

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

Mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsust mõjutavad mehhanismid

Magistritöö

30 EAP

Lea Lopp

Juhendaja: PhD Heili Ilves

TARTU 2022

Infoleht

Mullabakter *Pseudomonas putida* fluoriiditolerantsust mõjutavad mehhanismid

Fluor on leviku poolest 13 element maakooses. Fluori ühendit NaF lisatakse hambapastadele ja mõnel pool maailmas ka joogiveele, kuna fluoriidil on kaariest ennetav toime. Juba mõne millimolaarne fluoriidi kontsentratsioon mõjub bakterite kasvule pärssivalt, samas puutuvad bakterid eri keskkondades kokku kõrgete fluori ühendite kontsentratsioonidega. Mehhanismidest, kuidas bakterid fluoriidi taluda suudavad, on vähe teada. Mullabakter *Pseudomonas putida*-l on fluoriidiga toimetulekuks fluoriidioonide transporter CrcB. Varasemalt on meie laboris näidatud, et *P. putida* tüves, kus puudub CrcB transporter, tekivad spontaansed fluoriidi taluvad mutandid, mis näitab, et lisaks CrcB transporterile leidub veel mehhanisme, mis *P. putida*-l fluoriidi taluda võimaldavad. Käesolevas töös uuriti *P. putida* fluoriiditolerantsust mõjutavaid mehhanisme, mis esinevad bakteris lisaks CrcB transporterile ning kirjeldati katsete käigus leitud transkriptsiooniregulaatori mõju *P. putida* fluoriiditolerantsusele.

Märksõnad: CrcB, fluor, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Mechanisms affecting fluoride tolerance in soil bacteria *Pseudomonas putida*

Fluor is 13th most abundant element in Earth's crust. Since it has been shown, that fluor has caries preventing effect, NaF is commonly added to toothpastes and in some countries also to drinking water. Already a few millimolar concentration of fluoride inhibits bacterial growth. In different environments, bacteria concours high fluoride concentrations, but less is known about mechanisms what helps bacteria withstand fluoride. In soil bacterium *Pseudomonas putida* only fluoride transporter CrcB is known. In our group, it has previously shown, that growing *P. putida* strain that lacks CrcB transporter on fluoride containing media, spontaneous fluoride tolerant mutans appear. This shows that in *P. putida*, there must be other mechanisms addition to CrcB transporter to help bacteria stand high fluoride concentrations. In this paper, mechanisms what affect fluoride tolerance in *Pseudomonas putida* are studied. Also, an effect of a transcriptional regulator, found during experiments, to *P. putida* fluoride tolerance was described.

Keywords: CrcB, fluoride, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Halogeenid.....	7
1.1.2 Fluor	8
1.2 Halogeenide toksilisus prokarüootidele.....	10
1.2.1 Halogeenidega seotud tolerantsusmehhanismid prokarüootides	12
1.3 Ribolülitid.....	16
1.3.1 Fluoriidioone siduv ribolüliti.....	17
1.4 <i>Pseudomonas putida</i> kui rakuvabrik	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1 Töös kasutatud söötmed, plasmiidid, bakteritüved ja bakterite kasvutingimused	21
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	21
2.2.3 Geelelektroforees.....	21
2.2.4 Kloneerimine	22
2.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon.....	22
2.2.6 <i>Pseudomonas putida</i> genoomse raamatukogu kasutamine	23
2.2.7 Sekveneerimine	24
2.2.8 Bakterite konjugatsioon.....	24
2.2.9 Transposoonmutagenees.....	25
2.2.10 ARB-PCR	25
2.2.11 <i>PP_3125</i> geeni deletsioonitüvede konstrueerimine	26
2.2.12 <i>PP_3125</i> geeni komplementatsioonitüve konstrueerimine	28
2.2.13 NaF tundlikkuse testimine	29
2.2.14 <i>P. putida</i> kasvukiiruste määramine	29
2.2.15 <i>P. putida</i> Δ crcB tüve spontaansete NaF-i tolerantsete kolooniate isoleerimine ja ettevalmistamine kogu genoomi sekveneerimiseks.....	30
2.3 Tulemused	31

2.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> NaF-i talumist mõjutavate geenide otsimine genoomsest raamatukogust.....	31
2.3.2 <i>P. putida</i> fluoriiditolerantsust mõjutavate geenide tuvastamine transposoonmutageneesiga.....	32
2.3.3 <i>PP_3125</i> geeni seos <i>P. putida</i> NaF-i taluvusega.....	33
2.3.4 <i>P. putida</i> metsiktüve, Δ crcB, Δ 3125, $\Delta\Delta$ ja $\Delta\Delta$ -tac3125 tüvede kasvukiiruste võrdlus NaF-i juuresolekul ja ilma	37
2.3.5 <i>P. putida</i> Δ crcB tüve spontaansete NaF-i tolerantsete kolooniate isoleerimine ja analüüs	40
2.4 Arutelu	43
2.4.1 Cro/CI transkriptsiooniregulaator <i>PP_3125</i> mõjutab <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Δ crcB tüve NaF-i taluvust	43
2.4.2 Cro/CI transkriptsiooniregulaator <i>PP_3125</i> on seotud <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Δ crcB tüve fluoriiditolerantsete mutantide tekke loodusliku mehhanismiga.....	46
KOKKUVÕTE	48
SUMMARY	49
TÄNUSÕNAD	50
KASUTATUD KIRJANDUS	51
KASUTATUD VEEBILEHED	57
LISAD	58
Lisa 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid	58
Lisa 2. Töös kasutatud praimerid, nende järjestused ja kirjeldused	60
Lisa 3. Transposoonmutandid	63
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	64

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

Bp – bensüülpenitsilliin

GFP – roheliselt helendav valk (inglise keeles *green fluorescent protein*)

glyc – glükoos

Gm – gentamütsiin

Km – kanamütsiin

LB – lüsogeenne sööde (inglise keeles *lysogeny borth*)

nt – nukleotiid

OD – optiline tihedus (inglise keeles *optical density*)

WT – metsiktüvi (inglise keeles *wild-type*)

SISSEJUHATUS

Fluor on kõige kergem halogeen ning leviku poolest 13. element maakoos. Kuigi fluor on keskkonnas üsna levinud, leidub looduslikke orgaanilisi fluori sisaldavaid ühendeid vähe. Samas tehnikult toodetud fluororgaanilised ühendid on laialdaselt kasutusel. 20% praegu kasutusel olevatest ravimitest ning 40% agrokemikaalidest sisaldavad fluori aatomit (Dong ja Tsui, 2021). Praegu toodetakse fluororgaanilisi ühendeid tehnikult, keemiliste protsesside käigus, mis on keskkonnale koormav. Esimene ensüüm, mis suudab fluori lisada orgaaniliste ühendite koosseisu, leiti *Streptomyces cattleya-st* 2002 aastal ning antud avastus rajas uue tee fluororgaaniliste ühendite tootmises (O'Hagan jt., 2002).

Pseudomonas putida on mullabakter, kes tänu oma metaboolsele võimekusele on vastupidav erinevatele kemikaalidele ning stressitingimustele. See on ka põhjus, miks *P. putida-t* on uuritud kui erinevate ühendite biotootmise potentsiaaliga bakterit. Ühed ühendid, mida lähitulevikus plaanitakse *P. putida-t* kasutades tootma hakata, on fluororgaanilised ühendid, täpsemalt orgaanilised fluori polümeerid. Tootmises plaanitakse kasutada algsubstraadina fluori vees lahustuvat ühendit NaF (Calero jt., 2020).

Bakteritel on kujunenud erinevaid mehhanisme, kuidas toime tulla erinevate keskkonnas esinevate toksiliste kemikaalidega. Kuna fluor on keskkonnas levinud element ning NaF-i lisatakse juba kahekümnenda sajandi teisest poolest hambapastadele ja joogiveele tänu fluoriidi kaariest ennetavale toimele, puutuvad bakterid keskkonnas kokku paljude fluori ühenditega. Samas mõjub juba mõne millimolaarne fluoriidi kontsentratsioon bakterite kasvule pärssivalt (O'Mullane jt., 2016). Keskkonnas esineva fluoriga toimetulekuks on bakteritel välja kujunenud fluoriididione bakterirakust välja pumpavad transporterid. Üheks selliseks transporteriks on CrcB, mis on olemas ka *P. putida-s* (Calero jt., 2020). Kuigi CrcB transporterita *P. putida* tüvi ei suuda kasvada NaF-i sisaldaval söötmel (Calero jt., 2020), siis meie laboris on varasemalt leitud, et NaF-i juuresolekul tekivad CrcB transporterita *P. putida* tüves mutandid, mis suudavad kasvada tunduvalt kõrgema NaF-i kontsentratsiooni juures kui CrcB transporterita metsiktüvi. See viitab, et lisaks CrcB transporterile esineb *P. putida-s* veel mehhanisme, mis aitavad bakteril taluda kõrget fluoriididioonide kontsentratsiooni.

Sellest lähtuvalt sai käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada geenid, mis aitavad *P. putida* CrcB transporterita tüvel taluda fluoriidi ning kontrollida ja kirjeldada leitud geenide efekti *P. putida* fluoriiditolerantsusele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Halogeenid

Halogeenid on perioodilisusetabeli VII A alarühma elemendid, kuhu kuuluvad fluor, kloor, broom, jood ja astaat. Fluor ja kloor on lihtainena gaasilised, broom ja jood vedelad ning astaat tahke. Halogeenid on väga reaktiivsed, kuna neil on stabiilsest 8-elektronilisest väliskihist puudu üks elektron. Head elektronidonorid on metallid, millega halogeenid enamasti reageerivad, moodustades soolaid. Vesinikuga reageerides moodustavad halogeenid happeid. Halogeenide nimi tähendab kreeka keeles „soola moodustav“. Lihtainena on halogeenid inimestele toksilised. Kuigi bakterid puutuvad keskkonnas kokku kõigi halogeenidega, keskendun antud töö kirjanduse ülevaates põhiliselt fluorile ja kloorile.

Astaat (keemiline lühend At, aatomnumber 85) on radioaktiivne ning tema stabiilseima isotoobi poolestusaeg on vaid 8.3 tundi. Tegu on ühe haruldasima elemendiga maakooses, korraga hinnatakse maakooses olevat maksimaalselt 28 g astaati. Looduses esinevad vaid mõned astaadi stabiilsemad isotoobid, samas kõige stabiilsemat isotoopi looduses ei esine (Meyer, 2018). Jood (I, 53) on stabiilsetest halogeenidest kõige raskem. Tegu on mittemetallilise tahke ainega. Jood on stabiilsetest halogeenidest looduses vähimlevinud, asetudes maakooses leiduvate elementide tabelis 61. kohale. Jood on hädavajalik element kõigile loomadele, kuuludes kilpnäärme hormoonide koostisesse. Joodipuudus võib tekitada kompleksse häire kõigis vanustes inimestel (Zimmermann jt., 2008). Broom (Br, 35) on toatemperatuuril punakas-pruunikas vedelik. Tegu on reaktiivse elemendiga ning looduses esineb broomi vaid mineraalooladena. Broomi kasutatakse tulekindlate materjalide tootmises, veepuhastuses kasutatavate kemikaalide koostises, värvides, desinfitseerimisvahendites, ravimite koostises jne. Inimestele on broom lihtainena mürgine (Makarovsky jt., 2007)

Kloor (Cl, 17) on toatemperatuuril gaas. Tegu on väga reaktiivse elemendiga, mis paikneb oma leviku poolest maakooses 21-le kohale. Tuntuim kloori ühend on ilmselt NaCl ehk söögisool. Kloor on tänu oma tugevale oksüdeerimisvõimekusele leidnud kasutust valgendites, desinfitseerimisvahendites ja reagentina keemiatööstuses. Kloori kasutatakse desinfitseeriva vahendina nii joogivee kui ka reovee puhastamisel, basseinides ning tööstuslikes jahutusvee süsteemides (Luo jt., 2021). Kloriidioonid on vajalikud kõigile teadaolevatele elusorganismidele.

Kloori kasutatakse maos hüdroksüülhappe tootmiseks ning kloor on vajalik rakupumpade toimimiseks. Kloriidioon on vere koostises üks peamisi anioone ning omab olulist rolli rakkude osmoregulatsioonis, lihastöös ja neuronitevahelises sünapside liikumises (Yunos jt., 2010, Svensson jt., 2021).

1.1.2 Fluor

Fluor (F, 9) on perioodilisustabeli üheksas element. Tegu on kõige kergema ja reaktiivsema halogeeni, mis tavaolekus on mürgine gaas. Fluor reageerib ka vääriskaasidega ning paljude teiste tavaliselt inertsete materjalidega, nagu klaas. Ainsad elemendid, millega fluor ei reageeri, on argoon, neon ja heelium. Fluor on oma leviku poolest kolmeteistkümmes element maakoos ja esineb enamasti mineraalide koostises. Tuntuimad fluori sisaldavad mineraalid on vilgukivi, apatiit ja fluoriit. Tegu on väga reaktiivse elemendiga ning puhtal kujul antud elementi looduses praktiliselt ei esine. Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) nimetas fluoriidi kättesaadavuse üheks osaks inimeste terviseõigusest, kuna kahekümnenda sajandi teisel poolel leiti seos fluoriidi tarbimise ning vähenenud hambakaariese vahel. Fluoriidi lisatakse hambapastadesse ning mõnel pool maailmas ka joogiveele, soolale ning piimale, et parandada fluoriidi kättesaadavust ning seeläbi inimeste tervist (O'Mullane jt., 2016). Samas on täheldatud, et kokkupuude liigse fluoriidiga võib põhjustada inimestele tõsiseid tervisehäireid. Levinumaks probleemiks on hammaste fluoroos ning harvemal juhul ka luude fluoroos. Lisaks on liigset kokkupuudet fluoriga seostatud aeglasema vaimse arengu ja teiste haigustega (Peckham ja Awofeso, 2014).

Tänu oma tugevale reageerimisvõimele ning aatomi väiksele suurusele on fluor leidnud kasutust mitmetel elualadel. Anorgaanilistes ühendites leiab fluor kasutust näiteks uraanetrafluoriidi tootmisel, mida kasutatakse termotuumareaktsioonide jaoks, ning metallurgias, kus fluori ühendid aitavad alandada metalli sulamistemperatuuri ning viskoossust (Villalba jt., 2007). Samuti leiavad laialdast kasutust ühendid, kus on fluor seotud süsinikuga. Fluori ning süsiniku vahel olev side (F-C side) on väga stabiilne nii temperatuurile, keemilisele reageerimisele kui ka metaboolsetele protsessidele (O'Hagan, 2008). Tänu fluori aatomi väiksusele saab asendada ühendites vesiniku fluoriga ilma, et ühendi suurus sellest oluliselt muutuks. Samas aitab fluori lisamine tõsta ühendi stabiilsust (Lv ja Cheng, 2021). Rohkem kui 20% praegu turul olevates ravimitest ning kuni 40% agrokemikaalidest on fluori ühendid. Fluori ühendeid kasutatakse positronemissioontomograafias (PET), mida kasutatakse vähi diagnoosimisel (Dong ja Tsui, 2021). Lisaks kasutatakse fluori ühendeid tulekustutite, jahutusvedelike, õli ja vett tõrjuvate

värvide koostises ning mittenakkuva ja korrosioonikindla pinnakattena (Gluge jt., 2020). Samas esineb orgaaniliste fluori ühendite, sealhulgas orgaaniliste fluori polümeeride, kasutamisel probleeme. Ühelt poolt on tegu väga stabiilsete ühenditega, mistõttu fluororgaaniliste ühendite lagunemine looduses on piiratud ning enamasti toimub fluori ühendite kuhjumine keskkonda (Wu jt., 2020). Teiselt poolt on probleemiks fluororgaaniliste ühendite tootmine, kuna tegu on väga keerukate keemiliste reaktsioonidega, mis on energiakulukad ning reaktsiooni käigus võib tekkida kahjulikke lisühendeid (Prevedouros jt., 2006, Lv ja Cheng, 2021).

Kuigi fluor on maakoos väga levinud, ning looduses esineb fluor enamasti mineraalide koostises, leidub vähesel määral ka looduslikke fluororgaanilisi ühendeid. Looduslikke fluororgaanilisi ühendeid on leitud vaid mikroorganismidest ja taimedest, loomadest orgaanilisi fluori ühendeid leitud ei ole. Kõige levinum looduslik fluororgaaniline ühend on fluoroatsetaat, mida taimed kasutavad kaitses herbivooride vastu. Fluorinaas, esimene ensüüm, mis suudab lisada fluori orgaanilise ühendi koosseisu, leiti gram-positiivsest bakterist *Streptomyces cattleya* (O'Hagan jt., 2002). Antud avastus aitab toorata orgaaniliste fluori ühendite tootmises uuele leheküljele, kus oleks võimalik kasutada mikroorganisme fluori ühendite tootmiseks ilma, et kasutataks ohtlikke kemikaale ning tekiks keskkonnale ohtlikke kõrvalprodukte.

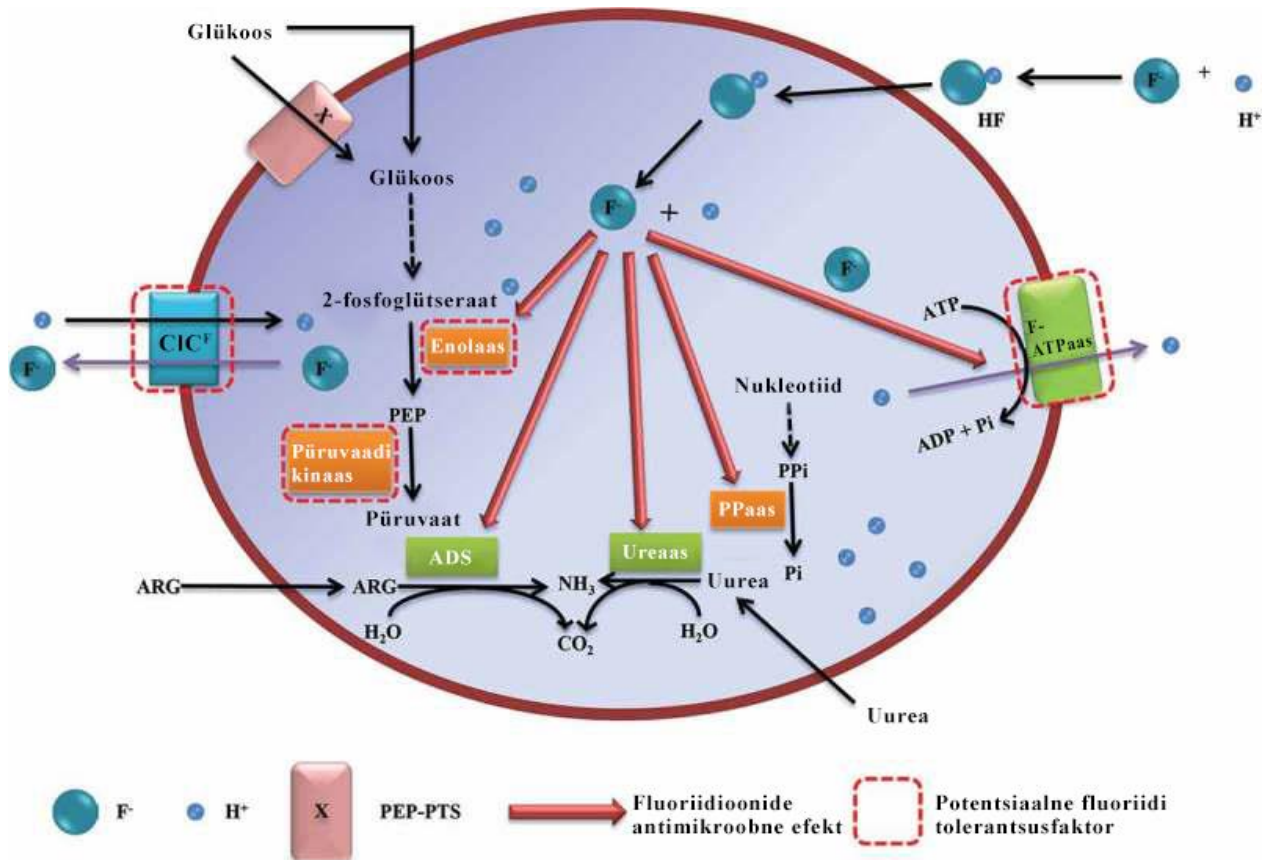
1.2 Halogeenide toksilised prokarüootidele

Halogeenidega puutuvad bakterid keskkonnas kokku väga mitmel moel. Kuna orgaanilisi halogeeni ühendeid esineb looduses vähe (teada on näiteks fluoroatsetaat taimedes, komposteerumise käigus tekkiv klorometaan), on prokarüootidel kokkupuude orgaaniliste halogeeni ühenditega vähene. Broomiga, mis on haruldasim stabiilne halogeen looduses, puudub bakteritel kokkupuude peaaegu täielikult. Joodi ja klooriga puutuvad bakterid kokku desinfitseerimisvahendite kasutamise kaudu, fluoriga nii keskkonnas esinevate mineraalsete ja orgaaniliste fluori ühendite kaudu kui ka veele ning suuhooldustoodetele lisatud NaF kaudu (Atashgahi jt., 2018).

