

TARTU ÜLIKOOL
Bioloogia-geograafiateaduskond
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

MARTA PUTRINŠ

Rakkude füsioloogilisest seisundist tulenevad kontrollmehhanismid
Pseudomonas putida fenooli degradatsiooni operoni *pheBA* transkriptsiooni regulatsioonil

Magistritöö

Juhendajad Andres Tover, M.Sc.
ja Maia Kivisaar, Ph.D.

TARTU 2004

Sisukord

Sissejuhatus	4
1 Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Aromaatsete ühendite lagundamine	5
1.1.1 Aromaatsete ühendite degradatsioonirajad	5
1.1.2 Aromaatsete ühendite lagundamisega seotud kromosomaalsed operonid ja nende regulaatorid	7
1.1.3 Aromaatsete ühendite lagundamisega seotud plasmiidised operonid ja nende regulaatorid	8
1.1.4 Biodegradatiivsete operonide rist-regulatsioon	9
1.2 Rakkude füsioloogilisest seisundist tulenevad transkriptsiooni regulatsiooni mehhanismid kataboolsetel operonidel	10
1.2.1 Eksponentsiaalne vaigistamine ja kataboliitne repression - kaks eristatavat füsioloogilise kontrolli mehhanismi.	11
1.2.2 Kataboliitset repressiooni vahendav valk Crc <i>P. putida</i> rakkudes.	12
1.2.3 Hingamisahela seos kataboolsete operonide ekspressiooni regulatsiooniga .	13
1.2.4 Pu promootori kataboolset repressiooni vahendavad valgud PtsN ja PtsO .	13
1.2.5 σ -faktorite osalus biodegradatiivsete operonide transkriptsiooni initsiatsiooni regulatsioonis.	14
1.2.6 Signaalmolekul guanosiin tetrafosfaadi(pentafosfaat) (p)ppGpp	15
1.2.7 Katabolse raja regulaatorvalgu hulga ja aktiivsuse kaudu toimuvad regulatsioonimehhanismid	16
1.3 <i>P. putida catBCA</i> ning <i>pheBA</i> operon	16
1.3.1 <i>pheBA</i> ja <i>catBCA</i> operonide spetsiifiline transkriptsiooni regulatsioon	17
1.3.2 Bakterirakkude füsioloogilise seisundi mõju <i>pheBA</i> ja <i>catBCA</i> operonide transkriptsiooni regulatsioonile.....	19
2 Materjal ja meetoodika	21
2.1 Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.	21
2.2 Söötmed	22
2.3 Plasmiidide ja bakteritüvede konstrueerimine	23
2.4 Kasvatamistingimused	24
2.5 Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs.....	26
2.6 Kloneerimine	27
2.7 Transformatsioon	27
2.8 Elektroporatsioon	27
2.9 Bakteritüvede ristamine	28
2.10 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)	28
2.11 Bioluminestsentsi mõõtmine bakterikultuurist	29
2.12 Ensüümi katehooli 1,2-dioksügenaas eriaktiivsuse määramine rakulüsaadist	29
2.13 β -galaktosidaasi mõõtmine	30
2.14 “Western blot” analüüs	30
3 Tulemused	32

3.1	<i>pheBA</i> promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsiooni tase sõltub CCM-i allikana kasutatavast aromaatsesest ühendist	32
3.2	CatR valgu üleekspressioon mõjutab positiivselt <i>pheBA</i> promootorilt lähtuvat transkriptsiooni	34
3.3	CCM-i akumulatsioon mõju bakterirakkudes <i>pheBA</i> promootorilt lähtuvale transkriptsioonile	36
3.4	Aminohapete juuresolekul bakterite kasvukeskkonnas langeb eksponentsiaalses kasvufaasis <i>pheB</i> geeni poolt kodeeritud C12O eriaktiivsus	37
3.5	Aminohapped bakterite kasvukeskkonnas pärivad eksponentsiaalses kasvufaasis <i>pheB</i> geeni poolt kodeeritud C12O ekspressiooni posttranskriptsioonilisel tasemel	40
4	Arutelu	43
	Kokkuvõte	48
	Summary	49
	Kasutatud kirjandus	50

Sissejuhatus

Mullabakter *Pseudomonas putida* on võimeline lagundama mitmesuguseid aromaatseid süsinikuühendeid, mis on tekkinud looduses taimse materjali lagunemise käigus. Tsentraalsed aromaatsete ühendite lagundamisrajad on kodeeritud bakteri kromosomaalsete geenide poolt. Suurtes konjugatiivsetes plasmiidides paiknevad biodegradatsiooni operonid võivad aga bakterirakkude poolt metaboliseeritavate substraatide ringi veelgi laiendada.

Selleks, et võimalikult optimaalselt kasutada keskkonnas olevaid toitaineid, on bakterites erinevate süsinikuallikate degradatsiooniraja geenide ekspressioon täpselt kontrollitud. *P. putida* rakkudes on transkriptsioon kataboolsete operonide promootoritelt enamasti kontrollitud nii spetsiifilise regulaatorvalgu ja induktormolekuli poolt kui ka sõltuvalt alternatiivsete süsinikuallikate olemasolust bakterite kasvukeskkonnas või ka bakterite kasvufaasist.

Meie töögrupis on uuritud *P. putida* katehooli lagundamist võimaldava kromosomaalse *catBCA* ja fenooli lagundamist võimaldava plasmiidse *pheBA* operoni transkriptsiooni regulatsiooni. Transkriptsioon nende kataboolsete operonide promootoritelt on kontrollitud kromosomaalselt kodeeritud regulaatorvalgu CatR ja ning katehooli degradatsiooni vaheühendi *cis,cis*-mukonaadi poolt (Kasak jt., 1993). Transkriptsiooni *catBCA* ja *pheBA* operonide promootoritelt ei aktiveerita aga tingimustes, kus bakterirakud kasvavad rikkas söötmes eksponentsiaalselt (Tover jt., 2001). See tähendab, et lisaks biodegradatiivse raja substraadi olemasolule bakterite kasvukeskkonnas, suudavad bakterirakud tunnetada ka teisi signaale, mille tagajärjel mõjutatakse mingi mehhanismi kaudu transkriptsiooni biodegradatiivse operoni promootorilt.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, milliste mehhanismide abil on kontrollitud *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvavates *P. putida* rakkudes.

Suur tänu minu juhendajatele Maiale ja Andresele, igakülgse abi ja heade nõuannete eest, samuti toredatele laborikaaslastele, kes aitasid kaasa käesoleva töö valmimisele.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Aromaatsete ühendite lagundamine

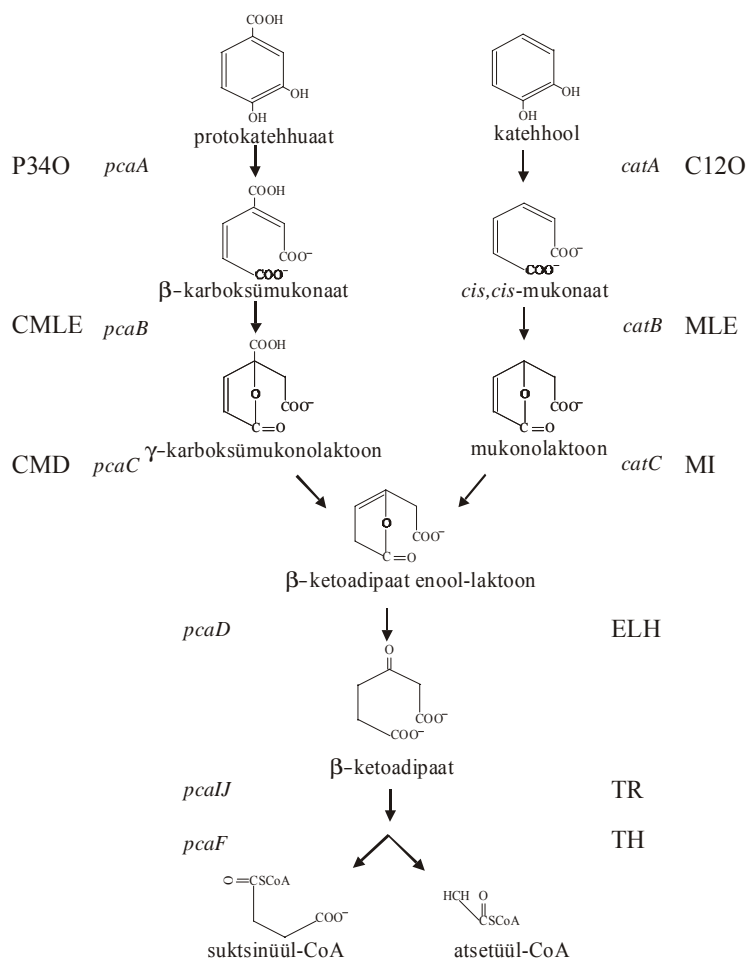
Aromaatsete ühendite lagundamine bakterite poolt on pälvinud suurt tähelepanu mitmel põhjusel. Esiteks on aromaatsete ühendite lagundamisrajad olulised taimse, peamiselt ligniinist koosneva biomassi lagundamisel (Harwood ja Parales, 1996). Teiseks satuvad aromaatsed süsinikühendid keskkonda ka tööstusjääkidenä - looduses lagunevad need aeglaselt ning on toksilised. Aromaatsete ühendite poolt saastunud keskkonnast on isoleeritud baktereid, kes suudavad neid ksenobiootilisi ühendeid lagundada ning enamasti on bakteripopulatsioonis domineerivad perekonda *Pseudomonas* kuuluvad liigid (Parsek jt., 1996). Kuna ksenobiootilised ühendid on keskkonda ilmunud suhteliselt hiljuti, siis on nende lagundamist võimaldavad geenid bakterites tekkinud tõenäoliselt olemasolevate geenide modifikatsioonide tulemusena. (Timmis jt., 1994).

1.1.1 Aromaatsete ühendite degradatsioonirajad

Pseudomonas putida tüvi KT2440 (identne tüvega PaW85) on saadud tüvest mt-2 TOL plasmidi pWW0 elimineerimise teel. Kuna mt-2 on isoleeritud mullast, siis on ootuspärane selle bakteritüve võime lagundada mitmesuguseid taimse materjali lagunemisel tekkinud aromaatsed süsinikuühendeid (Jimenez jt., 2002).

P. putida tüves KT2440 on kirjeldatud neli tsentraalset aromaatsete süsinikuühendite katabolismi rada, milleks on β -ketoadipaadi raja katehhooli ja protokatehhuuaadi haru ning fenüülatsetaadi ja homogenistaadi rada. β -ketoadipaadi rada on saanud oma nimetuse vaheühendi järgi, mis tekib mitmete aromaatsete ühendite lagundamisel raja kahe erineva haru kaudu. Üks neist harudest lagundab protokatehhuuaati ja teine katehhooli kuni β -ketoadipaadi enool-laktoonini. Edasine β -ketoadipaadi lagundamine tsitraaditsükli vaheühenditeks toimub juba ühtse raja kaudu (joonis 1). Protokatehhuuaat tekib selliste fenoolsete ühendite lagundamisel nagu 4-hüdroksübensoaat ja mitmed ligniini monomeerid. Katehhool saadakse omakorda näiteks bensoaadi lagundamisel (Jimenez jt., 2002).

Aromaatsete ühendite lagundamise teeb raskeks benseeni aromaatsuse rõnga stabiilsus. Kõigepealt tuleb aromaatsust ühendit modifitseerida nii, et tekiks dihidroksüleeritud benseeni rõngas. Edasi toimub aromaatsuse rõnga lõhkumine dioksügenaaside poolt. Nii protokatehhuadist kui katehoolist algav rada jagatakse kaheks sõltuvalt sellest, kuidas toimub aromaatsuse rõnga katkestamine. *Orto*-rajas toimub aromaatsuse rõnga katkestamine hüdrksüülrühmade vahelt. Kui aga aromaatsuse rõngas lõhutakse ühe hüdroksüülrühma kõrvalt, on tegemist *meta*-rajaga (Harwood ja Parales 1996).



Joonis 1. β -ketoadipaadi *orto*-rada bakterites. Ensüümide lühendid: P34O, protokatehhuadi 3,4-dioksügenaas; CMLE, β -karboksü-*cis,cis*-mukonaati laktoniseeriv ensüüm; CMD, γ -karboksü-mukonolaktooni dekarboksülaas; C12O, katehooli 1,2-dioksügenaas; MLE *cis,cis*-mukonaati laktoniseeriv ensüüm; MI, mukonolaktooni isomeeraas; ELH, enool-laktooni hüdrolaas; TR, β -ketoadipaat:suktsinüül-CoA transferaas; TH, β -ketoadipüül-CoA tiilaas.

1.1.2 Aromaatsete ühendite lagundamisega seotud kromosomaalsed operonid ja nende regulaatorid

Transkriptsiooni initsiatsiooniks, nii β -ketoadipaadi raja geenidelt kui ka teistelt aromaatssete ühendite lagundamisega seotud operonidelt, on vaja regulaatorvalgu ning induktormolekuli (vastava raja substraat või vaheühend) olemasolu. Induktormolekuli seostumisel spetsiifilise regulaatorvalguga muutub selle konformatsioon, võimaldades aktiveerida transkriptsiooni vastava operoni promootorilt. Regulaatorvalgu kodeeriv geen paikneb genoomis enamasti reguleeritava operoni läheduses ja on sageli sellega vastassuunaliselt transkribeeritav (Parsek jt., 1996).

Regulaatorvalgud, mis on seotud aromaatssete ühendite lagundamisega, kuuluvad kõige sagedamini LysR tüüpi valkude perekonda. Teised sageli esinevad transkriptsiooni regulaatorid kuuluvad NtrC/XylR, AraC/XylS ning IcrR valkude perekonda (Gerischer, 2002). LysR perekonda kuuluvad transkriptsiooniregulaatorid tunnevad enamasti ära vaid ühe konkreetse biodegradatiivse raja vaheühendi, millega seondues suudavad aktiveerida transkriptsiooni initsiatsiooni vastava operoni promootorilt. Regulaatorid, mis seonduvad primaarse substraadiga, võivad aktiveerida transkriptsiooni initsiatsiooni ka seondues aromaatssete ühendi mittemetaboliseeritavate struktuurialoogidega (Shingler, 2003).

P. putida tüves KT2440 on β -ketoadipaadi raja ensüümid kodeeritud kromosomaalsete *cat* ja *pca* operoni geenide poolt ning selle raja kaudu toimub mitmete looduslike aromaatssete ühendite lagundamine (joonis 1). Transkriptsiooni initsiatsioon nendelt operonidelt on reguleeritud vastavalt CatR ja PcaR regulaatorvalkude poolt (Jimenez jt., 2002).

P. putida tüve KT2440 kromosoomis paiknevad ka operonid, mis võimaldavad erinevaid aromaatssete ühendeid lagundada protokatehhuaadiks või katehhooliks. Näiteks võimaldavad *benABCDE* geenide poolt kodeeritud ensüümid bensoaadi lagundamist katehhoolini ning *pobA* geeni poolt kodeeritud ensüüm 4-hüdroksübensoaadi lagundamist protokatehhuaadiks (Harwood ja Parales, 1996).

1.1.3 Aromaatsete ühendite lagundamisega seotud plasmidsed operonid ja nende regulaatorid

Geenid, mis võimaldavad erinevaid aromaatsid ühendeid lagundada protokatehhaadiks või katehhooliks, võivad asuda ka plasmiidides. Plasmidse päritoluga on näiteks *pheA* geen, mis võimaldab fenooli lagundamist katehhooliks (Kivisaar jt., 1990).

Modifitseeritud β -ketoadipaadi raja ensüümid, mis võimaldavad looduses harva esinevate aromaatssete ühendite lagundamist, on bakterites sageli kodeeritud plasmiidide poolt. Modifitseeritud *orto*-raja ensüümid, näiteks plasmiidis pAC27 sisalduva *clc* operoni poolt kodeeritud ensüümid, võimaldavad lagundada kloreeritud substraate (Coco jt., 1993). *Meta*-raja ensüümid võivad katalüüsida metüleeritud substraatide lagundamist. Modifitseeritud *meta*- ja *orto*-rada ei esine bakterites korraga, kuna kloro- ja metüül- asendatud aromaatssete ühendite lagundamisel vale raja kaudu, tekivad lagundamatud produktid (Timmis jt., 1994).

Plasmiidides paiknevad biodegradatsiooni operonid on reguleeritud sarnaselt kromosomaalsete operonidega. Transkriptsiooni regulaatorvalgud indutseerivad transkriptsiooni biodegradatiivsete operonide promootoritelt vastusena spetsiifilisele induktormolekulile ning regulaatorvalku kodeeriv geen paikneb sageli plasmiidis, tema poolt reguleeritava operoni vahetus läheduses (Parsek jt., 1996).

Pseudomonas putida TOL plasmiidis pWW0 asuvad *xyl* geenid, mis võimaldavad bakteril lagundada tolueeni ja ksüleeni (Worsey ja Williams, 1975). Need geenid on kahes transkriptsioonilises üksuses – “ülemises” operonis paiknevad geenid vastutavad tolueeni/ksüleeni lagundamise eest bensoaadiks/alküülbensoaadiks; “alumine” *meta*-operon kodeerib ensüüme nende ühendite edasiseks lagundamiseks. Mõlemad operonid on reguleeritud pWW0 plasmidi poolt kodeeritud regulaatorite XylS (*meta*-raja Pm promootori regulaator) ja XylR (nii ülemise raja Pu promootori kui ka *xylS* geeni promootori regulaator) poolt (Ramos jt., 1997). Transkriptsioon Pu promootorilt on kontrollitud σ^{54} poolt ning Pm promootorilt σ^H ja σ^S poolt (Ramos jt., 1997; Marques jt., 1999).

dmp operon pärineb plasmiidist pVII50, mis on leitud *Pseudomonas sp.* tüvest CF600 (Shingler jt., 1993). *dmp* operoni poolt kodeeritud ensüümid võimaldavad metüülfenoolide lagundamist *meta*-raja kaudu. *dmp* operoni transkriptsioon algab promootorilt Po, mis on

positiivselt reguleeritud DmpR valgu poolt (Shingler jt., 1993). Transkriptsioon Po promootorilt on sarnaselt Pu promootorile kontrollitud σ^{54} poolt (Sze jt., 1996).

