli võimalik visuaalselt määrata elus ja surnud rakkude proportsioonid. Sellisel juhul sarnanesid *gac*-defektsed tüved *P. putida* metsiktüvega PaW85 (lisa 4, joonised 16 ja 17). Kui aga hindasin rakupopulatsioone üksikraku tasemel läbivoolutsütomeetriaga, siis oli märgata, et fenool-minimaaltasside pinnalt pestud *gac*-defektsetes tüvedes on suurenenud läbilaskva membraaniga rakkude hulk (joonis 11A ja 11B). Fenool on biotsiidse toimega ühend, mis on võimeline muutma bakterimembraani funktsiooni, kuna lahustub membraanis ja muudab rasvhapete konformatsiooni (Sikkema jt., 1995). Samas on kirjanduses näidatud, et *P. fluorescens*-i *gac*-defektsel tüvel oli laboritingimustes kasvueel (Bull jt., 2001). Kasvueel võib olla tingitud läbilaskvamast rakumembraanist, mis võimaldab toitaineid ümbritsevast keskkonnast kiiremini ning efektiivsemalt omastada. Seega *P. putida* *gac*-defektsete tüvede suurenenud membraani läbilaskvuse põhjuseks ei pruugi olla fenooli toksiline mõju, vaid siiski Gac-valkude puudumine. Tabelist 3 on näha, et statsionaarses kasvufaasis on *P. putida* *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* tüves biofilmi moodustamisega seotud valk LapF ca 10 korda alla reguleeritud. Membraani läbilaskvus *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* tüvel võib tuleneda seega ka LapF madalast ekspressioonitasemest. LapF on ekstratsellulaarne, biofilmi moodustamisel oluline struktuurivalk, mida GacS-GacA signaalsüsteem reguleerib (Martinez-Gil jt., 2014). Samuti on näidatud, et LapF valgu puudumine muudab *Pseudomonas putida* rakupinna hüdrofoobsemaks kui on metsiktüve rakupind (Lahesaare jt., 2016).

Whistler ja kolleegid (1998) näitasid, et *Pseudomonas protegens* Pf-5 tüves reguleerib GacS-GacA kahekomponentne signaalsüsteem hilises statsionaarses kasvufaasis kuhjuvat alternatiivset RNA polümeraasi σ -faktorit RpoS-i (Whistler jt., 1998). Üldises stressivastuses oluline RpoS aktiveerib muuhulgas näiteks ka SOS-vastuses osaleva vigadealt DNA polümeraasi Pol IV (Foster, 2005; Foster, 2007; Matic, 2016). RpoS ja GacS omakorda represserivad DNA reparatsioonis osalevat MutS valku (van der Broek jt., 2005). Varasemalt on kirjanduses näidatud, et RpoS-i puudumisel suureneb nälgivates *P. putida* PaW85 rakkudes asendusmutatsioonide tekkesagedus 50 korda võrreldes metsiktüvega (Tarassova jt., 2008). Seetõttu võib nälgivates *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes suurenenud asendusmutatsioonide tekkesageduse põhjuseks olla RpoS-i madal ekspressioonitase või madal RpoS valgu hulk. Seepärast vaatasin täisproteoomidest saadud andmetest nii RpoS-i kui Pol IV taset ning leidsin, et *P. putida* *gac*-defektsete tüvede statsionaarse faasi täisproteoomanalüüsis (tabel 3), ei ole märgata RpoS-i ekspressioonitaseme vähenemist võrreldes metsiktüvega ([lisa 8](#), tabel 5). Proteoomanalüüsis ei olnud aga välja tulnud DNA polümeraas IV. Samuti oli täisproteoomi andmetes näha, et ka MutS-i tase polnud võrreldes metsiktüvega *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes muutunud ([lisa 8](#), tabel 5). Kuigi RpoS-i tase statsionaarse kasvufaasi *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes polnud metsiktüvega võrreldes muutunud, ei saa välistada, et pikemaajalisel nälgimisel fenool-minimaalsöötmel võib katses RpoS-i tase muutuda. Seda enam, et spontaansete Phe⁺ mutantide tekkesageduse tõusu *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes on näha alles alates viiendast nälgimispäevast (joonis 7). Seega, RpoS-i osaluse hindamiseks asendusmutatsioonide tekkes *P. putida* *gac*-defektsete tüvede nälgivates rakkudes tuleks analüüsida RpoS-i taset *gac*-defektsetes tüvedes kogu nälgimisperioodi jooksul.

Proteoomi andmetest selgus veel, et DNA ligaas LigB on *gac*-defektsetes tüvedes üles reguleeritud ca viis korda võrreldes *P. putida* metsiktüvega PaW85 (tabel 3). Tavaliselt on DNA ligeerimiseks vaja vaid üht molekuli ligaasiensüümi (Eisen ja Hanwalt, 1999). *Gac*-defektsetes tüvedes DNA ligaasi ülesreguleeritus võib viidata SOS-vastusele. SOS-vastusena aktiveeritakse DNA parandamisega, rekombinatsiooniga ja DNA sünteesiga seotud geenide ekspressiooni (Foster, 2007). DNA ligaas parandab DNA katkeid, mis on otsene DNA kahjustuse parandamise mehhanism (Eisen ja Hanawalt, 1999). Kuna DNA ligaas LigB on üles reguleeritud, siis võib see vihjata, et *P. putida* *gac*-defektsetes rakkudes võib parandamist vajavate DNA kahjustuste hulk olla suurenenud.

Pseudomonas chlororaphis-e tüve O6 statsionaarse kasvufaasi proteoomanalüüsist leiti 12 valku, mis on *gacS*-defektses tüves alla reguleeritud (Kim jt., 2014). Alla olid reguleeritud oksüdatiivse stressi, signaaliülekannete, sekundaarsete metaboliitide sünteesi ja sekretsiooniga seotud valgud (näiteks KatG (katalaas G), PrnA (trüptofaani halogenaas), Ssb (üheaahelalise DNA-ga seonduv valk)). Käesoleva töö proteoomanalüüsist ei tule välja valke, mis otseselt võiksid suurendada *gac*-defektsetes tüvedes mutatsioonitaseme tõusu, näiteks erinevad stressivastustes osalevad valgud. Samas on näha metsiktüvest erinevalt reguleeritud valke. Statsionaarse faasi proteoomi analüüsist on näha ühe operoni kaks geeni, mis on *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes tugevalt alla reguleeritud võrreldes metsiktüvega (tabel 3). Nendeks geenideks on PP_2006 ja PP_2007, millest esimese funktsioon on teadmata ning teine on p-47 sarnane valk. Huvitavalt on PP_2007 alla reguleeritud mõlemas *gac*-defektses tüves juba eksponentsiaalses kasvufaasis (tabel 2). Seetõttu võiks PP_2007 mõjutada Phe⁺ mutantide tekkesagedust. Katsetest selgus siiski, et PP_2007 ei mõjuta nälgivates *P. putida* rakkudes mutatsioonide teket, kuna PP_2007::Km katkestustüve statsionaarse faasi rakkudes polnud mutatsioonisagedus suurenenud võrreldes *P. putida* metsiktüvega KT2440Rif^R (joonis 15). PP_2007 geeniga ühte operoni kuulub ka veel geen PP_2006, mis oli statsionaarses kasvufaasis *gac*-defektsete tüvede proteoomides tugevalt alla reguleeritud. Kuid sarnaselt PP_2007 valguga ei mõjutanud PP_2006 *P. putida* statsionaarse kasvufaasi mutatsioonisagedust (joonis 15). *P. putida* *gac*-defektsete tüvede statsionaarse kasvufaasi proteoomides oli võrreldes metsiktüvega veel alla reguleeritud Cro/Ci perekonna transkriptsioonifaktor PP_4100 (tabel 3). Kuid taas, ka PP_4100 deletsioontüve mutatsioonisagedus nälgivates *P. putida* rakkudes ei olnud võrreldes metsiktüvega muutunud. Seetõttu võib püstitada hüpoteesi, et *P. putida* *gac*-defektsetes rakkudes nähtava mutatsioonisageduse tõusu põhjus ei pruugi tuleneda ühe konkreetse valgu taseme muutusest, vaid on tegemist mitmete erinevate valkude ekspressioonitasemete muutuste summeeruva mõjuga.

