

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

**Mullabakter *Pseudomonas putida* Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 kui
fluoriidi transporteri *crcB* geeni regulaator**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Egle Privoi

Juhendaja: MSc Lea Ets

TARTU 2024

Infoleht

Mullabakter *Pseudomonas putida* Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 kui fluoriidi transporteri *crcB* geeni regulaator

Väga hea stressitaluvusega mullabakter *Pseudomonas putida* on välja töötanud mehhanismi fluoriidiga toimetulekuks. Põhiline fluoriidi detoksifitseerija *P. putida*s on CrcB transporter, mis on passiivne ioonkanal, mida mööda transporditakse fluoriidi anioonid rakust välja. Siiani pole teada *crcB* geeni regulatsioon *Pseudomonas putida*s. Meie laboris varasemalt tehtud katsetele toetudes oli põhjust pidada potentsiaalseks *crcB* geeni reguleerijaks transkriptsiooniregulaatorit PP_3125. Sellest tulenevalt oli käesoleva tööeesmärk välja selgitada, ka Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 reguleerib *Pseudomonas putida* fluoriidi transporteri *crcB* geeni.

Märksõnad: fluoriid, *crcB*, transkriptsiooniregulaator PP_3125, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Cro/CI-type transcriptional regulator PP_3125 as a regulator of the fluoride transporter CrcB in the soil bacterium *Pseudomonas putida*

The soil bacterium *Pseudomonas putida*, which is known to be very stress-tolerant, has developed a mechanism to cope with fluoride. The main fluoride detoxifier in *P. putida* is the CrcB transporter, which is an inactive ion channel through which fluoride anions are transported out of the cell. The regulation of the *crcB* gene in *P. putida* is still unknown. Based on previous experiments in our laboratory, there was reason to consider the transcriptional regulator PP_3125 as a potential regulator of the *crcB* gene. Accordingly, the aim of this work was to find out whether the Cro/CI type transcriptional regulator PP_3125 regulates the fluoride transporter *crcB* in *Pseudomonas putida*.

Keywords: fluoride, *crcB*, transcriptional regulator PP_3125, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Fluor	5
1.2 Ribolülitid	6
1.3 Bakterite fluoriiditolerantsus	7
1.3.1 Fluc transporter	8
1.4 Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator	9
2. EKSPERIMENTAALOSA	10
2.1 Töö eesmärgid	10
2.2 Materjal ja meetodika	11
2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid	11
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	12
2.2.3 Geelelektroforees	13
2.2.4 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon.....	14
2.2.5 Kloneerimine	14
2.2.6 Sekveneerimine	15
2.2.7 β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine.....	15
2.2.8 Statistiline analüüs	16
2.3 Tulemused	16
2.3.1 <i>crcB</i> operoni promootorala ennustamine ning <i>crcB</i> operoni promootoralaga reporterplasmidi konstrueerimine	16
2.3.2 <i>crcB</i> operoni promootori -10 boxi muteerimine.....	17
2.3.3 Transkriptsiooniregulaator PP_3125 ei reguleeri <i>crcB</i> operoni promootori aktiivsust	18
2.4 Arutelu	20
KOKKUVÕTE	22
SUMMARY	23
TÄNUSÕNAD	24
KASUTATUD KIRJANDUS	25
KASUTATUD VEEBILEHED	28
LISAD	29
Lisa 1. p-väärtused.	29
Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	30

SISSEJUHATUS

Fluor on 13. element maakoos. Mineraalsel kujul leidub seda keskkonnas nii inimtekkelist kui ka geogeenset päritolu (Ghosh *et al.*, 2013). Üldiselt on seda peetud ka enamus organismidele toksiliseks – on märgatud, et fluoriid mõjutab negatiivselt mitmeid põhiensüüme, nagu enolaas ja F-ATPaas, mis omakorda segavad süsiniku metabolismi raja toimimist. Mullabakteril *Pseudomonas putida-l*, kes on teadaolevalt kõrge stressitaluvusega, on välja kujunenud mehhanismid halogeniidiga toimetulemiseks. Tähtsaimat rolli mängib selles geen *crcB*, mis kodeerib fluoriidi spetsiifilist eksporterit. Teiste halogeniidide, nagu näiteks kloriid ja bromiid, toksilisuse vastu *crcB* ei aita. Fluoriidi transporteri eemaldamisel bakterist, akumulereerub halogeniid rakku, mis pärsib bakteri kasvu ka väga madalatel fluoriidi kontsentratsioonidel (Baker *et al.*, 2012; Calero *et al.*, 2022). Kui paljudes organismides reguleerib *crcB* geeni avaldumist fluoriiditundlik ribolüliti, siis *P. putida*s pole *crcB* regulatsioonimehhanismid veel teada (Stockbridge *et al.*, 2013).

Varasemalt on meie laboris uuritud *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsust mõjutavaid gene. Uurimistöökäigus tuli välja Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125, mis mõjutab *P. putida* fluoriiditolerantsust. Leitud transporteriga viidi läbi ka proteoomianalüüs, et tuvastada geenid, mida antud transporter reguleerib (Lopp, 2022; Ets, avaldamata). Proteoomi analüüsi põhjal pole võimalik tuvastada membraaniseoselisi transportereid. Sellest tulenevalt ei saanud ka PP_3125 geeni uurimiseks tehtud proteoomi analüüsi põhjal öelda, kas PP_3125 mõjutab *crcB*-d, sest viimane on samuti membraaniseoseline transporter. Kuna PP_3125 mõjutab fluoriiditolerantsust, kuid seost *crcB* transporteriga ei õnnestunud varasemate katsetega näidata, sai käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kas Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 mõjutab mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriidi transporteri *crcB* transkriptsiooni.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Fluor

Fluor on mürgine kollakas-pruun gaasiline aine, mida looduses üldiselt puhta elemendina ei esine, kuna lihtainena on fluoril kõrge reaktsioonivõime. Fluoriidi, mis on fluori ja mõne muu elemendi ühend, leidub looduslikus koosluses peaaegu igal pool nii mullas, vees, taimedes kui ka õhus, kuid tihti just mineraalidena kivides. Seetõttu paiknevad suure fluori sisaldusega looduslikud veekogud just mägedes. Kõik veekogud sisaldavad mingil määral fluoriidi. (Ghosh *et al.*, 2013; Nureddin, 2018; O'Mullane *et al.*, 2016). On riike, kus lisatakse fluoriidi väikestes kogustes ka avalikkusse veesüsteemidesse, seda nimetatakse fluorideerimiseks (Newbrun, 1989). Väike kogus fluoriidi joogivees aitab ennetada hambakaariest, muutes hambaemaili hapete suhtes vastupidavamaks ning kiirendades vajalike mineraalide kogunemist, mis aeglustab veel omakorda hamba lagunemist. Samas liigne fluoriid võib kahjustada hambaemaili ja võib lõpuks viia kroonilise hambahaiguse fluoroosini. Samuti olenevad fluoriidist tekitatud kahjustuste suurused sellest, kui kaua ja kui suurtes kogustes on fluoriidiga kokku puutunud. 2007. aastal võttis Maailma Terviseorganisatsioon WHO vastu resolutsiooni, mis tegi fluoriidi kättesaamise inimõiguseks, sest viimasel on tähtis roll inimese suuhügieeni hoidmises. Selle jaoks on kasutusel fluoriidi sisaldavad hambapastad ja suuloputusvedelikud kui ka fluorideeritud vesi, piim ja sool, (Medjedovic *et al.*, 2015; O'Mullane *et al.*, 2016).

