

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

**Mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsuses osalevate
geenide *PP_3125* ja *PP_2037* transkriptsiooni regulatsioon**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Lisette Juhe

Juhendajad MSc Lea Ets

PhD Heili Ilves

TARTU 2024

Infoleht

Mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsuses osalevate geenide *PP_3125* ja *PP_2037* transkriptsiooni regulatsioon

Fluoriid on mineraal, mida leidub looduslikult erinevates keskkondades – nii vees, mullas kui ka taimedes. Oma antimikroobse toimega mõjub see bakteritele toksiliselt. Siiski suudavad mitmed bakterid ellu jääda ka kõrge fluoriidi kontsentratsiooniga keskkonnas. Leitud on erinevaid mehhanisme, kuidas bakterid fluoriidi toksilisusega toime tulevad. Mullabakter *Pseudomonas putida*-s on selleks fluoriidioonide eksportvalk CrcB. Meie uurimisgrupi varasemate katsete põhjal on alust arvata, et *P. putida*-s on lisaks CrcB transporterile veel fluoriiditolerantsusega seotud valke. Käesolevas töös uuriti *P. putida* kahe geeni: transkriptsiooniregulaator *PP_3125* ja aldolaasi *PP_2037* transkriptsiooni regulatsiooni, selgitamaks välja, kas ka nende kodeeritud valgud on seotud fluoriiditolerantsusega.

Märksõnas: fluoriid, *Pseudomonas putida*, aldolaas

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Transcription regulation of *PP_3125* and *PP_2037* – genes associated with fluoride tolerance in soil bacterium *Pseudomonas putida*

Fluoride is a mineral, commonly found in water, soil and plants. Due to its antimicrobial properties, it is toxic to bacteria. Nevertheless, some bacteria can survive in environments containing a high concentration of fluoride. Different mechanisms for bacteria to achieve this, have been found. The soil bacteria *Pseudomonas putida* has a fluoride ion exporter CrcB for this purpose. Based on our group's previous findings, there is reason to believe that in addition to this exporter, *P. putida* also has some other proteins associated with fluoride tolerance. In this paper, the transcription regulation of two genes: a transcription regulator *PP_3125* and aldolase *PP_2037* were studied, to determine, whether their coded proteins could be associated with fluoride tolerance in *P. putida*.

Keywords: fluoride, *Pseudomonas putida*, aldolase

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

| | |
|---|----|
| SISSEJUHATUS | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 6 |
| 1.1. Fluoriid | 6 |
| 1.1.1 Fluoriidi mõju bakteritele | 6 |
| 1.1.2 Fluoriiditolerantsus | 7 |
| 1.1.3 <i>Pseudomonas putida</i> fluoriiditolerantsus | 8 |
| 1.2. Transkriptsiooni initsiatsioon bakterites | 9 |
| 1.2.1 <i>Pseudomonas putida</i> transkriptsiooniregulaator PP_3125 | 10 |
| 1.3. Aldolaas | 11 |
| 1.3.1 L-fukuloos 1- fosfaat aldolaas | 12 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 13 |
| 2.1. Töö eesmärgid | 13 |
| 2.2. Materjal ja meetodika | 14 |
| 2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid | 14 |
| 2.2.2 PCR | 14 |
| 2.2.3 Geelelektroforees | 16 |
| 2.2.4 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon | 16 |
| 2.2.5 Plasmiidse DNA eraldamine | 17 |
| 2.2.6 PCR produktide, ligaasireaktsiooni ja sadestamine | 17 |
| 2.2.7 Kloneerimine | 17 |
| 2.2.8 Sekveneerimine | 17 |
| 2.2.9 β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine | 18 |
| 2.2.10 Statistiline analüüs | 18 |
| 2.3. Tulemused | 19 |
| 2.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> PP_2037 ja PP_3125 geenide eelsete DNA järjestuste <i>in silico</i> analüüs promootoralade leidmiseks | 19 |
| 2.3.2 <i>Pseudomonas putida</i> PP_2037 ja PP_3125 promootorjärjestustega pBLKT-3 reporterplasmiidide konstrueerimine | 19 |
| 2.3.2 Naatriumfluoriidi mõju <i>P. putida</i> transkriptsiooniregulaator PP_3125 transkriptsioonile | 21 |
| 2.3.3 Aldolaasi (PP_2037) transkriptsiooni sõltuvus transkriptsiooniregulaator PP_3125 -st | 22 |
| 2.4. Arutelu | 23 |
| KOKKUVÕTE | 25 |
| SUMMARY | 26 |

| | |
|---|----|
| Tänuõnad..... | 27 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 28 |
| KASUTATUD VEEBILEHED..... | 31 |
| LISAD | 32 |
| Lisa 1. p- väärtused..... | 32 |
| Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks | 33 |

SISSEJUHATUS

Fluor on maakooses leviku poolest 13. element, mis on isoleeritud kujul väga reaktiivne. Seetõttu esineb fluori looduses tihti ioonses vormis – fluoriidina (Rao, 2003, Johnston & Strobel 2020). Fluoriid on levinud mineraal, mida leidub nii mullas, vees kui ka taimedes. Elusorganismidele on fluoriid reeglina toksiline, inhibeerides näiteks süsivesikute metabolismi (Adamek et al. 2005). Siiski on mitmed prokarüootid omandanud mehhanisme, mis võimaldavad neil ellu jääda ka kõrgetel fluoriidi kontsentratsioonidel. Nende hulgas on bakteritel näiteks ribolülitid või fluoriidiooni väljapumpavad eksportvalgud, mis aitavad fluoriidi kontsentratsiooni raku sees madalana hoida (Marquis et al. 2003).

Pseudomonas putida on gram-negatiivne mullabakter, kellel on võrdlemisi kõrge stressitaluvus ning mitmeid metaboolseid ensüüme, mistõttu on bakter pakkunud huvi ka biotehnoloogilistel eesmärkidel, sealhulgas fluori sisaldavate ühendite sünteesiks (Calero et al. 2020). *P. putida*-l on siiani fluoriiditolerantsusega seotud mehhanismidest teada vaid CrcB transporter Valk, mis pumpab rakust välja fluoriidioone (Calero et al. 2022). Meie uurimisgrupi varasemate katsete puhul oli põhjust arvata, et lisaks CrcB-le on *P. putida*-s veel fluoriiditolerantsusega seotud valke. Selleks sooritati transposoonmutagenees *crcB* deletsioonitüvele, millest selgus, et katkestus transkriptsiooniregulaatori *PP_3125* geenis suurendas Δ *crcB* fluoriiditaluvust (Lopp, 2022). Viidi läbi proteoomanalüüs, et leida gene, mida *PP_3125* reguleerib. Sellest selgus, et *Pseudomonas putida* tüvedes, mille genoomist puudus *PP_3125* geen, oli aldolaasi (*PP_2037*) valgu hulk tunduvalt suurem. Samuti oli *PP_3125* valgu tase fluoriidi puudumisel väga madal, kuid fluoriidi juuresolekul kõrgem (Ets, avaldamata).

Nendest tulemustest lähtuvalt said minu töö eesmärkideks välja selgitada, kas *P. putida* transkriptsiooniregulaator *PP_3125* transkriptsioon sõltub kasvukeskkonnas olevast fluoriidist ning kindlaks teha, kas *PP_3125* transkriptsiooniregulaator mõjutab *PP_2037* aldolaasi transkriptsiooni.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Fluoriid

Fluor on halogeenide rühma kuuluv rohekas gaas. Maakooses levinumatest elementidest on fluor 13ndal kohal. Elemendina on see väga reaktiivne ning looduslikult fluori kunagi isoleeritud kujul ei leidu (Rao, 2003). Seega looduses esineb fluori kas kompleksina või ioonses vormis fluoriidina (Johnston & Strobel 2020). Fluoriid on mineraal, mida leidub nii vees, mullas, taimedes kui toidus. Kuna fluoriid on antimikroobse toimega, siis 1950ndatest on fluoriid olnud kasutusel ka suuhügieenis ning osades riikides lisatud joogiveele oma kaariese vastase omaduse tõttu (Levine 1976, Mullen 2005).

1.1.1 Fluoriidi mõju bakteritele

Kuigi siiani pole täpselt teada, millise mehhanismi kaudu fluoriidi toksilisus bakteritel väljendub, on peamine põhjus arvatavasti süsivesikute metabolismi inhibitsioon (Adamek et al. 2005). Üks viis selleks on valkude, eelkõige ensüümide inhibeerimine. Fluoriidil on kõrge afiinsus metallide suhtes, enim just kaltsiumi ja magneesiumi, millega seondudes tekib lahustumatu kompleks (Johnston & Strobel 2020).