3.1 *Pseudomonas putida* *gac*-defektsete tüvede metsiktüvest madalam ROS-ide tase

Varasemalt on näidatud, et *Pseudomonas protegens* Pf-5 *gac*-defektsed tüved on tundlikud oksüdatiivse stressi suhtes, mis tekitati 15 mM H₂O₂-ga. Tundlikkus oksüdatiivse stressi suhtes võib tuleneda *rpoS*-i madalamast ekspressioonitasemest (Whistler jt., 1998). Ka Kim ja kolleegid (2014) leidsid, et *gacS*-defektses *Pseudomonas chlororaphis* O6 tüves on võrreldes metsiktüvega langenud katalaasi KatG ekspressioonitase ja seega suurenenud

tundlikkus oksüdatiivse stressi suhtes (Kim jt., 2014). Kui vaadata *gac*-defektsete tüvede proteoomanalüüsi, siis on näha, et võrreldes *P. putida* metsiktüvega PaW85 on statsionaarses kasvufaasis katalaas KatA alla reguleeritud ca kaks korda ning lisaks on *gacS*-defektsetes tüves alla reguleeritud ka katalaas KatG, kuid ainult 0,12 korda ([lisa 8](#), tabel 5). Seetõttu, toetudes nii kirjanduse kui proteoomi andmetele, võiksid *P. putida gac*-defektsed tüved samuti olla tundlikumad oksüdatiivse stressi suhtes. Samas, kui mõõtsin otseselt endogeensete ROS-ide taset *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes, oli see huvitaval kombel madalam kui metsiktüves (joonised 12, 13 ja 14). Sellest tulenevalt võib oletada, et antud tingimustel on oksüdatiivse stressiga seotud valgud üles reguleeritud. Kuid kui vaadata tüvede proteoomi analüüsi neljakordset erinevust, siis ei ole näha ROS-e eemaldavate ensüümide (katalaasid, superoksiidi dismutaasid) ülesreguleeritust, küll aga on näha, et superoksiidi dismutaas SodA on *gac*-defektsetes tüvedes üles reguleeritud 0,95-1,6 korda ([lisa 8](#), tabel 5), mis aga ei olnud statistiliselt oluline muutus.

Parakvaat on kergesti redutseeritav kemikaal ning redutseeritud parakvaat reageerib molekulaarse hapnikuga ning tekitab superoksiidi aniooni, mis põhjustab oksüdatiivset stressi (Hassan ja Fridovich, 1979). Kui indutseerisin *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsetes tüvedes oksüdatiivse stressi 0,15 mM parakvaadiga 1,5 tunni jooksul, siis nägin, et võrreldes metsiktüvega oli *gac*-defektsetes tüvedes ROS-ide tase tunduvalt kõrgem ([lisa 7](#), joonis 20). Seega *P. putida gac*-defektsete tüvede oksüdatiivse stressi tundlikkus ilmneb vaid indutseeritud oksüdatiivse stressi tingimustes, mil rakud ei suuda toime tulla kuhjuvate superoksiidi anioonidega. Samas on näha, et fenool-minimaaltassil 14 nälgimispäeva jooksul ei erine *gac*-defektsete tüvede elumus *P. putida* metsiktüve omast (joonis 10) ning ka endogeenne ROS-ide tase ei muutu 14 nälgimispäeva jooksul (joonis 14). Seega nälgimise käigus ei ole *P. putida gac*-defektsed tüved suuremas stressiseisundis kui metsiktüvi. Kui *gac*-defektsed tüved kasvavad rikkas kasvusöötmes ning neis ei ekspresseerita Gac-reguloni geene nagu metsiktüves, võib *gac*-defektsetel tüvedel olla isegi kasvueelis tänu madalamale ROS-ide tasemele ning energiakokkuhoiule, mis tuleneb Gac-reguloni kuuluvate geenide mitte-avaldumisest. *gac*-defektsete tüvede kasvueelist näitasid Bull ja kolleegid, kui rikkas söötmes *P. fluorescens*-i *gac*-defektsetel tüvedel oli statsionaarses kasvufaasis kasvueelis metsiktüve ees (Bull jt., 2001). Kuna *P. putida gac*-defektsete tüvede nälgivates rakkudes on ROS-ide tase madalam kui metsiktüves (joonis 14), siis on üheselt selge, et mutatsioonisageduse tõus polnud põhjustatud oksüdatiivsest stressist. *P. putida gac*-defektsete tüvede madalamat ROS-ide taset võib aga seletada geeni *PP_2765* produkt. Tegemist on sulfonaadi

monooksügenaasiga Msd, mis on metsiktüvega võrreldes mõlemas *gac*-defektses tüves statsionaarses faasis üles reguleeritud ca 4,5 korda (tabel 3). Msd toimel tekib dimetüülsulfiidi degradatsioonirajas kaks vaba prootonit. Neid vabu prootoneid võidakse aga juurde liita ROS-idele, mis ROS-e seeläbi neutraliseerib (Kertez jt., 1999; Liew jt., 2021). Seega võib *P. putida* *gac*-defektsetes tüvedes ROS-ide madal tase tuleneda valgu Msd ülesreguleeritusest.

Kokkuvõte

Kahekomponentsed signaalsüsteemid võimaldavad bakteril tunnetada muutusi keskkonnatingimustes ning vastusena toimunud muutustele reguleerivad bakteriraku füsioloogiat. GacS-GacA kahekomponentne signaalsüsteem on konserveerunud Gram-negatiivsetes bakterites. Pseudomonaadides on Gac-signaalsüsteem oluline sekundaarse metabolismi regulaator, antibiootikumi ja tsüaniidi sünteesi aktivaator, reguleerib kvoorunitunnetust ning ekstratsellulaarsete ühendite produktsiooni ja biofilmi moodustumist. Varasemalt on meie töögrupp kirjeldanud Gac-signaalsüsteemi sensorvalgu GacS-i defektsuse mõju *P. putida* mutatsioonisagedusele nii kasvavates kui ka nälgivates rakkudes. Käesoleva töö eesmärgiks oli kindlaks teha, kas Gac-signaalsüsteemi regulaatorvalk GacA mõjutab *P. putida* mutatsioonisagedust ning miks on mutatsioonisagedus *gac*-defektsetes tüvedes tõusnud.