Veel üks analoogiline σ^{54} -st sõltuv (metüül)fenoolide lagundamist võimaldav operon on leitud plasmiidist pPGH1: seal paiknev *phl* operon on reguleeritud aktivaatorvalgu PhIR poolt (metüül)fenooli juuresolekul (Herrmann jt., 1995).

Lisaks tahaksin tuua näitena ka ühe mittearomaatse süsinikuühendi degradatsiooniraja, kuna antud operoni transkriptsiooni on põhjalikult uuritud nii spetsiifilise kui globaalse regulatsiooni seisukohast. Mullabakter *P. oleovorans* on võimeline kasutama *n*-alkaane ainsa süsiniku- ja energiaallikana. Transkriptsiooni aktivatsioon *alk* operoni promootorilt (*PalkB*) indutseeritakse raja substraatide poolt aktivaatorvalgu AlkS vahendusel (van Beilen jt., 1994). Alkaanide puudumisel toimub *alkS* geeni ekspressioon madalal tasemel *PalkS1* promootorilt, mis on positiivselt kontrollitud σ^S poolt (Canosa jt., 1999). Alkaanide esinemisel kasvukeskkonnas represserib PalkS transkriptsiooni *PalkS1* promootorilt ja aktiveerib *PalkS2* promootori, millelt toimub tugev *alkS* geeni ekspressioon (Canosa jt., 2000).

1.1.4 Biodegradatiivsete operonide rist-regulatsioon

Kataboolsete operonide transkriptsiooni regulatsiooni uurides on kirjeldatud süsteeme, kus regulaatorvalk suudab aktiveerida või represserida transkriptsiooni ka n.ö. võõrastelt geenidelt (Shingler, 2003).

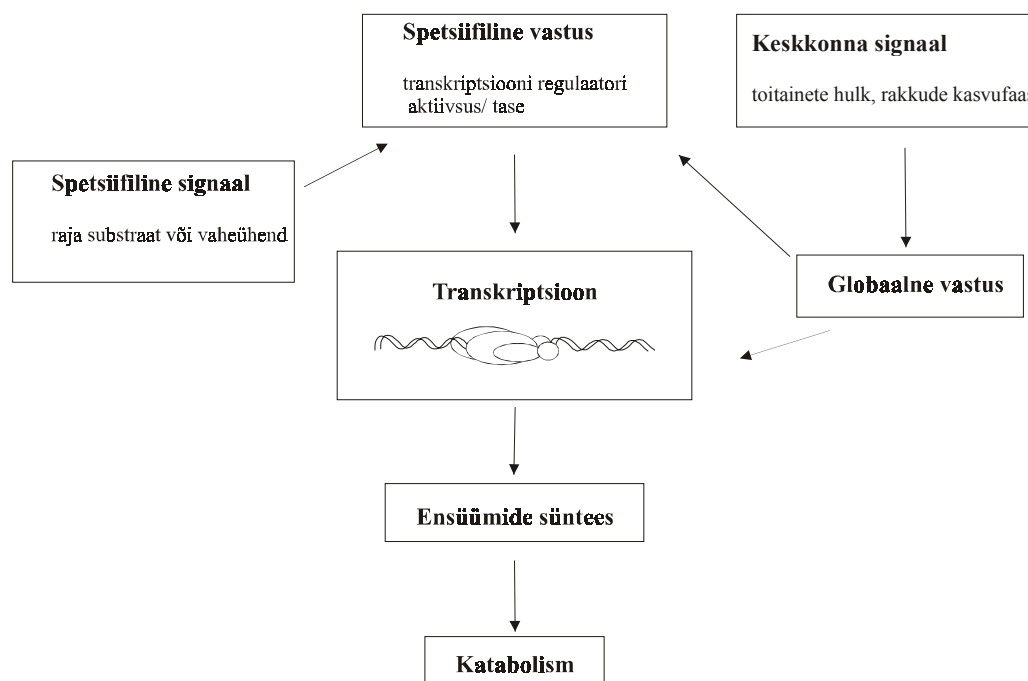
P. putida tüves PRS2000 on kirjeldatud BenR valgu poolt kontrollitud regulatsioonimehhanismi, kus β -ketoadipaadi *orto*- ja *meta*-raja substraatide (vastavalt 4-hüdrosübensoaat ja bensoaat) koosinemise korral on eelistatud substraadiks bensoaat. BenR valk aktiveerib vastusena bensoaadile transkriptsiooni bensoadi degradatsiooni operonilt ning samal ajal represserib transkriptsiooni *pcaK* geenilt (kodeerib 4-hüdrosübensoaadi permeaasi). BenR valk (kuulub XylS valguga ühte perekonda) on bensoadi juuresolekul võimeline indutseerima transkriptsiooni ka TOL plasmidi pWW0 *meta*-raja *xyl* geenidelt, mis on tavaliselt reguleeritud XylS valgu poolt (Cowles jt., 2000).

Ühte valguperekonda kuuluvate regulaatorite puhul on kirjeldatud teisigi kataboolseid operone, kus kaks regulaatorit on võimelised aktiveerima transkriptsiooni teineteise poolt reguleeritavatelt promootoritelt. Näiteks Pu transkriptsiooni regulaator DmpR on suuteline initsieerima transkriptsiooni XylR poolt reguleeritavalt Po promootorilt ja vastupidi

(Fernandez jt., 1994). Samuti on näidatud kuidas katehhooli lagundamiseks vajaliku *cat* operoni regulaatorivalk CatR on võimeline initsieerima transkriptsiooni ka klorokatehhooli lagundamiseks vajaliku *clc* operoni promootorilt (Parsek jt., 1994a.).

1.2 Rakkude füsioloogilisest seisundist tulenevad transkriptsiooni regulatsiooni mehhanismid kataboolsetel operonidel

Lisaks erinevale spetsiifilisele regulatsioonile on aromaatsete ühendite lagundamisega seotud operonid ülemuslikult kontrollitud rakkude üldise metaboolse seisundi poolt (joonis 2). Selline globaalne kontroll hõlmab esiteks mehhanisme, mis põhjustavad eelistatud süsinikuallika olemasolul bakterite kasvukeskkonnas teiste süsinikuallikate degradatsiooniradade ekspressiooni pärssimist (kataboolne repressioon) (Gerischer 2002). Teiseks on paljude biodegradatiivsete radade puhul kirjeldatud rikkas söötmes rakkude kasvufaasist sõltuvat regulatsiooni, mida nimetatakse eksponentsiaalseks vaigistamiseks (Cases jt. 1996).



Joonis 2. Skemaatiline joonis spetsiifilise ja keskkonnast tulevate signaalide koostoime võimalustest kataboolse raja ekspressioonile (Shingler, 2003).

1.2.1 Eksponentsiaalne vaigistamine ja kataboliitne repressioon - kaks eristatavat füsioloogilise kontrolli mehhanismi.

Mõiste “eksponentsiaalne vaigistamine” (“*exponential silencing*”) on kasutusele võetud Cases jt. (1996) poolt kirjeldamaks regulatsioonimehhanismi, kus rikkas söötmes on transkriptsioon biodegradatiivsete operonide promootoritelt repressseeritud kuni bakterirakud on jõudnud statsionaarsesse kasvufaasi. Selline regulatsioonimehhanism võib olla saavutatud erinevate faktorite poolt, mis mõjutavad kas promootori DNA topoloogiat, operoni regulaatorvalgu hulka ja aktiivsust või RNA polümeraasi seondumist spetsiifilise sigma faktoriga (Cases ja de Lorenzo, 2001).

Bakterirakkude kasv kahte erinevat süsinikuallikat sisaldaval söötmel võib olla kahefaasiline, mis tähendab, et üks süsinikuallikas tarvitatakse ära enne kui teine kasutusele võetakse. Sellist regulatsioonimehhanismi nimetatakse kataboliitseks repressiooniks (Collier jt. 1996). Erinevalt enterobakteritest ei ole pseudomonaadidel eelistatud süsinikuallikaks enamasti mitte glükoos vaid orgaanilised happed nagu suktsinaat, tsitraat ja atsetaat. Teiseks erinevuseks võrreldes enterobakteritega on ka see, et kataboliitse repressiooni vahendamisel ei ole signaalmolekuliks cAMP. Ühist signaalmolekuli/signaali erinevate substraatide poolt põhjustatud kataboliitse repressiooni korral ei olegi leitud. Siiski on võimalik, et erinevate kataboliitset repressiooni esilekutsuvate substraatide metabolismi korral, vahendab repressiooni ikkagi kõigil juhtudel üks ja sama või vähesed erinevad signaalid. Nendeks signaalideks võivad olla nii metabolismi vaheühendid kui ka üldisemad metaboolse seisundi indikaatorid nagu näiteks redutseeriva energia hulk, prootongradiendist tuleneva energia hulk või ka kõrge energiasisaldusega fosfodiester sidemete kättesaadavus (Collier jt. 1996).

Kuna perekonna *Pseudomonas* bakteritel ei esine niiõelda klassikast enterobakterites kirjeldatud kataboliitset repressiooni, siis on võimalik, et mõnede biodegradatiivsete operonide puhul saavutatakse nii süsinikuallikast kui kasvufaasist sõltuv transkriptsiooni repressioon ühe ja sama füsioloogilise signaali vahendusel. Pu promootori puhul on aga näidatud et süsinikuallikast ja bakterite kasvufaasist tulenevad signaalid on üksteisest eristatavad (Cases ja de Lorenzo, 2000).

1.2.2 Kataboliitset repressiooni vahendav valk Crc *P. putida* rakkudes.

Valkudest, mis osalevad rohkem kui ühe metaboolse raja kataboliitises repressioonis, on esimesena kirjeldatud Crc (“*catabolite repression control*”) valk. Crc valk mõjutab *P. putida* rakkudes selliste geenide ekspressiooni nagu glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas, amidaas ja hargnenud ahelatega ketohapete dehüdrogenaas. Crc valgu suhtes defektse tüve fenotüübi põhjal on järeldatud, et antud valk osaleb nende geenide repressioonis eelistatud süsinikuallika olemasolul, mitte ei aktiveeri geene, kui eelistatud süsinikuallikas puudub (nagu see toimub enterobakteritel) (Collier jt. 1996; Hester jt., 2000). Nii *P. putida* kui *P. aeruginosa* Crc valgud ei oma homoloogiat seni kirjeldatud DNA-ga seonduvate regulaatorvalkudega, ning nende struktuuris ei ole leitud ka DNA-ga seondumiseks vajalikku heeliks-pööre-heeliks motiivi. Seega arvatakse, et Crc valk ise ei ole transkriptsiooni repressor, vaid on komponent regulatoorsest kaskaadist, mille lõplikuks väljundiks on transkriptsiooni pärssimine teatud promootoritelt (Collier jt. 1996).

Lisaks kataboliitsele repressioonile on leitud, et Crc valk osaleb ka eksponentsiaalses vaigistamises. *P. putida* tüve KT2440 puhul on näidatud, et rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates bakterirakkudes ei toimu Crc valgu suhtes defektset tüves transkriptsiooni repressiooni selliste aromaatsete ühendite lagundamisega seotud geenidelt nagu *benA*, *pobA*, *pcaGH*, *hpd*, *hmgA*, *mai*, *catABC* (Morales jt., 2004).

alk operoni puhul on leitud, et Crc valk mõjutab transkriptsiooni nii *alk* operoni promootorilt *PalkB* kui ka regulaatorvalku kodeeriva geeni promootorilt *PalkS2*. Crc defektsetes tüves on rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes transkriptsiooni tase kõrgem võrreldes algse tüvega. Ometi jääb alles 5-6 kordne repressioon, mis viitab sellele, et lisaks Crc-le peab transkriptsiooni vaigistamiseks rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes olema veel mingi süsteem. Oletatakse, et Crc valk mõjutab transkriptsiooni *PalkB* ja *PalkS* promootoritelt, reguleerides AlkS valgu ekspressiooni translatsiooni efektiivsuse kaudu (Yuste jt., 2001).

1.2.3 Hingamisahela seos kataboolsete operonide ekspressiooni regulatsiooniga

Uurides *phl* ja *alk* operonide regulatsiooni mehhanisme, on leitud seos kataboliitse repressiooni ning hingamisahela komponentide vahel (Petruschka jt., 2001; Dinamarca jt., 2002).

Lisaks aa₃-tüüpi tsütokroomi oksüdaasile, mis on kõige levinum ja omab suurt sarnasust mitokondriaalse tsütokroomi oksüdaasiga, on pseudomonaadidel kirjeldatud mitmeid alternatiivseid terminaalse oksüdaasi komplekse. Ubikinooli terminaalse oksüdaasi komplekse on kaks ning need on kodeeritud vastavalt *cyo* ja *cyd* operonide poolt (Hirayama jt., 1998). *Escherichia coli* puhul on teada, et *cyo* operoni ekspressioon on maksimaalne bakterite eksponentsiaalses kasvufaasis, samas kui *cyd* operoni transkriptsioon initsieeritakse statsionaarses kasvufaasis või tingimustel, kus hapniku kontsentratsioon on madal. Selle põhjuseks on tsütokroom *d* oksüdaasi kõrge afiinsus hapnikule, kuigi samal ajal transpordib ta võrreldes tsütokroom *o* oksüdaasiga ühe prootoni elektroni kohta vähem (Alexeeva jt., 2000).

Petruschka jt. (2001) näitasid, et tsütokroom *o* oksüdaasi suhtes defektsest tüves vähenes *phl* operoni transkriptsiooni kataboliitne repressioon suktsinaadi poolt. Sarnased tulemused on saadud ka alkaanide degradatsiooni *alk* operoni puhul, kuid lisaks orgaaniliste hapete poolt põhjustatud kataboliitsele repressioonile, väheneb tsütokroom *o* oksüdaasi suhtes defektse tüves ka rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes transkriptsiooni repressioon *PalkB* ja *PalkS* promootoritelt (Dinamarca jt., 2002). Saadud tulemused kinnitavad hüpoteesi, et eelistatud süsinikuallika olemasolul võiks bakteriraku poolt tunnetatud signaaliks olla prootongradiendist tuleneva energia hulk (Collier jt. 1996).

1.2.4 Pu promootori kataboolset repressiooni vahendavad valgud PtsN ja PtsO

Enterobakterites toimub kataboliitse repressiooni signaali edasikandmisel fosfoenoolpüruvaadist sõltuva transportsüsteemi (PTS) komponentide fosforüleerimine. Pseudomonaadidel on seni kirjeldatud ainult ühe biodegradatiivse operoni puhul sarnane regulatsioonimehhanism. Tolueeni ja ksüleenide degradatsiooniraja ülemise operoni Pu promootorilt on transkriptsioon pärssitud glükoosi ja glükonaadi esinemisel minimaalsöötmes (Holtel jt., 1994). On leitud, et Pu promootori kataboolset repressiooni vahendavad valgud

PtsN ja PtsO. Mõlemad geenid *ptsN* ja *ptsO* kodeerivad PTS perekonna valke IIA ja NPr (Cases jt., 1999; Cases jt., 2001). Kuidas jõuab PtsN ja PtsO vahendatud signaal Pu promootori transkriptsiooni initsiatsiooni regulatsioonini, pole selge.

1.2.5 σ -faktorite osalus biodegradatiivsete operonide transkriptsiooni initsiatsiooni regulatsioonis.

Bakteriaalse RNA polümeraasi sigma subühikuga vastutab promootori äratundmise spetsiifika eest. *P. putida* tüve KT2440 genoomist on leitud 24 sigma faktorit kodeerivat geeni. Neist 19 kuuluvad ekstratsütoplasmaatilise funktsiooniga sigma faktorite alam perekonda (neist 13 on oletatavalt seotud raua omastamiseks vajalike geenide ekspressiooniga) ning ülejäänud viis on sarnased *E. coli* poolt kodeeritud sigma faktoritega (Martinez-Bueno jt., 2002). Peamine sigma faktor, mis vastutab raku elutegevuseks vajalike geenide ekspressiooni eest on σ^{70} . Alternatiivseteks sigma faktoriteks on σ^S , σ^H , σ^{28} ja σ^{54} . Kuna mitmete aromaatsete ühendite katabolismiga seotud operonide transkriptsioon on kontrollitud alternatiivsete sigma faktorite poolt, siis on see samuti üheks võimalikuks kontrollpunktiks, mille kaudu saab bakterirakus toimuda kataboolse operoni transkriptsiooni regulatsioon sõltuvalt bakterite füsioloogilisest seisundist (Cases ja de Lorenzo, 2001).

TOL plasmiidis asuva *meta*-rada kodeeriva *xyl* operoni XylS-i poolt reguleeritavalt Pm promootorilt lähtuvat transkriptsiooni kontrollitakse kahe erineva alternatiivse sigma faktori kaudu. Eksponentsiaalses kasvufaasis sõltub Pm promootorilt lähtuv transkriptsioon σ^H -st ja statsionaarses kasvufaasis σ^S -st. Lisaks sellele on näidatud, et mitmed aromaatsed ühendid nagu näiteks 3-metüülbensoaat, suudavad bakterirakkudes esile kutsuda kuumašokiga sarnase vastuse, mille tulemusena tõuseb σ^H tase (Marques jt., 1999).

Sigma 54-st sõltuvate promootorite puhul on füsioloogiline kontroll osaliselt saavutatud sigma 54 aktiivsuse regulatsiooni kaudu. Näiteks *xyl* operoni Pu promootori puhul on näidatud, et ka rikkas söötmes võimaldab σ^{54} üleekspressioon transkriptsiooni toimumist juba eksponentsiaalses kasvufaasis (Cases jt., 1996).