Veel üks seletus süsivesikute metabolismi inhibitsiooniks fluoriidi tõttu on tsütoplasma hapestumine (Whitford et al. 1977). See tekib eelkõige nõrga happe akumulatsiooni efekti tõttu. Fluoriid on kõige toksilisem oma protoneeritud vormis, HF-ina, millena esineb happelises keskkonnas (Johnston & Strobel 2020). Kui ekstratsellulaarse keskkonna pH väheneb, siseneb fluoriid rakku nõrga happe HF-ina. Kuna HF-i pK_a on kõrge: ligikaudu 3.4, on kergelt happelises keskkonnas märkimisväärses koguses ekstratsellulaarset HF-i (Baker et al. 2012). HF on molekulina väike ning laenguta, seetõttu läbib ta rakumembraani hõlpsasti. Tsütoplasmaatiline pH on tunduvalt kõrgem (7-7.5), mistõttu hape dissotsieerub seal prootoniks ja fluoriidiooniks (Wilks & Slonczewski 2007). Tekkinud laenguga osakesed ei suuda enam läbi membraani difundeeruda ning seetõttu kuhjuvad – mida rohkem fluoriidi rakku siseneb, seda happelisemaks muutub tsütoplasma (Marquis et al. 2003). Selline hapestumine võib jällegi inhibeerida glükolüütilisi ensüüme, nagu näiteks enolaasi, mis on eriti tundlikud tsütoplasma pH muutustele (Bunick & Kashket 1981).

1.1.2 Fluoriiditolerantsus

Fluoriidi toksilisusega toimetulemiseks on bakteritel väljakujunenud erinevaid mehhanisme, mis võimaldavad ellu jääda ka kõrge fluoriidi kontsentratsiooniga keskkonnas (Maltz & Emilson 1982).

Üheks viisiks, kuidas mikroorganismid fluoriidi sisaldavas keskkonnas toime tulevad, on fluoriidioone eksportivate membraanivalkude abil. Seniks on kirjeldatud kahte fluoriidi eksportvalkude perekonda. Prokarüootides esinevad F^-/H^+ antiporterid perekonnast CLC^F ning nii eukarüootides kui prokarüootides leiduvad F^- spetsiifilised ioonkanalid Fluc/FEX perekonnast (McIlwain et al. 2021). Bakterites on rohkem levinud Fluc kanalid (Baker et al. 2012).

CLC^F F^-/H^+ antiporterid kasutavad transmembraanset prootongradienti või ATP hüdrolüüsi, et termodünaamiliselt ülesvoolu juhtida liias olevaid substraate. Need kanalid ekspordivad fluoriidi aniooni ühe vesiniku katiooni vastu (Baker et al. 2012).

Fluc/FEX (Fluc prokarüootides, FEX eukarüootides) kanali puhul on tegemist passiivse, ühesuunalise F^- liikumisega, kus anioon väljub rakust mööda elektrokeemilist gradienti (Stockbridge et al. 2013). Fluc kanaleid kodeerib *crcB* geen, seetõttu nimetatakse valku ka CrcB-ks. Fluc kanalid töötavad nõrga happe akumulatsiooni vastu, pumbates rakust välja fluoriidiiioone, vältimaks nii selle toksilist kuhjumist rakku. Tänu nendele kanalitele hoitakse fluoriidi kontsentratsioon raku sees normaalsena, mistõttu saab bakter kasvada ka fluoriidirikkas keskkonnas (Marquis et al. 2003).

Enamikul juhtudel paiknevad fluoriidi eksportvalke kodeerivad geenid ühes operonis ja on fluoriidi ribolüliti kontrolli all. Ribolülidid on reguleeritud lõigud bakteriaalses mRNA-s, mis seovad metaboliite. Enamasti paiknevad ribolülidid mRNA 5'-mittetransleeritavas osas ning metaboliidi seondumisega kaasnev muutus mRNA konformatsioonis reguleerib allavoolu paikneva geeni avaldumist (Weinberg et al. 2010). Seega on ribolülidid viis, mis otseselt seob metaboliitide kontsentratsiooni geeniregulatsiooniga. Fluoriidi ribolülidid detekteerivad fluoriidiiioone ja reguleerivad seeläbi eksportvalkude mRNA translatsiooni (Baker et al. 2012). Näiteks leiti *Pseudomonas syringae* mittekodeerivate RNA-de analüüsimisel *crcB* motiiviga ribolüliti, mis seob spetsiifiliselt fluoriidiiioone (Baker et al. 2012). Erinevates bakterites esineb *crcB* ribolüliti eri geenide ees, kuid enamasti paikneb see siiski fluoriidiiiooni transporterite ees. *CrcB* ribolüliti toimib läbi RNA-s tekkiva pseudosõlme (Weinberg et al. 2010). Kui fluoriidioon mRNA-ga seondub, muutub mRNA struktuur ning terminaatorstruktuuri tekkimine on takistatud. *CrcB* ribolüliti

aktiivsuseks on vajalikud magneesiumioonid, mis stabiliseerivad fluoriidiooni seondumist RNA-ga (Baker et al. 2012).

1.1.3 *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsus

Pseudomonas putida on gram-negatiivne keskkonnabakter, milles leidub laialdaselt metaboolseid ensüüme (Peter et al. 2017). Bakter on tuntud oma kõrge stressitaluvuse poolest, mis tähendab, et ka toksiinide taluvus on parem, kui mitmetel teistel bakteritel. Oma vähenõudlikkuse, vastupidavuse ja metaboolsete omatuste tõttu pakub *P. putida* huvi mitmetel biotehnoloogilistel eesmärkidel, sealhulgas ka ühendite tootmiseks keskkonnasõbralikumal viisil. Enim huvi pakub bakter just fluori sisaldavate ühendite sünteesiks (Calero et al. 2020).

Calero et al. (2022) leidsid, et *Pseudomonas putida*-s on fluoriidi taluvuses keskne roll CrcB kanalil. Eemaldades *crcB* geeni, kuhjus bakterirakku märkimisväärses koguses fluoriidi, mis pärssis *P. putida* kasvu juba väga madalatel NaF-i kontsentratsioonidel. Samuti selgus, et *P. putida*-s on CrcB selline efekt just fluoriidile spetsiifiline, mitte seotud ka teiste stressoritega ning üldise stressitaluvuse funktsiooniga.

1.2. Transkriptsiooni initsiatsioon bakterites

Geeniekspressioonis on esimene samm transkriptsiooni initsieerimine. Bakteriaalne transkriptsiooni initsiatsiooni protsess hõlmab RNA polümeraasi, promootorjärjestust ja reguloorseid mehhanisme, mis tagavad korrektse geeniekspressiooni vastusena rakusisestele ja välistele signaalidele (Seshasayee et al. 2011).

Esimeseks etapiks transkriptsiooni initsiatsioonis prokarüootidel on RNA polümeraas holoensüümi moodustumine. Sinna kompleksi kuuluvad RNA polümeraas tuumikensüüm ja sigma faktor. RNA polümeraas katalüüsib RNA sünteesi DNA matriitsilt ning sigma faktor on subühik, mis tunneb ära spetsiifilise promootorjärjestuse ning suunab sellele RNA polümeraas holonensüümi (Browning & Busby 2004). Sigma faktorid on promootorspetsiifilised ning jagunevad promootori tüübi järgi perekondadesse. Bakterite aktiivsel kasvatamisel on enamasti kasutusel σ^{70} tüüpi sigma faktorid, mis tunnevad ära nn. koduhoidja geenide promootoreid (Paget & Helmann 2003). σ^{54} tüüpi faktorid juhivad transkriptsiooni eelkõige vastuseks keskkonnasignaalidele ning vajavad lisaenergiat (Zhang & Buck 2015).

Promootorjärjestus on spetsiifiline reguloorne lõik geenile eelnevas DNA-s, mille sigma faktor ära tunneb ning millelt transkriptsioon alguse saab (Piramanayagam et al. 2021). Promootori järjestuse spetsiifilisus on oluline, kuna see määrab ära, kas ja millal vastavat geeni transkribeeritakse (Goodrich et al. 1996). Kuigi promootorjärjestused erinevad genoomiti, esineb prokarüootide promootoril kaks konserveerunud regiooni: -35 element ja -10 element (Harley & Reynolds 1987). -35 element asub ligikaudu 35 nukleotiidi transkriptsiooni alguspunktist ülesvoolu. Sigma 70 sõltuva promootori puhul on -35 elemendi konsensusjärjestuseks TTGACA. -10 element paikneb transkriptsiooni alguspunktist ligikaudu 10 nukleotiidi ülesvoolu. Sigma 70 sõltuva promootori puhul on selle elemendi konsensusjärjestus TATAAT (Typas & Hengge 2006). Need elemendid tunneb ära sigma faktor, mille järel RNA polümeraas tuumikensüüm järjestusele seondub, moodustades transkriptsiooni initsiatsiooni kompleksi. Seondumine põhjustab DNA lahtikeerdumist, mida hõlbustab ka A-T rikas -10 regioon (Mejía-Almonte et al. 2020).

Pärast seondumist ja DNA matriitsi lahtikeeramist, alustab RNA polümeraasi holoensüüm RNA sünteesi. Enne päris transkriptsiooni alustamist sünteesitakse ja vabastatakse lühikesi RNA transkripte (Goldman et al. 2009). Seejärel vabastatakse sigma faktor ning RNA polümeraasi tuumikensüüm lahkub promootorilt, jätkates RNA sünteesi 5'-3'suunas (Cooper 2000).