Selleks, et teha kindlaks, kas Gac-signaalsüsteemi regulaator GacA mõjutab *P. putida* mutatsioonisagedust, kontrollisin mutatsioonisagedust nii *gacS*- kui ka *gacA*-defektses *P. putida* tüves ning samuti konstrueeritud *gacA*-komplementatsioonitüves *gacA*+*tacgacA*. Läbiviidud katsetest selgus, et nii Gac-signaalsüsteemi sensorvalgu GacS kui regulaatorvalgu GacA defektsus tõstab *P. putida* nälgivates rakkudes mutatsioonisagedust 6,4-7,5 korda, kuid ei mõjuta kasvavates rakkudes toimuvaid mutatsiooniprotsesse. *P. putida* nälgivates rakkudes suurenenud mutatsioonisageduse põhjus(t)e väljaselgitamiseks analüüsisin ROS-ide tasemeid ning tegin kõigile kolmele tüvele täisproteoomid eksponentsiaalse ja statsionaarse kasvufaasi rakkudest. Mainitud katsetest selgus, et *P. putida gac*-defektsete tüvede suurenenud mutatsioonisageduse põhjuseks pole oksüdatiivne stress, proteoomanalüüsist ei selgunud konkreetseid mutatsioonisageduse tõusu põhjustajaid.

The effect of two-component signal system GacS-GacA on mutagenesis in *Pseudomonas putida*

Triin Uussaar

Summary

In response to environmental signals two-component signalling systems enable bacteria to adapt to different conditions. These signal systems typically consist of sensor kinase and response regulator. The GacS-GacA two-component signal system is conserved among Gram-negative bacteria. In pseudomonads, the GacS-GacA signalling system regulates virulence, expression of biocontrol factors, extracellular proteases, secondary metabolites, and formation of biofilm. It has been shown that the inactivation of the *gacS* gene resulted in the loss of virulence and ecological fitness in *P. syringae* (Willis, 1990). In *P. putida*, deficiency of *gacS* affected stationary-phase mutagenesis (Tagel jt., 2016) and loss of GacS function has been found to reduce the attachment to various surfaces (Duque jt., 2013).

In our laboratory it has been previously shown that deficiency of *gacS* affects mutagenesis in the stationary-phase of *P. putida*. Whether GacA, a response regulator of the Gac-signalling system, influences mutagenesis and why mutation frequency increases in *gac*-defective strains is unclear. Therefore, the aim of this study was to determine whether GacA affects the mutation rate of *P. putida* and why the mutation rate increases in *gac*-defective strains. I analysed the mutation rate in both the *gacS*- and *gacA*-defective strain and in the constructed *gacA* complementation strain *gacA+tacgacA*. The experiments showed that both the *gacS*- and *gacA*-defective strains had an increased mutation frequency in starving but not in growing cells compared to the *P. putida* wild-type PaW85, while the mutation rate of the *gacA* complementation strain did not change. To determine the causes of the increased mutagenesis, the ROS levels of *P. putida* PaW85, *gacS*::Sm, and *gacA*::Sm strains were determined and proteomic analysis of cells in exponential and stationary growth phase was performed. These experiments showed that oxidative stress was not a cause of the increased mutation rate of the *gac*-defective strains, nor were specific causes revealed by proteomic analysis.

Kasutatud kirjandus

1. Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers Inc., NY.
2. Aravind, L., Ponting C.P. (1999). *The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins*. FEMS Microbiol Lett. 1999 Jul 1;176(1):111-6.
3. Y. Bao, D.P. Lies, H. Fu, G.P. Roberts. (1991). *An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria*. Gene, 109 (1991), pp. 167-168
4. Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy and P. Broda (1977). *Two modes of loss of the Tol function from Pseudomonas putida mt-2*. Mol Gen Genet 154(2): 203-204.
5. Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., & Haas, D. (1999). *Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in Pseudomonas fluorescens involves specific ribosome binding sites*.
6. Blumer, C., & Haas, D. (n.d.). *Multicopy suppression of a gacA mutation by the infC operon in Pseudomonas Fluorescens CHA0: competition with the global translational regulator RsmA*.
7. Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., & Lory, S. (2009). *The GacS/GacA signal transduction system of Pseudomonas aeruginosa acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs*. Molecular Microbiology, 73(3), 434–445.
8. Bull, C. T., Duffy, B., Voisard, C., Défago, G., Keel, C., & Haas, D. (2001). *Characterization of spontaneous gacS and gacA regulatory mutants of Pseudomonas fluorescens biocontrol strain CHA0*. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 79(3–4), 327–336.
9. Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). *Evolution of two-component signal transduction systems*. In Annual Review of Microbiology (Vol. 66, pp. 325–347).
10. Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK. (1995). *Inactivation of rsmA leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in Erwinia carotovora subsp. carotovora in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone*. Appl Environ Microbiol. 1995 May;61(5):1959-67.
11. David Burbulys, Kathleen A. Trach, James A. Hoch. (1991). *Initiation of sporulation in B. subtilis is controlled by a multicomponent phosphorelay*. Cell, Volume 64, Issue 3, 1991, Pages 545-552.
12. Dikalov, Sergey I. and David G. Harrison. (2014). *Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species*. Antioxidants and Redox Signaling 20(2):372–82.
13. Duque, E., de la Torre, J., Bernal, P., Molina-Henares, M. A., Alaminos, M., Espinosa-Urgel, M., Roca, A., Fernández, M., de Bentzmann, S., & Ramos, J. L. (2013). *Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic Pseudomonas*. Environmental Microbiology, 15(1), 36–48.
14. Eisen, J. A., & Hanawalt, P. C. (1999). *A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes*. In Mutation Research (Vol. 435).
15. Egger, L.A., Park, H., and Inouye, M. (1997) *Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay*. Genes Cells 2: 167–184.
16. Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., & Danielson, M. A. (1997). *The Two-Component Signaling Pathway Of Bacterial Chemotaxis: A Molecular View of Signal*

- Transduction by Receptors, Kinases, and Adaptation Enzymes*. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 13)
17. Foster P. L. (2005). *Stress responses and genetic variation in bacteria*. *Mutation research*, 569(1-2), 3–11.
 18. Foster, P. L. (2007). *Stress-induced mutagenesis in bacteria*. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 42, Issue 5, pp. 373–397).
 19. Fridovich I. (1975). *Superoxide dismutases*. *Annual Review of Biochemistry* 44, 147–159.
 20. Fridovich, I. (1978). *The Biology of Oxygen Radicals*. *Science* 201(4359):875–80.
 21. Fukumori F, Kishii M (2001). *Molecular cloning and transcriptional analysis of the alkyl hydroperoxide reductase genes from Pseudomonas putida KT2442*. *J Gen Appl Microbiol* 47:269–277
 22. Gaupp, R., Ledala, N., & Somerville, G. A. (2012). *Staphylococcal response to oxidative stress*. In *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 33).
 23. Gelvin SB, Habeck LL. (1990). *vir genes influence conjugal transfer of the Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 1990 Mar;172(3):1600-8.
 24. Ghisla, S., & Thorpe, C. (2004). *Acyl-CoA dehydrogenases: A mechanistic overview*. In *European Journal of Biochemistry* (Vol. 271, Issue 3, pp. 494–508).
 25. Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., Lory, S. (2008). *Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotype in a bacterial pathogen*. In *Genes & Dev* (2009). 23: 249-259.
 26. Gottesman, S. (2019). *Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria*. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 294, Issue 31, pp. 11685–11700). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.
 27. Gross R, Aricò B, Rappuoli R. (1989). *Families of bacterial signal-transducing proteins*. *Mol Microbiol*. 1989 Nov;3(11):1661-7.
 28. Hassan, H. M., & Fridovich, I. (1979). *Paraquat and Escherichia coli mechanism of production of extracellular superoxide radical*. in the *journal of biological chemistry* (Vol. 254, Issue 21).
 29. Hayashi S, Nakamura S, Suzuki M. (1980). *Corynebacterium sarcosine oxidase: a unique enzyme having covalently-bound and noncovalently-bound flavins*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980 Sep 30;96(2):924-30. In
 30. Heeb, S., & Haas, D. (2001). *Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria* (Vol. 14, Issue 12)
 31. Hellingwerf, K. J., Crielaard, W. C., Joost Teixeira De Mattos, M., Hoff, W. D., Kort, R., Verhamme, D. T., & Avignone-Rossa, C. (1998). *Current topics in signal transduction in bacteria*. In *Antonie van Leeuwenhoek* (Vol. 74)
 32. Hengge-Aronis R. (1996). *Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1996 Sep;21(5):887-93.
 33. Hirano, S. S., Ostertag, E. M., Savage, S. A., Stuart Baker, L., Willis, D. K., Upper, C. D., Hrabak, M., Willis, D. K., Hrabak, E. M., Rich, J. J., Barta, T. M., Lindow, S. E., & Panopoulos, N. J. (1997). *Contribution of the Regulatory Gene lemA to Field Fitness of Pseudomonas syringae pv. Syringae* In *Pseudomonas syringae pv. Syringae, lemA is required for brown spot lesion formation on snap bean and for production of syringomycin and extracellular proteases*. In *Applied and environmental microbiology* (Vol. 63, Issue 11).
 34. Hrabak't And, E. M., & Willis', D. K. (1992). *The lemA Gene Required for Pathogenicity of Pseudomonas syringae pv. syringae on Bean Is a Member of a Family of Two-Component Regulators*. In *journal of bacteriology* (Vol. 174, Issue 9).

