

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

RADI TEGOVA

**DNA polümeeraas IV osalus *Pseudomonas putida* rakkudes
toimuvates mutatsiooniprotsessides**

Magistritöö geneetika erialal

2004

Juhendajad: Andres Tover
Maia Kivisaar

Sissejuhatus.....	4
Kirjanduse ülevaade.....	5
1. DNA replikatsioon.....	5
1. 1. Replikatsiooni initsiatsioon.....	5
1. 2. Praimeri süntees.....	6
1. 3. Replikatiivne DNA polümeraas.....	6
1.4. Replikatsiooni terminatsioon.....	10
2. DNA polümeraaside jaotus ja ehitus.....	12
3. Mutatsioonide teke <i>E. coli</i> rakkudes.....	14
4. Mutatsiooniprotsessides osalevate DNA polümeraaside regulatsioon SOS vastuse kaudu.....	15
5. Vigutegevate DNA polümeraaside funktsioon bakterirakus.....	16
5. 1. Kahjustatud nukleotiidide ületamine DNA sünteesil.....	16
5. 2. SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside osalus stressi poolt induitseeritud mutageneesis <i>E. coli</i> rakkudes.....	19
5. 3. SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside olulisus bakterite pikaajalisel ellujäämisel.....	21
6. SOS-indutseeritavad DNA polümeraasid teistes bakterites.....	22
6. 1. DNA pol V analoogid teistes bakterites.....	22
6. 2. SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside osalus patogeensete bakterite peremeesorganismi koloniseerimisel toimuvates ja virulentsust tagavates mutatsiooniprotsessides.....	23
6. 3. Vigutegevad DNA polümeraasid madala GC sisaldusega graam-positiivsetes bakterites.....	23
Materjal ja meetodika.....	25
1. Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid.....	25
2. Testsüsteemide konstrueerimine.....	26
3. <i>P. putida</i> DNA polümeraas IV ja RecA suhtes defektsete tüvede konstrueerimine.....	29
4. <i>P. putida</i> <i>dinB</i> geeni üleekspressioon.....	30
5. Phe ⁺ mutantide isoleerimine.....	32
6. DNA polümeraas IV ja RecA suhtes defektsete tüvede elumuse määramine.....	

fenooli minimaaltassidel.....	32
7. DNA sekveneerimine.....	33
8. PCR.....	33
9. Transformatsioon.....	33
10. Bakterite elekroporatsioon.....	34
11. Bakterite ristamine.....	34
12. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs	35
Tulemused.....	36
1. <i>P. putida</i> DNA polümeraas IV homoloogi identifitseerimine.....	36
2. <i>P. putida</i> rakkudes toimuvate mutatsiooniprotsesside uurimiseks kasutatud testsüsteemide konstrueerimine	38
3. DNA polümeraas IV osalus <i>P. putida</i> rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides	39
4. RecA osaluse määramine DNA polümeraas IV-st sõltuvas mutageneesis	41
Arutelu	42
Kokkuvõte.....	45
Summary	47
Kasutatud kirjandus	48
Lisa 1. Radi Tegova, Andres Tover, Kairi Tarassova, Mariliis Tark and Maia Kivisaar: Involvement of Error-Prone DNA Polymerase Pol IV on Stationary Phase Mutagenesis in <i>Pseudomonas putida</i> (2004). J. Bacteriol. 186(9):2735-44	

Sissejuhatus

Bakteripopulatsioonid on väga muutlikud, evolutsioneerudes ja kohanedes kiiresti uute keskkonnatingimustega. Muutlikkuse võivad tagada horisontaalne geeniülekanne, mobiilsed DNA elemendid, ümberkorraldused bakteri genoomis ja samuti mutatsioonide teke. On näidatud, et ebasobivates keskkonnatingimustes nagu näiteks toitainete puudumise korral kasvukeskkonnas bakterirakkudes mutatsioonisagedus tõuseb (Sung ja Yasbin, 2002; Taddei jt., 1997; Kasak jt., 1997). Mutatsiooniprotsessid nälgivates bakterirakkudes võivad olla soodustatud nii reparatsioonisüsteemide töö efektiivsuse languse kui ka vigutegevate DNA polümeraaside ekspressiooni ja funktsionaalsuse tõusu tõttu.

Meie töögrupis uuritakse reparatsioonisüsteemide ja vigutegevate DNA polümeraaside osalust *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides. Kirjandusest on teada, et DNA polümeraas IV peamiseks ülesandeks *E. coli* rakkudes on mutatsioonide tekitamine ebasobivates kasvutingimustes, mis võivad osutada bakterile kasulikuks ja võimaldada uute keskkonnatingimustega kohanemist (Rosenberg, 2001; Bull jt., 2001; Kim jt., 2001). Sellest tulenevalt seadsime oma töö eesmärgiks välja selgitada, kuidas osaleb *dinB* geeni poolt kodeeritud vigutegev DNA polümeraas IV *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides.

Kirjanduse ülevaade

1. DNA replikatsioon

Bakteri rõngaskromosoom sisaldab ühte replikatsiooni alguspunkti *oriC* (inglise k. *origin*), millelt algab DNA süntees. DNA replikatsioon lõpeb kromosoomi vastaspoolel asuval replikatsiooni terminatsiooni järjestusel - *ter*. Replikatsiooni käigus liiguvad kaks replikatsioonikahvlit vastassuunaliselt ning kohtuvad replikatsiooni terminatsiooni järjestusel. Bakteri *E. coli* DNA replikatsioonil osalevad valgud on toodud ära Tabelis 1.

1. 1. Replikatsiooni initsiatsioon

E. coli DNA replikatsiooni alguspunkt (*origin*), *oriC* sisaldab A/T rikast regiooni, nelja DnaA valgu seondumisjärjestust (DnaA boxi) ja metülatsiooni järjestusi GATC. DNA replikatsiooni initsiatsiooniks on vajalik *dnaA* geeni poolt kodeeritud DnaA valgu seondumine ATP-ga, mis muudab DnaA valgu aktiivseks. Aktiivsete DnaA valgu molekulide seondumine *oriC*-le ja oligomeriseerumine põhjustab A/T rikkas regioonis DNA ahelate lahtisulamist. DnaA valgu seondumist *oriC*-le soodustab *ihfAB* geenide poolt kodeeritud heterodimeerne valk IHF. IHF valgu seondumine *oriC*-le põhjustab DNA paindumist nii, et DnaA boxid asetuvad üksteisele lähemale, soodustades sellega DnaA boxidele seondunud DnaA valgu polümeriseerumist (von Freiesleben jt., 2000). Lahtisulanud DNA-le seondub DnaC valgu abil helikaas DnaB. Helikaas viib läbi DNA ahelate lahtikeeramist, lõhkudes kaheaheelalise DNA lämmastikaluste vahelisi vesiniksidemeid. Energia selle protsessi läbiviimiseks saadakse ATP hüdrolüüsil. Liikudes üheaheelalisel DNA-l 5'-3' suunas, võimaldab DNA polümeraasi kompleksiga seotud helikaas kogu replikatsiooni masinavärgi liikumist. Helikaasi molekulide liikumine DNA ahelal põhjustab replikatsioonikahvli eelse ala positiivset superspiralisatsiooni. Superspiralisatsiooni kõrvaldab helikaasi ees kaheaheelalist DNA-d mööda liikuv *gyrAB* geenide poolt kodeeritud ensüüm tüüp II topoisomeraas DNA güraas. DNA ahelate tagasipaardumist

enne uue DNA ahela sünteesi takistab *ssb* geeni poolt kodeeritud üheaahelalise DNA-ga seonduv valk *single-strand binding protein* (SSB)(Moat jt., 2002; Brooker, 1999).

1. 2. Praimeri süntees

DNA sünteesi alustamiseks on vajalik RNA praimeri olemasolu üheaahelisel DNA-l. RNA praimeri sünteesib *dnaG* geeni poolt kodeeritud ensüüm primaas. RNA praimeri süntees on vajalik sellepärast, et DNA polümeraas ei suuda ise üheaahelisel DNA-l DNA sünteesi initsieerida, vaid on võimeline liitma nukleotiide juba olemasolevale DNA või RNA ahelale (Brooker, 1999).

1. 3. Replikatiivne DNA polümeraas

DNA sünteesi viib läbi keerukas ensüümkompleks DNA polümeraas III holoensüüm (Joonis 1). DNA polümeraas III holoensüüm koosneb kahest β -klambrist (β -clamp), kahest DNA polümeraas III apoensüümist ja neid ühendavast γ kompleksist, mis on omakorda seondunud helikaasiga.

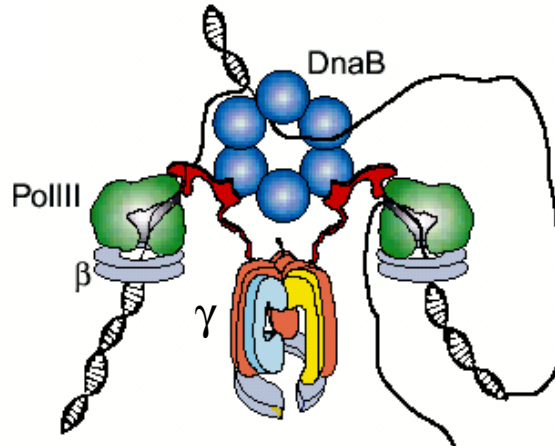
1. 3. 1. γ kompleks

γ kompleksil on replikatsioonil täita kaks olulist ülesannet. Esimeseks ülesandeks on DNA sünteesi läbiviiva kompleksi asetamine replikatsioonikahvlisse. Teiseks ülesandeks on DNA sünteesi läbiviiva kompleksi kooshoidmine replikatsiooni jooksul.

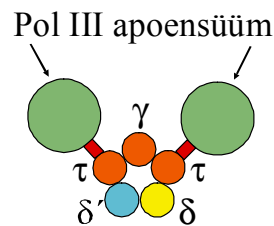
E. coli γ kompleks koosneb seitsmest subühikust: kaks τ subühikut (*dnaX*), γ subühik (*dnaX*), δ subühik (*holA*), δ' subühik (*holB*), χ subühik (*holC*), ψ subühik (*holD*). Subühikud τ ja γ on mõlemad kodeeritud *dnaX* geeni poolt, kusjuures γ subühik on translatsioonilise raaminihke tõttu tekkinud τ subühiku lühem variant. γ kompleksi subühikud asetsevad üksteise suhtes ringikujuliselt nii, et kummalegi poole γ subühikust jäävad τ subühikud (Joonis 1)(O'Donnell jt., 2001). τ ja ψ subühikute ülesanne on DNA polümeraas III holoensüümi koos hoidmine (Ellison ja Stillman,

2001). γ , δ , δ' ja χ subühikud osalevad ensüümkompleksi replikatsioonikahvlisse asetamisel (O'Donnell jt., 2001).

A



B



Joonis 1.

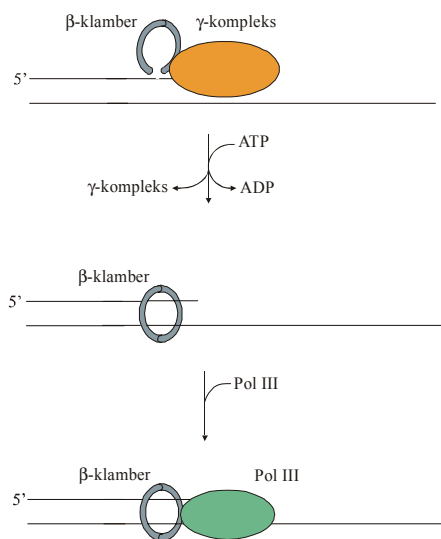
a) Replikatsioonikahvlis asetsev DNA polümeraas III holoensüüm. Nii juhtivat kui ka mahajäävat ahelat sünteesiv DNA polümeraas III apoensüüm (joonisel tähistatud PolIII) on seondunud DNA-d ümbritseva β -klambriga (tähistatud tähega β). DNA polümeraas III apoensüüme omavahel ja holoensüümi helikaasiga (joonisel tähistatud DnaB) ühendab gamma kompleks (tähistatud γ).

b) Skeem γ kompleksi subühikute asetumisest üksteise suhtes DNA polümeraas III koosseisus. γ kompleksi vastavad subühikud on tähistatud neile vastavate kreeka sümbolitega. Jooniselt on näha, et τ subühik seondub DNA polümeraas III apoensüümiga C-terminaalse domääni abil.

1. 3. 2. β -klamber ja DNA polümeraas III holoensüümi asetumine replikatsioonikahvlisse

Selleks, et DNA polümeraas DNA sünteesi käigus DNA-lt ei dissotseeruks, on vajalik *dnaN* geeni poolt kodeeritud ensüümi, β -klambri osalemine replikatsioonil. β -klamber on homodimeerne valk, mis moodustab rõnga ümber DNA ahela ja seondub DNA polümeraasiga (Joonis 2) (Lopez de Saro ja O'Donnell, 2001; Dalrymple jt., 2001).

Selleks, et kogu replikatsiooni läbiviiv ensüümkompleks asetuks replikatsioonikahvlisse, tuleb kõigepealt panna õiges kohas ümber DNA ahela rõngakujuline β -klamber. γ kompleksi δ subühik seondub β -klambriga ATP juuresolekul ja muudab selle konformatsiooni nii, et rõngas avaneb.



Joonis 2. γ kompleks asetab β -klambri praimerit omavale üheahelalisele DNA-le. β -klamber hoiab DNA polümeraasi replikatsiooni käigus DNA ahelal.

Avatud β -klamber asetub nii replikatsiooni *origin*-ilt lähtuva DNA sünteesi kui ka iga Okazaki fragmendi sünteesi alustamiseks vajalikule praimerit omavale üheahelalisele DNA-le. Paimeriga varustatud üheahelalist DNA-d aitab β -klambril ära tunda γ kompleksi χ subühik. Kui β -klamber on seondunud praimeriga varustatud

üheahelalise DNA-ga, vabaneb γ kompleks ATP hüdrolüüsil β -klambrist. ATP sidumist ja hüdrolüüsi viib läbi γ kompleksi γ subühik. γ kompleksi eraldumise tulemusel β -klamber sulgub (Ellison ja Stillman, 2001). Seejärel seondub DNA polümeraas III apoensüüm β -klambriga, võimaldades kogu replikatsiooni läbiviiva kompleksi asetumist DNA-le.

1.3.3. DNA polümeraas III apoensüüm

DNA polümeraas III apoensüüm viib replikatsioonil läbi uue DNA ahela sünteesi. DNA polümeraas III apoensüüm koosneb α , ϵ ja θ subühikutest. *dnaE* geeni poolt kodeeritud α subühik vastutab uue DNA ahela sünteesi eest, lisades sünteesitavale DNA ahelale nukleotiide 5'-3' suunas. *dnaQ* (*mutD*) geeni poolt kodeeritud ϵ subühik omab 3'-5' eksonukleasaset e. vigu korrigeerivat “*proofreading*” aktiivsust, mis võimaldab replikatsiooni käigus eemaldada valesti paardunud nukleotiide. *holE* (*dnaY*) poolt kodeeritud θ subühiku funktsioon on seni veel teadmata.

1.3.4. DNA polümeraas III holoensüümi assambleerimine.

Replikatsiooni läbiviiva kompleksi moodustumiseks on vaja ühendada kaks DNA polümeraas III apoensüümi teineteisega. Seejärel tuleb moodustunud holoensüüm ühendada tema ees liikuva helikaasi molekuliga. DNA apoensüüme omavahel ja samas ka helikaasiga ühendavaks lüliks on γ kompleks (Joonis 1). Nagu juba eespool kirjeldatud, sisaldab γ kompleks kahte τ subühikut, millest üks seondub ühe ja teine teise DNA polümeraas III apoensüümiga. Samal ajal seonduvad mõlemad τ subühikud ka replikatsioonikahvlit edasiviiva helikaasiga. τ subühik seondub nii DNA polümeraas III apoensüümi kui ka helikaasiga C-terminaalse domääni abil (O'Donnell jt., 2001). γ kompleks ühendab kahte DNA polümeraas III apoensüümi nii, et kogu moodustunud DNA polümeraas III holoensüüm asetseb replikatsioonikahvlil v-kujuliselt (Joonis 1)(O'Donnell jt., 2001).

DNA polümeraas III holoensüümi vasak õlg sünteesib juhtivat ahelat ja parem mahajäävat ahelat. Kuna DNA süntees toimub vaid 5'-3' suunas, siis toimub mahajääva ahela süntees 1000-2000 aluspaariliste Okazaki fragmentidena. Iga Okazaki

fragmendi sünteesiks on vajalik uue RNA praimeris süntees primaasi poolt. DNA polümeraas I, omades 5'-3' eksonukleasest aktiivsust, eemaldab Okazaki fragmentidest RNA praimeris ja täidab sünteesitava DNA ahelasse tekkinud lüngad. DNA polümeraas I poolt lisatud viimase nukleotiidi ja järgmise nukleotiidi vahelise fosfodiesterisideme sünteesib DNA ligaas (Brooker, 1999).

1.4. Replikatsiooni terminatsioon

oriC suhtes kromosoomi vastaspoolel asub replikatsiooni terminatsiooniregioon, mille moodustab *ter* järjestuste paar. *ter* järjestusele seondub valk *ter-binding protein* ja peatab replikatsioonikahvli liikumise. Üks *ter* järjestus peatab päripäeva, teine vastupäeva liikuva replikatsioonikahvli. DNA ligaas ühendab äsjasünteesitud DNA ahelate otsad. Moodustub kaks kaheaheelist tsirkulaarset DNA molekuli. Tütarkromosoomide teineteisest lahutamise on rekombinatsiooniline protsess, mis toimub *dif*-saitides Xer rekombinaasi abil. Protsessis osaleb ka topoisomeraas (Brooker, 1999).

Tabel 1. *E. coli* DNA replikatsiooni läbiviivad ja kontrollivad valgud.

valk (molekulmass kDa)	geen	funktsioon
DnaA (54)	<i>dnaA</i>	DNA ahelate lahtisulamine <i>oriC</i> piirkonnaga seandumisel
IHF	<i>ihfAB</i>	soodustab DnaA poolt läbiviidavat DNA ahelate lahtisulamist
DnaB helikaas (55)	<i>dnaB</i>	kaksikaheelise DNA viimine üheaheeliseks
DnaC (25)	<i>dnaC</i>	soodustab helikaasi seandumistüheaheelisele DNA-le <i>oriC</i> piirkonnas
Topoisomeraas (105)	<i>gyrAB</i>	helikaasi tekitatud superspiralisatsiooni kõrvaldamine, tütarkromosoomide üksteisest eraldamine replikatsiooni terminatsioonil
Primaas (60)	<i>dnaG</i>	RNA praimeris süntees

Tabel 1. (Järg) *E. coli* DNA replikatsiooni läbiviivad ja kontrollivad valgud (Algus lk 10).

valk (molekulmass kDa)	geen	funktsioon
γ kompleks: τ subühik (71)	<i>dnaX</i>	DNA polümeraas III apoensüümide ja helikaasi ühendamine replikatsiooni läbiviivas kompleksis
γ subühik (47.5)	<i>dnaX</i>	ATP sidumine ja hüdrolyüs β-klambri avamisel
δ subühik (38)	<i>holA</i>	β-klambri sidumine γ kompleksiga
δ' subühik (37)	<i>holB</i>	γ kompleksi ATPaasse aktiivsuse regulatsioon
χ subühik (12)	<i>holC</i>	praimeriga seondunud üksikahelalise DNA äratundmine
ψ subühik (14)	<i>holD</i>	γ kompleksi stabiliseerimine replikatsiooni kõigus
β-klamber (40.6)	<i>dnaN</i>	DNA polümeraasi sidumine ja DNA-l hoidmine
DNA polümeraas III apoensüüm: α subühik (129)	<i>dnaE</i>	DNA süntees
ε subühik (27.5)	<i>dnaQ (mutD)</i>	valestipaardunud nukleotiidi eemaldamine
θ subühik (10)	<i>holE (dnaY)</i>	pole teada
DNA polümeraas I (109)	<i>polA</i>	RNA praimer eemaldamine ja üksikahelalisele alale komplementaarset ahela sünteesimine
DNA ligaas (75)	<i>lig</i>	fosfodiesterideme moodustamine DNA ahelate otste vahel
<i>ter</i> -binding protein	<i>tau (tus)</i>	Replikatsioonikahvli peatamine <i>ter</i> -järjestusele seondumisel
SSB (single-strand binding protein)	<i>ssb</i>	üheahelalise DNA-ga seondumine ja lämmastikaluste omavahelise tagasipaardumise takistamine
Dam metüültransferaas	<i>dam</i>	GATC järjestuses asuva adenini metüleerimine
SeqA	<i>seqA</i>	seondub hemimetüleeritud <i>oriC</i> -le, takistades selle täielikku metüleerimist
SeqB	<i>seqB</i>	SeqA aktivatsioon
IciA	<i>iciA</i>	seondub <i>oriC</i> A/T rikkale alale, takistades replikatsiooni initsiatsiooni
Xer integraas-rekombinaas	<i>xerC, xerD</i>	osaleb rekombinatsiooni terminatsioonil tütarchromosoonide üksteisest lahutamisel

2. DNA polümeraaside jaotus ja ehitus

Eelmises peatükis kirjeldasin *E. coli* näidete põhjal replikatsiooni toimumist bakterirakus. Sellest mudelist lähtudes teame, et bakter vajab kromosoomi replikatsiooniks peamise replikatiivse DNA polümeraasi - DNA polümeraas III ning Okazaki fragmentide sünteesil vajalike praimerite degradatsiooniks ja praimerite kohale tekkinud tühikute täissünteesiks DNA polümeraas I olemasolu. Ometi on erinevate bakterite genoomidest ja ka suurtest konjugatiivsetest plasmiididest leitud veel teisi DNA polümeraase kodeerivaid geene. *E. coli* genoom sisaldab peale DNA polümeraas III ja I kodeerivate geenide *dnaE* ja *polA* veel kolme geeni, mis kodeerivad samuti DNA polümeraase - DNA polümeraas II kodeerivat *polB* geeni, DNA polümeraas IV kodeerivat *dinB* geeni ja DNA polümeraas V kodeerivaid *umuDC* geene (Moat jt., 2002). Erinevalt *E. coli*-st on leitud mitmete nii graam-positiivsete kui graam-negatiivsete bakterite genoomidest veel üks DNA polümeraasi kodeeriv geen - *dnaE2*, mis kodeerib replikatiivse DNA polümeraasi analoogi (Boshoff jt., 2003; le Chatelier jt., 2003; Bruck jt., 2003).

Tabel 2. *E. coli* DNA polümeraasid

DNA polümeraas	geen	kuuluvus
DNA polümeraas I	<i>polA</i>	perekond A
DNA polümeraas II	<i>polB</i>	perekond B
DNA polümeraas III α subühik	<i>dnaE</i>	perekond C
DNA polümeraas IV	<i>dinB</i>	perekond Y
DNA polümeraas V	<i>umuDC</i>	perekond Y

Prokarüootsetes organismides esinevad DNA polümeraasid jaotatakse valgu struktuuri ja fülogeneetilise põlvnemise alusel perekondadesse A, B, C ja Y (Tabel 2). *E. coli* DNA polümeraas I kuulub perekonda A, DNA polümeraas II perekonda B, *E. coli* DNA polümeraas III apoensüümi α subühik ja samuti ka teiste bakterite replikatiivne DNA polümeraas ja selle analoog kuuluvad perekonda C ja DNA polümeraasid IV ja V perekonda Y (Ohmori jt., 2001).

Kuigi kõik DNA polümeraasid ei ole fülogeneetiliselt seotud ja nende aminohappeline järjestus on sageli väga erinev, on molekuli üldine kuju erinevate DNA polümeraaside puhul siiski sarnane. DNA polümeraaside konformatsioon meenutab paremat kätt. Seetõttu nimetatakse DNA polümeraaside valgu domääne “peopesaks” (*palm*), “sõrmeks” (*finger*) ja “pöidlaks” (*thumb*). DNA polümeraas asetub ümber DNA ahela nii, et moodustunud kompleksi võib kujutada ette parema käena, mis hoiab DNA ahelat justkui köit, mis libiseb DNA sünteesil läbi peopesa. Katalüütiline tsepter asub “peopesa” domäänis (Ling jt., 2001). Protsessiivsust tagava β -klambriga seonduvad DNA polümeraasid valgu C-terminaalses otsas asuva konserveerunud järjestuse QL[S/D]LF abil (Lopez de Saro jt., 2003; Bunting jt., 2003).