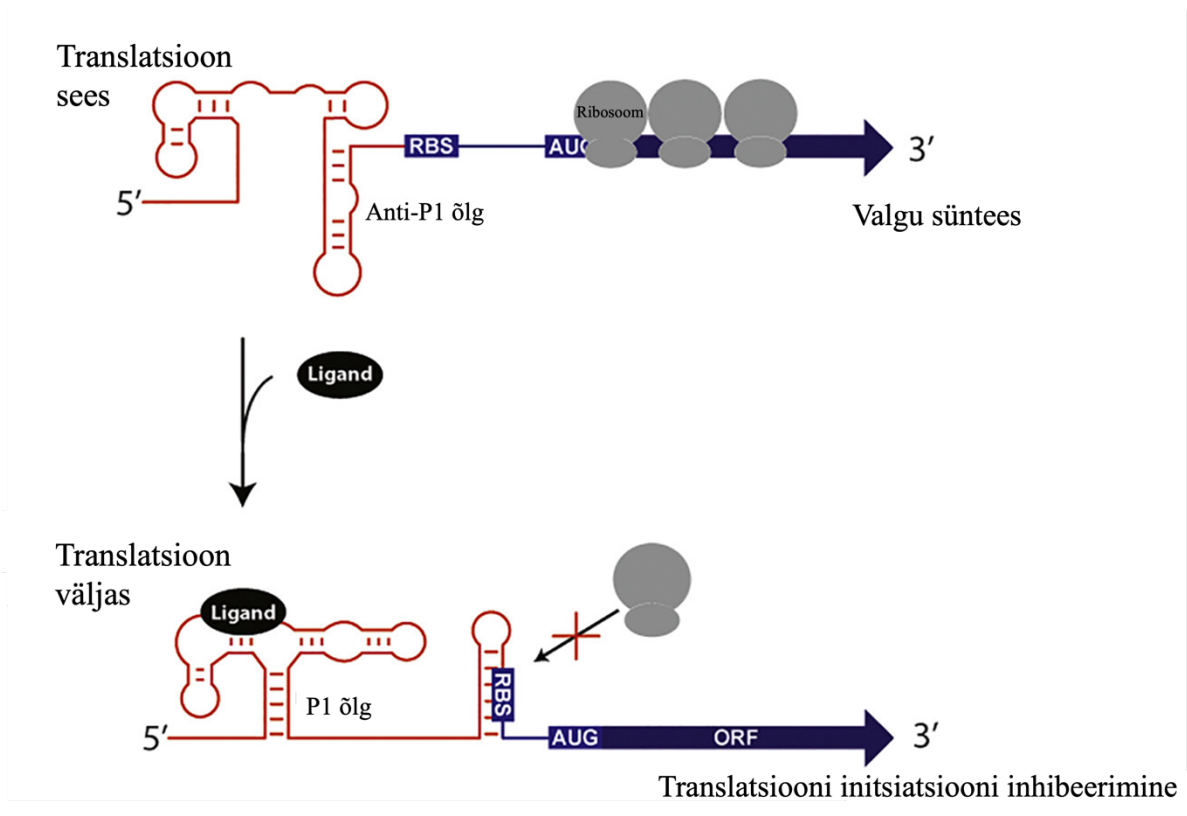
Fluori suure elektronegatiivsuse tõttu on fluori ja süsiniku vaheline polaarne side kõige tugevam. Selle sideme lõhustumine muutub maailmas aina olulisemaks, sest nii saab toota fluoriidi molekule fluoriidi sisaldavatest ühenditest (Shen *et al.*, 2015). Fluuroorgaanilised molekulid on vajalikud erinevates biotehnoloogilistes rakendustes, kuid siiani on nende keemiline süntees üsna keeruline ja kulukas, sageli nõudes ohtlike reaktiivide kasutamist, näiteks HF või F₂. Mullast on leitud siiani 12 fluuroorgaanilist ühendit, milleks on näiteks fluorosuhkrud, fluoritud aminohapped ja α -fluoro- β -hüdrosükarboksüülestrid (Nieto-Domínguez & Nikel, 2020; O'Hagan *et al.*, 2002). 2003. aastal puhastati bakterist *Streptomyces cattleya* esimene fluorinaas, millel on võime biosünteesida fluuroorgaanilisi ühendeid sekundaarsete metaboliitidena. See ensüüm vahendab fluoroatsetaadi ja 4-fluorotreoniini biosünteesi esimest etappi (Schaffrath *et al.*, 2003). Fluorinaasi homolooge on hiljem veel leitud näiteks *Streptomyces* sp. MA37, *Nocardia brasiliensis*, *Actinoplanes* sp. N902-109 ja *Streptomyces xinghaiensis*'t (Sooklal *et al.*, 2020).

1.2 Ribolülitid

Ribolülitid on konserveerunud domeenid mRNA-s, mis käituvad kui sensorid, juhul kui sinna kinnituvad väiksed metaboliidid või ioonid (Joonis 1). Neil on tavaliselt kaks osa: aptameer, mis on tagasiside sensor; ja ekspressiooni platvorm, mis juhib geeni ekspressiooni signaale. Erinevat tüüpi ribolülitite ülesanne on reguleerida geeni ekspressiooni transkriptsiooni, translatsiooni või splaissingu tasemel. Ribolülitid teeb eriliseks see, et neil pole vaja lisamolekule metaboliitide sidumiseks (Ariza-Mateos *et al.*, 2021; Serganov & Nudler, 2013). Praeguseni on teada üle 55 ribolüliti klassi. Neid klasse eristatakse ligandi põhjal, millega viimane seondub või aptameeri domeenis olevate järjestuste konserveerunud mustrite alusel (Olenginski *et al.*, 2024).

Ribolülitil põhinev regulatsioon on olemas nii eukarüootides kui ka prokarüootides. Prokarüootides reguleerib ribolüliti geeni ekspressiooni otse läbi transkriptsiooni või translatsiooni (Serganov & Nudler, 2013). Enamus baktereid elavad pidevalt muutavas keskkonnas, kus neil on vaja uute tingimustega kohastuda. Enda säästmiseks lülitab bakter välja geenid, mida tal sel momendil vaja pole. Selline regulatsioon saadakse tagasiside abil – kui molekuli on bakteris liiga palju, annab üleliigne produkt signaali, et seda geeni pole praegu vaja ekspresseerida (Ariza-Mateos *et al.*, 2021). Näiteks on olemas guaniini ja adeniini siduvad ribolülitid (Batey *et al.*, 2004; Serganov *et al.*, 2004).

Fluoriiditundlikud ribolülitid reguleerivad geene, mis kodeerivad fluoriidi transportereid. Neid leidub nii bakterites kui ka arhedes. Fluoriiditundlikud ribolülitid on väga tõhusad fluoriidianioonide sidujad, samal ajal edukalt tõrjudes teisi väikseid anioone, sealhulgas kloriidi (Chawla *et al.*, 2015). Fluoriiditundlike ribolülitite klass on konserveerunud RNA struktuur, millelt on tuvastatud *crcB* motiiv. Ribolülitid reguleerivad geene, mis on neist allavoolu (Baker *et al.*, 2012). Fluoriidi seondumisel aptameerile muutub ribolüliti struktuur, mis võimaldab RNA polümeraasil transkriptsiooni aktiveerida. Kui fluoriidi ioone keskkonnas ei leidu, siis formuleerub terminaator struktuur ning transkriptsiooni ei toimu (Lee *et al.*, 2021).



Joonis 1. Ribolüüti regulatsioon translatsiooni tasemel. Ligandi puudumisel on valgu süntees aktiveeritud, mis tähendab, et moodustub anti-P1 õlg ning ribosoomi seondumissait (RBS) on translatsiooni initsieerimiseks ligipääsetav. Kuid ligandi seondumisel aptameerile moodustub P1 õlg, mille tagajärjel muutub ribosoomi seondumisaidi konformatsioon, mis takistab translatsiooni initsiatsiooni. Joonis Bédard et al., 2020 järgi.