35. Imlay, James A. (2003). *Pathways of Oxidative Damage*. Annual Review of Microbiology 57(1):395–418.
36. Imlay, James A. (2008). *Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide*.
37. Kay, Elisabeth et al. (2006). *Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology vol. 188,16 (2006): 6026-33.
38. Kertesz, M. A., Schmidt-Larbig, K., Wu^{est}, T., & Wu^{est}, W. (1999). *A Novel Reduced Flavin Mononucleotide-Dependent Methanesulfonate Sulfonatase Encoded by the Sulfur-Regulated msu Operon of Pseudomonas aeruginosa*. In Journal of bacteriology (Vol. 181, Issue 5).
39. Kim, C. H., Kim, Y. H., Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2014). *Proteomic analysis of a global regulator GacS sensor kinase in the rhizobacterium, Pseudomonas chlororaphis O6*. Plant Pathology Journal, 30(2), 220–227.
40. Kim, J., & Park, W. (2014). *Oxidative stress response in Pseudomonas putida*. In Applied Microbiology and Biotechnology (Vol. 98, Issue 16, pp. 6933–6946). Springer Verlag.
41. Kim Sr, Maenhaut-Michel G, Yamada M, Yama- Moto Y, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T, ohmori H. (1997). *Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in Escherich- ia coli: an overexpression of dinB/dinP results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA*. Proc Natl Acad Sci USA 94: 13792-13797.
42. Kullik I, Toledano MB, Tartaglia LA, Storz G. (1995). *Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions im- portant for oxidation and transcriptional activation*. J Bacteriol 177: 1275–1284
43. Lahesaare, A., Ainelo, H., Teppo, A., Kivisaar, M., Heipieper, H. J., & Teras, R. (2016). *LapF and its regulation by fis affect the cell surface hydrophobicity of pseudomonas putida*. PLoS ONE, 11(11).
44. Landini, P., Egli, T., Wolf, J., & Lacour, S. (2014). *SigmaS, a major player in the response to environmental stresses in Escherichia coli: Role, regulation and mechanisms of promoter recognition*. Environmental Microbiology Reports, 6(1), 1–13.
45. Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. T., & Haas, D. (2008). *Gac/Rsm signal transduction pathway of γ-proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour*. In Molecular Microbiology (Vol. 67, Issue 2, pp. 241–253).
46. Latour, X. (2020). *The evanescent gacs signal*. In Microorganisms (Vol. 8, Issue 11, pp. 1–25). MDPI AG.
47. Laville, J., Voisard, C., Keelt, C., Maurhofert, M., Dtfagot, G., & Haas, D. (1992). *Global control in Pseudomonas fluorescens mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco (secondary metabolites/hydrogen cyanide/2,4-diacetylphloroglucinol/two-component regulatory systems/uvrC)* (Vol. 89).
48. Lemire, J., Alhasawi, A., Appanna, V., Tharmalingam, S. and Appanna, V. (2017), *Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far*. J Appl Microbiol, 123: 798-809.
49. Liew, J. J. M., el Saudi, I. M., Nguyen, S. v., Wicht, D. K., & Dowling, D. P. (2021). *Structures of the alkanesulfonate monooxygenase MsuD provide insight into C–S bond cleavage, substrate scope, and an unexpected role for the tetramer*. Journal of Biological Chemistry, 297(1).
50. Liu, W., Bai, X., Li, Y. et al. (2021). *FixJ family regulator AcfR of Azorhizobium caulinodansis involved in symbiosis with the host plant*. BMC Microbiol 21, 80 (2021).

51. Maris AE, Sawaya MR, Kaczor-Grzeskowiak M, Jarvis MR, Bearson SM, Kopka ML, Schröder I, Gunsalus RP, Dickerson RE. (2002). *Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator*. Nat Struct Biol. 2002 Oct;9(10):771-8.
52. Martínez-Gil, M., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2014). *Roles of cyclic Di-GMP and the Gac system in transcriptional control of the genes coding for the Pseudomonas putida adhesins LapA and LapF*. Journal of Bacteriology, 196(8), 1484–1495.
53. Matic, I. (2016). *Molecular mechanisms involved in the regulation of mutation rates in bacteria*. In Periodicum Biologorum (Vol. 118, Issue 4, pp. 363–372). Croatian Society of Natural Sciences.
54. Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Biochimie 75(6): 456.
55. Mondragón, V., Franco, B., Jonas, K., Suzuki, K., Romeo, T., Melefors, Ö., & Georgellis, D. (2006). *pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 188(23), 8303–8306.
56. Park, W., Peña-Llopis, S., Lee, Y., & Dimple, B. (2006). *Regulation of superoxide stress in Pseudomonas putida KT2440 is different from the SoxR paradigm in Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 341(1), 51–56.
57. Pavel, H., M. Forsman & V. Shingler (1994). *An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of Pseudomonas sp. strain CF600 on para-substituted methylphenols*. Journal of bacteriology 176(24): 7550-7557.
58. Pazour GJ, Das A. (1990). *virG, an Agrobacterium tumefaciens transcriptional activator, initiates translation at a UUG codon and is a sequence-specific DNA-binding protein*. J Bacteriol. 1990 Mar;172(3):1241-9.
59. Pirrung, M. C. (1999). *Histidine kinases and two-component signal transduction systems*. In Chemistry & Biology (Vol. 6, Issue 6)
60. Rastogi, Rajesh P., Shailendra P. Singh, Donat P. Häder, and Rajeshwar P. Sinha. (2010). *Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) by the Oxidant-Sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate in the Cyanobacterium Anabaena Variabilis PCC 7937*. Biochemical and Biophysical Research Communications 397(3):603–7.
61. Rich, J. J., Kinscherf, T. G., Kitten, T., & Willis12, D. K. (1994). *Genetic Evidence that the gacA Gene Encodes the Cognate Response Regulator for the lemA Sensor in Pseudomonas syringae* (Vol. 176, Issue 24).
62. Schroeder, J. W., Yeesin, P., Simmons, L. A., & Wang, J. D. (2018). *Sources of spontaneous mutagenesis in bacteria*. In Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology (Vol. 53, Issue 1, pp. 29–48). Taylor and Francis Ltd.
63. Schröder I, Wolin CD, Cavicchioli R, Gunsalus RP. (1994). *Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of Escherichia coli*. J Bacteriol. 1994 Aug;176(16):4985-92.
64. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. (1995). *Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons*. Microbiol Rev. 1995;59(2):201–222
65. Seaver, L.C. and Imlay, J.A. (2001). *Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli*. J Bacteriol 183, 7173–7181.
66. Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT. (2005). *Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis*. PLoS Biol. 2005 Oct;3(10):e334.