DNA polümeraas IV ja V kuuluvad DNA polümeraaside perekonda Y. Kuna Y perekonna DNA polümeraasidel puudub 3'-5' eksonukleasne e. “*proofreading*” aktiivsus (Ling jt., 2001), on nende poolt läbiviidud DNA süntees vigaderohke (Goodman ja Tippin, 2000). Samuti arvatakse, et Y perekonna polümeraaside aktiivtsepter on replikatiivse DNA polümeraasi aktiivtsentrist paindlikum, mistõttu on Y perekonna DNA polümeraasid võimelised jätkama DNA sünteesi ka DNA kahjustuste korral (Ling jt., 2001). Domäänid “sõrm” ja “pöial” on Y perekonna DNA polümeraasidel võrreldes teiste perekondade DNA polümeraasidega ebaharilikult väikesed. Lisaks kolmele, kõigile DNA polümeraasidele iseloomulikule domäänile on Y perekonna DNA polümeraasidel veel neljas domään “väike sõrm” (*little finger*), mis kontakteerub DNA-ga ja kompenseerib domäänide “pöial” ja “sõrm” puudulikkuse, suurendades polümeraasi protsessiivsust (Ling jt., 2001). Erinevate Y perekonna DNA polümeraaside “väikese sõrme” domääni aminohappeline järjestus on väga varieeruv, samas kui domääni üldine struktuur $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ on konserveerunud. Y perekonna DNA polümeraasid seonduvad β -klambriga sarnaselt teiste perekondade DNA polümeraasidele “väikese sõrme” domääni C-terminaalses otsas asuva konserveerunud β -klambriga seonduva motiivi QL[S/D]LF abil. On näidatud, et lisaks C-terminaalse motiivi abil β -klambriga seondumisele võib DNA polümeraas IV “väikese sõrme” domään interakteeruda ka β -klambri monomeeride liitumiskohas asuva hüdrofoobse alaga. Seetõttu võib DNA polümeraas IV olla β -klambriga seondunud kahel erineval viisil - kas ainult C-terminaalse peptiidi abil või samaaegselt nii C-terminaalse peptiidi

abil kui ka hüdrofoobse interaktsiooni kaudu. Juhul, kui DNA polümeraas IV on seondunud ainult C-terminaalse motiiviga, asetub polümeraasi molekul DNA ahelale ja viib läbi DNA sünteesi. Kui aga DNA polümeraas IV on seondunud β -klambriga nii C-terminaalse motiivi kui ka hüdrofoobse interaktsiooni kaudu, ei asetu polümeraas DNA-le ja DNA süntees DNA polümeraas IV poolt ei ole võimalik. Termodünaamiliselt stabiilsem on DNA polümeraas IV seondumine nii C-terminaalse motiivi kui ka hüdrofoobse interaktsiooni kaudu (Bunting jt., 2003).

3. Mutatsioonide teke *E. coli* rakkudes

Muutused DNA nukleotiidses järjestuses võivad olla organismile kas kahjulikud, kasulikud või neutraalsed. Geenide kodeerivasse või reguleerivasse alasse sattunud mutatsioonid võivad viia bakteriraku hukuni, põhjustades mittefunktsionaalse valgusünteesi või muuta valgusünteesi taset bakterirakus. Seepärast on organismile kasulik säilitada ja anda järgmise põlvkonda edasi DNA nukleotiidses järjestuses muutumatuna. Teisest küljest võib aga mutatsioonide teke osutada organismile kasulikuks, võimaldades kohanemist uute keskkonnatingimustega, andes eelise teiste liigikaaslaste ees. Rakkudes peab olema tasakaal mutatsioonide vältimise, parandamise ja tekitamise vahel.

E. coli rakkudes on peamiseks DNA-d sünteesivaks ensüümiks DNA polümeraas III. Kuigi DNA polümeraas III-l on olemas DNA sünteesil tehtavaid vigu parandav 3'-5' eksonukleasne aktiivsus, tekivad rakkudes siiski mutatsioonid. Vigu parandava aktiivsuse suhtes defektne DNA polümeraas III lülitab sünteesitavasse ahelasse umbes kaks suurusjärku rohkem valesid nukleotiide kui 3'-5' eksonukleasne aktiivsust omav DNA polümeraas III. 3'-5' eksonukleasne aktiivsust omav DNA polümeraas III sünteesib DNA ahelasse 3-6 korda 10^7 nukleotiidi kohta ühe valestipaardunud nukleotiidi, samas kui "proofreading" aktiivsuse suhtes defektne DNA polümeraas III lülitab sünteesitavasse DNA ahelasse ühe vale nukleotiidi 1-2 korda 10^5 nukleotiidi kohta (Fijalkowska ja Schaaper, 1996).

Spetsiifiliste DNA aluspaaride moodustumisel tekivad lämmastikaluste vahel vesiniksidemed – guaniini ja tsütosiini vahel tekib kolm, adeniini ja tümiini vahel kaks vesiniksidet. Vesiniksidet moodustav vesinikuaatomi asukoht lämmastikaluses ei ole

alati ühesugune, st. et lämmastikalused võivad esineda erinevates tautomeersetes vormides. Guaniin ja tümiin võivad esineda nii keto– kui ka enoolvormis. Tsütosiinil ja adeniinil esineb amino– ja iminovorm. Guaniini ja tümiini ketovorm on stabiilsem enoolvormist ja suurema tõenäosusega nad selles vormis ongi. Tsütosiini ja adeniini puhul on stabiilsem lämmastikaluste aminovorm. Lühikese aja vältel võivad lämmastikalused olla siiski ka ebastabiilses enool– või iminovormis. On võimalik, et hetkel, kui DNA polümeraas asetab replikatsioonil sünteesitavasse ahelasse järgmise nukleotiidi, on lämmastikalus, mille vastu komplementaarsuse alusel järgmist nukleotiidi asetatakse, ebastabiilsemas tautomeerses vormis. Sellisel juhul ei ole võimalik Watson–Crick’i aluspaarile iseloomulike vesiniksidemete teke ja sünteesitavasse ahelasse võidakse lisada vale nukleotiid. DNA polümeraas III ei subühik suudab tavaliselt sellise valepaardumise ära tunda ja volestipaardunud nukleotiidi eemaldada (McHenry, 1985).

E. coli rakkudest on leitud peale põhilise DNA polümeraas III veel vähemalt kaks DNA polümeraasi, mis erinevalt DNA polümeraas III-st ei suuda ära tunda ja asendada DNA ahelasse valesti lülitatud nukleotiide õigetega. Sellisteks DNA polümeraasideks on *dinB* poolt kodeeritud DNA polümeraas IV ja *umuDC* geenide poolt kodeeritud DNA polümeraas V (tabel 2).

4. Mutatsiooniprotsessides osalevate DNA polümeraaside regulatsioon SOS vastuse kaudu

Replikatsiooni toimumiseks hädavajalike DNA polümeraaside, nagu näiteks *E. coli* DNA polümeraaside III ja I, ekspressioon toimub bakterirakus konstitutiivselt. Selliste DNA polümeraaside ekspressioon, mille olemasolu rakus ei ole replikatsiooni toimumiseks tingimata vajalik, nagu *E. coli* DNA polümeraasid II, IV ja V (Kim jt., 2001), indutseeritakse DNA kahjustuste korral SOS vastuse poolt. *E. coli* rakkudes on SOS vastuse kaudu reguleeritud veel vähemalt 42 geeni ekspressioon, mille hulka kuuluvad peale DNA polümeraaside II, IV ja V kodeerivate geenide mitmed rekombinatsiooniosalevaid ja rakutsükli kontrollivaid valke kodeerivad geenid (Sutton jt., 1999; Rosenberg, 2001).

SOS-vastuse regulatsioon toimub valkude RecA ja LexA vahendusel. SOS vastuse käigus indutseeritavate geenide, ka *recA* ja *lexA* geenide promootralas asub repressorvalgu LexA seondumisjärjestus. Raku normaalses olekus on LexA seondunud SOS vastuse käigus indutseeritavate geenide promootoralaga ning transkriptsioon nendelt geenidelt on kas suuremal või vähemal määral maha surutud. *recA* ja *lexA* geenidelt toimub transkriptsioon ja sünteesitakse vastavaid valke madalal tasemel ka siis, kui LexA on bakterirakus olemas. DNA kahjustuse korral replikatsioon peatub, mille tulemusel tekib üheaheelalise DNA ja RecA valgu baasil nukleoproteiinfilament. Üheaheelalise DNA-ga seondunud RecA on aktiveeritud ja põhjustab repressorvalgu LexA autokatalüütilise lagunemise, mille tulemusena suureneb transkriptsiooni tase SOS vastuse käigus indutseeritavate geenidelt, sealhulgas ka *lexA* ja *recA* geenidelt. Juhul kui DNA kahjustus on eemaldatud ja replikatsioon jätkub normaalselt, langeb raku RecA aktiveerimiseks vajaliku üheaheelalise DNA hulk ja repressorvalgu LexA-d ei lagundata. LexA valk seondub jällegi SOS vastuse käigus indutseeritavate geenide promootoraladele ja surub neilt transkriptsiooni kiiresti maha (Smith ja Walker, 1998; Moat jt., 2002).

5. Vigutegevate DNA polümeraaside funktsioon bakterirakus

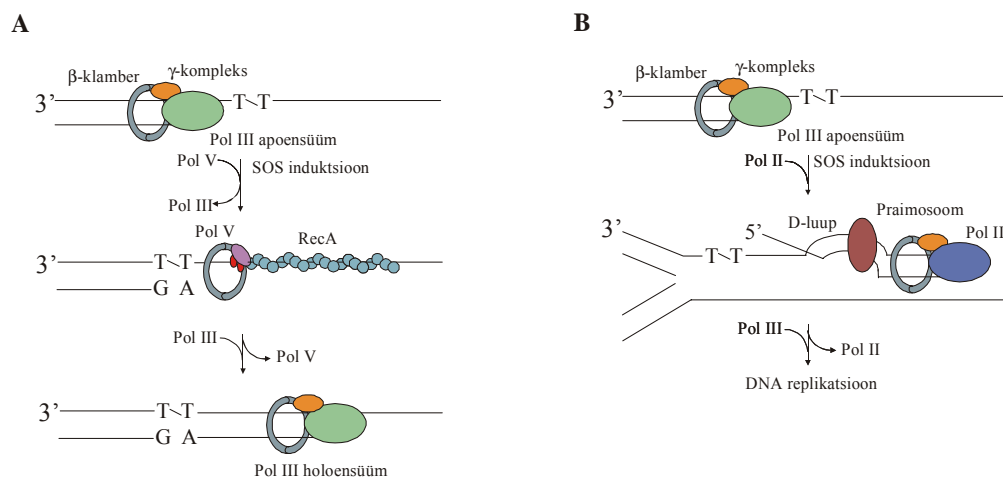
Bakteriraku elutegevuse käigus võivad tekkida DNA-d kahjustavad ühendid, mis modifitseerivad DNA ahelas asuvate nukleotiidide või vabade nukleosiid trifosfaatide lämmastikaluseid. Samuti võivad DNA kahjustusi tekitada ümbritsevast keskkonnast rakku sattunud keemilised ühendid või ultraviolettkiirgus. Peamine replikatiivne DNA polümeraas ei suuda jätkata DNA sünteesi kohas, kus DNA ahelas on kahjustatud nukleotiidi ja replikatsioon peatub. Kui DNA sünteesi ei suudeta jätkata, bakterirakk hakkab hukkuma.

5. 1. Kahjustatud nukleotiidide ületamine DNA sünteesil

Erinevalt peamisest replikatsiooni läbiviivast DNA polümeraasist suudavad SOS-indutseeritavad DNA polümeraasid jätkata DNA sünteesi ka keemiliselt modifitseeritud nukleotiidide korral (Wagner ja Nohmi, 2000; Napolitano jt., 2000). Replikatsiooni peatumisel asendatakse replikatsioonikahvlis peamine replikatsiooni

läbiviiv DNA polümeraas ühega SOS-indutseeritavatest DNA polümeraasidest, mis lühiajaliselt jätkab DNA sünteesi. See, milline DNA polümeraas valitakse replikatsiooni takistavast DNA kahjustusest ülesaamiseks, sõltub DNA kahjustuse tüübist ja DNA järjestuse iseärasustest (Napolito jt., 2000). Näiteks ultraviolettkiirguse poolt tekitatud tümidiindimeeride tõttu peatunud replikatsiooni jätkamine võib toimuda nii DNA polümeraas II kui ka DNA polümeraas V osalusel.

Kohas, kus DNA ahelas asub tümidiindimeer, viib DNA sünteesi läbi DNA polümeraas V. Kuna DNA polümeraas V-l puudub 3'-5' eksonukleasne aktiivsus, siis võib DNA polümeraas V asetada DNA sünteesil tümidiini dimeeri vastu A nukleotiidide asemel mõne teise nukleotiidi ja põhjustada sellega ühenukleotiidseid asendusmutatsioone (Joonis 3A) (Goodman, 2000; Murli jt., 2000; Napolitano jt., 2000).



Joonis 3. UV kahjustuse tõttu tekkinud tümidiindimeeri poolt peatatud replikatsiooni jätkamisel võivad osaleda *E. coli* rakkudes DNA polümeraas V ja II. DNA polümeraas III ei suuda ületada tümidiindimeeri. A) DNA polümeraas V jätkab replikatsiooni positsioonis, kus asub tümidiindimeer. B) Replikatsiooni taasalustamiseks on vajalik DNA polümeraas II osalus.

DNA polümeraas II osaleb replikatsiooni taaslustamisel. Kahjustatud positsioonile järgnevas alas tekitatakse DNA kaksikahelasse D–ling ja moodustatakse replikatsiooni taaslustamiseks vajalik praimosoom. Praimosoomi assambleerimisest võtavad osa valgud PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaB, DnaC ja DnaG. Moodustunud praimosoomilt DNA polümeraas III apoensüüm DNA sünteesi alustada ei suuda. DNA sünteesi viib lühiajaliselt läbi DNA polümeraas II, luues sobivad tingimused DNA polümeraas III tööks, mis jätkab edasist DNA sünteesi (Joonis 3B) (Goodman, 2000). N–2–atsetüülaminofluoriini (AAF) poolt tekitatud DNA kahjustuse tõttu peatunud replikatsiooni jätkamiseks on *E. coli* rakkudes kaks erinevat võimalust. Kahjustatud nukleotiidi on võimelised ületama nii DNA polümeraas II kui ka DNA polümeraas V. Guaniiniga kovalentselt seondunud N–2–atsetüülaminofluoriini tõttu võib DNA polümeraas V tekitada DNA sünteesil ühenukleotiidseid deletsioone, põhjustades sellega –1 raaminihete teket (Napolitano jt., 2000). DNA polümeraas II ületab N–2–atsetüülaminofluoriiniga seondunud nukleotiidi, tekitades kahenukleotiidilise deletsiooni ja põhjustab sellega DNA kodeerivasse alasse sattudes –2 raaminihke (Napolitano jt., 2000; Becherel ja Fuchs, 2001).

Samuti on näidatud DNA polümeraas V osalemist benso(a)püriini (BaP) poolt modifitseeritud nukleotiidi ületamisel DNA replikatsioonil. Benso(a)püriini poolt keemiliselt modifitseeritud guaniinile võidakse replikatsioonil jätta nukleotiidi vastu asetamata. Selle tulemusel tekib kahjustatud nukleotiidi kohale ühenukleotiidiline deletsioon, mis põhjustab -1 raaminihet. Sellise vea võib põhjustada nii DNA polümeraas IV kui ka DNA polümeraas V (Napolitano, 2000).

Sarnaselt DNA polümeraasidega II ja V osaleb ka DNA polümeraas IV teatud tüüpi DNA kahjustuste ületamisel, võimaldades DNA kahjustuse kohal peatunud replikatsiooni jätkata.

Üheks võimaluseks jätkata peatunud replikatsiooni on DNA sünteesil kahjustatud nukleotiidi vahele jätmine e. kahjustatud nukleotiidist praimeri ülelibistamine. On näidatud, et kahjustatud positsioonis lühikeste mononukleotiidsete korduste puhul põhjustab DNA polümeraas IV poolt läbiviidud DNA süntees ühenukleotiidilisi deletsioone. DNA polümeraas IV struktuuri iseärasused võimaldavad tekitada kodeerivas ahelas kahjustatud nukleotiidi kohale lünga ja sünteesitavasse DNA ahelasse lülitatud nukleotiid paardub järgmisega, mis sisaldab

modifitseeritud nukleotiidiga sama lämmastikalust (Napolitano jt., 2000; McKenzie jt., 2001). DNA polümeraas IV poolt põhjustatud ühenukleotiidilisi deletsioonide teket põhjustab näiteks guaniiniga seondunud BaP (Napolitano jt., 2000).

Arvatakse siiski, et enamuste bakterirakus esinevate DNA kahjustuste ületamisega tulevad toime DNA polümeraas II ja V. DNA polümeraas IV peamiseks ülesandeks bakterirakus peetakse ebasobivates kasvutingimustes mutatsioonide tekitamist, millest mõned võivad osutada bakterile kasulikuks, võimaldades kohaneda uue keskkonnaga (Rosenberg, 2001; Bull jt., 2001; Kim jt., 2001).

5. 2. SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside osalus stressi poolt induktsioonile mutageneesis *E. coli* rakkudes

SOS-indutseeritavad DNA polümeerasid võivad osaleda DNA sünteesil ka siis, kui DNA ei ole kahjustatud. Kuna *E. coli* DNA polümeraasidel IV ja V puudub 3'-5' eksonukleasaasne aktiivsus ja arvatakse, et võrreldes peamise replikatiivse DNA polümeraasiga on nende DNA polümeraaside aktiivtsenter paidlikum (Ling jt., 2001), siis põhjustab nende poolt läbiviidud DNA süntees bakterirakkudes mutatsioonisageduse tõusu (Bull jt., 2001; Kim jt., 2001; Boshoff jt., 2003). SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside ekspressioonitaseme tõus bakterirakus ebasobivate kasvutingimuste korral on üheks võimaluseks tõsta bakteripopulatsioonis mutatsioonide tekkesagedust ja sellega suurendada populatsiooni adapteerumisvõimet (Kivisaar, 2003; Bjedov jt., 2003).

Esmakordselt näidati F' plasmiidis asuva *lac* raaminihke testsüsteemiga, et laktoosi minimaaltassidel nälgivates *E. coli* rakkudes toimuvad mutatsiooniprotsessid erinevad olulisel määral kasvavas kultuuris toimuvatest mutatsiooniprotsessidest (Cairns ja Foster, 1991). Samuti selgus, et selliste nn. adaptiivsete mutatsioonide teke nälgivas bakterikultuuris sõltus SOS vastusest bakterirakus (Cairns ja Foster, 1991). Nälgivates *E. coli* rakkudes toimunud mutatsioonidest olid enamik ühenukleotiidset deletsioonid mononukleotiidsetes kordusjärjestustes (Rosenberg jt., 1994; Foster ja Trimarchi, 1994). Hiljem näidati, et Lac⁺ revertantide teke nälgivates *E. coli* rakkudes sõltus DNA polümeraas IV olemasolust bakterirakkudes (McKenzie jt., 2001).

λ faagi *cII* geenis tekkivaid mutatsioone uurides leiti, et kahjustamata DNA korral põhjustab DNA polümeraas IV poolt läbiviidud DNA süntees olukorras, kus DNA polümeraas IV taset on rakkudes kunstlikult tõstetud kasvavates *E. coli* rakkudes kõige sagedamini ühenukleotiidilisi deletsioone ja väiksema tõenäosusega asendusmutatsioone. Nii olid DNA polümeraas IV poolt tekitatud mutatsioonidest 2/3 raaminihke mutatsioonid ja 1/3 ühenukleotiidilised asendusmutatsioonid (Wagner ja Nohmi, 2000). Ühenukleotiidsete asendusmutatsioonide korral toimus asendus eelistatult positsioonis, millele eelnes sünteesitavas DNA ahelas 5' positsioonis olev G nukleotiid. Kodeerivas DNA ahelas asuvale A, T või C nukleotiidile lülitati vastu kõige sagedamini C nukleotiid. Suurima tõenäosusega leidis aset mutatsioon, kus C nukleotiidile asetati sünteesitavas DNA ahelas vastu C nukleotiid, mille tulemusena toimus C→G asendusmutatsioon. -1 raaminihke korral toimus deletsioon samuti eelistatult sünteesitavas DNA ahelas 5' positsioonis asuva G nukleotiidi järel (Wagner ja Nohmi, 2000).

Kuna looduses esinevad bakteripopulatsioonid kas biofilmi või mikrokolooniatena, siis uuriti mutatsiooniprotsesse vananevates *E. coli* kolooniates - tingimustes, mis võiksid olla looduslikule bakterite elukeskkonnale võimalikult sarnased. Mutatsioonisagedust vananenud koloonias olevates *E. coli* rakkudes hinnati Rif-resistentsete mutantide tekke põhjal. Selgus, et mutatsioonisagedus oli tõusnud 7 päeva vanustes kolooniates keskmiselt 7 korda võrreldes 1 päeva vanustes kolooniates olevate rakkude mutatsioonisagedusega (Taddei jt., 1997; Bjedov jt., 2003). Kasvavas bakterikoloonias tekib olukord, kus koloonia sisemuses olevad bakterirakud on jõudnud statsionaarsesse kasvufaasi, samal ajal kui koloonia pinnal olevad bakterirakud on eksponentsiaalses kasvufaasis. Koloonia pinnal olevate bakterirakkude intensiivse metabolismi tõttu on bakterikoloonia sisemuses anaeroobne keskkond. Kui süsinikuallikas kasvukeskkonaast on ära kasutatud ja metabolism bakterirakkudes aeglustub, jõuab õhuhapnik koloonias olevatesse rakkudesse. Hapniku olemasolu metaboolselt mitteaktiivsetes rakkudes põhjustab oksüdatiivset stressi. Reaktiivsete hapnikuühendite poolt tekitatud DNA kahjustused kutsuvad *E. coli* rakkudes esile SOS-vastuse (Taddei jt., 1995), mis omakorda põhjustab SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside ekspressioonitaseme tõusu. Bjedov jt. (2003), näitasid oma katsetes, et 95% vananevates *E. coli* kolooniates tekkinud mutatsioonidest sõltusid funktsionaalse

RecA valgu olemasolust ja 73% SOS-indutseeritava DNA polümeraas II olemasolust bakterirakus.

5. 3. SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside olulisus bakterite pikaajalisel ellujäämisel

SOS-indutseeritud DNA polümeraaside osalust on uuritud ka GASP (*Growth Advantage in Stationary Phase*) fenotüübi tekkel ja enamkohastunud subpopulatsioonide kujunemisel pikka aega vedelsöötmes nälgitud *E. coli* kultuuris. Toitainete puudumine kasvukeskkonnas kutsub bakterirakus esile terve rea muutusi, mille tõttu suurem osa rakkudest kogu populatsioonis hukkub. Ellujäänud subpopulatsioon on võrreldes populatsiooni ülejäänud rakkudega paremini kohastunud ebasobivate kasvutingimustega ja saavutavad populatsioonis ülekaalu. Paremini kohastunud populatsiooni arvukus tõuseb seni, kuni toitained kasvukeskkonnast on ära kasutatud ja seejärel nende kasv pidurdub. Selles populatsioonis võib jälle tekkida järgmine subpopulatsioon, mis konkureerib eelmise, vähem kohastunud kultuuri välja. Tekivad nn. GASP-i lained. Uurides GASP fenotüübi tekkepõhjuseid leiti, et enamus mutatsioone asusid *rpoS* geeni kodeerivas alas, mis vähendasid statsionaarse kasvufaasi sigma faktori σ^S -i aktiivsust (Zambrano jt., 1993; Zambrano ja Kolter, 1996).

Yeiser jt. (2000) uurisid *E. coli* SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside osalust bakteripopulatsioonide konkureerimisel. Konkurentsi katsetest selgus, et nii DNA polümeraas II, IV kui ka V suhtes defektsed *E. coli* tüved olid võrreldes algse tüvega madalama konkurentsivõimega ja tõrjuti algse tüve poolt segakultuurist välja. Üksteisega konkureerides olid erinevate DNA polümeraaside suhtes defektsed tüved sarnase kohasusega. See ilmneb katsetest, kus selgus, et paljude algselt identsete segakultuuride kasvatamisel hakkas pooltel juhtudel domineerima ühe ja pooltel juhtudel teise DNA polümeraasi suhtes defektne tüvi (Yeiser jt., 2002).