Klooriga puutuvad bakterid kokku erinevates kohtades. Paljud desinfitseerimisvahendid sisaldavad kloori. Lisaks kasutatakse kloori veepuhastusjaamades ning osades kohtades lisatakse kloori joogiveele, et tagada selle puhtus. Kloor ei mõjuta prokarüootset rakku ühe spetsiifilise sihtmärgi läbi, nagu antibiootikumid, vaid kahjustab kõiki rakukomponente (Luo jt., 2021). Katsed on näidanud, et kokkupuutel veepuhastusjaamades kasutatavate gaasilise kloori ja kloori ühenditega suureneb bakterites reaktiivsete hapniku osakeste hulk, tekivad membraanikahjustused ja reaktiivsete hapniku osakeste poolt tekitatud DNA kahjustused, mis viivad bakterites üldise stressivastuse tekkeni (Zhang jt., 2021). Looduslikke orgaanilisi kloori ühendeid (näiteks 2,4-diklorofenool, trikloroetüleen), suudavad bakterid aga kasutada rakuhingamisel hapnikuvaestes tingimustes, kuid inimtekkeliste orgaaniliste kloori ühenditega sama näidatud ei ole. Samuti suudavad bakterid kasutada rakuhingamisel looduslikke orgaanilisi joodi ja broomi ühendeid (Atashgahi jt., 2018).

Kuna fluor on keskkonnas väga levinud element, puutuvad fluoriidiga kokku ka looduses elavad bakterid. Samas on fluoriid bakteritele ülimalt toksiline, juba mõne millimolaarne fluoriidi kontsentratsioon bakterite kasvusöötmes mõjub rakkude kasvule pärssivalt (Lesher jt., 1977). See on üks põhjus, miks fluoriid on kasutusel suuhügieenitoodetes. Nimelt takistab fluoriid hammastel kaariese teket (NIH, 2001). Hambapastas olev naatriumfluoriid (NaF) laguneb kokkupuutel veega naatriumiooniks ning fluoriidiooniks. Fluoriidioon seob ühe prootoni veelt, mille tulemusena tekib vesinikfluoriid (HF) ning järgi jääb OH⁻ ioon. Põhilise hambakaariest tekitava bakteri *Streptococcus mutans*-i näitel tuleneb fluoriidi toksiline efekt läbi vesinikfluoriidi (HF) difundeerumise bakterirakkudesse, kus see laguneb ioonideks. Fluoriidioonid takistavad raku mitmete ensüümide ja rakusiseste protsesside toimimist, näiteks pärssivad fluoriidioonid enolaasi

aktiivsust. Enolaas on oluline glükolüüsis ja enolaasi poolt katalüüsitud fosfoenoolpüruvaadi sünteesis ning seetõttu on takistatud glükoosi omastamine keskkonnast. Lisaks vähendab fluoriid *S. mutans*-i happetaluvust, kuna fluoriid seondub alumiiniumiooni juuresolekul F-ATPaasiga ja ensüümi aktiivsus väheneb seeläbi 50%. F-ATPaas mängib olulist rolli prootonite transpordis läbi rakumembraani ja seeläbi on mõjutatud happelise keskkonna talumine (Sutton jt., 1987). Lisaks takistab fluoriid veel teistegi rakusiseste protsesside tööd, näiteks inhibeerides ureaasi ja arginiini deiminaasi ning seondudes pürofosfaadiga mangaani juuresolekul (joonis 1) (Liao jt., 2017).



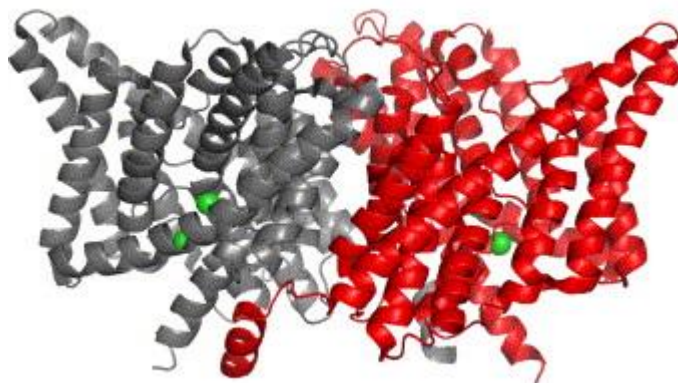
Joonis 1. Fluoriidi toksilisuse mehhanismid. Fluoriidioon on tähistatud suurema sinise keraga, mille sees on märgitud „F⁻“ ning vesinik väikese sinise keraga. Pärast vee lahustumist laguneb naatriumfluoriid fluoriidiooniks ning seob vee molekulilt ühe prootoni. Tulemuseks on HF, mis siseneb bakterirakku. Punaste joontega on näidatud fluoriidi toksilisuse mehhanismid bakteris. Fluoriid takistab enolaasi aktiivsust rakus, mille tõttu on takistatud glükoosi omandamine, samuti takistavad fluoriidioonid ureaasi, PPaasi, arginiini dehüdrolaasi rada (ADS), F-ATPaasi ja püruvaadi kinaasi. Katkendliku joonega on näidatud potentsiaalsed fluoritolerantsust mõjutavad faktorid. Liao jt (2017) järgi.

1.2.1 Halogeenidega seotud tolerantsusmehhanismid prokarüootides

Kuna kloriidioonid reageerivad raku kõikide komponentidega, mitte kindla sihtmärgiga nagu antibiootikumid, erineb ka tolerantsusmehhanism antibiootikumiresistentsusest. Põhilisteks tolerantsusmehhanismideks on läbilaskvusbarjäär ja kloriidi sidumine rakuvälises maatriksis (Luo jt., 2021). *E. coli* puhul on näidatud, et kuigi kloriidistressi tingimustes aktiveeruvad põhiliselt rakukesta sünteesi mõjutavad geenid (näiteks atsetaldehyüdi dehüdrogenaas, endolüütilise peptiidoglükaani transglükosülaas, lipiid A disahhariidi süntaas), suureneb ka DNA reparatsioon, transkriptsioon, metabolismis ning ühendite väljapumpamise osalevate geenide transkriptsioon (Holder jt., 2013). Kuna vastusena kloriidiga kokkupuutele muudavad bakterirakud membraani vähemläbilaskvamaks, suurendavad väljapumpamist ning beetalaktamaaside ja antioksidantensüümide sünteesi, siis sellised bakterid võivad paremini taluda ka antibiootikume. Seega, kloori sisaldavate desinfitseerimisvahendite laialdane kasutus võib kätkeada varjatud ohtu ristresistentsuse tekkimiseks bakteritel (Tong jt., 2021).

1.2.1.1 CIC superperekonna transporterid

1999. aastal leiti transportsüsteem, mille ülesandeks on *E. coli*-st kloriidioonide väljapumpamine. Tegemine on eukariotides esinevate CIC perekonna kloriidiooni transporterite homoloogidega, millele anti esialgu nimeks EriC (Maduke jt., 1999), antud valku tuntakse ka nimedega EcCIC ja CIC-ec1, mis on antud transporterile CIC perekonna nimetuse järgi (Dutzler jt., 2002, Accardi ja Miller, 2004). CIC transporterid on levinud kõigis eludomeenides. CIC transporterid moodustavad kas homo- või heterodimeeri, millest kumbki valk tekitab eraldi ioonkanali (Jentsch ja Pusch, 2018). Joonisel 2 on esitatud CIC-ec1 heterodimeerse kloriidi transporterite struktuur (Maduke jt., 1999, Dutzler jt., 2002, Accardi jt., 2006). 2012. aastal näidati, et EriC võib lisaks kloriidioonidele transportida ka fluoriidione (Baker jt., 2012).



Joonis 2. ClC-ec1 struktuur. Homodimeeri üks subühik on värvitud punaseks, teine halliks, rakuväline osa üleval pool. Kloriidioonid on tähistatud roheliste keradega (Accardi jt., 2006).

1.2.1.2 CLCF perekonna transporterid

Kuigi kloriidi transporter leiti juba 1999. aastal (Maduke jt., 1999), siis mehhanismid, mis aitavad bakteritel taluda keskkonnas esinevat fluoriidi, on olnud pikemat aega ebaselged. Kuna fluoriiditolerantsust uuriti algselt põhiliselt inimese suumikrofloora hulka kuuluvas gram-positiivses bakteris *S. mutans*, on järgnevad näited antud bakteri põhjal. Kuni 2012. aastani eeldati, et kuna enolaas ja F-ATPaas on fluoriidioonide osas tundlikud, toimub fluoriidi suhtes tolerantsete tüvede teke tänu mutatsioonidele just nende kahe ensüümi geenides (Liao jt., 2017). Mitsuhata jt. näitasid 2014. aastal, et fluoriidi suhtes vähem tundlikust *S. mutans*-i tüvest eraldatud enolaasi ensüüm talus kõrgemat fluoriidioonide kontsentratsiooni kui metsiktüvest eraldatud enolaas. Samas, kõigist uuritud fluoriiditolerantsetest tüvedest nad mutatsioone enolaasi geenis ei leidnud ning oletasid, et lisaks muteerunud enolaasi geenile esineb veel teisigi mehhanisme, mis aitavad *S. mutans*-il taluda kõrgeid fluoriidi kontsentratsioone (Mitsuhata jt., 2014). F-ATPaasiga on saadud selgemaid tulemusi. Nimelt leidsid Li jt. 2021. aastal, et ühel *S. mutans*-i fluoriiditundlikul tüvel on ühenukleotiidne muutus F₀F₁-ATPaasi geeni promootoris ning sama mutatsioon parandas ka fluoriiditundliku metsiktüve fluoriiditaluvust (Li jt., 2021).

Kui 2012. aastal näidati, et *Pseudomonas syringae* EriC ei pruugi olla vaid kloriidioonide transporter, vaid osaleb ka fluoriidioonide transportimisel rakust välja (Baker jt., 2012), avas see uue vaatenurga organismide fluoriidi taluvusele. 2015. aastal näidati ka *S. mutans*-i puhul, et fluoriiditolerantsetel tüvedel on toimunud muutused geenides *permeaas_A* ja *permeaas_B*, mis osutusid *P. syringae*-st leitud fluoriidioone transportiva EriC^F-i homoloogideks (Liao jt., 2015).

Fluoriidioonide transporterid liigitatakse kahte eri perekonda: 1. CIC^F tüüpi prootonvahetuskanalid; 2. Fluc valgud (varasemalt tuntud ka kui CrcB). CIC^F ning Fluc perekonna transporterid viivad mõlemad fluoriidioone rakust välja, kuid nad pole omavahel fülogeneetiliselt seotud (Baker jt., 2012, Stockbridge jt., 2012). Järgnevalt annan ülevaate nii CIC^F tüüpi transporteritest kui Fluc perekonna transporteritest.

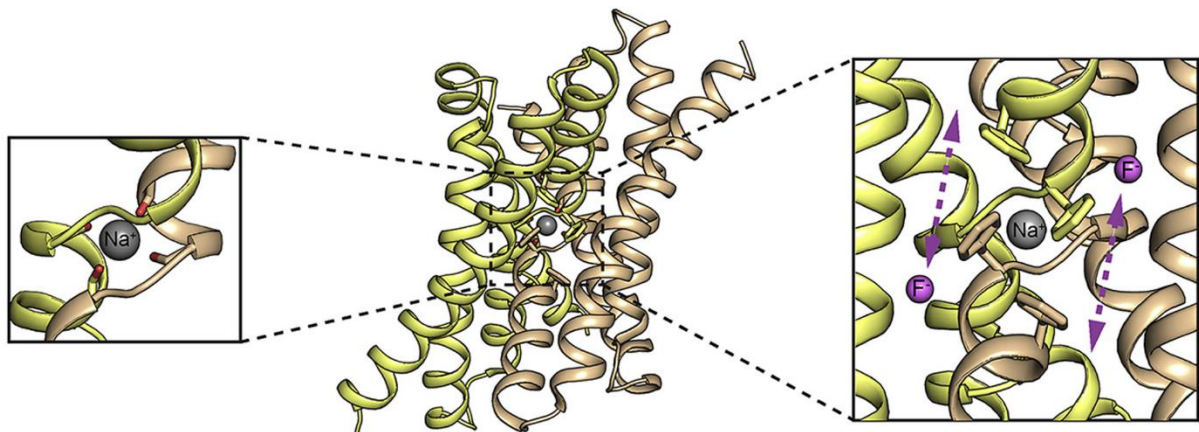
CIC^F transportereid esineb nii gram-positiivsetes kui ka -negatiivsetes bakterites. Baker jt. (2012) näitasid, et *P. syringae*-st pärit CIC^F perekonda kuuluv EriC^F vastutab fluoriidioonide transportimise eest rakust välja (Baker jt., 2012). 2012. aastal leiti, et kõik uuritud CIC^F transporterid on F⁻/H⁺ prootonvahetuskanalid (Stockbridge jt., 2012). CIC^F transporteritel erineb aminohappeline järjestus regioonides, mis koordineerivad kloriidiooni ning prootoni liikumist kanalis. Tänu sellele eelistavad CIC^F kanalid fluoriidioone kloriidioonidele (Brammer jt., 2014). Pea kõigi CIC^F transporterite geenide puhul on geenile eelnevast regulaatorsest alast leitud ka fluoriidioone tunnetav ribolüliti, v.a. *P. syringae*-s olev homoloog CIC-*psy* (Stockbridge jt., 2012). Ribolülititest räägin täpsemalt peatükis „1.3 Ribolülidid“.

1.2.1.3 Fluc perekonna transporterid

Lisaks CIC transporterite perekonda kuuluva EriC kahetisele funktsioonile (kloriid- ja fluoriidioone transportiv EriC ning ainult fluoriidioone transportiv EriC^F) leiti 2012. aastal veel üks transporter, mis on spetsialiseerunud ainult fluoriidioonide transportimisele (Baker jt., 2012). *crcB* on teada juba 1996. aastast, kui antud geeni puudumisel leiti, et *E. coli*-i rakud ei suutnud taluda kampri juuresolekul toimuvat kromosoomi lahti keerdumist (Hu jt., 1996). 2012. aastal näidati, et CrcB on ühtlasi ka transporter, mis viib rakust välja fluoriidioone (Baker jt., 2012). Prokariootides nimetatakse antud transportereid Fluc perekonna transporteriteks ning eukariootides FEX perekonna transporteriteks. FEX perekonna transporterid toimivad

eukariootides, näiteks seentes, taimedes, vetikates kui ka loomariiki kuuluval käsna, fluoriidiioonkanalitena, (Li jt., 2013, Zhu jt., 2019, Song jt., 2020).

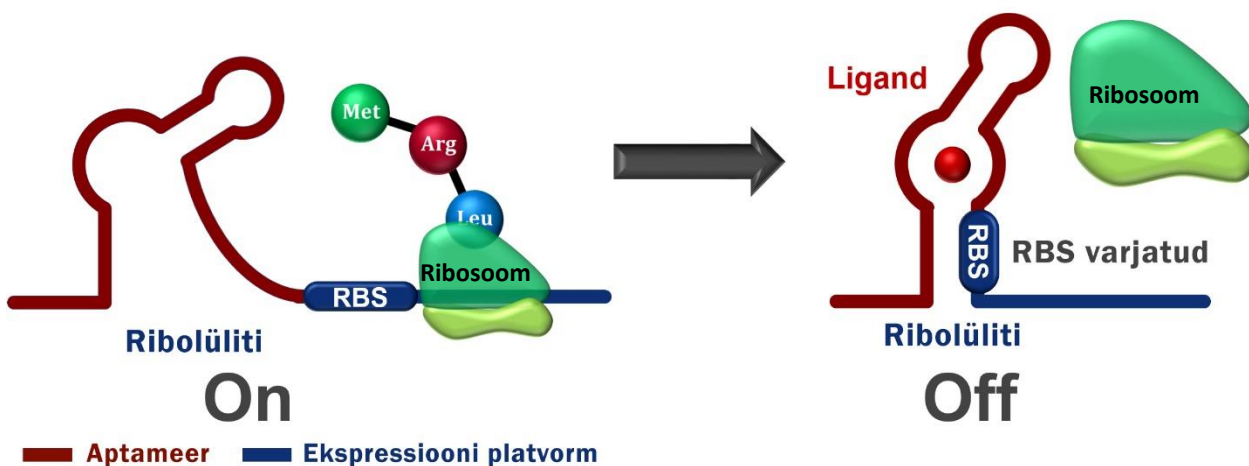
Fluc perekonna transporteritest (joonis 3) on kõige tuntum CrcB, mida 2013. aastast nimetatakse ka Fluc-iks. Fluc transporterid on membraanis homodimeerina, millest kummalgi subühikul on neli transmembraanset domeeni (Stockbridge jt., 2013). Fluc ehk CrcB on ka üks vähestest membraanivalkudest, mis omab tõestatult kahepidist topoloogiat ehk pole fikseeritud, milline osa valgust ulatub raku pinnale ning milline raku tsütoplasmasse. Raku membraanis võib esineda valku kahes eri orientatsioonis. Ka üks CrcB dimeer võib koosneda kahest antiparalleelsest subühikust (Stockbridge jt., 2014). 2020. aastal näidati, et Fluc transporterite toimimiseks on vajalik naatriumioon (joonis 3). Eukariootide FEX geen on liitgeen, ning selle tulemusena koosnevad eukariootide fluoriiooni transporterid ühest valgust, millel on alles üks funktsionaalne kanal (Berbasova jt., 2017).



Joonis 3. Fluc perekonna transporter (McIlwain jt., 2020). Halli kerana on märgitud naatriumioon, mis on vajalik fluoriidioonide (lillad kerad) liikumiseks läbi kanalite.

1.3 Ribolülitid

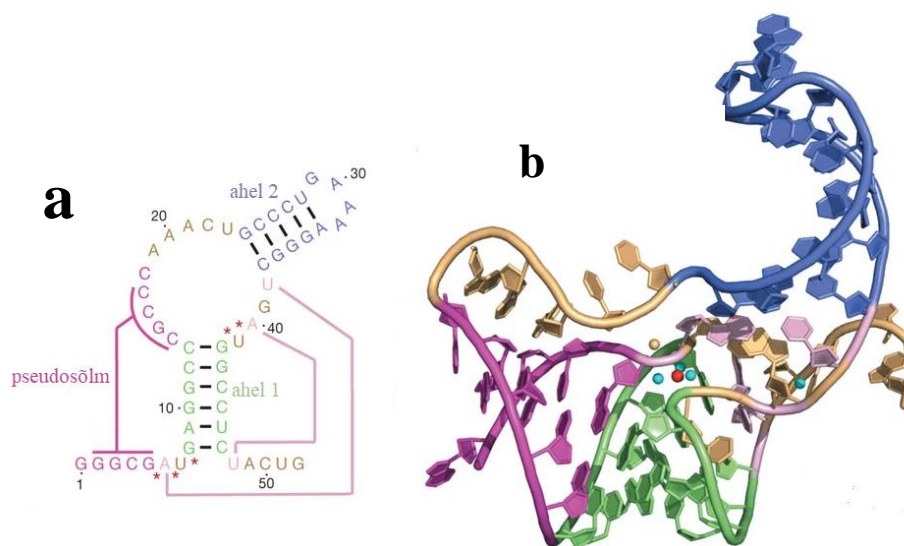
Ribolülitid on mRNA piirkonnad, mis võivad otseselt seostuda sihtmärkmolekulidega ja seeläbi mõjutada geenide avaldumist. Ribolüliti olulisimaks osaks on domään, mis seob endaga äratuntava molekuli, ning mis on tihti ühte molekuli äratundvatel ribolülitel konserveerunud (nimetatakse aptameeriks). Ribolüliti koosseisu kuulub ka varieeruv osa ehk ekspressiooniplatvorm, mida sihtmärkmolekuli seondumine aptameeriga mõjutab, ning mis aitab reguleerida sellele järgnevaid gene (joonis 4). Sihtmärkmolekuli seondamisel muutub ribolüliti sekundaarstruktuur ning see omakorda mõjutab geeniekspressiooni. Ribolüliteid on erinevaid tüüpe: enamik ribolüliteid tunnetavad ära, kui teatud molekuli on rakus juba piisaval hulgal, ning lülitavad seejärel nende kontrolli all olevate geenide ekspressiooni välja. Samas on ka ribolüliteid, mis hoopis aktiveerivad enda mõjutatud geeni. Lisaks toimivad ribolülitid geeniekspressiooni erinevatele tasemetele. Transkriptsiooni tasemel toimib ribolüliti läbi terminaatorstruktuuride tekitamise või avamise, mis vastavalt, kas takistavad või lubavad polümeraasil sünteesi jätkata. Translatsiooni tasemel mõjutab ribolüliti Shine-Delgarno järjestuse ligipääsetavust ribosoomidele. Ribolülitid võivad aeglustada või kiirendada ka juba sünteesitud RNA-de lagundamist, avades või sulgedes RNA-d lagundamisele suunavaid järjestusi (Serganov ja Nudler, 2013, Ariza-Mateos jt., 2021). Ribolülitite olemasolu on näidatud nii bakterites, arhedes kui ka seentes (Weinberg jt., 2010, Li ja Breaker, 2017).



Joonis 4. Ribolüliti struktuur translatsiooni tasemel toimiva ribolüliti näitel. „On“ tähistab ribolüliti konformatsiooni, kus ligand ei ole ribolülitiga seondunud. Sellisel juhul on ribosoomi seondumissait (RBS) ribosoomile kättesaadav ning toimub valgu süntees antud mRNA-lt. „Off“ tähistab ribolüliti konformatsiooni, kus punase ringiga tähistatud ligand on seondunud. Antud juhul on aptameeri konformatsioon selline, mis varjab ära ekspressiooniplatvormis oleva ribosoomi seondumissaidi ning antud mRNA-lt geeniekspressiooni toimuda ei saa. Joonis (https://2015.igem.org/Team:Exeter/RNA_Riboswitches, viimati külastatud 03.05.2022) järgi.