Transkriptsiooni initsiatsioon on prokarüootides reguleeritud mitmete mehhanismidega. Näiteks võivad bakterid toota erinevaid sigma faktoreid vastavalt keskkonnatingimustele. Kuna sigma faktorid on promootori suhtes spetsiifilised, võimaldab see erinevate geenide regulatsiooni, mõjutades milliste geenide transkriptsiooni parasjagu initsieeritakse (Kazmierczak et al. 2005). Samuti kontrollivad transkriptsiooni initsiatsiooni erinevad transkriptsiooniregulaatorid. Need on valgud, mis ei kuulu ensüümide alla, kuid on seotud transkriptsiooni initsiatsiooni ja regulatsiooniga. Reeglina seonduvad transkriptsiooniregulaatorid kindlatele DNA järjestustele ja vastavalt kas aktiveerivad või represserivad transkriptsiooni initsiatsiooni. Aktivaatorid võivad toetada RNA polümeraasi seondumist promootorile ning seeläbi transkriptsiooni aktiveerida, repressorid võivad seondumist takistada ning seetõttu represserida ka geenide ekspressiooni (Latchman 1993).

1.2.1 *Pseudomonas putida* transkriptsiooniregulaator PP_3125

Pseudomonas putida transkriptsiooniregulaator PP_3125 kuulub Cro/C1 tüüpi regulaatorite hulka. Cro/C1 tüüpi heeliks-pööre-heeliks domeen on DNA-ga seonduv domeen transkriptsiooniregulaatorites. Oma nime on see saanud bakteriofaag 434 ja lambda transkriptsiooni repressorite Cro ja C1 järgi. Lisaks faagidele leidub selliseid regulaatoreid ka prokarüootides ja eukarüootides (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q88I76>, viimati külastatud 06.11.2023)

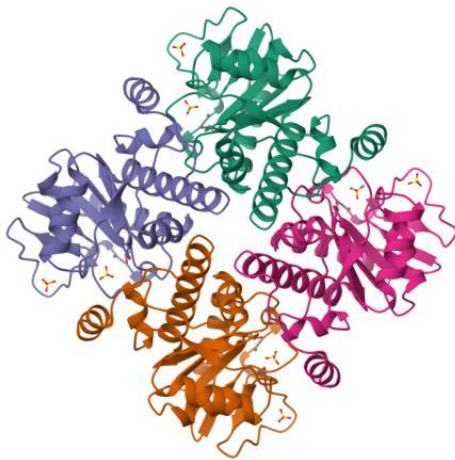
1.3. Aldolaas

Aldolaasi perekonna ensüümid katalüüsivad metaboolsete radade olulistes etappides aldoolreaktsioone, mille käigus sünteesitakse või lõhutakse süsiniksidemeid, andes produktina aldooli. Aldolaaside põhiline funktsioon on ketoosi ja aldehüüdi konversioon aldooliks. Aldoolid on ühendid, mis sisaldavad hüdroksüülrühmast 2 süsiniku kaugusel aldehüüdi või ketooni ning on mitmete komplekssete ühendite sünteesi vaheühenditeks (Lee et al. 2022). Enamik aldolaasidest on doonorspetsiifilised, ehk saavad kasutada ainult kindlat doonorühendit, kuid taluvad mitmeid aldehüüde aktseptorühendina (Samland & Sprenger 2006). Substraadispetsiifilisuse ja mehhanismi järgi on üldiselt eristatavad kaks aldolaaside klassi (Bolt et al. 2008). Esimese klassi aldolaasid toimivad ilma kofaktoriteta, teise klassi aldolaasid vajavad tsingiiooni, mis aktiveeriks doonori (Cornelius et al. 2023). Mõlema mehhanismi puhul viib süsiniksidemete teke kahe uue stereotsentri tekkeni (Bolt et al. 2008). Enamasti leidub esimese klassi ensüüme kõrgemates organismides ning teise klassi aldolaase bakterites ja madalamates organismides (Plater et al. 1999). On kirjeldatud ka kolmandat klassi (IA) aldolaase, mille mehhanism on sarnane esimese klassi omale, kuid mida leidub arhedes (Siebers et al. 2001).

Aldolaasidel on täheldatud ka *moonlighting* funktsiooni (Figuera et al. 2013). *Moonlighting* on valkude evolutsiooni käigus omandatud fenomen, kus üks valk täidab rohkem kui ühte funktsiooni (Piatigorsky & Wistow 1989). Üks geen võib kodeerida mitut valku läbi alternatiivse RNA splaissingu, aga kuna sellisel juhul on tegemist erinevate polüpeptiidahelatega, ei loeta neid *moonlighting* valkudeks. Tegemist peab olema multifunktsionaalse valguga, mille ülesanded on täidetud ühe polüpeptiidahela poolt (Jeffery 1999). *Moonlighting* valgud võivad erinevat käitumist näidata mitte ainult asukoha tõttu, vaid sõltuvalt ka rakutüübist, milles neid ekspresseeritakse (Jeffery 2005). Kõige tavalisem primaarfunktsioon nendel valkudel on ensümaatilise katalüüsi ning nad on omandanud sekundaarse rolli, näiteks transkriptsiooni regulatsioon, signaaliülekanne või struktuurne roll (Sriram et al. 2005). *Moonlighting* omadust on nähtud mitmete glükolüüsiraja ensüümide puhul. Fruktoos 1,6- bisfosfaat aldolaas osaleb pärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) lisaks süsivesikute metabolismile ka transkriptsiooni kontrollis, läbi füüsilise interaktsiooni (Cieśla et al. 2014). Samuti on mõnel juhul ekstratsellulaarne aldolaas oluline patogeeni virulentsuse jaoks, interakteerudes peremeesraku faktoritega (Figuera et al. 2013).

1.3.1 L-fukuloos 1- fosfaat aldolaas

Mullabakter *Pseudomonas putida* PP_2037 geen kodeerib L-fukuloos 1-fosfaat aldolaasi. Sinna alamgruppi kuuluvad aldolaasid, mis katalüüsivad L-fukuloos-1-fosfaadi lõhkumist dihidroksüatsetoon fosfaadiks (DHAP) ja L- laktaldehüüdiks (vt *Joonis 1*). Ensüüm kuulub prokarüootides teise klassi aldolaaside sekka ning vajab reaktsiooni katalüüsimiseks tsingiiooni. (Joerger et al. 2000). L-fukuloos 1-fosfaat aldolaaside poolt katalüüsitud reaktsiooni tulemusena saavad bakterid kasutada L-fukoosi süsinikuallikana, aidates neil ellu jääda erinevates keskkondades. L- fukuloos 1- fosfaat aldolaas ei ole *Pseudomonas putida* puhul oluline keskses metabolismis, kuid on vajalik fruktoosi ja mannoosi lagundamises ning pentoosi ja glükuronaadi teisendustes.



Joonis 1. L-fukuloos-1-fosfaat aldolaasi struktuur *Escherichia coli* näitel. Värviliselt on kujutatud polümeer ning väikeste pall- kriips molekulidena valguga ligandid (Joerger et al. 2000b)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie laboris uuritakse *Pseudomonas putida* KT2440 fluoriiditolerantsust mõjutavaid faktoreid. Kirjandusest on teada, et *P. putida* rakkudes on üheks fluoriiditolerantsust mõjutavaks valguks fluoriiditransporter CrcB (Calero et al. 2022). Samas meie uurimisgrupi katsete põhjal oli alust arvata, et lisaks CrcB transporterile võib olla fluoriidi talumises osalevaid valke veel. Selle välja selgitamiseks teostas Lea Ets oma magistritöö raames transposoonmutageneesi *P. putida* KT2440 Δ crcB deletsioontüvele ning leidis, et transkriptsiooniregulaator *PP_3125* geeni katkestus tõstab *P. putida* Δ crcB fluoriidi taluvust (Lopp, 2022). Selleks, et leida genee, mida *PP_3125* reguleerib, viis Lea läbi proteoomanalüüsi *P. putida* Δ crcB Δ PP_3125 rakkudele nii fluoriidi juuresolekul kui ilma. Proteoomi analüüsist selgus, et *P. putida* tüvedes, kus oli puudu *PP_3125* geen, oli aldolaasi (*PP_2037*) valgu hulk kuni 200 korda suurem. Samuti oli proteoomis näha, et fluoriidi puudumisel oli *PP_3125* valgu tase väga madal, kohati alla detekteerimispiiri, kuid fluoriidi olemasolul alati detekteeritav (Ets, avaldamata). Nendest tulemustest püstitus hüpotees, et transkriptsiooniregulaator *PP_3125* osaleb kas otseselt või kaudselt aldolaasi *PP_2037* regulatsioonis ning *PP_3125* enda ekspressioonitase võib sõltuda fluoriidi olemasolust kasvukeskkonnas.