6. SOS-indutseeritavad DNA polümeraasid teistes bakterites

6. 1. DNA pol V analoogid teistes bakterites

DNA polümeraasi V kodeerivaid geene on graam-negatiivsete bakterite puhul leitud vaid *E. coli* ja *Salmonella typhimurium*-i genoomidest. Enamuste graam-negatiivsete bakterite, sealhulgas ka perekonna *Pseudomonas*-e esindajate genoom ei sisalda DNA polümeraas V kodeerivaid geene, küll aga on *E. coli umuDC* homologe leitud paljudest suurtest konjugatiivsetest plasmiididest (Kim ja Sundin, 2000).

Taimepatogeen *Pseudomonas syringae* on oma looduslikus keskkonnas - taimemehe pinnal ehk fülloosfääris pidevalt eksponeeritud ultraviolettkiirgusele. Kim ja Sundin (2000) näitasid oma artiklis, et *P. syringae* plasmiidist pPSR1 leitud *rulAB* geene sisaldavad plasmidi kandvad *P. syringae* rakud taluvad UV kiirgust paremini kui rakud, mis sisaldavad *rulAB* geenide suhtes defektset plasmidi. Samuti oli UV kiirguse poolt indukseeritud mutatsioonide tekkesagedus plasmidi pPSR1 kandvates *P. syringae* rakkudes oluliselt suurem võrreldes *P. syringae* rakkudega, mis kandsid rikutud *rulAB* geene sisaldavat plasmidi. Mutatsioonisageduse hindamiseks *P. syringae* rakkudes jälgiti Rif-resistentsete mutantide teket. Plasmiidist pPSR1 leitud *rulAB* geenid sarnanevad DNA järjestuselt ennustatud aminohappelise järjestuse tasemel *E. coli umuDC* geenidelt ennustatud aminohappelisele järjestusele vastavalt 30,9 ja 41,5 % ulatuses (Kim ja Sundin, 2000).

E. coli umuDC geenide homologe on leitud veel *Salmonella typhimurium*-i plasmiididest TP110 ja R46 ning 60 mDa virulentsusplasmiidist, *E. coli* plasmiidist pKM101, *Serratia marcescens*-i plasmiidist R471a, *Proteus rettgeri* plasmiidist R391 (Runyen-Janecky jt., 1999) ja *Pseudomonas putida* plasmiidist pWW0 (Tark, 2003)

6. 2. SOS-indutseeritavate DNA polümeraaside osalus patogeensete bakterite peremeesorganismi koloniseerimisel toimuvates ja virulentsust tagavates mutatsiooniprotsessides

Peremeesorganismi koloniseerimisel tuleb patogeensetel bakteritel taluda erinevaid stressitingimusi: bakterite invasiooni poolt esilekutsud immuunvastust, toitainete puudust, hüpoksiat ning reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite või antibakteriaalse ravimina peremeesorganismi viidud antibiootikumide olemasolu kasvukeskkonnas. Ebasobivad keskkonnatingimused induitseerivad bakterirakus SOS vastuse. Mitmete nii graam-positiivsete kui graam-negatiivsete bakterite genoom sisaldab replikatiivset DNA polümeraasi kodeeriva *dnaE* geeni teist analoogi *dnaE2* (Boshoff jt., 2003; le Chatelier jt., 2003; Bruck jt., 2003).

Erinevalt *E. coli*-st ei ole inimese patogeeni *Mycobacterium tuberculosis*-e rakkudes Y perekonda kuuluvate *dinP* ja *dinX* geenide poolt kodeeritud DNA polümeraaside ekspressioon SOS vastuse poolt induitseeritud (Brooks jt., 2001). Ometi näitasid Boshoff jt. (2003), et UV kiirguse poolt tekitatud DNA kahjustused põhjustavad RecA valgust sõltuvalt *M. tuberculosis*-e rakkudes mutatsioonisageduse tõusu. Ainus DNA polümeraasi kodeeriv geen, mille ekspressioon oli DNA kahjustuste poolt induitseeritav, oli C perekonda kuuluva peamise replikatsiooni läbiviiva DNA polümeraasi kodeeriva geeni *dnaE* analoogi kodeeriv geen *dnaE2*. Rif-resistantsete mutantide teket hinnates selgus, et UV kiirguse poolt induitseeritud mutagenees *M. tuberculosis*-e rakkudes sõltus funktsionaalse DnaE2 olemasolust. Samuti sõltub DnaE2 olemasolust *M. tuberculosis*-e rakkudes olulisel määral bakteripopulatsiooni virulentsus ja elumus peremeesorganismis (Boshoff jt., 2003).

6. 3. Vigutegevad DNA polümeraasid madala GC sisaldusega graam-positiivsetes bakterites

DNA replikatsioon gram positiivsetes bakterites, nagu näiteks *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ja *Streptococcus pyogenes*, vajab eelpool *E. coli* näitel kirjeldatud mudelist erinevalt kahe erineva C perekonda kuuluva replikatiivse DNA polümeraasi osalust (le Chatelier jt., 2003; Bruck jt., 2003). Dervyn

jt. näitasid, et *B. subtilis*-e rakkudes viib juhtiva DNA ahela sünteesi läbi PolC, samas kui mahajääva DNA ahela sünteesi eest vastutab peamiselt DnaE (Dervyn jt., 2001). Hiljuti näidati *in vitro* katsetes, et nii *B. subtilis*-e kui ka *S. pyogenes*-e DnaE on võimelised DNA sünteesil ületama teatud tüüpi kahjustatud nukleotiide. Mõlema organismi DnaE võis DNA kahjustuse ületamisel tekitada nii asendusmutatsioone kui ka ühenukleotiidseid deletsioone (le Chatelier jt., 2003; Bruck jt., 2003).

Samuti selgus, et DnaE ekspressiooni tase *B. subtilis*-e rakkudes sõltub SOS vastusest bakterirakkudes. Transkriptsioon *dnaE* geeni promootorilt tõusis DNA kahjustuse korral 3-6 korda (le Chatelier jt., 2003). *B. subtilis*-e genomist on leitud ka *E. coli* Y perekonda kuuluvate vigutegevate DNA polümeraaside IV ja V homoloogid. *B. subtilis*-e valk YqjH on *E. coli* Din B valguga 36% ja YqjW *E. coli* UmuC valguga 26% ulatuses identne. Sung jt. (2003) katsed näitasid, et *B. subtilis*-e UV tundlikkus sõltub DNA polümeraasi YqjH olemasolust bakterirakus, samas kui UV-indutseeritud mutageneesis osalevad nii YqjH kui ka YqjW. Mutatsioonisagedust hinnati His⁺ prototroofsete revertantide tekke alusel, mis võimaldas näha erinevate asendusmutatsioonide toimumist *B. subtilis*-e rakkudes. Y perekonna DNA polümeraasidest sõltuv UV-indutseeritud mutagenees on mõjutatud DnaE ja PolC hulgast *B. subtilis*-e rakkudes (le Chatelier jt., 2003). See, kuidas DnaE ja PolC osalevad *B. subtilis*-e rakkudes toimivas UV-indutseeritud mutageneesis, ei ole veel teada.

Sung ja Yasbin (2002) näitasid, et mutatsioonisagedus *B. subtilis*-e statsionaarse faasi rakkudes tõuseb aminohapete nälja korral. Statsionaarses kasvufaasis sõltus His⁺ mutantide teke Y perekonna DNA polümeraasi YqjH olemasolust rakkudes kuid ei olnud mõjutatud YqjW poolt (Sung jt., 2003). Erinevalt *E. coli* nälgivates rakkudes toimuvatest mutatsiooniprotsessidest ei sõltu *B. subtilis*-e statsionaarse kasvufaasis olevates rekkudes toimuv mutagenees RecA valgu olemasolust bakterirakkudes, vaid sõltub post-eksponentsiaalset diferentseerumist reguleerivate transkriptsioonifaktorite ComA ja ComK funktsionaalsusest (Sung ja Yasbin, 2002; Sung jt., 2003).

Materjal ja meetodika

1. Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutatud bakteritüved ning plasmiidid on näidatud tabelis 3.

Tabel 3. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi või Plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB⁺ lacI^h lacZΔM15)</i>	Carter jt. (1985)
C118 <i>λpir</i>	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am)</i>	Herrero jt. (1990)
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3(τ_B m_B) recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1-1</i>	Boyer jt. (1969)
DH5a	<i>supE44 ΔlacU169(f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Tn4652	Bayley jt. (1977)
PaW85 <i>dinB::tet</i>	DNA polümeraas IV suhtes defektne <i>P. putida</i> tüvi	Käesolev töö
PaW85 <i>recA::tet</i>	RecA valgu suhtes defektne <i>P. putida</i> tüvi	Käesolev töö
Plasmiidid		
pBluescript KS(+)	Kloneerimisvektor (Ap ^r)	Stratagene
pGP704L	Homoloogiliseks rekombinatsiooniks kasutatav plasmid (Ap ^r)	Pavel jt. (1994)
pKT240 (1983)	Keskmise koopiaarvuga laia peremeesringi kloneerimisvektor (Ap ^r , Km ^r)	Bagdasarjan jt.
pPR9TT	Single-copy broad-host-range vector (Cm ^r ; Amp ^r)	Santos jt. (2001)
pPU1930	pUC19 mis sisaldab konstitutiivse promotoriga <i>pheA</i> geeni	Nurk jt., (1993)
pKSpheA56+A	pBluescript KS(+) kuhu on EcoRV saiti inserteeritud PCR-I abil amplifitseeritud <i>pheA</i> järjestus kuhu on inserteeritud A nukleotiid	Käesolev töö
pPUpheA56+A	Segment <i>pheA</i> geeni järjestusest, mis on kloneeritud plasmidi pPU30 <i>XbaI-BclI</i> fragmendina plasmiidist pKSpheA56+A, et asendada originaal <i>pheA</i> järjestus	Käesolev töö
pKTpheA56+A	Mutantne <i>pheA</i> geen, mis on transkribeeritud konstitutiivse promotori alt kloneeritud <i>SacI-PvuII</i> fragmendina plasmiidist pPUpheA56+A plasmidi pKT240	Käesolev töö
pKTpheA22TGA	Mutantne <i>pheA</i> geen plasmiidis pKT240, kus aminohapet Leu kodeeriva koodoni CTG asemel asub <i>pheA</i> geeni 22 positsioonis stoppkoodon TGA	Käesolev töö
pKTpheA22TAA	Mutantne <i>pheA</i> geen plasmiidis pKT240, kus aminohapet Leu kodeeriva koodoni CTG asemel asub <i>pheA</i> geeni 22 positsioonis stoppkoodon TAA	Käesolev töö
pKTpheA22TAG	Mutantne <i>pheA</i> geen plasmiidis pKT240, kus aminohapet Leu kodeeriva koodoni CTG asemel asub <i>pheA</i> geeni 22 positsioonis stoppkoodon TAG	Käesolev töö
pKSdinB	pBluescript KS(+), mis sisaldab PCR-ga amplifitseeritud <i>P. putida dinB</i> geeni kloneeritud <i>EcoRV</i> -ga avatud vektorisse	Käesolev töö
pKSdinB::tet	Tet ^r geen plasmiidist pBR322, mis on inserteeritud <i>Van91</i> -ga avatud <i>dinB</i> geeni keskele plasmiidis pKSdinB	Käesolev töö
pGP704dinB::tet	Plasmid pGP704 L, kuhu on kloneeritud <i>Acc65-XbaI</i> fragmendina <i>dinB::tet</i> järjestus plasmiidist pKSdinB::tet	Käesolev töö
pKSrecA	pBluescript KS(+), mis sisaldab PCR meetodiga amplifitseeritud <i>P. putida recA</i> geeni restriktasiga <i>EcoRV</i> avatud vektoris	Käesolev töö
pKSrecA::tet	Tet ^r geen plasmiidist pBR322, mis on kloneeritud restriktasiga <i>BclI</i> avatud <i>recA</i> geeni keskele plasmiidis pKSrecA	Käesolev töö
pGP704recA::tet	Plasmid pGP704 L, kuhu on kloneeritud <i>XbaI-Ecl136II</i> fragmendina <i>recA::tet</i> järjestus plasmiidist pKSrecA::tet	Käesolev töö
pRK2013	Abiplasmid pGP704 L konjugatsioonil	Figurski ja Helinski (1979)
pKSATGdinB	pBluescript KS(+), mis sisaldab PCR meetodil amplifitseeritud <i>P. putida dinB</i> geeni järjestust alates ATG initsiaator koodonist kloneeritud restriktasiga <i>EcoRV</i> avatud vektoris	Käesolev töö

Tabel 3. (Järg) Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid (Tabel algab lk. 25).

Bakteritüvi või Plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
pBRlactac	Ekspressioonivektor, sisaldab P_{tac} promootorit ja lac^R repressorvalku kodeerivat geeni plasmiidis pBR322	Ojangu jt., 2000
pBRlactacdinB	<i>dinB</i> plasmiidist pKSATGdinB kloneerituna <i>PstI-Acc65I</i> fragmendina plasmidi pBRlactac	Käesolev töö
p9TlactacdinB	<i>dinB</i> ekspressiooni kassett plasmiidist pBRlactacdinB kloneerituna <i>NheI-Acc65I</i> fragmendina restriktaasidega <i>XbaI</i> ja <i>Acc65I</i> avatud vektorisse pPR9TT	Käesolev töö
pREP4	LacI repressorvalku ekspresseeriv plasmiid	QIAGEN
pKTlacI	LacI repressorit kodeeriv geen plasmiidist pREP4 kloneerituna restriktaasiga <i>Ecl136II</i> avatud plasmidi pKT240	Käesolev töö
pBR322	koneerimisvektor (Tet^r , Ap^r)	Stratagene
pTetKS	Promootoriga tetratsükliini resistentsusgeen plasmiidist pBR322 kloneerituna plasmidi pBluescript KS(+)	Käesolev töö

Täissöötmena kasutasime LB söödet (Miller, 1972). Minimaalsöötmed valmistasime M9 baasil (Adams, 1959). Minimaalsööde sisaldas lisaks M9-le veel mikroelementide lahust (2,5 ml/l) (Bauchop ja Elsdén, 1960) ja süsinikuallikana kas glükoosi lõppkontsentratsiooniga 10 mM või fenooli lõppkontsentratsiooniga 2.5 mM. Tardsöötme valmistamiseks lisasime söötmele agarit 1,5 g/l.

Plasmiidide ja katkestusmutantide selektsiooniks kasutasime antibiootikume järgmise lõppkontsentratsiooniga: *E. coli* puhul ampitsilliini (Amp) (0,1 mg/ml), *P. putida* puhul karbenitsilliini (Cb) (1-3 mg/ml), klooramfenikooli (Cm) (1,5-3 mg/ml) ja tetratsükliini (Tet) (0,08 mg/ml) ning nii *E. coli* kui ka *P. putida* puhul kanamütsiini (Km) (0,05 mg/ml).

P. putida rakke kultiveerisime 30° C juures, *E. coli* tüvesid 37° C juures. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil.

2. Testsüsteemide konstrueerimine

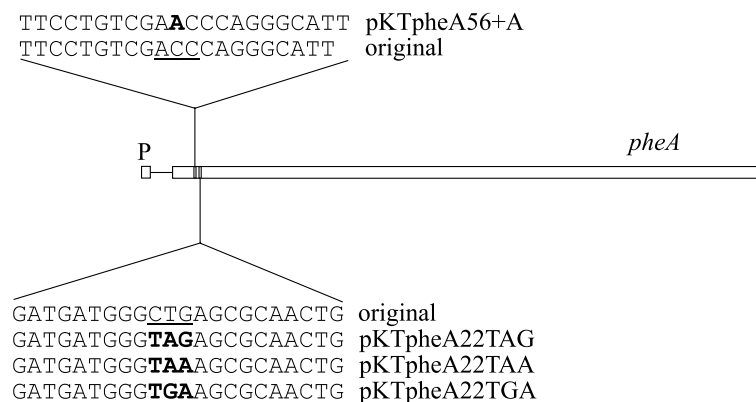
Ühenukleotiidsete deletsioonide detekteerimiseks konstrueerisime testsüsteemi, kus tekitasime *pheA* geeni kodeerivasse alasse +1 raaminihkemutatsiooni. Selleks lisasime fenooli monooksügenaasi 56. positsioonis asuvasse treoniini kodeerivasse koodonisse ACC ühe A nukleotiidi nii, et tekkis järjestus AACC (joonis 4). Selleks amplifitseerisime PCR meetodil *pheA* geeni fragmendi plasmiidist pPU1930 (Nurk jt., 1991) (Tabel 4).

Tabel 4. Töös kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus	Seandumiskoht
pheAup	5'-AAGGCGCTCCCGTAAGACA-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni kodeerivast alast positsioonides -40 kuni -22 aluspaari ülespoole jääva DNA regiooniga
pheA56+A	5'-GGTGATCATAATGTTGCTAATGCCCTGGGTTTCGACAGGAACATTGCTGCG-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni stardikoodonist ATG allapoolejääva alaga positsioonis 147 kuni 195 aluspaari
pheA22TGA	5'-CGCTTACCCATCATCAAAAATGACG CTA-3'	komplementaarsed <i>pheA</i> geeni translatsiooni stardikoodonist ATG 42 kuni 71 aluspaari allapoole jääva DNA regiooniga
pheA22TAA	5'-CGCTTACCCATCATCAAAAATGACG CTA-3'	komplementaarsed <i>pheA</i> geeni translatsiooni stardikoodonist ATG 42 kuni 71 aluspaari allapoole jääva DNA regiooniga
pheA22TAG	5'-CGCTTACCCATCATCAAAAATGACG CTA-3'	komplementaarsed <i>pheA</i> geeni translatsiooni stardikoodonist ATG 42 kuni 71 aluspaari allapoole jääva DNA regiooniga
pheA_{ts}	5'-GTTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	paardub <i>pheA</i> geenis alaga positsioonides 295 kuni 313 nukleotiidi allapoole translatsiooni stardikoodonist ATG
tetO_c	5'-ATGACGATGACCGCATTATT-3'	seondub <i>tet</i> geenile positsioonis 1-20, suunaga geenist algusest välja
dinBRev	5'-GCGGATCCAGGCGTGCATTATTAG-3'	komplementaarne <i>dinB</i> geeni stoppkoodoni regiooniga, suunaga geeni sisse
dinBFw	5'-GGCCTTTTCTCGAATCTGGTTGCG-3'	komplementaarne <i>dinB</i> geeni ATG piirkonnaga, suunaga geeni sisse
dinBNde	5'-CATATGTCCTTGCGCAAGATCATCCA-3'	komplementaarne alaga -3 kuni +23 nukleotiidi <i>dinB</i> geeni initsiaatorkoodoni ATG suhtes
RecAFw	5'-AACAAAGAAGCGCGCCTTGTC-3'	komplementaarne <i>recA</i> geeni initsiaatorkoodonist ATG -66 kuni -45 nukleotiidi ülespoole jääva DNA regiooniga
RecARev	5'-ATCAGCTTCAGCAGCAGCAGCTT-3'	paardub translatsiooni stoppkoodonist 37 kuni 60 nukleotiidi allapoole jääva alaga

PCR reaktsiooniks kasutasime praimerit pheAup, mis on komplementaarne *pheA* geeni kodeerivast alast positsioonides -40 kuni -22 aluspaari ülespoole jääva DNA regiooniga, ja pheA56+A, mis paardub alaga, mis jääb *pheA* geeni translatsiooni stardikoodonist ATG allapoole positsioonides 147 kuni 195 aluspaari. Amplifitseeritud DNA fragmendi kloonisime restriктаasiga *EcoRV* avatud vektorisse pBluescript KS(+). Saadud plasmidi nimetasime pKSpheA56+A. A nukleotiidi insertsiooni tulemusena kadus *pheA* kodeerivas järjestuses restriктаasi *SalI* lõikesait. +1 raaminihkemutatsiooni olemasolu plasmidis pKSpheA56+A asuvas *pheA* geeni fragmendis kontrollisime DNA sekveneerimisega. Edasi kloonisime plasmidist pKSpheA56+A välja lõigatud +1 raaminihke mutatsiooni kandva fragmendi restriктаaside *XbaI* ja *BclI* abil plasmidi pPU1930, asendades *XbaI* ja *BclI* lõikesaitide vahelise algse DNA järjestuse mutatsiooni kandva DNA järjestusega. Saadud

plasmidi nimetasime pPUpheA56+A. Mutatsiooni sisaldava plasmidi pPU1930 derivaadi tegime kindlaks *SalI* lõikesaidi puudumise alusel *pheA* geenis. Plasmidist pPUpheA56+A viisime restriктаasidega *SacI* ja *PvuII* lõigatud fragmendi, mis sisaldas konstitutiivselt ekspresseeritava promotori kontrolli all oleva +1 insertiooniga *pheA* geeni, samade ensüümidega avatud laia peremeesringiga vektorisse pKT240. Selle tulemusel saime plasmidi pKTpheA56+A.



Joonis 4. *P. putida* rakkudes toimuvate ühe nukleotiidsete deletsioonide (plasmiid pKTpheA56+A) ja erinevate asendusmutatsioonide (plasmiidid pKTpheA22TAG, pKTpheA22TAA ja pKTpheA22TGA) detekteerimiseks konstrueeritud testsüsteemid. Joonisel on näidatud fragment fenooli monooksügenaasi kodeeriva *pheA* geeni algsest järjestusest ja selle mutantsetest variantidest erinevates testsüsteemides. P tähistab testsüsteemides *pheA* geeni ees olevat konstitutiivselt transkribeeritavat promotorit.

Asendusmutatsioonide detekteerimist ja uurimist võimaldavate testsüsteemide (Joonis 4) konstrueerimisel kasutasime kaheastmelist PCR meetodit. Lasime sünteesida praimerid pheA22TGA, pheA22TAA ja pheA22TAG, mis sisaldasid erinevaid mutatsioone *pheA* geenis, asendades fenooli monooksügenaasi 22. positsioonis asuvat leutsiini kodeeriva koodoni CTG kolme erineva translatsiooni stoppkoodoniga TGA, TAA või TAG. Asendusmutatsioone sisaldavad praimerid olid komplementaarsed *pheA* geeni translatsiooni stardikoodonist ATG 42 kuni 71 aluspaari allapoole jääva DNA regiooniga. Esimese PCR reaktsiooni viisime läbi kasutades praimerit pheAup ja sellel vastaspraimeritena praimereid pheA22TGA, pheA22TAA või pheA22TAG. Selleks, et eemaldada esimese reaktsiooni järgsed

praimerid PCR-i segust, viisime läbi ExoI töötuse. Puhastatud PCR produkti kasutasime teises PCR reaktsioonis ühe praimerina. Vastaspraimeriks oli pheAts, mis paardub *pheA* geenis alaga positsioonides 295 kuni 313 nukleotiidi allapoole translatsiooni stardikoodonist ATG. Amplifitseeritud DNA fragmendid kloneerisime restriктаasiga *EcoRV* avatud vektorisse pBluescript KS(+). Mutatsioonide olemasolu amplifitseeritud DNA fragmentides kontrollisime DNA sekveneerimisega. Kloneerimise järgmistel etappidel kasutasime sama strateegiat kui eelpool kirjeldatud raaminihkemutatsioonide detekteerimiseks konstrueeritud testsüsteemi pKTpheA56+A puhul. Saadud translatsiooni stoppkoodoneid sisaldavaid testsüsteeme kandvad plasmiidid said nimetuse pKTpheA22TGA, pKTpheA22TAA ja pKTpheA22TAG.