1.3.1 Fluoriidioone siduv ribolüliti

2012. aastal leiti bakteri *Pseudomonas syringae* mittekodeerivate RNA-de analüüsimisel fluoriidioone siduv *crcB* ribolüliti. Antud ribolüliti paikneb *P. syringae* genoomist leitud *crcB* geeni ees, mille järgi antud ribolüliti oma nime on saanud (Weinberg jt., 2010). *crcB* ribolüliti esineb nii bakteritel kui ka arhedel (Weinberg jt., 2010, Speed jt., 2018) ning ribolüliti kontrollib näiteks fluoriidioonide transportereid (*crcB*), DNA reparatsiooni geene (*mutS*), stressivastuse geene (erinevad universaalse stressivastuse geenid, näiteks *uspA*) ning ka paljusid teisi geene (näiteks pürofosfataasi geen, püruvaadi kinaasi geen, *jne*). Geenid, mille ees ribolüliti esineb, varieeruvad bakteriliigiti, kuid kõige enam leidub ribolüliti fluoriidiooni transporterite ees (Weinberg jt., 2010, Baker jt., 2012). Fluoriidi ribolüliti toimib läbi pseudosõlme RNA-s. Oletatakse, et fluoriidiooni seondumine mRNA-ga muudab selle struktuuri ning takistab mRNA-s terminaatorstruktuuri tekkimist. *crcB* ribolüliti seob spetsiifiliselt vaid fluoriidioone, teised halogeenid ribolülitiga ei seonu (Weinberg jt., 2010, Baker jt., 2012). Fluoriidiooni seondumiseks fluoriidi ribolülitiga on oluline lisaks veel magneesiumioonide olemasolu. Nimelt, fluoriidiooni seondumist RNA-ga aitavad stabiliseerida kolm magneesiumiooni (joonis 5), ilma magneesiumita ei ole fluoriidi ribolülidid aktiivsed (Ren jt., 2012, Lee jt., 2021).



Joonis 5. *crcB* ribolüliti struktuur. (a) *Thermotoga petrophila* fluoriidi ribolüliti skemaatiline struktuur. Rohelise ja sinisega on näidatud mRNA ahelad, mille puhul moodustub nukleotiidide vahel Watson-Crick paardumine, roosaga pseudosõlme moodustavad interaktsioonid (ühendatud joontega) ning kuldsega struktuuri moodustumises mitteosalevad aluspaarid. Viis nukleotiidi, mis osalevad metalliioonide koordineerimisel, on märgitud punaste tärnidega. (b) Fluoriidiga seondunud ribolüliti kristallstruktuur. Punane pall on fluoriidioon ning sinised pallid on magneesiumioonid. Ahelate värvikood vastab joonise (a) osas toodule. Ren jt., 2012 järgi.

1.4 *Pseudomonas putida* kui rakuvabrik

P. putida on gram-negatiivne aeroobne γ -proteobakter, mida võib leida kõikjal mullas ning veekogudes, ka saastunud keskkondades. Oma elupaikade mitmekesisuse ja elukeskkonna suure muutlikkuse tõttu on *P. putida*-l märkimisväärne metaboolne ja füsioloogiline vastupidavus ja paindlikkus. Tänu sellele on *P. putida*-t uuritud ka kui võimalikku organismi, kelle metaboolseid radu oleks võimalik muuta selliselt, et antud bakterit saaks kasutada erinevate ühendite tootmisel või toksiliste ainete lagundamisel. *P. putida* tüvest KT2440 on ajapikku saanud laboratoorne mudelorganism, millel on säilinud võimekus saada hakkama ka looduslikus mullakeskkonnas. Antud tüvel on mitmeid eri mehhanisme, kuidas toime tulla nii eksogeense kui ka endogeense oksüdatiivse stressiga (Hishinuma jt., 2006, Park jt., 2006, Kim jt., 2008, Chavarria jt., 2013). KT2440 tüve genoomi sekveneerimise tulemusena leiti, et tüve genoomis on kokku 1256 erinevat võimalikku degradatsioonireaktsiooni, mis tõestab veelkord tüve suurt paindlikust võimalike energiaallikate kasutamise osas (Nikel ja de Lorenzo, 2018).

Üheks väljakutseks rakuvabrikute loomisel on see, kuidas muuta kasutatavad bakteritüved võimalikult stabiilseks ning efektiivseks. Martinez-Garcia jt., (2014, 2015) näitasid, et eemaldades *P. putida* genoomist bakterile eluliselt mittevajalikke piirkondi, saavutati võrreldes algse tüvega tunduvalt vastupidavam tüvi. Erinevates katsetes eemaldati *P. putida* KT2440 genoomist, kas ainult neli profaagi või kõik profaagid, kaks transposooni ja kogu flagellide sünteesimehhanism. Viimase eemaldamine oli oluline, kuna antud rada kulutab palju NAD(P)H-d, mida saaks kasutada soovitatavate ühendite tootmisel. Vähendatud genoomiga *P. putida* tüved oli tunduvalt paremate kasvuomadustega (lühem *lag*-faas, suurem biomass), talusid paremini oksüdatiivset stressi ja DNA kahjustusi, suutsid paremini replitseerida endogeenset DNA-d ning tüvede ellujäämine statsionaarses faasis oli suurem (Martinez-Garcia jt., 2014, Martinez-Garcia jt., 2015).

Genoomsed saared on piirkonnad bakterite DNA-s, millel on põhigenoomist eristatav struktuur ja funktsioon ning mis on suure tõenäosusega omandatud horisontaalse geeniülekanne käigus. Genoomsed saared sisaldavad tihti ka eri bioloogilisi ülesandeid täitvaid geene, näiteks virulentsusgeene, antibiootikumiresistentsusgeene ja metabolismiradade geene. Horisontaalse geenisiirdega omandatud genoomsed saared aitavad bakteritel evolutsioneeruda, et pidada paremini vastu muutlikule keskkonnale (Juhas jt., 2009). Samas pole genoomsed saared eluliselt olulised ning genoomsete saarte eemaldamisega oli võimalik näiteks *P. putida* KT2440 tüve algsest genoomist eemaldada umbes 4,12 % (254,52 kiloaluspaari). Pärast genoomsete saarte eemaldamist

ei muutunud tüve kasvukiirus, kuid paranes transformatsiooni efektiivsus, rakule mitteomaste valkude süntees ja eri süsinikuallikate kasutamine. Lisaks oli paranenud ka tüve geneetiline stabiilsus (Liang jt., 2020).

Näiteid *P. putida* KT2440 bakterirakkudest, mida on biotehnoloogiliselt pandud tootma, kasutama või lagundama ühendeid, mida see tüvi tavaliselt ei suuda, võib tuua mitmeid. Näiteks on *P. putida* KT2440 bakterirakke modifitseeritud nii, et nad toodavad rhamnolipiidi (Tiso jt., 2016). Lisaks on muudetud *P. putida* genoomi selliselt, et bakter suudaks kasutada energiaallikana ka tsellobioosi ja ksüloosi (Dvorak ja de Lorenzo, 2018). Ka on pandud *P. putida*-t kasutama tööstuses laialdaselt levinud ja raskesti lagundatavat etüleenglükooli (Frandsen jt., 2018) ning sünteesima fluori sisaldavaid nukleotiide ja suhkruid mineraalsest fluoriidist (Calero jt., 2020). *P. putida*-t on uuritud ka bioremedatsiooni ehk keskkonnast toksiliste ühendite eemaldamise valdkonnas. Tulevikus on oodata, et *P. putida* baasil luuakse erieivaid rakuvabrikuid ning keskkonda puhastavaid bakteritüvesid, kuna nõudlus keerukate ühendite sünteesi ja nende keskkonnast lagundamise järgi aina kasvab (Weimer jt., 2020).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Orgaanilised fluori ühendid leiavad järjest enam kasutust erinevates valdkondades. Rohkem kui 20% praegu turul olevates ravimitest ning kuni 40% agrokemikaalidest on fluori ühendid. Samas on fluororgaaniliste ühendite ja ühtlasi ka orgaaniliste fluoropolümeeride tootmine väga keerukas, energiamahukas ning tootmise käigus võib tekkida kahjulikke lisaihendeid (Prevedouros jt., 2006, Lv ja Cheng, 2021).

Pseudomonas putida on mullabakter, millel on väga mitmekülgne metabolism ning hea stressitaluvus. Järjest enam on *P. putida*-t uuritud kui võimalikku platvormi rakule mitteomaste valkude ja ühendite tootmiseks. Meie labor osaleb „Horisont 2020 programmi“ projektis SinFonia, mille eesmärgiks on konstrueerida metaboolselt võimeka *Pseudomonas putida* KT2440 põhjal fluoropolümeere sünteesivad bakteritüved, lähtudes sünteetilise bioloogia võimalustest. Meie uurimisgrupi roll selles projektis on fluori ühendeid sünteesivate *P. putida* bakteritüvede geneetilise stabiilsuse jälgimine ja vajaduspõhine parendamine. Minu tööle eelnevatest katsetest oli selgunud, et *P. putida* KT2440 fluoriidi transporteri deletsioonitüves Δ crcB tekib fluoriiditolerantseid kolooniad 10 mM NaF-i sisaldavatele LB tardsöötmege tassidele, millel antud tüvi tavaliselt kasvada ei suuda. Seega esineb *P. putida*-s lisaks CrcB transporterile teisigi mehhanisme, mis aitavad bakteril taluda keskkonnas esinevat fluoriidi. Käesoleva magistritöö eesmärgid püstitusid vajadusest saada aimu molekulaarsetest mehhanismidest, mis lisaks fluori transporteri CrcB olemasolule mõjutavad *P. putida* rakkude fluoriidi talumist. Peamised eesmärgid olid:

1. Fluoriiditolerantsust mõjutavate geenide otsimine *Pseudomonas putida* genoomsest raamatukogust.
2. Fluoriiditolerantsust mõjutavate geenide tuvastamine transposoonmutageneesiga.
3. Transposoonmutageneesiga tuvastatud *PP_3125* geenilt kodeeritud Cro/CI perekonna transkriptsiooniregulaatori osaluse kontrollimine *P. putida* fluoriiditolerantsuses.

2.2 Materjal ja meetoodika

2.2.1 Töös kasutatud söötmed, plasmiidid, bakteritüved ja bakterite kasvutingimused

Lisas 1 on toodud töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid. Bakterite kasvatamiseks kasutasin kas LB (inglise k – *lysogeny borth*) täissöödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl) või M9 minimaalsöödet (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl), millele lisasin mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 µM MgO, 50 µM CaCO₃, 40 µM FeSO₄, 12,5 µM ZnSO₄, 12,5 µM MnSO₄, 2,5 µM CuSO₄, 2,5 µM CoSO₄, 1,9 µM H₃BO₄) ning süsinikuallikana glükoosi lõppkontsentratsiooniga 20 mM. Tardsöötme saamiseks lisati vedelsöötmele agarit 15 g/l. *P. putida* rakke kasvasin temperatuuril 30 °C ning *E. coli* rakke 37 °C. Vedelsöötmes kasvavatele kultuuridele piisava aeratsiooni tagamiseks kasvasin kultuure loksutil (180 rpm).

Seleksiooniks lisasin söötmesse järgmisi antibiootikume: kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml), bensüülpenitsilliin (Bp; 1500 µg/ml), gentamütsiin (Gm; 10 µg/ml).

2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Matriitsina kasutasin PCR-is (inglise k *Polymerase Chain Reaction*), kas varasemalt eraldatud plasmiidset DNA-d või bakterirakke. Reaktsioonisegu lõppmahuks oli 20 µl ning segu sisaldas 1x PCR puhvrit (*Thermo Scientific, DreamTaq™ Green Buffer (10X)*), sisaldas 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP; 10 pmol igat praimerit, 0,7 U Taq polümeraasi.

Ühe reaktsioonitsükli osadeks olid:

- 1) DNA denaturatsioon (45 s, 96 °C),
- 2) praimerite seondumine matriitsile (30 s, 53-63 °C),
- 3) DNA süntees (96 °C, sünteesiaeg sõltus amplifitseeritava fragmendi pikkusest).

Programmi alguses oli paariminutiline kuumutamine rakkude lõhkumiseks (96 °C) ning programm lõppes järelsünteesiga (72 °C, 4 min), et sünteesida lõpuni kõik poolikud fragmendid. Kokku oli programmis 25 tsükli. Töös kasutatud praimerid on toodud lisas 2.

2.2.3 Geelektroforees

DNA fragmentide (PCR-i produktid või restriiktaasiga lõigatud DNA) analüüsimiseks kasutasin geelektroforeesi. Uuritavale proovile lisasin 5 µl foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). Kui PCR-i reaktsioonis või restriksioonanalüüsis kasutatav puhver sisaldas juba värvi, siis elektroforeesiks enam eraldi värvi ei lisanud. Proovid kandsin 1% agarosgeelile

1xTAE puhvis (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi (lõppkontsentratsioon 0,33 µg/ml). DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutasin *Thermo Scientific* DNA markereid *ZipRuler Express DNA Ladder 1* või *ZipRuler Express DNA Ladder 2*. Tulemused visualiseerisin UV valguses.

2.2.4 Kloneerimine

Kloneerimisel kasutatavad PCR-i produktid, ligaasisead ja restriksioonisead sadestasin, lisades 2,5-kordses mahus 96% etanooli ja 0,1 kordses mahus 5 M NaCl lahust. DNA-d sadestasin -20 °C juures 10 minutit, sademe tsentrifuugisin kokku 4 °C juures 10 minutit ning pesin kaks korda 75% etanooliga. Saadud sademe kuivatasin temperatuuri 37 °C ning suspendeerisin 10 µl vees.

Vektorplasmiidide konstrueerimiseks restrikteerisin vektorit ning kloneeritavat fragmenti samade restriktasidega. Ensüümide inaktiveerimiseks kuumutasin reaktsiooniseadu 10 minutit 80 °C juures. Pärast restrikteerimist töötlesin vektorit ühe ühiku aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) 15 minutit 37 °C juures, et takistada vektori tagasi kokku ligeerumist. Ensüümi inaktiveerisin termotöötusega 80 °C juures 10 minutit. Seejärel sadestasin reaktsioonisead ning sadestatud DNA lahustasin vees. Ligeerimiseks valmistasin reaktsiooni mahus 20 µl. Segu sisaldas ühekordset ligaasi puhvrit (*Thermo Scientific*), ATP-d lõppkontsentratsiooniga 1 mM, 0,5 ühikut T4 ligaasi (*Thermo Scientific*) ning ligeeritavaid DNA fragmente. Reaktsioon toimus üleöö toatemperatuuril (21 °C)

DNA restriksiooniks, ligeerimiseks ja vektorite töötlemiseks aluselise fosfataasiga kasutasin *Thermo Scientific*-u ensüüme vastavalt tootja protokollidele.

Sadestatud ligaasiseadu viisin *E coli* DH5α, DH5α λpir või CC118 λpir rakkudesse või *P. putida* rakkudesse, kasutades elektroporatsiooni. Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutasin *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* -i ning järgisin tootja poolt ette antud protokollid.

2.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Kompetentsete *E. coli* rakkude saamiseks inokuleerisin 5 ml LB vedelsöödet 150 µl üleöö LB-s kasvanud kultuuriga ning kasvasin rakke ligikaudu 2 tundi loksutil (180 rpm) 37 °C juures (rakukultuuri optiline tihedus (OD) mõõdetud spektrofotomeetriliselt 580 nanomeetri (nm) juures = 0,2-0,3). Seejärel tõstsin bakterikultuurid jääle ning tsentrifuugisin rakud kokku (60 sek, 12000 x g). Rakkude sadet pesin kolm korda 400 µl 10% glütserooliga ning seejärel suspendeerisin rakud 80 µl 10% glütseroolis. Kogu protsessi vältel hoidsin glütserooli ja *E. coli* rakke jääl.

Kompetentsete *P. putida* rakkude saamiseks kasvasin rakke 4 ml LB vedelsöötmes loksutil (180 rpm) üleöö. Kompetentsete rakkude valmistamiseks tsentrifugeisin kokku 300 µl üleöökultuuri (30 sek, 12000 x g). Rakke pesin 300 µl 300 mM saharoosi lahusega kolm korda. Seejärel suspendeerisin rakud 100 µl 300 mM saharoosi lahuses.

Elektroporatsiooniks lisasin kompetentsetele rakkudele ligikaudu, kas 100 ng vees lahustatud DNA-d, 22 µg genoomset raamatukogu või ligaasisegu. Seejärel tõstsin rakud elektroporatsiooniküveti ning viisin läbi elektroporatsiooni *BioRad* elektroporaatoriga “*Micropulser*” pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisasin rakkudele 700 µl LB vedelsöödet ning tõstsin rakud küvetist välja. Rakke kasvasin 45 minutit ilma seleksioonita loksutil ning seejärel plaatisin rakud selektiivsöötmele.

2.2.6 *Pseudomonas putida* genoomse raamatukogu kasutamine

P. putida genoomset raamatukogu kasutasin antud töös, et leida geene, mis on olulised *P. putida* fluoriiditolerantsuses. Katsete läbiviimiseks kasutasin Pablo Iván Nikeli laborist saadud *P. putida* KT2440 tüve, millel on deleteeritud fluoriidi transporteri geen *crcB* (Calero jt., 2020) ning p9TTpheAgusA plasmidi baasil loodud *P. putida* genoomset raamatukogu. Antud raamatukogu sisaldas 17% tühja plasmidi, 40% plasmiididest sisaldasid umbes 1 kiloaluspaari pikkust genoomi lõiku, 23% 2 kiloaluspaari pikkust lõiku ning 17% plasmiididest sisaldasid suuremat lõiku kui 3 kiloaluspaari (Kivistik jt., 2006). Genoomse raamatukogu (22 µg) elektroporeerisin *P. putida* Δ crcB testtüve rakkudesse (ühe kompetendi valmistamiseks arvestasin 200 µl üleöö kasvanud Δ crcB rakke). Pärast elektroporatsiooni lasin rakkudel kasvada 45 minutit ilma seleksioonita ning seejärel plaatisin rakud bensüülpenitsilliini sisaldavale LB tardsöötmele ja lasin kasvada üleöö. Hommikul (pärast 18 tunni möödumist) teostas in kolooniate tempelkülvi 15 mM NaF-LB tassidele (sobiva NaF-i kontsentratsiooni tegin kindlaks eelnevate katsete käigus) ning tasse inkubeerisin 30 kraadi juures 5 päeva. Topeltseleksiooni (15 mM NaF + 1500 µg/ml Bp) bakterid ei kannatanud. Eelnevalt olin kindlaks teinud, et 5 päeva on sobiv NaF-i taluvate kloonide tekke jälgimiseks, kuna pärast seda hakkavad tekkima spontaansed NaF-i taluvad kloonid. Selleks, et aru saada, kudas tekivad 15 mM NaF-LB tassidele Δ crcB spontaansed NaF-i taluvad mutandid, kasutasin katses sisemise kontrollina Δ crcB rakkudesse tühja p9TTpheAgusA plasmidi viimist, mille plaatisin samuti pärast elektroporatsiooni Bp sisaldavatele tassidele ning järgmisel hommikul (pärast 18 tunni möödumist) teostas in tempelkülvi 15 mM NaF-LB tassile.

15 mM NaF-LB tassidele viie inkubatsioonipäeva vältel tekkinud NaF-i taluvad *P. putida* Δ crcB kloonid külvasin edasi paralleelselt nii 15 mM NaF-LB kui ka Bp-LB tassidele. Pasmidi olemasolu kontrollisin praimeritega T1T2 ning pheAval, mis lisaks võimaldas hinnata plasmiidis paikneva genoomse raamatukogu lõigu suurust (lisa 2). 15 mM NaF-i taluvaid *P. putida* Δ crcB kloone kasvasin üleöö bensüülpenitsilliini sisaldavas LB vedelsöötmes loksutil (180 rpm) ning eraldas kloonide plasmiidse DNA. Saadud DNA viisin *E. coli* DH5 α rakkudesse plasmiidse DNA eralduseks ning *P. putida* Δ crcB rakkudesse, et kinnitada plasmidi antav fenotüüp. Genoomse raamatukogu plasmiidis sisalduva genoomse inserdi amplifitseerimiseks ja sekveneerimiseks kasutasin plasmiidile seonduvaid primereid T1T2 ja pheAval.

2.2.7 Sekveneerimine

Sekveneerimiseks eemaldasid kõigepealt kasutatavast reaktsioonisegust vabad primereid ja nukleotiidid 1 ühiku aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) ja 2,5 ühiku eksonukleasiga ExoI (*Thermo Scientific*). Reaktsioon toimus 30 minutit temperatuuril 37 °C ning ensüümid inaktiveerisin 15 minutit 80 °C juures. Sekveneeritavad proovid valmistasin ette kasutades *Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit*-i (*Applied Biosystem*) ning kasutasin tootja modifitseeritud protokollid. Reaktsioonisegu koosnes 1 μ l eeltöödetud uuritavast PCR-i produktist, 1,6 pmol vajalikust primerist, 2 μ l 5x lahjenduspuhvrst, 0,7 μ l premix'ist (*BigDye PR-100 mix v3.1*) ning veest (10 μ l). DNA järjestuste määramiseks kasutasin Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveneerimisteenust ja sekveneerimiseks kasutati 3730xl kapillaarsekvenaatorit (*Applied Biosystem*).