Sellest lähtuvalt said minu töö eesmärkideks:

- 1) selgitada välja, kas *Pseudomonas putida* transkriptsiooniregulaator *PP_3125* geeni transkriptsioon sõltub kasvukeskkonnas olevast fluoriidist.
- 2) kindlaks teha, kas *PP_3125* transkriptsiooniregulaator mõjutab *PP_2037* aldolaasi geeni transkriptsiooni.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid

Bakterite kasvatamisel kasutasin LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöödet (Miller,1993) ning tardsöötme valmistamiseks lisasin vedelsöötmesse agarit (15 mg/ml). Vedelsöötmes kasvatades aereerisin kultuure loksutil (180 rpm). Töös kasutatud tüved on esitatud Tabel 1.

Reporterplasmiidiga kolooniate seleksiooniks kasutasin kanamütsiini (Km) lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. *Pseudomonas putida* rakke kasvasin 30 °C juures, *Esterichia coli* rakke 37 °C juures. Selleks, et tuvastada bakterites *lacZ* geeni ekspressiooni, lisasin LB tardsöötmele X-gal-i (20 mg/ml).

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

| BAKTERITÜVI | ISELOOMUSTUS | ALLIKAS |
|-------------------------|--|-------------------------------|
| <i>P. putida</i> KT2440 | <i>Pseudomonas putida</i> algne tüvi | (Bagdasarian et al. 1981) |
| <i>P. putida</i> Δ3125 | <i>PP_3125</i> geen <i>P. putida</i> genoomist deleteeritud | (Lopp 2022) |
| <i>E. coli</i> DH5αλpir | supE44, ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15), hsdR17 (rk ⁻ mk ⁺), recA1, endA1, thi1, gyrA, relA, λpir | (Martínez-García et al. 2011) |
| Plasmiidid | | |
| pBLKT-3 | promootorita <i>lacZ</i> geeni ja Km resistentsusgeeni sisaldav vektorplasmiid | Avaldamata, Riho Teras |
| pBLKT-3_2037_prom | pBLKT-3, milles <i>lacZ</i> geeni ette kloonitud 500 nt <i>PP_2037</i> geeni eelset ala | Käesolev töö |
| pBLKT-3_3125_prom | pBLKT-3, kuhu <i>lacZ</i> geeni ette viidud <i>PP_3125</i> promootorala sisaldav 500 nt DNA lõik | Käesolev töö |

2.2.2 PCR

Konstruktide kontrolliks ja eraldatud DNA amplifitseerimiseks kasutasin PCR-i (ingl k – *Polymerase Chain Reaction*). PCR reaktsioonisegu lõppmahuks oli 20 µl. Reaktsioonisegu sisaldas: 1 x PCR puhvrit (*Thermo Scientific DreamTaq Green Buffer* (10x), puhver sisaldas 2,5

mM MgCl₂), 0,2 mM dNTP-d, 0,7 U Taq polümeraasi ja 10 pmol kumbagi praimerit. Töös kasutatud praimerid on välja toodud Tabel 2.

PCR etapid olid järgmised:

- 1) Eelkuumutus 98 °C
- 2) Denaturatsioon 98 °C, 30 sekundit
- 3) Praimerite seondumine 56-64 °C (sõltuvalt praimeritest) 20-30 sekundit
- 4) DNA süntees 72 °C, vastavalt amplifitseeritava lõigu pikkusele 1 min/kb
- 5) Järelsüntees 72 °C 10 minutit

Etappe 2-4 korrati 25 tsüklit.

Kloneerimisel kasutasin Phusion PCR-i. Sel juhul oli reaktsioonisegu lõppmaht 50 µl. PCR segu sisaldas: 1 x *Phusion High-Fidelity* puhvrit, 0,2mM dNTP-d, 0,5 µM kumbagi praimerit, 1 U *Phusion High-Fidelity* polümeraasi ja 3µl DNA-d.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid.

| NIMETUS | 5'-3'JÄRJESTUS | ISELOOMUSTUS |
|-----------------|---------------------------------|--|
| PP_2037-BHI_uus | TAGGATCCGCCTTGTAGAAAGCCACCTCTGC | Seondub <i>PP_2037</i> geenist ülesvoolu, suunaga geeni alguse poole, praimerit 5' otsa on disainitud <i>BamHI</i> lõikesait |
| PP_2037_promBHI | TAGGATCCGGGGTTGAGACTAGGAATGGC | Seondub <i>PP_2037</i> geeni ette, suunaga promotori -10 boxi poole, praimerit 5' otsa on disainitud <i>BamHI</i> lõikesait |
| lacZ-seq | GGGGATGTGCTGCAAGGCG | Seondub <i>lacZ</i> geeni algusesse. |
| T1T2 | GGCCTTTTTGCGTAGATC | Seondub pBLKT-3 vektori terminaatoralale 107-125 nt <i>lacZ</i> geenist ülesvoolu, suunaga <i>lacZ</i> poole. |
| PP_3125_BHI_uus | TAGGATCCGACCCTGGCCCACCATATTC | Seondub <i>PP_3125</i> geenist ülesvoolu, suunaga geeni |

| | | |
|-----------------|-----------------------------|--|
| | | alguse poole, praimer 5' otsa on disainitud BamHI lõikesait |
| PP_3125_promBHI | TAGGATCCGTGACGCGAGTTTCCCAGG | Seondub PP_3125 geeni ette, suunaga promotori –10 boxi poole, praimer 5'otsa on disainitud BamHI lõikesait |

2.2.3 Geelelektroforees

PCR produkte kontrollisin agaros-geelelektroforeesil. Kandsin PCR proovid etiidiumbromiidiga 1%-le agarosgeelile 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). DNA fragmentide hindamiseks kasutasin suurusmarkerit (*Thermo Fisher Generuler ladder 2*). Elektroforeesil kasutasin pinget 130V ning DNA visualiseerimisel UV-valgust.

2.2.4 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Esterichia coli rakke kasvasin üleöö 5 ml-s LB-vedelsöötmes. Kompetentsete rakkude saamiseks inokuleerisin 115 µl üleöökuultuuriga 5 ml LB-vedelsöödet ning kasvasin 37° C juures loksutil 2 tundi. Seejärel tsentrifugeerisin (30 sek, 12000 x g) rakud söötmest välja ning pesin kolm korda 400 µl glütserooliga (10%). Suspendeerisin rakud 80 µl glütseroolis. Nii rakke kui töölahuseid hoidsin pidevalt jääl.

Pseudomonas putida rakke kasvasin 5 ml-s LB vedelsöötmes üleöö. Tsentrifugeerisin 300 µl üleöökuultuuri kokku (1 min 12000 x g) ning pesin 300 µl 300 mM sahharoosi lahusega kolm korda. Suspendeerisin rakud 100 µl 300 mM sahharoosi lahuses.

Kompetentsetesse rakkudesse plasmiidse DNA viimiseks kasutasin elektroporatsiooni. Lisasin kompetentsetele rakkudele vees lahustatud plasmiidset DNA-d. Segu viisin elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooniks kasutasin firma BioRad elektroporaatorit „*E. Coli pulser*“ pingel 2,5 kV. Peale elektroporatsioonist lisasin rakkudele 700 ml LB-vedelsöödet, pestes rakud küvetist välja. Kasvasin rakke 45 minutit temperatuuril 37 °C (*E. coli*) või 30 °C (*P. putida*). Seejärel tsentrifugeerisin rakud kokku (12000 x g) ning plaatisin rakud selektiivsöötmege tassile (Km; 50 µg/ml).

2.2.5 Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmiidse DNA eraldas, kasutades firma FavorPrep plasmidi eralduse komplekti *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* ning järgides sellega kaasasolevat protokollit.

2.2.6 PCR produktide, ligaasireaktsiooni ja sadestamine

PCR produkti või reaktsioonide sadestamiseks viisin segu mahu veega 100 µl-ni, lisasin 0,1 mahtu 5 M NaCl-i ja 2,5 mahtu 96% etanooli. Sadenemine toimus -20°C juures 10 minutit. Seejärel tsentrifuugisin (12000 x g) sademe põhja 10 minuti jooksul 4 °C juures. Sadet pesin 2 korda 150 µl 80% etanooliga ning kuivatasin 37° C juures.

2.2.7 Kloneerimine

Restriksioonisegude valmistamiseks viisin läbi reaktsiooni mahus 20 µl. Segu sisaldas 1x *FastDigest* restriksioonipuhvrit, 0,5 µl *BamHI* restriктаasi, 7 µl kloonitavat DNA-d või 5 µl kloonimisvektorit, lõppmahu viisin 20 µl-ni veega. Restriksiooniisegused hoidsin 30 minutit 37°C juures. 1 minuti möödumisel töötlesin kloonimisvektorit 1 µl-i firma Thermo Scientific aluselise fosfataasi fastAP-ga. (1 U/ µl). Restriктаaside ja fastAP inaktiveerimiseks hoidsin segused 10 minutit 80 °C juures.