1.2.6 Signaalmolekul guanosiin tetrafosfaadi(pentafosfaat) (p)ppGpp

Süsiniku ja aminohapete nälja korral toimub *relA* ja *spoT* geenidelt kodeeritud valkude abil signaalmolekuli guanosiin tetrafosfaadi (p)ppGpp süntees, mille akumulereerumine vallandab rakus nn. "*stringent*" vastuse (Schreiber jt., 1991).

Signaalmolekul ppGpp seondumine RNA polümeraasi katalüütilise osaga muudab sigma faktorite seondumisafiinsust. See võimaldab alternatiivsetel σ faktoritel efektiivsemalt konkureerida σ^{70} subühikuga ning aminohapete nälja korral suureneb alternatiivsete σ faktoritega seondunud holoensüümi hulk (Laurie jt., 2003). Näiteks Po promootorilt lähtuvat transkriptsiooni mõjutab positiivselt aminohapete nälja korral suurenenud ppGpp hulk (Sze ja Shingler, 1999).

Lisaks σ faktorite konkureerimisele võib ppGpp mõjutada transkriptsiooni erinevatelt promootoritelt kas positiivselt või negatiivselt sel viisil, et seondub RNA polümeraasi β ja β' subühikutega, mõjutades sellega avatud kompleksi stabiilsust (Toulokhnov jt., 2001).

Signaalmolekul ppGpp võib mõjutada kataboolsete operonide transkriptsiooni ka kaudsemalt. Näiteks tõstab ppGpp üleekspressioon IHF-i (DNA-ga seonduv arhitektuurne valk) taset juba eksponentsiaalses kasvufaasis. IHF mõjutab omakorda enamike σ^{54} -sõltuvate promootorite transkriptsiooni positiivselt nii DNA-d painutades kui ka otsese interaktsiooni kaudu RNA polümeraasiga (Bertoni jt., 1998). Kuna IHF-i seondumisjärjestused ei ole eksponentsiaalses kasvufaasis tavaliselt IHF-ga küllastunud, siis näiteks *xyl* operoni Pu promootorilt lähtuva transkriptsiooni vaigistamist eksponentsiaalses kasvufaasis mõjutab ppGpp üleekspressioon peamiselt IHF-i taseme tõusu kaudu. Sarnaselt vähendab ka IHF-i üleekspressioon Pu promootorilt lähtuva transkriptsiooni sõltuvust bakterite kasvufaasist (Carmona jt., 2000).

Transkriptsiooni stimuleeriv mõju statsionaarse kasvufaasi spetsiifilistele promootoritele võib avalduda ka selle kaudu, et ppGpp mõjutab positiivselt σ^S taset rakus (Bertani jt., 2003).

1.2.7 Katabolse raja regulaatorvalgu hulga ja aktiivsuse kaudu toimuvad regulatsioonimehhanismid

Kuna kataboolse raja geenide ekspressioon saab toimuda ainult aktiveeritud regulaatori olemasolul, siis võib regulaatorvalgu kodeeriva geeni ekspressioon või regulaatorvalgu enda hulk/aktiivsus olla füsioloogilise kontrolli all (joonis 2).

Regulaatorvalgu ekspressioonitaseme tõstmine võib viia olukorrani, kus transkriptsiooni initsiatsioon kataboolse operoni promootorilt ei allu enam füsioloogilisele kontrollile. Näiteks DmpR valgu üleekspressiooni korral suureneb transkriptsioon Po promootorilt ning seetõttu kaob tüves, kus *dmpR*-i geenikoopiate arv on suurenenud, Po promootorilt lähtuva transkriptsiooni sõltuvus teistest faktoritest nagu näiteks bakterite kasvufaas (Sze jt., 1996). Sarnaselt eelpool toodud näitele kaob füsioloogiline kontroll kataboolsete operonide ekspressiooni üle ka PhlR ja AlkS regulaatorvalkude üleekspressiooni korral (Müller jt., 1996; Yuste jt., 1998). Samas jääb *xyl* operoni Pu promootori transkriptsiooni initsiatsiooni sõltuvus rikkas söötmes bakterite kasvufaasist alles ka regulaatorvalgu XylR üleekspresiooni korral (Perez-Martin ja de Lorenzo, 1996).

Üheks üldiseks transkriptsiooni regulaatoriks, mis mõjutab paljusid σ^{54} sõltuvaid promootoreid, on FtsH valk, mis võib käituda nii proteaasi kui ka shaperonina. *E. coli* FtsH⁻ mutandiga läbiviidud katsed on näidanud, et XylR-ist sõltuv transkriptsioon Pu promootorilt langeb FtsH valgu puudumise korral drastiliselt (Carmona jt., 1999). XylR, nagu paljud teised σ^{54} -st sõltuvate promootorite regulaatorid, moodustab kõrgema järgu oligomeere vastusena spetsiifilisele signaalmolekulile ja nukleotiidide seondumisele valgu C-domääniga. Erinevalt XylR-st oligomeriseerub DmpR ka ilma DNA-ga seondumata (Wikstrom jt., 2001). Sellest tulenevalt on püstitatud hüpotees, et FtsH-st sõltuvad σ^{54} poolt äratuntavate promootorite regulaatorid vajavad FtsH valku, kas regulaatori korrektseks voltimiseks või regulaatori oligomeeride ja/või regulaator- σ^{54} kompleksi assambleerimiseks (Sze jt., 2001)

1.3 *P. putida* catBCA ning pheBA operon

P. putida tüvi PaW85 on võimeline kasutama süsinikuallikana fenooli, lagundades seda kateholiks ja edasi *orto*-raja kaudu tsitraaditsükli vaheühenditeks. Selleks peavad

bakterirakkudesse ekspresseeruma geenid, mis kodeerivad *orto*-raja raja ensüüme ja fenooli monooksügenaasi.

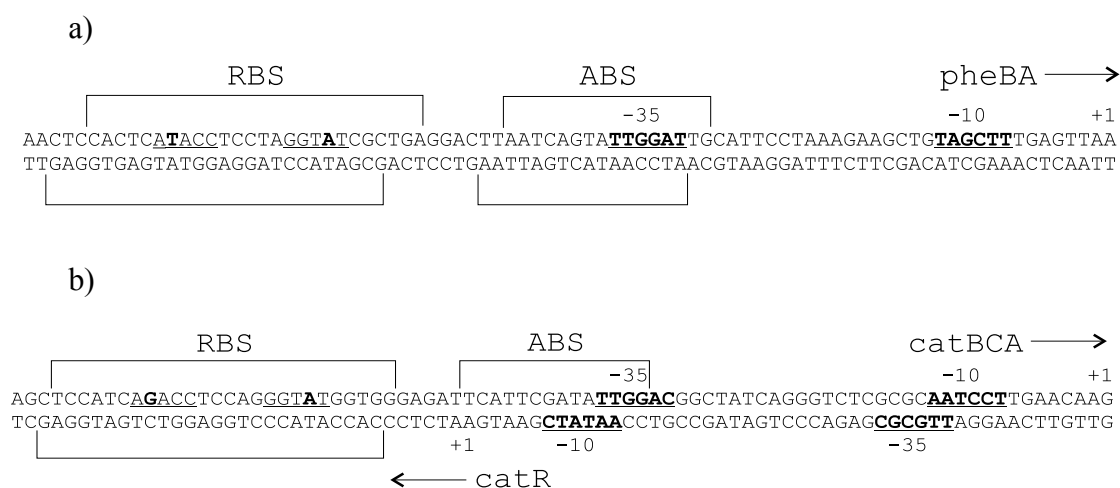
pheBA operon on plasmiidse päritoluga ning on algselt leitud *Pseudomonas sp.* tüvest EST1001 (Kivisaar jt., 1990). Geen *pheA* kodeerib fenooli monooksügenaasi, mis lagundab fenooli katehhooliks. Katehhool degradeeritakse *pheB* geeni produkti katehhooli 1,2-dioksügenaasi poolt *cis,cis*-mukonaadiks (Kivisaar jt., 1990). Selleks, et *P. putida* rakud saaksid kasvada fenoolil, on vajalik *pheBA* operoni ja kromosomaalse *orto*-rada kodeeriva *catBCA* operoni koosavaldumine (Kasak jt., 1993). *pheBA* ja *catBCA* poolt kodeeritud fenooli degradatsiooniraja puhul on katehhooli 1,2-dioksügenaas dubleeritud: lisaks plasmiidsele *pheB*-le, kodeerib seda ka kromosomaalne *catA* geen. Ülejäänud *catBCA* operoni geenid *catB* ja *catC* kodeerivad vastavalt *cis,cis*-mukonaati laktoniseerivat ensüümi ja mukonolaktooni isomeraasi (Houghton jt., 1995).

1.3.1 *pheBA* ja *catBCA* operonide spetsiifiline transkriptsiooni regulatsioon

pheBA ja *catBCA* operonide transkriptsiooni regulatsioon on väga sarnane. Transkriptsiooni initsiatsiooniks nii *pheBA* kui ka *catBCA* promootoritelt on vajalik LysR perekonda kuuluv regulaatorvalk CatR (Parsek jt., 1995; Kasak jt., 1993). *catR* geen asub *P. putida* kromosoomis *catBCA* operoni ees ning transkriptsioon *catR* geeni promootorilt toimub *catBCA* operonile vastassuunaliselt ja teiselt DNA ahelalt. *catR* ja *catBCA* promootorid kattuvad kahe aluspaari ulatuses (Rothmel jt., 1990) (joonis 3).

Nii *pheBA* kui ka *catBCA* promootoril on konserveerunud CatR valgu seondumisjärjestused RBS (“*recognition binding site*”) ja ABS (“*activation binding site*”). RBS regioon asub *pheBA* promootoril positsioonis -78 kuni -53 transkriptsiooni alguspunktist, *catBCA* promootoril positsioonis -76 kuni -51. ABS regioon asub *pheBA* promootoril positsioonis -46 kuni -31 transkriptsiooni alguspunktist ja *catBCA* puhul positsioonis -47 kuni -35. RBS sisaldab LysR perekonna valkude poolt äratuntavat motiivi T-N₁₁-A katkestatud pöördkordusjärjestustes, mis on vajalikud CatR valgu seondumiseks RBS regiooni. *catBCA* promootoril on LysR valkude poolt äratuntavas motiivis T nukleotiidi asemel G ja seepärast seondub CatR sinna väiksema afiinsusega kui *pheBA* promootori RBS järjestusele (Parsek jt., 1992; Parsek jt., 1994b). Transkriptsiooni initsiatsiooniks on vajalik, et CatR seonduks lisaks RBS järjestusele ka ABS järjestusele. Seondumiseks ABS regiooni

vajab CatR induktormolekuli, milleks on katehhooli lagundamise produkt *cis,cis*-mukonaat (CCM). Alles CCM-ga seondumise tulemusena muutub CatR-i konformatsioon selliseks, et CatR on võimeline seonduma ABS järjestusele. CatR-i seondumine on kooperatiivne: seandumiseks ABS regiooni on vajalik selle valgu eelnev seondumine RBS regiooni. Mõlemal promootoril kattub ABS järjestus -35 heksameeriga (joonis 3). Transkriptsiooni initsiatsiooniks *pheBA* ja *catBCA* promootoritelt on vajalik RNA polümeraasi α -subühiku (α -CTD) interaktsioon ABS järjestusele seondunud CatR valguga (Chugany jt., 1997). Lisaks võib α -CTD interakteeruda ka promootorregiooni DNA-ga, nn. UP-elementiga (McFall jt., 1998).



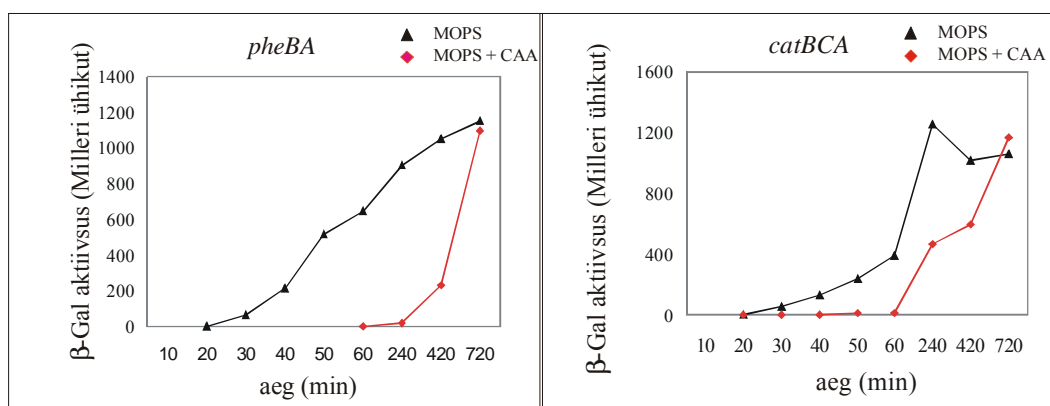
Joonis 3. (a) *pheBA* ning (b) *catBCA* ja *catR* promootorite nukleotiidne järjestus. Klambritega on näidatud CatR-i seondumisjärjestused RBS ja ABS. Katkestatud pöördkordusjärjestused RBS-is on alla joonitud, ning konserveerunud nukleotiidid LysR perekonna valkude poolt äratuntavas motiivis on tumedalt trükitud. Nukleotiidid -35 ja -10 heksameerides on alla joonitud ja tumedas trükis. Transkriptsiooni alguspunkti tähistab +1.

Lisaks transkriptsiooni aktivatsioonile võib CatR transkriptsiooni *pheBA* ja *catBCA* operonidelt osaliselt ka represserida. Mõlemal operonil on leitud IBS (“*internal binding site*”) järjestus. *catBCA* operonil paikneb IBS järjestus *catB* geeni sees, positsioonis +164 kuni +191 transkriptsiooni alguspunkti suhtes, ja *pheBA* operonil positsioonis +204 kuni +221. *catBCA* operoni IBS järjestus sisaldab osalist katkestatud pöördkordusjärjestust LysR valkude poolt äratuntava motiiviga G-N₁₁-A, mis on identne RBS regioonis paikneva motiiviga. *pheBA* operoni IBS regioon sisaldab samuti osalist katkestatud pöördkordusjärjestust motiiviga T-N₁₁-A (Parsek jt., 1996; Tover jt., 2000). IBS regiooni

seondunud CatR valgu repressiiv mõju *pheBA* operoni transkriptsioonile on 2-2,5 kordne ning *catBCA* operonile 3-3,5 kordne (Tover jt., 2000; Chugani jt., 1998).

1.3.2 Bakterirakkude füsioloogilise seisundi mõju *pheBA* ja *catBCA* operonide transkriptsiooni regulatsioonile

Transkriptsioon initsiatsioon *pheBA* ja *catBCA* operonidelt on lisaks spetsiifilisele, CatR-vahendatud regulatsioonile, seotud ka bakterirakkude füsioloogilise seisundiga. Selline mitmetasemeline regulatsioon võimaldab bakteril kõige ökonoomsemalt oma metabolismi korraldada (Tover jt., 2001). Rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates *P. putida* rakkudes on transkriptsioon nii *pheBA* kui ka *catBCA* promootorilt pärssitud ning aktiveeritakse alles statsionaarses kasvufaasis (Tover jt., 2001).



Joonis 3. Aminohapete mõju transkriptsioonile *pheBA* ja *catBCA* promootoritelt. Baktoreid kasvatati MOPS minimaalsöötmes, mis sisaldas süsinikuallikana glükoosi (10 mM) ja induktorina Na-bensoaati (0,5 mM). β -galatosidaasi aktiivsused on mõõdetud *P. putida* rakkudest aminohapete (0,5% CAA) olemasolul söötmes ja ilma (Tover jt., 2001).

Rakkude kasvatamisel minimaalsöötmes toimub transkriptsiooni aktivatsioon *catBCA* ja *pheBA* promootoritelt juba eksponentsiaalse kasvufaasi alguses (Tover jt., 2001). Aminohapete lisamine minimaalsöötmele pärssib neilt promootoritelt eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes transkriptsiooni (joonis 3). Seda nähtust edasi uurides selgus, et kasvufaasist sõltuvat efekti ei põhjusta ükski spetsiifiline aminohape. Aminohapete gruppide (5 või 15 aminohapet) lisamine põhjustab osalist transkriptsiooni langust uuritavatelt

promootoritelt. Seega on tegemist pigem rakkude üldisest füsioloogilisest seisundist tulenevate signaalidega (Tover jt., 2001).

Transkriptsioon initsiatsioon *pheBA* operoni promootorilt, on reguleeritud sõltuvalt bakterirakkude füsioloogilisest seisundist, mehhanismide abil, mida ei ole siiani kindlaks tehtud. Seepärast sai käesoleva töö eesmärgiks selgitada välja, milliste regulatsioonimehhanismide kaudu saavutatakse kontroll *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni üle, sõltuvalt bakterirakkude kasvukeskkonnast ja kasvufaasist tulenevatest signaalidest.

2 Materjal ja metoodika

2.1 Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1. *Escherichia coli* tüvesid TG1 ja CC118λpir kasutasime kloneerimisel. *Escherichia coli* tüve HB101, mis kandis helperplasmidi pRK2013, kasutasime mittekonjugatiivset plasmiidide ülekandmiseks *Pseudomonas putida* rakkudesse.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid (järgneb lk. 22).