67. Slauch, J.M., and Silhavy, T.J. (1996). *The porin regulon: a paradigm for the two-component regulatory systems*. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*. Lin, E.C.C. and Lynch, A.S. (eds). New York: Chapman & Hall, pp. 383–417
68. Storvik, K. A. M., & Foster, P. L. (2010). *RpoS, the stress response sigma factor, plays a dual role in the regulation of Escherichia coli's error-prone DNA polymerase IV*. Journal of Bacteriology, 192(14), 3639–3644.
69. Sultan, M.; Arya, R.; Kim, K.K. (2021). *Roles of Two-Component Systems in Pseudomonas aeruginosa Virulence*. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 12152.
70. Svenningsen, N. B., Pérez-Pantoja, D., Nikel, P. I., Nicolaisen, M. H., de Lorenzo, V., & Nybroe, O. (2015). *Pseudomonas putida mt-2 tolerates reactive oxygen species generated during matrix stress by inducing a major oxidative defense response*. BMC Microbiology, 15(1), 1–11.
71. Tagel, M., Tavita, K., Hörak, R., Kivisaar, M., Ilves, H. (2016). *A novel papillation assay for the identification of genes affecting mutation rate in Pseudomonas putida and other pseudomonads*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis (Vol 790, pages 41-55).
72. Tarassova, K., Tegova, R., Tover, A., Teras, R., Tark, M., Saumaa, S., & Kivisaar, M. (2009). *Elevated mutation frequency in surviving populations of carbon-starved rpoS-deficient Pseudomonas putida is caused by reduced expression of superoxide dismutase and catalase*. Journal of Bacteriology, 191(11), 3604–3614.
73. Tegova, R., A. Tover, K. Tarassova, M. Tark and M. Kivisaar (2004). *Involvement of Error-Prone DNA Polymerase IV in Stationary-Phase Mutagenesis in Pseudomonas putida*. J Bacteriol 186(9): 2735-2744.
74. Tessmer, I., Yang, Y., Zhai, J., Du, C., Hsieh, P., Hingorani, M. M., & Erie, D. A. (2008). *Mechanism of MutS searching for DNA mismatches and signaling repair*. Journal of Biological Chemistry, 283(52), 36646–36654.
75. Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. In *Nature Methods* (Vol. 13, Issue 9, pp. 731–740). Nature Publishing Group.
76. Valverde C, Heeb S, Keel C, Haas D. (2003). *RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in Pseudomonas fluorescens CHA0*. Mol Microbiol. 2003 Nov;50(4):1361-79.
77. van den Broek, D., Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloembergen, G. v., & Lugtenberg, B. J. J. (2005). *Role of RpoS and MutS in phase variation of Pseudomonas sp. PCL1171*. Microbiology, 151(5), 1403–1408.
78. Vierstra RD, Davis SJ. (2000). *Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction*. Semin Cell Dev Biol. 2000 Dec;11(6):511-21.
79. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S, Filloux A. (2006). *Multiple sensors control reciprocal expression of Pseudomonas aeruginosa regulatory RNA and virulence genes*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Jan 3;103(1):171-6.
80. Wang, B. X., Wheeler, K. M., Cady, K. C., Lehoux, S., Cummings, R. D., Laub, M. T., & Ribbeck, K. (2021). *Mucin Glycans Signal through the Sensor Kinase RetS to Inhibit Virulence-Associated Traits in Pseudomonas aeruginosa*. Current Biology, 31(1), 90-102.e7.
81. Williams, S. B., & Stewart, V. (n.d.). *Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction*. MicroReview

82. Willis, D. K., E. M. Hrabak, J. J. Rich, T. M. Barta, S. E. Lindow, and N.J. Panopoulos. (1990). *Isolation and characterization of a Pseudomonas syringae pv. syringae mutant deficient in lesion formation on bean*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:149- 156.
83. Wise Aa and Binns An. (2016). *The Receiver of the Agrobacterium tumefaciens VirA Histidine Kinase Forms a Stable Interaction with VirG to Activate Virulence Gene Expression*. Front. Microbiol. 6:1546.
84. Whistler, C. A., Corbell, N. A., Sarniguet, A., Ream, W., & Loper, J. E. (1998). *The Two-Component Regulators GacS and GacA Influence Accumulation of the Stationary-Phase Sigma Factor S and the Stress Response in Pseudomonas fluorescens Pf-5*. In JOURNAL OF BACTERIOLOGY (Vol. 180, Issue 24).
85. Yoshida, M., Ishihama, A., & Yamamoto, K. (2015). *Cross talk in promoter recognition between six NarL-family response regulators of Escherichia coli two-component system*. Genes to Cells, 20(7), 601–612

Kasutatud veebilehed

1. <https://www.pseudomonas.com> (viimati külastatud 10.05.2022)
2. <https://smart.embl.de> (viimati külastatud 10.05.2022)
3. <https://www.uniprot.org> (viimati külastatud 10.05.2022)
4. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (viimati külastatud 10.05.2022)

Lisad

Lisa 1. Töös kasutatud praimerid ja nende kirjeldus

Praimer	Praimeri järjestus	Iseloomustus ja seondumiskoht
pheAtsII	5'-AATAGACTGTGTCACCCATAA-3'	Komplementaarne <i>pheA</i> geenis alaga positsioonides 314 kuni 334 nukleotiidi allapoole translatsiooni stardikoodonist ATG
pheBamei	5'-AAGGCGCTCCCGTAAGACA -3'	Komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni -40 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geeni sisse
gacAstartHIII	5'-TATA <u>AAGCTTT</u> GATTAGGGTCTTAGTGGT -3'	Komplementaarne <i>gacA</i> geeni algusega suunaga geeni poole, praimer 5' otsa on disainitud <i>HindIII</i> lõikesait
gacAstopSall	5'-TAG <u>TCGACTT</u> ACAGGCTTGCCTCAAC-3'	Komplementaarne <i>gacA</i> geeni lõpuga suunaga geeni sisse, praimer 5' otsa on disainitud <i>Sall</i> lõikesait
Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Plasmiidi pBluescript universaalpraimer
Reverse	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	Plasmiidi pBluescript universaalpraimer
prTac	5'-AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3'	Komplementaarne <i>tac</i> -promootoriga, suunaga <i>tac</i> -promootori kontrolli all olevale geenile
Tn7-glmS	5'-AATCTGGCCAAGTCGGTGAC-3'	mini-Tn7 kontrollimiseks
Tn7-109R	5'-CAGCATAACTGGACTGATTTCAG-3'	mini-Tn7 kontrollimiseks