Ligeerimiseks lahustasin sadestatud DNA vees. Ligeerimise viisin läbi mahus 15 µl, segu sisaldas ligeeritavaid DNA-sid, 1x T4 ligeerimispuhvrit, 10 mM ATP-d, 1 µl *Thermo Scientific* T4 ligaasi. Reaktsioon toimus toatemperatuuril üleöö, ligaasi inaktiveerimiseks hoidsin segu 10 minutit 80°C juures ning seejärel sadestasin ligaasisegu. Sadestatud DNA lahustasin vees ning elektroporeerisin bakterirakkudesse.

2.2.8 Sekvenerimine

Selleks, et enne sekvenerimist reaktsioonisegust ülejäänud nukleotiidid ja praimerid eemaldada, töötlesin segu 1 U FastAP aluselise fosfataasiga (*Thermo Scientific*) ning 2,5 ühiku ExoI eksonukleasiga (*Thermo Scientific*). Seejärel hoidsin reaktsiooni 30 minutit 37 °C juures. Proovid valmistasin sekvenerimiseks ette, kasutades *Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit*-i (*Applied Biosystem*), toimisin tootja poolse protokollit järgi. Reaktsioonisegu sisaldas 1 µl eeltöödeldud PCR produkti, 1,6 pmol vastavat praimerit, 2 µl 5x lahjenduspuhvrit, 0,7 µl *BigDye premix*'i ning reaktsiooni viisin 10 µl-i, lisades vett. DNA järjestuse määramiseks kasutasin Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekvenerimisteenust.

2.2.9 β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine

β -galaktosidaasi eriaktiivsused määrasin *lacZ* reporterplasmidi sisaldavatest *P. putida* tüvede KT2440 ja Δ 3125 rakkudest. Reporterplasmiidides pBLKT-3_2037_prom ja pBLKT-3_3125 oli *lacZ* geeni transkriptsioon vastavalt kas *PP_2037* või *PP_3125* promootori kontrolli all. Baktereid kasvasin üleöö 30 °C juures loksutil LB söötmes, kuhu olin selektsiooniks lisanud Km-i (50 μ g/ml). Fluoriidisõltuvuse katsete puhul kasvasin rakke üleöö paralleelselt kahes LB-Km söötmes, millest ühele lisasin NaF-i lõppkontsentratsiooniga 30 mM. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmiseks segasin kokku reaktsioonisegud, milles oli 1,6 ml Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β -merkaptotoetanool; 0,0005 % naatriumdodetsüülsulfaat (SDS); pH 7), 400 μ l ONPG lahust (4 mg/ml) ja 100 μ l kloroformi. Reaktsioonisegusse lisasin reaktsiooni käivitamiseks 60 μ l üleöö bakterikultuuri ja mõõtsin aega rakkude lisamisest reaktsiooni peatamiseni. Reaktsiooni peatamiseks kasutasin 1 ml Na₂CO₃ (1 M).

Mõõtsin kollase värvuse tekkeni kulunud aega, värvi intensiivsust ja rakkude tihedust. Spektrofotomeetriliselt määrasin lainepikkusel 420 nm tekkinud orto-nitrofenooli hulga. Rakukultuuri tihedust määrasin lainepikkusel 580 nm. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse arvutamiseks Milleri ühikutes kasutasin valemit $\frac{1000 \times (OD_{420} - 1,75 \times OD_{550})}{t \times V \times OD_{580}}$, valemis on t reaktsiooniks kulunud aeg, V reaktsionis kasutatud bakterikultuuri maht (ml), OD₄₂₀ neeldumine 420 nm juures, OD₅₅₀ neeldumine 550 nm juures ning OD₅₈₀ mõõdetud rakukultuuri tihedus (Miller, 1972).

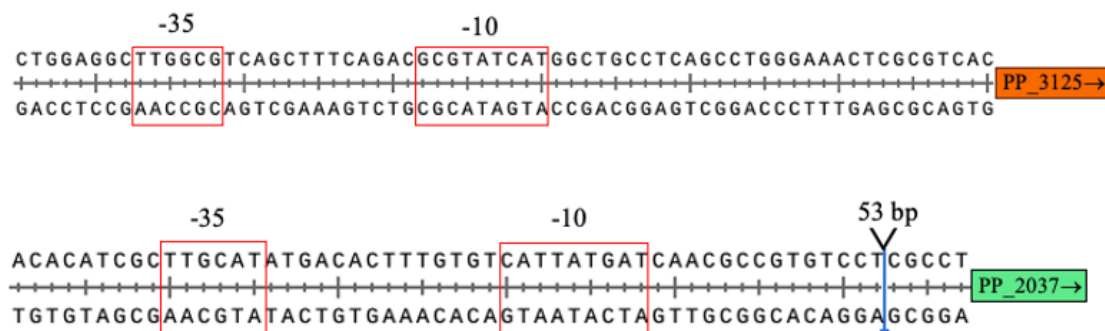
2.2.10 Statistiline analüüs

Katsetulemuste statistiliseks analüüsiks viisin läbi standardse kahepoolse t-testi. Graafikud koostas Microsoft Excelis. T- testi p-väärtused on esitatud lisas 1.

2.3. Tulemused

2.3.1 *Pseudomonas putida* PP_2037 ja PP_3125 geenide eelsete DNA järjestuste *in silico* analüüs promootoralade leidmiseks

Selleks, et selgitada välja nii PP_2037 kui ka PP_3125 geeni promootoralad, kasutasin *Softberry* programmi BPROM (www.softberry.com), mis ennustab sigma70 tüüpi promootorite paiknemist. Mõlema geeni puhul analüüsisin programmiga 400 nt pikkust DNA lõiku geneelsest alast. PP_3125 eelses piirkonnas ennustas programm ühe promootori LDF skooriga 2.98. -10 boxi asukoha järjestusega GCGTATCAT ja -35 boxi järjestusega TTGGCG. LDF skoor peegeldab tõenäosust, et DNA järjestus promootorina toimib. Kõrge LDF skoor vihjab suuremale tõenäosusele ja madalam skoor väiksemale tõenäosusele. PP_2037 geeni eelses alas tuvastas programm samuti ühe promootori LDF skooriga 3.02, -10 box järjestusega CATTATGAT ja -35 box järjestusega TTGCAT (Joonis 2).

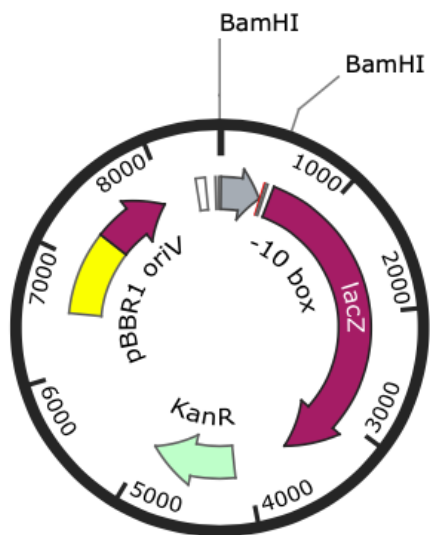


Joonis 2. *Softberry* ennustatud promootoralade -10 ja -35 elementide asukohad. PP_2037 geeni eelsest alast on joonise kompaktsuse huvides eemaldatud 53 bp pikkune järjestus.

2.3.2 *Pseudomonas putida* PP_2037 ja PP_3125 promootorjärjestustega pBLKT-3 reporterplasmiidide konstrueerimine

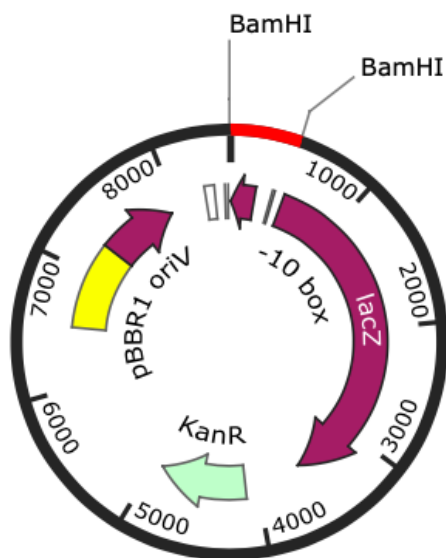
Softberry ennustatud promootorite põhjal konstrueerisin mõlema geeni jaoks praimerid, mis aitasid üles amplifitseerida ligikaudu 500 nukleotiidi pikkuse ala geeni eest koos promootorregiooniga ning mille ottesse lisasin *BamHI* restriksioonisaadid. Ülesamplifitseeritud produktid lõikasid *BamHI* restriksioonisaadiga ja kloneerisin *BamHI* restriksioonisaadiga avatud pBLKT-3 reporterplasmidi *lacZ* geeni ette. Joonis 3 on näha konstrueeritud PP_3125 promootoralaga reporterplasmidi pBLKT-

3_3125_prom. Joonis 4 on konstrueeritud reporterplasmiid, milles *lacZ* geeni ette viidud *PP_2037* promootorala.



pBLKT-3_3125_prom
8527 bp

Joonis 3. Transkriptsiooniregulaator *PP_3125* promootorala pBLKT-3 reporterplasmiid.