2.2.8 Bakterite konjugatsioon

E. coli CC118 λ pir tüves replitseeruvast pBAM1 plasmiidist viisin Tn5lacItac minitransposooni *P. putida* Δ crcB rakkudesse bakterite konjugatsiooni teel. Konjugatsiooni läbiviimiseks kasvasin LB vedelsöötmes loksutil (180 rpm) üleöö vastava antibiootikumi juuresolekul doonortüve *E. coli* CC118 λ pir, milles oli ülekantav plasmiid, *E. coli* HB101 tüve helperplasmiidiga ja retsipienttüve *P. putida* Δ crcB. Järgmisel hommikul, pärast 18 tunni möödumist, lahjendasin üleöökultuure 40 korda 5 ml värskesse LB vedelsöötmesse, kuhu antibiootikume ei lisatud. Tüvesid kasvasin loksutil (118 rpm), et tagada kultuuride piisav aeratsioon. Ristamissegude tegemiseks võtsin 2,5 tunni pärast 100 μ l ülekantavat plasmidi kandvat *E. coli* CC118 λ pir tüve, 100 μ l helperplasmiidiga HB101 tüve ning 200 μ l retsipienttüve Δ crcB. Kokkusegatud ristamissegust panin 100 μ l LB tardsöötmele nii, et segu jääks kokku üheks tihedaks laiguks. Konjugatsiooni

toimumiseks hoidsin tassi üleöö 30 °C juures. Järgmisel päeval kraapisin tassilt 1/3 ristamissegust ning suspendeerisin 300 µl-s 1x M9 puhvris, tsentrifuugisin põhja, pesin kaks korda 1x M9-ga ning võtsin rakud uuesti ülesse 300 µl 1x M9 puhvris. Saadud suspensiooni mahu viisin 1x M9 puhvriga 4 milliliitriini ning plaatisin 300 µl-i kaupa välja selektiivsöötmele, millel said ülesse kasvada vaid transkonjugandid.

2.2.9 Transposoonmutagenees

Transposoonmutageneesi läbiviimiseks kasutasin Riho Terasse konstrueeritud vektorit pBAM1Tn5lacItac. Selles kanamütsiini resistentsusega Tn5 minitransposoonis on *lacItac* geenikassett orienteeritud nii, et *tac*-promootor on suunaga Tn5 minitransposoonist välja. pBAM1Tn5lacItac plasmidi viisin elektroporatsiooni teel esmalt *E. coli* CC118 λpir tüvesse, millest plasmid kandus konjugatsiooni teel edasi retsipienttüvesse KT2440Δ*crcB*. 1x M9 puhvris ülesse võetud ristamisseguga plaatisin 300 µl kaupa välja kanamütsiini (50 µg/ml) ja 0,5 mM IPTG-d (isopropüül-β-tio-galaktopüranosiid, aktiveerib geeniekspressiooni *tac*-promootorilt) sisaldavatele glükoos-minimaal tassidele. Järgmisel päeval tegin Km tassile tekkinud kolooniatest tempelkülvi 0,5 mM IPTG-d sisaldavatele 15 mM NaF-LB tassidele. Varasemalt on teada, et umbes viie päeva möödudes hakkavad tekkima spontaansed NaF-i taluvad Δ*crcB* mutandid. Spontaansete 15 mM NaF-i taluvate mutantide tekke jälgimiseks tegin ristamisseguga ilma doonorita ja plaatisin välja ilma selektsioonita glükoos-minimaal tassile ning teostas in tempelkülvi 0,5 mM IPTG 15 mM NaF-LB tassile. Tempelkülviga 0,5 mM IPTG 15 mM NaF-LB tase jälgisin kokku viis päeva. Tekkinud kolooniad külvasin paralleelselt edasi nii 0,5 mM IPTG 15 mM NaF-LB tassile kui ka Km-LB tassile, selleks, et kontrollida NaF-i taluvuse püsivust ja minitransposooni olemasolu (minitransposoon kannab resistentsusgeeni Km-i vastu). Kahe stressi korraga rakendamist (15 mM NaF ja 50 µg/ml Km) bakterid ei talunud. Edasiseks analüüsimiseks valisin kloonid, mis suutsid kasvada nii 15 mM NaF-i sisaldaval LB tardsöötme tassil kui ka Km-i sisaldaval tassil.

2.2.10 ARB-PCR

Minitransposooni Tn5 insertioonikoha kindlakstegemiseks *P. putida* KT2440 Δ*crcB* kromosoomis kasutasin ARB-PCR-i, mis võimaldas ülesse amplifitseerida minitransposooni otsa ning sellega külgneva kromosomaalse ala järjestuse.

ARB-PCR-s on kaks etappi, millest esimeses tekitatakse juhusliku pikkusega DNA fragmendid ning teises etapis kasutatakse esimese etapi produkti ning praimereid, mis seonduvad esimese etapi produktile. Esimeses etapis kasutatakse praimereid, millest üks seondub transposooni otsmisele

järjestusele ning teine kinnitub genoomis juhuslikele järjestustele. Antud töös kasutasin praimereid BAM1 ja ARB6 (lisa 2). ARB6 on kōdupraimer, mis sisaldab 5-6 nukleotiidi pikkust linker-regiooni (3'otsas), 10 nukleotiidi juhuslikus järjekorras kõiki nelja nukleotiidi, ning konserveerunud järjestust (5'otsas), millega saab seonduda teises etapis kasutatav praimer ARB2 (lisa 2).

ARB-PCR-i reaktsiooni lõppmaht oli 30 µl ja reaktsioonisegu sisaldas 1x PCR-i puhvrit, puhvriga võrdses mahus DMSO-t (dimetüülsulfoksiid), 10 pmol kumbagi praimerit, 0,3 ühikut *Taq* polümeraasi ning bakterirakke. ARB-PCR-i esimeses etapis kasutasin järgmist PCR-i programmi:

- 1) DNA denaturatsioon (96 °C, 30 s),
- 2) praimerite seondumine (30 °C, 30 s),
- 3) DNA süntees (72 °C, 1,5 min),
- 4) punktide 1-3 kordus 6 tsükliks,
- 5) DNA denaturatsioon (96 °C, 30 s),
- 6) praimerite seondumine (45 °C, 30 s),
- 7) DNA süntees (72 °C, 2 min),
- 8) punktide 5-7 kordus 30 tsükliks.

ARB-PCR-i teise etappi võtsin 0,5 µl esimese etapi PCR-i produkti ja kasutasin praimereid ME-I-uus2 ning ARB2 (lisa 2). Teise etapi programm koosnes 30-st tsüklist ning ühe tsükli etapid olid järgmised:

- 1) DNA denaturatsioon (96 °C, 30 s),
- 2) praimerite seondumine (59 °C, 30 s),
- 3) DNA süntees (72 °C, 2 min).

ARB-PCR-i teisest etapist saadud PCR-i produktid sekveneerisin.

2.2.11 PP_3125 geeni deletsioonitüvede konstrueerimine

PP_3125 geeni deletsioonitüved konstrueerisin nii KT2440 kui ka KT2440 Δ crcB tüvedest ning kasutasin Pablo Iván Nikeli laboris väljatöötatud meetodika (Wirth jt., 2020) kohandatud versiooni. Teostasin „armiga“ deleteerimise ehk jätsin geenist alles start- ja stoppkoodoni. Esmalt tekitasin kaks PCR-i produkti: I produkt sisaldas u 500 nukleotiidi deleteeritava geeni eelset ala ja II produkt sisaldas 500 nukleotiidi deleteeritava geeni järgset ala. Kasutatavad praimerid sisaldasid vastavalt *BamHI* ja *SacI* ning *EcoRI* ja *SacI* restriksioonisaite (lisa 2).

Esmalt töötlesin I PCR-i produkti *Bam*HI ja *Sac*I restriктаasidega ning kloneerisin samade restriктаasidega avatud vektorisse pSNW2. Tulemuseks sain järgmises etapis kasutatava plasmidi pSNW2_PP_3125enne3. Saadud vektori viisin elektroporatsiooni teel *E. coli* DH5 α λ pir tüve rakkudesse. Vektori DNA eraldas rakkudest ning kontrollisin sekveneerimisega (praimerid PP_3125BHI ja PP_3125delSac, lisa 2). Järgmise etapina restrikteerisin II PCR-i produkti *Sac*I ja *Eco*RI ensüümidega ning kloneerisin samade restriктаasidega avatud pSNW2_PP_3125enne3 plasmidi. Saadud vektor pSNW2_PP_3125enne3+pärast2 viisin taas *E. coli* DH5 α λ pir tüve rakkudesse, kust eraldas plasmidi ning sekveneerisin praimeritega Forward ja Reverse (lisa 2).

PP_3125 deletsiooniga suitsiidplasmidi pSNW2_PP_3125enne3+pärast2 viisin *P. putida* WT ja Δ crcB rakkudesse, kus plasmid ei replitseeru. Kuna plasmid *P. putida*-s ei replitseeru, siseneb see vektorisse kloneeritud fragmendi ja kromosoomi vahel toimuva homoloogilise rekombinatsiooni teel bakteri kromosoomi. Kuna kromosoomi siseneb kogu plasmid, moodustuvad kointegraadiga rakud, milles on nii plasmidis paiknev Km resistentsus, GFP (roheliselt helendav valk, inglise keeles *green fluorescent protein*) ja deletsioonilookus kui ka kromosoomis olemasolev metsiktüve lookus. Selleks, et vabaneda ülejäänud plasmidist ja metsiktüve lookusest ning alles jääks vaid deletsioonilookus, viisin saadud kointegraatidesse I-SceI nukleaasi kodeeriva pSW(I-SceI) plasmidi. I-SceI nukleaas lõikab kromosoomi inserteerunud pSNW2_PP_3125enne3+pärast2 plasmidi spetsiifilist järjestust ning toimub taas homoloogiline rekombinatsioon, mille tulemusena, kas taastub metsiklookus või tekib deletsioonilookus. Nukleaasi indutseerimiseks kasvasin rakke üleöö meta-toluuaadi (lõppkonstratsioon 750 μ M) juuresolekul ning plaatisin Km-LB tardsöötmele. Saadud kloonide hulgast selekteerisin sinises valguses mittehendavad kloonid (plasmidist kaasa tulnud GFP on välja rekombineerunud) ning deletsiooni olemasolu kontrollisin PCR-iga kasutades primereid PP_3125BHI ja PP_3125EcoRI. pSW plasmidist vabanemiseks passeerisin deletsioonitüvesid edasi viis korda ning plasmidi puudumist kontrollisin paralleelkülviga LB ja Bp tassidele. Lisaks kontrollisin *P. putida* profaagi P1 esinemist PCR-ga (praimerid 5636_Kpn ja 3920XbaI, lisa 2) ning edasiste katsete jaoks kasutasin kloone, millel P1 profaag on endiselt genoomis alles. Tulemuseks sain *P. putida* deletsioonitüve Δ 3125 ning topeltdeletsioonitüve $\Delta\Delta$.

2.2.12 *PP_3125* geeni komplementatsioonitüve konstrueerimine

PP_3125 geeni viimiseks *P. putida* topeltdelatsioonitüve $\Delta\Delta$ kromosoomi kasutasin mini-Tn7 süsteemil põhinevat meetodikat (Koch jt., 2001). Esmalt tekitasin PCR-i produkti *PP_3124* geenist (praimereid *PP_3125algHII* ning *PP_3125_loppSalI*, lisa 2) ning kloneerisin PCR-i produkti pBluescript KS + T-track vektorisse. Sain vahevektori KS/*PP_3125*, milles oleva *PP_3125* geeni amplifitseerisin PCR-ga, kasutades praimereid Forward ja Reverse (lisa 2), ning sekveneerisin. KS/*PP_3125* vektorist kloneerisin *PP_3125* geeni *HindIII* - *SalI* restriksioonifragmendina samade restriktasidega avatud pSEVA*lacItac* (Km^R) vektorisse *lacItac* kontrolli alla (sain vektori pSEVA*lacItacPP_3125*). Seejärel, kasutades *NotI* restriktasi, kloneerisin *PP_3125* geeni koos *lacI* ja *tac*-promootoriga *NotI*-ga avatud pGP704LTn7 (Gm^R) vektorisse. Saadud konstrukti viisin elektroporatsiooni teel *E. coli* CC118 λ pir pREP4 plasmidi sisaldavasse tüvesse. pREP4 sisaldab lisa *LacI* repressori geeni, et takistada *tac*-promootori lekkimist ning välistada *PP_3125* geeni ekspressioon *E. coli* rakkudes. Ilma pREP4 plasmiidita ei õnnestunud saada pGP704LTn7*lacItacPP_3125* plasmidi kandvaid kloone. Konstrukti korrektsust kontrollisin PCR-ga ja sekveneerimisega (praimerid *Prtac* ja *PP_3125loppSalI*).

pGP704LTn7*lacItacPP_3125* plasmidi elektroporeerisin koos puxBF13 helperplasmiidiga (sisaldab Tn7 *tnpA-d*) KT2440 $\Delta\Delta$ tüve (puudu nii *crcB* kui ka *PP_3125* geenid) rakkudesse, kasvasin transpositsiooni toimumiseks 4 tundi LB vedelsöötmes ning plaatisin seejärel Gm sisaldavatele LB tassidele (mini-Tn7 sisaldab Gm resistentsusgeeni). Mini-Tn7 koosseisus oleva *lacItac-PP_3125* geenikasseti genoomi inserteerumist kontrollisin esmalt 5 mM NaF-i mittetalumise fenotüübi järgi ning seejärel ka PCR-i meetodil praimeritega Tn7GlmS ja *PP_3125algHIII*. Tulemuseks sain tüve $\Delta\Delta$ -*tac3125*. Kui tüve kasvusöötmesse lisada IPTG-d, on võimalik aktiveerida *tac*-promootor ning toimub *PP_3125* geeni ekspressioon. Kõrgemate IPTG kontsentratsioonidega on võimalik tekitada geeni üleekspressioon (näiteks 0,5 mM IPTG lisamisel toimub geeni tugev üleekspressioon).

2.2.13 NaF tundlikkuse testimine

Selleks, et testida uuritavate tüvede tundlikkust NaF-le, viisin läbi nn täpikatsed. Selleks kasvasin uuritavaid tüvesid üleöö LB vedelsöötmes loksutil (180 rpm). Järgmisel päeval tegin LB vedelsöötmesse rakukultuuri lahjendused ja pipeteerisin 5 µl suurused tilgad 0,5-40 mM NaF-i kontsentratsioonide sisaldavatele LB tassidele. Komplementatsioonitüve $\Delta\Delta$ -tac3125 uurimisel kasvasin tüve üleöö, kas 0,5 mM IPTG juuresolekul (toimub *PP_3125* geeni tugev üleekspressioon) või ilma, ning täpikatses kasutasin ilma IPTG-ta või 0,5 mM IPTG-d sisaldavaid NaF-LB tasse. Kontrolliks tegin samadest lahjendustest tilkkülvid ka ilma NaF-ta LB tardsöötmele. Bakteritüvede kasvu hindasin 24 tunni möödudes.

2.2.14 *P. putida* kasvukiiruste määramine

P. putida tüvede kasvukiiruste mõõtmiseks, nii NaF-i juuresolekul kui ilma, kasvasin kõiki uuritavaid *P. putida* tüvesid (metsiktüvi, Δ crcB, Δ 3125, $\Delta\Delta$, $\Delta\Delta$ -tac3125) üleöö LB vedelsöötmes (loksutil, 180 rpm) ilma antibiootikumi juuresolekuta. Hommikul, pärast 18 tunni möödumist, lahjendasin bakterikultuurid värskesse LB vedelsöötmesse nii, et kultuuri lõplik tihedus 580 nm juures oleks 0,05. *PP_3125* geeni komplementatsioonitüve $\Delta\Delta$ -tac3125 kasvasin 0,01 mM IPTG juuresolekul ja ilma. *tac*-promootori induktsiooniks sobiva IPTG koguse tegin kindlaks varasemate katsete käigus (kõrgem IPTG kontsentratsioon pärssis rakkude kasvama hakkamist). Igale uuritavale bakteritüvele lisasin NaF-i lõppkontsentratsioonidega 0 mM, 0,5 mM, 1,5 mM või 2,5 mM. Bakteritüvesid kasvasin mikrotiiterplaadil 100 µl LB vedelsöötmes loksutil (180 rpm) 48h 30 °C juures ning kultuuri optilise tiheduse (OD) mõõtsin lainepikkusel 580 nm, mõõtmine toimus automaatselt iga 20 minuti tagant. Katse läbiviimiseks kasutasin spektrofotomeetrit *POLARstar Omega*. Kasvukõverate analüüsil tegin statistika Python programmeerimiskeele *pandas* statistikaraamatukoguga ning koostasid kasvukõvera joonised kasutades programmi Microsoft Excel 2010.

2.2.15 *P. putida* Δ crcB tüve spontaansete NaF-i tolerantsete kolooniate isoleerimine ja ettevalmistamine kogu genoomi sekveneerimiseks

NaF-i tolerantsete mutantide isoleerimiseks kasvasin Δ crcB tüve üleöö LB vedelsöötmes loksutil (180 rpm) ning järgmisel päeval, umbes 18 tunni möödudes, plaatisin 500 μ l üleöö kultuuri seitsmele 10 mM NaF-LB tassile. Kahele 10 mM NaF-LB tassile plaatisin 250 μ l üleöö kultuuri. Tasse inkubeerisin 30 kraadi juures. Järgmiseks päevaks oli tassidele kokku tekkinud paarkümmend Δ crcB NaF-i tolerantset mutanti (NaF⁺), millest valisin edasiseks analüüsiks üheksa. Katsesse kaasasin ka viis varasemalt isoleeritud NaF⁺ mutanti. Kõigepealt kontrollisin, kas isoleeritud mutandid on *crcB* geeni suhtes deletsioonitüved või metsiktüved. Selleks kasutasin primereid *crcB*1 ja *crcB*parast. Seejärel üritasin amplifitseerida *PP_3125* geeni piirkonda, et uurida, kas *PP_3125* geen on intaktne või on seal toimunud mutatsioonid. Selleks kasutasin erinevaid primereid, mis seonduvad antud geenile ning selle eelnevale ja järgnevale genoomsele alale (joonis 10b ning lisa 2). Valisin välja kaks meie laboris varasemalt isoleeritud Δ crcB NaF⁺ mutanti ning kaks enda poolt isoleeritud mutanti, millest eraldas genoomse DNA, kasutades *Thermo scientific*-u *GeneJET Genomic DNA purification kit*-i, järgides tootja protokollit. Saadud DNA-dele teostati Eesti Biokeskuse tuumiklabori poolt teenusena kogu genoomi sekveneerimine. Sekveneerimisest saadud andmed analüüsis meie laborist Tanel Ilmjärv.

2.3 Tulemused

2.3.1 *Pseudomonas putida* NaF-i talumist mõjutavate geenide otsimine genoomset raamatukogust

Selleks, et tuvastada geenid, mis lisaks fluoriidi transporteri *crcB* geenile mõjutavad *P. putida* rakkudes fluoriidi talumist, kasutasin *P. putida* genoomset raamatukogu. Genoomsete raamatukoguplasmiididega komplementeerisin *P. putida* Δ *crcB* rakke, et leida geenid, mis taastavad Δ *crcB* tüve kasvu fluoriidi sisaldavatel tassidel. Töös kasutasin p9TTpheAgusA plasmidi baasil loodud genoomset raamatukogu, mis sisaldas eri pikkusega lõike *P. putida* genoomist. 17% plasmiididest ei sisaldanud ühtegi lõiku, 40% sisaldasid 1 kiloaluspaari pikkust insersiooni, 23% 2 kiloaluspaari pikkust lõiku ja 17% üle 3 kiloaluspaari pikkust lõiku (Kivistik jt., 2006). Genoomseid raamatukoguplasmiide sisaldavaid *P. putida* Δ *crcB* rakke selekteerisin esmalt plasmiidilt kodeeritud antibiootikumiresistentsuse alusel bensüülpenitsilliini sisaldavatel LB tassidel ning järgneval päeval tegin Bp-LB tassidel kasvavatest kolooniatest tempelkülvi 15 mM NaF-LB tassidele.

Kokku analüüsisin ~ 60 000 raamatukoguplasmiidiga *P. putida* Δ *crcB* kolooniat neljast bioloogiliselt sõltumatust katsest, millest huvipakkuvaid 15 mM NaF-i taluvaid kloone sain kokku umbes 130. Esimesest kolmest 15 mM NaF-i taluvatest *P. putida* Δ *crcB* kloonidest eraldasid raamatukoguplasmiidide DNA ning plasmiidis paiknev genoomne lõigu sekveneerisin. Selgus, et kõik sekveneeritud raamatukoguplasmiidid sisaldasid *crcB* geeni. Edaspidi kontrollisin tekkinud NaF-i taluvaid kolooniaid *crcB* geenile eelnevale ning järgnevale alale seonduvate praimeritega *crcB1* ja *crcB2*, et teha juba enne sekveneerimist kindlaks *crcB* lookust sisaldavad raamatukoguplasmiidid. Ka kõik ülejäänud (umbkaudu 127) huvipakkuvad raamatukoguplasmiididega Δ *crcB* kloonid andsid PCR-i tulemusena *crcB* geeni spetsiifilise produkti. Kuna kõik uuritud raamatukoguplasmiidid sisaldasid *crcB* geeni, võib järeldada, et *P. putida* NaF-i taluvuses mängib olulist rolli CrcB transporter.