Lisa 2: GacS valgu domeenide järjestused

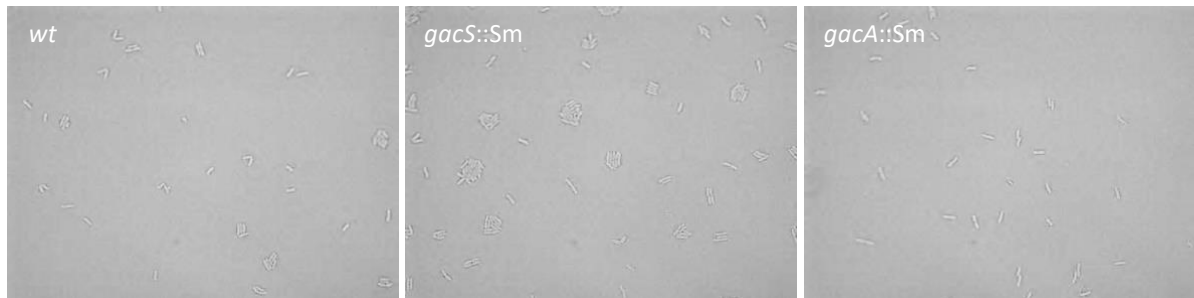
Domeen	Asukoht (aminohape)	Järjestus
Transmembraanne osa 1	12-32	LLLALLPAGLMALVLGSYFTW
Periplasmaatiline silmus ehk DUF2222	34-170	QQNDLRTQLLQRGKMIAEQLAPLAAPAMARLAPA QLERIAAQTLQADVRVAFLAPDRTRLAHAGPSMLNLPSPGG TGTQLLQRSGNDATRYLMPVFGHHRDLATDAVPAEAERLLGW VEIELSHDGTLLRGYRNL
Transmembraanne osa 2	170-189	LFTSLLLILACLALSGLLAL
HAMP	193-245	RTINDPIERIKHAVNQLKDGHLERLPTMGSHDELAHGINRM AETLQNAHE
HisKA	285-350	IKSEFLANMSHEIRTPNLGILGFTHLLQKSEMPRQLDYLNITIEKS ADNLLGIINEILDFSKIEAG

ATPase_c	397-513	GDPLRLKQILTNLVSNAIKFTREGTIVVRAMLED EHEDCAQLRISVQDTGIGLSPQDVRTLQAFSQ ADNSLARQPPGGTGLGLVISKRLIEQMGGEIGVDS TPGEGSQFWISLNLPK
REC	668-784	PKILCVDDNAANLLLKTLLEDLGAEVLAVNNGYAAVQAVQEEL FDLVLMQVQMPGMDGRACTEQIRLWENTQSGNPLPIVALTA HAMANEKRALLHSGMDDYLTKPISERQLAQVV
HPT	821-917	AAGKADLAADMLSMLLASLDTDREAIRAARAADDRNGLIEQVH RLNGASRYCGVPQLRAACQRSETLLKQDNPPQAQQALDELSAI SRLAAQARLSA

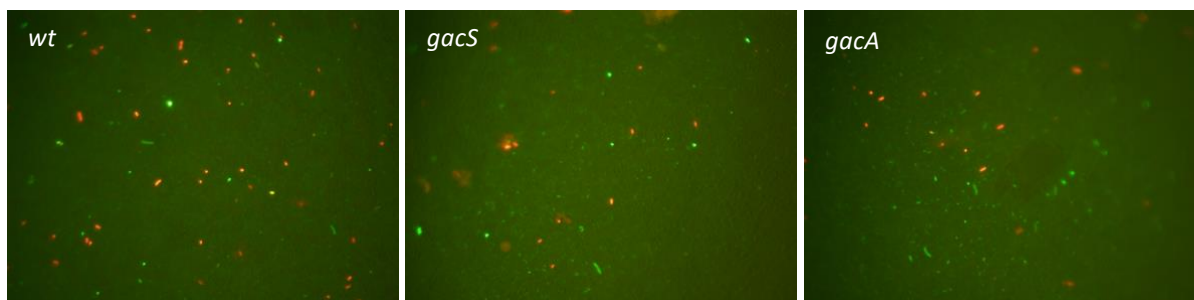
Lisa 3: GacA valgu domeenide järjestused

Domeen	Asukoht (aminohape)	Järjestus
REC domeen	2-115	VLVVDHDLVRTGITRMLADIDGLQVVGEGDSGESALKLARELK PDVVLMDVKMPGIGGLEATRKLRSHPDIKVVAVTVCEEDPFPT RLLQAGAAGYLTGAGLDEMVAI
HTH LuxR domeen	145-202	FDALSEREIQIALMIVGCQKVQIISDKLCLSPKTVNTYRIRIFEKLS VTSDVELTLLA