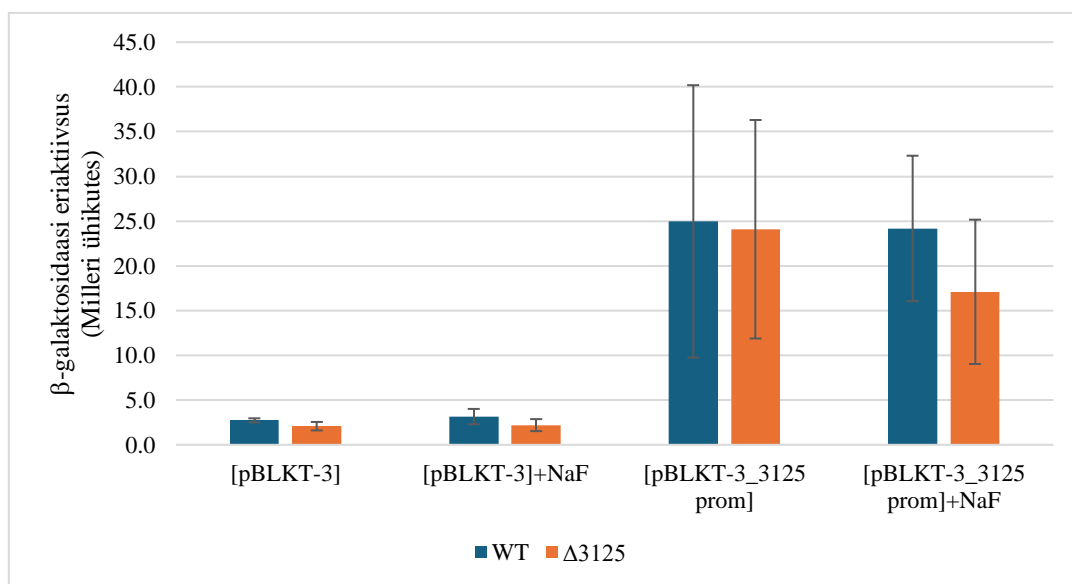


pBLKT-3_2037_prom
8512 bp

Joonis 4. Aldolaasi *PP_2037* geeni promootorala pBLKT-3 reporterplasmiid.

2.3.2 Naatriumfluoriidi mõju *P. putida* transkriptsiooniregulaator PP_3125 transkriptsioonile

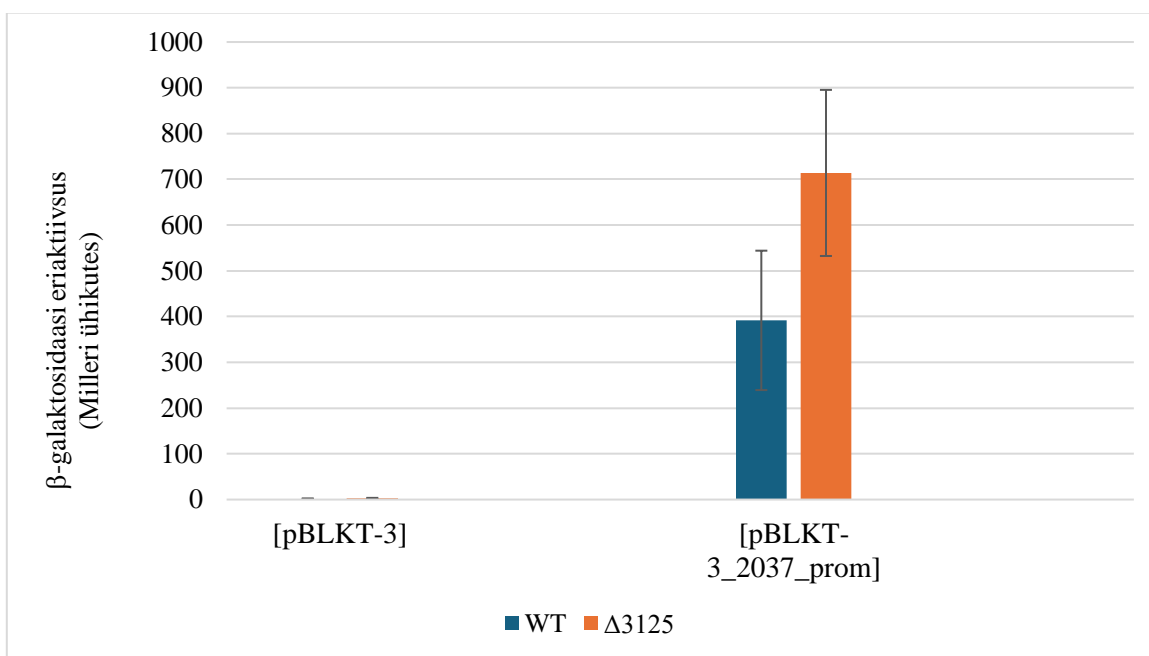
Selleks, et selgitada välja kas *P. putida* transkriptsiooniregulaator *PP_3125* transkriptsioon sõltub fluoriidist, mõõtsin *PP_3125* promootorilt lähtuvat β -galaktosidaasi eriaktiivsust *P. putida* metsiktüves (wt) ja $\Delta 3125$ rakkudest, mida kasvasin üleöö 30 mM naatriumfluoriidi (NaF) juuresolekul või ilma. Võrdluseks tegin katsed ka tühja vektorplasmidi pBLKT-3 sisaldavate bakterirakkudega. Teostasin 3 bioloogiliselt sõltumatut katset, igas katsetingimuses oli kõigis katsetes 3 paralleeli. Katsete tulemused on esitatud Joonis 5. Joonisel esitatud tulemustest on näha, et *P. putida* metsiktüves ei mõjuta naatriumfluoriidi olemasolu *PP_3125* promootori aktiivsust. Samuti ei ole näha olulist erinevust β -galaktosidaasi eriaktiivsuses NaF-iga ja ilma kasvanud *PP_3125* deletsioonitüvedes ($\Delta 3125$). Kuigi naatriumfluoriidi olemasolul on *PP_3125* promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi keskmine eriaktiivsus $\Delta 3125$ tüves veidi madalam, kattuvad veapiirid ning kuna eriaktiivsuse skaalal on väärtused suhteliselt madalad, on erinevus ebaoluline ning seda kinnitas ka statistiline analüüs (Lisa 1). Samuti ei tulnud välja statistilist olulisust, võrreldes β -galaktosidaasi eriaktiivsuseid *PP_3125* promootorist lähtuvalt metsiktüves NaF olemasolul ja ilma. Seega *Pseudomonas putidas* ei mõjuta naatriumfluoriidi olemasolu *PP_3125* promootori aktiivsust ei metsiktüves ega ka *PP_3125* deletsioonitüves.



Joonis 5. *PP_3125* promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* tüvedes KT2440 (wt) ja $\Delta 3125$ NaF juuresolekul ja ilma. Tüved on kasvatatud LB vedelsöötmes. y- teljel on β -galaktosidaasi eriaktiivsus Milleri ühikutes. Joonisel on esitatud kolme bioloogiliselt sõltumatu katse keskmised tulemused.

2.3.3 Aldolaasi (*PP_2037*) transkriptsiooni sõltuvus transkriptsiooniregulaator *PP_3125* -st

Selgitamaks välja, kas transkriptsiooniregulaator *PP_3125* mõjutab *P. putidas* aldolaasi *PP_2037* geeni transkriptsiooni, mõõtsin aldolaasi *PP_2037* promootorilt lähtuvat β -galaktosidaasi eriaktiivsust *P. putida* metsiktüve (wt) ja $\Delta 3125$ tüve rakkudest. Võrdluseks tegin katsed läbi ka tühja vektorplasmidi pBLKT-3 sisaldavate bakterirakkudega. Viisin läbi 3 bioloogiliselt sõltumatut katset, igas katsetingimuses oli kõigis katsetes 3 paralleeli. Katsete tulemused on esitatud Joonis 6. Joonisel 6 esitatud tulemustest on näha, et *P. putidas* on *PP_3125* transkriptsiooniregulaatori olemasolul *PP_2037* promootori aktiivsus madalam. Kuigi *P. putida* metsiktüves ja $\Delta 3125$ tüves *PP_2037* promootorist lähtuvad β -galaktosidaasi eriaktiivsuste veapiirid kattuvad, tuli välja statistiliselt oluline erinevus (Lisa 1). Seega, see tulemus viitab, et transkriptsiooniregulaator *PP_3125* võib represserida aldolaasi *PP_2037* geeni transkriptsiooni.



Joonis 6. *PP_2037* promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida* tüvedes KT2440 (wt) ja $\Delta 3125$, kasvatatud LB vedelsöötmes. y- teljel on β -galaktosidaasi eriaktiivsus Milleri ühikutes. Joonisel on toodud kolme bioloogiliselt sõltumatu katse keskmised.