1.3 Bakterite fluoriiditolerantsus

Fluoriidi inhibeeriv mõju süsivesinike metabolismile avastati 1934. aastal imetajate süsteemist Lohmann'i ja Meyerhof'i poolt. Tänu sellele avastusele jõuti hiljem järeldusele, et fluoriid on üldisem inhibiitor. Fluoriidi akumulatsiooniks peab toimuma HF transport rakku, mis nõuab transmembraanset pH gradienti, mida suudavad tekitada ainult metaboolselt aktiivsed rakud. Kui HF on aluselises keskkonnas, siis laguneb see H^+ ja F^- ning selle protsessi jätkudes muutub tsütoplasma happeliseks, redutseerides nii prootongradiendi kui ka ensüümide aktiivsust (Hamilton, 1990). Kõrged fluoriidi kogused inhibeerivad glükolüüsi ning DNA ja RNA aluste sünteesi. Teadaolevalt ei saa ioonid läbi lipiidsete membraanide liikuda. Selle jaoks kasutavad nad spetsiaalseid valke, mis moodustavad kanaleid, kust viiakse ioonid kõrgema kontsentratsiooniga alalt madalamale. Kanalite komplekssem alternatiiv on transporterid, mis suudavad ioone liigutada mõlemas suunas, ehk rakku ning rakust välja (Stockbridge *et al.*, 2013).

Praeguseks on teada kahte tüüpi membraani valke, mis vastutavad fluoriidi eksportimise eest- CLC^F ja Fluc valgud (McIlwain *et al.*, 2021). CLC kanalid on $H^+ Cl^-$ pumbad, mis viivad rakust

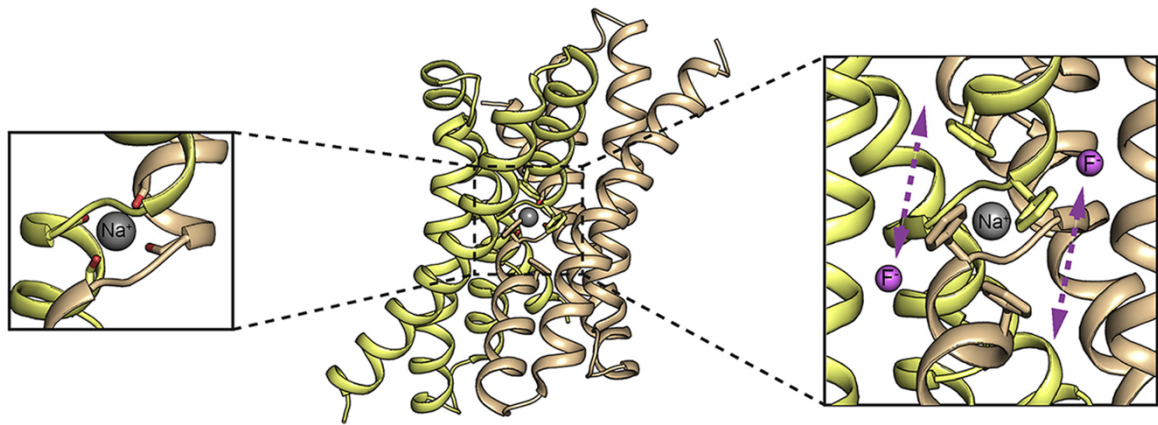
välja kaks kloriidi ühe vesiniku katiooni vastu (Accardi & Miller, 2004). CLC^F kaitseb baktereid fluoriidi toksilisuse eest ekspordides ühe fluoriidi aniooni ühe vesiniku katiooni vastu. Need toimivad kui antiporterid, mis tähendab seda, et membraani valk transpordib molekule eri suundades (Stockbridge *et al.*, 2012)

1.3.1 Fluc transporter

Fluc kanalid on passiivsed ioonkanalid, kus fluoriidi anioonid liiguvad mööda keemilist gradienti läbi transmembraanse poori. Need hoiavad fluoriidi taseme rakus kontrolli all, et see ei häiriks raku metabolismi (Ji *et al.*, 2014; Stockbridge *et al.*, 2013). Varem kutsuti neid membraanivalke kodeerivaid geene *crcB*-ks, kuid need nimetati ümber *fluc*-iks, et vältida segi minemist CLC kanali nimetusega (Stockbridge *et al.*, 2013). Mikroorganismidel on kaks talituslikku omadust, mille tõttu ioonkanalid ekspordivad just fluoriidi anioone. Peaaegu kõik rakud säilitavad negatiivse membraanipotentsiaali, mis iseenesest soosib ka fluoriidi ionide välja saatmist rakust. Samuti kaotavad Fluc kanalid ära nõrga happe akumulatsiooni efekti, mis on tingitud HF kõrgeast pKa-st ja membraani läbilaskvusest HF suhtes. Seda just seetõttu, et nõrga happe akumulatsioon efekti võib viia raku sisese fluoriidi kontsentratsiooni kõrgemale kui on väline ning selektiivne fluoriidi väljavool töötab sellele protsessile lihtsalt vastu (Adamek *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2014).

Fluc transporterid on dimeerid, mis koosnevad kahest subühikust. Struktuurselt on need duaalse topoloogiaga valgud. See tähendab, et need võivad olla nii paralleelse kui ka antiparalleelse orientatsiooniga. (Rapp *et al.*, 2006; Stockbridge *et al.*, 2013). Samuti on Na⁺ olemasolu Fluc kanalis struktuurselt oluline (Joonis 2). See võimaldab kanalil saavutada avatud konformatsiooni, mille kaudu saavad fluoriidi ionid liikuda (McIlwain *et al.*, 2020).

CrcB on põhiline fluoriidi detoksifitseerija *Pseudomonas putida* 's. CrcB aitab bakteril taluda fluoriidi põhjustatud tsütoplasma hapestumist, kuid selle puudumisel tekivad rakul raskused hakkama saada ka madalatel soolakontsentratsioonidel. *P. putida* ei toimu *crcB* regulatsioon läbi ribolüliti nagu mitmetel teistel bakteritel, näiteks *Pseudomonas syringae* ja *Bacillus subtilis* (Calero *et al.*, 2022, 2020).



Joonis 2. Fluc kanal, millel on märgitud halliga naatriumi kation ja lillaga fluoriidi anioonid. Joonis McIlwain et al., 2020 järgi.

1.4 Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator

Cro/CI on DNA-d siduv heeliks-keerd-heeliks tüüpi transkriptsiooniregulaator, mida on olemas lisaks bakteriofaagidele nii prokarüootides kui ka eukarüootides. Cro domeeni nimetus tuleneb bakteriofaagist 434 ja CI vastavalt bakteriofaagist lambda. (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR001387/>, viimati külastatud 30.03.2024). Cro ja CI regulaatorid on olulised bakteriofaagide lüsogeense ja lüütilise tsükli regulatsioonis. CI on lüsogeense tsükli positiivne regulaator, mille ülesanne on lüütilist tsüklit alla suruda, represserides teatud lüütilise tsükli valkude sünteesi. Cro valk on negatiivne regulatoorne element, mis lülitab välja rekombinatsiooni ja replikatsiooni hilises arengustaadiumis, represserides lüsogeense tsükli (Echols, 1972, 1975). PP_3125 kuulub Cro/CI transkriptsiooni regulaatorite perekonda. Valk koosneb 180 aminohappest (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q88I76/entry>, viimati külastatud 28.03.2024).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

CrcB on fluoriiditolerantsust mõjutav passiivne ioonkanal, mille kaudu fluoriidi ioonid rakust välja liiguvad (Stockbridge *et al.*, 2013). Meie laboris on uuritud *P. putida* fluoriiditolerantsusega seotud geene ning leitud, et transkriptsiooniregulaator PP_3125 mõjutab *P. putida* fluoriiditolerantsust. Selgitamaks, milliseid geene PP_3125 reguleerib, viidi meie laboris läbi täisproteoomanalüüs (Ets, avaldamata). Kahjuks ei selgunud proteoomi analüüsist, kas PP_3125 võiks reguleerida *crcB*-d, sest viimane kodeerib membraaniseoselist valku ning ei olnud proteoomi analüüsis tuvastatav. Sellest lähtuvalt kujunesid töö eesmärkideks:

1. tuvastada *crcB* operoni promootori asukoht ja konstrueerida reporterplasmiid, milles oleks *crcB* geeni operoni promootorala kloneeritud *lacZ* geeni ette;
2. välja selgitada, kas Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 reguleerib mullabakter *Pseudomonas putida* *crcB* geeni transkriptsiooni.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid

Baktereid kasvasin LB (ingl k- *lysogeny broth*) täissöötmes (Miller, 1992). Sini-valge testi tegemiseks lisasin LB söötmele 0,5 mM IPTG-d ja X-gal-i (100 µg/ml). Tardsöötme valmistamiseks lisati vedelsöötmesse agarit 15 µg/l. Kasutatud tüved ja plasmiidid on toodud Tabel 1.