3. *P. putida* DNA polümeraas IV ja RecA suhtes defektsete tüvede konstrueerimine

dinB ja *recA* geenide nukleotiidses järjestuses leidsime *P. putida* tüve KT2440 (geneetiliselt identne tüvega PaW85) genoomi andmebaasist (www.tigr.org.). *dinB* geeni amplifitseerisime PCR meetodil *P. putida* tüve PaW85 genoomselt DNA-lt, kasutades primereid dinBFw ja dinBRev. Primerid dinBFw ja dinBRev seonduvad vastavalt *dinB* geeni initsiaatorkoodonist ATG -518 kuni -496 aluspaari ülespoole jääva DNA regiooniga ja stoppkoodonist TGA 24 kuni 47 nukleotiidi allapoole jääva piirkonnaga. Amplifitseeritud *dinB* geeni sisaldava DNA fragmendi kloneerisime restriктаasiga *EcoRV* avatud vektorisse pBluescript KS(+). Saadud plasmiid sai nimetuse pKSdinB. *dinB* geeni katkestamiseks kloneerisime plasmiidist pBR322 restriктаaside *EcoRI* ja *Van91I* abil lõigatud tetratsükliini resistentsusgeeni sisaldava fragmendi restriктаasiga *Van91I* avatud *dinB* geeni keskele plasmiidis pKSdinB. Restriksioonil tekkinud kleepuvad üksikahelalised DNA otsad täitsime Klenowi polümeraasi abil. Saadud plasmiidist pKSdinB::tet viisime restriктаaside *Acc65I* ja *XbaI* abil lõigatud ligikaudu 2,3 kb suuruse *tet* geeniga katkestatud *dinB* geeni sisaldava fragmendi samade ensüümidega avatud plasmidi pGP704L. Saadud plasmidi pGP704dinB::tet abil asendasime homoloogilise rekombinatsiooni teel *P. putida* tüves PaW85 funktsionaalse *dinB* geeni katkestatud geeniga. Selleks viisime plasmidi pGP704dinB::tet, mis replitseerub vaid *E. coli* tüves CC118 λpir,

konjugatsiooni teel *P. putida* tüve PaW85 rakkudesse, kus see plasmiid ei replitseeru. *dinB* geeni katkestust tüves PaW85 *dinB::tet* kontrollisime PCR-i abil.

recA geeni suhtes defektse *P. putida* tüve konstrueerimiseks amplifitseerisime PCR meetodil *P. putida* tüve PaW85 genoomselt DNA-lt *recA* geeni, kasutades primereid RecAFw ja RecARev. RecAFw on komplementaarne *recA* geeni initsiaatorkoodonist ATG -66 kuni -45 nukleotiidi ülespoole jääva DNA regiooniga, RecARev paardub translatsiooni stoppkoodonist 37 kuni 60 nukleotiidi allapoole jääva alaga. Amplifitseeritud *recA* geeni sisaldava DNA fragmendi kloneerisime restriктаasiga *EcoRV* avatud vektorisse pBluescript KS(+). Saadud plasmidi nimetasime pKSrecA. Plasmiidist pBR322 restriктаasidega *EcoRI* ja *Van9II* tekitatud ligikaudu 1,3 kb suuruse tetratsükliini resistentsusgeeni sisaldava fragmendi kloneerisime restriктаasiga *BclII* avatud *recA* geeni keskele plasmiidis pKSrecA. Restriksioonil tekkinud kleepuvad üksikahelalised DNA otsad täitsime Klenowi reaktsiooniga. Saadud plasmiidist pKSrecA::tet viisime restriктаaside *Ecl136II* ja *XbaI* abil lõigatud tetratsükliini resistentsusgeeniga katkestatud *recA* geeni sisaldava fragmendi samade ensüümidega avatud plasmidi pGP704L, mille tulemusena saime plasmidi pGP704recA::tet. Saadud plasmidi pGP704recA::tet kasutades asendasime homoloogilise rekombinatsiooni teel *P. putida* tüves PaW85 funktsionaalse *recA* geeni katkestatud geeniga ülalkirjeldatud meetodi abil. *recA* geeni katkestust tüves PaW85 *recA::tet* kontrollisime PCR-i abil. Samuti võrdlesime *recA* geeni suhtes defektse *P. putida* tüve ja algse tüve UV kiirguse taluvust Milleri meetodil (Miller, 1992).

4. *P. putida dinB* geeni üleekspressioon

Selleks, et konstrueerida plasmiid, millega oleks võimalik bakterirakkudes üleekspressseerida DinB valku, amplifitseerisime ilma regulatoorse alata *dinB* geeni alates translatsiooni stardikoodonist ATG kuni stoppkoodonini TAA PCR meetodil *P. putida* kromosomaalselt DNA-lt. PCR reaktsioonis kasutasime primereid dinBRev ja dinBNde, mis on komplementaarne alaga positsioonides -3 kuni +23 nukleotiidi *dinB* geeni initsiaatorkoodoni ATG suhtes. Amplifitseeritud DNA fragmendi kloneerisime restriктаasiga *EcoRV* avatud vektorisse pBluescript KS(+). Valisime konstrukti, kus *dinB* geen oli vektorisse kloneerunud vastassuunaliselt *lac* promootorilt lähtuvale

transkriptsioonile. Saadud plasmidi nimetasime pKSATGdinB. Kasutades vektori pKSATGdinB multikloneerimisjärjestuses olevaid ensüümide *PstI* ja *Acc65I* lõikesaite, kloneerisime *dinB* geeni sisaldava fragmendi samade ensüümidega avatud vektorisse pBRlacItac nii, et transkriptsioon *dinB* geenilt oli kontrollitud P_{tac} promootori ja plasmidis pBRlacItac asuva *lacI* geeni poolt kodeeritud repressorvalgu poolt. Saadud plasmidi nimetasime pBRlacItacdinB. Selleks, et *dinB* geeni *P. putida* rakkudes üleekspresserida, kloneerisime ekspresioonikasseti restriктаaside *NheI* ja *Acc65I* fragmendina restriктаasidega *XbaI* ja *Acc65I* avatud ühekoopialisse laia peremeesringiga plasmidi pPR9TT. Selle tulemusena saime plasmidi p9TTlacItacdinB. Kuna transkriptsioon plasmidis p9TTlacItacdinB asuvalt *dinB* geenilt ei olnud täielikult represseritud ja seda plasmidi kandvad *P. putida* rakkud ei olnud eluvõimelised, viisime selleks, et pärssida plasmidselt *dinB* geenilt toimuvat transkriptsiooni *P. putida* rakkudes mitteindutseeritud tingimustes repressorvalku kodeerivat *lacI* geeni sisaldava plasmidi pKTlacI. Plasmidi pKTlacI konstrueerimiseks kloneerisime plasmidist pREP4 (QIAGEN) *lacI* geeni restriктаaside *Eca47III* ja *SmaI* fragmendina restriктаasiga *Ecl136II* avatud vektorisse pKT240. *dinB* geeni üleekspressiooni mõju uurimiseks *E. coli* rakkudes kasutasime konstrukti pBRlacItacdinB. *P. putida* rakkudesse viisime eelnevalt repressorvalku kodeerivat *lacI* geeni sisaldava plasmidi pKTlacI ja alles seejärel *dinB* geeni üleekspressioonikonstrukti p9TTlacItacdinB. *dinB* geeni ekspresioonitaseme tõstmiseks lisasime 35-le sõltumatule 1,5 ml LB vedelsöötmes eksponentsiaalselt kasvavale bakterikultuurile 1 mM isopropüül- β -tiogalaktopüranosiidi (IPTG). Pärast IPTG lisamist kasvatasime baktereid veel 6 tundi ja plaatisime seejärel bakterikultuurist 0,1 ml rifampitsiini (lõppkonsentratsiooniga 100 $\mu\text{g/ml}$) sisaldavatele LB tassidele. Rifampitsiini tassidele ilmunud kolooniaid lugesime 24 tundi peale rakkude plaatimist. Rif^r mutantide tekkesageduse arvutasime 10⁹ bakteriraku kohta. Negatiivseks kontrolliks kasutasime *E. coli* puhul vektorplasmidi pBRlacItac ja *P. putida* puhul ilma IPTG lisamiseta kasvanud plasmidi p9TTlacItacdinB sisaldavaid rakke.

5. Phe⁺ mutantide isoleerimine

Selleks, et uurida DinB ja RecA osalust nälgivas bakterikultuuris toimuvates mutatsiooniprotsessides, plaatisime erinevaid testsüsteeme sisaldavaid *P. putida* rakke fenooli ainsa C-allikana sisaldavale tardsöötmele. Kasvatasime geeni *pheA* funktsionaalsuse taastamisel põhinevaid testsüsteeme kandvaid *P. putida* rakke LB vedelsöötmes üleöö 30°C juures tiheduseni 10⁸-10⁹ rakku ml-s. 1 ml-st üleöö kasvanud rakukultuurist tsentrifugeerisime bakterirakud kokku 30 s jooksul firma "Eppendorf" lauatsentriifuugiga "MiniSpin" maksimumpööretel (suhteline tsentrifugaaljõud 12100 x g). Kõik tsentrifugimised antud töös teostasime samadel tingimustel. Seejärel pesime rakke 1 ml 1 x M9 lahusega, tsentrifugeerisime uuesti ja suspendeerisime ligikaudu 100 µl-s 1xM9 lahuses. Rakud plaatisime minimaaltassidele, mis sisaldasid ainsa süsinikuallikana fenooli (2,5 mM) ja plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi (Cb).

Mutantide akumulatsioonist selektiivtassidele jälgisime viieteistkümne järgneva päeva jooksul peale rakkude plaatimist. Kasvavas kultuuris plaatimise eelselt tekkinud Phe⁺ mutandid ilmusid tassidel nähtavale teisel päeval. Hilisematel päevadel tassidele ilmunud Phe⁺ kolooniate puhul olid mutatsioonid tekkinud süsinikunälja tingimustes fenooli minimaaltassidel olevates rakkudes (Kasak jt., 1997).

6. DNA polümeraas IV ja RecA suhtes defektsete tüvede elumuse määramine fenooli minimaaltassidel

Erinevate *P. putida* tüvede elumuse määrasime samadelt fenoolitassidelt, millel jälgisime ka Phe⁺ revertantide akumulatsioonist. Selleks lõikasime 1 ml pipetiotsikuga tüki fenooli minimaaltassi söötimest, vältides tassile tekkinud Phe⁺ kolooniaid. Bakterirakud eemaldasime agarsöötmetükilt, loksutades seda 1 ml-s 1 x M9 lahuses. Saadud raku suspensioonist plaatisime 10⁴ või 10⁵ kordse lahjenduse LB tassile. Elusrakkude arvu määrasime vähemalt viiest sõltumatust sama tüve nälgivast bakterikultuurist.

7. DNA sekveneerimine

Fenooli minimaaltassidele ilmunud Phe⁺revertantides *pheA* geenis tekkinud mutatsioonid identifitseerisime DNA sekveneerimisel, kasutades firma “Amersham” automaatsekvenaatorit MegaBace 1000. Eeldatavat mutatsiooni sisaldava, ligikaudu 390 aluspaarise regiooni amplifitseerisime PCR meetodil, kasutades praimereid pheAup ja pheAats (Tabel 4). DNA sekveneerimiseks võtsime ligikaudu 0,5 µg PCR-i produkti ja kasutasime praimerit pheAup või pheAats (5 pmol). Sekveneerimiseks vajalikud proovid valmistasime DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing reaktiividega (Amersham Pharmacia Biotech Inc).

8. PCR

PCR reaktsiooni teostasime bakterisuspensioonist. PCR toimus mahus 25 µl. Reaktsioonisegu sisaldas PCR-i puhvrit (10 kordse puhvri koostis oli: 750 mM Tris-HCl (pH 8,8); 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Triton-X 100; 5% Ficoll 40; 10 mM tartrasiin); 6 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP-d ja 0,5 ühikut firma “Fermentas” Taq DNA polümeraasi. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid (10 pmol reaktsiooni kohta) on toodud Tabelis 4. PCR-i teostasime firma “Biometra” PCR-i masinaga. PCR-i viisime läbi järgmistes tingimustes: DNA denaturatsioon 96° C juures 1 minut, praimerit paardumine 54-56° C juures 30 sekundit, DNA süntees 72° C juures 1-2 minutit, olenevalt amplifitseeritava fragmendi pikkusest, kokku 25 tsüklit (Saiki, 1986; Palmer, 1995).

9. Transformatsioon

Transformatsiooniks kasvasime *E. coli* rakke LB-puljongis optilise tiheduseni 0,2-0,5 (mõõdetud spektrofotomeetriliselt lainepikkusel λ 580 nm). Tsentrifugisime rakud põhja ning eemaldasime supernatandi. Seejärel suspendeerisime rakud 500 µl transformatsioonilahuses I, mis sisaldab 10 mM NaOAc, 50 mM MnCl₂ ja 5 mM NaCl, pH 5.6-6. Seejärel tsentrifugisime rakud põhja ning suspendeerisime 40 µl

transformatsioonilahuses II, mis sisaldab 10 mM NaOAc, 70 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂ ja 5% glütserooli, pH 5,6-6. Rakke hoidsime jääl ja tsentrifugimised teostasime 4°C juures. Transformatsiooniks kasutasime ligikaudu 100 ng DNA-d. Peale DNA lisamist hoidsime rakke 30 min jääl, seejärel viisime 5 minutiks 37° C juurde ning pärast seda hoidsime veel 2 min jääl. Siis lisasime rakkudele 1,5 ml LB-söödet ja kasvasime rakke 1 tund 37° C loksutil. Seejärel tsentrifugisime rakud söötmetest põhja ja plaatisime selektiivplaadile.

10. Bakterite elektroporatsioon

P. putida rakkude elektroporatsioonil kasutasime Sharma ja Schimke (1996) meetodit. Retsipienttütve rakke kasvasime YENB-söötmes (0,75% “Bacto yeast extract”; 0,8% “Bacto nutrient broth”) optilise tiheduseni 1-1,5, mõõdetuna lainepikkusel 580 nm. Rakud tsentrifugisime söötmetest välja, pesime kaks korda destilleeritud veega ja ühe korra 10%-se glütserooliga. Seejärel suspendeerisime rakud 50 µl 10%-ses glütseroolis.

Rakkudele lisasime ligikaudu 100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d. Seejärel pipeteerisime rakud jääl jahutatud elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooni teostasime firma “BioRad” elektroporaatoriga “*E. coli* Pulser” pingel 2500 V. Peale elektroporatsiooni viisime rakud 1,5 ml LB-söötmesse ja kasvasime ligikaudu tund aega loksutil 37 °C juures. Seejärel tsentrifugisime rakud söötmetest välja ja plaatisime selektiivplaatidele.

11. Bakterite ristamine

Ristamiseks kasvasime LB-söötmes üleöö doonortütve *E. coli* CC118 λ pir, mis sisaldas kas plasmidi pGP704dinB::tet või pGPrecA::tet, retsipienttütve *P. putida* PaW85 ning helperplasmidi RK2013 sisaldavat *E. coli* tütve HB101. Lahjendasime kultuuri tiheduseni OD₅₈₀ 0,1 ja kasvasime 3-5 tundi. Seejärel segasime kokku võrdse koguse igast bakterikultuurist ja pipeteerisime ligikaudu 100 µl bakterikultuuride segu LB tassile. Rakke kasvasime üleöö 30°C juures. Üleöö

kasvanud kultuurist tsentrifugisime rakud põhja, suspendeerisime 1 ml 1x M9 lahuses ja plaatisime 100 µl suspensiooni selektiivtassidele.

12. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks tsentrifugisime 4 ml-st üleöö LB vedelsöötmes kasvanud bakterikultuurist rakud põhja lauatsentrifuugiga 30 sekundi jooksul. Rakud suspendeerisime 300 µl-s SET puhvis (10% sahharoos; 50 mM EDTA; 50 mM TrisHCl; pH 8,0). Rakususpensioonile lisasime 50 µl lüsotsüümilahust (20 mg/ml), segasime ja hoidsime 3 minutit toatemperatuuril. Seejärel lisasime 300 µl TET lahust (1% Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM TrisHCl; pH 8,0), segasime ja kuumutasime 3 minutit 96° C juures. Lüüsunud bakterirakkude kestade ja kromosoomi kompleksi tsentrifugisime põhja 15 minuti jooksul. Sademe eemaldasime tikuga ja DNA sadestamiseks lisasime lahusele 800 µl isopropanooli. Peale segamist tsentrifugisime lahust lauatsentrifuugiga 5 minuti jooksul. Eemaldasime vedeliku ja lahustasime sademe 150 µl-s RNAasi sisaldavas vesilahuses (20 mg/ml) ning hoidsime RNA degradeerimiseks ligikaudu 30 minutit toatemperatuuril. Pärast seda ekstraheerisime DNA-d sisaldavat lahust fenooli ja kloroformiga. Plasmiidse DNA sadestasime 1/10 mahu 5 M NaCl juuresolekul 2,5 mahu 96%-lise etanooliga ning tsentrifugisime 10 minutit 14000 p/min. DNA-sadet pesime 75%-lise etanooliga ning lahustasime 30-60 µl Milli-Q vees.

Geelelektroforeesiks lisasime 0,5-1 µg-le DNA-le 0,04%-list broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis, 20 µl proovi kohta 5 µl. Proovi kandsime horisontaalsele etiidiumbromiidi (10 mg/ml) sisaldavale 1%-sele agarosgeelile TAE-puhvis (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2). Elektroforees toimus toatemperatuuril. Geeli pildistasime ultravioletvalguses.

Plasmiidse DNA restriksiooniks kasutasime firma "Fermentas" ensüüme. Reaktsioonid viisime läbi tingimustel, mis olid ette nähtud vastavaid restriктаase tootva firma kataloogis. Pärast reaktsiooni toimumist lisasime restriksioonisegule broomfenoolsinise lahust 50%-lises glütseroolis ning kandsime proovid agarosgeelile (1% agarosgeel TAE-puhvis).

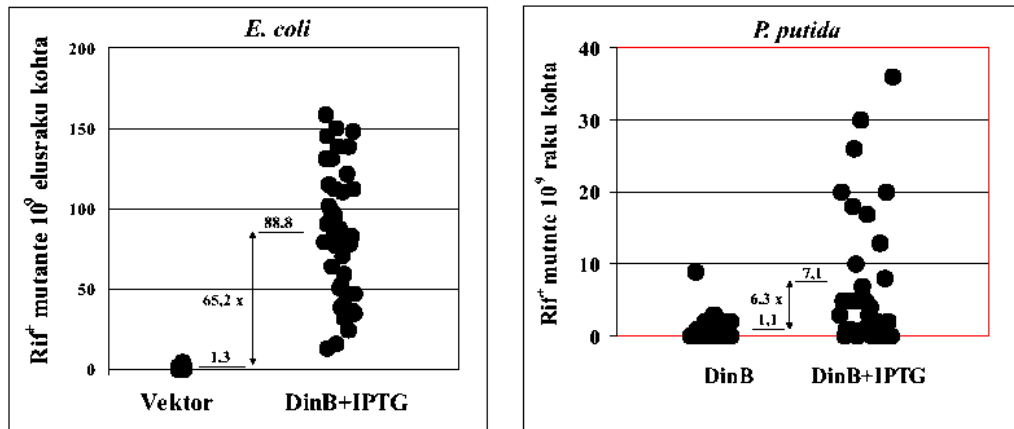
Tulemused

Mutatsiooniprotsessid nälgivates bakterirakkudes võivad olla soodustatud nii reparatsioonisüsteemide töö efektiivsuse languse kui ka vigutegevate DNA polümeraaside ekspressiooni ja funktsionaalsuse tõusu tõttu. Meie töögrupis uuritakse mullabakteris *P. putida* toimuvaid mutatsiooniprotsesse. Üheks eesmärgiks on välja selgitada, kuidas osaleb *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides *dinB* geeni poolt kodeeritud vigutegev DNA polümeraas IV. Tulemused, mis on käesolevas magistritöös esitatud, on avaldatud artiklis Radi Tegova, Andres Tover, Kairi Tarassova, Mariliis Tark and Maia Kivisaar: Involvement of Error-Prone DNA Polymerase Pol IV on Stationary Phase Mutagenesis in *Pseudomonas putida* (2004). J. Bacteriol. 186(9):2735-44

1. *P. putida* DNA polümeraas IV homologgi identifitseerimine

Analüüsid *P. putida* tüve KT2440 (geneetiliselt identne tüvega PaW85) genoomi (www.tigr.org) leidsime sealt geeni, mille nukleotiidne järjestus on 50% ulatuses identne *E. coli* DNA polümeraas IV kodeeriva geeni järjestusega. Kirjandusest on teada, et DinB on vigutegev DNA polümeraas, mis põhjustab kasvavates *E. coli* rakkudes nii -1 raaminihkemutatsioonide kui ka asendusmutatsioonide tekkesageduse tõusu. Selleks, et selgitada välja, kas meie poolt leitud *dinB* geen kodeerib tõesti vigutegev DNA polümeraasi, otsustasime DinB valku nii *P. putida* kui ka *E. coli* rakkudes üleekspresseerida ja jälgida, kas DinB üleekspressioon põhjustab bakterirakkudes mutatsioonisageduse tõusu. Selleks amplifitseerisime *P. putida* tüve PaW85 kromosoomist *dinB* geeni ja kloneerisime selle plasmiididesse pPR9TT (Santos jt., 2001) ja pBRlacItac (Ojangu jt., 2000) nii, et *dinB* geen jääb IPTG-ga indutseeritava P_{tac} promootori kontrolli alla. IPTG lisamine vastavaid plasmide sisaldavatele bakterikultuuridele põhjustab DinB ekspressioonitaseme tõusu. pBR322 baasil konstrueeritud plasmiidiga pBRlacItacdinB oli võimalik hinnata DinB üleekspressiooni mõju mutatsioonisagedusele *E. coli* rakkudes. DinB üleekspressiooni jaoks *P. putida* rakkudes valisime laia peremeesringiga plasmidi pPR9TT. Hindasime *P. putida* DinB valgu üleekspressiooni

poolt põhjustatud mutatsioonisageduse tõusu nii *E. coli* kui ka *P. putida* rakkudes, mõõtes mutatsioonisagedust *rpoB* geenis. *rpoB* geen kodeerib RNA polümeraasi β subühikut ja asendusmutatsioonid *rpoB* geenis võimaldavad bakteritel hakata kasvama rifampitsiini sisaldaval söötmel. Selgus, et *P. putida* DinB üleekspressioon plasmidi pBRlacItacdinB sisaldavates *E. coli* kasvava kultuuri rakkudes põhjustas ligikaudu 60-ne kordse Rif⁺ mutantide tekkesageduse tõusu võrreldes kontrollplasmidi pBR lacItac sisaldavate *E. coli* rakkude Rif⁺ mutantide tekkesagedusega (Joonis 5). Viies DinB valku üleekspresseriva plasmidi p9TTlacItacdinB *P. putida* rakkudesse, ei olnud need eluvõimelised ka siis, kui IPTG-d polnud söötmesse lisatud. Seetõttu oletasime, et P_{tac} promootor ei olnud LacI poolt täielikult represseritud ja mingil tasemel toimus transkriptsioon plasmidselt *dinB* geenilt, mistõttu ekspresseeriti rakkudes ülemäära DinB valku. Selektiivtassidele tekkinud kolooniad olid väikesed ja kolooniatest võetud rakke ei olnud võimalik edasi kultiveerida. On võimalik, et sellisel tasemel DNA polümeraas IV hulk *P. putida* rakkudes inhibeeris bakterite kasvu ja surmas rakud. Selleks, et P_{tac} promootorit lähtuvat transkriptsiooni täielikult represserida olukorras, kus induktorit kasvukeskkonda ei ole lisatud, viisime *P. putida* tüve PaW85 rakkudesse enne DinB üleekspressiooniplasmidi plasmidi pKTlacI, mis ekspresseerib tugeva konstitutiivse promootori alt LacI repressorvalku. Nii oli ainult lühiajaliselt võimalik IPTG lisamisel bakterite kasvukeskkonda tõsta DinB valgu ekspressioonitaset bakterirakkudes. Kasvatades plasmide p9TTlacItacdinB ja pKTlacI sisaldavaid *P. putida* rakke 1 mM IPTG juuresolekul, oli Rif⁺ mutantide tekkesagedus kasvavas bakterikultuuris tõusnud 5,7 korda võrreldes IPTG juuresolekuta kasvanud rakkude Rif⁻ resistentsete mutantide tekkesagedusega (joonis 5). IPTG induktsioonita kasvanud plasmide p9TTlacItacdinB ja pKTlacI sisaldavate *P. putida* rakkude Rif⁺ mutantide tekkesagedus oli samaväärne plasmiidivaba tüve PaW85 spontaansete Rif-resistentsete mutantide tekkesagedusega. Saadud tulemustest järeldame, et *P. putida dinB* geeni poolt kodeeritud valk on nii *E. coli* kui ka *P. putida* rakkudes funktsionaalne ning osaleb mutatsioonide tekitamises.



Joonis 5. Rif⁺ mutantide teke DinB üleekspressiooni korral *E. coli* (A) ja *P. putida* rakkudes (B). Joonte kohal on näidatud antud katsete keskväärtus. Nooled tähistavad keskväärtuste vahet kordades. Joonisel on kokku võetud vähemalt 35 sõltumatu katse tulemused. DinB üleekspressiooni efektist saadud tulemustele on teostatud Mann-Whitney test ja arvatud *P* väärtused (Rosche ja Foster, 2000). Nii *E. coli* kui ka *P. putida* puhul jääb DinB valgu üleekspressiooni efekt statistiliselt oluliseks, *P* väärtusega alla 0,001 ($P < 0,001$).