Bakteritüvi või plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
Tüved		
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB⁺ lac^f lacZΔM15)</i>	Carter jt., 1997
HB101	<i>supE44 hsd20(τ_B⁻ m_B) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2</i> <i>rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer jt., 1996
CC118λpir	<i>galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1, λpir phage</i> lysogen	Herrero jt., 1990
<i>P. putida</i>		
PaW85	identne tüvega KT2440	Bayley jt., 1977
PaWpheBA	PaW85; <i>pheBA</i> , Km ^r	käesolev töö
PaWlux-pheBA	PaW85; <i>luxAB</i> geenid <i>pheBA</i> promootori kontrolli all, <i>pheBA</i> , Km ^r Sm ^r	käesolev töö
PaWlux-pheBA-CatB::tet	PaWlux-pheBA; <i>catB::tet</i> , Km ^r Sm ^r Tet ^r	käesolev töö
PaWlux-pheBA-CatR	PaWlux-pheBA; <i>catR</i> geen <i>Ptac</i> promootori kontrolli all, Km ^r Sm ^r Tet ^r	käesolev töö
PaWPheB	PaW85; <i>pheB</i> geen <i>Ptac</i> promootori kontrolli all, Tet ^r	käesolev töö
Plasmiidid		
pBluescript KS(+)	Kloneerimisvektor (Amp ^r)	Stratagene
pUC18Not	Kloneerimisvektor (Amp ^r)	Herrero jt., 1990
pRK2013	Km ^r Mob ⁺ Tra ⁺	Figurski jt., 1979
pKRZ-1	Kloneerimisvektor (Amp ^r Km ^r)	Rothmel jt., 1991
pPR9TT	Ühekoopiaalne laia peremeesringiga kloneerimisvektor (Amp ^r Cm ^r)	Santos jt., 2001
pUTmini- Tn5Sm	Tn5 Sm minitransposooni sisaldav pUT plasmiid (Amp ^r Sm ^r)	de Lorenzo jt., 1993
pUTmini-Tn5Km2	Tn5 Km2 minitransposooni sisaldav pUT plasmiid (Amp ^r Km ^r)	de Lorenzo jt., 1993
pUTmini-Tn5Tel	Tn5 Tel minitransposooni sisaldav pUT plasmiid (Amp ^r Tet ^r)	Sanchez-Romero jt., 1998
pAT1142	<i>pheBA</i> operon plasmiidis pAYC32	Kasak jt., 1993
pUCNotP _i <i>pheBA</i>	<i>pheBA</i> geene sisaldav 6,3 kb <i>SacI-EcoRI</i> fragment plasmiidist pAT1142 kloneeritud plasmidi pUC18Not	käesolev töö

Tabel 1 (järg). Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid (algus lk. 21).

Bakteritüvi või plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
Plasmiidid		
pUTP _{phe} BAKm	Indutseeritavad <i>pheBA</i> geenid plasmiidist pUCNotP _{phe} BA kloneeritud plasmidi pUTmini-Tn5Km2	käesolev töö
pGP704 <i>catB::tet</i>	<i>catB::tet</i> allele plasmiidis pGP704del	Saks, 2002
pBRlacIac	<i>Ptac</i> promootor ja <i>lacF^l</i> repressor plasmiidis pBR322	Ojangu jt., 2000
<i>catR</i> SDKS	<i>P. putida</i> PaW85 <i>catR</i> geen kloneeritud vektori pBluescript KS(+) <i>EcoRV</i> saiti	käesolev töö
pBRlacIaccatRSD	<i>EcoRI-HindIII catR</i> geen sisaldav fragment plasmiidist <i>catR</i> SDKS kloneeritud plasmidi pBRlacIac	käesolev töö
pUCNotP <i>tac</i> CatR	<i>lacF^l-P<i>tac</i>-catR</i> ekspressioonikassetti sisaldav <i>EcoRI-NheI</i> fragment plasmiidist pBRlacIaccatRSD kloneeritud vektorisse pUC18Not	käesolev töö
pUT <i>tac</i> CatRTel	<i>lacF^l-P<i>tac</i>-catR</i> plasmiidist pUC18Not kloneeritud plasmidi pUTmini-Tn5Tel	käesolev töö
pBRlacIac <i>pheB</i>	<i>pheB</i> geeni sisaldav <i>HincII-Eco47II</i> fragment plasmiidist pAT1142 inserteeritud plasmidi pBRlacIac	käesolev töö
pUCNotP <i>tac</i> P <i>heB</i>	<i>lacF^l-P<i>tac</i>-p<i>heB</i></i> ekspressioonikassetti sisaldav <i>Ecl136II-BamHI</i> fragment plasmiidist pBRlacIac <i>pheB</i> kloneeritud plasmidi pUC18Not	käesolev töö
PUT <i>tac</i> P <i>heB</i> Tel	<i>lacF^l-P<i>tac</i>-p<i>heB</i></i> ekspressioonikassett plasmiidis pUTmini-Tn5Tel	käesolev töö
p9TTdelBam	Plasmiid pPR9TT, millest on <i>BamHI</i> fragmendina deleteeritud <i>lacZ</i> geen	käesolev töö
p9TTlacZ	Kloneerimisvektor p9TTdelBam, mis sisaldab reportergeenina <i>lacZ</i> geeni plasmiidist pKRZ-1	käesolev töö
p9TT <i>tac</i> - <i>lacZ</i>	Plasmiid p9TTlacZ, mis sisaldab <i>lacZ</i> geeni <i>Ptac</i> promootori ja <i>lacF^l</i> repressori kontrolli all	käesolev töö

2.2 Söötmed

E. coli rakke kasvasime LB söötmel (Miller, 1972) 37 °C juures. Vedelsöötmes kasvatades aereerisime kultuure loksutil. Plasmidi sisaldavate *E. coli* rakkude selekteerimiseks peale transformatsiooni kasutasime antibiootikume ampitsiliin (Amp) (0,1 mg/ml), kanamütsiin (Km) (0,05 mg/ml), streptomütsiin (Sm) (0,05 mg/ml), tetratsükliin (Tet) (0,01 mg/ml) ja raskemetalli Na-telluriit (0,04 mg/ml).

P. putida tüvesid kasvasime M9 (Adams, 1959) baasil valmistatud minimaalsöötmel 30 °C juures. Minimaalsöötmele lisasime mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960) 2,5 ml/l ja glükoosi lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Aminohapete mõju uurimiseks kasutasime 20%-list CAA (casamino acids) lahust, mis sisaldab kõiki aminohappeid. Plasmidi seleksiooniks *P. putida* rakkudes kasutasime antibiootikumi karbenitsiliin (Cb) (1

mg/ml). *P. putida* tüvede selektsiooniks kasutasime antibiootikume Tet (0,08 mg/ml) ning Km, Sm ja Tel samades kontsentratsioonides nagu *E. coli* puhul.

2.3 Plasmiidide ja bakteritüvede konstrueerimine

Fenooli lagundava *P. putida* tüve konstrueerimiseks kloneerisime 6,3 kb suuruse *pheBA* operoni sisaldava DNA fragmendi restriктаasidega *SacI* ja *EcoRI* välja plasmiidist pAT1142 (Kasak jt., 1993) ning sisestasime samade restriктаasidega avatud vektorisse pUC18Not (Herrero jt., 1990). Saadud plasmiidist pUCNotP₁*pheBA* kloneerisime *pheBA* operoni sisaldava *NotI* fragmendi edasi plasmidi pUTmini-Tn5 Km2 (de Lorenzo jt., 1993). Saadud plasmidi pUT₁*pheBA*Km kasutasime selleks, et inserteerida minitransposooni koosseisus olev katehhooli 1,2-dioksügenaasi ja fenooli monooksügenaasi kodeeriv *pheBA* operon *P. putida* tüve PaW85 kromosoomi. Saadud tüve nimetasime PaW₁*pheBA*.

Transkriptsiooni uurimiseks *pheBA* promootorilt kasutasime *luxAB* geenidel põhinevat reportersüsteemi, mis võimaldab mõõta reportergeenide poolt kodeeritud lutsiferaasi aktiivsust. Plasmiidis pUTP₁*luxAB*Sm (Tegova, 2001) on *pheBA* promootori kontrolli all olevad *luxAB* geenid minitransposooni koosseisus. Plasmidi pUTP₁*luxAB*Sm kasutasime selleks, et inserteerida minitransposooni koosseisus olev *pheBA* promootori-*luxAB* ekspressioonikassett *P. putida* tüve PaW₁*pheBA* kromosoomi. Saadud tüve nimetasime PaW₁*lux-pheBA*.

CatR valku üleekspresseriva tüve konstrueerimiseks amplifitseerisime 913 aluspaarise *catR* geeni sisaldava DNA fragmendi *P. putida* tüve PaW85 kromosoomist kasutades primereid CatRSD ja CatRots. Saadud PCR-i produkti kloneerisime restriктаasiga *EcoRI* avatud vektorisse pBluescript KS(+). Saadud plasmiidist pKScatR lõikasime *catR* geeni välja restriктаasidega *EcoRI* ja *HindIII* ning sisestasime vektorisse pBRLacItac (Ojangu jt., 2000). Kasutades restriктаase *EcoRI* ja *NheI*, lõikasime saadud plasmiidist pBRLacItaccatRSD välja *lacI^q-P_{tac}-catR* ekspressioonikasseti ning sisestasime vektorisse pUC18Not. Saadud plasmiidist pUCNotPtacCatR kloneerisime *lacI^q-P_{tac}-catR* ekspressioonikasseti *NotI* fragmendina plasmidi pUTmini-Tn5 Tel (Sanchez-Romero jt., 1998). CatR valku üleekspresseriva tüve PaW₁*lux-pheBA*-CatR saamiseks viisime IPTG-ga indutseeritava promootori kontrolli all oleva *catR* geeni bakteritüve PaW₁*lux-pheBA* kromosoomi, kasutades plasmidi pUTtacCatR.

catB geeni suhtes defektse tüve saamiseks asendasime tüve PaWlux-pheBA kromosoomis *catB* geeni homoloogilise rekombinatsiooni teel tetratsükliini resistentsust kandva katkestatud *catB::tet* geeniga, kasutades plasmidi pGpcatB::tet (Saks, 2002). Saadud tüve nimetasime PaWlux-pheBA-CatB::tet.

PheB valgu üleekspressioonitüve saamiseks lõikasime restriктаasidega *Eco47II* ja *HincII* 1011 aluspaarise *pheB* geeni sisaldava DNA fragmendi välja plasmidist pAT1442 ning sisestasime restiktaasiga *SmaI* avatud vektorisse pBRlacItac. Kasutades restriктаasi *BamHI*, lõikasime saadud plasmidist pBRlacItacpheB välja *lacI^q-P_{tac}-pheB* ekspressioonikasseti ning sisestasime vektorisse pUC18Not. Saadud plasmidist pUCNotPtacCatR kloonisime *lacI^q-P_{tac}-pheB* ekspressioonikasseti *NotI* fragmendina plasmidi pUTmini-Tn5 Tel. PheB valgu üleekspressiooni tüve PaWpheB saamiseks viisime PaW85 tüve kromosoomi minitransposooni koosseisus oleva ekspressioonikasseti *lacI^q-P_{tac}-pheB*, kasutades doonorplasmidi pUTPtacPheB.

P_{tac} promootorilt lähtuva transkriptsiooni testimiseks konstrueerisime ühekoopialise vektori pRP9TT (Santos jt., 1991) baasil plasmidi, kus *lacZ* geen on IPTG-ga indutseeritava *P_{tac}* promootori kontrolli all. Selleks lõikasime plasmidist pRP9TT *BamHI* fragmendina välja *lacZ* geeni, millel puudus translatsiooni startkoodon, saades plasmidi p9TTdelBam. Seejärel lõikasime funktsionaalse *lacZ* geeni plasmidist pKRZ-1 (Rothmel jt., 1991) välja kasutades restriктаase *PstI* ja *XbaI* ning sisestasime plasmidi p9TTdelBam, mis oli avatud restriктаasidega *Ecl136II* ja *HbaI*. Selleks, et *lacZ* geen saadud plasmidis p9TTlacZ oleks *P_{tac}* promootori kontrolli all, sisestasime plasmidist pBRlacItac *BamHI* fragmendina välja lõigatud *lacI^q-P_{tac}* järjestuse *lacZ* geeni ette. Saadud plasmidi nimetasime p9TTtac-lacZ.

2.4 Kasvatamistingimused

pheBA promootori transkriptsiooni uurimiseks kasvasime *P. putida* tüve PaWlux-pheBA erinevates kasvukeskkondades ning mõõtsime *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni hindamiseks rakkudest suhtelist lutsiferaasi aktiivsust. Kuna eesmärk oli uurida *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni just eksponentsiaalselt kasvavates bakterirakkudes, siis tuli enne katse algus bakterikultuure kaks korda värskesse vedelsöötmesse edasi külvata. Kõigepealt kasvasime bakterikultuuri üleöö M9 minimaalsöötmes, kuhu olid lisatud ka aminohapped (0,2% CAA). Seejärel lahjendasime

bakterikultuuri 100 korda värskesse söötmesse ($A_{580} \sim 0,05$), mis sisaldas aminohappeid vaid 0,02%. Selline CAA hulk sai valitud eeldusel, et umbes kolme tunni möödudes, kui bakterikultuur on jõudnud optilise tiheduseni A_{580} 0,3-0,4, on aminohapped bakterite kasvukeskkonnast ära kasutatud. Edasi lahjendasime bakterikultuur optilise tiheduseni A_{580} 0,05 värskesse M9 minimaalsöötmesse, mis sisaldas transkriptsiooni indutseerimiseks *pheBA* promootorilt kas bensoaati või fenooli (lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM). Pooltele kultuuridele lisasime söötmesse ka 0,33% CAA. CatR valgu üleekspressiooni mõju uurimiseks indutseerisime transkriptsiooni P_{tac} promootorilt, lisades bakterite kasvukeskkonda IPTG lõppkontsentratsiooniga 1 mM. *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktiivsuse hindamiseks mõõtsime eksponentsiaalselt kasvavatest rakkudest bioluminestsentsi.

Selleks, et uurida kas aminohapped võivad mõjutada *pheB* geeni poolt kodeeritud C12O hulka või eriaktiivsust, kasvasime tüve PaWpheB üleöö M9 minimaalsöötmes, kuhu olid lisatud ka aminohapped (0,2% CAA). Seejärel lahjendasime bakterikultuuri 100 korda värskesse söötmesse ($A_{580} \sim 0,05$), mis sisaldas aminohappeid vaid 0,02%. Umbes kolme tunni möödudes, kui bakterikultuur on jõudnud optilise tiheduseni A_{580} 0,3-0,4 lahjendasime bakterikultuuri kaks korda värskesse M9 minimaalsöötmesse, mis sisaldas transkriptsiooni indutseerimiseks P_{tac} promootorilt IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 1mM ning pooltele kultuuridele lisasime ka aminohappeid. Ensüümi C12O-i eriaktiivsust mõõtsime eksponentsiaalsest kasvufaasist esimesel ja kolmandal tunnil ning hilisest statsionaarsest kasvufaasist 24-dal tunnil. Kontrollimaks P_{tac} promootori ekspressiooni, viisime analoogilise katse läbi ka PaW85 tüvega, mis sisaldas plasmidi p9TTac-lacZ.

Selleks, et kontrollida kas aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes toimub PheB valgu kiire degradatsioon, mõõtsime C12O aktiivsust aminohapete juuresolekul ja ilma kasvanud rakkudest, olles juba eelnevalt indutseerinud IPTG lisamisega *pheB* geeni transkriptsiooni. Selleks kasvasime tüve PaWpheB rakke analoogiliselt eelpool kirjeldatud katsele kuid *pheB* geeni transkriptsiooni indutseerimiseks lisasime IPTG-d juba pärast üleöö kasvanud kultuuri esmakordset lahjendamist värskesse söötmesse. C12O eriaktiivsust mõõtsime nii vahetult enne rakukultuuri teistkordset lahjendamist, kui ka tunni aja möödudes pärast lahjendamist, kui pooled kultuurid olid kasvanud aminohapete juuresolekul ja pooled ilma.

2.5 Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs.

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasvasime *E. coli* rakke 4 ml-s LB-söötmes, kuhu lisasime plasmidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi. Üleöö kasvanud kultuurist tsentrifuugisime rakud välja ja suspendeerisime 300 µl SET lahuses (10% sahharoos; 50 mM EDTA; 50 mM TrisHCl; pH 8,0). Rakkude lüüsimiseks lisasime 50 µl lüütsüümilahust (20 mg/ml), segasime kergelt ja hoidsime viis minutit toatemperatuuril. Seejärel lisasime 300 µl TET lahust (1% Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM TrisHCl; pH 8,0), segasime ja hoidsime 3 minutit 96°C juures. Peale kuumutamist tsentrifuugisime rakke firma "Eppendorf" lauatsentrifuugiga "Minispin" 10-15 minutit maksimumpööretel 13400 p/min raskusjõul 20100 x g (kõik järgnevad tsentrifuugimised teostasime samal raskusjõul). Peale tsentrifuugimist eemaldasime kromosoom- Valk kompleksi lahusest tikuga. Plasmiidse DNA sadestamiseks lisasime lahusele 600 µl isopropanooli ja peale segamist tsentrifuugisime lahust lauatsentrifuugiga 5 minutit. Peale supernatandi eemaldamist lahustasime sademe 150 µl RNAasi sisaldavas lahuses (0,1 mg/ml) ja hoidsime 10 minutit 37°C juures. Seejärel ekstraheerisime DNA-d sisaldavat lahust fenooli ja kloroformiga. DNA sadestamiseks lisasime sellele 0,1 mahtu 5M NaCl ja 2,5 mahtu 96%-list etanooli ning tsentrifuugisime lauatsentrifuugiga 10 minutit 4°C juures. DNA sadet pesime 150 µl 80%-lise etanooliga ja pärast kuivatamist 37°C juures lahustasime sademe 20-60 µl Milli-Q vees.

DNA restrikteerimiseks kasutasime firma "Fermentas" poolt toodetud ensüüme ja neile vastavaid reaktsioonipuhvreid. Reaktsioonid viisime läbi vastavalt "Fermentase" kataloogis ettenähtud tingimustele.