Selektsioonimarkerina kasutasin antibiootikumi kanamütsiin (Km; 50 µg/ml). *E. Coli* baktereid kasvasin 37°C ja *P. Putida* rakke 30°C termostaadis. Vedelsöötme kultuurid kasvasin loksutil (180 rpm), et neil oleks piisav hapnikuga varustus.

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

BAKTERITÜVI	ISELOOMUSTUS	ALLIKAS
<i>E.coli</i> DH5 α λpir	supE44, ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15), hsdR17 (rk-mk+), recA1, endA1, thi1, gyrA, relA, λpir lysogen	(Martínez-García & de Lorenzo, 2011)
<i>E.coli</i> CC118 λpir	Δ(ara-leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, phoA20, thi-1, rpsE, rpoB, argE (Am), recA1, λpir lysogen	(de Lorenzo & Timmis, 1994)
<i>P.putida</i> KT2440	Algne täielikult sekveneeritud <i>P.putida</i> tüvi	(Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981)
<i>P.putida</i> KT2440Δ3125 (lühidalt Δ3125)	KT2440 metsiktüvest on deleteeritud PP_3125 geen.	(Lopp, 2022)
PLASMIID		
pBLKT-3	Reporterplasmiid koos <i>lacZ</i> geeni ja Km ^R -ga	Avaldamata, Riho Teras
pBLKT-3 +crcB opr_prom	LacZ reportergeeni ees on <i>crcB</i> operoni promootor	Käesolev töö
pBLKT-3 +crcB opr_prom_mut	LacZ reportergeeni ees on muteeritud -10 boxiga <i>crcB</i> operoni promootor	Käesolev töö

2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-iga kontrollisin plasmidi olemasolu rakkudes või konstrueeritud plasmidi õigsust. Ühe reaktsiooni lõppmahuks oli 20 µl, mis sisaldas 1x PCR puhvrit (*Thermo Scientific, DreamTaq™ Green Buffer (10X)*), sisaldas 2,5 mM MgCl₂), 0,2 mM nukleotiide, 10 pmol mõlemat praimerit, 0,7 U Dream Taq polümeraasi. Kasutatud praimerid on toodud Tabel 2 . Matriitsina kasutasin PCR reaktsioonis kas varasemalt eraldatud DNA-d või bakterirakke.

PCR-i etapid olid järgmised:

- 1) eelkuumutus 98°C,
- 2) denaturatsioon 98°C, 20 sekundit,
- 3) praimerite seondumine 54-64°C, olenevalt praimerite pikkusest ja nukleotiidide sisaldusest, 20-30 sekundit,
- 4) DNA süntees 72°C, vastavalt uuritava lõigu pikkusele (1 min/kb),
- 5) järelsüntees 72°C, 10 minutit.

Punkte 2-4 korrati kokku 25 tsüklit.

Phusion PCR-i kasutasin kloonimisel kloneeritava promootorregiooni amplifitseerimiseks. Selleks segasin kokku reaktsiooni lõppmahuga 50 µl, mis sisaldas 1x Phusion puhvrit (5x *Phusion™ HF Buffer*), 200 µM nukleotiide, 0,5 µM mõlemat praimerit, ja 0,02 U/µl Phusion polümeraasi (*Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase*). Matriitsina kasutasin rakke. Phusion PCR-i etapid olid järgmised: eelkuumutus 98 °C; denaturatsioon 98 °C, 10 sekundit; praimerite seondumine 64°C, 20 sekundit; DNA süntees 72°C, 15 sek/kb; järelsüntees 72°C 10 minutit. Kokku toimus 30 tsüklit.

CrcB -10 boxi muteerimiseks kasutasin Q5 PCR-i. Ühe reaktsioon maht kokku oli 50 µl, mis sisaldas 5x Q5 puhvrit, 10 mM dNTP mix-i, 20 µM mõlemat praimerit, 50x lahjendusega plasmid ja Q5 polümeraas, lõppmahuni viisin selle mQ-ga. Kasutatud praimerid on toodud Tabel 2. Q5 PCR-i etapid olid: eelsoojendus 98°C, 2 minutit; denaturatsioon 98°C, 10 sekundit; seondumine 59,5°C, 10 sekundit; süntees 72°C, 30 sekundit/kb; järelsüntees 72°C, 2 minutit. Kokku toimus 30 tsüklit.

Tabel 2. Kasutatud praimerid.

NIMETUS	JÄRJESTUS	SEONDUMISKOHT
crcB_opr_prom_parast_BH1	5'-TAG GAT CCC GTC TAT TCC TGC GCG TGG TG-3'	<i>crcB</i> geeni operonile eelneva alaga seonduv

		praimer, mis on suunaga geeni poole
crcB opr_prom_enne_BH1	5'-TAG GAT CCG TCT ATC GTG CGG TGG GGG AGG-3'	crcB geeni operonile järgneva alaga seonduv praimer, mis on suunaga geeni poole
lacZ-seq	5'-GGG GAT GTG CTG CAA GGC G-3'	lacZ geeni algusega seonduv praimer
T1T2	5'-GGCCTTTTT GCGTAGATC-3'	lacZ geenist 107-125 nukleotiidi ülesvoolu, suunaga geeni alguse poole
crcB_prom_mut_fw	5'-caCGCAcAgTGCAGCTATA TGAATTCG-3'	crcB geeni operoni eelse promootorala -10 box-i muteerimiseks Q5 PCR meetodikaga, geeni alguse poole; väikeste tähtedega on tähistatud originaalpromootorist erinevad nukleotiidid
crcB_prom_mut_rev	5'-TGCATTTTCTTTCGTGAC-3'	crcB geeni operoni eelse promootorala -10 box-i muteerimiseks Q5 PCR meetodikaga, suunaga geenist eemale

2.2.3 Geelelektroforees

PCR produktide analüüsiks kasutasin geelelektroforeesi. Selleks lisasin uuritavale proovile 5 µl foreesivärvi (*Thermo Scientific, Orange Loading dye, (6X)*,) ja seejärel kandsin need 1% agarosgeelile 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA, pH 8,2). Lisaks oli geelile lisatud etiidiumbromiidi kontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. DNA fragmentide pikkuse hindamiseks kasutasin *Thermo Scientific* DNA markerit *ZipRuler Express DNA Ladder 1* või *ZipRuler Express DNA Ladder 2*. Agarosgeeli jooksutasin 130 V juures 15 minutit ning seejärel visualiseerisin tulemused UV valguses.

2.2.4 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

E. coli kompetentide tegemiseks kasvasin neid üleöö loksutil (180 rpm) 30°C juures LB vedelsöötmes. Seejärel tegin lahjendused uude vedelsöötmesse, kus kasvasin neid 2 tundi 37°C juures. Tõstsin bakterikultuurid jääle ning seejärel tsentrifugeisin rakud põhja (60 sekundit, 12000 rpm). Pesin 400 µl 10% glütserooliga rakke kolm korda ning seejärel suspendeerisin rakud 80 µl glütseroolis. Glütserooli ja *E. Coli* rakke hoidsin kogu aeg jääs.

Kompetentsete *P. putida* rakkude valmistamiseks kasvasin neid üleöö loksutil (180 rpm) 5 ml LB vedelsöötmes 30°C juures. Seejärel tsentrifugeisin 300 µl söötmest rakud kokku (60 sekundit, 12000 rpm). Pesin rakke kolm korda 300 µl 300 mM sahharoosiga ning siis suspendeerisin rakud 100 µl sahharoosis.