2. *P. putida* rakkudes toimuvate mutatsiooniprotsesside uurimiseks kasutatud testsüsteemide konstrueerimine

Mutatsiooniprotsesside uurimiseks *P. putida* rakkudes oleme kasutanud testsüsteeme, mis põhinevad bakteri võimel kasutada fenooli ainsa süsinikuallikana juhul, kui rakkudesse on viidud fenooli monooksügenaasi kodeeriv *pheA* geen. Fenool lagundatakse plasmiidse fenooli monooksügenaasi abil katehooliks (Kivisaar jt., 1990), mis degradeeritakse edasi *P. putida* kromosomaalselt kodeeritud valkude poolt tsitraaditsükli vaheühenditeni (Ornston, 1966).

Kirjandusest on teada, et DinB osaleb *E. coli* rakkudes eelkõige -1 raaminihete ja harvem asendusmutatsioonide tekkes. Meid huvitas, milline on DinB poolt põhjustatud mutatsioonide spetsiifika *P. putida* rakkudes. Selle uurimiseks konstrueerisime testsüsteemid, mis võimaldasid *P. putida* rakkudes vaadelda nii raaminihke- kui ka asendusmutatsioonide teket. Ühenukleotiidsete deletsioonide uurimiseks tekitasime fenooli monooksügenaasi kodeeriva *pheA* geeni 56. positsioonis

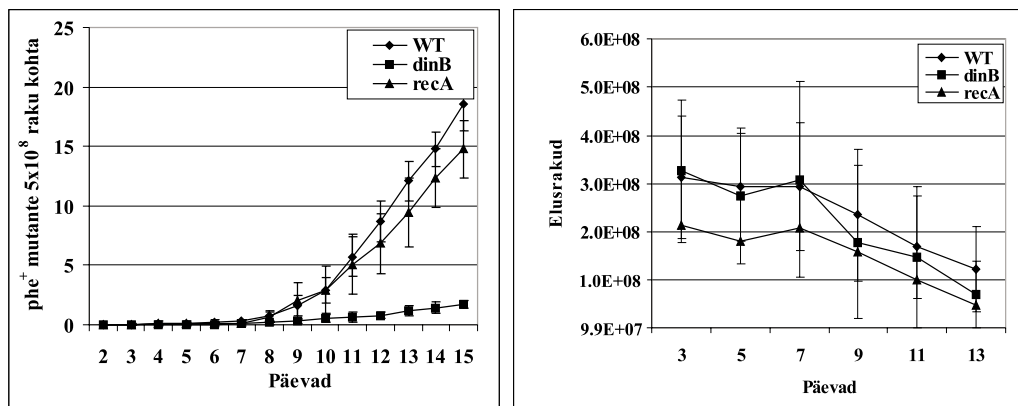
asuvasse treoniini kodeerivasse koodonisse A nukleotiidi lisamisega +1 raaminihkemutatsiooni (Joonis 4). Järgmised kolm testsüsteemi olid konstrueeritud asendusmutatsioonide uurimiseks ja sisaldavad *pheA* geeni kodeerivas järjestuses erinevaid asendusmutatsioone, mis muudavad fenooli monookskügenaasi 22. positsioonis asuvat leutsiini kodeeriva CTG koodoni translatsiooni stopkoodoniteks TAG, TAA või TGA (joonis). Testsüsteemide konstrueerimist on täpsemalt kirjeldatud peatükis “Materjal ja meetodika”.

Selleks, et kontrollida, kas konstrueeritud testsüsteemid tõepoolest võimaldavad detekteerida oodatavaid mutatsioone, analüüsisime fenooli minimaaltassidele tekkinud Phe⁺ revertandide *pheA* geeni nukleotiidset järjestust. Ühenukleotiidsete raaminihkemutatsioonide detekteerimiseks konstrueeritud testsüsteemi pKTpheA56+A sisaldavate Phe⁺ revertantide DNA sekveneerimisest selgus, et 15-st analüüsitud mutandist oli 90%-l revertantidest raaminihkemutatsioon tekkinud meie poolt inserteeritud A nukleotiidi kõrval asuvasse CCC mononukleotiidsesse kordusjärjestusse (Joonis 4). Ainult 10%-l revertantidest oli *pheA* geeni lugemisraam taastunud lisatud A nukleotiidi deleteerumise tagajärjel. Ühenukleotiidne deletsioon CCC kordusjärjestuses taastab *pheA* geeni lugemisraami, asendades treoniini kodeeriva ACC koodoni asparagiini kodeeriva AAC koodoniga.

3. DNA polümeraas IV osalus *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides

Selleks, et uurida vigutegeva DNA polümeraasi IV osalust *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides, konstrueerisime DNA polümeraas IV kodeeriva *dinB* geeni suhtes defektse *P. putida* tüve (“Materjal ja meetodika”). *P. putida* genoomi analüüs näitas, et *dinB* geen ei kuulu ühegi teise geeniga samasse operoni, mis välistab võimaluse, et *dinB* geeni ära rikkumine võiks omada negatiivset mõju teiste geenide transkriptsioonile. DNA polümeraas IV osaluse uurimiseks nälgivates rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides plaatsime erinevaid testsüsteeme (pKTpheA56+A, pKTpheA22TAA, pKTpheA22TGA või pKTpheA22TAG) sisaldavad *P. putida* algse tüve PaW85 ja selle DNA polümeraas IV suhtes defektse derivaadi PaW85 *dinB::tet* rakud minimaaltassidele, mis sisaldasid ainsa

süsinikuallikana fenooli. Phe⁺ mutantide teket fenooli minimaaltassidel jälgisime 15-ne päeva pikkuse perioodi jooksul. Tulemustest võib näha, et ühenukleotiidsete deletsioonide teke sõltub funktsionaalse *dinB* geeni olemasolust *P. putida* rakkudes (Joonis 6). Samuti on jooniselt näha, et -1 raaminihkemutatsiooni tulemusel tekkinud Phe⁺ mutantide tekkesagedus tõuseb *P. putida* algse tüves olulisel määral alates 9-ndast nälgimispäevast. Alates 11-ndast nälgimispäevast on *P. putida* algse tüves Phe⁺ revertantide tekkesagedus võrreldes DNA polümeraas IV suhtes defektse tüvega 10 korda kõrgem. Et teha kindlaks, kas madal ühenukleotiidsete deletsioonide tekkesagedus tüves PaW85 *dinB::tet* ei ole põhjustatud selle tüve väiksemast eluvõimest võrreldes algse tüvega, testisime nii algse tüve PaW85 kui ka tüve PaW85 *dinB::tet* eluvõimet fenooli minimaaltassidel rakkude nälgimisel 13-ne päeva jooksul. Selgus, et DNA polümeraas IV suhtes defektse tüve eluvõime fenooli minimaaltassidel ei erinenud algse tüve eluvõimest (Joonis 6). Saadud tulemustest järeldasime, et *P. putida* rakkudes osaleb DNA polümeraas IV raaminihkemutatsioonide tekkes, ja et DNA polümeraas IV-st sõltuv mutagenees toimub *P. putida* rakkudes vaid pikaajalise nälja tingimustes.



Joonis 6. A) Phe⁺ mutantide akumulatsioon algse (WT), DNA polümeraas IV (*dinB*) ja RecA (*recA*) suhtes defektse *P. putida* tüves. Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvatud 5 x 10⁸ raku kohta. B) *P. putida* algse tüve (WT), DNA polümeraas IV (*dinB*) ja RecA (*recA*) suhtes defektsete tüvede elumus fenooli minimaaltassidel. Joonistel on esitatud vähemalt viie sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

Selleks, et uurida DNA polümeraas IV osalust asendusmutatsioonide tekkes, jälgisime Phe⁺ mutantide akumulereumist nii testsüsteeme pKTpheA22TAA, pKTpheA22TGA kui ka pKTpheA22TAG sisaldavas *dinB* geeni suhtes defektse tüves võrreldes algse tüvega. Antud testsüsteemide puhul oli asendusmutatsioonide tõttu tekkinud Phe⁺ revertantide tekkesagedus tüves PaW85 *dinB::tet* võrdne algse tüves PaW85 tekkinud Phe⁺ mutantidega (andmed pole näidatud). Sellest võime järeldada, et DNA polümeraas IV ei osale nälgivates *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides asendusmutatsioonide tekkes.

4. RecA osaluse määramine DNA polümeraas IV-st sõltuvas mutageneesis

Kirjandusest on teada, et *E. coli* rakkudes on transkriptsioon *dinB* geeni promootorilt DNA kahjustuste (SOS vastuse) poolt indutseeritav ja DNA polümeraas IV-st sõltuv mutagenees vajab funktsionaalse RecA valgu olemasolu (McKenzie jt., 2001). SOS reguloni geenide, sealhulgas ka *dinB*, transkriptsioon aktiveeritakse üheaahelalise DNA-ga nukleoproteiinfilamendi moodustanud RecA valgu abil, mis stimuleerib repressorvalgu LexA autokatalüütilist lagundamist (Sutton jt., 1999; Courcelle jt., 2001). Selleks, et näha, kas DNA polümeraas IV-st sõltuv mutagenees nälgivates *P. putida* rakkudes on mõjutatud funktsionaalse RecA valgu olemasolust, konstrueerisime RecA suhtes defektse *P. putida* tüve PaW85 *recA::tet* ("Materjal ja meetoodika"). Jälgisime -1 raaminihkemutatsiooni tagajärjel tekkinud Phe⁺ mutantide akumulereumist testsüsteemi pKTpheA56+A sisaldavas PaW85 *recA::tet* tüves võrreldes algse tüvega. Meie katsetes selgus, et ühenukleotiidsete deletsioonide tõttu tekkinud Phe⁺ revertantide tekkesagedused nälgivates *P. putida* algse tüve ja RecA valgu suhtes defektse derivaadi PaW85 *recA::tet* rakkudes ei erinenud teineteisest oluliselt (Joonis 6A). Samuti oli *P. putida* tüves PaW85 *recA::tet* rakkude elumus fenooli minimaaltassidel sarnane algse tüve elumusega (Joonis 6B).

Arutelu

Uurides *P. putida* rakkudes toimuvaid mutatsiooniprotsesse leidsime, et DNA polümeraas IV-st sõltuvate –1 raaminihkemutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ mutantide akumulereumissagedus ainsa süsinikuallikana fenooli sisaldavatel minimaaltassidel oli nälgimise varases faasis suhteliselt madal ja suurenes järsult pikemat aega nälgivas bakteripopulatsioonis alates 9-ndast nälgimispäevast. Kirjandusest on teada, et *E. coli* rakkudes toimuv DNA polümeraas IV-st sõltuvate –1 raaminihkemutatsioonide tagajärjel tekkinud Lac⁺ revertante akumulereub süsinikunälja tingimustes ühesuguse kiirusega kõigil päevadel kogu uuritava nälgimisperioodi jooksul. Lac⁺ mutantide ilmumist laktoosi minimaaltassidele jälgiti vaid maksimaalselt 9 päeva vältel ja see, kas pikemaajalistes süsinikunälja tingimustes mutatsioonisagedus tõuseks, ei ole selle testsüsteemi puhul teada (McKenzie jt., 2001). Nähes ühenukleotiidsete deletsioonide tekkesageduse märgatavat tõusu alles bakteripopulatsiooni nälgimise hilises faasis, tekkis küsimus, kuidas võiks olla DNA polümeraas IV-st sõltuvate mutatsioonide teke *P. putida* rakkudes reguleeritud. On näidatud, et *E. coli* rakkudes toimuv DNA polümeraas IV-st sõltuv mutagenees vajab funktsionaalse RecA valgu olemasolu bakterirakkudes (Cairns and Foster, 1991). *recA* geeni suhtes defektses *E. coli* tüves langeb DNA polümeraas IV-st sõltuvate mutatsioonide hulk drastiliselt.

RecA osaluse kohta DNA polümeraas IV-st sõltuval mutageneesil *E. coli* rakkudes on välja pakutud kaks mudelit. 1) Funktsionaalne RecA valk on vajalik DNA kahjustuse korral transkriptsiooni initsatsiooniks SOS reguloni geenidelt, sealhulgas ka DNA polümeraas IV kodeerivalt *dinB* geenilt (Cairns and Foster, 1991). 2) Samuti toimuvad RecA valgust sõltuvalt rekombinatsiooniprotsessid, mille tulemusena toimub *dinB-lacZ* geeni koosamplifikatsioon plasmiidis FC40, mis suurendab mutatsioonide tekkimise tõenäosust koosamplifitseeritavas DNA regioonis ning tõstab Lac⁺ revertantide tekkesagedust (McKenzie jt., 2001, Kofoid jt., 2003; Slechta jt., 2002).

P. putida rakkudes ei ole *dinB* geenilt toimuv transkriptsioon SOS vastusest sõltuv (Tegova jt, 2004). Käesolevas töös esitatud tulemused näitavad, et ka DNA polümeraas IV-st sõltuv mutagenees nälgivates *P. putida* rakkudes ei vaja

funktsionaalse RecA valgu olemasolu. Seega peavad DNA polümeraas IV-st sõltuvad mutatsiooniprotsessid *P. putida* rakkudes olema reguleeritud *E. coli* põhjal kirjeldatust erineva mehhanismi abil.

DNA polümeraas IV-st sõltuvate mutatsioonide tekkesageduse reguleerimiseks on mitmeid võimalusi. DNA polümeraas IV hulk *P. putida* rakkudes võib olla reguleeritud kas mRNA stabiilsuse, translatsiooni efektiivsuse või valgu degradatsiooni kaudu. Samuti võib posttranslatsioonilisel tasemel olla kontrollitud DNA polümeraas IV aktiivsus. Mutatsioonide tekkesageduse tõus võib sõltuda ka reparatsioonisüsteemide töö efektiivsuse langusest hilises näljaperioodis, mille tulemusena jäävad vead DNA ahelas parandamata. *E. coli* põhjal on teada, et MMR (*methyl-directed mismatch repair*) efektiivsus statsionaarse asvu faasi rakkudes langeb (Strauss jt., 2000; Wagner ja Nohmi, 2000; Tsui jt., 1997; Feng jt., 1996). On näidatud, et MMR võtmeensüümi MutS-i hulk bakterirakkudes on negatiivselt reguleeritud RNA polümeraasi sigma faktori σ^s poolt (Feng jt., 1996; Tsui jt., 1997). Samuti on näidatud, et enamus DNA polümeraas IV poolt tekitatud mutatsioone *E. coli* rakkudes parandatakse MMR poolt (Wagner ja Nohmi, 2000). Oleme näidanud, et *P. putida* rakkudes tõuseb -1 raaminihkemutatsioonide tekkesagedus *mutS* geeni suhtes defektses tüves nii kasvavas kui ka nälgivas bakterikultuuris (avaldamata andmed).

Meie tulemused Rif⁺ mutantide isoleerimisel viitavad sellele, et DNA polümeraas IV üleekspressioon *P. putida* rakkudes tõstab asendusmutatsioonide hulka eksponentsiaalselt kasvavas bakterikultuuris (Joonis 5). Samas leidsime Phe⁺ mutantide tekkesagedusi alguses ja *dinB*-defektses tüves võrreldes, et DNA pol IV ei osale asendusmutatsioonide tekkes nälgivates *P. putida* rakkudes. Sarnane seos bakterite kasvufaasi ja DNA polümeraas IV üleekspressiooni vahel ilmnes ka *E. coli* rakkudes, kus DNA polümeraas IV põhjustas asendusmutatsioonide teket ainult kasvavates rakkudes DNA polümeraas IV üleekspressiooni korral (Wagner ja Nohmi, 2000), kuid ei osalenud asendusmutatsioonide tekkes tingimustes, kus DNA polümeraas IV hulka *E. coli* rakkudes ei olnud kunstlikult tõstetud (Wolff jt., 2004). Tekib küsimus, mis võiks olla selle põhjuseks, et DNA polümeraas IV osalust asendusmutatsioonide tekkes on võimalik näha vaid kasvavtes rakkudes DNA polümeraas IV üleekspressiooni korral? Nii MutS kui ka kõik teadaolevad bakteriaalsed DNA polümeraasid sisaldavad protsessiivsust tagava β -klambriga seondumiseks vajalikku konserveerunud motiivi QL[S/D]LF (Lopez de Saro ja

O'Donnell, 2001; Dalrymple jt., 2001). Kuna nii DNA polümeraas IV kui ka MutS konkureerivad β -klambriga seondumisel sama seondumisjärjestuse pärast, siis juhul kui DNA polümeraas IV hulks bakterirakus on kunstlikult tõstetud, on võimalik, et kasvavas bakterikultuuris replikatsioonil DNA polümeraas III poolt tekitatud asendusmutatsioonid jäävad MMR süsteemi poolt parandamata sellepärast, et MutS valgu seondumiskoht β -klambril on okupeeritud DinB valgu poolt. Seetõttu võib mutatsioonisagedus suurenda ka sellepärast, et DNA polümeraas IV takistab MMR süsteemi tööd ja mitte ainult sellepärast, et DNA polümeraas IV osaleks replikatsioonil ja teeks DNA sünteesil vigu.

Kokkuvõte

Muutlikus keskkonnas võib mutatsioonide teke suurendada bakteripopulatsiooni adapteerumisvõimet. Ebasobivad keskkonnatingimused nagu näiteks toitainete puudumine kasvukeskkonnas võivad põhjustada bakterirakkudes mutatsioonisageduse tõusu (Sung ja Yasbin, 2002; Taddei jt., 1997; Kasak jt., 1997). Mutatsioonisageduse tõus nälgivas bakteripopulatsioonis võib sõltuda nii reparatsioonisüsteemide töö efektiivsuse langusest kui ka vigutegevate DNA polümeraaside ekspressiooni ja funktsionaalsuse tõusust. DNA reparatsiooni ja vigutegevate DNA polümeraaside osa mutatsiooniprotsessides on kirjeldatud peamiselt *E. coli* baasil (Rosenberg, 2001; Bjedov jt., 2003).

Meie töögrupis uuritakse mutatsiooniprotsesse mullabakteris *Pseudomonas putida*. Kuna looduslikus keskkonnas on bakteripopulatsioon enamus aja süsinikunälja tingimustes, sai meie töö eesmärgiks uurida mutatsiooniprotsesside dünaamikat just nälgivas bakterikultuuris.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaates kirjeldasin *E. coli* rakkudes toimuvat kromosoomi replikatsiooni ning replikatsioonil osalevaid valke. Andsin ülevaate *E. coli* rakkudes mutatsiooniprotsessides osalevatest DNA polümeraasidest ja nende regulatsioonist. Samuti tõi näiteid vigutegevate DNA polümeraaside osalusest mutatsiooniprotsessides ka teistes bakteriliikides.

Töö praktilises osas uurisin *dinB* geeni poolt kodeeritud DNA polümeraas IV osalust *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides selleks konstrueeritud testsüsteemide abil.

Töö tulemused saab võtta kokku järgnevalt:

1. *P. putida dinB* geeni poolt kodeeritud DNA polümeraas IV on nii *E. coli* kui ka *P. putida* rakkudes funktsionaalne ning tema kunstlik ekspressioonitaseme tõstmine kasvavates rakkudes tõstab mutatsioonisagedust.
2. DNA polümeraas IV osaleb nälgivates *P. putida* rakkudes -1 raaminihkemutatsioonide tekkes.
3. DNA polümeraas IV-st sõltuv mutagenees ilmneb *P. putida* rakkudes vaid pikaajalise nälja tingimustes.

4. DNA polümeraas IV ei osale nälgivas *P. putida* kultuuris asendusmutatsioonide tekkes.
5. DNA polümeraas IV-st sõltuvate statsionaarse faasi mutatsioonide teke *P. putida* rakkudes ei ole mõjutatud funktsionaalse RecA valgu olemasolust bakterirakus.

Summary

Mutations occurring in bacterial cells living in changing environmental conditions enable bacterial populations to adapt to these conditions and to survive. Growth-restricting conditions like starvation may permit a transient increase in the mutation rate in bacterial cells (Sung ja Yasbin, 2002; Taddei jt., 1997; Kasak jt., 1997). Increase in the mutation rate depends both on depression of the DNA repair systems and activation of error-prone DNA polymerases. Involvement of limitation of DNA reparation and activity of error-prone DNA polymerases in the mutational processes have mostly been studied in *E. coli* (Rosenberg, 2001; Bjedov jt., 2003).

Our research group investigates the mechanisms of mutational processes in soil bacterium *Pseudomonas putida*. Because in natural environment bacteria spend most of the time under conditions of carbon starvation, our research is concentrated on studies of dynamics of mutational processes in starving cell populations.

Literature review of this study gives an overview of DNA replication in *E. coli* and involvement of error-prone DNA polymerases in DNA replication and in mutagenesis in *E. coli* cells. Also, error-prone DNA polymerases involved in mutagenesis in an other bacterial species have been discussed.

The experimental part of this study demonstrates involvement of *dinB*-encoded DNA polymerase IV in mutational processes in starving *P. putida* cells and construction and usage of new test-systems for the study of mutational processes in *P. putida*.

The results of this study can be summarized as following:

1. DNA polymerase IV, encoded by *P. putida dinB* gene is functional both in *E. coli* and artificial increase of its expression in growing cells elevates frequency of mutation.
2. DNA polymerase IV contributes to -1 deletions in starving *P. putida* cells.
3. DNA polymerase IV-dependent mutagenesis in *P. putida* occurs only under conditions of long-term sarvation of bacteria.
4. The occurrence of base substitutions in starving *P. putida* does not require the activity of DNA polymerase IV.
5. The occurrence of DNA polymerase IV-dependent stationary-phase mutagenesis in *P. putida* does not require the functional RecA protein.

Kasutatud kirjandus

Adams, MH. 1959. Bacteriophages, p. 445-447. Interscience Publishers Inc., New York.

Bagdasarian, MM., Ammann E., Lurz R., Ruckert B., and Bagdasarian M. 1983. Activity of the hybrid *trp-lac (tac)* promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors. *Gene*. **26**:273-282.

Bauchop T., Elsdon SR. 1960. The growth of microorganisms in relation their energy supply. *J of Gen Microbiol*. 23:469-475.

Bayley SA., Duggleby CJ., Worsey MJ., Williams PA., Hardy KG., Broda P. 1977. Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet*. 20;154(2):203-4.

Becherel OJ., Fuchs RP. 2001. Mechanism of DNA polymerase II-mediated frameshift mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17;98(15):8566-71.

Berardini M., Foster PL., Loechler EL. 1999. DNA polymerase II (polB) is involved in a new DNA repair pathway for DNA interstrand cross-links in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 181(9):2878-82.

Bjedov, I., Tenaillon O., Gérard B., Souza V., Denamur E., Radman M., Taddei

F., and Matic I. 2003. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science*. **300**:1404-1409.

Boshoff HL., Reed MB., Barry CE 3rd., Mizrahi V. 2003. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. 18;113(2):183-93.

Boyer HW., Roulland-Dussoix D. 1969. A Complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J Mol Biol. 41:459-72.

Brooker RJ. 1999. Genetics Analysis and Principles. An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Brooks PC., Movahedzadeh F., Davis EO. 2001. Identification of some DNA damage-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis*: apparent lack of correlation with LexA binding. J Bacteriol. 2001 183(15):4459-67.

Bruck I., Goodman MF., O'Donnell M. 2003. The essential C family DnaE polymerase is error-prone and efficient at lesion bypass. J Biol Chem. 7;278(45):44361-8

Bull HJ., Lombardo MJ., Rosenberg SM. 2001. Stationary-phase mutation in the bacterial chromosome: recombination protein and DNA polymerase IV dependence. Proc Natl Acad Sci U S A. 17;98(15):8334-41.

Bunting KA., Roe SM., Pearl LH. 2003. Structural basis for recruitment of translesion DNA polymerase Pol IV/DinB to the beta-clamp. EMBO J. 3;22(21):5883-92.

Cairns J., Foster PL. 1991. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. Genetics. 128(4):695-701.

Carter P., Bedoulle H., Winter G. 1985. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. Nuc Acids Res. 13: 4431-4443.

Courcelle JA., Khodursky B., Peter P., Brown O., Hanawalt PC. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. Genetics. 158:41-64.

Dalrymple BP., Kongsuwan K., Wijffels G., Dixon NE., Jennings PA. 2001. A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25;98(20):11627-32.