2.3.2 *P. putida* fluoriiditolerantsust mõjutavate geenide tuvastamine transposoonmutageneesiga

Järgnevalt kasutasin *P. putida* NaF-i taluvust mõjutavate geenide leidmiseks transposoonmutageneesi meetodikat. NaF-i tundlikule *P. putida* Δ crcB tüvele teostas transposoonmutageneesi kanamütsiini (Km) resistentsust kandva minitransposooniga Tn5lacItac. Selles minitransposoonis on transposoonist väljapoole suunatud *tac*-promootor, *tac*-promootori aktiveerimisel toimub geeniekspressioon minitransposooniga külgnevalt alalt. Antud meetodika võimaldas leida nii gene, mille katkestusel taastus Δ crcB võime kasvada NaF-i sisaldaval söötmel, kui ka gene, mille puhul oli huvipakkuva fenotüübi jaoks vajalik geeni üleekspressioon. Minitransposooni sisaldavad kolooniad selekteerisin esmalt Km-i sisaldaval glükoos-minimaal tardsöötmel ning külvasin tempelkülvi kasutades edasi 15 mM NaF-LB tardsöötmel.

Kokku teostas kolm sõltumatut katset ning kolme katse peale analüüsisin umbkaudu 141 000 transposoonmutanti. 15 mM NaF-i talusid kokku 48 transposoonmutanti, millest 24-l mutandil õnnestus ARB-PCR-ga kindlaks teha minitransposooni asukoht genoomis (kõigi 24 mutandi ülevaade koos transposooni sisenemiskohtadega on toodud lisas 3). Tabelis 1 on toodud ülevaade geenidest, kuhu sisenenud minitransposoon taastas KT2440 Δ crcB tüve 15 mM NaF-i taluvuse. Mutandid, mille sisenemiskoht oli identne ning mis olid pärit samast katsest, läksid arvesse ühe sisenemisena antud geeni. Kokku oli selliseid mutante kaheksa, mistõttu tabelis 1 on näidatud 21 transposooni sisenemiskohta.

Tabel 1. Minitransposooni asukoht transposoonmutandi genoomis.

Geen	Esinemise arv katses kordades
Cro/CI transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	16
glutationüülhüdrokinooni reduktaas <i>gqr</i> (<i>PP_3998</i>)	1
RHS perekonna valk <i>tke4</i> (<i>PP_4085</i>)	1
<i>rhs</i> -laadne valk Tke2 (<i>PP_3108</i>)	1
Transkriptsiooni regulator (<i>PP_2550</i>)	1
Hüpoteetiline valk (<i>PP_0788</i>)	1

Katses tuli välja geen *PP_3125*, kuhu minitransposoon oli sisenenud 16-nel sõltumatul korral. Ülejäänud geenidesse oli minitransposoon sisenenud ühel korral. Kuna *PP_3125* geeni oli minitransposoon sisenenud eri asukohtadesse ning erinevat pidi (lisa 3), siis järeldasin, et efekt NaF-i taluvusele tuleneb *PP_3125* geeni katkestusest, mitte kõrvalasuvate geenide üleekspressioonist minitransposoonis sisalduva *tac*-promootori poolt.

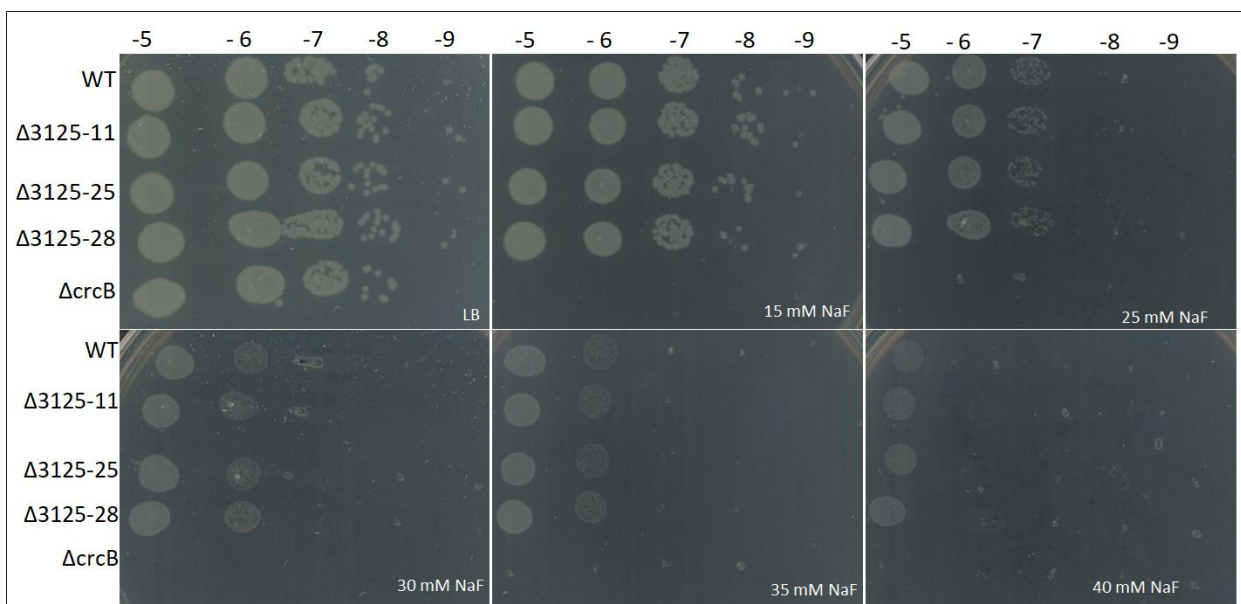
2.3.3 *PP_3125* geeni seos *P. putida* NaF-i taluvusega

Edasistes uuringutes keskendusin *PP_3125* geenile. Tegu on 543 aluspaari pikkuse geeniga, mis kodeerib Cro/CI transkriptsiooniregulaatorite perekonda liigitatud valku. Selleks, et kontrollida transposoonmutageneesiga leitud *PP_3125* geeni osalust *P. putida* NaF-i taluvuses, konstrueerisin nii *P. putida* algtüvest kui ka Δ *crcB* tüvest *PP_3125* deletsioonitüved (vastavalt Δ 3125 ja $\Delta\Delta$). Lisaks konstrueerisin *crcB* ja *PP_3125* topeltdelletsioonitüvest $\Delta\Delta$ komplementatsioonitüve, kus $\Delta\Delta$ tüve genoomi viisin Tn7 abil *lacI* ja *tac* promootori kontrolli all olev *PP_3125* geeni. Saadud tüvedel hindasin NaF-i tundlikkust tilkkülvi meetodil erineva kontsentratsiooniga NaF-i sisaldavatel LB tardsöötmetel.

2.3.3.1 *PP_3125* geeni deletsiooni mõju *P. putida* KT2440 metsiktüvele

PP_3125 puudumise mõju hindasin nii *P. putida* metsiktüves kui Δ *crcB* tüves. Esmalt võrdlesin *P. putida* metsiktüvest kolme sõltumatutult saadud Δ 3125 tüve (Δ 3125- 11, Δ 3125- 25 ja Δ 3125- 28) kasvu NaF-i juuresolekul.

Joonisel 6 on näha, et Δ *crcB* tüvel puudub kasv 15 mM NaF-i sisaldaval LB söötmel, kuid kõigi kolme sõltumatu Δ 3125 tüve NaF-i taluvus on võrreldav *P. putida* KT2440 metsiktüvega. Nii metsiktüvi kui ka Δ 3125 tüved suudavad kasvada 15 mM NaF-i sisaldaval tardsöötmel, alates 25 mM NaF-i lõppkontsentratsioonist on tüvede kasv võrdselt häiritud. Kuna kõik sõltumatud Δ 3125 tüved käitusid võrreldes metsiktüvega ühtemoodi, kasutasin edasistes katsetes tüve Δ 3125-11, mida nimetan lihtsuse huvides kui Δ 3125.



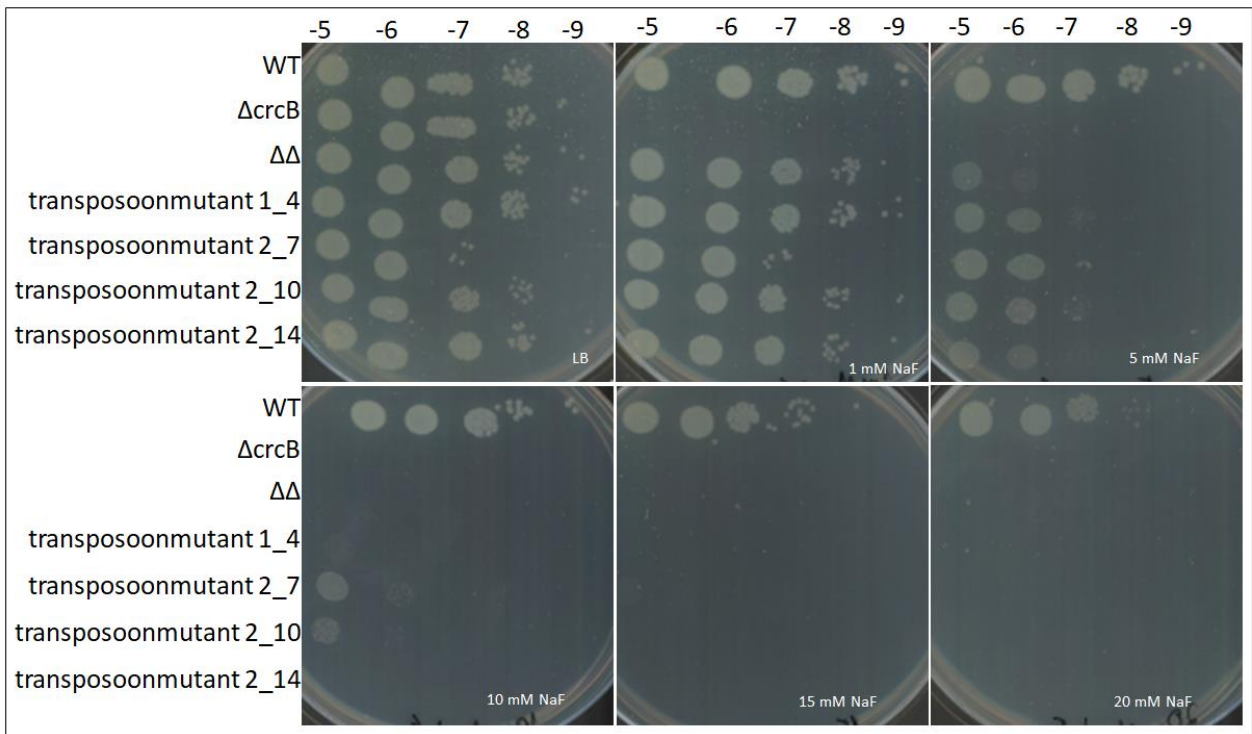
Joonis 6. NaF-i taluvus *P. putida* $\Delta 3125$ sõltumatutel deletsioonitüvedel. WT tähistab *P. putida* metsiktüve KT2440 ja $\Delta 3125$ -11, $\Delta 3125$ -25 ning $\Delta 3125$ -28 on *PP_3125* sõltumatud deletsioonitüved, $\Delta crcB$ on *crcB* deletsioonitüvi. Numbrid joonise kohal on lahjenduskordajad, NaF-i lõppkontsentratsioon LB tardsöötmes on märgitud iga pildi all paremas nurgas. Tassid pildistasin pärast 24 tunni möödumist.

2.3.3.2 Transposoonmutantide võrdlus topeltdeletsioonitüvega $\Delta\Delta$

Kuna minitransposoon oli sisenenud *PP_3125* geeni erinevatesse positsioonidesse erinevates orientatsioonides, siis järelikult võiks transposoonmutageneesist leitud *PP_3125* geeni transposoonmutantide ja konstrueeritud $\Delta\Delta$ tüve (*crcB* ja *PP_3125* geenide topeltdeletsioon) NaF-i taluvus olla sarnane. Edasi võrdlesingi omavahel *P. putida* metsiktüve, $\Delta crcB$ tüve, $\Delta\Delta$ tüve ning nelja transposoonmutandi (transposoonmutantide kirjeldused on toodud lisas 3) kasvu erinevate NaF-i kontsentratsiooniga (1-20 mM) LB tassidel.

Joonisel 7 on näha, et $\Delta\Delta$ tüve NaF-i taluvus on võrreldav transposoonmutandiga 2_14, kuna mõlemal tüvel 5 mM NaF-i kontsentratsiooni juures kasv rohkem häiritud kui teistel transposoonmutantidel. Transposoonmutantidel 1_4, 2_7 ja 2_10 on näha kasvu ka 10 mM NaF-i kontsentratsiooni juures ning transposoonmutandil 2_7 on näha õrn kasv ka 15 mM NaF-i kontsentratsiooni juures. Seega, transposoonmutandid ja $\Delta\Delta$ tüvi käituvad NaF-i juuresolekul üsna sarnaselt ning erinevad tunduvalt metskitüvest ja $\Delta crcB$ tüvest.

$\Delta\Delta$ tüve ning transposoonmutantide võrdlus kinnitab, et transposoonmutageneesi katsest leitud geeni *PP_3125* puudumine mõjutab *P. putida* NaF-i taluvust.



Joonis 7. NaF-i taluvus *P. putida* metsiktüvel Δ crcB tüvel ja transposoonmutantidel. WT tähistab *P. putida* KT2440 metsiktüve, Δ crcB on *crcB* deletsioonitüvi, $\Delta\Delta$ *crcB* ja *PP_3125* topeltdeletsioonitüvi. Transposoonmutandid on tähistatud katse numbriga ja kloori numbriga ning kirjeldatud lisas 3. Numbrid joonise kohal on lahjenduskordajad, NaF-i lõppkontsentratsioon LB tardsöötmes on märgitud iga pildi all paremas nurgas. Tassid pildistasin pärast 24 tunni möödumist.

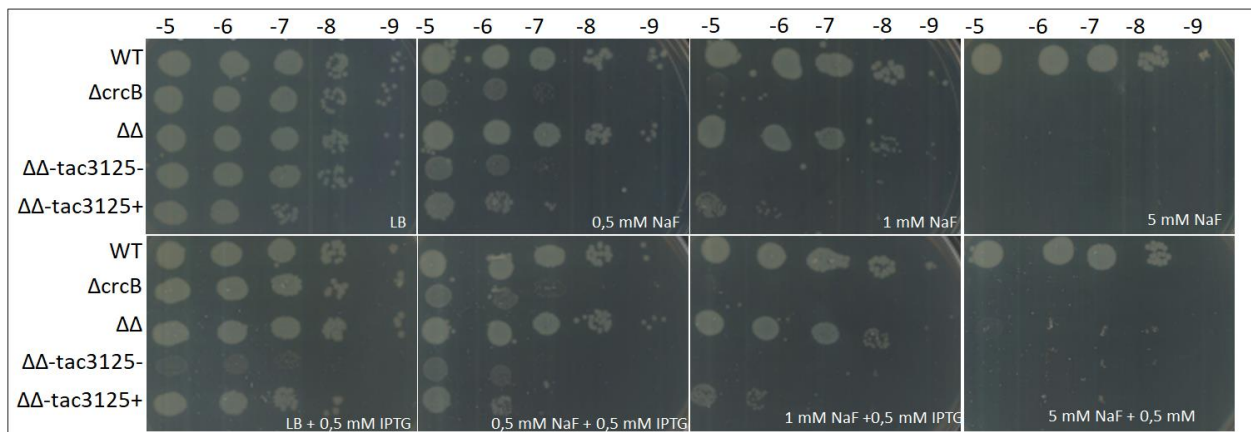
2.3.3.3 *PP_3125* geeni üleekspressiooni mõju $\Delta\Delta$ tüvele

Selleks, et veelkord kinnitada *PP_3125* geeni osalust *P. putida* fluoriidi taluvuses ning hinnata geeni üleekspressiooni mõju *P. putida* rakkudele, konstrueerisin lisaks topeltdeletsioonitüvele ka komplementatsioonitüve $\Delta\Delta$ -tac3125. $\Delta\Delta$ -tac3125 tüves on genomist deleteeritud *crcB* ja *PP_3125* geenid, kuid *PP_3125* geen on viidud tagasi kromosoomi Tn7-ga ning on LacI repressori ning indutseeritava *tac*-promootori kontrolli all. Kui kasvusöötmesse lisada 0,5 mM IPTG-d, toimub *PP_3125* geeni üleekspressioon.

Jooniselt 8 esitatud tulemustest on näha, et võrreldes metsiktüvega on Δ crcB tüve kasv häiritud juba 0,5 mM NaF-i juuresolekul. 1 mM kontsentratsiooni juures on näha õrna kasvu vaid -5 lahjenduses ning 5 mM NaF-i kontsentratsiooni puhul Δ crcB tüve kasv puudub. Lisaks on joonisel 8 näha, et *PP_3125* geeni deleteerimine Δ crcB tüve genomist taastab osaliselt NaF-i taluvust, kuid ei tõsta metsiktüve NaF-i taluvusega samale tasemele. $\Delta\Delta$ tüvi suudab kasvada 1 mM NaF-ga tardsöötmel, kuid 5 mM NaF-i juuresolekul enam mitte (joonis 8). Seega, *PP_3125*

geeni puudumine taastab osaliselt Δ crcB tüve NaF-i taluvust, kuid ei kompenseeri täielikult fluoriidi transporterit CrcB puudumist.

PP_3125 geeni komplementatsioonitüve $\Delta\Delta$ -tac3125 kasvatamisel IPTG juuresolekul ja ilma ilmnesevad erinevad efektid nii rakkude kasvule kui NaF-i tolerantsusele. Joonisel 8 (ülemine rida) on näha, et üleöö ilma IPTG induktsioonita kasvanud $\Delta\Delta$ -tac3125 tüvi on võrreldav Δ crcB tüvega. Seega, ilma *tac*-promootori indutseerimiseta *PP_3125* geeni olemasolu taastab tüve NaF-i tundlikkuse nii, nagu see on Δ crcB tüvel. Samas on näha, et $\Delta\Delta$ -tac3125 tüve kasv tilkkülvides on pärssitud 0,5 mM IPTG-ga LB tassidel (joonis 8, alumine rida), mis viitab, et rakud ei talu *PP_3125* üleekspressiooni. Kui $\Delta\Delta$ -tac3125 tüvi on üleöö kasvanud 0,5 mM IPTG juuresolekul, on juba LB tassil rakke, võrreldes teiste tüvedega, vähem, kuid rakud taluvad NaF-i paremini kui Δ crcB ja $\Delta\Delta$ -tac3125 tüvi, millel *tac*-promootorit ei olnud indutseeritud. Seega, 0,5 mM IPTG lõppkontsentratsioon tagab *tac*-promootori järel oleva *PP_3125* geeni tugeva üleekspressiooni, mis mõjub rakkude kasvule pärssivalt. See võimaldab NaF-i tolerantsemate rakkude tekke, mille tõttu $\Delta\Delta$ -tac3125 tüvi ei käitu sarnaselt mitte Δ crcB tüvega, vaid hoopis $\Delta\Delta$ tüvega. Selleks, et vältida *PP_3125* geeni tugevast üleekspressioonist tingitud efekte, kasutasin järgnevas katsetes *PP_3125* geeni indutseerimiseks 0,01 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG-d.



Joonis 8. *PP_3125* geeni mõju *P. putida* NaF-i taluvusele. WT tähistab *P. putida* metsiktüve KT2440; Δ crcB on *crcB* deletsioonitüvi, $\Delta\Delta$ *crcB* ja *PP_3125* topeltdeletsioonitüvi. $\Delta\Delta$ -tac3125 on *PP_3125* komplementatsioonitüvi, mida kasvasin *tac*-promootorit indutseeriva 0,5 mM IPTG juuresolekul ($\Delta\Delta$ -tac3125+) ja ilma ($\Delta\Delta$ -tac3125-). Numbrid joonise üleval on lahjenduskordajad, NaF-i kontsentratsioon on märgitud iga pildi all paremas nurgas. Alumisel real on LB tardsöötmele lisatud lisaks NaF-ile ka 0,5 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG-d. Tassid on pildistatud pärast 24 tunni möödumist.

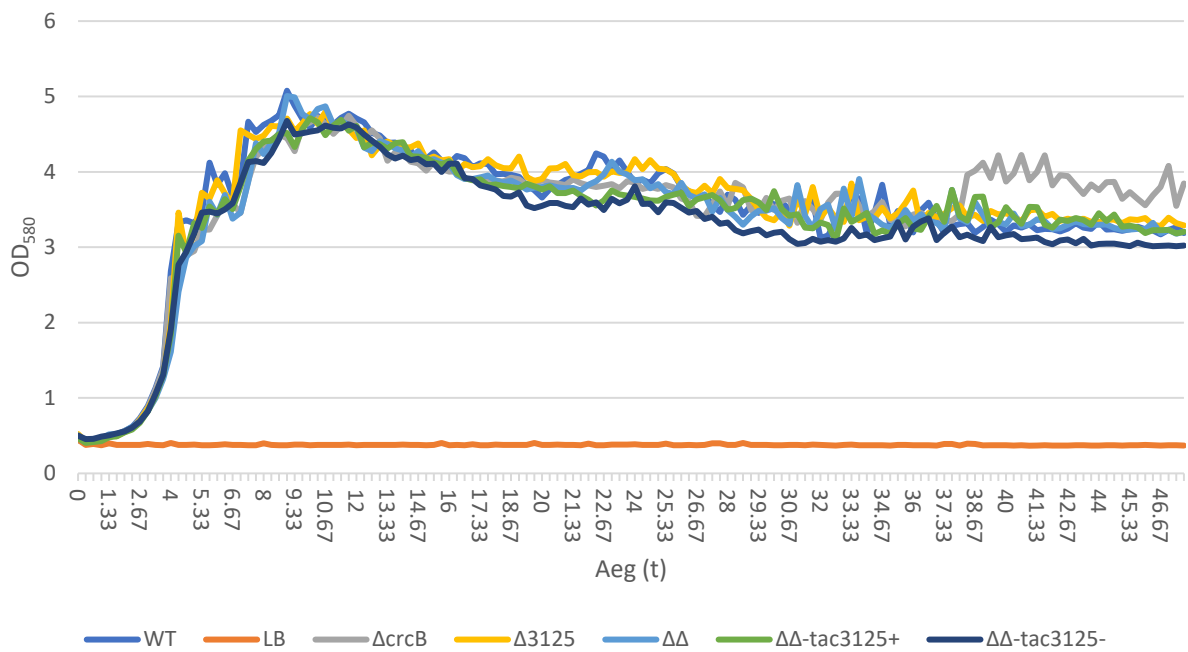
2.3.4 *P. putida* metsiktüve, Δ crcB, Δ 3125, $\Delta\Delta$ ja $\Delta\Delta$ -tac3125 tüvede kasvukiiruste võrdlus NaF-i juuresolekul ja ilma

Selleks, et saada täpsem ülevaade töös konstrueeritud erinevate *P. putida* tüvede kasvukiirustest NaF-i sisaldavas söötmes, mõõtsin bakterikultuuride kasvutihedust 48 tunni jooksul erinevate NaF-i kontsentratsioonide juuresolekul. Bakterikultuuride OD-d mõõtsin 580 nm juures ning mõõtmise toimus automaatselt iga 20 minuti tagant. Joonisel 9 on esitatud kolme tehnilise paralleeli keskmised OD-d koos standardhälbega.