Lisa 4: Mikroskopeerimised

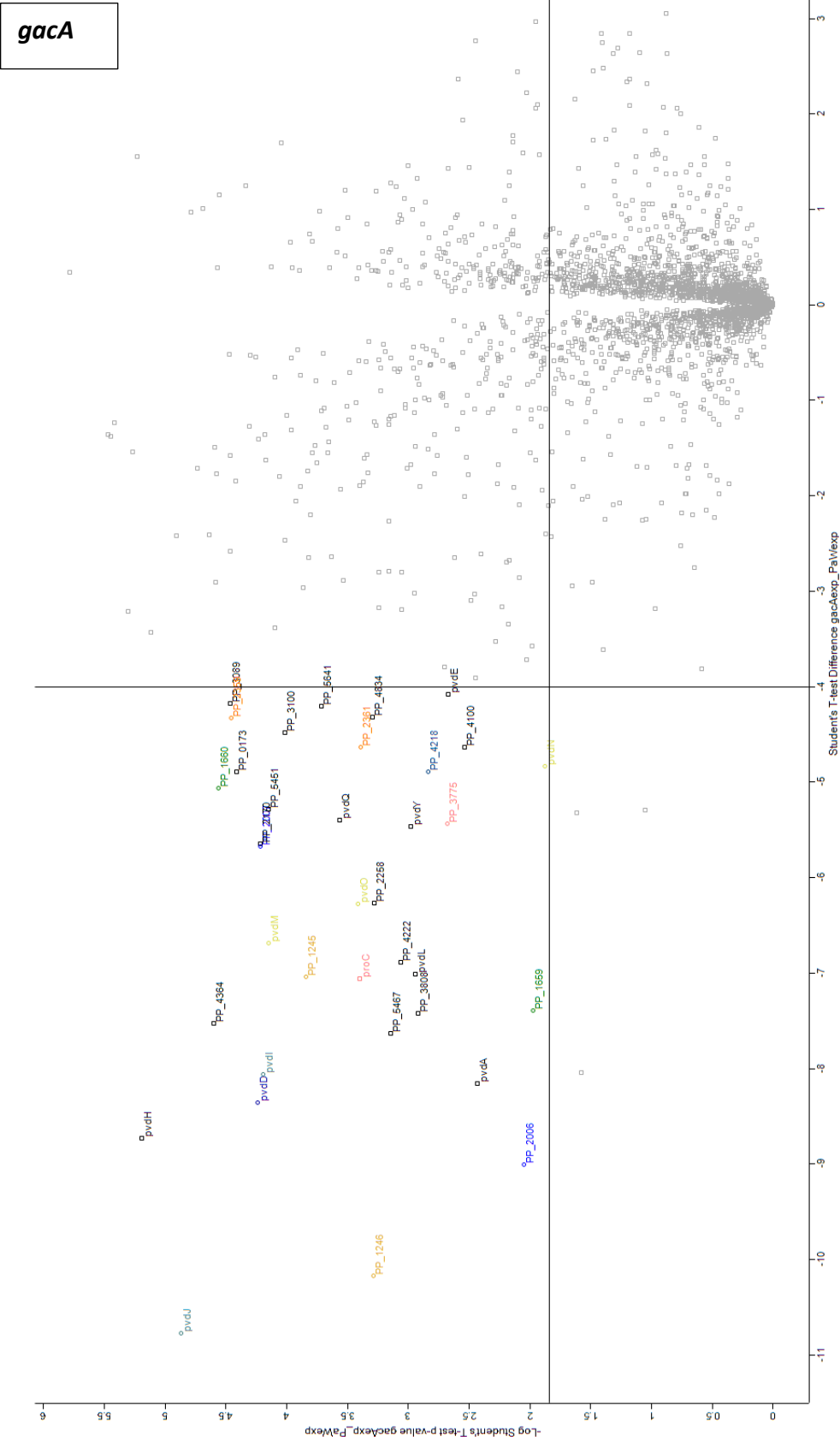


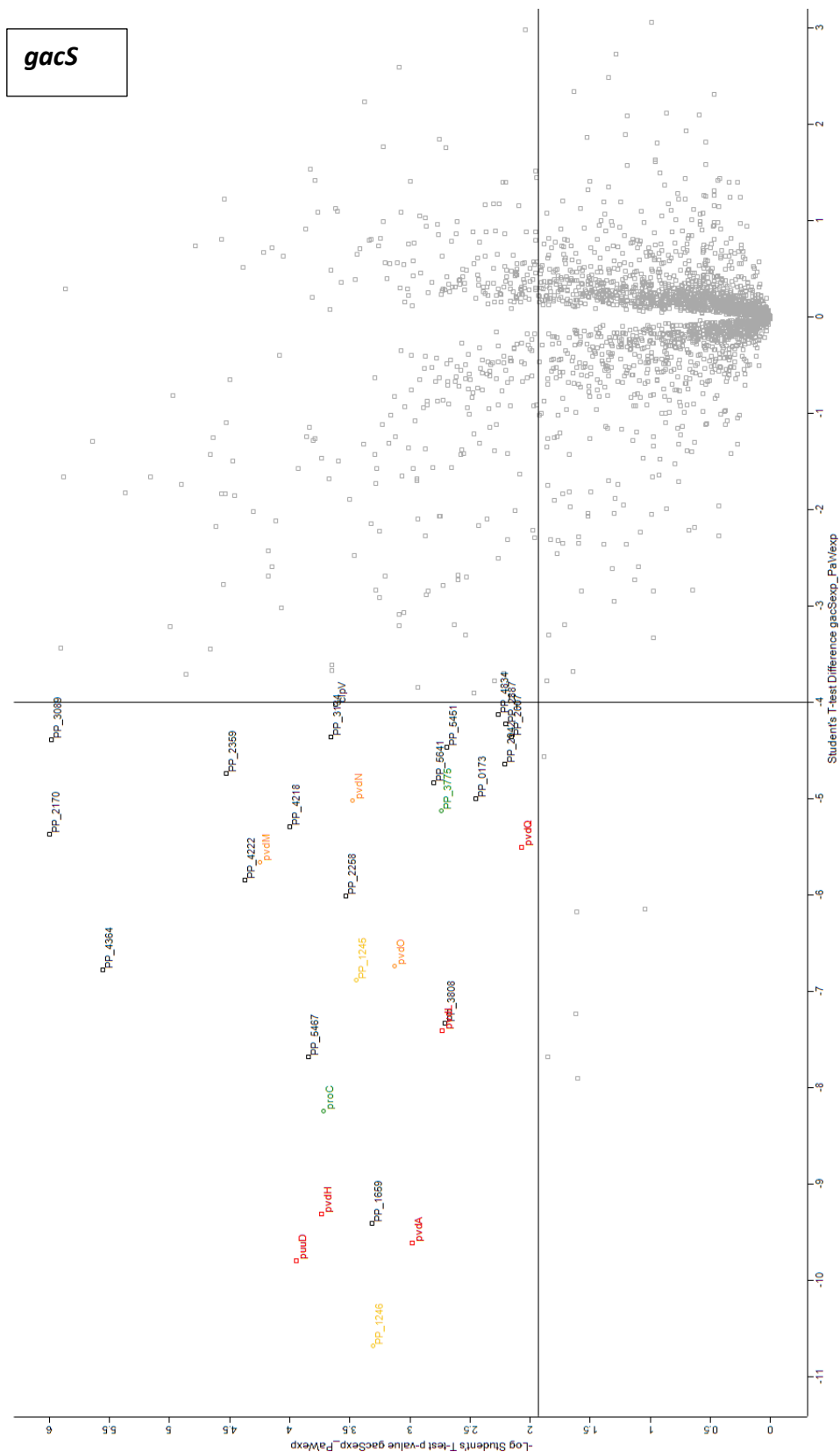
Joonis 16: 2h 40 min ($OD_{580} = 1$) glc-CAA söötmes kasvanud PaW85 (wt), *gacS*- ja *gacA*-defektse tüve rakud valgusmikroskoobis 1000x suurendusega.



Joonis 17: PaW85 (wt), *gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede rakupopulatsioonid vaadeldud 1000x suurendusega fluorestsentsmikroskoobis. 18h glc-CAA söötmes kasvanud rakud, mis on värvitud PI/SYTO9 värvilahusega.

Lisa 5: *P. putida* PaW85, *gacA*::Sm ja *gacS*::Sm eksponentsiaalse kasvufaasi täisproteoomanalüüs