Geelektroforeesiks lisasime geelile kantavale DNA-le 0,04%-list broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis ($\frac{1}{4}$ DNA lahuse hulgast). Proovid kandsime etiidiumbromiidi sisaldavale 1%-le agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2). Elektroforees toimus pingel 100-200 V. DNA visualiseerimiseks kasutasime ultravioletvalgust.

2.6 Kloneerimine

Restriksiooni tulemusena saadud DNA fragmendid lahutasime geelelektroforeesil, kasutades madalal temperatuuril sulavat agarosgeeli (Nu Sieve GTG low melting). DNA fragmentide elueerimiseks ja puhastamiseks geelist lisasime geelitükile kolmekordses mahus vett ning sulatasime geeli 65°C juures. Seejärel ekstraheerisime DNA-d sisaldavat lahust fenooli ja kloroformiga. DNA sadestamiseks lisasime 5M NaCl (0,1 mahtu) ja 96% etanooli (2,5 mahtu). DNA sadet pesime 150 µl 80% etanooliga ja lahustasime 10 µl vees. Ligaasireaktsiooni viisime läbi 15 µl-s reaktsioonisegus vastavalt firma "Fermentas" protokollile, lisades reaktsioonisegule 5-10 u ligaasi. Ligaasireaktsioon toimus üleöö 16°C termostaadis.

2.7 Transformatsioon

Kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvasime *E. coli* rakke 4 ml LB söötmes optilise tiheduseni (A_{580}) 0,2-0,3. Seejärel tsentrifugisime rakud söötimest põhja ja suspendeerisime 500 µl lahuses SolI (10 mM Na-atsetaat; 50 mM $MnCl_2$; 5 mM NaCl; pH 5,6-6,0). Seejärel tsentrifugisime rakud uuesti lahusest välja ja suspendeerisime 40 µl lahuses SolIII (10 mM Na-atsetaat; 70 mM $CaCl_2$; 5 mM $MnCl$; 5% glütserool; pH 5,6-6,0). Pärast transformatsiooniks kasutatava DNA lisamist hoidsime rakke veel 20 minutit jääl. Seejärel aetasime rakud 5 minutiks 37°C juurde, ning järgnevalt hoidsime rakke veel mõned minutid jääl. Seejärel lisasime rakkudele 1,5 ml LB söödett ja inkubeerisime neid 37° juures. 1 tunni pärast tsentrifugisime rakud söötimest põhja ja plaatisime plasmiidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi sisaldavale tardsöötmele.

2.8 Elektroporatsioon

Elektroporatsiooniks kompetentsete *P. putida* rakkude saamiseks kasvasime neid üleöö LB söötmes. Seejärel lisasime üleöö kasvanud kultuuri 4 ml-sse YENB (0,75% "Bacto yeast extract"; 0,8% "Bacto nutrient broth") söötmesse kultuuri optilise tiheduseni (A_{580}) 0,1 ning kasvasime tiheduseni 0,9-1,5. Seejärel tsentrifugisime rakud lahusest põhja ning

pesime rakke kaks korda 1 ml destilleeritud veega ja ühe korra 1 ml 10%-lise glütserooliga. Pärast viimast tsentifuugimist suspendeerisime rakud 50 µl 10%-lises glütseroolis. Elektroporatsiooniks lisasime rakkudele ~1 µg plasmiidset DNA-d ja hoidsime elektroporatsiooniküvetis jää peal paar minutit. DNA sisestamiseks rakkudesse teostasime elektroporatsiooni firma "BioRad" elektroporaatoriga "E. coli Pulser" pingel 2500 V. Peale seda lisasime rakkudele 0,5 ml LB söödet ja inkubeerisime rakke 30°C juures. Ühe tunni pärast tseentrifuugisime rakud söötmest põhja ja plaatisime selektiivsöötmele.

2.9 Bakteritüvede ristamine

P. putida rakkudesse viisime nii homoloogiliseks rekombinatsiooniks kasutatavad plasmiidid kui ka minitransposooni koosseisus olevaid gene sisaldavad plasmiidid bakterite konjugatsiooni teel. Kõigepealt kasvasime *E. coli* tüvesid CC118λpir (mis sisaldas ülekantavat plasmidi) ja HB101 (mis sisaldas plasmidiülekaneks vajalike funktsioone kodeerivat plasmidi pRK2013) ning *P. putida* retsipienttüve rakke üleöö LB vedelsöötmes plasmiidide ja tüvede seleksiooniks vajalike antibiootikumide juuresolekul. Edasi lahjendasime rakukultuure 20 korda värskesse LB vedelsöötmesse, mis antibiootikume ei sisaldanud. Kolme tunni möödumisel segasime kokku 100 µl igast rakukultuurist ning inkubeerisime bakterikultuuride segu LB tardsöötmele üleöö 30°C juures. Üleöö kasvanud rakumassist lahustasime ühe kümnendiku 1ml-s M9 lahuses ning seejärel plaatisime 100 µl bakterikultuuri selektiivsöötmele.

2.10 PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

PCR-l kasutasime matriitsina kas varem eraldatud plasmiidset DNA-d, või olid matriits-DNA allikaks bakterirakud. Reaktsioonisegu sisaldas ühe kümnendiku mahust 10 x PCR-puhvrit (firma "Fermentas" kataloogis toodud (NH₄)₂SO₄ puhver; pH 8,8), 0,2 mM dNTP-d, 6 mM MgCl₂, 15 pM praimerit, 0,5 ühikut firma "Fermentas" *Taq* DNA polümeraasi, matriits DNA-d ja vett reaktsioonisegu lõpliku mahuni 20 µl. Reaktsioon toimus 25 tsükli jooksul. Reaktsiooni tingimused olid järgnevad: 1 minut 96°C DNA denatureerimiseks, 1 minut praimeri kinnitumiseks matriitsile, temperatuur sõltuvalt praimeri

järjestusest 54 - 58°C ning 72°C DNA sünteesiks, aeg sõltuvalt sünteesitava fragmendi pikkusest 0,5 - 2 minutit. Antud töös kasutasime järgmisi primereid:

Forward 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3';
Reverse 5'-AACAGCTATGACCATG-3';
CatRSD 5'-CCCACCATAACCCTGAGG-3';
CatRots 5'-GGAGCGCGAAGCTTTTCGGCCTGTTGTCAATCAA-3';
prtac 5'-AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3';
cat2.1 5'-TTTAAACAGTCATAATTACTCTC-3'.

Forward primer seondub vektorile pBluescript KS(+) (positsioonides 501-519) *lacZ* geeni algusesse suunaga multikloneerimisjärjestuse poole. Reverse primer seondub vektorile pBluescript KS(+) (positsioonides 797-815) erinevalt Forward primerist multikloneerimisjärjestusest teisele poole, suunaga *lacZ* geeni poole. Primerid CatRSD ja CatRots on komplementaarsed vastavalt regioonidega -4 kuni +14 ja +875 kuni +909 aluspaari *catR* geeni transkriptsiooni alguspunktist. Primer prtac seondub plasmiidis pBRlacItac sisalduva P_{tac} promootori järjestusega suunaga multikloneerimisjärjestuse poole. Primer cat2.1 seondub *pheB* geeni algusega piirkonnas +12 kuni -12 aluspaari geeni translatsiooni initsiatsioonikoodoni suhtes.

2.11 Bioluminestsentsi mõõtmine bakterikultuurist

Rakkudest *luxAB* geenide poolt kodeeritud lutsiferaasi eriaktiivsuse määramiseks mõõtsime bakterirakkudest bioluminestsentsi taset. Selleks segasime kokku reaktsioon, mis sisaldas 980 µl Na-K-fosfaatpuhvrit (87mM Na₂HPO₄; 13mM KH₂PO₄; pH 7,5), 10 µl dekanaali lahust (lõppkontsentratsiooniga 50 µM) ning 10 µl bakterikultuuri. 5,5 minuti möödumisel mõõtsime lutsiferaasi poolt läbi viidud reaktsiooni tulemusena eralduvat valgust, kasutades firma "Promega" lumioomeetrit ("Turner design" TD-20/20).

2.12 Ensüümi katehhooli 1,2-dioksügenaasi eriaktiivsuse määramine rakulüsaadist

Katehhooli 1,2-dioksügenaasi eriaktiivsust mõõtsime *P. putida* rakkude lüsaadist. Valgulüsaatide saamiseks tsentrifugeerisime rakud söötmest põhja 4°C juures. Rakke pesime

Na-K-fosfaatpuhvriga (87mM Na₂HPO₄; 13mM KH₂PO₄; pH 7,5) ning suspendeerisime 300 µl Na-K-fosfaatpuhvris. Rakuvaba valguekstrakti saamiseks purustasime rakud ultraheliga ning rakukestade sadestamiseks tsentrifuugisime saadud suspensiooni raskusjõul 12000 x g 10 minuti jooksul 4°C juures. Katehhooli 1,2-dioksügenaas eriaktiivsuse määramiseks lisasime 1,85 ml-le Na-K-fosfaatpuhvri 150 µl katehhooli lahust lõppkontsentratsiooniga 6 µM ja valgulüsaati. Reaktsioonisegus ensüümreaktsiooni produkti *cis,cis*-mukonaadi akumulereerumist jälgisime optilise tiheduse muutusena spektrofotomeetriselt lainepikkusel A₂₆₀ nm. Valgulüsaatide kontsentratsiooni määrasime Bradfordini (1976) meetodil. Katehhooli 1,2-dioksügenaas eriaktiivsuse ühikuks on produkti tekkimine moolides grammi valguga kohta minutis (Hegeman, 1966).

2.13 β-galaktosidaasi mõõtmine

β-galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks rakukultuurist kasvasime plasmidi p9TTac-lacZ sisaldavaid *P. putida* rakke minimaalsöötmes, kuhu oli transkriptsiooni indutseerimiseks lisatud 1 mM IPTG. Reaktsioonisegu sisaldas 1,6 ml Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1mM MgSO₄; 50 mM β-merkaptopetaanool; 0,001% SDS; pH 7), 0,4 ml ONGP-lahust (o-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml), 100 µl kloroformi ning 25-400 µl rakukultuuri. Mõõtsime rakukultuuri optilise tiheduse (A₅₈₀) ja fikseerisime aja reaktsiooni käivitamisest kuni peatamiseni (reaktsiooni peatasime 1 ml 1M Na₂CO₃ lahuse lisamisega). β-galaktosidaasi eriaktiivsuse määrasime spektrofotomeetriselt A₄₂₀ juures valgust neelava produkti o-nitrofenooli tekkimise järgi ajaühikus rakutiheduse kohta. β-galaktosidaasi aktiivsused esitasime Milleri ühikutes (Miller, 1972).

2.14 “Western blot” analüüs

“Western blot” analüüsi jaoks lahutasime valgud kõigepealt 10%-lises SDS-poliakrüülamiid geelis firma “Hoefler” elektroforeesiaparaadiga pingel 120 V. Geelile kandsime võrdse koguse (10 µg) totaalset valku. Pärast elektroforeetilist lahutamist kandsime valgud nitrotselluloosmemraanile (“Amersham Pharmacia Biotech”) valguülekanne

aparaadiga (“Bio-Rad” Power Pac 200) pingel 15 V 20-ne minuti jooksul. Järgnevalt teostasime “*Western blot*” analüüsi. Kõigepealt inkubeerisime filtrit PheB-vastase polükloonaalse hiire antikehaga (lahjendusega 1:500), ning seejärel aluselise fosfataasiga konjugeeritud hiire IgG-spetsiifilise sekundaarse antikehaga (lahjendusega 1:5000) (LabAS Ltd., Tartu). Reaktsiooni visualiseerisime BCIP (bromo-kloro-indolüülfosfaat) ja NBT (nitrosinine tetrazolium) reaktsiooniga (Harlow ja Lane, 1988).

3 Tulemused

Transkriptsiooni initsiatsiooniks *pheBA* operoni promootorilt on *P. putida* rakkudes vajalik nii β -ketoadipaadi *orto*-raja vaheprodukti *cis,cis*-mukonaadi (CCM) kui ka regulaatorvalgu CatR olemasolu (Kasak jt. 1993). Minimaalsöötmes kasvavates bakterirakkudes initsieeritakse transkriptsioon *pheBA* promootorilt koheselt, kuid tingimustel, kus bakterid kasvavad aminohappeid sisaldavas söötmes, ei toimu transkriptsiooni initsiatsioon *pheBA* promootorilt enne, kui bakterikultuur jõuab statsionaarsesse kasvufaasi (Tover jt. 2001).

3.1 *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsiooni tase sõltub CCM-i allikana kasutatavast aromaatselt ühendist

Uurides kasvukeskkonna ja bakterite kasvufaasi mõju *pheBA* promootorilt lähtuvale transkriptsiooni initsiatsioonile, on varasemates katsetes kasutatud CCM allikana bensoaati (Tover jt. 2001). Ensüüme bensoaadi lagundamiseks katehholiini kodeerib *P. putida* kromosomaalne *ben* operon, mille transkriptsiooni regulatsiooni sõltuvust rakkude füsioloogilisest seisundist ei ole uuritud. On võimalik, et aminohapete juuresolekul bakterite kasvukeskkonnas toimub transkriptsiooni repressioon sarnaselt *pheBA* promootorile ka *ben* operoni promootorilt ning bensoaadi lagundamiseks katehholiini vajalike ensüüme ei ekspresseerita. Seega ei saa me välistada võimalust, et bensoaadi lagundamine bakterirakkudes on füsioloogilise kontrolli all ja seetõttu ei tekki aminohapete juuresolekul kasvanud bakterirakkudes *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni initsiatsiooniks vajalikku induktormolekuli.

Nii bensoaadi kui ka fenooli lagundamine toimub *P. putida* rakkudes β -ketoadipaadi *orto*-raja kaudu. Kuna *P. putida* tüvi PaW85 ei kodeeri kromosomaalselt fenooli monooksügenaasi, siis on *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni initsieerimiseks võimalik kasutada fenooli ainult juhul, kui bakterirakkudesse on viidud ka fenooli monooksügenaasi kodeeriv geen. Selleks, et transkriptsiooni *pheBA* promootorilt oleks võimalik indutseerida, lisades bakterite kasvukeskkonda fenooli, konstrueerisime tüve

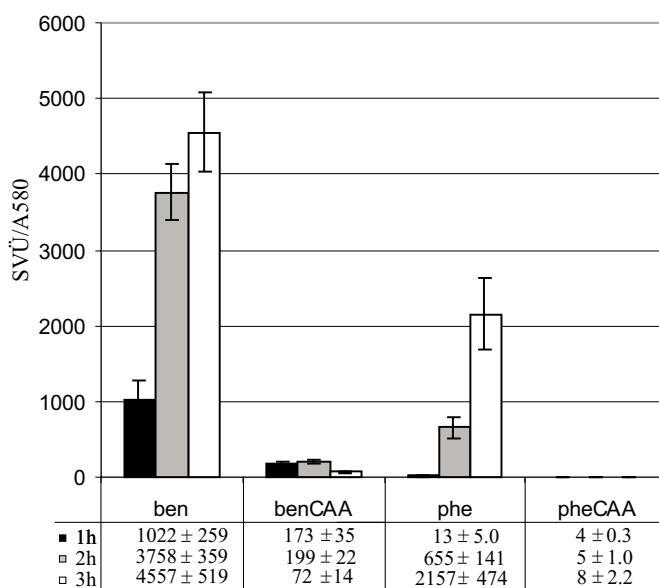
PaWp*heBA*, kus *P. putida* tüve PaW85 kromosoomi on viidud *pheBA* promootori kontrolli all olev fenooli lagundamist võimaldav *pheBA* operon.

Varasemas töös *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni uurimiseks kasutatud *lacZ* reporter geen ei võimaldanud detekteerida promootori aktiivsust rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates bakterirakkudes (Tover jt., 2001). Selleks et iseloomustada *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni profiili erinevate bakterikultuuri kasvutingimuste korral juba varajases eksponentsiaalses kasvufaasis, kasutasime tundlikumat *luxAB* geenidel põhinevat reportertestsüsteemi, kus *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni on võimalik hinnata bioluminestsentsi intensiivsuse järgi. Selleks viisime tüve PaWp*heBA* kromosoomi ekspressioonikasseti, kus *luxAB* geenid on *pheBA* promootori kontrolli all, ning saadud tüve nimetasime PaWlux-*pheBA*.

Selleks, et uurida *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni, kasvasime *P. putida* tüve PaWlux-*pheBA* rakke nii aminohapete juuresolekul kui ka ilma, kasutades *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni indutseerimiseks kas 2,5 mM Na-bensoaati või 2,5 mM fenooli. *pheBA* promootori kontrolli all olevate reporter geenide *luxAB* geenide poolt kodeeritud lutsiferaasi aktiivsuse hindamiseks mõõtsime bioluminestsentsi eksponentsiaalselt kasvavast bakterikultuurist kolme esimese tunni jooksul.

Nagu võib näha jooniselt 5, on transkriptsioon *pheBA* promootorilt pärssitud aminohapete olemasolul bakterite kasvukeskkonnas ja seda olenemata sellest, kas me kasutame fenooli või bensoaati induktormolekuli CCM allikana. Siiski on näha olulised erinevused *pheBA* promootori transkriptsiooni aktivatsiooni tasemest sõltuvalt sellest, kas bakterite kasvukeskkonda on lisatud fenooli või bensoaati. Kui bakterid kasvavad aminohappeid mittesisaldavas minimaalsöötmes, siis bensoaadi lisamisel kasvukeskkonda indutseeritakse transkriptsioon *pheBA* promootorilt kiiresti ning teiseks tunniks on *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktiivsus jõudnud peaaegu maksimumtasemele. Samal ajal on esimese tunni jooksul transkriptsioon *pheBA* promootorilt fenooli juuresolekul kasvavates rakkudes pärssitud ka minimaalsöötmes ning transkriptsiooni indutseerimine toimub hiljem, suurenedes teise ning kolmanda kasvutunni vältel. Ka juhul, kui bakterite kasvukeskkonda on lisatud aminohappeid, on näha, et transkriptsioon on tugevamini pärssitud tingimustes, kus induktormolekuli allikana on kasutatud fenooli. Juhul kui me kasutame *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni induksiooniks bensoaati, ei tõuse aminohapete juuresolekul kasvanud bakterirakkudes transkriptsioon *pheBA* promootorilt esimese kolme

tunni vältel basaalsest tasemest kõrgemale, kuid samas on see siiski ligikaudu kümme korda kõrgem kui fenooli kasutamise korral.