Joonisel 9a on näha, et kui ilma NaF-ta on kõigi tüvede kasvukiirused võrreldavad, siis juba 0,5 mM NaF-i kontsentratsioon pärsib Δ crcB, $\Delta\Delta$ -tac3125+ ja $\Delta\Delta$ -tac3125- tüvede kasvu (joonis 9b, kasvama hakkavad alles pärast seitsmendat inkubatsioonitundi). 1,5 mM NaF kontsentratsiooni korral (joonis 9c) on tüvede Δ crcB, $\Delta\Delta$ -tac3125+ ja $\Delta\Delta$ -tac3125- lag-faas veelgi pikenenud. Kõige aeglasemalt hakkab kasvama Δ crcB, kasv tekib alles pärast 19 tunni möödumist. Tüvel $\Delta\Delta$ -tac3125+ tekib kasv pärast 15 tunni möödumist. Aeglustunud on ka $\Delta\Delta$ tüve kasv, tüvi hakkab kasvama umbes 2 tundi hiljem kui metsiktüvi ja Δ 3125. Joonisel 9d on näha, et 2,5 mM NaF-i juuresolekul hakkab tüvi $\Delta\Delta$ kasvama kuus tundi hiljem kui KT ja Δ 3125. Tüvi $\Delta\Delta$ -tac3125- hakkab kasvama 16 tundi hiljem kui metsiktüvi, Δ crcB 28 tundi hiljem ning $\Delta\Delta$ -tac3125+ 38 tundi hiljem.

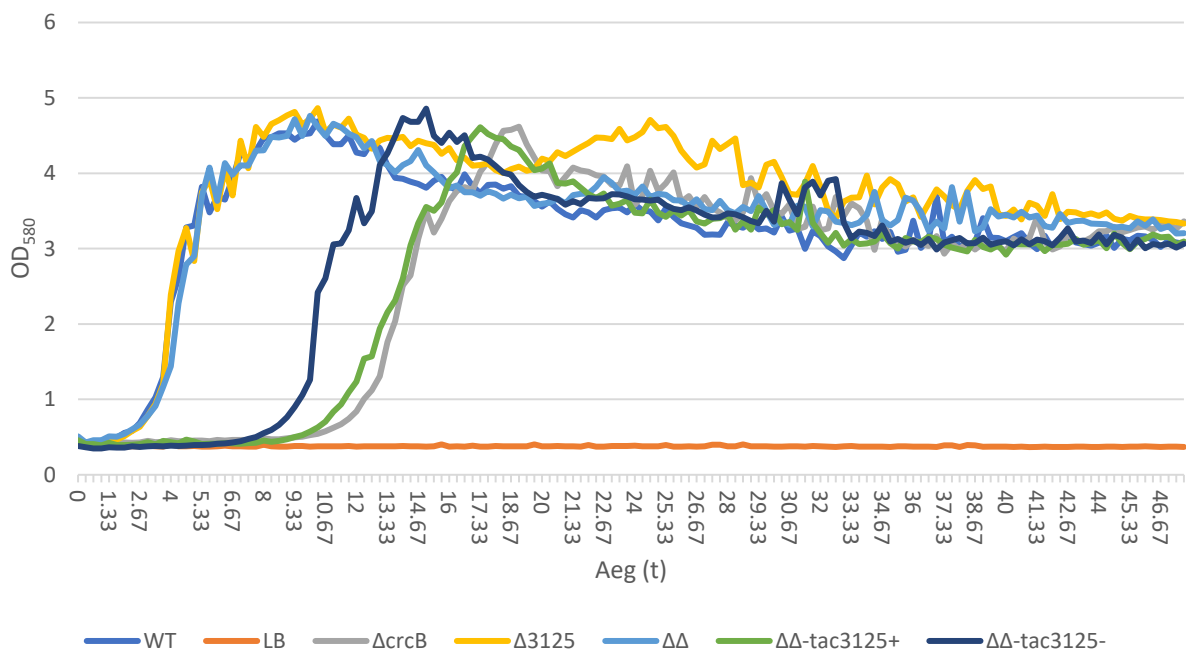
(a)

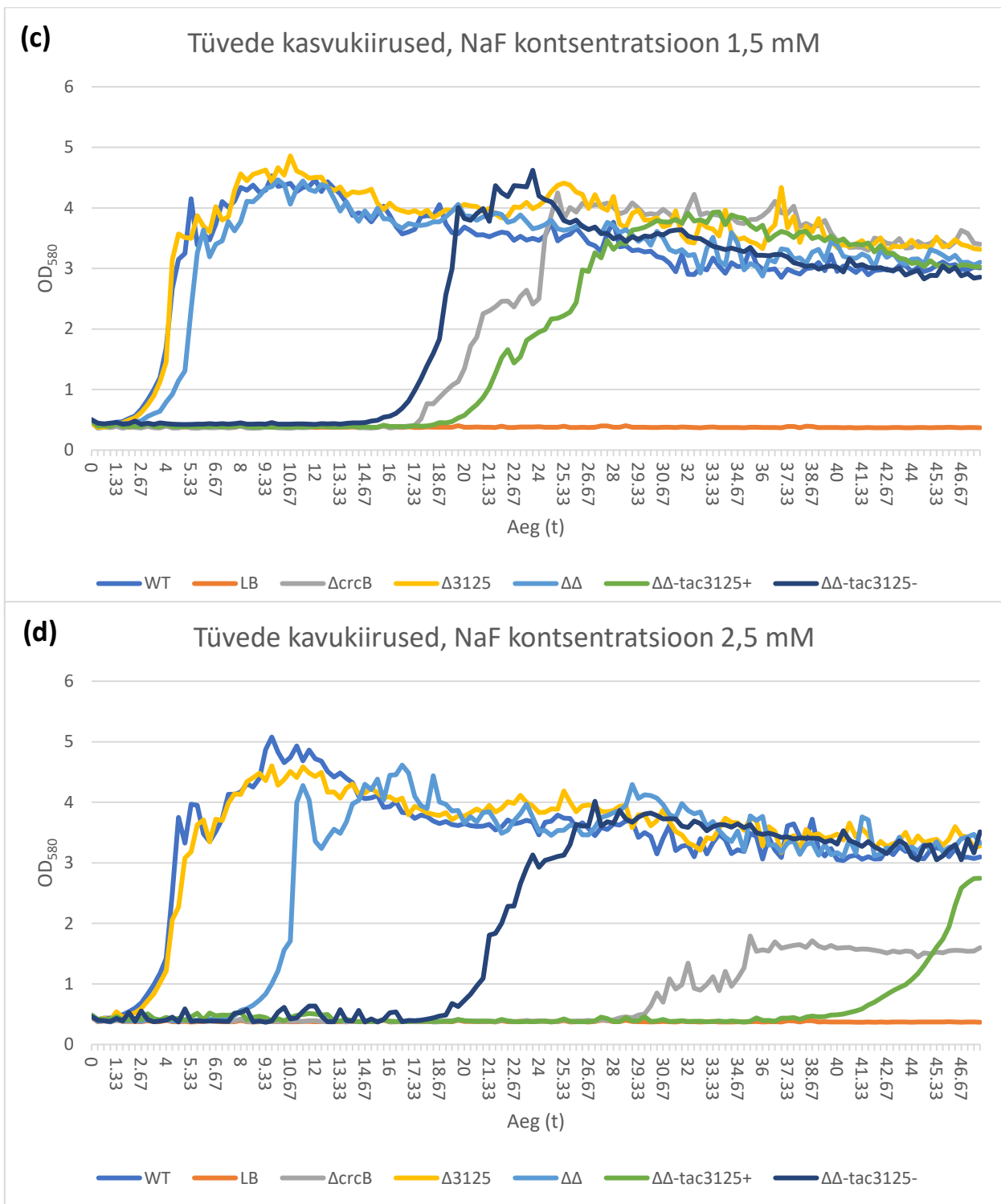
Tüvede kasvukiirused, NaF kontsentratsioon 0 mM



(b)

Tüvede kasvukiirused, NaF kontsentratsioon 0,5 mM





Joonis 9. *P. putida* metsiktüve, $\Delta crcB$, $\Delta 3125$, $\Delta\Delta$ ja $\Delta\Delta-tac3125$ kasv erinevatel NaF-i kontsentratsioonidel. LB tähistab LB vedelsöötme optilist tihedust. + ja – $\Delta\Delta-tac3125$ tüve järel tähistab vastavalt 0,01 mM IPTG juuresolekul kasvanud tüve ja ilma IPTG-ta kasvanud tüve. Joonisel on esitatud kolme tehnilise paralleeli keskmine optiline tihedus koos standardhällbega. (a) tüvede kasvukiirused LB vedelsöötmes (b) NaF-i lõppkontsentratsioon LB vedelsöötmes on 0,5 mM; (c) NaF-i lõppkontsentratsioon LB vedelsöötmes on 1,5 mM; (d) NaF-i lõppkontsentratsioon LB vedelsöötmes on 2,5 mM.

NaF juuresolekul kasvukiiruste võrdlemine kinnitab veelkord, et *PP_3125* geeni puudumine parandab Δ crcB tüve NaF-i taluvust. Lisaks näen, et $\Delta\Delta$ -tac3125 tüve rakkudele on 0,01 mM IPTG lõppkontsentratsioon sobiv *tac*-promootorilt lähtuva *PP_3125* geeni transkriptsiooni initsiatsiooniks, kuna sel kontsentratsioonil pole näha *PP_3125* geeni üleekspressioonist tingitud rakkude kasvu pidurdumist. Joonisel 9d on lõpus näha väga suuri veapiire, mis võivad tuleneda sellest, et Δ crcB tüves tekivad NaF-i juuresolekul spontaansed NaF-i taluvad rakud ning selliste mutantide teke erinevates tehnilistes paralleelides on juhuslik ja toimub erineval ajahetkel. Ka $\Delta\Delta$ -tac3125 tüvedes võivad toimuda kõrgema NaF-i kontsentratsiooni juures samalaadsed muutused ning seetõttu on näha suuri veapiire.

2.3.5 *P. putida* Δ crcB tüve spontaansete NaF-i tolerantsete kolooniade isoleerimine ja analüüs

Varasemalt oli meie laboris nähtud, et Δ crcB tüve kasvatamisel NaF-i sisaldaval söötmel tekivad spontaansed NaF-i taluvad Δ crcB mutandid (NaF⁺ mutandid). Selleks, et uurida, kas spontaanselt tekkivatel NaF⁺ mutantidel on *PP_3125* geen intaktne või on antud geenis funktsiooni rikkuvad mutatsioonid, isoleerisin spontaansed NaF-i taluvad Δ crcB mutandid, millele teostasin PCR-analüüsi. Kõigepealt kontrollisin *crcB* geeni lookust, et olla kindel, et tegu on *crcB* deletsioonitüve mutantidega ning seejärel testisin PCR-ga *PP_3125* geeni lookust. Katsesse kaasasin ka meie laboris varasemalt isoleeritud viis NaF⁺ Δ crcB mutanti, mis on joonistel 10a ja 10b tähistatud numbritega 1-5.

Joonisel 10a on näha, et bakteritüvedelt, kus on *crcB* geen olemas (WT LB, WT glyc, Δ 3125), tuleb 900 aluspaari pikkune PCR-i produkt ning *crcB* puudumisel ($\Delta\Delta$, Δ crcB) tuleb 500 aluspaari pikkune fragment. Kõigil spontaansete Δ crcB tüvede NaF-i tolerantsetel kloonidel, v.a. kloon nr 6, tuleb *crcB* deletsiooni kinnitav 500 aluspaarine fragment. Klooni nr 6 puhul on tegu *crcB* geeni suhtes metsiktüvega ja seega tuleb NaF-i talumine CrcB transporteri olemasolust. Joonisel 10b on näha, et *PP_3125* geeni spetsiifiline u 500 aluspaari pikkune PCR-i produkt tuleb bakteritüvedelt, millel on *PP_3125* geen genoomis olemas (WT LB, WT glc; Δ crcB). Tüvedelt, millel puudub *PP_3125* ($\Delta\Delta$, Δ 3125), PCR-i produkti saada ei õnnestu. Spontaansetest Δ crcB tüve NaF-i tolerantsetest kloonidest õnnestus saada *PP_3125* geeni spetsiifiline PCR-i produkt vaid klooni nr 6, mis on joonise 10a järgi *crcB* lookuse suhtes metsiktüvi ning antud klooni NaF taluvus tulenes CrcB pumba olemasolust. PCR-i produkti NaF-i tolerantsete Δ crcB mutantide *PP_3125* geeni lookuselt üritasin saada erinevate praimerikombinatsioonidega (joonis 10c), kuid tulutult.

PP_3125 on oluline Δ crcB tüve NaF-i taluvuse tõstmisel ning eelnevates katsetes nägin, et *PP_3125* geeni puudumisel suureneb Δ crcB tüve NaF-i taluvus kuni 10 korda. Seega võib oletada, et ka looduslik mehhanism, mille läbi tekivad Δ crcB tüvest spontaansed NaF-i taluvad mutandid, hõlmab endas muutusi *PP_3125* geeni piirkonnas ning toimunud muutuste tõttu ei õnnestu ka saada PCR-i produkti antud geeni piirkonnast. Antud katsest valisin varasemalt eraldatud mutandid NaF⁺ Δ crcB1, NaF⁺ Δ crcB4 ning uued mutandid NaF⁺ Δ crcB7 ja NaF⁺ Δ crcB12 (joonisel 10 tähistatud numbritega 1, 4, 7 ja 12), millest eraldasin genoomse DNA ning millele teostati teenusena kogu genoomi sekveneerimine.

2.4 Arutelu

P. putida on mullabakter, mida on järjest enam uuritud kui võimalikku rakuvabrikut, mille abil toota laialdaselt kasutatavaid ühendeid keskkonna- ja energiasäästlikumal viisil. Üheks uueks suunaks on ka orgaaniliste fluoropolümeeride tootmine kasutades *P. putida*-t. Meie labor osaleb „Horisont 2020 programmi“ projektis SinFonia, mille eesmärgiks ongi konstrueerida *P. putida* KT2440 põhjal fluoropolümeere sünteesivad bakteritüved, lähtudes sünteetilise bioloogia võimalustest. Meie uurimisgrupi roll selles projektis on fluori ühendeid sünteesivate *P. putida* bakteritüvede geneetilise stabiilsuse jälgimine ja vajaduspõhine parendamine.

Meie labori varasemates katsetes *P. putida* fluoriidiooni transpordi CrcB deletsioonitüvega nähti, et antud tüves tekivad kõrge sagedusega NaF-i taluvad mutandid. CrcB on Fluc perekonda kuuluv transporter, mis transpordib rakust välja fluoriidioone (Baker jt., 2012). CrcB transpordi puudumisel ei suuda *P. putida* taluda juba 1 mM NaF-i kontsentratsiooni kasvusöötmes, samas kui metsiktüvi suudab kasvada isegi 30 mM NaF-i kontsentratsiooni juures ((Calero jt., 2020), käesoleva töö andmed). Kuna spontaansed NaF-i taluvad Δ crcB kloonid suutsid taluda Δ crcB tüvest tunduvalt suuremat NaF-i kontsentratsiooni (kuni 15 mM NaF-i lõppkontsentratsioon kasvusöötmes, avaldamata andmed) siis see viitas, et leidub veel teisigi mehhanisme *P. putida*-s, mis aitavad bakteril toime tulla fluoriidioonide kõrge kontsentratsiooniga. Selleks, et välja selgitada *P. putida* fluoriiditolerantsust mõjutavad geenid, kasutasin nii genoomse raamatukogu metoodikat kui ka transposoonmutageneesi.

Genoomse raamatukoguga *P. putida* NaF-i talumist mõjutavate geenide otsimiseks kasutasin *P. putida* KT2440 Δ crcB tüve, millel puudub genoomis fluoriidioonide transporter CrcB. Katsest selgus, et ainus geen, mis komplementeeris CrcB transpordi puudumist *P. putida* Δ crcB tüves, oli seesama transpordi geen *crcB*. Antud tulemus näitab, et CrcB transporter mängib olulist rolli *P. putida* võimes taluda fluoriidioonide kõrget kontsentratsiooni keskkonnas.

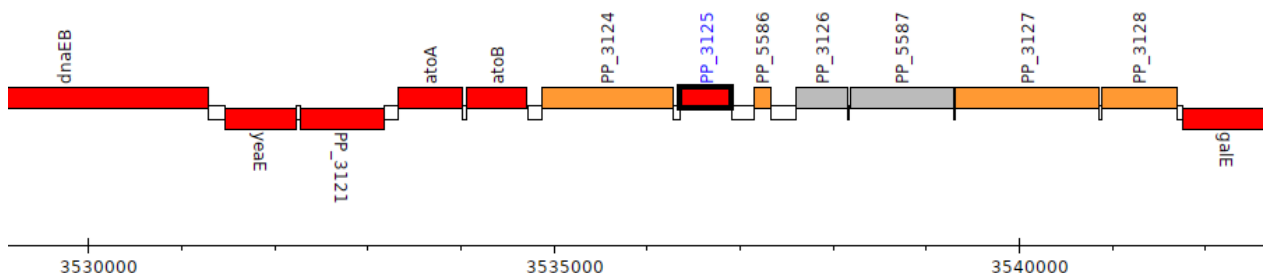
2.4.1 Cro/CI transkriptsiooniregulaator PP_3125 mõjutab *Pseudomonas putida* KT2440 Δ crcB tüve NaF-i taluvust

Genoomset raamatukogu kasutades on võimalik leida vaid gene, mille üleekspressioon uuritavat fenotüüpi mõjutab, samas pole võimalik leida gene, mille puhul mängib olulist rolli geeni inaktiveerimine. Järgmise metoodikana kasutasin *P. putida* NaF-i talumist mõjutavate geenide otsimiseks transposoonmutageneesi Tn5lacItac minitransposooniga. Antud Tn5 minitransposooni oli integreeritud ka *lacI* repressori geen ja *tac*-promootor. Kasutatud minitransposooni abil oli

võimalik uurida nii geene, mille puudumine aitab kaasa fluoriidi talumisele (kui transposoon siseneb geeni ning katkestab selle) kui ka geene, mille üleekspressioon aitab NaF-i talumisele kaasa (lisades söötmesse IPTG-d aktiveerus transposoonis paiknev *tac*-promootor ning toimus RNA süntees transposooniga külgnevalt alalt).

Tabelis 1 on näha, et kokku leidsin transposoonmutageneesiga *P. putida* Δ crcB tüvest kuus geeni, mille katkestus tõstis NaF-i taluvust. Kuuest geenist viis tulid katse käigus välja vaid ühel korral, kuid geen *PP_3125* kokku 16 sõltumatul korral. Sõltumatuks korraks lugesin igat erinevat transposooni sisenemispositsiooni antud geenis. Sõltumatute kordustena lugesin ka samasse positsiooni sisenenud transposoonid, kui mutandid leidsin katse erinevatest tehnilistest kordustest. Lisas 3 on näidatud kõik ARB-PCR-i käigus kindlaks tehtud transposooni sisenemiskohad.

PP_3125 on transkriptsiooniregulaator, mis kuulub Cro/CI transkriptsiooniregulaatorite perekonda (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q88I76>, viimati külastatud 05.05.2022). Antud perekonda kuuluvad DNA-ga seonduvad transkriptsiooni regulaatorid, milles esineb heeliks-pööre-heeliks motiiv. Cro/CI transkriptsiooniregulaatorid on saanud oma nime bakteriofaagis 434 pärineva repressori Cro ja faagist λ pärit repressori CI järgi (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR001387/>, viimati külastatud 05.05.2022). *PP_3125* transporteri sekundaarstruktuur on ennustatud järjestuse põhjal ning ei ole meetodiliselt kinnitatud. *PP_3125* geen on 543 aluspaari pikk ning kodeerib 180 aminohappe pikkust valku. *PP_3125* võib kuuluda ühte operoni geeniga *PP_3124*, kuna geenide vaheline ala on väga lühike (76 aluspaari, joonis 11). *PP_3124* kodeerib lühikeseahelaliste rasvhapete transporterit. Peale Cro/CI transkriptsiooniregulaatorite perekonda kuulumisele pole *PP_3125* transporteri funktsiooni kohta *P. putida*-s midagi teada.