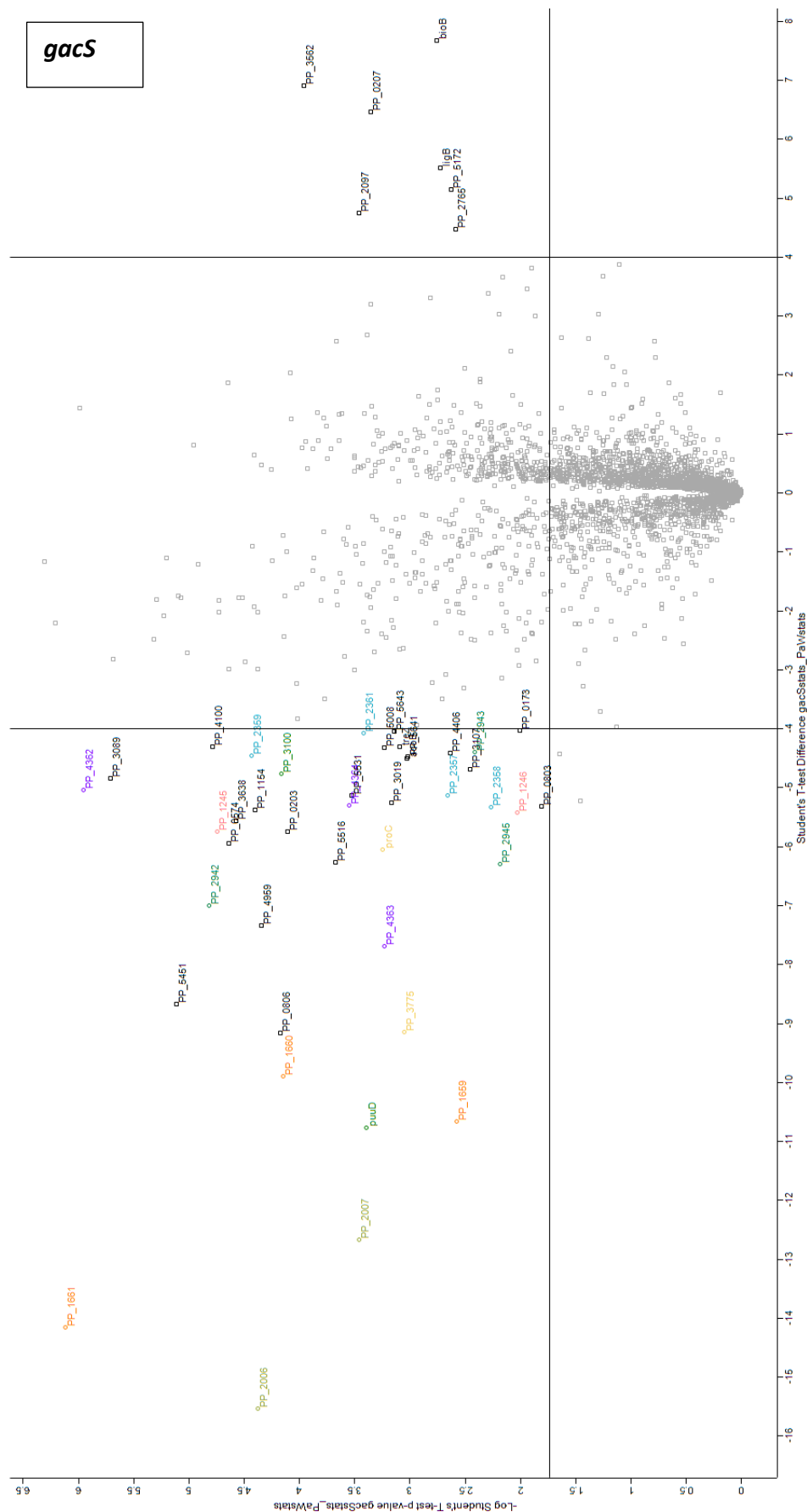




Joonis 18 : *gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede eksponentsiaalse kasvufaasi täisproteoom võrrelduna metsiktüvega PaW85. x-teljel on toodud erineva metsiktüvest ning y-teljega paralleelselt on märgitud neljakordne erinevus. x-teljega paralleelselt on märgitud statistiline usalduspiir, millest alates on erinevus metsiktüvest statistiliselt oluline. Samasse operoni kuuluvad geenid on märgitud sama värviga.

Ülemine. *gacA*-defektses tüves metsiktüvest erinevalt ekspresseeritud valgud.

Alumine. *gacS*-defektses tüves metsiktüvest erinevalt ekspresseeritud valgud.



Joonis 19: *gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede statsionaarse kasvufaasi täisproteoom võrrelduna metsiktüvega PaW85. x-teljel on toodud erinevus metsiktüvest ning y-teljega paralleelselt on märgitud neljakordne erinevus. x-teljega paralleelselt on märgitud statistiline usalduspiir,

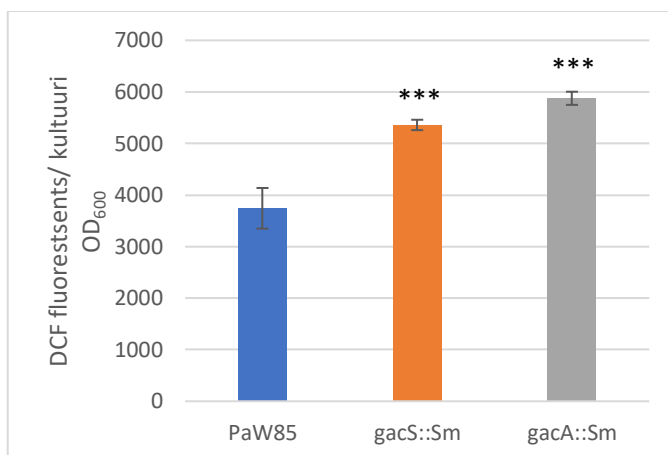
millest alates on erinevus metsiktüvest statistiliselt oluline. Samasse operoni kuuluvad geenid on märgitud sama värviga.

Ülemine. *gacA*-defektses tüves metsiktüvest erinevalt ekspresseeritud valgud.

Alumine. *gacS*-defektses tüves metsiktüvest erinevalt ekspresseeritud valgud.

Lisa 7: ROS-ide tase *P. putida* tüvedes PaW85, *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* parakvaadiga

Kui vaadata endogeensete ROS-ide taset *P. putida* metsiktüves PaW85 ning *gac*-defektsetes tüvedes peale 1,5 tundi kasvamist glc-CAA söötmes 0,15 mM parakvaadi juuresolekul, siis on *P. putida gacS*-ja *gacA*-defektsetes tüvedes endogeenne ROS-ide tase kõrgem kui metsiktüves (Student'i T-testi p-väärtused vastavalt $2,42 \cdot 10^{-6}$ ja $3,28 \cdot 10^{-6}$) (joonis 20). Bakterid kasvasid üleöö glc-CAA söötmes. Järgmisel päeval mõõtsin kultuuri OD ning tegin lahjenduse glc-CAA söötmesse selliselt, et $OD_{600}=0,2$. Proovidele lisasin parakvaati, lõppkontsentratsiooniga 0,15 mM ning kasvasin rakke 1,5 tundi 30 kraadi juures. Seejärel värvisin rakke H_2DCFDA värvilahusega nagu kirjeldatud peatükis „Materjal ja meetoodika“ [2.2.14.](#)



Joonis 20: Endogeensete ROS-ide tase metsiktüves PaW85 ning *gacS::Sm* ja *gacA::Sm* tüvedes peale 1,5 tundi 0,15 mM parakvaadi juuresolekul. Joonisel on toodud iga tüve viie tehnilise paralleeli keskmised väärtused ühest katsest, kus y-teljele on märgitud DCF keskmise fluorestsentsi intensiivsuse ja keskmise optilise tiheduse (OD_{600}) suhe koos standardhällbega. *** tähistab võrdlust metsiktüvega ning p-väärtust $< 0,001$.

Lisa 8: *P. putida gac*-defektsete tüvede statsionaarse kasvufaasi proteoomanalüüs

Tabel 5: *P. putida gacS*- ja *gacA*-defektsete tüvede mõnede huvipakkuvate statsionaarse kasvufaasi valkude ekspressioonitasemed.

Geen	Valgu nimi	Muutus tüves <i>gacS::Sm</i> võrreldes wt (kordades)	Muutus tüves <i>gacA::Sm</i> võrreldes wt (kordades)
<i>dinB</i>	DNA polümeraas IV	ei olnud antud proteoomis kättesaadav	ei olnud antud proteoomis kättesaadav

<i>katA</i>	Katalaas KatA	-2,00	-2,23
<i>katG</i>	Katalaas-peroksüdaas KatG	-0,12	-0,13
<i>mutS</i>	DNA paardumisvigu parandav valk MutS	+0,01	+0,08
<i>rpoS</i>	RNA polümeraasi σ -faktor	-0,25	-0,13
<i>sodA</i>	Superoksiidi dismutaas SodA	+0,95	+1,60
<i>sodB</i>	Superoksiidi dismutaas SodB	+0,12	+0,10

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Triin Uussaar**,

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

„Kahekomponentse signaalsüsteemi GacS-GacA mõju mullabakter *Pseudomonas putida* mutatsioonisagedusele“,

mille juhendajad on Heili Ilves PhD ja Karl Jürgenstein MSc,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Triin Uussaar

30.05.2022