Elektroporatsiooniks lisasin üles võetud rakkudele umbes 100 ng vees lahustatud DNA-d või ligaasisegu. Pipeteerisin rakud elektroporatsiooniküvetti ja poreerisin rakke *BioRad* elektroporaatiga „*Micropulser*“ pingel 2500 V. Kohe pärast poreerimist pipeteerisin rakkudele peale 700 µl LB vedelsöödet ja tõstsin need tagasi tuubi. Seejärel kasvasin rakke 60 (*E. coli*) või 30 (*P. putida*) minutit loksutil (37°C või 30°C juures). Pärast seda fuugisin rakud põhja ja plaatisin rakud selektiivsöötmele.

2.2.5 Kloneerimine

Kloonimist kasutasin soovitava PCR-i produkti viimisel vektorplasmidi. Valmistasin restriksioonisegud, kus lõikasin nii PCR-i fragmenti kui vektorplasmidi sama restriктаasi BamHI-ga. Pärast lõikamist töötlesin vektorit ühe ühiku aluselise fosfataasi FastAP-ga (*Thermo Scientific*) 30 minutit 37°C juures, et vektor tagasi kokku ei ligeeruks. Seejärel inaktiveerisin ensüümi 80°C juures 10 minutilise termotötlusega.

Järgmiseks sadestasin restriksioonisegud, lisades 1/10 mahtu 5M NaCl ja 2,5x mahtu 96% etanooli. Sadestus toimus -20°C juures 10 minutit, millele järgnes 10 minutiline tsentrifugeerimine 4°C tsentrifugeerimis täispöoretel (12000 rpm). Seejärel pesin fragmente 80% etanooliga kaks korda, pesemiste vahepeal tsentrifugeerides 4 minutit. Sademe kuivatasin 37°C juures, kuni etanool oli aurustunud.

Ligeerimiseks valmistasin reaktsiooni mahus 15 µl, mis sisaldas 10x ligaasipuhvrit (*Thermo Scientific*), 1mM ATP-d, 0,5 ühikut T4 ligaasi (*Thermo Scientific*), mQ vett ja sadestatud DNA fragmente. Reaktsioon toimus üleöö toatemperatuuril (21°C). Seejärel sadestasin ligaasisegu ning viisin selle rakkudesse, kasutades elektroporatsiooni. Plasmidse DNA eraldamiseks

kasutasin *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* -i, millel järgisin tootja poolt etteantud protokoll.

2.2.6 Sekvenerimine

Sekvenerimist kasutasin konstrueeritud plasmiidide kontrollimiseks. Alustasin PCR-st, mille järel tegin PCR produktile ExoSap töötluste, mis eemaldas alles jäänud praimerid ja nukleotiidid reaktsioonisegust. Lisasin PCR produktile 1 ühiku FastAP (*Thermo Scientific*) ja 1 ühiku eksonukleaasi ExoI (*Thermo Scientific*). Reaktsioon toimus 37 °C juures 30 minutit ning ensüümid inaktiveerisin 80 °C juures 15 minutit. Proovid valmistasin ette kasutades *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*-i, millel järgisin tootja poolt ette antud protokoll. Reaktsioonisegu koosnes 1µl PCR-i produktist, 1,6 pmol kasutatavatest praimeritest, 2µl 5x lahjenduspuhvrist, 0,7 µl BigDye premix'ist ja veest. Sekvenerimise teostas TUMRI sekvenerimise tuumiklabor.

2.2.7 β.galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine

Ennustatud promootori aktiivsuse mõõtmiseks kasutasin konstrukte, kus *crcB* operoni eelne promootorala oli kloonitud *lacZ* geeni ette. β-galaktosidaasi eriaktiivsust mõõtsin nii *P. putida* KT2440 kui ka Δ3125 tüvedes. Rakke kasvasin üleöö 5 ml vedelsöötmes kanamütsiini juuresolekul, pooltele lisasin ka NaF-i (30 mM). Bakterirakkude tihedust mõõtsin lainepikkusel 580 nm spektrofotomeetri LibraS35-ga. Reaktsioonisegu sisaldas: 1600 µl Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β-merkaptopetanol; 0,0005 % naatriumdodetsüülsulfaat (SDS); pH 7); 400 µl ONPG-d (o-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml); 100 µl kloroformi. Seejärel lisasin reaktsioonisegule 30 µl üleöö kasvatatud bakterikultuuri, fikseerisin aja rakkude lisamisest. Reaktsiooni peatasin 1000 µl Na₂CO₃ lisamisega reaktsioonisegusse, kui reaktsioonisegu oli muutunud kollaseks, siis fikseerisin reaktsiooni toimumisaja.

β-galaktosidaasi eriaktiivsuse arvutamiseks kasutasin valemit:

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

OD₄₂₀ tähistab kollase produkti neeldumist 420 nm lainepikkusel, OD₅₅₀ lüüsitud rakukestade tihedust 550 nm juures ja OD₅₈₀ tähistab rakkude algset tihedust. T märgib aega, kui kaua reaktsioon kestis ning V reaktsiooni lisatud bakterite ruumalat. Tulemus on Milleri ühikutes.

2.2.8 Statistiline analüüs

Statistiliselt oluliste erinevuste leidmiseks kasutasin ma Microsoft Excelit, kus p-väärtuste saamiseks võrdlesin tulemusi kahekaupa kahesuunalist T-testi kasutades. P-väärtused on toodud Lisa 1.

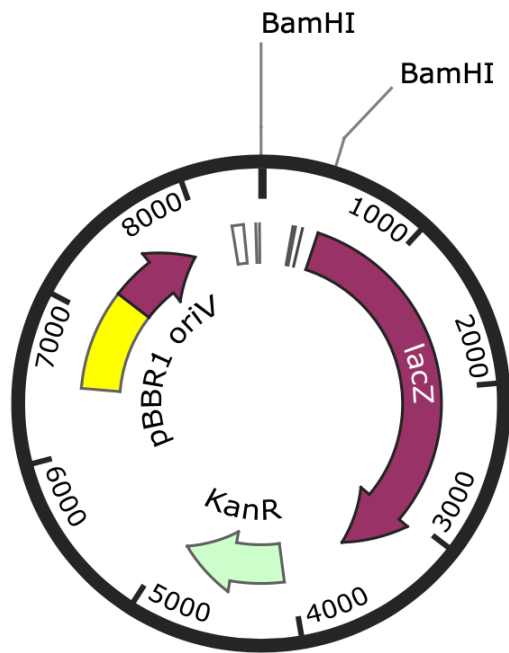
2.3 Tulemused

2.3.1 *crcB* operoni promootorala ennustamine ning *crcB* operoni promootoralaga reporterplasmidi konstrueerimine

CrcB on fluoriidi tolerantsust mõjutav geen (Baker *et al.*, 2012). Siiani pole teada *crcB* geeni regulatsiooni mehhanismid *P. Putidas*. Varasemalt on teada, et transkriptsiooniregulaator PP_3125 mõjutab fluoriiditolerantsust *P. Putidas*, ning meie laboris läbi viidud proteoomi analüüsi põhjal ei olnud võimalik öelda, kas PP_3125 võiks ka reguleerida *CrcB* transporteri ekspressiooni (Lopp, Lea, 2022).