Joonis 5. Kasvukeskkonna mõju *pheBA* promootorilt lähtuvale transkriptsioonile. Bakterikultuuri kasvatasime glükoosi sisaldavas M9 minimaalsöötmes, kuhu transkriptsiooni indutseerimiseks *pheBA* promootorilt lisasime kas bensoaati (ben) või fenooli (phe). Pooltele bakterikultuuridele lisasime aminohapete lahust (CAA) lõppkontsentratsiooniga 0,33%. Bioluminesentsi (suhteline valguse ühik/optiline tihedus lainepikkusel 580 nm) mõõtsime bakterikultuuri esimesel kolme kasvutunni vältel. Joonisel on esitatud viie katse keskmine ja standardhälve.

Antud tulemustest võib järeldada, et *pheBA* promootorilt lähtuv transkriptsioon on aminohapete olemasolu korral bakterite kasvukeskkonnas vaigistatud sõltumata sellest, kas me kasutame CCM-i allikana bensoaati või fenooli. Seega ei ole võimalik aminohapete poolt põhjustatud *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni repressiooni selgitada üksnes bensoaadi ebaefektiivse lagundamisega *P. putida* rakkudes.

3.2 CatR valgu üleekspressioon mõjutab positiivselt *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni

Mitmete kataboolsete operonide puhul on näidatud, et transkriptsiooni regulaatorvalgu üleekspressioon vähendab eksponentsiaalset vaigistamist bakterirakkudes (Sze jt., 1996;

Müller jt., 1996; Yuste jt., 1998). Kuna on võimalik, et regulaatorvalgu hulk võib olla limiteeriv transkriptsiooni initsiatsioonil ka *pheBA* operoni promootorilt eksponentsiaalses kasvufaasis, siis on seda hüpoteesi kontrollitud, kasutades *P. putida* tüve, kus IPTG-ga indutseeritava P_{tac} promootori kontrolli alla kloneeritud *catR* geen on viidud bakteri kromosoomi. Tover jt. (2001) leidsid, et CatR valgu üleekspressioon ei mõjutanud transkriptsiooni initsiatsiooni *pheBA* promootorilt hilises eksponentsiaalses ega statsionaarses kasvufaasis. CatR valgu hulga mõju *pheBA* promootori transkriptsioonile bakterite varajases eksponentsiaalses kasvufaasis ei olnud aga võimalik hinnata, kuna *pheBA* promootori kontrolli alla kloneeritud *lacZ* geeni poolt kodeeritud β -galaktosidaasi aktiivsust ei õnnestunud detekteerida (Tover jt., 2001). Seega ei ole teada, kas CatR valgu üleekspressioon bakterite varajases eksponentsiaalses kasvufaasis võiks tõsta *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni taset.

Käesolevas töös uurisime CatR valgu üleekspressiooni mõju *pheBA* promootorilt lähtuvale transkriptsioonile nii minimaalsöötmes kui ka aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes, kasutades *luxAB* geenidel põhinevat reportersüsteemi. CatR valgu üleekspressiooni mõju uurimiseks viisime *P. putida* tüvesse PaWlux-*pheBA lacI-P_{tac}-catR* ekspressioonikasseti ning saadud tüve nimetasime PaWlux-*pheBA-CatR*

Selleks, et indutseerida transkriptsiooni *pheBA* promootorilt, kasutasime CCM allikana fenooli. CatR valgu taseme kunstlikuks tõstmiseks lisasime bakteri kasvukeskkonda IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 1 mM. Tüvega PaWlux-*pheBA-CatR* ja algse tüvega PaWlux-*pheBA* läbiviidud katsete tulemused on võrdlevalt esitatud tabelis 2.

Tabel 2. CatR valgu üleekspressiooni mõju *pheBA* promootorilt lähtuvale transkriptsioonile eksponentsiaalselt kasvavates bakterirakkudes.

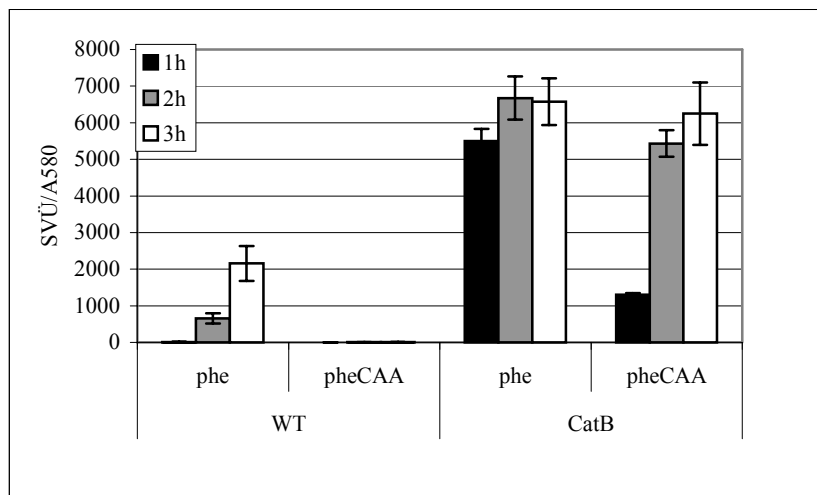
Tunnid	PaWlux- <i>pheBa</i> (wt)		PaWlux- <i>pheBA-CatR</i> (CatR)			
	- CAA	+ CAA	- CAA	CatR/wt	+ CAA	CatR/wt
1	13 ± 5.0	4.0 ± 0.3	307 ± 39	24	109 ± 1.0	27
2	655 ± 141	5.0 ± 1.0	2111 ± 32	3.2	182 ± 2.3	36
3	2157 ± 474	8.0 ± 2.2	4729 ± 826	2.2	341 ± 1.9	43

Tulemustest võib näha, et CatR valgu üleekspressioon bakterirakkudes omab positiivset mõju *pheBA* promootorilt lähtuval transkriptsioonile nii minimaalsöötmes kui ka aminohappeid sisaldavas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes (tabel 2). Võrreldes algse tüvega PaWlux-*pheBA*, tõuseb mõlemal juhul transkriptsiooni *pheBA* promootorilt kuni 20 korda. Minimaalsöötmes on CatR valgu üleekspressioonil kõige suurem mõju esimese tunni jooksul pärast katse algust, kui see efekt on ligikaudu 20 kordne, teisel ja kolmandal tunnil väheneb CatR-i üleekspressiooni efekt umbes 10 korda, jäädes siiski vähemalt 2 korda kõrgemaks võrreldes algse tüvega. Samal ajal jääb aminohappeid sisaldavas keskkonnas CatR valgu üleekspressiooni mõju tugevaks (transkriptsiooni tase on võrreldes algse tüvega tõusnud 30-40 korda) kõigis uuritud ajapunktides, ning kolmandal tunnil on see mõju kõige suurem (tabel 2). Seega avaldab CatR valgu üleekspressioon *pheBA* promootorilt lähtuval transkriptsioonile positiivset mõju ja vähendab ka aminohapete poolt põhjustatud transkriptsiooni vaigistamist.

3.3 CCM-i akumulereumise mõju bakterirakkudes *pheBA* promootorilt lähtuval transkriptsioonile

Kuna CatR valk vajab transkriptsiooni initsieerimiseks *pheBA* promootorilt induktormolekuli CCM-i, siis on võimalik, et CatR valgu üleekspressiooni korral bakterirakkudes suureneb induktormolekuliga seondunud valgu hulk. Järgnevalt tahtsime selgitada välja, kas CCM-i hulk võib olla limiteerivaks CatR valgu poolt kontrollitud *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsioonil. Selleks, et suurendada CCM-i hulka bakterirakkudes, katkestasime *P. putida* tüves PaWlux-*pheBA catB* geeni, mille poolt kodeeritud CCM-i laktoniseeriv ensüüm lagundab CCM-i mukonolaktooniks. Sellises tüves lõppeb nii bensoaadi kui fenooli lagundamine CCM-i tekkimise ning akumulereumisega bakterirakkudes.

Saadud *catB* defektset tüve PaWlux-*pheBA-catB::tet* kasvatasime aminohapete juuresolekul ning ilma, ja mõõtsime *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsioonitaseme hindamiseks bioluminestsentsi. Joonisel 6 on esitatud nii algse tüvega PaWlux-*pheBA* kui *catB* geeni suhtes defektse tüvega PaWlux-*pheBA-catB::tet* läbiviidud katsete tulemused.



Joonis 6. CCM-i akumulereumise mõju *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsiooni tasemele. Bakteritüvesid PaWlux-*pheBA* (WT) ja PaWlux-*pheBA-catB::tet* (CatB) kasvasime glükoosi sisaldavas M9 minimaalsöötmes, kuhu transkriptsiooni indutseerimiseks *pheBA* promootorilt lisasime fenool (*phe*). Pooltele bakterikultuuridest lisasime aminohapete lahust (CAA) lõpliku kontsentratsiooniga 0,33%. Bioluminestsentsi (suhteline lutsiferaasi ühik/optiline tihedus lainepikkusel 580 nm) mõõtsime bakterikultuuri esimese kolme kasvutunni vältel. Joonisel on esitatud viie katse keskmine ja standardhälve.

Nagu on näha joonisel 6, väheneb *catB* defektses tüves oluliselt *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni sõltuvus bakterirakkude füsioloogilistest tingimustest. Transkriptsioon *pheBA* promootorilt tõuseb tüves PaWlux-*pheBA-catB::tet* võrreldes algse tüvega kahe suurusjärgu võrra, sõltumata aminohapete olemasolust bakterite kasvukeskkonnas. Alates teisest tunnist on *catB* defektses tüves *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni tase võrdne nii aminohapete juuresolekul kui ka ilma kasvanud rakkudes. Seega näitavad need katsed, et *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni initsiatsioonil on limiteerivaks faktoriks induktormolekuli CCM-i hulk.

3.4 Aminohapete juuresolekul bakterite kasvukeskkonnas langeb eksponentsiaalses kasvufaasis *pheB* geeni poolt kodeeritud C120 eriaktiivsus

Juhul kui CCM on limiteerivaks faktoriks *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni induksioonil, siis võib aminohapete poolt põhjustatud transkriptsiooni vaigistamine olla tingitud CCM-i tekkimise eest vastutava ensüümi C120 hulgast või

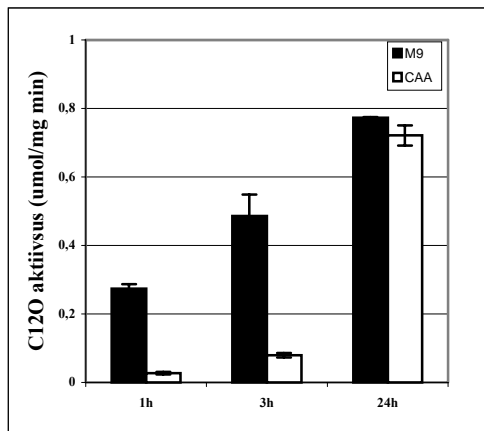
aktiivsuse vähenemisest bakterirakkudes. Seetõttu võib aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes tekkida vähem CCM-i, kui minimaalsöötmes kasvanud rakkudes.

Aminohapete poolt põhjustatud *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni taseme langus bakterirakkudes ilmnes nii bensoaadi kui fenooli kasutamisel CCM-i allikana. Kuna katehhooli 1,2-dioksügenaas (C12O) on ühine ensüüm nii bensoaadi kui fenooli lagundamise radades ning viib läbi katehhooli lagundamist CCM-iks, siis otsustasime võrrelda *pheB* poolt kodeeritud ensüümi eriaktiivsust *P. putida* rakkudes, mis on kasvanud aminohapete juuresolekul ja ilma olukorras, kus *pheB* transkriptsioon lähtub promootorilt, mille aktiivsus ei ole mõjutatud aminohapete olemasolust bakterite kasvukeskkonnas. Selleks kloonisime *pheB* geeni IPTG poolt indutseeritava P_{tac} promootori kontrolli alla ja viisime tüve PaW85 kromosoomi. Saadud tüve nimetasime PaWpheB.

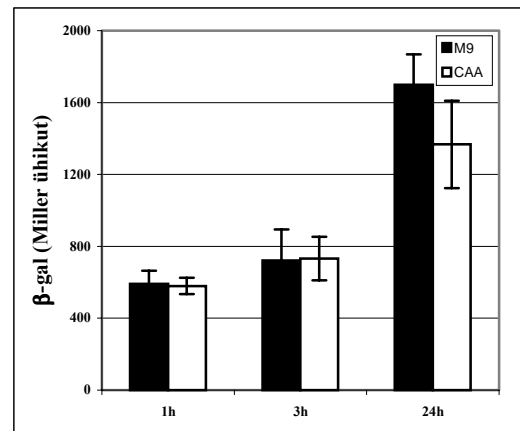
Selleks et kontrollida, kas transkriptsioon P_{tac} promootorilt on sõltumatu aminohapete olemasolust bakterite kasvukeskkonnas, konstrueerisime ka ekspresioonikasseti, kus P_{tac} promootori kontrolli all on *lacZ* reportergeen. Ekspresioonikasseti *lacI-P_{tac}-lacZ* sisaldava ühekoopialise plasmidi p9TTtac-lacZ viisime PaW85 tüve rakkudesse.

Selleks, et uurida kas aminohapete olemasolu bakterite kasvukeskkonnas võib mõjutada *pheB* geeni poolt kodeeritud C12O eriaktiivsust, kasvatasime tüve PaWpheB aminohapete juuresolekul või ilma, ning transkriptsiooni initsieerimiseks P_{tac} promootorilt lisasime söötmesse 1mM IPTG-d. Ensüümi C12O-i eriaktiivsust mõõtsime eksponentsiaalselt kasvavate rakkude lüsaatidest esimesel ja kolmandal katsetunnil ning hilise statsionaarse kasvufaasi rakkude lüsaatidest 24-dal tunnil. Analoogilise katse viisime läbi ka kontrollplasmidi p9TTtac-lacZ sisaldava bakteritüvega, ning P_{tac} promootorilt lähtuva transkriptsiooni hindamiseks mõõtsime *lacZ* geeni poolt kodeeritud β -galaktosidaasi aktiivsust. Saadud katsete tulemused on esitatud joonisel 7.

A



B



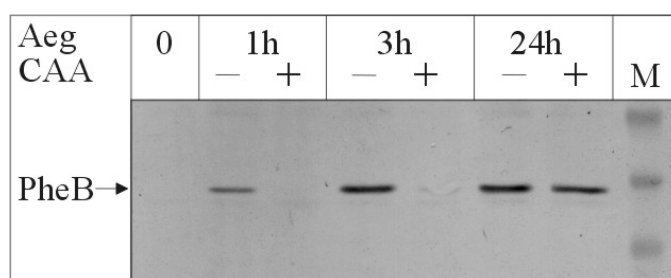
Joonis 7. Kasvukeskkonna mõju *pheB* geeni poolt kodeeritud ensüümi C12O eriaktiivsusele (A) ning P_{tac} promootori kontrolli all olevale β -galaktosidaasi eriaktiivsusele (B). Bakteritüvesid PaWpheB ja PaW85 (p9TTtac-lacZ) kasvasime M9 minimaalsöötmes, kuhu paralleelkatsetes lisasime ka aminohappeid (joonisel tähistatud CAA). Ensüümiaktiivsusi mõõtsime bakterikultuuri eksponentsiaalsest kasvufaasist (1h ja 3h) ning hilisest statsionaarsest kasvufaasist (24h). Joonisel on toodud vähemalt kolme katse keskmine ja standardhälve.

Jooniselt 7A on näha, et C12O aktiivsus on aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes (1 ja 3 tundi) tugevalt pärsitud võrreldes minimaalsöötmes kasvanud rakkudega. Samal ajal on plasmidi p9TTtac-lacZ sisaldava tüvega läbi viidud kontrollkatsetest näha, et β -galaktosidaasi aktiivsused on võrdsed nii aminohapete juuresolekul kui ka ilma eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes. See kinnitab, et transkriptsioon P_{tac} promootorilt ei ole mõjutatud aminohapete juuresolekust bakterite kasvukeskkonnas. (joonis 7B). Hilises statsionaarses kasvufaasis (24h) on C12O aktiivsused võrdsed nii aminohapete juuresolekul kui ka ilma kasvanud bakterirakkudes.

Põhjuseks, miks on aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes C12O aktiivsus pärsitud, võib olla nii ensüümi katalüütilise aktiivsuse kui ka valgu hulga vähenemine *P. putida* rakkudes.

3.5 Aminohapped bakterite kasvukeskkonnas pärsivad eksponentsiaalses kasvufaasis *pheB* geeni poolt kodeeritud C12O ekspressiooni posttranskriptsioonilisel tasemel

Selleks, et selgitada välja, kas aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes toimub C12O inaktiveerumine, või on ensüümi eriaktiivsus madal seetõttu, et vähenenud on ensüümi hulk, võrdlesime samades rakulüsaatides, millest on mõõdetud C12O eriaktiivsused, ka PheB valgu suhtelist hulka, kasutades PheB valgu vastaseid polükloonaalseid antikehi.