Dervyn E., Suski C., Daniel R., Bruand C., Chapuis J., Errington J., Janniere L., Ehrlich SD. 2001. Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science.* 23;294(5547):1716-9.

Ellison V., Stillman B. 2001. Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell.* 21;106(6):655-60.

Feng G., Tsui HC., Winkler ME. 1996. Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells. *J Bacteriol.* 1996 Apr;178(8):2388-96.

Figurski DH., Helinski DR. 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):1648-52.

Fijalkowska IJ., Schaaper RM. 1996. Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli* dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;93(7):2856-61.

Foster PL., Trimarchi JM. 1994. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science.* 15;265(5170):407-9.

Goodman MF. 2000. Coping with replication 'train wrecks' in *Escherichia coli* using Pol V, Pol II and RecA proteins. *Trends Biochem Sci.* 25(4):189-95.

Goodman MF., Tippin B. 2000. The expanding polymerase universe. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(2):101-9.

Herrero M., de Lorenzo V., Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 172(11):6557-67.

Kasak L., Horak R., Kivisaar M. 1997. Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;94(7):3134-9.

Kim JJ., Sundin GW. 2000. Regulation of the *rulAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *rulAB*-mediated mutability in vitro and in planta. *J Bacteriol.* 182(21):6137-44.

Kim SR., Matsui K., Yamada M., Gruz P., Nohmi T. 2001. Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics.* 266(2):207-15.

Kivisaar M. 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environ. Microbiol.* 5:814-827.

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

Kofoed EU., Bergthorsson E., Slechta S., Roth JR. 2003. Formation of an F' plasmid by recombination between imperfectly repeated chromosomal Rep sequences: a closer look at an old friend (F'₁₂₈ *pro lac*). *J Bacteriol.* 185:660-663.

Le Chatelier E., Becherel OJ., d'Alencon E., Canceill D., Ehrlich SD., Fuchs RP., Janniere L. 2004. Involvement of DnaE, the second replicative DNA polymerase from *Bacillus subtilis*, in DNA mutagenesis. *J Biol Chem.* 16;279(3):1757-67.

Ling H., Boudsocq F., Woodgate R., Yang W. 2001. Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell*. 5;107(1):91-102.

Lopez de Saro FJ., Georgescu RE., Goodman MF., O'Donnell M. 2003. Competitive processivity-clamp usage by DNA polymerases during DNA replication and repair. *EMBO J*. 1;22(23):6408-18.

Lopez de Saro FJ., O'Donnell M. 2001. Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17;98(15):8376-80.

McHenry CS. 1985. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*: components and function of a true replicative complex. *Mol Cell Biochem*. ;66(1):71-85.

McKenzie GJ., Lee PL., Lombardo MJ., Hastings PJ., Rosenberg SM. 2001. SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol Cell*. 7(3):571-9.

Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbour Press, N.Y.

Miller JH. 1992. *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Moat AG., Foster JW., Spector MP. 2002. *Microbial Physiology*. 4-th edition. A John Wiley & Sons, INC., Publication

Murli S., Opperman T., Smith BT., Walker GC. 2000. A role for the umuDC gene products of *Escherichia coli* in increasing resistance to DNA damage in stationary phase by inhibiting the transition to exponential growth. *J Bacteriol*. 182(4):1127-35.

Napolitano R., Janel-Bintz R., Wagner J., Fuchs RP. 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.* 15;19(22):6259-65.

Nurk A., Kasak L., Kivisaar M. 1991. Sequence of the gene (pheA) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene.* 15;102(1):13-8.

Nurk A., Tamm A., Horak R., Kivisaar M. 1993. In-vivo-generated fusion promoters in *Pseudomonas putida*. *Gene.* 15;127(1):23-9.

O'Donnell M., Jeruzalmi D., Kuriyan J. 2001. Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. *Curr Biol.* 13;11(22):R935-46.

Ohmori H., Friedberg EC., Fuchs RPP., Goodman MF., Hanaoka F., Hinkle D. 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell.* 8:7-8.

Ojangu EL., Tover A., Teras R., Kivisaar M. 2000. Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 182(23):6707-13.

Ornston LN. 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. 3. Enzymes of the catechol pathway. *J Biol Chem.* 25;241(16):3795-9.

Pavel H., Forsman M., Shingler V. 1994. An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on para-substituted methylphenols. *J Bacteriol.* 176(24):7550-7.

Rosenberg SM. 2001. Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat Rev Gen.* 2:504-515.

Rosenberg SM., Longerich S., Gee P., Harris RS. 1994. Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science*. 15;265(5170):405-7.

Rosche WA., Foster PL. 2000. Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods*. 20(1):4-17.

Runyen-Janecky LJ., Hong M., Payne SM. 1999. The virulence plasmid-encoded impCAB operon enhances survival and induced mutagenesis in *Shigella flexneri* after exposure to UV radiation. *Infect Immun*. 67(3):1415-23.

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

Sharma RC., Schimke RT. 1996. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques*. 20:42-44.

Slecht ES., Liu J., Andersson DI., Roth JR. 2002. Evidence that selected amplification of a bacterial lac frameshift allele stimulates Lac(+) reversion (adaptive mutation) with or without general hypermutability. *Genetics*. 2002 161(3):945-56.

Smith BT., Walker GC. 1998. Mutagenesis and More: *umuDC* and the *Escherichia coli* SOS Response. *Genetics*. 148. 1599-1610.

Strauss BS., Roberts R., Francis L., Pouryazdanparast P. 2000. Role of the *dinB* gene product in spontaneous mutation in *Escherichia coli* with an impaired replicative polymerase. *J Bacteriol*. 182(23):6742-50.

Sung HM., Yasbin RE. 2002. Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 184(20):5641-53.

Sung HM., Yeaman G., Ross CA., Yasbin RE. 2003. Roles of YgjH and YgjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **185**:2153-216.

Sung HM., Yeaman G., Ross CA., Yasbin RE. 2003. Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **185**(7):2153-60.

Sutton MD., Opperman T., Walker GC. 1999. The *Escherichia coli* SOS mutagenesis proteins UmuD and UmuD' interact physically with the replicative DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. **26**;96(22):12373-8.

Taddei F., Halliday JA., Matic I., Radman M. 1997. Genetic analysis of mutagenesis in aging *Escherichia coli* colonies. Mol Gen Genet. **256**(3):277-81.

Taddei F., Matic I., Radman M. 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. Proc Natl Acad Sci USA. **92**:11736-11740.

Tark M. 2003. TOL plasmiidis PWW0 sisalduvate geenida *ruvA* ja *ruvB* osa *Pseudomonas putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides. Keskastme lõputöö

Tsui HC., Feng G., Winkler ME. 1997. Negative regulation of mutS and mutH repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **179**(23):7476-87.

von Freiesleben U., Krekling MA., Hansen FG., Lobner-Olesen A. 2000. The eclipse period of *Escherichia coli*. EMBO J. **15**;19(22):6240-8.

Wagner J., Nohmi T. 2000. *Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity:

genetic requirements and mutational specificity. *J Bacteriol.* 182(16):4587-95.

Wolff E., Kim M., Hu K., Yang H., Miller JH. 2004. Polymerases leave fingerprints: analysis of the mutational spectrum in *Escherichia coli* rpoB to assess the role of polymerase IV in spontaneous mutation. *J Bacteriol.* 2004 May;186(9):2900-5.

Yeiser B., Pepper ED., Goodman MF., Finkel SE. 2002. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**:8737-8741.

Zambrano MM., Kolter R. 1996. GASping for life in stationary phase. *Cell.* 26;86(2):181-4.

Zambrano MM., Siegele DA., Almiron M., Tormo A., Kolter R. 1993. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science.* 19;259(5102):1757-60.

Lisa 1. Radi Tegova, Andres Tover, Kairi Tarassova, Mariliis Tark and Maia Kivisaar:
Involvement of Error-Prone DNA Polymerase Pol IV on Stationary Phase Mutagenesis in
Pseudomonas putida (2004). J. Bacteriol. 186(9):2735-44

Involvement of Error-Prone DNA Polymerase IV in Stationary-Phase Mutagenesis in *Pseudomonas putida*

Radi Tegova, Andres Tover, Kairi Tarassova, Mariliis Tark,
and Maia Kivisaar*

Department of Genetics, Institute of Molecular and Cell Biology, Tartu University and Estonian Biocentre,
51010 Tartu, Estonia

Received 8 December 2003/Accepted 23 January 2004

In this work we studied involvement of DNA polymerase IV (Pol IV) (encoded by the *dinB* gene) in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. For this purpose we constructed a novel set of assay systems that allowed detection of different types of mutations (e.g., 1-bp deletions and different base substitutions) separately. A significant effect of Pol IV became apparent when the frequency of accumulation of 1-bp deletion mutations was compared in the *P. putida* wild-type strain and its Pol IV-defective *dinB* knockout derivative. Pol IV-dependent mutagenesis caused a remarkable increase (approximately 10-fold) in the frequency of accumulation of 1-bp deletion mutations on selective plates in wild-type *P. putida* populations starved for more than 1 week. No effect of Pol IV on the frequency of accumulation of base substitution mutations in starving *P. putida* cells was observed. The occurrence of 1-bp deletions in *P. putida* cells did not require a functional RecA protein. RecA independence of Pol IV-associated mutagenesis was also supported by data showing that transcription from the promoter of the *P. putida dinB* gene was not significantly influenced by the DNA damage-inducing agent mitomycin C. Therefore, we hypothesize that mechanisms different from the classical RecA-dependent SOS response could elevate Pol IV-dependent mutagenesis in starving *P. putida* cells.

During the past several years our understanding of mutation mechanisms has been expanded by the discovery of a new superfamily of DNA polymerases, called the Y family (46). The Y-family polymerases have been identified in prokaryotes, archaea, and eukaryotes. Members of this superfamily are devoid of 3'→5' proofreading exonuclease activity and replicate undamaged DNA with low fidelity and low processivity; many of these enzymes can bypass DNA lesions that block chain elongation by replicative DNA polymerases (21–23). According to the concept of specialized polymerases some of these polymerases are able to copy cognate lesions with high genetic fidelity (22). On the other hand, the specialized DNA polymerases are involved in mutation processes when copying non-cognate DNA lesions or normal DNA.

In a growth-restricting environment (e.g., during starvation), mutants arise that are able to take over bacterial populations by a process known as stationary-phase mutation (15). One widely discussed idea is that genetic adaptation of microbial populations under environmental stress might be accelerated by stress-induced activation of error-prone DNA polymerases (see, for example, references 16, 50, and 63). In *Escherichia coli*, two error-prone DNA polymerases, Pol V (UmuD'C) and Pol IV (DinB), and one high-fidelity DNA polymerase, Pol II, are upregulated during the SOS response (23). SOS induction has also been shown to occur spontaneously in static bacterial populations (62). It has been recently demonstrated that error-prone DNA polymerases Pol IV and Pol V are involved in stationary-phase mutagenesis in *E. coli* (4, 7, 42). The involve-

ment of SOS-induced polymerases (Pol II, Pol IV, and Pol V) in stationary-phase mutagenesis has also been shown in the appearance of GASP (growth advantage in stationary phase) mutants of *E. coli* (70). *E. coli* mutants lacking one or more of these polymerases suffered considerable fitness reduction when competing with a wild-type strain under starvation conditions (70).

Although DinB-like polymerases have been identified in essentially all prokaryotic and eukaryotic organisms studied (46), with only a few exceptions (e.g., see reference 61), involvement of Pol IV homologues in stationary-phase mutagenesis in bacteria other than *E. coli* has not been investigated. Knowledge about mechanisms of Pol IV-dependent stationary-phase mutagenesis obtained using *E. coli*-based test systems includes studies of the 1-bp deletions occurring in an F' plasmid (see, for example, references 38 and 42) and in the bacterial chromosome (7). In these cases, another copy of the *dinB* gene was present in the F' plasmid and Pol IV-dependent stationary-phase mutations required the RecA protein. The genus *Pseudomonas* represents one of the most diverse and ecologically widely distributed groups of bacteria (58). Here, we studied the role of Pol IV in mutagenesis in *Pseudomonas putida*. We show that Pol IV is involved in generation of 1-bp deletions in starving cells. The occurrence of other types of stationary-phase mutations (e.g., base substitutions) does not require the presence of Pol IV. Pol IV-dependent mutagenesis in *P. putida* appears to be a RecA-independent process. Moreover, our results demonstrate that involvement of Pol IV in stationary-phase mutagenesis becomes essential only in long-term-starved populations of *P. putida*, which indicates that Pol IV-dependent mutagenesis can be induced by a so-far uncharacterized mechanism in cells that have suffered long-term starvation stress.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Genetics, Institute of Molecular and Cell Biology, Tartu University and Estonian Biocentre, 23 Riia Street, 51010 Tartu, Estonia. Phone: 372-7-375036. Fax: 372-7-420286. E-mail: maiak@ebc.ee.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or construction	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15)</i>	10
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relAI Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1</i> , λpir phage lysogen	Invitrogen 30 30
CC118 λpir		
<i>P. putida</i>		
PaW85	Wild type	3
PaW85 <i>dinB::tet</i>	<i>dinB::tet</i>	This work
PaW85 <i>recA::tet</i>	<i>recA::tet</i>	This work
PKS54	<i>rpoS::km</i>	47
Plasmids		
pBluescript KS(+)	Cloning vector (Ap ^r)	Stratagene
pBR322	Cloning vector (Ap ^r Tet ^r)	6
pKT240	Medium-copy broad-host-range cloning vector (Ap ^r Km ^r)	2
pPR9TT	Single-copy broad-host-range vector (Cm ^r Amp ^r)	52
pPU1930	pUC19 carrying the <i>pheA</i> gene transcribed from constitutive promoter	45
pKSpheA56+A	pBluescript KS(+) containing PCR-amplified <i>pheA</i> sequence with A-nucleotide insertion cloned into the EcoRV-cleaved vector	This work
pPUpheA56+A	Segment of mutant <i>pheA</i> gene cloned as XbaI-BclI fragment from pKSpheA56 + A into pPU1930 to replace the original <i>pheA</i> sequence	This work
pKTpheA56+A	Mutant <i>pheA</i> gene transcribed from constitutive promoter cloned as SacI-PvuII fragment from pPUpheA56+A to pKT240	This work
pKTpheA22TGA	pKT240 carrying the <i>pheA</i> gene with TGA codon instead of CTG for Leu-22	This work
pKTpheA22TAA	Same as pKTpheA22TGA but contains TAA stop codon	This work
pKTpheA22TAG	Same as pKTpheA22TGA but contains TAG stop codon	This work
pKSdinB	pBluescript KS(+) containing PCR-amplified <i>P. putida dinB</i> gene cloned into EcoRV-cleaved vector	This work
pKSdinB::tet	Tet ^r gene from pBR322 inserted into Van91-cleaved <i>dinB</i> gene in pKSdinB	This work
pGP704dinB::tet	<i>dinB::tet</i> sequence-containing Acc65-XbaI fragment from pKSdinB::tet in pGP704 L	This work
pKSrecA	pBluescript KS(+) containing PCR-amplified <i>P. putida recA</i> gene cloned into EcoRV-cleaved vector	This work
pKSrecA::tet	Tet ^r gene from pBR322 inserted into BclI-cleaved <i>recA</i> gene in pKSrecA	This work
pGP704recA::tet	<i>recA::tet</i> sequence-containing XbaI-Ecl136II fragment from pKSrecA::tet in pGP704 L	This work
pGP704 L	Delivery plasmid for homologous recombination	48
pRK2013	Helper plasmid for conjugal transfer of pGP704 L	13
pKSATGdinB	pBluescript KS(+) containing PCR-amplified <i>P. putida dinB</i> sequence starting from ATG initiator codon cloned into EcoRV-cleaved vector	This work
pBRlacItac	Expression vector containing P _{tac} promoter and <i>lacI^q</i> repressor in pBR322	47
pBRlacItacdinB	<i>dinB</i> from pKSATGdinB as PstI-Acc65I fragment in pBRlacItac	This work
p9TTlacItacdinB	<i>dinB</i> expression cassette from pBRlacItacdinB cloned as NheI-Acc65I fragment into XbaI-Acc65I-cleaved pPR9TT	This work
pREP4	LacI repressor-expressing plasmid	QIAGEN
pKTlacI	pKT240 expressing LacI repressor cloned from pREP4 into Ecl136II site	This work
pKSPdinB	pBluescript KS(+) containing PCR-amplified <i>P. putida dinB</i> promoter P _{dinB} cloned into BamHI- and XhoI-cleaved vector	This work
pKSluxAB	pBluescript KS(+) containing <i>luxAB</i> reporter genes cloned from pGP704 L as BamHI fragment into BamHI-cleaved vector	This work
pKTluxAB	<i>luxAB</i> reporter-carrying SacI-XhoI fragment from pKSluxAB in pKT240	This work
pKTPdinBluxAB	P _{dinB} -carrying SmaI-Acc65I fragment from pKSPdinB in pKTluxAB	This work
p9TTPdinBluxAB	P _{dinB} - <i>luxAB</i> from pKTPdinBluxAB in NotI site of pPR9TT	This work
pKTlacZ	pKT240-derived promoter-probe vector (Ap ^r)	31
pKTPdinBlacZ	P _{dinB} -carrying BamHI-XhoI fragment from pKSPdinB in pKTlacZ	This study

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and media. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. Complete medium was Luria-Bertani (LB) medium (43), and minimal medium was M9 (1). Phenol minimal plates with 1.5% Difco agar contained 2.5 mM phenol as a sole carbon and energy source. Antibiotics were added at the following final concentrations: for *E. coli*, ampicillin at 100 μg/ml and tetracycline at 10 μg/ml; for *P. putida*, carbenicillin at 1,000 to 3,000 μg/ml, chloramphenicol at 1,500 to 3,000 μg/ml, and tetracycline at 80 μg/ml; for both organisms, kanamycin at 50 μg/ml and rifampin at 100 μg/ml. *E. coli* was incubated at 37°C, and *P. putida* was incubated at 30°C. *E. coli* was transformed with plasmid DNA as described by Hanahan (24). *P. putida* was

electrotransformed as described by Sharma and Schimke (54). *E. coli* strain TG1 or DH5α was used for the DNA cloning procedures.

Construction of test systems to study stationary-phase mutations in *P. putida*. An assay system to test 1-bp deletions (Fig. 1) was constructed by altering the phenol monoxygenase gene (*pheA*) coding sequence. Insertion of a single A nucleotide 5' to the ACC codon for Thr-56 was performed by PCR amplification of the segment of the *pheA* gene from plasmid pPU1930 (45) with primer pheAup (5'-AAGCGCTCCCGTAAGACA-3'), complementary to the sequence at nucleotides -40 to -22 relative to the coding sequence of the *pheA* gene, and the mutant primer pheA56+A (5'-GGTGATCATAATGTTGCTAATGCCCTGGGTTTCGACAGGAACATTGCTGCG-3'), complementary to the

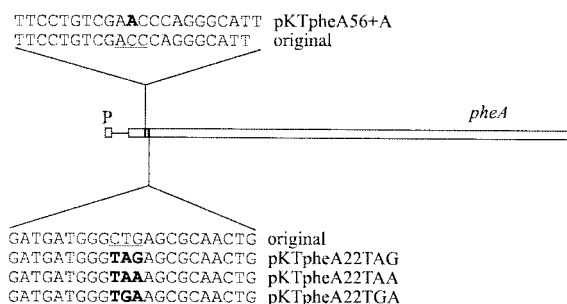


FIG. 1. Assay systems allowing measurement of 1-bp deletions (plasmid pKTpheA56+A) or different base substitutions (plasmids pKTpheA22TAG, pKTpheA22TAA, and pKTpheA22TGA) in *P. putida* stationary-phase cells. Segments of the original sequences and their mutant variants are shown. The test systems were constructed by altering the phenol monooxygenase gene (*pheA*) coding sequence. The +1 frameshift was constructed in the phenol monooxygenase gene *pheA* by inserting the A nucleotide (marked in bold) into the ACC codon for Thr-56 (underlined in the original sequence). Assay systems for the isolation of base substitutions were constructed by replacement of the CTG codon for Leu-22 (underlined in the original sequence) with a TGA, TAA, or TAG stop codon (indicated in boldface). Transcription from the *pheA* gene is initiated from the constitutively expressed promoter (45), indicated by P.

pheA coding sequence at nucleotides 147 to 195. The amplified DNA fragment was subcloned into the pBluescript KS(+) EcoRV site to obtain pKSpheA56+A. In addition to the generation of frameshift in the *pheA* coding sequence, this nucleotide insertion eliminated the SalI restriction site. The mutation was verified by DNA sequencing. The mutated DNA segment was thereafter inserted as the XbaI- and BclI-generated fragment from pKSpheA56+A (the XbaI site was provided by the pBluescript KS multicloning site) into pPU1930 by replacing the original *pheA* sequence located between the XbaI (the XbaI site is present upstream of the coding sequence of the *pheA* gene in pPU1930) and BclI sites to generate pUPpheA56+A. A pPU1930 derivative carrying the mutated sequence was first identified by the absence of the SalI restriction site in the *pheA* sequence. Finally, we cloned the SacI- and PvuII-generated fragment from pUPpheA56+A containing the constitutively expressed promoter and the mutated *pheA* gene into the broad-host-range plasmid pKT240 (2) to obtain pKTpheA56+A.

Assay systems allowing detection of base substitutions (Fig. 1) were constructed by using a two-step PCR amplification strategy. Mutant oligonucleotides contained specific base substitutions that replaced the CTG codon for Leu-22 in the *pheA* gene with a TGA, TAA, or TAG stop codon. In the first step, the PCR with oligonucleotides pheAup and pheA22TGA (5'-CGCTT**CA**CCCATCATCAAAAATGACGCTA-3'), pheA22TAA (5'-GCGCTT**TA**CCCATCATCAAAAATGACGCTA-3'), or pheA22TAG (5'-GCGCTT**CA**CCCATCATCAAAAATGACGCTA-3'), complementary to the positions 42 to 71 relative to the coding sequence of the *pheA* gene, was carried out. ExoI treatment followed, and the PCR products were purified and used in a second PCR with the oligonucleotide pheAts (5'-GTTTCATGGGGGACTGCTTC-3'), complementary to *pheA* nucleotides 295 to 313. The amplified DNA fragments were cloned into the EcoRV site of pBluescript KS (+), and the mutations were verified by DNA sequencing. The next steps in the cloning strategy were identical to those used for the construction of the frameshift assay plasmid pKTpheA56+A. Finally, plasmids pKTpheA22TGA, pKTpheA22TAA, and pKTpheA22TAG were obtained.

Construction of *P. putida* *dinB* and *recA* knockout mutants. The *dinB* and *recA* gene sequences of *P. putida* KT2440 were obtained from The Institute for Genomic Research website (<http://www.tigr.org>). The *dinB* gene was amplified by PCR from genomic DNA of *P. putida* PaW85, which is isogenic to *P. putida* strain KT2440. Two primers, dinBfw (5'-GGCCTTTTCTTGAATCTGGTTGC G-3'), complementary to the sequence -518 to -496 upstream of the ATG initiator codon, and dinBrev (5'-GCGGATCCAGGCGTGCATTATTAG-3'), complementary to the sequence 24 to 47 nucleotides downstream of the TGA stop codon of the *dinB* gene, were used for PCR amplification. The amplified DNA fragment containing the *dinB* gene was subcloned into EcoRV-cleaved pBluescript KS (+), to obtain pKSdinB. The EcoRI- and Van9I-generated DNA fragment containing the Tet^r gene from pBR322 was inserted into the Van9I-

cleaved *dinB* gene. The resulting *dinB::tet* sequence from pKSdinB::tet was inserted into plasmid pGP704 L (48) by using Acc65I and XbaI sites. Plasmid pGP704dinB::tet was selected in *E. coli* strain CC118 λpir (30). The interrupted *dinB* gene was inserted into the chromosome of *P. putida* PaW85 by homologous recombination. Plasmid pGP704dinB::tet, not able to replicate in hosts other than *E. coli* CC118 λpir, was conjugatively transferred into *P. putida* PaW85 by using a helper plasmid, pRK2013 (13). The PaW85 *dinB::tet* knockout strain was verified by PCR analysis.