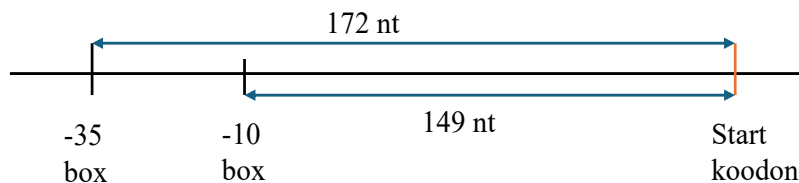
Plasmidi konstrueerimiseks oli vaja umbes 500 nukleotiidi pikkust *crcB* geeni operoni eelset ala, mille sisse jäi ka promootorregioon. Selleks ennustasin ma promootori asukoha, kasutades Softberry programmi (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>, viimati külastatud 22.05.2024), mis tuvastab σ -70 tüüpi promootoreid. Programm tuvastas antud piirkonnast ühe promootori, mille -10 boxi järjestus oli TGCTCAAAT ja -35 boxi järjestus TTGTCA. Promootori LDF skoor oli 3,29, mida võib pidada üsna heaks näitajaks, sest promootori lävend oli 0,2. LDF skoor näitab kui kaugel on tuvastatav promootor lineaarse diskrimineeriva funktsiooni lävest (Yona *et al.*, 2018). -10 box oli start koodonist 149 nukleotiidi ülesvoolu ning -35 box 179 nukleotiidi ülesvoolu (Joonis 4). -35 järjestuse sarnasus konsensusjärjestusele oli 53% ning -10 järjestuse sarnasus 43%. Seega ei ole tegu kõige konserveerunuma promootoriga. Seejärel disainisin Snapgene's praimerid, millele lisasin otsa *BamHI* restriksioonisaigid, et hiljem saaks saadud PCR produkti *BamHI*-ga avatud plasmidi kloneerida.

Selleks, et selgitada välja, kas PP_3125 reguleerib *crcB*-d, konstrueerisin plasmidi pBLKT-3+crcB_opr_prom, milles *lacZ* reportergeeni avaldumist kontrollib *crcB* operoni promootorala sisaldav DNA-lõik. Tulemuseks sain plasmidi, mille rakku viimisel sain mõõta *crcB* operoni promootorilt lähtuvat β -galaktosidaasi eriaktiivsust (Joonis 3).



pBLKT-3+crcB opr_prom
8462 bp

Joonis 3. Konstrueeritud plasmiid pBLKT-3+crcB opr_prom, kus on märgitud *lacZ* geen, kanamütsiini resistentsusgeen, replikatsiooni alguspunkt ning BamHI lõikesaidid, mille vahel paikneb *crcB* operoni promootorala. Joonis snapgene'st.



Joonis 4. -10 ja -35 boxi kaugused start koodonist. -35 box asub start koodonist 179 nukleotiidi ülesvoolu ning -10 box 149 nukleotiidi ülesvoolu.

2.3.2 *crcB* operoni promootori -10 boxi muteerimine

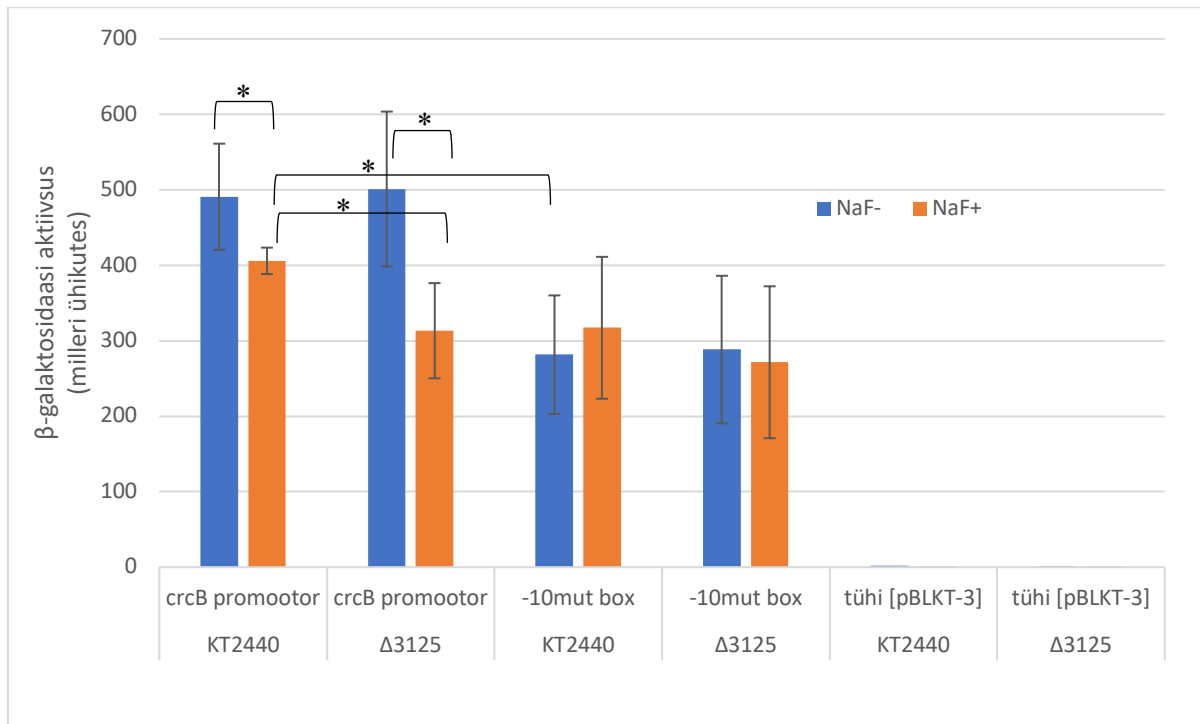
Selleks, et kinnitada ennustatud promootori õigsust, muteerisin ennustatud *crcB* operoni promootori -10 boxi kasutades Q5 PCR-i. Selleks disainisin praimerid, millest ühe otsas oli minu poolt muteeritud -10 box. Algne -10 boxi järjestus oli TGCTCAAATT ning pärast muteerimist oli see CACGCACAGT. Kui olin Snapgenes -10 boxi muteerinud, kontrollisin

piirkonda taas Softberry rakendusega ning piirkonda ei ennustatud enam ühtegi promootorit. Valmis plasmidi õigsust kontrollisin sekveneerimisega.

2.3.3 Transkriptsooniregulaator PP_3125 ei reguleeri *crcB* operoni promootori aktiivsust

Selleks, et välja selgitada, kas transkriptsooniregulaator PP_3125 reguleerib *crcB* operoni promootori aktiivsust, võrdlesin *crcB* operoni promootorilt lähtuvat β -galaktosidaasi eriaktiivsust *P. Putida* metsiktüve KT2440 ja deletsioonitüve Δ 3125 rakkudes nii NaF juuresolekul kui ilma. Joonis 5 on näha, et uuritavalt promootorilt lähtuvad β -galaktosidaasi eriaktiivsused on nii metsiktüves kui ka deletsioonitüves samad ning ka veapiirid kattuvad. Seega võib järeldada, et PP_3125 ei reguleeri *crcB* operoni promootori aktiivsust. Märgata oli metsiktüve ja deletsioonitüve erinevust NaF juuresolekul. Δ 3125 tüves oli aktiivsus madalam kui KT2440 tüves ning veapiirid samuti ei kattunud.

Promootorala ennustuse õigsuse kontrolliks muteerisin ennustatud promootori -10 boxi ning kontrollisin piirkonda uuesti Softberry rakendusega. Tulemusena ei ennustatud piirkonda enam ühtegi promootorit. Joonis 5 on näha, et muteeritud -10 boxiga promootorilt lähtuvad β -galaktosidaasi eriaktiivsused nii metsiktüves kui ka deletsioonitüves on NaF juuresolekul ja ilma sarnased, samuti kattuvad kõik veapiirid. Kuna muteeritud sai -10 box ning muteeritud järjestuse alusel piirkonda enam ühtegi promootorit ei ennustatud, peaksid eriaktiivsused olema palju madalamad. Sellest võin oletada, et selles piirkonnas võib olla veel mõni teine promootor.



Joonis 5. Joonisel on esitatud β -galaktosidaasi eriaktiivsused koos veapiiridega. NaF- tähendab naatriumfluoriidi puudumist keskkonnast ning NaF+ naatriumfluoriidi olemasolu keskkonnas. Joonisel on kokku pandud kolme bioloogilise katse tulemused. * tähistab statistiliselt olulist erinevust.