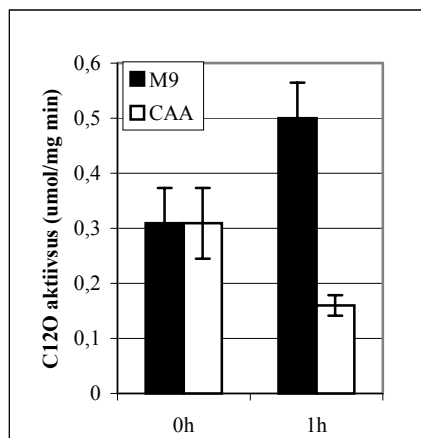
Joonis 8. PheB valgu hulga detekteerimine “Western blot” meetodil. Geelile kantud valgulüsaadid (10 µg) on valmistatud tüve PaWpheB rakkudest (samadest lüsaatidest on mõõdetud joonisel 7A esitatud C12O aktiivsused. Sümbolid + ja - tähistavad aminohapete juuresolekul (+) ja ilma (-) kasvanud rakkude lüsaate.

Joonisel 8 toodud tulemused näitavad, et *pheB* geeni poolt kodeeritud C12O hulk on aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes (1 ja 3 tundi) vähenenud, võrreldes minimaalsöötmes kasvanud rakkudega. Hilisesse statsionaarsesse kasvufaasi (24 tundi) jõudnud rakkude lüsaatidest detekteeritud C12O hulk ei sõltu enam sellest, kas rakud on kasvanud aminohapete juuresolekul või mitte ja valgu hulgad on võrdsustunud.

C12O eriaktiivsused erinevates kasvukeskkondades (joonis 7A) korelleeruvad antikehade abil detekteeritud PheB valgu hulgaga (joonis 8). Seega ei toimu aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes mitte C12O inaktiveerumine, vaid on vähenenud valgu hulk.

Kuna P_{tac} promootori kontrolli all oleva *pheB* geeni transkriptsioon ei ole aminohapete poolt mõjutatud, siis võib valgu madalama taseme põhjuseks olla kas mRNA ebastabiilsus, translatsiooni ebaefektiivsus või valgu kiire degradatsioon. Selleks, et kontrollida kas aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes toimub PheB valgu kiire degradatsioon, viisime läbi katse, kus mõõtsime C12O aktiivsust aminohapete juuresolekul ja ilma kasvanud rakkudest, kus *pheB* geeni transkriptsiooni oli

enne aminohapete lisamist kasvukeskkonda indutseerinud IPTG-ga. Katse tulemused on esitatud joonisel 9.



Joonis 9. C120-i aktiivsuste muutumine sõltuvalt aminohapete lisamisest bakterite kasvukeskkonda. C120-i aktiivsused on mõõdetud tüve PaWpheB rakulüsaatidest vahetult enne aminohapete lisamist (0h) peale ühe tunni möödumist, kui bakterikultuur on kasvanud kas aminohapete juuresolekul (CAA) või ilma (M9).

Eeldades, et C120 eriaktiivsus kajastab ka PheB hulka bakterirakkudes, peaksime PheB valgu spetsiifilise degradatsiooni korral aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes ühe tunni möödudes nägema C120 eriaktiivsuse langust. Joonisel 9 on näha, et ühe tunni möödudes langeb C120 eriaktiivsus aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes ligikaudu 2 korda, kusjuures samal ajal tõuseb minimaalsöötmes kasvanud bakterirakkudest mõõdetud C120 eriaktiivsus ligikaudu 1,5 korda. Arvestades seda, et ühe tunni jooksul toimub eksponentsiaalselt aminohapete juuresolekul kasvanud kultuuri rakumassi kahekordistumine, siis juhul, kui PheB valku enam rakkudes oluliselt juurde ei teki, on ootuspärane, et me näeme rakukultuuri kasvust tingitud kahekordset C120 aktiivsuse langust. Need tulemused viitavad sellele, et PheB valgu spetsiifilist degradatsiooni ühe tunni jooksul ei toimu ning C120 eriaktiivsuse langus on põhjustatud vaid rakukultuuri lahjendusefektist. Seega võime oletada, et juba olemasolevat valmissünteesitud valku ei lagundata aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes kiiremini kui minimaalsöötmes kasvanud bakterirakkudes.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsiooni tase on rakkude füsioloogilisest seisundist tulenevalt kontrollitud CCM-i hulga

regulatsiooni kaudu, kusjuures see kontroll realiseerub vähemalt ühe fenooli kataboolse raja ensüümi PheB ekspressiooni mõjutamise kaudu posttranskriptsioonilisel tasemel.

Magistritöö tulemused on vormistatud teaduslikuks artiklik: Putrinš, M., Tover, A., Tegova, R., Saks, Ü., Kivisaar, M. “Physiological control mechanisms regulating transcription from the CatR-regulated *pheBA* promoter in *Pseudomonas putida* operate through reduction of the synthesis of the inducer-producing enzyme catechol 1,2-dioxygenase“, ning saadetud ajakirja “Applied and Environmental Microbiology” (ajakirja saadetud käsikirja number on AEM00978-04).

4 Arutelu

Bakterite looduslik elukeskkond on muutlik ja seepärast on bakteritel kujunenud välja regulatsioonimehhanismid, mis võimaldavad neil vastavalt keskkonnast tulenevatele signaalidele oma metabolismi kiiresti ümber korraldada. Bakterirakkudes on kabloolsete operonide promootorilt lähtuv transkriptsioon kontrollitud nii spetsiifiliselt, metaboolse raja substraatide või degradatsiooniraja vaheühendite, kui ka üldiste bakteriraku füsioloogilisest seisundist tulenevate signaalide poolt (Cases ja de Lorenzo, 2001). Ka *P. putida* fenooli ja katehhooli lagundamist võimaldavate *pheBA* ja *catBCA* operonide transkriptsioon on eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes aminohapete juuresolekul alla reguleeritud, sõltumata transkriptsiooni induktsiooniks vajaliku CCM-i allika olemasolust bakterite kasvukeskkonnas (Tover jt., 2001).

Kirjandusest on teada, et regulaatorvalgude ekspressioonitaseme tõstmine võib viia olukorrani, kus transkriptsiooni induktsioon kataboolse operoni promootorilt ei allu enam füsioloogilisele kontrollile - seda on kirjeldatud näiteks DmpR, PhlR ja AlkS regulaatorvalgude üleekspressiooni korral (Sze jt., 1996; Müller jt., 1996; Yuste jt., 1998). TOL plasmidi *meta*-raja *xyl* operoni promootori Pm puhul on näidatud, et regulaatorvalgu XylS ekspressioonitaseme tõstmine bakterirakkudes võib viia ka olukorrani, kus transkriptsioon kataboolse operoni promootorilt toimub induktormolekulist sõltumatult (Inouye jt., 1987).

Ka meie uurimistöö tulemusena selgus, et regulaatorvalgu CatR üleekspressioon *P. putida* rakkudes suurendas *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni taset (tabel 2, tulemused), kuid samas jäi alles aminohapete poolne negatiivne mõju transkriptsioonile. Arvame, et juhul kui regulaatorvalgu on rakkudes rohkem, siis olukorras, kus CCM-i hulk on madal, suureneb CatR-i üleekspressiooni puhul tõenäosus, et vähesed CCM-i molekulid seotakse CatR valgu poolt ning see võimaldab tõsta transkriptsiooni taset *pheBA* promootorilt.

Meie katsetest CatB-defektse tüvega (kus CCM-i rakus ei lagundata) selgus, et CCM-i hulga tõusu korral tõuseb transkriptsioon *pheBA* promootorilt sõltumata CatR valgu hulgest rakkudes ja seda nii aminohapete juuresolekul kui ka ilma kasvanud rakkudes. Seega on *pheBA* operoni transkriptsiooni aktivatsioonil peamiselt limiteerivaks siiski induktormolekuli

CCM-i hulk bakterirakkudes, kuid sellistel tingimustel on võimalik biodegradatiivse operoni promootorilt lähtuvat transkriptsiooni mõnevõrra suurendada ka regulaatorvalgu hulga tõstmise kaudu. Paralleele võib tuua TOL plasmidi *meta*-raja *xyl* operoni (nn. “alumise operoni”) regulatsiooniga, kus promootorilt Pm lähtuva transkriptsiooni puhul tõuseb TOL plasmidi “ülemise operoni” efektormolekulide olemasolul bakterite kasvukeskkonnas regulaatorvalgu XylS tase, mille tulemusena on võimalik efektiivsemalt aktiveerida transkriptsiooni Pm promootorilt nii selle promootori otsese efektormolekuli metüülbensoaadi limitatsiooni korral kui ka puudumisel (Gonzalez-Perez jt., 2003). XylS valgu hulga suurenemisel bakterirakkudes toimub transkriptsiooni aktivatsioon Pm promootorilt peamiselt induktorist sõltumatult, kuna osa XylS molekule on spontaanselt aktiivses konformatsioonis ja XylS-i üleekspressiooni tingimustes nende hulk rakus tõuseb. Induktori lisamine tõstab aga transkriptsiooni taset Pm promootorilt veelgi. Erinevalt XylS valgust ei ole CatR valk ka üleekspressiooni korral võimeline transkriptsiooni CatR-i poolt reguleeritavatel promootoriltelt induktorist sõltumatult tõstma (meie poolt avaldamata andmed).

Seda, kas operoni induktori hulk võib jääda limiteerivaks transkriptsiooni aktiveerimisel rikkas söötmes kasvanud bakterirakkudes, on uuritud biodegradatiivsete operonide puhul, kus induktormolekul on otsene bakterite kasvusubstraat, mitte metabolismi vaheühend. XylR/NtrC perekonna regulaatorvalkude DmpR ja XylR poolt kontrollitud operonide transkriptsiooni regulatsiooni uurimisel on kasutatud mutantseid regulaatorvalke, millel A-domääni deletsioon muudab regulaatorvalgu konstitutiivselt aktiivseks (Shingler & Pavel, 1995; Fernandez jt., 1995). Induktorsõltumatute regulaatorvalkude puhul on aga transkriptsioon nende poolt aktiveeritavatelt promootoriltelt aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes ikkagi vaigistatud, mis näitab, et nende kataboolsete operonide regulatsioon rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes ei toimu aromaatses ühendi kättesaadavuse kaudu regulaatorvalgule (Cases & de Lorenzo, 1996; Sze jt., 1999).

Kirjanduses on viiteid sellele, et metabolismiraja vaheühendite poolt indutseeritava operoni puhul toimub operoni regulatsioon induktormolekuli hulga kaudu. *Acinetobacter* sp. tüves ADP1, kus bensoaadi lagundamine toimub samuti β -ketoadipaadi raja kaudu, on näidatud, kuidas CCM-i kontsentratsioon on oluline bensoaadi degradatsiooniga seotud operonide transkriptsioonitaseme kontrollimisel. ADP1 tüves kuuluvad *ben* ja *cat* operonide regulaatorvalgud BenM ja CatM mõlemad LysR-tüüpi regulaatorvalkude perekonda.

Katehhooli 1,2-dioksügenaasi kodeeriva *catA* geeni transkriptsioon on positiivselt kontrollitud nii CatM (seondub CCM-iga) kui BenM (seondub nii CCM-iga kui ka bensoadiga) valgu poolt, samas kui teiste *cat* operoni geenide transkriptsioon on reguleeritud vaid CatM valgu poolt (Cosper jt., 2000). Selline regulatsioonimehhanism kahe positiivse regulaatori abil võimaldab bakteritel bensoadi lagundamisel tõsta C12O taset ning suurenenud CCM-i hulga kaudu efektiivsemalt indutseerida ka teisi katehhooli lagundamise *cat* operoni gene. Paraku ei ole ADP1 tüves uuritud, kas *cat* ja *ben* operonide transkriptsioon allub ka füsioloogilistele kontrollmehhanismidele.

Käesoleva töö tulemusena selgus, et *pheBA* promootorilt lähtuv transkriptsioon on aminohapete juuresolekul eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes repressseeritud, kuna sel juhul on induktormolekuli hulk madalam kui minimaalsöötmes kasvanud rakkudes. CCM-i taseme erinevus sõltuvalt bakterite kasvukeskkonnast võib olla põhjustatud nende ensüümide ekspressioonitaseme või aktiivsuse regulatsioonist, mis vastutavad bensoadi või fenooli lagundamise eest CCM-ini.

Transkriptsioonitase *pheBA* promootorilt sõltub ka sellest, millist aromaatsset süsinikuühendit, kas fenooli või bensoati, on kasutatud induktormolekuli allikana. Kui me kasutasime CCM-i allikana bensoati, oli transkriptsioon *pheBA* promootorilt kõrgem kui fenooli korral ning seda sõltumata aminohapete olemasolust bakterite kasvukeskkonnas (joonis 3, tulemused). Bensoadi ja fenooli metabolismi rada on ühine alates katehhooli lagundamisest CCM-iks. *P. putida* tüves KT2440 on lisaks *catA* geenile leitud veel üks katehhooli 1,2-dioksügenaasi kodeeriv geen, *catA2*, mis paikneb *ben* operonis (Jimenez jt., 2002). Tõenäoliselt on *catA2* geeni transkriptsioon reguleeritud *ben* operoni transkriptsiooni regulaatorvalgu BenR poolt vastusena bensoadi esinemisele bakterite kasvukeskkonnas. Seega on võimalik, et kasutades CCM-i allikana bensoati, indutseeritakse bakterirakkudes ka *catA2* geeni transkriptsioon ja ekspresseeritakse veel ühte 1,2-dioksügenaasi, mille läbi saavutataksegi kõrgem CCM-i tase rakkudes ja *pheBA* promootorilt efektiivsem transkriptsiooni aktivatsioon võrreldes tingimustega, kus CCM-i allikana kasutatakse fenooli.

Käesoleva töö tulemustest selgus, et vähemasti üheks põhjuseks, miks aminohapete olemasolul bakterite kasvukeskkonnas väheneb bakterirakkudes induktormolekuli CCM-i hulk, on *pheB* geeni poolt kodeeritud C12O ekspressioonitaseme langus. PheB valgu hulga vähenemine ei ole põhjustatud mitte valgu spetsiifilisest degradatsioonist vaid mRNA ebastabiilsusest või translatsioonist efektiivsuse regulatsioonist. Meie esialgsed katsed PheB

mRNA stabiilsuse määramisel on näidanud, et PheB mRNA stabiilsus ei sõltu aminohapete juuresolekust bakterite kasvukeskkonnas. Seepärast arvame, et pigem toimub PheB ekspressiooni regulatsioon translatsiooni tasemel. Paralleele võib tuua alkaanide degradatsiooni võimaldava *alk* operoni transkriptsiooni regulatsiooniga. *alk* operoni transkriptsiooni pärssimine rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvanud rakkudes on põhjustatud peamiselt regulaatorvalgu AlkS ekspressioonitaseme vähenemisest ning on püstitatud hüpotees, et AlkS valgu hulka kontrollitakse peamiselt mRNA translatsiooni tasemel (Yuste ja Rojo, 2001). Samas ei ole perekonna *Pseudomonas* bakterite biodegradatsiooni operonide regulatsiooni kohta seni kirjanduses näiteid, et kataboolse operoni füsioloogiline kontroll võiks toimuda katabolismiraja ensüümi translatsiooni efektiivsuse kaudu.

Kas *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni eksponentsiaalseks vaigistamiseks piisab ainult *pheB* geeni poolt kodeeritud C12O ekspressioonitaseme langusest või on tegemist paljude efektide koosmõjuga?

Arvestades seda, et *P. putida* kromosoomis on veel kaks C12O kodeerivat geeni - *catA* ja *catA2*, siis võiks ka teiste katehooli 1,2-dioksügenaaside ekspressioonitase bakterirakkudes olla reguleeritud sõltuvalt bakterite kasvufaasist ja aminohapete olemasolust kasvukeskkonnas. *P. putida* tüves KT2440 on näidatud, et rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates bakterirakkudes on transkriptsioon *benA* geenilt represseritud (Morales jt., 2004). See tähendab, et ka bensoadi lagundamine katehoolini on eksponentsiaalselt, aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes tõenäoliselt pärssitud. On võimalik, et ka fenooli monoooksügenaasi aktiivsus või hulk on kontrollitud bakterirakkude füsioloogilise seisundi poolt.

CatR valku kodeeriva geeni transkriptsioon on rikkas söötmes kasvavates bakterirakkudes samuti bakterite kasvufaasist sõltuv. Statsionaarses kasvufaasis on transkriptsiooni tase *catR* geeni promootorilt ligikaudu 10 korda kõrgem kui eksponentsiaalses kasvufaasis (Tover jt., 2001). Suurenenud transkriptsioon *catR* promootorilt võib viidata sellele, et ka regulaatorvalku on statsionaarses faasis bakterirakkudes rohkem ja see võib omakorda mõjutada positiivselt *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni regulatsioon aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes on kontrollitud vähemasti ühe kataboolse raja

ensüümi C12O ekspressiooni regulatsiooni kaudu posttranskriptsioonilisel tasemel. Sellist biodegradatiivse operoni transkriptsiooni regulatsiooni mehhanismi rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates bakterirakkudes, mis kontrolliks induktormolekuli sünteesi eest vastutava ensüümi ekspressiooni posttranskriptsioonilisel tasemel, ei ole varem perekonna *Pseudomonas* liikidel kirjeldatud.

Kokkuvõte

Transkriptsiooni initsiatsioon *pheBA* operoni promootorilt on lisaks spetsiifilisele, CatR valgu ja *cis,cis*-mukonaadi poolt vahendatud regulatsioonile, seotud ka bakterirakkude füsioloogilise seisundiga. Rikkas söötmes eksponentsiaalselt kasvavates *Pseudomonas putida* rakkudes on transkriptsioon *pheBA* promootorilt pärsitud ning aktiveeritakse alles statsionaarses kasvufaasis (Tover jt., 2001).