2.4. Arutelu

Mullabakter *Pseudomonas putida* on kõrge stressitolerantsusega ning omab mitmeid metaboolseid ensüüme, mistõttu pakub see huvi fluori ühendite tootmiseks keskkonnasõbralikumalt. *Pseudomonas putida*-s oli senini ainus teadaolevaks fluoriidi taluvuse mehhanismiks fluoriidioonide transporter Fluc perekonnast – CrcB. Seda transporterivalgu kodeerib geen *crcB* (Calero et al. 2022). Meie laboris on varasemalt tehtud katseid *crcB* deletsioonitüvedega, mis viitasid, et lisaks CrcB-le, on *P. putida*s veel mõni fluoriiditolerantsust tagav mehhanism (Lopp, 2022). Nimelt *P. putida* KT2440 Δ *crcB* tüvedega läbiviidud transposoonmutageneesi katsest tuli välja valk PP_3125, mille puudumisel suutsid *crcB* deletsioonitüve rakud kasvada ka NaF-i kontsentratsioonil kuni 15 mM, samas kui valgu olemasolul ei suutnud Δ *crcB* tüve rakud taluda juba 1 mM NaF-i kontsentratsiooni (Lopp, 2022). Välja selgitamiseks geene, mida transkriptsiooniregulaator PP_3125 *P. putida*-s reguleerib, viidi läbi proteoomanalüüs (Ets, avaldamata). Sellest selgus, et PP_3125 regulaatorvalgu puudumisel oli rakkudes aldolaasi PP_2037 valgu kogus tunduvalt tõusnud.

Selleks, et kontrollida, kas PP_3125 transkriptsiooniregulaatori transkriptsioon on mõjutatud fluoriidist ning kas aldolaas PP_2037 transkriptsioon on PP_3125 kontrolli all, viisin uuritavate geenide promootoralad reporterplasmidi ning mõõtsin nendelt lähtuvaid β -galaktosidaasi eriaktiivsuseid nii *P. putida* metsiktüve KT2440 kui transkriptsiooniregulaator PP_3125 deletsioonitüve Δ 3125 rakkudes.

Kuna fluoriidi lisamine (NaF, 30 mM) kasvukeskkonda ei mõjutanud PP_3125 promootorist lähtuvat β -galaktosidaasi eriaktiivsust (vt Joonis 3) siis sellest võib järeldada, et *P. putida* transkriptsiooniregulaatori PP_3125 ekspressioon transkriptsiooni tasemel ei sõltu fluoriidist. Lähtudes proteoomi analüüsi tulemustest, kus fluoriidi juuresolekul oli PP_3125 valgu tase alati detekteeritav, kuid ilma fluoriidita kohati alla detekteerimispiiri (Lopp, avaldamata), oleks võinud näha tunduvalt madalamat β -galaktosidaasi eriaktiivsust *P. putida* KT2440 tüves, mida on kasvatatud ilma fluoriidita LB söötmes. Samas on PP_3125 promootorilt lähtuva β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmisega võimalik järeldusi teha vaid transkriptsiooni tasemel. Kuigi transkriptsiooni tasemel erinevusi nendest katsetest välja ei tulnud, ei saa välistada, et PP_3125 on mõjutatud fluoriidist hoopis mRNA või valgu tasemel.

Samuti ei mõjutanud fluoriidi lisamine PP_3125 promootori aktiivsust *P. putida* PP_3125 deletsioonitüves Δ 3125. Kuna nii metsiktüve kui Δ 3125 tüve rakkudes on PP_3125 promootori

aktiivsus võrreldav, siis selle põhjal saab järeldada, et transkriptsiooni tasemel ei reguleeri transkriptsiooniregulaator PP_3125 iseenda transkriptsiooni. Selleks, et selgitada välja, kas ja millisel tasemel fluoriid PP_3125 valgust avaldumist mõjutab, tuleks läbi viia katseid ka post-transkriptsioonilistel tasemetel, kasutades näiteks *Northern* või *Western blot*-i või mass-spektrometriat.

Aldolaas PP_2037 promootori aktiivsuse mõõtmisest *P. putida* metsiktüves KT2440 ja PP_3125 deletsioonitüves selgus, et PP_2037 promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi eriaktiivsus on madalam metsiktüves, kuid joonisel veapiirid kattuvad (vt. Joonis 6). Statistilise olulisuse väljaselgitamiseks võrdlesin erinevusi ka kahepoolse t-testiga, mille tulemus näitas, et erinevused PP_2037 promootori aktiivsuses metsiktüves ja Δ 3125 tüves olid statistiliselt olulised. Seega transkriptsiooniregulaator PP_3125 reguleerib PP_2037 aldolaasi geeni transkriptsiooni. Kuna PP_3125 on negatiivne regulaator, mõjub selle olemasolu rakus aldolaasi geeni transkriptsioonile repressiivalt ning PP_3125 puudumisel saab transkriptsioon toimuda kõrgemal tasemel. Toetudes proteoomianalüüsile, kus leiti, et fluoriidi juuresolekul oli *P. putida* tüves Δ crcB regulaatorvalgu PP_3125 tase alati detekteeritav, fluoriidi puudumisel kohati alla detekteerimispiidi ning PP_2037 valgust tase ligi 200 korda kõrgem metsiktüves, mille genomist puudus PP_3125 geen (Lopp, avaldamata), võiks arvata, et ka aldolaas valguna on *Pseudomonas putida*-s kuidagi fluoriiditolerantsuse saavutamiseks oluline. Kuna aldolaasidel on täheldatud *moonlighting* omadusi (Figuera et al. 2013, Cieřla et al. 2014), ei saa välistada võimalust, et ka PP_2037 aldolaas omab lisaks ensümaatilisele katalüüsile veel lisafunktsioone, mis kas otseselt või kaudselt võivad mõjutada *P. putida* fluoriidi taluvust. Kuna selle töö raames ei viidud läbi katseid kirjeldamiseks otseselt aldolaasi ekspressiooni sõltuvust fluoriidi juuresolekust, ei saa antud töö põhjal PP_2037 valgust seost fluoriiditolerantsusega kinnitada.

KOKKUVÕTE

Pseudomonas putida on gram-negatiivne keskkonnabakter, kes oma kõrge stressitaluvuse ja metabolismi tõttu pakub huvi biotehnoloogilistel eesmärkidel. *P. putida* bakterit nähakse potentsiaalina fluori sisaldavate ühendite keskkonnasõbralikumaks tootmiseks. Keskkonnas leidub fluori näiteks ioones vormis fluoriidina, mis on bakteritele toksiline. Siiski on mitmetel bakteritel välja arenenud mehhanismid fluoriidi toksilise mõju vähendamiseks.

Praeguseks on bakterite fluoriiditaluvus mehhanismidest teada vaid vähesed: enamasti on bakteritel selleks fluoriidi ribolülitid või fluoriidiooni eksportivad valgud, mille tulemusena suudetakse ellu jääda ja kasvada ka fluoriidirikas keskkonnas. *Pseudomonas putida*-l on fluoriiditolerantsusega seoses teada vaid üks valk – CrcB transporter, mis aitab fluoriidi kontsentratsiooni raku sees madalana hoida. Varasemate katsete käigus on leitud, et lisaks CrcB transporterile võib *P. putida*-s leiduda veel valke, mis fluoriiditolerantsust mõjutavad. Nende varasemate katsete põhjal püstitus hüpotees, et nii transkriptsiooniregulaator PP_3125 kui aldolaas PP_2037 võivad mõjutada *P. putida* fluoriiditolerantsust.

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli välja selgitada, kas *P. putida* transkriptsiooniregulaator PP_3125 transkriptsioon sõltub fluoriidist keskkonnas. Teiseks eesmärgiks oli kindlaks teha, kas regulaator PP_3125 reguleerib *P. putida*-s aldolaasi geeni *PP_2037* transkriptsiooni. Töös leiti, et PP_3125 ekspressioon ei sõltu fluoriidi olemasolust transkriptsiooni tasemel. Lisaks selgus, et PP_3125 reguleerib aldolaasi geeni transkriptsiooni. Edaspidistes töödes tasuks uurida, kas regulaator PP_3125 ekspressioon on mõjutatud fluoriidi juuresolekust post-transkriptsiooni tasemel. Samuti võiks välja selgitada aldolaasi *PP_2037* ekspressiooni otseseid seoseid fluoriidiga.

Transcription regulation of *PP_3125* and *PP_2037* – genes associated with fluoride tolerance in soil bacteria *Pseudomonas putida*

Lisette Juhe

SUMMARY

Fluorine is the 13th most abundant element in Earth's crust. In nature, it is mostly found in complexes or in its ionic state as fluoride. Fluoride is a mineral that is found in many environments, including water, soil and plants. Although fluoride is toxic to living organisms, some bacteria have developed mechanisms to help overcome this. Not many of these mechanisms have been described, but two of the most common ones are riboswitches and ion channels that help keep the concentration of fluoride tolerable inside the cell.