Joonis 11. *PP_3125* geeni paiknemine *P. putida* KT2440 (TIGR) genoomis. Punasega on tähistatud tsütoplasmas paiknevad valgud, oranžiga membraanis paiknevad valgud ning halliga tähistatud valkude asukoht rakus on teadmata. Valged on geenidevahelised alad. *PP_3125* geen on ümbritsetud musta kastiga. Joonise all on näidatud genoomi mõõtkava nukleotiidides (<https://www.pseudomonas.com/feature/show?id=38827732>, viimati külastatud 14.05.2022).

Cro ja CI regulaatorid esinevad λ bakteriofaagides, kus CI hoiab faagi bakteri genoomis lüsogeenses tsükli ning CI puudumisel saab Cro aktiveerida lüütilise tsükli. Samas võib Cro regulaatorit esineda vähesel määral ka faagi lüsogeense tsükli ajal. *E. coli* virulentses tüves näidati, et Cro regulaator mõjutab lisaks faagi geenidele ka bakteri geene, aktiveerides virulentsusega seotud geene (Hernandez-Doria ja Sperandio, 2018). Cro/CI transkriptsiooniregulaatorite perekonda kuuluvate regulaatorite kohta on vähe infot. Cro/CI transkriptsiooniregulaatorid on tulnud välja näiteks katsetes, kus uuriti *Enterococcus faecalis*-e adaptatsiooni vaske sisaldavale keskkonnale, ning *Lactobacillus rhamnosus*-e kliiniliste kaariest põhjustavate isolaatide genoomi uurimisel. *E. faecalis*-e vasestressi uurimisel leiti, et transkriptsioonifaktor aktiveerus pikemaajalise vasestressi käigus, ning transkriptsioonifaktori aktivatsioon võib olla seotud ka osküdatiivse stressiga, mida vask põhjustab (Reyes-Jara jt., 2010). *L. rhamnosus*-e kliiniliste isolaatide uurimisel (isoleeritud kaariese käes kannatavate hammaste nakatunud hamba pulbast) leiti, et mõlemal uuritaval isolaadil on genoomis Cro/CI transkriptsiooniregulaator, mida probiootilisel tüvel ei esine (Nadkarni jt., 2014). Samas pole regulaatoreid ning nende täpset funktsiooni bakteris töödes kirjeldatud. Käesolevas töös leidsin, et Cro/CI transkriptsiooniregulaator mõjutab *P. putida* fluoriioonide taluvust, kuid täpne mehhanism, kuidas antud regulaator fluoriioonide taluvust mõjutab, vajaks veel edasist uurimist.

Selleks, et kontrollida transposoonmutageneesiga leitud *PP_3125* rolli *P. putida* fluoriiditolerantsuses, konstrueerisin nii *P. putida* metsiktüvest kui ka Δ crcB tüvest *PP_3125* geeni deletsioonitüved. Lisaks konstrueerisin topeltdeletsioonitüvest $\Delta\Delta$ ka komplementatsioonitüve, kus *PP_3125* geen on viidud kromosoomi LacI repressori ning *tac*-promootori kontrolli alla. Lisades $\Delta\Delta$ -*tac3125* tüve kasvukeskkonda IPTG-d, on võimalik aktiveerida kromosoomi viidud *PP_3125* geeni ekspressioon. Kui Δ crcB tüvest oli puudu *PP_3125*, taastus tüve NaF-i taluvus osaliselt (joonised 7, 8 ja 9b-d). Metsiktüvest *PP_3125* geeni puudumisel efekti ei olnud (joonised 6, 9b-d). *PP_3125* geeni puudumine ei mõjutanud ka tüvede kasvu ilma NaF-ta söötmes (joonis 9a).

Lisades komplementatsioonitüve kasvuvöötmesse 0,5 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG-d, toimub *PP_3125* geeni üleekspressioon. Jooniselt 8 on näha, et *PP_3125* geeni üleekspressioon häirib rakkude kasvu ning üleekspressioonitingimustes tekivad muutused, tänu millele talub tüvi suuremat NaF-i kontsentratsiooni kui komplementatsioonitüve puhul võiks eeldada. Ilma IPTG lisamiseta kasvusöötmesse on tüve NaF-i tundlikkus sarnane Δ crcB tüvega, mitte $\Delta\Delta$ tüvega, nagu võiks eeldada. Varasemalt on teada, et *tac*-promootorilt toimub vähesel määral transkriptsioon ka

ilma promootorit aktiveeriva IPTG lisamiseta. Seega piisab juba väikesest tasemest *PP_3125* geeni ekspressioonist, et taastuks tüve NaF-i tundlikkus. Kui kasutada madalamat IPTG kontsentratsiooni (0,01 mM), puudus tüvel geeni üleekspressioonist tingitud kasvupeetus (joonis 9a) ning tüvel oli taastunud NaF-i tundlikkus (joonis 9b-d). Seega 0,01 mM IPTG kogus oli piisav, et toimuks geeniekspressioon, kuid piisavalt madal, et vältida üleekspressioonist tingitud stressi. IPTG juuresolekul kasvanud tüvi oli ka NaF-i osas tundlikum kui ilma IPTG-ta tüvi, seega *tac*-promootori baastaseme ekspressioonist ei piisa, et $\Delta\Delta$ -*tac3125* tüve NaF-i tundlikkus oleks võrreldav Δ *crcB* tüve omaga (joonis 9b-d).

2.4.2 Cro/CI transkriptsiooniregulaator *PP_3125* on seotud *Pseudomonas putida* KT2440 Δ *crcB* tüve fluoriiditolerantsete mutantide tekke loodusliku mehhanismiga

Selleks, et kontrollida, kas transposoonmutageneesis leitud geen *PP_3125* on seotud ka looduslike Δ *crcB* NaF-i taluvate mutantide (NaF⁺ mutandid) tekkes, isoleerisin NaF⁺ Δ *crcB* mutandid. Varasemates katsetes oleme täheldanud Δ *crcB* tüve puhul juhuslike NaF⁺ mutantide teket. Kuigi *P. putida*-s pole fluoriidioone tunnetavad *crcB* ribolülitiit leitud, on teiste bakterite puhul näidatud, et ribolüliti esineb ka stressivastuse geenide ees (Weinberg jt., 2010, Baker jt., 2012). Võimalik, et ka *P. putida*-s esineb mehhanism, mille abil aktiveeruvad suurenenud fluoriidioonide kontsentratsiooni korral rakus stressivastuse geenid ning suureneb mutatsioonisagedus. Esmalt kinnitasin, et isoleeritud mutantidel puudub *crcB* geen ning seejärel teostas PCR-analüüsi *PP_3125* geeni lookusele (joonis 10). Kõik isoleeritud mutandid olid Δ *crcB* deletsioonitüved (v.a. mutandi nr 6), kuid *PP_3125* geeni lookuselt PCR-i produkti saada ei õnnestunud. Kui *PP_3125* geeni piirkonnas on toimunud suured muutused (insertsioon või deletsioon), ei pruugi geeni piirkonnast PCR-i saada. Selleks, et lähemalt uurida, mis muutused *PP_3125* geeni piirkonnas on toimunud looduslike mehhanismide kaudu, saatsin kahe varasemalt isoleeritud Δ *crcB* NaF⁺ mutandi ning kahe uue mutandi genoomsed DNA-d kogu genoomi sekveneerimisse. Sekveneerimise teostas teenusena Eesti Biokeskuse tuumiklabor ning sekveneerimistulemusi analüüsis meie laborist Tanel Ilmjärv.

Kogu genoomi sekveneerimisest selgus, et kõigis ΔcrcB NaF^+ mutantides on toimunud ΔcrcB tüvega võrreldes genoomis ulatuslikud deletsioonid (18-345 geeni, tabel 2). Deletsioonide piirkonda jääb ka transposoonmutageneesi käigus leitud geen *PP_3125*. Kuna geen on puudu kõigil neljal uuritud mutandil, võib eeldada, et mutantide puhul toimub fluoriiditolerantsuse teke läbi ulatuslike deletsioonide *PP_3125* geeni piirkonnas. Seetõttu ei õnnestu saada ka PCR-i produkti mutantide *PP_3125* geenilt. Seega on looduslik mehhanism, tänu millele suureneb ΔcrcB tüve NaF -i taluvus, samuti seotud uuritava *PP_3125* geeniga.

Tabel 2. Genoomsed deletsioonid spontaansetes NaF -i tolerantsetes ΔcrcB mutantides võrrelduna ΔcrcB tüvega. Kandilistes sulgudes esitatud geen oli deleteerunud osaliselt. Tanel Ilmjärv, avaldamata andmed.

Tüvi	Deleteerunud ala pikkus	Deleteerunud gene	Deleteerunud geenid
$\text{NaF}^+ \Delta\text{crcB7}$	17 598 nt	18	[<i>PP_3119</i>]-[<i>PP_3133</i>]
$\text{NaF}^+ \Delta\text{crcB12}$	217 651 nt	190	[<i>PP_3059</i>]-[<i>PP_3221</i>]
$\text{NaF}^+ \Delta\text{crcB1}$	338 968 nt	344	[<i>PP_2985</i>]- <i>PP_5598</i>
$\text{NaF}^+ \Delta\text{crcB4}$	340 046 nt	345	[<i>PP_2985</i>]-[<i>PP_3288</i>]

Kuidas täpselt *PP_3125* *P. putida* fluoriidi taluvust mõjutab, tuleb kindlasti edasi uurida, sest teema on oluline väga mitmetes valdkondades. Kuna NaF -i toleranttsuse suurenemine ilmneb just geeni puudumisel, võib eeldada, et tegu võiks olla negatiivse regulaatoriga, mille puudumisel aktiveeruvad geenid, mis otseselt NaF -i taluvust mõjutavad. Kuna tegu on transkriptsiooniregulaatoriga, tasuks edaspidi teha kas transkriptoom või proteoom, et saada täpsem ülevaade, milliseid gene *PP_3125* mõjutab ning kuidas *PP_3125* aitab kaasa *P. putida* fluoriidi taluvusele.

KOKKUVÕTE

Pseudomonas putida on gram-negatiivne mullabakter, mida on uuritud kui potentsiaalset rakuvabrikut, mille abil toota erinevaid laialdaselt kasutusel olevaid ühendeid. Üheks ühendiks, mida plaanitakse *P. putida* abil tootma hakata, on orgaanilised fluoropolümeerid, mis leiavad järjest laialdasemat kasutust mittenakkuvates ja vett hülgavates pinnakatetes. Praegu toodetakse fluoropolümeere keemiliste protsesside käigus, mis on energiakulukad ning keskkonda koormavad. *P. putida*-t kasutades plaanitakse fluoropolümeere tootma hakata naatriumfluoriidist (NaF), mis on vees lahustuv fluori ühend. Samas on juba mõne millimolaarne fluoriidi kontsentratsioon bakteritele mürgine.

Praeguseks on teada vaid üksikud mehhanismid, mis aitavad bakteritel taluda kõrget fluoriidioonide kontsentratsiooni kasvukeskkonnas ning enamus uurimusi on tehtud gram-positiivsete bakteritega. Gram-negatiivsel *Pseudomonas putida*-l on teada vaid CrcB transporter, tänu millele bakter suudab taluda kõrget fluoriidioonide kontsentratsiooni keskkonnas. Samas on varasemate katsete käigus nähtud, et kui kasvatada *P. putida* tüve, millel puudub CrcB transporter, fluoriidioone sisaldavas keskkonnas, tekivad spontaansed mutandid, mis taluvad kõrgemat fluoriidioonide kontsentratsiooni kui ilma transporterita algne tüvi.

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida *P. putida* fluoriiditolerantsust mõjutavaid geene ning kirjeldada leitud geenide mõju *P. putida* fluoriiditolerantsuses. Töös leiti, et Cro/CI transkriptsiooniregulaatorite perekonda kuuluva PP_3125 regulaatori puudumisel suureneb *P. putida* CrcB transporterita tüvede fluoriidi taluvus 5-10 korda. Leiti ka, et PP_3125 geeni tugev üleekspressioon mõjus *P. putida* rakkude kasvule pärssivalt. Lisaks selgus, et looduslik mehhanism, mille läbi fluoriidi transporter CrcB-ta *P. putida* tüved suudavad taluda 10 mM fluoriidioonide kontsentratsiooni, hõlmab suuri deletsioone just PP_3125 geeni piirkonnas. Edaspidi tasuks uurida, milliseid geene Cro/CI transkriptsiooniregulaator PP_3125 reguleerib.

Mechanisms affecting fluoride tolerance in soil bacteria

Pseudomonas putida

Lea Lopp

SUMMARY

Organofluorides are increasingly being used in various areas of life (agrochemicals, medications, waterproof clothing). At the same time, production of organofluorides is energetically consuming and burdensome for the environment. When enzymes capable of incorporating fluoride into organic compounds were found in 2002, it paved a new way for synthesizing organofluorides.

Pseudomonas putida is a soil bacterium with a versatile and robust metabolism capable of withstanding harsh environments. There is an increasing interest in its use as cell factories and various studies focused on how to make *P. putida* even more resistant to stressors and more productive as a cell factory. The biggest problem for synthesizing fluoride compounds using *P. putida* is toxicity caused by the fluoride to the bacteria. Already few millimolar concentrations of fluoride in bacterial growth media is enough to kill the bacteria present in it. Since fluor is very abundant in Earth's crust, bacteria have developed mechanisms to withstand high fluoride concentrations. Many bacteria have fluoride transporters that minimize fluoride ion concentration in the bacterial cell. To synthesize organofluorides with *P. putida*, sodium fluoride (NaF) is used as a substrate. A difficulty for this process is that *P. putida* also has a fluoride transporter, CrcB, thus fluoride concentration in the bacterial cell is low, keeping production yields small. Notwithstanding, removing the transporter is also not an option as strains having no CrcB transporter can't tolerate even 1 millimolar concentration of NaF, whereas wild type strains can grow even on growth media containing 30 millimolar of NaF.

Previous studies have reported spontaneous mutants appearing when CrcB deficient strain has been cultivated on 10-15 mM NaF media, a much higher concentration than that the strain without CrcB transporter should be able to grow in. In this study, PP_3125: a Cro/CI type transcriptional regulator, has been described. We found that CrcB deficient strain lacking PP_3125 regulator can grow on NaF concentrations 10 times higher than a normal CrcB deficient strain. We also found out, that natural NaF tolerant mutants of CrcB deficient strains have big deletions in their genome, including deletions of the previously described *PP_3125* gene. Since little is known about the PP_3125 transporter, further studies are needed to describe its role in *P. putida* NaF tolerance.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Heilit, kes töö valmimisele nõu ja jõuga kaasa aitasid. Lisaks soovin tänada Kristot ja Kristelit, kes teemavõõraste inimestena viitsid töö läbi lugeda ning parandada selliselt, et ka teiste valdkondade inimestele oleks töö arusaadav. Ning aitäh kõigile, kes mu jooniste koostamise oskuse üle naersid ning eriti Kätlinile, kes peale naermist aitas teha asja lihtsamini ning efektiivsemalt.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Accardi, A., S. Lobet, C. Williams, C. Miller & R. Dutzler (2006). "Synergism between halide binding and proton transport in a CLC-type exchanger." *J Mol Biol* **362**(4): 691-699.
- Accardi, A. & C. Miller (2004). "Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels." *Nature* **427**(6977): 803-807.
- Ariza-Mateos, A., A. Nuthanakanti & A. Serganov (2021). "Riboswitch Mechanisms: New Tricks for an Old Dog." *Biochemistry (Mosc)* **86**(8): 962-975.
- Atashgahi, S., M. M. Haggblom & H. Smidt (2018). "Organohalide respiration in pristine environments: implications for the natural halogen cycle." *Environ Microbiol* **20**(3): 934-948.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey & K. N. Timmis (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**(1-3): 237-247.
- Baker, J. L., N. Sudarsan, Z. Weinberg, A. Roth, R. B. Stockbridge & R. R. Breaker (2012). "Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride." *Science* **335**(6065): 233-235.
- Bao, Y., D. P. Lies, H. Fu & G. P. Roberts (1991). "An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria." *Gene* **109**(1): 167-168.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy & P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." *Mol Gen Genet* **154**(2): 203-204.
- Berbasova, T., S. Nallur, T. Sells, K. D. Smith, P. B. Gordon, S. L. Tausta & S. A. Strobel (2017). "Fluoride export (FEX) proteins from fungi, plants and animals are 'single barreled' channels containing one functional and one vestigial ion pore." *PLoS One* **12**(5): e0177096.
- Boyer, H. W. & D. Roulland-Dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **41**(3): 459-472.
- Brammer, A. E., R. B. Stockbridge & C. Miller (2014). "F⁻/Cl⁻ selectivity in CLCF-type F⁻/H⁺ antiporters." *J Gen Physiol* **144**(2): 129-136.
- Calero, P., D. C. Volke, P. T. Lowe, C. H. Gotfredsen, D. O'Hagan & P. I. Nickel (2020). "A fluoride-responsive genetic circuit enables in vivo biofluorination in engineered *Pseudomonas putida*." *Nat Commun* **11**(1): 5045.
- Chavarria, M., P. I. Nickel, D. Perez-Pantoja & V. de Lorenzo (2013). "The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress." *Environ Microbiol* **15**(6): 1772-1785.
- de Lorenzo, V. & K. N. Timmis (1994). "Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons." *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
- Dong, T. & G. C. Tsui (2021). "Construction of Carbon-Fluorine Bonds via Copper-Catalyzed/Mediated Fluorination Reactions." *Chem Rec* **21**(12): 4015-4031.

- Dutzler, R., E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait & R. MacKinnon (2002). "X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity." *Nature* **415**(6869): 287-294.
- Dvorak, P. & V. de Lorenzo (2018). "Refactoring the upper sugar metabolism of *Pseudomonas putida* for co-utilization of cellobiose, xylose, and glucose." *Metab Eng* **48**: 94-108.
- Figurski, D. H. & D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(4): 1648-1652.
- Franden, M. A., L. N. Jayakody, W. J. Li, N. J. Wagner, N. S. Cleveland, W. E. Michener, B. Hauer, L. M. Blank, N. Wierckx, J. Klebensberger & G. T. Beckham (2018). "Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient ethylene glycol utilization." *Metab Eng* **48**: 197-207.
- Gluge, J., M. Scherlinger, I. T. Cousins, J. C. DeWitt, G. Goldenman, D. Herzke, R. Lohmann, C. A. Ng, X. Trier & Z. Wang (2020). "An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)." *Environ Sci Process Impacts* **22**(12): 2345-2373.
- Hanahan, D. & M. Meselson (1983). "Plasmid screening at high colony density." *Methods Enzymol* **100**: 333-342.
- Hernandez-Doria, J. D. & V. Sperandio (2018). "Bacteriophage Transcription Factor Cro Regulates Virulence Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Cell Host Microbe* **23**(5): 607-617 e606.
- Hishinuma, S., M. Yuki, M. Fujimura & F. Fukumori (2006). "OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas putida*." *Environ Microbiol* **8**(12): 2115-2124.
- Holder, D., D. Berry, D. Dai, L. Raskin & C. Xi (2013). "A dynamic and complex monochloramine stress response in *Escherichia coli* revealed by transcriptome analysis." *Water Res* **47**(14): 4978-4985.
- Hu, K. H., E. Liu, K. Dean, M. Gingras, W. DeGraff & N. J. Trun (1996). "Overproduction of three genes leads to camphor resistance and chromosome condensation in *Escherichia coli*." *Genetics* **143**(4): 1521-1532.
- Jakovleva, J., A. Teppo, A. Velts, S. Saumaa, H. Moor, M. Kivisaar & R. Teras (2012). "Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation." *Microbiology (Reading)* **158**(Pt 3): 708-720.
- Jentsch, T. J. & M. Pusch (2018). "CLC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease." *Physiol Rev* **98**(3): 1493-1590.
- Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood & D. W. Crook (2009). "Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution." *FEMS Microbiol Rev* **33**(2): 376-393.
- Kim, J., C. O. Jeon & W. Park (2008). "Dual regulation of *zwf-1* by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*." *Microbiology (Reading)* **154**(Pt 12): 3905-3916.
- Kivistik, P. A., M. Putrins, K. Puvi, H. Ilves, M. Kivisaar & R. Horak (2006). "The ColRS two-component system regulates membrane functions and protects *Pseudomonas putida* against phenol." *J Bacteriol* **188**(23): 8109-8117.