2.4 Arutelu

Põhiline fluoriidi detoksifitseerija *Pseudomonas putidas* on *crcB* transproter (Calero *et al.*, 2022), kuid meie laboris tehtud varasematele katsetele tuginedes võib arvata, et lisaks *crcB* transporterile võiks olla veel geene, mis aitavad toime tulla fluoriidi kahjustava toimega. Varasemalt teostatud katsetest tuli välja transkriptsiooniregulaator PP_3125, mille puudumisel suurenes bakteri fluoriiditolerantsus (Lopp, 2022). PP_3125 regulaatori poolt reguleeritavate geenide uurimiseks viidi varasemalt läbi ka proteoomi analüüs. Proteoomi analüüsist ei saanud teha kindlat järeldust PP_3125 ja *crcB* geeni seotuse osas, sest *CrcB* on väike membraaniseoseline valk, mis pole proteoomi analüüsis tuvastatav (Ets, avaldamata). Sellest tulenes ka käesoleva bakalaureusetöö eesmärk välja selgitada, kas Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 reguleerib mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsust mõjutavat geeni *crcB*.

Joonis 5 on näha, et *crcB* operoni promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi eriaktiivsus on KT2440 metsiktüves ja deletsioonitüves $\Delta 3125$, kust on eemaldatud PP_3125 regulaator, fluoriidi puudumisel võrdlemisi samad, samuti kattuvad ka nende veapiirid ning statistiliselt olulist vahet välja ei tulnud. Selle põhjal järeldasin, et PP_3125 ei reguleeri *crcB*-d. Kuid fluoriidi juuresolekul oli siiski näha statistiliselt olulist kõikumist *crcB* operoni promootorit sisaldava plasmiidiga KT2440 metsiktüve ja $\Delta 3125$ deletsioonitüve vahel (Lisa 1). Seega on võimalik, et PP_3125 siiski reguleerib *crcB*-d, kuid läbi mõne muu valguga. Promootori ennustuse õigsuse kontrolliks konstrueeriti plasmiid, kus oli muteeritud -10 box selliselt, et piirkonda ei jäänud funktsionaalset promootorit. Kui võrrelda joonisel 4 NaF juuresolekul *crcB* operoni eelset promootorala $\Delta 3125$ tüves muteeritud -10 boxiga konstruktiga, siis näeme, et eriaktiivsused on suhteliselt samad. Samas metsiktüves on eriaktiivsus NaF juuresolekul *crcB* operoni promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi eriaktiivsus kõrgem kui muteeritud promootorilt lähtuv eriaktiivsus. Eriaktiivsuste erinevus NaF juuresolekul metsiktüves ning $\Delta 3125$ tüves võib-olla tingitud sellest, et fluoriid mõjutab PP_3125 aktiivsust positiivselt ehk seda aktiveerides. PP_3125 on negatiivne regulaator ning seetõttu võib oletada, et see reguleerib negatiivselt mingit valku, mis inhibeerib *crcB* operoni promootori aktiivsust. Kui keskkonnas on fluoriid, saab PP_3125 seonduda enda reguleeritava geeni promootorilaga ning takistada selle ekspressiooni. Seega puudub valk, mis *crcB* operoni promootorit inhibeerib ning promootorilt saab toimuda transkriptsioon. Kui PP_3125 on rakkudes puudu, ei inhibeerigi miski *crcB* transporterit ning *crcB* operoni promootorilt lähtuv transkriptsioon on häiritud. Kuigi ilma NaF-ta võiks PP_3125 olla inaktiivne ning *crcB* operoni promootori transkriptsioon olla

häiritud, näeme NaF juuresolekul suuremat promootoraktiivsust. Erinevus NaF-ga ning NaF-ta võib tuleneda ka NaF üldisest mõjust transkriptsioonile.

crcB promootori -10 boxi muteerimisest võin järeldada, et ennustatud promootor oli küll õige, kuid tõenäoliselt on selles piirkonnas veel üks promootor, sest muteeritud promootorilt sünteesitud β -galaktosidaasi eriaktiivsused on siiski võrdlemisi kõrged. Softberry programm tuvastab ainult σ -70 tüüpi promootoreid ning see võib olla põhjus, miks ei tuvastatud teist potentsiaalset promootorit- tõenäoliselt ei ole tegemist σ -70 tüüpi promootoriga. Teise promootori tuvastamiseks on võimalik kloneeritud ala 10 nukleotiidi kaupa lõigata ning mõõta, mis hetkest aktiivsus langeb.

KOKKUVÕTE

CrcB on fluoriiditolerantsust mõjutav passiivne ioonkanal, mille kaudu fluoriidi ioonid rakust välja liiguvad. Siiani pole teada fluoriiditolerantsust mõjutava *crcB* geeni regulatsioonimehhanismid mullabakter *Pseudomonas putida*'s. Viimases ei toimu *crcB* regulatsioon läbi fluoriiditundliku ribolüliti nagu seda on *Pseudomonas syringae*'s ja *Bacillus subtilis*'es. Meie laboris on varasemalt läbi viidud katseid, kus otsiti potentsiaalseid fluoriiditolerantsust mõjutavaid gene *P. putidas*. Katsetest tuli välja transkriptsiooniregulaator PP_3125, mille puudumisel suureneb *P. putida* fluoriiditolerantsus. Seega oletati, et antud geen võiks reguleerida ka *crcB* geeni (Lopp, 2022). Proteoomi analüüsi põhjal ei saanud sellele kinnitust, sest CrcB on väike membraaniseoseline valk, mida polnud võimalik analüüsist tuvastada (Ets, avaldamata). Sellest tulenevalt oli käesoleva töö eesmärk välja selgitada, kas mullabakter *Pseudomonas putida* Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 on fluoriiditolerantsust mõjutava *crcB* geeni regulaator. Töös leiti, et Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 ei reguleeri otseselt *crcB* geeni operoni eelset promootorala. Samuti tuli välja, et *crcB* operoni eelses piirkonnas on potentsiaalselt veel üks promootor, mis tõenäoliselt pole σ -70 tüüpi. Edasist uurimist vajaks potentsiaalne promootor. Promootori olemasolu uurimiseks on võimalus kloneeritud ala lõigata 10 nukleotiidi kaupa ning mõõta β -galaktosidaasi aktiivsusi kuniks see langeb.

The soil bacterium *Pseudomonas putida* Cro/CI-type transcriptional regulator PP_3125 as a regulator of the fluoride transporter CrcB in the soil bacterium *Pseudomonas putida*

Egle Privoi

SUMMARY

Studying the effects of the fluoride is not only important for discovering new tolerance mechanisms in bacteria but is also necessary for microbial engineering. Due to the high electronegativity of fluorine, the polar bond between fluorine and carbon is the strongest. Cleavage of this bond is becoming more and more important in the world because fluoride molecules can be produced from fluoride-containing compounds. Organofluorine compounds are needed in various biotechnological applications, but so far, their chemical synthesis is quite difficult and expensive, often requiring the use of hazardous reagents.