Pseudomonas putida is a soil bacterium capable of surviving in harsh environments. Due to its versatile metabolism, low maintenance and resilience, the bacterium has been of interest for many biotechnological purposes. One of these is the environmentally friendly synthesis of compounds, specifically compounds containing fluorine. In *P. putida*, only one mechanism for fluoride tolerance has been reported: the CrcB fluoride transporter. The CrcB protein pumps out fluoride ions, helping maintain a tolerable intracellular environment. But previous work has shown that even the *P. putida* strains lacking the CrcB protein, developed mutants capable of growing on a fluoride containing medium. That led to further analysis, which showed that *P. putida* CrcB deficient strains that also lacked the *PP_3125* regulator, could tolerate fluoride better than the strains still containing the *PP_3125* gene. When looking for the genes the *PP_3125* protein regulates, it was found that the amount of aldolase *PP_2037* protein was higher in *P. putida* strains, where the regulator protein *PP_3125* was missing. It led to suspicion that both of these proteins could have to do with fluoride tolerance.

This study focused on the transcription of these two genes: *PP_3125* and *PP_2037*, to find out, whether the transcription of *PP_3125* is affected by fluoride and if the *PP_3125* regulator regulates the transcription of aldolase *PP_2037*. We found that NaF in the environment did not affect the expression of *PP_3125* on a transcriptional level. And that *PP_3125* does regulate the transcription of aldolase.

Tänu sõnad

Täna oma juhendajaid, kes olid toetavad, kannatlikud ning ka kõige naeruväärsematele küsimustele tõsise näoga vastata suutsid. Täna kõiki teemavõõraid inimesi, kes peale mitmeid segaste sõnastuste ülevaatamisi ja -kuulamisi minuga endiselt kontaktis on. Kindlasti lähivad suured tänud ka Rihole plasmidi lahke jagamise eest, ilma milleta ei oleks töö pooltki nii kergelt sujunud. Samuti täna neid, kes töö kirjutamise esimeses faasis mu kätt hoidsid ning pisaraid pühkisid.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adamek E, Pawłowska-Góral K, Majnusz K (2005) In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Annales Academiae Medicae Stetinensis* 51:69–85.
- Bagdasarian M, Lurz R, Rückert B, Franklin FC, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16:237–247.
- Baker JL, Sudarsan N, Weinberg Z, Roth A, Stockbridge RB, Breaker RR (2012) Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* 335:233–235.
- Bolt A, Berry A, Nelson A (2008) Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474:318–330.
- Browning DF, Busby SJ (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* 2:57–65.
- Bunick FJ, Kashket S (1981) Enolases from fluoride-sensitive and fluoride-resistant streptococci. *Infect Immun* 34:856–863.
- Calero P, Gurdo N, Nikel PI (2022) Role of the CrcB transporter of *Pseudomonas putida* in the multi-level stress response elicited by mineral fluoride. *Environ Microbiol* 24:5082–5104.
- Calero P, Volke DC, Lowe PT, Gotfredsen CH, O'Hagan D, Nikel PI (2020) A fluoride-responsive genetic circuit enables in vivo biofluorination in engineered *Pseudomonas putida*. *Nat Commun* 11:5045.
- Cieśla M, Mierzejewska J, Adamczyk M, Farrants A-KÖ, Boguta M (2014) Fructose biphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochim Biophys Acta* 1843:1103–1110.
- Cooper GM (2000) Transcription in Prokaryotes. In: *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates
- Cornelius EC, Bartl M, Persson LJ, Xiong R, Cederfelt D, Rad FM, Norberg T, Engel S, Marklund EG, Dobritzsch D, Widersten M (2023) Engineered aldolases catalyzing stereoselective aldol reactions between aryl-substituted ketones and aldehydes. *Catal Sci Technol* 13:4978–4987.
- Figuera L, Gómez-Arreaza A, Avilán L (2013) Parasitism in optima forma: exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Trop* 128:116–123.
- Goodrich JA, Cutler G, Tjian R (1996) Contacts in Context: Promoter Specificity and Macromolecular Interactions in Transcription. *Cell* 84:825–830.
- Harley CB, Reynolds RP (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15:2343–2361.
- He H, Yang M, Li S, Zhang G, Ding Z, Zhang L, Shi G, Li Y (2023) Mechanisms and biotechnological applications of transcription factors. *Synth Syst Biotechnol* 8:565–577.
- Jeffery CJ (2005) Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. *Mass Spectrometry Reviews* 24:772–782.
- Jeffery CJ (1999) Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 24:8–11.
- Joerger AC, Gosse C, Fessner W-D, Schulz GE (2000) Catalytic Action of Fuculose 1-Phosphate Aldolase (Class II) As Derived from Structure-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* 39:6033–6041.
- Johnston NR, Strobel SA (2020) Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. *Arch Toxicol* 94:1051–1069.
- Lee S-H, Yeom S-J, Kim S-E, Oh D-K (2022) Development of aldolase-based catalysts for the synthesis of organic chemicals. *Trends Biotechnol* 40:306–319.

- Levine RS (1976) The action of fluoride in caries prevention. A review of current concepts. *Br Dent J* 140:9–14.
- Lopp L (2022) Mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsust mõjutavad mehhanismid.
- Maltz M, Emilson CG (1982) Susceptibility of oral bacteria to various fluoride salts. *J Dent Res* 61:786–790.
- Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M (2003) Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev* 26:493–510.
- Martínez-García E, Calles B, Arévalo-Rodríguez M, de Lorenzo V (2011) pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology* 11:38.
- McIlwain BC, Ruprecht MT, Stockbridge RB (2021) Membrane Exporters of Fluoride Ion. *Annual Review of Biochemistry* 90:559–579.
- Mejía-Almonte C, Busby SJW, Wade JT, Van Helden J, Arkin AP, Stormo GD, Eilbeck K, Palsson BO, Galagan JE, Collado-Vides J (2020) Redefining fundamental concepts of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Genet* 21:699–714.
- Paget MSB, Helmann JD (2003) The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* 4:203.
- Peter S, Oberhettinger P, Schuele L, Dinkelacker A, Vogel W, Dörfel D, Bezdán D, Ossowski S, Marschal M, Liese J, Willmann M (2017) Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* 18.
- Piatigorsky J, Wistow GJ (1989) Enzyme/crystallins: Gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell* 57:197–199.
- Piramanayagam S, Menon S, Piramanayakam S, Agarwal G (2021) COMPUTATIONAL IDENTIFICATION OF PROMOTER REGIONS IN PROKARYOTES AND EUKARYOTES. *EPR International Journal of Agriculture and Rural Economic Research*:21–28.
- Plater AR, Zgiby SM, Thomson GJ, Qamar S, Wharton CW, Berry A (1999) Conserved residues in the mechanism of the *E. coli* class II FBP-aldolase. *Journal of Molecular Biology* 285:843–855.
- Samland AK, Sprenger GA (2006) Microbial aldolases as C–C bonding enzymes—unknown treasures and new developments. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:253–264.
- Seshasayee ASN, Sivaraman K, Luscombe NM (2011) An overview of prokaryotic transcription factors: a summary of function and occurrence in bacterial genomes. *Subcell Biochem* 52:7–23.
- Siebers B, Brinkmann H, Dörr C, Tjaden B, Lilie H, van der Oost J, Verhees CH (2001) Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase. *J Biol Chem* 276:28710–28718.
- Sriram G, Martinez JA, McCabe ERB, Liao JC, Dipple KM (2005) Single-Gene Disorders: What Role Could Moonlighting Enzymes Play? *The American Journal of Human Genetics* 76:911–924.
- Stockbridge RB, Robertson JL, Kolmakova-Partensky L, Miller C (2013) A family of fluoride-specific ion channels with dual-topology architecture. *eLife* 2:e01084.
- Typas A, Hengge R (2006) Role of the spacer between the –35 and –10 regions in σ s promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 59:1037–1051.
- Weinberg Z, Wang JX, Bogue J, Yang J, Corbino K, Moy RH, Breaker RR (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biology* 11:R31.
- Whitford GM, Schuster GS, Pashley DH, Venkateswarlu P (1977) Fluoride uptake by *Streptococcus mutans* 6715. *Infect Immun* 18:680–687.

Wilks JC, Slonczewski JL (2007) pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry. *Journal of Bacteriology* 189:5601–5607.

KASUTATUD VEEBILEHED

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q88I76>, viimati külastatud 06.11.2023

<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom>, viimati külastatud 20.05.2024

LISAD

Lisa 1. p- väärtused. Statistiliselt olulised väärtused on tähistatud tärniga

| PP_3125 promootori aktiivsus fluoriidiga ja ilma | | | |
|---|--------------------------------------|------------------|---|
| Tüvi | Tüvi | p-väärtus | |
| KT2440_BLKT-3_3125_prom | KT2440_BLKT-3_3125_prom + NaF | 0.881 | |
| Δ 3125_BLKT-3_3125_prom | Δ 3125_BLKT-3_3125_prom + NaF | 0.06288 | |
| PP_2037 promootori aktiivsus PP_3125 valgu olemasolul ja ilma | | | |
| KT2440_BLKT-3_2037_prom | Δ 3125_BLKT-3_2037_prom | <0.001 | * |

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lisette Juhe,

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

„Mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsuses osalevate geenide *PP_3125* ja *PP_2037* transkriptsiooni regulatsioon”,

mille juhendajad on Lea Ets MSc ja Heili Ilves PhD,

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

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

Lisette Juhe

27.05.2024