For the construction of a *recA* knockout mutant of *P. putida*, the genomic DNA of PaW85 was amplified with oligonucleotides RecAfw (5'-ACAAGA AGCGCGCCTTGGTC-3') and RecArev (5'-ATCAGCTTCAGCAGCAGCA GCTT-3'), complementary to the sequences -66 to -45 upstream of the ATG initiator codon and 37 to 60 nucleotides 5' to the stop codon of the *recA* gene, respectively. The amplified DNA fragment was subcloned into EcoRV-cleaved pBluescript KS (+) to obtain pKSrecA. The EcoRI- and Van9I-cleaved DNA fragment containing the Tet^r gene from pBR322 was blunt ended and inserted into the BclI-cleaved *recA* gene (the BclI ends were blunt ended before the ligation as well), resulting in pKSrecA::tet. Finally, the DNA fragment containing the *recA::tet* sequence was inserted with XbaI and Ecl136II ends into pGP704 L to obtain pGP704recA::tet. The wild-type *recA* sequence of *P. putida* was replaced with the interrupted *recA::tet* sequence by homologous recombination using a procedure similar to that described above. The knockout mutant was verified by PCR analysis. Additionally, a UV sensitivity test (43) was performed to verify the RecA-defective strain PaW85 *recA::tet*.

DNA sequence analysis. In Phe⁺ mutants, an approximately 350-bp DNA region covering the area of the *pheA* gene containing potential reversion mutations was analyzed by DNA sequencing. The DNA segment containing this region was amplified by PCR using the primers pheAup and pheAts. The nucleotide sequences were determined using the DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc). The oligonucleotides used in sequencing of the mutant DNA region were the same as those used in PCRs. The DNA sequencing reactions were analyzed with an ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer).

Overexpression of the *P. putida* *dinB* gene. The *dinB* gene lacking any regulatory sequences upstream of its ATG initiator codon was obtained by PCR amplification of *P. putida* PaW85 chromosomal DNA with primers dinBNde (5'-CATATGTCCTTGGCGCAAGATCATCCA-3'), complementary to the nucleotides -3 to 23 relative to the *dinB* ATG initiator codon, and dinBrev. The amplified DNA fragment was cloned into the pBluescript KS (+) EcoRV site. We chose the construct carrying the *dinB* gene in the pBluescript vector in the opposite direction relative to the transcription direction from the *lac* promoter and named pKSATGdinB. By using the PstI and Acc65I restriction sites present in the pBluescript multicloning site, the *dinB* gene was further subcloned into the pBRLactac plasmid (47) under the control of the P_{lac} promoter and *lacI^r* repressor to generate plasmid pBRLactacdinB. In order to overexpress the *dinB* gene in *P. putida*, the *dinB* expression cassette was finally inserted as the NheI- and Acc65I-generated DNA fragment into the XbaI- and Acc65I-cleaved single-copy broad-host-range plasmid pPR9TT (52) to obtain p9TTlacIactacdinB. To avoid a leaky transcription of the *dinB* gene from the P_{lac} promoter, which is deleterious to *P. putida* cells, plasmid pKTlacI carrying an additional copy of the *lacI* gene was constructed by inserting the DNA fragment containing the *lacI* gene from pREP4 (QIAGEN) with Eco47III- and SmaI-generated ends into the Ecl136II site of the pKT240 vector. The *dinB* overexpression studies with *E. coli* were performed with cells carrying plasmid pBRLactacdinB; *P. putida* PaW85 carried two plasmids, p9TTlacIactacdinB and pKTlacI. The expression level of *dinB* was artificially increased by addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to the growth medium of 1.5-ml separate cultures of exponentially growing bacteria. After 6 h of cultivation of bacteria, 0.1-ml samples were taken from the cultures and spread onto LB plates containing 100 μg of rifampin/ml. Colonies were counted on plates incubated for 24 h. The control experiments were performed using bacteria carrying the same vector plasmids lacking the *dinB* gene. The frequency of mutation to Rif^r per 10⁹ cells was calculated for at least 35 independent cultures.

Studies of transcription from the *dinB* promoter. A DNA fragment containing a putative *dinB* promoter region was amplified by PCR with oligonucleotides dinBBamHI (5'-CCTTGGATCCAAGCTTTTAAACGGGCAAGAAA-3') and dinBXho (5'-ACGCTGCGATCGAGATGCGCTCGAGAAG-3'), complementary to the nucleotides at positions -328 to -350 and 40 to 58, respectively, relative to the ATG initiator codon of the *dinB* gene. The amplified DNA fragment was cut with BamHI and XhoI and inserted into BamHI- and XhoI-cleaved pBluescript KS (+) to obtain pKSPdinB. To construct the *luxAB* reporter plasmid replicating in *P. putida*, the promoterless *luxAB* genes were subcloned within the BamHI-cleaved DNA fragment from pGP704 L into pBlue-

script KS (+) to obtain pKSluxAB. Then, by using the SacI and XhoI restriction sites provided by the pBluescript vector multicloning sites, the *luxAB* genes were inserted into SacI- and XhoI-cleaved pKT240. The resulting plasmid, named pKTluxAB, was used as a multicopy promoter-probe vector for study of the transcription from the *dinB* promoter. The putative promoter region of the *dinB* gene was cloned from plasmid pKSPdinB into pKTluxAB, using restriction enzymes SmaI and Acc65I. The resulting plasmid was named pKTPdinBluxAB. In order to study the regulation of transcription from a single copy of the *dinB* promoter, the P_{dinB} -*luxAB* expression cassette was subcloned from pKTPdinBluxAB into the NotI site of pPR9TT to obtain p9TTPdinBluxAB.

P. putida cells carrying pKTPdinBluxAB were grown exponentially in LB medium. In order to study whether DNA damage could induce transcription from the *dinB* promoter, mitomycin C (at a final concentration of 2 μ g/ml) was added to cultures. Samples for luciferase assay were taken from *P. putida* exponential cultures grown in the presence or absence of mitomycin C. In all cases at least five independent measurements were made. The luciferase assay was performed as follows: 990 μ l of phosphate buffer (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, [pH 7]) and 10 μ l of decanal (5 mM decanal in ethanol) were mixed in a test tube; 10 μ l of bacterial culture was then added, and light emission was measured after 5 min of incubation with a luminometer (TD-20/20; Turner Designs).

To study the effect of the growth phase of bacteria on transcription from the *dinB* promoter, the promoter was subcloned from pKSPdinB into the promoter-probe vector pKTlacZ, using restriction enzymes BamHI and XhoI, to obtain plasmid pKTPdinBlacZ. β -Galactosidase (β -Gal) activities in *P. putida* cells carrying pKTPdinBlacZ were measured by a modification of the standard protocol of Miller (43) as specified previously (64). Bacteria were grown in LB medium.

To map the transcription initiation site of the *P. putida dinB* gene, a reverse transcriptase reaction was carried out to identify the 5' end of the *dinB*-specific mRNA. Total RNA was isolated from exponentially growing cells of *P. putida* using the QIAGEN RNeasy total RNA kit. Ten micrograms of purified RNA was used as a template in primer extension reactions with 10 pmol of [γ - 32 P]ATP-labeled primer dinBXho. DNA sequencing reactions were performed using a Sequenase version 2.0 kit (U.S. Biochemicals) and the same primer, and the reaction mixtures were loaded onto a sequencing gel as size markers. A dried gel was exposed to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics).

Isolation of Phe⁺ mutants. *P. putida* cells carrying different assay systems for the detection of Phe⁺ revertants were grown overnight in LB medium. Cells sampled from the culture were harvested by centrifugation and washed in M9 solution. Approximately 5×10^8 to 1×10^9 cells were spread onto phenol minimal plates. A few Phe⁺ colonies appearing on phenol minimal plates on day 2 contained mutations that occurred before the plating in a growing culture, whereas the colonies that emerged on selective plates on day 3 and later contained mutations that occurred after the cells were plated. To control whether the late-arising mutants could form a colony on phenol selective plates with a speed similar to that of those that emerged earlier, we performed reconstruction experiments. Plating of such mutants (approximately 100 cells) in the presence of 1×10^9 nonmutant cells onto phenol minimal plates demonstrated that all revertants tested were able to form visible Phe⁺ colonies on day 2 after plating of the mixed cultures. No more Phe⁺ colonies accumulated on these plates during the next days of incubation. This confirmed that the late revertants are truly stationary-phase mutants and that they are formed in *P. putida* populations after prolonged starvation. The pKT240-based plasmids carrying the test systems for detection of Phe⁺ mutations in *P. putida* are derivatives of the broad-host-range plasmid RSF1010 (2). We have previously shown (33) that the copy number of RSF1010-based plasmids is not affected by the growth phase of the bacteria.

Measurement of viability of Pol IV-defective and RecA-defective *P. putida* on phenol minimal plates. The viability of bacteria was determined on the same plates that were used for the isolation of Phe⁺ mutants. Using sterile 1-ml pipette tips, small plugs were cut out from the phenol-containing minimal plates, avoiding Phe⁺ colonies. The plugs were suspended in M9 solution by shaking for 10 min. Approximately 10^5 -fold dilutions were plated onto LB plates, and the number of CFU was determined for at least five independent starving cultures.

RESULTS

P. putida contains a DNA polymerase Pol IV homologue.

Analysis of complete genome sequences of *P. putida* KT2440 revealed that the putative Pol IV homologue in this strain has 50% identity with the *E. coli* Pol IV sequence. According to the literature, Pol IV overproduction in *E. coli* growing cells causes

TABLE 2. Effect of *P. putida dinB* overexpression on frequency of mutations in growing cells^a

Strain	<i>dinB</i> overexpression	Control ^b	<i>P</i> ^c
<i>E. coli</i> TG1	20.5	0.85	<0.0001
<i>P. putida</i> PaW85	1.70	0.30	<0.001

^a The frequency of mutation of Rif^r per 10^9 cells was calculated using the Lea-Coulson method of the median (39, 49).

^b Bacteria carried the same plasmid except lacking the *dinB* gene.

^c The Mann-Whitney test (57) for the effect of *dinB* overexpression.

hypermutation, including -1 frameshifts and some base substitutions (35, 67). To study whether overexpression of the *P. putida dinB* gene would also elevate the frequency of occurrence of spontaneous mutations in growing cells, we amplified the *P. putida dinB* (*dinP*) gene, encoding Pol IV, by PCR from chromosomal DNA of *P. putida* PaW85 (this strain is identical to KT2440) and cloned the gene into plasmid pBRLacItac (47) under the control of the P_{tac} promoter. We found that overexpression of the *P. putida dinB* gene in growing cells of *E. coli* carrying pBRLacItacdinB led to an approximately 24-fold increase in the frequency of appearance of Rif-resistant mutants (Table 2), which indicates that *P. putida* Pol IV is functional in *E. coli*.

To study the effects of overexpression of Pol IV on the frequency of mutations in *P. putida*, the *dinB* gene placed under the control of the P_{tac} promoter and the *lacI*^q repressor gene was inserted into a broad-host-range single-copy plasmid, pPR9TT (52). In contrast to *E. coli*, *P. putida* cells did not tolerate this construct, possibly due to a leakiness of the P_{tac} promoter. The colonies of p9TTlacItacdinB-carrying transformants that appeared on selective plates remained tiny, and cells picked up from these colonies were not further culturable. This indicated that artificial overexpression of the *dinB* gene in *P. putida* cells strongly inhibits growth of the bacteria and is probably lethal to the cells. To overcome the deleterious effect of leakiness of transcription of the *dinB* gene to *P. putida* cells, additional copies of the *lacI*^q repressor gene, present in the pKT240-derivative pKTlacI, were introduced into *P. putida* carrying the *dinB* expression construct p9TTlacItacdinB. In this case, by manipulating the IPTG concentrations, we found that addition of IPTG at a 1 mM concentration (but not below or above that concentration) resulted in an increase in the frequency of appearance of Rif-resistant mutants in *P. putida* cells (Table 2).

Construction of novel test systems for the study of mechanisms of stationary-phase mutations in *P. putida*. *P. putida* PaW85 cells carrying the phenol monooxygenase gene, *pheA*, are able to grow on minimal medium containing phenol as the only carbon source (45). Selection of mutants able to grow on phenol minimal plates due to the activation of a silent *pheA* gene has been used by us to study stationary-phase mutagenesis in *P. putida* (33, 53). The assay system employed in our previous studies allowed isolation of different types of mutations, base substitutions, deletions, and insertions, which all led to the same outcome—generation of a functional promoter. In the current study, in order to study the effects of different genetic backgrounds on the frequency of different types of mutations separately, we constructed a novel set of assay sys-

tems. Details of the construction of test systems are presented in Materials and Methods. One of these systems measures reversion of +1 frameshift within the phenol monooxygenase gene, *pheA* (Fig. 1). Three other test systems, designed for the detection of base substitutions, contain different stop codons, TAG, TAA, or TGA, introduced into the same position (Leu-22) of the *pheA* coding sequence (Fig. 1).

To control whether the test systems constructed really detect the expected mutations, some of the Phe⁺ revertants accumulating on phenol-containing selective plates were subjected to DNA sequence analysis. Sequence analysis of Phe⁺ mutants emerging in *P. putida* carrying the assay system which should measure a reversion of +1 frameshift in plasmid pKTp_{heA}56+A revealed that out of 15 mutants studied, 90% of frameshifts occurred at the neighboring site, in the CCC repeat flanking the inserted A nucleotide. Only 10% of the mutants contained an A nucleotide deletion. The -1 deletion at the CCC repeat restored the *pheA* reading frame by replacing the ACC codon (Thr) with the AAC codon (Asn).

Phe⁺ mutants isolated using the assay systems carrying different stop codons instead of the codon for Leu-22 in the *pheA* sequence were true revertants. No suppressors were isolated among approximately 100 mutants analyzed per test system. The absence of suppressor mutations was confirmed by the finding that all mutants analyzed contained base substitutions in the *pheA* gene which eliminated the stop codon by replacing it with codons for different amino acids (Table 3). Also, in the case of every revertant studied, the Phe⁺ phenotype was conjugatively transferred to the *P. putida* Phe⁻ recipient strain and the transconjugants carrying different mutant plasmids grew equally well on phenol minimal plates. Similar growth characteristics of different Phe⁺ transconjugants on phenol minimal plates indicated that the amino acid Leu-22 in the PheA protein is replaceable with many other amino acids without changing the wild-type phenotype of this enzyme. Analysis of the Phe⁺ revertants which appeared due to base substitutions revealed different spectra of mutations, depending on the sequence of the stop codon used in the particular assay system (Table 2). The spectrum of changes that occurred in the case of the assay system carrying the TAA stop codon (plasmid pKTp_{heA}22TAA) was most homogeneous: among 43 mutants analyzed, 88% contained a T-to-C transition and the rest (12%) had a T-to-G transversion. The T-to-C transition was also dominant in the case of mutants isolated using the assay systems carrying either the TGA or TAG codon (plasmids pKTp_{heA}22TGA and pKTp_{heA}22TAG, respectively), although several other DNA changes were identified as well (Table 3).

Pol IV contributes to -1 deletions in starving cells of *P. putida*. In order to study possible involvement of the error-prone DNA polymerase Pol IV in occurrence of stationary-phase mutations in *P. putida*, we constructed a *dinB* knockout mutant of *P. putida* PaW85 (see Materials and Methods). Based on analysis of the sequence of the *P. putida* genome, the *dinB* gene does not belong to an operon of other genes. Therefore, possible negative effects of disruption of the *dinB* gene on transcription of other genes are excluded. Cells of wild-type *P. putida* PaW85 and its Pol IV-defective derivative PaW85 *dinB::tet* carrying different test systems (plasmid pKTp_{heA}56+A, pKTp_{heA}22TAA, pKTp_{heA}22TGA, or

TABLE 3. Reversion of different nonsense mutations (TGA, TAA, and TAG) in independent Phe⁺ mutants accumulating in starving cell populations of *P. putida* PaW85

Target ^a	DNA change	Occurrence(s) (%)	Reversion change	
			Codon	Amino acid
TGA	T → C	13 (54)	CGA	Arg
	T → G	5 (21)	GGA	Gly
	G → T	4 (17)	TTA	Leu
	A → C	2 (8)	TGC	Cys
TAA	T → C	38 (88)	CAA	Gln
	T → G	5 (12)	GAA	Glu
TAG	T → C	44 (61)	CAG	Gln
	A → G	11 (15)	TGG	Trp
	G → T	8 (11)	TAT	Tyr
	T → G	6 (8.5)	GAG	Glu
	G → C	1 (1.5)	TAC	Tyr
	A → T	1 (1.5)	TTG	Leu
	T → A	1 (1.5)	AAG	Glu

^a In all cases the same codon, CTG for Leu 22, was altered in the wild-type *pheA* sequence.

pKTp_{heA}22TAG) were plated onto phenol minimal plates containing phenol as the only carbon source. Results presented in Fig. 2A clearly demonstrate that the occurrence of 1-bp deletion mutations depends on the presence of the functional *dinB* gene in *P. putida*. Starting from day 9, the frequency of accumulation of Phe⁺ mutants on selective plates increased remarkably, and on day 11 and later the accumulation frequency of the Phe⁺ revertants in the *P. putida* wild-type strain was approximately 10 times higher than in the Pol IV-defective mutant. The lower frequency of accumulation of 1-bp deletion mutants in PaW85 *dinB::tet* could not be ascribed to a lower viability of *dinB*-defective cells under starvation conditions: during the 13 days studied, the Pol IV-defective strain survived as well as the wild-type strain (Fig. 2B). Thus, Pol IV-dependent mutagenesis could be elevated under conditions of long-term starvation of *P. putida* cells.

No effect of the *dinB* knockout became apparent if we measured the frequency of appearance of Phe⁺ mutants in starving cell populations of *P. putida* carrying test systems which allowed detection of base substitutions (data not shown). This indicated that Pol IV contributes only to a particular type of stationary-phase mutations in *P. putida*.

RecA is not required for Pol IV-dependent mutagenesis in *P. putida*. In *E. coli*, *dinB* is one of the genes induced in response to DNA damage (SOS response). After RecA-mediated cleavage of the LexA repressor, SOS regulon genes including *dinB* become upregulated (11, 38). DNA polymerase Pol IV-dependent stationary-phase mutations in the well-studied *E. coli* FC40 Lac⁺ reversion system require a functional RecA protein (7, 42). In order to study whether the occurrence of *dinB*-dependent stationary-phase mutations are affected by RecA functionality in *P. putida*, we constructed a RecA-defective mutant of *P. putida* strain PaW85 (see Materials and Methods). Our experiments showed that the rate of accumulation of 1-bp deletion mutants was similar in the wild-type *P. putida* and its RecA-deficient derivative PaW85 *recA::tet* (Fig. 2A). This demonstrated that the occurrence of Pol IV-dependent sta-

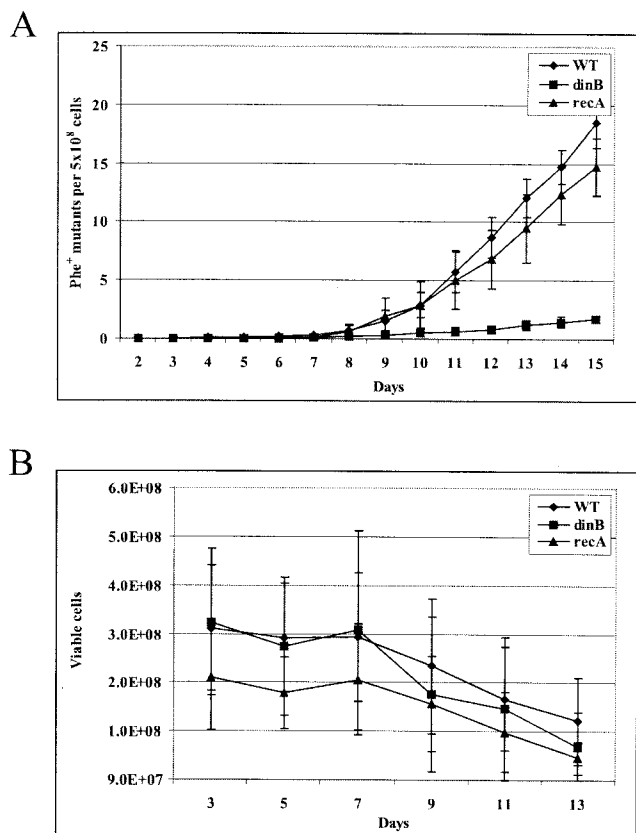


FIG. 2. (A) Accumulation of Phe⁺ mutants on phenol minimal plates of *P. putida* wild-type strain PaW85 (WT) and in its *dinB*-defective (*dinB*) and *recA*-defective (*recA*) derivatives carrying plasmid pKTpheA56+A. About 5×10^8 *P. putida* cells were plated from overnight LB-grown cultures onto phenol minimal plates. Data for at least five parallel experiments are presented. Means \pm standard deviations (error bars) for 10 plates calculated per 5×10^8 cells are shown. (B) Viability of *P. putida* wild-type strain PaW85 (WT) and in its *dinB*-defective (*dinB*) and *recA*-defective (*recA*) derivatives on phenol minimal plates. Means \pm standard deviations for at least five cultures are shown. $1.0E + 08$, for example, indicates 10^8 viable cells.

tionary-phase mutations observed in this study does not require the RecA protein.

Transcriptional analysis of the *P. putida* *dinB* promoter. In order to study transcription from the *dinB* promoter, the putative promoter region of the *dinB* gene was cloned upstream of the *luxAB* reporter into plasmid pKTluxAB. The resulting plasmid, pKTPdinBluxAB, expressed a high constitutive level of luciferase activity (Fig. 3). Mapping of the transcription initiation site by primer extension analysis localized the 5' end of the *dinB*-specific mRNA at the G nucleotide which is six nucleotides downstream from the putative promoter sequence, resembling the σ^{70} -type promoter consensus TTGACAN₁₆₋₁₈TATAAT (Fig. 4). The sequence GTTTCA, resembling the -35 hexamer, and TACTAT, similar to the -10 hexamer, of this promoter were separated by a 17-nucleotide spacer. The *P. putida* *dinB* promoter region contains a sequence exhibiting similarity to the LexA binding consensus CTG-N₁₀-CAG (69) (Fig. 4B). This sequence overlaps the -10 hexameric sequence of the *dinB* promoter by two nucleotides. Therefore, one may expect repression of this promoter by a LexA protein (the *P.*

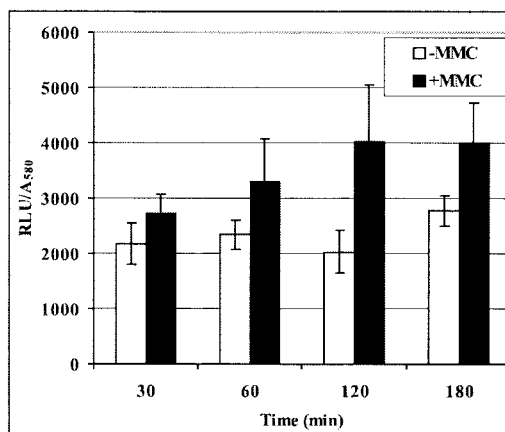


FIG. 3. Study of effects of DNA damage on transcription from the *dinB* promoter in *P. putida* PaW85. The promoter was cloned upstream of the reporter genes *luxAB*, encoding luciferase, and the expression of the transcriptional fusion was measured on pKT240-derived broad-host-range plasmid pKTPdinBluxAB. Transcription from the *dinB* promoter was assayed by measuring the luciferase activity (relative luciferase units/optical density unit at 580 nm) in cells grown in LB medium in the presence or absence of DNA-damaging agent mitomycin C ($2 \mu\text{g/ml}$). We determined that addition of higher concentrations of mitomycin C (up to $20 \mu\text{g/ml}$) to the growth medium of the bacteria did not cause greater effects on transcription from the *dinB* promoter.

putida genome contains two different *lexA* gene homologues; see, e.g., <http://www.tigr.org>). However, despite the presence of putative LexA binding sites in the *dinB* promoter region, addition of the DNA damage-inducing agent mitomycin C to the growth medium of bacteria had only a minor increasing effect (up to twofold) on the level of transcription from the *dinB* promoter (Fig. 3). The similar up-to-twofold positive effect of addition of mitomycin C became evident when the level of transcription from the *dinB* promoter was monitored in a single-copy plasmid, p9TTPdinBluxAB (data not shown). The latter fact excludes the possibility that the cellular amount of LexA repressor might be too low to saturate all its binding sites when the *dinB* promoter is expressed in a medium-copy-number plasmid, pKTPdinBluxAB (approximately 10 copies per cell). Thus, transcription from the *dinB* promoter is poorly stimulated after DNA damage in *P. putida* cells.