- Koch, B., L. E. Jensen & O. Nybroe (2001). "A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site." J Microbiol Methods **45**(3): 187-195.
- Lee, J., S. E. Sung, J. Y. Kang, J. H. Lee & B. S. Choi (2021). "Base-Pair Opening Dynamics Study of Fluoride Riboswitch in the Bacillus cereus CrcB Gene." Int J Mol Sci **22**(6).
- Leshner, R. J., G. R. Bender & R. E. Marquis (1977). "Bacteriolytic action of fluoride ions." Antimicrob Agents Chemother **12**(3): 339-345.
- Li, C., C. Qi, S. Yang, Z. Li, B. Ren, J. Li, X. Zhou, H. Cai, X. Xu & X. Peng (2021). "FOF1-ATPase Contributes to the Fluoride Tolerance and Cariogenicity of Streptococcus mutans." Front Microbiol **12**: 777504.
- Li, S. & R. R. Breaker (2017). "Identification of 15 candidate structured noncoding RNA motifs in fungi by comparative genomics." BMC Genomics **18**(1): 785.
- Li, S., K. D. Smith, J. H. Davis, P. B. Gordon, R. R. Breaker & S. A. Strobel (2013). "Eukaryotic resistance to fluoride toxicity mediated by a widespread family of fluoride export proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(47): 19018-19023.
- Liang, P., Y. Zhang, B. Xu, Y. Zhao, X. Liu, W. Gao, T. Ma, C. Yang, S. Wang & R. Liu (2020). "Deletion of genomic islands in the Pseudomonas putida KT2440 genome can create an optimal chassis for synthetic biology applications." Microb Cell Fact **19**(1): 70.
- Liao, Y., B. W. Brandt, J. Li, W. Crielaard, C. Van Loveren & D. M. Deng (2017). "Fluoride resistance in Streptococcus mutans: a mini review." J Oral Microbiol **9**(1): 1344509.
- Liao, Y., J. Chen, B. W. Brandt, Y. Zhu, J. Li, C. van Loveren & D. M. Deng (2015). "Identification and functional analysis of genome mutations in a fluoride-resistant Streptococcus mutans strain." PLoS One **10**(4): e0122630.
- Luo, L. W., Y. H. Wu, T. Yu, Y. H. Wang, G. Q. Chen, X. Tong, Y. Bai, C. Xu, H. B. Wang, N. Ikuno & H. Y. Hu (2021). "Evaluating method and potential risks of chlorine-resistant bacteria (CRB): A review." Water Res **188**: 116474.
- Lv, J. & Y. Cheng (2021). "Fluoropolymers in biomedical applications: state-of-the-art and future perspectives." Chem Soc Rev **50**(9): 5435-5467.
- Maduke, M., D. J. Pheasant & C. Miller (1999). "High-level expression, functional reconstitution, and quaternary structure of a prokaryotic ClC-type chloride channel." J Gen Physiol **114**(5): 713-722.
- Makarovsky, I., G. Markel, A. Hoffman, O. Schein, T. M. Brosh-Nissimov, A. Finkelstien, Z. Tashma, T. Dushnitsky & A. Eisenkraft (2007). "Bromine--the red cloud approaching." Isr Med Assoc J **9**(9): 677-679.
- Martinez-Garcia, E., B. Calles, M. Arevalo-Rodriguez & V. de Lorenzo (2011). "pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes." BMC Microbiol **11**: 38.
- Martinez-Garcia, E. & V. de Lorenzo (2011). "Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of Pseudomonas putida KT2440." Environ Microbiol **13**(10): 2702-2716.

- Martinez-Garcia, E., T. Jatsenko, M. Kivisaar & V. de Lorenzo (2015). "Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses." *Environ Microbiol* **17**(1): 76-90.
- Martinez-Garcia, E., P. I. Nickel, T. Aparicio & V. de Lorenzo (2014). "Pseudomonas 2.0: genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression." *Microb Cell Fact* **13**: 159.
- McIlwain, B. C., K. Martin, E. A. Hayter & R. B. Stockbridge (2020). "An Interfacial Sodium Ion is an Essential Structural Feature of Fluc Family Fluoride Channels." *J Mol Biol* **432**(4): 1098-1108.
- Meyer, G. J. (2018). "Astatine." *J Labelled Comp Radiopharm* **61**(3): 154-164.
- Mitsuhata, C., M. M. Puteri, Y. Ohara, N. Tatsukawa & K. Kozai (2014). "Possible involvement of enolase in fluoride resistance in *Streptococcus mutans*." *Pediatric Dental Journal* **24**(1): 12-16.
- Nadkarni, M. A., Z. Chen, M. R. Wilkins & N. Hunter (2014). "Comparative genome analysis of *Lactobacillus rhamnosus* clinical isolates from initial stages of dental pulp infection: identification of a new exopolysaccharide cluster." *PLoS One* **9**(3): e90643.
- NIH (2001). "Diagnosis and management of dental caries throughout life." *NIH Consens Statement* **18**(1): 1-23.
- Nickel, P. I. & V. de Lorenzo (2018). "Pseudomonas putida as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism." *Metab Eng* **50**: 142-155.
- O'Hagan, D. (2008). "Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond." *Chem Soc Rev* **37**(2): 308-319.
- O'Hagan, D., C. Schaffrath, S. L. Cobb, J. T. Hamilton & C. D. Murphy (2002). "Biochemistry: biosynthesis of an organofluorine molecule." *Nature* **416**(6878): 279.
- O'Mullane, D. M., R. J. Baez, S. Jones, M. A. Lennon, P. E. Petersen, A. J. Rugg-Gunn, H. Whelton & G. M. Whitford (2016). "Fluoride and Oral Health." *Community Dent Health* **33**(2): 69-99.
- Park, W., S. Pena-Llopis, Y. Lee & B. Dimple (2006). "Regulation of superoxide stress in *Pseudomonas putida* KT2440 is different from the SoxR paradigm in *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* **341**(1): 51-56.
- Peckham, S. & N. Awofeso (2014). "Water fluoridation: a critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention." *ScientificWorldJournal* **2014**: 293019.
- Prevedouros, K., I. T. Cousins, R. C. Buck & S. H. Korzeniowski (2006). "Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates." *Environ Sci Technol* **40**(1): 32-44.
- Ren, A., K. R. Rajashankar & D. J. Patel (2012). "Fluoride ion encapsulation by Mg²⁺ ions and phosphates in a fluoride riboswitch." *Nature* **486**(7401): 85-89.
- Reyes-Jara, A., M. Latorre, G. Lopez, A. Bourgoigne, B. E. Murray, V. Cambiazo & M. Gonzalez (2010). "Genome-wide transcriptome analysis of the adaptive response of *Enterococcus faecalis* to copper exposure." *Biomaterials* **23**(6): 1105-1112.
- Serganov, A. & E. Nudler (2013). "A decade of riboswitches." *Cell* **152**(1-2): 17-24.
- Song, J., C. Hou, J. Guo, Q. Niu, X. Wang, Z. Ren, Q. Zhang, C. Feng, L. Liu, W. Tian & L. Li (2020). "Two New Members of CsFEXs Couple Proton Gradients to Export Fluoride and

- Participate in Reducing Fluoride Accumulation in Low-Fluoride Tea Cultivars." J Agric Food Chem **68**(32): 8568-8579.
- Speed, M. C., B. W. Burkhardt, J. W. Picking & T. J. Santangelo (2018). "An Archaeal Fluoride-Responsive Riboswitch Provides an Inducible Expression System for Hyperthermophiles." Appl Environ Microbiol **84**(7).
- Stockbridge, R. B., A. Koide, C. Miller & S. Koide (2014). "Proof of dual-topology architecture of Fluc F- channels with monobody blockers." Nat Commun **5**: 5120.
- Stockbridge, R. B., H. H. Lim, R. Otten, C. Williams, T. Shane, Z. Weinberg & C. Miller (2012). "Fluoride resistance and transport by riboswitch-controlled CLC antiporters." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(38): 15289-15294.
- Stockbridge, R. B., J. L. Robertson, L. Kolmakova-Partensky & C. Miller (2013). "A family of fluoride-specific ion channels with dual-topology architecture." Elife **2**: e01084.
- Sutton, S. V., G. R. Bender & R. E. Marquis (1987). "Fluoride inhibition of proton-translocating ATPases of oral bacteria." Infect Immun **55**(11): 2597-2603.
- Svensson, T., H. Kylin, M. Montelius, P. Sanden & D. Bastviken (2021). "Chlorine cycling and the fate of Cl in terrestrial environments." Environ Sci Pollut Res Int **28**(7): 7691-7709.
- Zhang, S., Y. Wang, J. Lu, Z. Yu, H. Song, P. L. Bond & J. Guo (2021). "Chlorine disinfection facilitates natural transformation through ROS-mediated oxidative stress." ISME J **15**(10): 2969-2985.
- Zhu, J., A. Xing, Z. Wu, J. Tao, Y. Ma, B. Wen, X. Zhu, W. Fang & Y. Wang (2019). "CsFEX, a Fluoride Export Protein Gene from *Camellia sinensis*, Alleviates Fluoride Toxicity in Transgenic *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*." J Agric Food Chem **67**(21): 5997-6006.
- Zimmermann, M. B., P. L. Jooste & C. S. Pandav (2008). "Iodine-deficiency disorders." Lancet **372**(9645): 1251-1262.
- Tagel, M., H. Ilves, M. Leppik, K. Jurgenstein, J. Remme & M. Kivisaar (2020). "Pseudouridines of tRNA Anticodon Stem-Loop Have Unexpected Role in Mutagenesis in *Pseudomonas* sp." Microorganisms **9**(1).
- Tiso, T., P. Sabelhaus, B. Behrens, A. Wittgens, F. Rosenau, H. Hayen & L. M. Blank (2016). "Creating metabolic demand as an engineering strategy in *Pseudomonas putida* - Rhamnolipid synthesis as an example." Metab Eng Commun **3**: 234-244.
- Tong, C., H. Hu, G. Chen, Z. Li, A. Li & J. Zhang (2021). "Chlorine disinfectants promote microbial resistance in *Pseudomonas* sp." Environ Res **199**: 111296.
- Weimer, A., M. Kohlstedt, D. C. Volke, P. I. Nickel & C. Wittmann (2020). "Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects." Appl Microbiol Biotechnol **104**(18): 7745-7766.
- Weinberg, Z., J. X. Wang, J. Bogue, J. Yang, K. Corbino, R. H. Moy & R. R. Breaker (2010). "Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes." Genome Biol **11**(3): R31.
- Villalba, G., R. U. Ayres & H. Schroder (2007). "Accounting for fluorine: Production, use, and loss." J Ind Ecol **11**(1): 85-101.

Wirth, N. T., E. Kozaeva & P. I. Nickel (2020). "Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI-mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection." Microb Biotechnol **13**(1): 233-249.

Wu, L., F. Maglangit & H. Deng (2020). "Fluorine biocatalysis." Curr Opin Chem Biol **55**: 119-126.

Yunos, N. M., R. Bellomo, D. Story & J. Kellum (2010). "Bench-to-bedside review: Chloride in critical illness." Crit Care **14**(4): 226.

KASUTATUD VEEBILEHED

https://2015.igem.org/Team:Exeter/RNA_Riboswitches, viimati külastatud 03.05.2022

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q88I76>, viimati külastatud 05.05.2022

<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR001387/>, viimati külastatud 05.05.2022

<https://www.pseudomonas.com/feature/show?id=38827732>, viimati külastatud 14.05.2022

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyr A96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan ja Meselson, 1983)
DH5 α λ pir	<i>supE44, ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15), hsdR17 (<i>rk⁻mk⁺</i>), recA1, endA1, thi1, gyrA, relA, λpir</i>	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
CC118 λ pir	<i>Δ(ara-leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, phoA20, thi1, rpsE, rpoB, argE (Amp), recA1, λpir lysogen</i>	(de Lorenzo ja Timmis, 1994)
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1 -1</i>	(Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969)
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	<i>P. putida</i> algne, sekveneeritud tüvi	(Bagdasarian jt., 1981)
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
KT2440 Δ crcB (lühidalt Δ crcB)	KT2440 tüvest on deleteeritud <i>crcB</i> geen	(Calero jt., 2020)
KT2440 Δ crcB Δ 3125 (lühidalt $\Delta\Delta$)	KT2440 tüvest on deleteeritud <i>crcB</i> ja <i>PP_3125</i> geenid	Käesolev töö
KT2440 Δ 3125 (lühidalt Δ 3125)	KT2440 tüvest on deleteeritud <i>PP_3125</i> geen	Käesolev töö
KT2440 Δ crcB Δ 3125 Tn7GmlacI tac3125 (lühidalt $\Delta\Delta$ -tac3125)	KT2440 tüvest on deleteeritud <i>crcB</i> ja <i>PP_3125</i> geenid ning Tn7 piirkonda on viidud <i>tac</i> promootori kontrolliall olev <i>PP_3125</i> geen, Gm ^r	Käesolev töö
Plasmiidid		
pBAM1Tn5 lacI-tac	mini-Tn5 (Km ^r) ning suunaga minitransposoonist välja paiknevat <i>tac</i> -promootorit kandev suitsiidvektor (Amp ^r , oriR6K)	R. Teras, avaldamata
pRK2013	Konjugatiivset ülekannet abistav plasmiid	(Figurski ja Helinski, 1979)

p9TTp _{heAgusA}	pPR9TT, mis sisalda promootorita reportergeene <i>pheA</i> ja <i>gusA</i> (Amp ^r)	(Kivistik jt., 2006)
p9TTp _{heAgusA} genoomne raamatukogu	<i>P. putida</i> genoomne raamatukogu	(Kivistik jt., 2006)
pRM6-GFP(Km ^R) ehk pSNW2(Km ^R)	I-SceI restriksioonisaite, multikloneerimisjärjestust ja GFP-d sisaldav suitsiidplasmid, Km ^r	(Wirth jt., 2020)
pSNW2_PP_3125enne3	pSMW2 plasmidi multikloneerimisjärjestusse on viidud 500 nt pikkune ala <i>PP_3125</i> geeni eest.	Käesolev töö
pSNW_PP_3125enne+pärast	pSMW2 plasmidi multikloneerimisjärjestusse on viidud 500 nt pikkune ala <i>PP_3125</i> geeni eest ja selle järgi 500 nt pikkune ala <i>PP_3125</i> geeni järelt.	Käesolev töö
pSW (I-SceI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmid (Amp ^r)	(Martinez-Garcia jt., 2011)
pGP704LTn7	pGP704L plasmidi, millesse on SacI ja XbaI restriksiooniensüümidega viidud mini-Tn7 ΩGm kassett (Amp ^r , Gm ^r)	(Jakovleva jt., 2012)
pBluescript KS + T-track	Kloneerimisvektor pBluescript KS, mis on avatud EcoRV-ga ja otstesse on lisatud T-nukleotiidid (Amp ^r)	H. Ilves, avaldamata
KS/PP_3125	KS kloneerimisvektorisse on viidud <i>PP_3125</i> geen	Käesolev töö
pSEVA _{lacI} ta _c	pSEVAHIII/Xba plasmidi, millesse on viidud BamHI ensüümiga <i>lacI</i> -P _{ta_c} geenikassett	(Tagel jt., 2020)
pREP4	LacI repressorvalku ekspresseeriv plasmid (Km ^r)	QIAGEN
pUXBF13	Plasmid, mis kodeerib Tn7 transpositsiooni inserteerumiseks vajalikke valke (Amp ^r <i>mob</i> ⁺)	(Bao jt., 1991)

Lisa 2. Töös kasutatud praimerid, nende järjestused ja kirjeldused

Praimer	Praimeri järjestus	Iseloomustus ja seondumiskoht
pheA-val	5'-TGCTCAAGATT ATCATTACGCT-3'	seondub positsioonides 11 - 32 pheA geeni kodeerivale ahelale
T1T2	5'-GGCCTTTTT GCGTAGATC-3'	107-125 nt lacZ geenist ülesvoolu suunaga geeni alguse poole
ARB6	5'-GGCCACGCGTCGACTAG TACNNNNNNNNNNACGCC-3'	ARB-PCR-i (pBAM1-st pärit Tn5 seondumiskoha kindlaks tegemiseks) esimese reaktsiooni kōdupraimer, mille linkerregioonile ACGCC on <i>P. putida</i> genoomis 12050 kordust
BAM1	5'-TTATGTAAG CAGACAGTTTT-3'	komplementaarne pBAM1 vektorist pärit Tn5 minitransposoonis paikneva Km resistentsusgeeni ATG ette jääva alaga positsioonides -21 kuni -40 suunaga geenist välja
ARB2	5'-GGCCACGCG TCGACTAGTAC-3'	seondub kōdupraimer ARB6 5'otsas paikneva konserveerunud järjestusega
Me-I-uus2	5'-TATCTTGTGCAA TGTAACATCAGAG-3'	komplementaarne pBAM1 vektorist pärit Tn5 minitransposoonis paikneva Km resistentsusgeeni ATG ette jääva alaga positsioonides -68 kuni -87 suunaga geenist välja
PP_3125_BHI	5' -TAGGATCCTCAC CCAGGTGAAGGGC-3'	<i>PP_3125</i> deletsioonitüve tegemiseks, seondub u 500 nt enne <i>PP_3125</i> geeni, suunaga geeni poole, BamHI restriksioonisait
PP_3125delSac	5' -ATAGAGCTCATG TGACGCGAGTT- 3'	<i>PP_3125</i> deletsioonitüve tegemiseks, seodub <i>PP_3125</i> geeni ette + start koodon, suunaga geenist eemale, Sac restriksioonisaidiga
PP_3125outdelSac	5' -TAAGAGCTCTGAAAG CGCAAGGGGGCA	<i>PP_3125</i> deletsioonitüve tegemiseks, seodub <i>PP_3125</i> geeni järgi (koos stopp koodoniga), suunaga geenist eemale, Sac restriksioonisaidiga
PP_3125_EcoRI	5'-GAGAATTCAC AAGCCACGCTG-3'	<i>PP_3125</i> deletsioonitüve tegemiseks, seondub u 500 nt peale

		<i>PP_3125</i> geeni, suunaga geeni poole EcoRI restriktsoonisait
5636_Kpn	5'-ATAGGTACCGG CAGCGACTGAGGAT-3'	profaagile P1 eelnevale alale seonduv praimer, suunaga profaagi poole
3920XbaI	5'-AATCTAGACCA GTGACGAGTACC-3'	profaagi P1 järgsele alale kinnituv praimer, suunaga profaagi poole
Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	plasmidi pBluescript KS ja pSNW2(KmR) universaalpraimer.
Reverse	5'-AACAGCTATGACCATG -3'	plasmidi pBluescript KS ja pSNW2(KmR) universaalpraimer
pSW-R	5'-AACGTCGTG ACTGGGAAAA-3'	seondub pSW(ISceI) plasmiidile, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
pSW-F	5'-GGACGCTTC GCTGAAAATA-3'	seondub pSW(Isce-I) plasmiidile suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
PP_3125algHIII	5'-TATAAGCTTATGTCT ATCCGATTGAAACTG-3'	<i>PP_3125</i> geeni ette ja start koodonile seonduv praimer, suunaga geeni sisepoole HindIII restriktsoonisaidiga
PP_3125loppSalI	5' -TATGTCGACTCATTC GTCTGCGTGGTGAAC-3'	<i>PP_3125</i> geeni stopp koodonile ning sellele järgnevale alale seonduv praimer, suunaga geenist välja, SalI restriktsoonisaidiga.
PP_3125_enne	5'-GCTTTCAGACGCG TATCATGGC-3'	seondub <i>PP_3125</i> geeni ette, suunaga geeni poole
PP_3125_lopp	5'-GGTTGTTGTTTC ACCACGCAG-3'	seondub <i>PP_3125</i> geeni lõpule suunaga geenist väljapoole
PP_3125_parast	5'-CGATGAACCTGG CGTTTCACG-3'	Seondub <i>PP_3125</i> geeni järgi, suunaga geeni poole
PP_3125loppSalI	5'-TATGTCGACTCATTC GTCTGCGTGGTGAAC-3'	seondub <i>PP_3125</i> geeni lõpule koos stopp koodoniga, suunaga geeni poole
PP_3125_kesk	5'-GGCCTGCTC TTCGGCGAAG-3'	seondub <i>PP_3125</i> geeni keskele, suunaga geeni alguse poole
crcB1	5'-CTGAAAATTG GCGAGAACCTG-3'	<i>crcB</i> geenile eelneva alaga seonduv praimer, suunaga geeni poole
crcBparast	5'- GATTCACCGAG GGCCACATG-3'	<i>crcB</i> geenile järgneva alaga seonduv praimer, suunaga geeni poole

Prtac	5'-AATTAATCATC GGCTCGTATAA-3'	Komplementaarne <i>tac</i> -promootoriga, suunaga <i>tac</i> -promootori kontrolli all oleval geenile
TnGlmS	5'-AATCTGGCCA AGTCGGTGAC-3'	komplementaarne <i>glmS</i> geeni alaga positsioonides 310 kuni 330 nt allapoole translatsiooni startkoodonist ATG

Lisa 3. Transposoonmutandid

Klooni numbritest esimene näitab vastavat bioloogiliselt sõltumatut katset, millest transposoonmutant leiti. Teine number vastab transposoonmutandi numbrile katses. Positsioon tähistab *P. putida* KT2440 genoomi järgi geeni nukleotiidi numbrit, mille järgi on transposoon sisenenud. Nool näitab *tac*-promootori suunda.

Klooni nr	Geen	Positsioon
1_1	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	305 ->
1_4	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	umbes <- 87
1_9	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	359 ->
1_10	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	283 ->
1_12	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	209 ->
1_14	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	umbes <- 143
1_17	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	<- 430
1_18	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	umbes 97 ->
1_19	RHS perekonna valk <i>tke4</i> (<i>PP_4085</i>)	<- 4593
1_21	glutationüülhüdrokinooni reduktaas <i>Gqr</i> (<i>PP_3998</i>)	<- 549
2_1	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	umbes 279 ->
2_2	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	402 ->
2_5	transkriptsiooniregulaator (<i>PP_2550</i>)	<- 69
2_6	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	204 ->
2_7	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	281 ->
2_8	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	<- 254
2_9	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	313 ->
2_10	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	<- 430
2_13	Hüpoteetiline valk (<i>PP_0788</i>)	<- 1187
2_14	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	204 ->
2_15	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	204 ->
2_17	<i>rhs</i> -laadne valk <i>Tke2</i> (<i>PP_3108</i>)	<- 3448
2_18	<i>rhs</i> -laadne valk <i>Tke2</i> (<i>PP_3108</i>)	<- 3448
2_25	<i>Cro/CI</i> transkriptsiooniregulaator (<i>PP_3125</i>)	240 ->

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lea Lopp,

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

„Mullabakter *Pseudomonas putida* fluoritolerantsust mõjutavad mehhanismid“,

mille juhendaja on Heili Ilves

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.

Lea Lopp

30.05.2022