The soil bacterium *Pseudomonas putida*, known to be highly stress-tolerant, has evolved a mechanism to cope with fluoride. The most important role is played by the *crcB* gene, which encodes passive ion channels, where fluoride anions move along a chemical gradient through a transmembrane pore. Our laboratory has previously conducted experiments searching for potential genes affecting fluoride tolerance in *P. putida*. The experiments revealed the transcriptional regulator PP_3125, in the absence of which the fluoride tolerance of *P. Putida* increases. Thus, it was assumed that this gene could also regulate the *crcB* gene. This could not be confirmed by proteome analysis, as CrcB is a small membrane-associated protein that could not be detected in the analysis. Consequently, the aim of this work was to find out whether the *P. putida* Cro/CI type transcriptional regulator PP_3125 is regulating a *crcB*. In this study we found that Cro/CI type transcriptional regulator PP_3125 does not directly regulate the pre-promoter region of the *crcB* gene operon. It also revealed that there is potentially another promoter upstream of the *crcB* operon that is probably not of the σ -70 type. A potential promoter would require further investigation. To study the presence of the second promoter, it is possible to cut the cloned area by 10 nucleotides and measure the activities of β -galactosidase until it falls.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Lead, kes mõistis, aitas ja paitas. Samuti Heilit, kes aitas ka nõu ja jõuga. Lisaks oma ema, kes küll ei mõistnud midagi, aga tööd parandas ikka. Suur aitäh Rihole plasmiidi eest! Aitäh ka neile, kes lihtsalt kuulasid ja olid toeks nii kui said.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Accardi, A. and Miller, C. 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature*, **427**: 803–807.
- Adamek, E., Pawłowska-Góral, K. and Bober, K. 2005. In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin*, **51**: 69–85.
- Ariza-Mateos, A., Nuthanakanti, A. and Serganov, A. 2021. Riboswitch Mechanisms: New Tricks for an Old Dog. *Biochemistry (Mosc)*, **86**: 962–975.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J. and Timmis, K.N. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, **16**: 237–247.
- Baker, J.L., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Roth, A., Stockbridge, R.B. and Breaker, R.R. 2012. Widespread Genetic Switches and Toxicity Resistance Proteins for Fluoride. *Science*, **335**: 233–235.
- Batey, R.T., Gilbert, S.D. and Montange, R.K. 2004. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**: 411–415.
- Bédard, A.-S.V., Hien, E.D.M. and Lafontaine, D.A. 2020. Riboswitch regulation mechanisms: RNA, metabolites and regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1863**: 194501.
- Calero, P., Gurdo, N. and Nikel, P.I. 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, D.C., Lowe, P.T., Gotfredsen, C.H., O'Hagan, D. and Nikel, P.I. 2020. A fluoride-responsive genetic circuit enables in vivo biofluorination in engineered *Pseudomonas putida*. *Nat Commun*, **11**: 5045.
- Chawla, M., Credendino, R., Poater, A., Oliva, R. and Cavallo, L. 2015. Structural Stability, Acidity, and Halide Selectivity of the Fluoride Riboswitch Recognition Site. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**: 299–306.
- de Lorenzo, V. and Timmis, K.N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol*, **235**: 386–405.
- Echols, H. 1972. DEVELOPMENTAL PATHWAYS FOR THE TEMPERATE PHAGE: LYSIS VS LYSOGENY. *Annual Review of Genetics*, **6**: 157–190.
- Echols, H. 1975. Some unsolved general problems of phage λ development. *Biochimie*, **56**: 1491–1496.
- Ghosh, A., Mukherjee, K., Ghosh, S.K. and Saha, B. 2013. Sources and toxicity of fluoride in the environment. *Res Chem Intermed*, **39**: 2881–2915.

- Hamilton, I.R. 1990. Biochemical Effects of Fluoride on Oral Bacteria. *J Dent Res*, **69**: 660–667.
- Ji, C., Stockbridge, R.B. and Miller, C. 2014. Bacterial fluoride resistance, Fluc channels, and the weak acid accumulation effect. *J Gen Physiol*, **144**: 257–261.
- Lee, Juhyun, Sung, S.-E., Lee, Janghyun, Kang, J.Y., Lee, J.-H. and Choi, B.-S. 2021. Base-Pair Opening Dynamics Study of Fluoride Riboswitch in the Bacillus cereus CrcB Gene. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**: 3234.
- Lopp, Lea. 2022. Mullabakter Pseudomonas putida fluoriiditolerantsust mõjutavad mehhanismid.
- Martínez-García, E. and de Lorenzo, V. 2011. Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of Pseudomonas putida KT2440. *Environmental Microbiology*, **13**: 2702–2716.
- McIlwain, B.C., Martin, K., Hayter, E.A. and Stockbridge, R.B. 2020. An interfacial sodium is an essential structural feature of Fluc family fluoride channels. *J Mol Biol*, **432**: 1098–1108.
- McIlwain, B.C., Ruprecht, M.T. and Stockbridge, R.B. 2021. Membrane Exporters of Fluoride Ion. *Annual Review of Biochemistry*, **90**: 559–579.
- Medjedovic, E., Medjedovic, S., Deljo, D. and Sukalo, A. 2015. IMPACT OF FLUORIDE ON DENTAL HEALTH QUALITY. *Materia Socio-Medica*, **27**: 395.
- Miller, J. H. 1992. *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. *Biochimie* 75(6): 456.
- Newbrun, E. 1989. Effectiveness of Water Fluoridation. *Journal of Public Health Dentistry*, **49**: 279–289.
- Nureddin, A. 2018. Imaging the Major Salivary Glands: A Review. *ADOH*, **8**: 1–3.
- Olenginski, L.T., Spradlin, S.F. and Batey, R.T. 2024. Flipping the script: Understanding riboswitches from an alternative perspective. *Journal of Biological Chemistry*, **300**: 105730.
- O'Mullane, D.M., Baez, R.J., Jones, S., Lennon, M.A., Petersen, P.E., Rugg-Gunn, A.J., Whelton, H. and Whitford, G.M. 2016. Fluoride and Oral Health. *Community Dent Health*, **33**: 69–99.
- Rapp, M., Granseth, E., Seppälä, S. and von Heijne, G. 2006. Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol*, **13**: 112–116.
- Schaffrath, C., Deng, H. and O'Hagan, D. 2003. Isolation and characterisation of 5'-fluorodeoxyadenosine synthase, a fluorination enzyme from Streptomyces cattleya. *FEBS Letters*, **547**: 111–114.
- Serganov, A. and Nudler, E. 2013. A decade of riboswitches. *Cell*, **152**: 17–24.

- Serganov, A., Yuan, Y.-R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R. and Patel, D.J. 2004. Structural Basis for Discriminative Regulation of Gene Expression by Adenine- and Guanine-Sensing mRNAs. *Chem Biol*, **11**: 1729–1741.
- Shen, Q., Huang, Y.-G., Liu, C., Xiao, J.-C., Chen, Q.-Y. and Guo, Y. 2015. Review of recent advances in CF bond activation of aliphatic fluorides. *Journal of Fluorine Chemistry*, **C**: 14–22.
- Sooklal, S.A., De Koning, C., Brady, D. and Rumbold, K. 2020. Identification and characterisation of a fluorinase from *Actinopolyspora mzabensis*. *Protein Expr Purif*, **166**: 105508.
- Stockbridge, R.B., Lim, H.-H., Otten, R., Williams, C., Shane, T., Weinberg, Z. and Miller, C. 2012. Fluoride resistance and transport by riboswitch-controlled CLC antiporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 15289–15294.
- Stockbridge, R.B., Robertson, J.L., Kolmakova-Partensky, L. and Miller, C. 2013. A family of fluoride-specific ion channels with dual-topology architecture. *eLife*, **2**: e01084.
- Yona, A.H., Alm, E.J. and Gore, J. 2018. Random sequences rapidly evolve into de novo promoters. *Nat Commun*, **9**: 1530.

KASUTATUD VEEBILEHED

<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q88I76/entry> (28.03.2024)

<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR001387/> (30.03.2024)

LISAD

Lisa 1. p-väärtused.

Statistiliselt olulised tulemused on tähistatud „+“ märgiga.

Tüvi 1	Tüvi 2	p-väärtus	
KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, ilma fluoriidita	Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, ilma fluoriidita	0,800	
KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, fluoriidiga	Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, fluoriidiga	0,003	+
KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom_mut plasmiidiga, fluoriidiga	KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, fluoriidiga	0,021	+
Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, fluoriidiga	Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom_mut plasmiidiga, fluoriidiga	0,295	
KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, fluoriidiga	KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, ilma fluoriidita	0,014	+
Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, fluoriidiga	Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom plasmiidiga, ilma fluoriidita	0,001	+
KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom_mut plasmiidiga, fluoriidiga	KT2440 pBLKT-3+crcB_opr_prom_mut plasmiidiga, ilma fluoriidita	0,097	
Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom_mut plasmiidiga, fluoriidiga	Δ3125 pBLKT-3+crcB_opr_prom_mut plasmiidiga, ilma fluoriidita	0,348	

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Egle Privoi,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“Mullabakter *Pseudomonas putida* Cro/CI tüüpi transkriptsiooniregulaator PP_3125 kui fluoriidi transporteri *crcB* geeni regulaator”,
mille juhendaja on Lea Ets,

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

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.

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

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

Egle Privoi
25.05.2024