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja uurida mehhanisme, mille kaudu toimub *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni regulatsioon sõltuvalt aminohapete sisaldumisest bakterite kasvukeskkonnas. Selleks konstrueerisime uued bakteritüved, mille abil oli võimalik uurida nii regulaatorvalgu CatR kui ka induktormolekuli *cis,cis*-mukonaadi hulga mõju *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsioonile. Töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Induktormolekuli *cis,cis*-mukonaadi hulk bakterirakkudes on limiteerivaks faktoriks *pheBA* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsioonil. Aminohapete juuresolekul kasvanud rakkudes tekib *cis,cis*-mukonaati vähem kui minimaalsöötmes kasvanud rakkudes.

2. CatR valgu üleekspressioon *P. putida* rakkudes mõjutab positiivselt *pheBA* promootorilt lähtuvat transkriptsiooni. Suurenenud regulaatorvalgu hulk tõstab transkriptsiooni taset *pheBA* promootorilt tõenäoliselt sel teel, et rakkudes on rohkem CatR valgumolekule limiteeriva *cis,cis*-mukonaadi sidumiseks.

3. Induktormolekuli *cis,cis*-mukonaadi madalama taseme üheks põhjuseks, aminohapete juuresolekul kasvanud bakterirakkudes, on katehhooli 1,2-dioksügenaasi (ensüüm, mis lagundab katehhooli bakterirakkudes *cis,cis*-mukonaadiks) ekspresioonitaseme langus. *pheB* geeni poolt kodeeritud katehhooli 1,2-dioksügenaasi ekspresioonitaseme kontroll toimub posttranskriptsiooniliselt.

Seni kirjeldatud biodegradatiivsete operonide transkriptsiooni füsioloogilise kontrolli mehhanismid mõjutavad kas promootori DNA topoloogiat, operoni regulaatorvalgu hulka ja aktiivsust või RNA polümeraasi seondumist spetsiifilise sigma faktoriga (Cases ja de Lorenzo, 2001; Shingler, 2003). Käesolevas töös oleme kirjeldanud uut biodegradatiivse operoni ekspresiooni regulatsiooni tüüpi, mis mõjutab *pheBA* promootori transkriptsiooni taset, kontrollides induktormolekuli sünteesi eest vastutava ensüümi ekspresiooni transkriptsiooni järgsel tasemel.

Summary

Our workgroup investigates the regulation of transcription from the *Pseudomonas putida* phenol degradation *pheBA* promoter. In addition to the study of the specific regulation of the transcription from the *pheBA* promoter by activator protein CatR and inducer molecule *cis,cis*-muconate, the global regulation of transcription from this promoter has been investigated as well. The mechanisms of exponential silencing of the *pheBA* promoter in rich medium-grown bacteria has not been previously characterized. The aim of this work was to study the physiological control mechanisms that repress the transcription from the *pheBA* promoter in the presence of amino acids in bacterial growth medium. For this purpose we constructed bacterial strains, that allowed us to investigate the effect of overexpression of the CatR protein or increased amount of inducer molecule *cis,cis*-muconate to the level of transcription from the *pheBA* promoter.

The results of this study are following:

1. Higher amount of the inducer molecule *cis,cis*-muconate relieves the exponential silencing of the *pheBA* promoter.
2. CatR overexpression elevates the rate of transcription from *pheBA* promoter. It is possible that as a number of CatR molecules per cell increases, small amount of *cis,cis*-muconate molecules would be more easily captured by CatR
3. The presence of amino acids in growth medium of bacteria affects negatively the expression of the *pheB*-encoded catechol 1,2-dioxygenase(the enzyme which is responsible for degradation of catechol to *cis,cis*-muconate) at posttranscriptional level.

Results obtained in this study allowed us to propose a novel mechanism for coupling a specific regulation of the biodegradative operon to cell physiology. This mechanism operates through modulation of expression of key enzymes necessary for the production of an operon inducer at the level of synthesis of these enzymes.

Kasutatud kirjandus

- Adams, M.H.** 1959. Bacteriophages, lk 445-447. NY: Interscience Publishers.
- Alexeeva, S., de Kort, B., Sawers, G., Hellingwerf, K.J., de Mattos, M.J.** 2000. Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182, 4934-4940.
- Bauchop, T., Elsdén, S.R.** 1960. The growth of microorganisms in relation their energy supply. J. Gen. Microbiol. 23, 469-475.
- Bayley, S.A., Duggleby, C.J., Worsley, M.J., Williams, K.G., Hardy, K.G., Broda, P.** 1977. Two models of loss of the TOL function from *Pseudomonas putida* mt-2. Mol. Gen. Genet. 154, 203-204.
- Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M., Venturi, V.** 2003. Role of GacA, LasI, RhlI, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor *rpoS*/RpoS in *Pseudomonas*. Arch. Microbiol. 180, 264-271.
- Bertoni, G., Fujita, N., Ishihama, A., de Lorenzo, V.** 1998. Active recruitment of sigma⁵⁴-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and alphaCTD. EMBO J. 17,5120-5128.
- Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41, 459-472.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Canosa, I., Yuste, L., Rojo, F.** 1999. Role of the alternative sigma factor sigma^S in expression of the AlkS regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. J. Bacteriol. 181, 1748-1754.
- Canosa, I., Sanchez-Romero, J.M., Yuste, L., Rojo, F.** 2000. A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. Mol. Microbiol. 35, 791-799.
- Carmona, M., de Lorenzo, V.** 1999. Involvement of the FtsH (HflB) protease in the activity of sigma 54 promoters. Mol. Microbiol. 31, 261-270.
- Carmona, M., Rodriguez, M.J., Martinez-Costa, O., de Lorenzo, V.** 2000. *In vivo* and *in vitro* effects of (p)ppGpp on the σ^{54} promoter Pu of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 182, 4711-4718.

Carter, P., Bedouelle, H., Winter, G. 1985. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* 13, 4431-4443.

Cases, I., de Lorenzo, V. 2000. Genetic Evidence of Distinct Physiological Regulation Mechanisms in the σ^{54} Pu Promoter of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 4, 956-960.

Cases, I., de Lorenzo, V. 2001. The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *EMBO J.* 20, 1-11.

Cases, I., de Lorenzo, V., Perez-Martin, J. 1996. Involvement of σ^{54} in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid Pu promoter. *Mol. Microbiol.* 19, 7-17.

Cases, I., Perez-Martin, J., de Lorenzo, V. 1999. The IIANtr (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J. Biol. Chem.* 274, 15562-15568.

Cases, I., Velazquez, F., de Lorenzo, V. 2001. Role of *ptsO* in carbon-mediated inhibition of the Pu promoter belonging to the pWW0 *Pseudomonas putida* plasmid. *J. Bacteriol.* 183, 5128-5133.

Chugani, S.A., Parsek, M.R., Chakrabarty, A.M. 1998. Transcriptional repression mediated by LysR-type regulator CatR bound at multiple binding sites. *J. Bacteriol.* 180, 2367-2372.

Chugani, S.A., Parsek, M.R., Hershberger, C.D., Murakami, K., Ishihama, A., Chakrabarty, A.M. 1997. Activation of the *catBCA* promoter: probing the interaction of CatR and RNA polymerase through *in vitro* transcription. *J. Bacteriol.* 179, 2221-2227.

Coco, W.M., Rothmel, R.K., Henikoff, S., Chakrabarty, A.M. 1993. Nucleotide sequence and initial functional characterization of the *clcR* gene encoding a LysR family activator of the *clcABD* chlorocatechol operon in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 175, 417-427.

Collier, D.N., Hager, P.W., Phibbs, P.V. Jr. 1996. Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res. Microbiol.* 147, 551-561.

Cosper, N.J., Collier, L.S., Clark, T.J., Scott, R.A., Neidle, E.L. 2000. Mutations in *catB*, the gene encoding muconate cycloisomerase, activate transcription of the distal ben genes and contribute to a complex regulatory circuit in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* 182, 7044-7052.

Cowles, C.E., Nichols, N.N., Harwood, C.S. 2000. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 182, 6339-6346.

de Lorenzo, V., Cases, I., Herrero, M., Timmis, K.N. 1993. Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: identification of postexponential promoters in *Pseudomonas putida* with *lacZ-tet* bicistronic reporters. J. Bacteriol. 175, 6902-6907.

Dinamarca, M.A., Ruiz-Manzano, A., Rojo, F. 2002. Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPO1 alkane degradation pathway. J. Bacteriol. 184, 3785-3793.

Fernández, S., de Lorenzo, V., Pérez-Martín, J. 1995. Activation of the transcription regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. Mol. Microbiol. 16, 205-213.

Fernandez, S., Shingler, V., de Lorenzo, V. 1994. Cross-regulation by XylR and DmpR activators of *Pseudomonas putida* suggests that transcriptional control of biodegradative operons evolves independently of catabolic genes. J. Bacteriol. 176, 5052-5058.

Figurski, D.H., Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 76,1648-1652.

Gerischer, U. 2002. Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4, 111-121.

Gonzalez-Perez, M.M., Ramos, J.L., Marques, S. 2004. Cellular XylS levels are a function of transcription of *xylS* from two independent promoters and the differential efficiency of translation of the two mRNAs. J. Bacteriol. 186, 1898-18901.

Harlow, E., Lane, D. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laoratory.

Harwood, C.S., Parales, R.E. 1996. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. Annu. Rev. Microbiol. 50, 553-590.

Hegeman, G.D. 1966. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type. J. Bacteriol. 91, 1140-1154.

Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172,6557-6567.

Herrmann, H., Müller, C., Schmidt, I., Mahnke, J., Petruschka, L., Hahnke, K. 1995. Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Mol. Gen. Genet.* 247, 240-246.

Hester, K.L., Lehman, J., Najar, F., Song, L., Roe, B.A., MacGregor, C.H., Hager, P.W., Phibbs, P.V. Jr, Sokatch, J.R. 2000. Crc is involved in catabolite repression control of the *bkd* operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 1144-1149.

Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A., Horikoshi, K. 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from *Pseudomonas putida* IH-2000. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 219-225.

Holtel, A., Marques, S., Mohler, I., Jakubzik, U., Timmis, K.N. 1994. Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 176, 1773-1776.

Houghton, J.E., Brown, T.M., Appel, A.J., Hughes, E.J., Ornston, L.N. 1995. Discontinuities in the evolution of *Pseudomonas putida cat* genes. *J. Bacteriol.* 177, 401-412.

Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. 1987. Overproduction of the *xylS* gene product and activation of the *xyIDLEGF* operon on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 169, 3587-3592.

Jimenez, J.I., Minambres, B., Garcia, J.L., Diaz, E. 2002. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 824-841.

Kasak, L., Hõrak, R., Nurk, A., Talvik, K., Kivisaar, M. 1993. Regulation of the catechol 1,2-dioxygenase- and phenol monooxygenase-encoding *pheBA* operon in *Pseudomonas putida* PaW85. *J. Bacteriol.* 175, 8038-8042.

Kivisaar, M., Hõrak, R., Kasak, L., Heinaru, A., Habicht, J. 1990. Selection of independent plasmids determining phenol degradation in *Pseudomonas putida* and the cloning and expression of genes encoding phenol monooxygenase and catechol 1,2-dioxygenase. *Plasmid* 24, 25-36.

Laurie, A.D., Bernardo, L.M., Sze, C.C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nystrom, T., Shingler, V. 2003. The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278, 1494-1503.

Marques, S., Manzanera, M., Gonzalez-Perez, M.M., Gallegos, M.T., Ramos, J.L. 1999. The XylS-dependent Pm promoter is transcribed *in vivo* by RNA polymerase with sigma 32 or sigma 38 depending on the growth phase. *Mol. Microbiol.* 31, 1105-1113.

Martinez-Bueno, M.A., Tobes, R., Rey, M., Ramos, J.L. 2002. Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ. Microbiol.* 4, 842-855.

McFall, S.M., Chugani, S.A., Chakrabarty, A.M. 1998. Transcriptional activation of catechol and clorocatechol operons: variations on a theme. *Gene* 223, 257-267.

Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martinez, J.L., Rojo, F. 2004. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J. Bacteriol.* 186, 1337-1344.

Müller, C., Petruschka, L., Cuypers, H., Burchhardt, G., Herrmann, H. 1996. Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhlR. *J. Bacteriol.* 178, 2030-6203.

Ojangu, E.L., Tover, A., Teras, R., Kivisaar, M. 2000. Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 182, 6707-6713.

Parsek, M.R., Kivisaar, M., Chakrabarty, A.M. 1995. Differential DNA bending introduced by the *Pseudomonas putida* LysR-type regulator, CatR, at the plasmid-born *pheBA* and *catBC* promoters. *Mol. Microbiol.* 15, 819-828.

Parsek, M.R., McFall, S.M., Chakrabarty, A.M. 1996. Evolution of regulatory systems of biodegradative pathways. *Molecular Biology of Pseudomonads*, pp. 135-152. American Society for Microbiology.

Parsek, M.R., McFall, S.M., Shinabarger, D.L., Chakrabarty, A.M. 1994a. Interaction of two LysR-type regulatory proteins CatR and ClcR with heterologous

promoters: functional and evolutionary implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 12393-12397.

Parsek, M.R., Shinabarger, D.L., Rothmel, R.K., Chakrabarty, A.M. 1992. Roles of CatR and cis,cis-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 174, 7798-7806.

Parsek, M.R., Ye, R.W., Pun, P., Chakrabarty, A.M. 1994b. Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. J. Biol. Chem. 269, 11279-11284.

Perez-Martin, J., de Lorenzo, V. 1996. VTR expression cassettes for engineering conditional phenotypes in *Pseudomonas*: activity of the Pu promoter of the TOL plasmid under limiting concentrations of the XylR activator protein. Gene. 172, 81-86.

Petruschka, L., Burchhardt, G., Muller, C., Weihe, C., Herrmann, H. 2001. The *cyo* operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. Mol. Genet. Genomics. 266, 199-206.

Ramos, J., Marques, S., Timmis, K.N. 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. Annu. Rev. Microbiol. 51, 341-373.

Rothmel, R.K., Aldrich, T.L., Houghton, J.E., Coco, W.M., Ornston, L.N., Chakrabarty, A.M. 1990. Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida* CatR: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. J. Bacteriol. 172, 922-931.

Rothmel, R.K., Shinabarger, D.L., Parsek, M.R., Aldrich, T.L., Chakrabarty, A.M. 1991. Functional analysis of the *Pseudomonas putida* regulatory protein CatR: transcriptional studies and determination of the CatR DNA-binding site by hydroxyl-radical footprinting. J. Bacteriol. 173,4717-4724.

Santos, P.M., Di Bartolo, I., Blatny, J.M., Zennaro, E., Valla, S. 2001. New broad-host-range promoter probe vectors based on the plasmid RK2 replicon. FEMS Microbiol. Lett 195, 91-96.

Sanchez-Romero, J.M., Diaz-Orejas, R., De Lorenzo, V. 1998. Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of *Pseudomonas* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4040-4046.

Saks, Ü. 2002. *cis,cis*-mukonaadi hulk *Pseudomonas putida* rakkudes – limiteeriv faktor *pheBA* promootori transkriptsiooni regulatsioonil. Magistritöö.

Schreiber, G., Metzger, S., Aizenman, E., Roza, S., Cashel, M., Glaser, G. 1991. Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 266, 4760-4767.

Shingler, V. 2003. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. Environ. Microbiol. 5, 1226-1241.

Shingler, V., Pavel, H. 1995. Direct regulation of the ATPase activity of the transcriptional activator DmpR by aromatic compounds. Mol. Microbiol. 17, 505-513.

Shingler, V., Bartilson, M., Moore, T. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVII50 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. J. Bacteriol. 175, 1596-1604.

Sze, C.C., Shingler, V. 1999. The alarmone (p)ppGpp mediates physiological-responsive control at the σ^{54} -dependent Po promoter. Mol. Microbiol. 31, 1217-1228.

Sze, C.C., Laurie, A.D., Shingler, V. 2001. *In vivo* and *in vitro* effects of integration host factor at the DmpR-regulated sigma(54)-dependent Po promoter. J. Bacteriol. 183, 2842-2851.

Sze, C.C., Moore, T., Shingler, V. 1996. Growth phase-dependent transcription of the σ^{54} -dependent Po promoter controlling the *Pseudomonas*-derived (methyl)phenol *dmp* operon of pVII50. J. Bacteriol. 178, 3727-3735.

Tegova, R. 2001. *luxAB* geenidel põhineva testsüsteemi konstrueerimine. Kursusetöö.

Timmis, K.N., Steffan, R.J., Unterman, R. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. Annu. Rev. Microbiol. 48, 525-557.

Toulokhonov, I.I., Shulgina, I., Hernandez, J.V. 2001. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the β' -subunit. J. Biol. Chem. 276, 1220-1225.

Tover, A., Ojangu E-L., Kivisaar, M. 2001. Growth medium composition-determined regulatory mechanisms are superimposed on CatR mediated transcription from the *pheBA* and *catBCA* promoters in *Pseudomonas putida*. Microbiology 147, 2149-2156.

Tover, A., Zernat, J., Chugani, S.A., Chakrabarty, A.M., Kivisaar, M. 2000. Critical nucleotides in the interaction of CatR with the *pheBA* promoter: conservation of the

CatR-mediated regulation mechanisms between the *pheBA* and *catBCA* operons. *Microbiology* 146, 173-183.

van Beilen, J.B., Wubbolts, M.G., Witholt, B. 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5, 161-74.

Wikstrom P, O'Neill E, Ng LC, Shingler V. 2001. The regulatory N-terminal region of the aromatic-responsive transcriptional activator DmpR constrains nucleotide-triggered multimerisation. *J. Mol. Biol.* 314, 971-984.

Worsey, M.J., Williams, P.A. 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124, 7-13

Yuste, L., Rojo, F. 2001. Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J. Bacteriol.* 183, 6197-6206.

Yuste, L., Canosa, I., Rojo, F. 1998. Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J. Bacteriol.* 180, 5218-5226.