Recently, Layton and Foster (38) demonstrated that in *E. coli*, the level of Pol IV is controlled by the stationary-phase sigma factor RpoS. RpoS is shown to also be a transcription regulator in *Pseudomonas*; however, it is less important in stress survival and has more specific roles related to virulence and colonization (reviewed in reference 66). In order to study whether the level of the transcription from the *dinB* promoter could be elevated in *P. putida* stationary-phase cells and to investigate possible effects of RpoS on transcription, we decided to compare expression of the reporter gene under the control of the *dinB* promoter in the wild type and RpoS-defective bacteria sampled from different time points of the batch culture. Because the *luxAB* reporter system is sensitive only in exponentially growing cells, we used another reporter, the *lacZ* gene, and monitored the level of β -Gal activity in *P. putida* cells carrying a *dinB* promoter-*lacZ* transcriptional fusion in the plasmid pKTPdinBlacZ during 100 h of cultivation

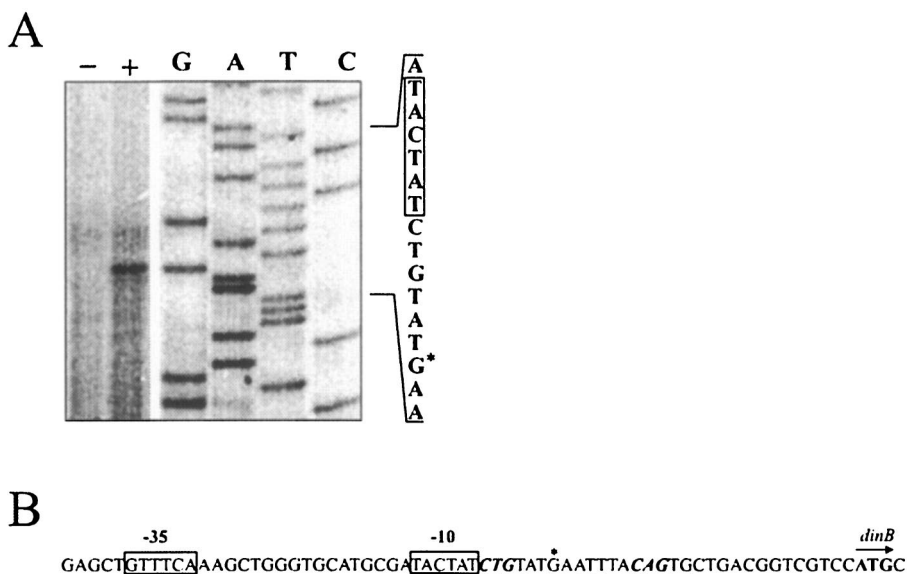


FIG. 4. (A) Mapping of the transcription initiation site for the *P. putida* *dinB* promoter by reverse transcriptase. Lanes G, A, T, and C show DNA-sequencing reactions of the *dinB* promoter region. Lanes marked by – and + represent primer extension reactions carried out with total RNA isolated from a *P. putida* PaW85 plasmid-free strain and from the same strain carrying extra copies of the *dinB* promoter region in medium-copy-number plasmid pKTPdinBluxAB, respectively. The sequence of the *dinB* promoter region, including the –10 sequence of the promoter (boxed) and the transcription start point (indicated by an asterisk), are shown on the right. (B) Nucleotide sequence of the *P. putida* *dinB* promoter region. The putative –35 and –10 hexamers of the promoter are boxed, and the 5' end of the *dinB* mRNA is indicated by an asterisk. The potential LexA binding site is underlined (LexA binding consensus nucleotides [69] are in boldface). The translation start site of the *dinB* gene is indicated by an arrow.

of bacteria. Results shown in Fig. 5 demonstrate that transcription from the *dinB* promoter is not controlled by RpoS. In both strains studied (the wild type and the RpoS mutant), we observed a modest increase (approximately twofold) in the level of β -Gal expression if the activities from exponentially growing

cells and stationary-phase cells sampled at h 12 were compared. During the prolonged incubation of bacteria in stationary phase the β -Gal activities increased but these changes were also small: an approximately threefold difference became apparent if transcription in exponentially growing and late-stationary-phase cells was compared. This experiment indicated that, although the transcription of the *dinB* gene in *P. putida* is affected by the growth conditions of the bacteria, RpoS does not play any role in *dinB* transcription.

DISCUSSION

Stationary-phase mutagenesis mechanisms have mostly been studied during short-term experiments, usually lasting less than 1 week. However, a large majority of microorganisms in their natural environments face far longer periods of starvation. Results of our recently published study (53) suggested that mutation processes in cells that have been starving for a short period are not entirely compatible with those of a prolonged starvation. The data presented by us herein demonstrate an increase in the frequency of accumulation of Phe⁺ mutants in populations of *P. putida* during prolonged starvation. The test system used for the isolation of these mutants is based on reversion of +1 frameshift in the *pheA* gene. We found that the error-prone DNA polymerase Pol IV was specifically required for most 1-bp deletions detected by measuring the frequency of appearance of Phe⁺ revertants in long-term-starved populations of *P. putida* (Fig. 2A). Meanwhile, this effect of Pol IV became clearly apparent only in cell populations that had already been starved for a carbon source for more than 7 days.

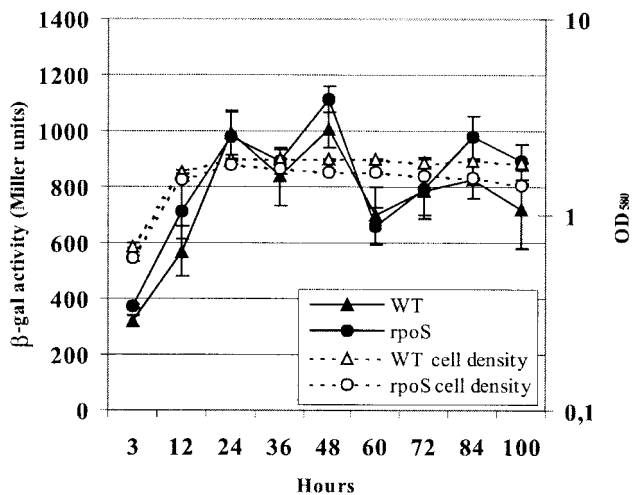


FIG. 5. Effect of growth phase of bacteria on transcription from the *dinB* promoter. β -Gal activity was measured in *P. putida* wild-type strain PaW85 (WT) and its RpoS-defective derivative PKS54 (*rpoS*) carrying the *dinB* promoter-*lacZ* fusion in plasmid pKTPdinBlacZ. Bacteria were grown in LB medium. Growth curves of bacteria are indicated by dashed lines. Results of four independent experiments are presented. The standard deviations are shown. OD₅₈₀, optical density at 580 nm.

This implies that Pol IV-dependent mutagenesis could be induced under conditions of long-term environmental stress.

The idea that some mechanisms have probably evolved to control the mutation rate in a cell is a subject of intense scientific debate (see, for example, references 36, 50, 51, 55, and 63). Evidence supporting the hypothesis that stress-induced mutagenesis is a genetically programmed strategy has been found in different organisms, which indicates that regulation of stress-induced mutagenesis is general to all microorganisms. However, different control mechanisms may exist. For example, mutagenesis in resting organisms in structured environments (ROSE mutagenesis), which occurs in *E. coli* aging colonies, involves control by the SOS system and the catabolite repression system (62). Studies by Bjedov et al. (5) revealed that the frequency of mutations increased remarkably between 1-day- and 7-day-old colonies of most natural isolates of *E. coli*, from diverse habitats worldwide, and the mutagenesis in aging colonies, in one natural isolate tested, was genetically controlled by RpoS and carbon-sensing regulators. Sung and Yasbin (60) demonstrated that accumulation of prototrophic revertants among *Bacillus subtilis* cells required activity of genes that are involved in regulation of bacterial differentiation. In our previous study of *P. putida* (53), we demonstrated that the spectrum of stationary-phase mutations among early-arising mutants (picked up on days 3 and 4) differs from that of later-arising ones (picked up on days 6 and 7). The occurrence of mutations, the number of which started to increase later (e.g., 2- to 3-bp deletions), was dependent on the stationary-phase sigma factor RpoS (53). At the same time, the transposition of *IS1411*, which also increased with time of starvation and resulted in emergence of Phe⁺ mutants, was under the negative control of RpoS (53). Most recently, Layton and Foster (38) provided evidence that the cellular amount of Pol IV in *E. coli* FC40 is controlled by RpoS, and Pol IV is required for stationary-phase mutation in that system (7, 42). Results presented here demonstrate that the frequency of accumulation of Pol IV-dependent mutants increases in *P. putida* populations during prolonged starvation. Whether RpoS is involved in Pol IV-dependent stationary-phase mutagenesis in the +1 frameshift reversion examined by us in the current study is difficult to determine because *P. putida* cells lacking functional RpoS die in cultures that have been starved more than 1 week (32).

Mechanisms of Pol IV-dependent stationary-phase mutations studied by us in *P. putida* differ in some aspects from those of the well-studied model organism *E. coli*. RecA is both a signal sensor/transducer molecule for the SOS response and a recombination protein (20). In the case of Pol IV-dependent mutagenesis in *E. coli* strain FC40, which has become a paradigm of stationary-phase mutation, the Lac⁺ mutations that arise in starving-cell populations on lactose selective plates require RecA function and a RecBCD double-stranded-break repair system (8, 19, 27, 28). The recombination-dependent stationary-phase mutations are proposed to result from erroneous DNA replication at sites of double-stranded-break repair via homologous recombination (for a review of this model, see, for example, references 15, 17, and 50). The results reported by McKenzie et al. (41) indicate that the SOS activation function of RecA is also required for Lac⁺ reversion in starving cells. DNA polymerase Pol IV, which is required specifi-

cally for 1-bp deletions in the Lac⁺ reversion system in stationary-phase cells (but not in growing cells), is up-regulated during the SOS response (7, 42). An alternative amplification-mutagenesis model for RecA function in Pol IV-dependent Lac⁺ reversion phenomena has also been proposed (29, 56). In the current study we showed that Pol IV-dependent mutagenesis in *P. putida* is RecA independent. Also, in contrast to *E. coli*, transcription from the *dinB* promoter in *P. putida* cells occurs at a high basal level both in the presence and absence of the DNA damage-inducing agent mitomycin C: we observed only a slight, maximum twofold increase after induction of DNA damage (Fig. 3). In comparison with *E. coli*, the SOS response in *P. putida* has been only poorly studied. However, the existence of a similar DNA damage-inducible response has been found by analyzing DNA damage-mediated induction of the *P. putida* *lexA* gene (9).

E. coli strains which have been used to study the role of Pol IV in stationary-phase mutations carry two copies of *dinB*, one in the chromosome and the other in the F' plasmid (42). The higher expression of *dinB* in *E. coli* starving cells, resulting in stationary-phase mutagenesis, is hypothesized to be connected with sporadic amplification of the F' plasmid DNA region carrying the *dinB* gene (37, 55). However, the increase in *dinB* expression in stationary phase shown by Layton and Foster (38) was observed in the absence of selection for *dinB* amplification. Differently from *E. coli*, the occurrence of stationary-phase mutations studied by us in *P. putida* depends on the presence of a single chromosomal copy of the *dinB* gene. If compared to exponentially growing cells, the level of transcription from the *dinB* promoter in *P. putida* was increased threefold in late-stationary-phase cells (Fig. 5). However, unlike expression of *dinB* in *E. coli*, the transcription of *dinB* in *P. putida* was not dependent on RpoS. This and other differences discussed above indicate that mechanisms distinct from those proposed to control expression of *dinB* in *E. coli* may up-regulate Pol IV-dependent mutagenesis under conditions of long-term environmental stress in *P. putida* starving cells.

There are at least three nonexclusive explanations of how the frequency of accumulation of Pol IV-dependent mutants can increase in long-term-starved cell populations: (i) some posttranscriptional/posttranslational mechanisms may control the activity of Pol IV in stressed *P. putida* cells; (ii) levels of Pol IV protein might increase in *P. putida* stationary-phase cells; and (iii) DNA repair can be depressed during prolonged starvation. Studies of stationary-phase mutagenesis in *E. coli* FC40 have demonstrated that defects in methyl-directed mismatch repair (MMR) resulted in a great increase in the number of Lac⁺ mutants that arose with time after lactose selection (18). The spectra of Lac⁺ reversion mutations observed in growing cells of MMR-deficient strains (1-bp deletions in small mononucleotide repeats) were indistinguishable from the spectrum of Lac⁺ reversion mutations characterized in stationary-phase cells of the wild-type strain (40). MMR has been shown to be down-regulated in stationary phase (12, 65). Moreover, results by Harris et al. (26) imply that the MMR protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation. The role of down-regulation of MMR in accumulation of Lac⁺ mutants in the FC40 system has stimulated an active dispute (14, 25). The idea that down-regulation of MMR might be involved in stationary-phase mutagenesis is supported by the finding that an

MMR-defective mutant did not show any significant elevation of mutagenesis in aging colonies (5). The 1-bp deletions measured in starving cells of FC40 which resulted in Lac⁺ reversion were mostly produced by Pol IV (7, 42). Wagner and Nohmi (67) have also shown that many Pol IV-induced errors are corrected by MMR. Moreover, that report (67) demonstrates saturation of the MMR system as a result of accumulation of errors made by overproduced Pol IV. Hence, drawing parallels with data obtained in *E. coli*, we hypothesize that the increase in the frequency of Pol IV-dependent mutations observed by us might be caused by the malfunctioning of MMR in *P. putida* starving cells. Moreover, one may speculate that MMR might be disabled due to a higher activity of Pol IV in long-term-starved *P. putida*. Further and more straightforward investigations are needed to test these hypotheses.

Rifampin mutation assay scores only base substitutions, but the most frequently observed mutations associated with Pol IV activity in *E. coli* are frameshifts (35). Artificial overproduction of Pol IV in *P. putida* growing cells resulted in an elevated frequency of occurrence of Rif-resistant mutants, which indicates that Pol IV can contribute to base substitutions in this organism as well. However, the occurrence of base substitutions in starving *P. putida* did not require the activity of Pol IV. Depending upon the DNA lesion and its sequence context, different DNA polymerases are involved in generation of mutations in *E. coli* (22, 44, 68). Thus, if only a specific type of mutation in a specific sequence context is detectable in a given assay system, some assay systems may be less relevant for the detection of Pol IV-generated mutations than others. Base substitutions in the *rpoB* gene measured by us (Rif-resistant mutants in growing cell populations) and in the test systems detecting Phe⁺ reversion mutations also occurred in different sequence contexts. Therefore, the failure to detect Pol IV-dependent base substitutions in starving cell populations in this study can be explained by the use of different assay systems for growing and stationary-phase cells. At the same time, results presented by Wagner and Nohmi (67) suggested a bias for Pol IV-generated mutations occurring in sequences with a guanine base at the 5' position of the mutated base. Our test systems designed for the measurement of base substitutions in the *pheA* gene detected mostly T-to-C transitions either in the sequence 5'-GGGTAA-3' or 5'-GGGTAG-3'. According to Wagner and Nohmi (67) both these sequences should be favored for base substitutions generated by Pol IV. Therefore, an alternative explanation for the phenomenon of why we did not observe any effect of Pol IV on generation of base substitutions in starving cells would be that the role of Pol IV in mutagenesis may vary between growing and stationary-phase cells.

It was recently shown that stationary-phase *E. coli* cells lacking one or more SOS-induced DNA polymerases (Pol II, Pol IV, and Pol V) are less fit when grown in the presence of wild-type cells under conditions in which the ability to generate GASP mutations (growth advantage in stationary phase) is under selection (70). Base pair substitution mutations occurring in stationary-phase cells of *E. coli* have been shown to be dependent on Pol V (4). Among gram-negative bacteria, *Pseudomonas* species examined so far, like many other nonenteric bacteria, lack chromosomally encoded Pol V. Although genes encoding Pol V homologues are frequently found in plasmids (34, 46, 59), bacteria lacking these plasmids accumu-

late stationary-phase mutations as well. Results of our current study demonstrate that only a particular type of stationary-phase mutations in *P. putida* requires Pol IV activity. Hence, the question arises whether these bacteria would express some other error-prone DNA polymerase activities involved in stationary-phase mutagenesis. Experiments to address this question are currently in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Alamäe, R. Hórak, and other coworkers for critically reading the manuscript and J. Truu for help in statistical analysis of the data.

This work was supported by grants 4481 and 4482 from the Estonian Science Foundation and by grant HHMI 55000316 from the Howard Hughes Medical Institute International Research Scholars Program.

REFERENCES

- Adams, M. H. 1959. Bacteriophages, p. 445–447. Interscience Publishers Inc., New York, N.Y.
- Bagdasarian, M. M., E. Ammann, R. Lurz, B. Ruckert, and M. Bagdasarian. 1983. Activity of the hybrid *trp-lac* (*tac*) promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors. *Gene* **26**:273–282.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy, and P. Broda. 1977. Two modes of loss of the TOL function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* **154**:203–204.
- Bhamre, S., B. B. Gadea, C. A. Koyama, S. J. White, and R. G. Fowler. 2001. An aerobic *recA*, *umuC*-dependent pathway of spontaneous base-pair substitution mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **473**:229–247.
- Bjedov, I., O. Tenailon, B. Gérard, V. Souza, E. Denamur, M. Radman, F. Taddei, and I. Matic. 2003. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* **300**:1404–1409.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95–113.
- Bull, H. J., M.-J. Lombardo, and S. M. Rosenberg. 2001. Stationary-phase mutation in the bacterial chromosome: recombination protein and DNA polymerase IV dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:8334–8341.
- Cairns, J., and P. L. Foster. 1991. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **128**:695–701.
- Calero, S., X. Garriga, and J. Barbé. 1993. Analysis of the DNA damage-mediated induction of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* *lexA* genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**:65–70.
- Carter, P., H. Bedouelle, and G. Winter. 1985. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* **13**:4431–4443.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**:41–64.
- Feng, G., H.-C. T. Tsui, and M. E. Winkler. 1996. Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells. *J. Bacteriol.* **178**:2388–2396.
- Figurski, D. H., and 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. USA* **76**:1648–1652.
- Foster, P. L. 1999. Are adaptive mutations due to decline in mismatch repair? The evidence is lacking. *Mutat. Res.* **436**:179–184.
- Foster, P. L. 1999. Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu. Rev. Genet.* **33**:57–88.
- Foster, P. L. 2000. Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **65**:21–29.
- Foster, P. L. 2001. Adaptive mutation: implications for evolution. *BioEssays* **22**:1067–1074.
- Foster, P. L., and J. Cairns. 1992. Mechanisms of directed mutation. *Genetics* **131**:783–789.
- Foster, P. L., J. M. Trimarchi, and R. A. Maurer. 1996. Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **142**:25–37.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, and W. Siede. 1995. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.
- Friedberg, E. C., P. L. Fischhaber, and C. Kisker. 2001. Error-prone DNA polymerases: novel structures and the benefits of infidelity. *Cell* **107**:9–12.
- Friedberg, E. C., R. Wagner, and M. Radman. 2002. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* **296**:1627–1630.
- Goodman, M. F. 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:17–50.

24. Hanahan, D. 1983. Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:577–580.
25. Harris, R. S., G. Feng, K. J. Ross, R. Sidhu, C. Thulin, S. Longrich, S. K. Szigety, M. E. Winkler, and S. M. Rosenberg. 1999. Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation. *Mutat. Res.* **437**:51–60.
26. Harris, R. S., G. Feng, K. J. Ross, R. Sidhu, C. Thulin, S. Longrich, S. K. Szigety, M. E. Winkler, and S. M. Rosenberg. 1997. Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation. *Genes Dev.* **11**:2426–2437.
27. Harris, R. S., S. Longrich, and S. M. Rosenberg. 1994. Recombination in adaptive mutation. *Science* **264**:258–260.
28. Harris, R. S., K. J. Ross, and S. M. Rosenberg. 1996. Opposing roles of the Holliday junction processing systems of *Escherichia coli* in recombination-dependent adaptive mutation. *Genetics* **142**:681–691.
29. Hendrickson, H., E. S. Slechta, U. Bergthorsson, D. I. Andersson, and J. R. Roth. 2002. Amplification-mutagenesis: evidence that “directed” adaptive mutation and general hypermutability result from growth with a selected gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:2164–2169.
30. Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557–6567.
31. Hórák, R., and M. Kivisaar. 1998. Expression of the transposase gene *tnpA* of Tn4652 is positively affected by integration host factor. *J. Bacteriol.* **180**:2822–2829.
32. Iives, H., R. Hórák, and M. Kivisaar. 2001. Involvement of σ^S in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652. *J. Bacteriol.* **183**:5445–5448.
33. Kasak, L., R. Hórák, and M. Kivisaar. 1997. Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3134–3139.
34. Kim, J. J., and G. W. Sundin. 2000. Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability in vitro in planta. *J. Bacteriol.* **182**:6137–6144.
35. Kim, S.-R., G. Maenhaut-Michel, M. Yamada, Y. Yamamoto, K. Matsui, T. Sofuni, T. Nohmi, and H. Ohmori. 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:13792–13797.
36. Kivisaar, M. 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environ. Microbiol.* **5**:814–827.
37. Kofoid, E., U. Bergthorsson, E. S. Slechta, and J. R. Roth. 2003. Formation of an F' plasmid by recombination between imperfectly repeated chromosomal Rep sequences: a closer look at an old friend (F'_{128 pro lac}). *J. Bacteriol.* **185**:660–663.
38. Layton, J. C., and P. L. Foster. 2003. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **50**:549–561.
39. Lea, D. E., and C. A. Coulson. 1949. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* **49**:264–265.
40. Longrich, S., A. M. Galloway, R. S. Harris, C. Wong, and S. M. Rosenberg. 1995. Adaptive mutation sequences reproduced by mismatch repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:12017–12020.
41. McKenzie, G. J., R. S. Harris, P. L. Lee, and S. M. Rosenberg. 2000. The SOS response regulates adaptive mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6646–6651.
42. McKenzie, G. J., P. L. Lee, M.-J. Lombardo, P. J. Hastings, and S. M. Rosenberg. 2001. SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol. Cell* **7**:571–579.
43. Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
44. Napolitano, R., R. Janel-Bintz, J. Wagner, and R. P. Fuchs. 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.* **19**:6259–6265.
45. Nurk, A., L. Kasak, and M. Kivisaar. 1991. Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* **102**:13–18.
46. Ohmori, H., E. C. Friedberg, R. P. Fuchs, M. F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. A. Kunkel, C. W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G. C. Walker, Z. Wang, and R. Woodgate. 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Mol. Cell* **8**:7–8.
47. Ojangu, E.-L., A. Tover, R. Teras, and M. Kivisaar. 2000. Effects of combination of different –10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor σ^S -dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**:6707–6713.
48. Pavel, H., M. Forsman, and V. Shingler. 1994. An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on para-substituted methylphenols. *J. Bacteriol.* **176**:7550–7557.
49. Rosche, W. A., and P. L. Foster. 2000. Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* **20**:4–17.
50. Rosenberg, S. M. 2001. Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat. Rev. Genet.* **2**:504–515.
51. Roth, J. R., E. Kofoid, F. P. Roth, O. G. Berg, J. Seger, and D. I. Andersson. 2003. Regulating general mutation rates: examination of the hypermutable state model for Cairnsian adaptive mutation. *Genetics* **163**:1483–1496.
52. Santos, P. M., I. Di Bartolo, J. M. Blatny, E. Zennaro, and S. Valla. 2001. New broad-host-range promoter probe vectors based on the plasmid RK2 replicon. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:91–96.
53. Saumaa, S., A. Tover, L. Kasak, and M. Kivisaar. 2002. Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and stationary-phase sigma factor RpoS. *J. Bacteriol.* **184**:6957–6965.
54. Sharma, R. C., and R. T. Schimke. 1996. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques* **20**:42–44.
55. Slechta, E. S., K. L. Bunny, E. Kugelberg, E. Kofoid, D. I. Andersson, and J. R. Roth. 2003. Adaptive mutation: general mutagenesis is not a programmed response to stress but results from rare coamplification of *dinB* with *lac*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:12847–12852.
56. Slechta, E. S., J. Liu, D. I. Andersson, and J. R. Roth. 2002. Evidence that selected amplification of a bacterial *lac* frameshift allele stimulates Lac⁺ reversion (adaptive mutation) with or without general hypermutability. *Genetics* **161**:945–956.
57. Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W. H. Freeman, San Francisco, Calif.
58. Spiers, A. J., A. Buckling, and P. B. Rainey. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**:2345–2350.
59. Sundin, G. W., S. P. Kidambi, M. Ullrich, and C. L. Bender. 1996. Resistance to ultraviolet light in *Pseudomonas syringae*: sequence and functional analysis of the plasmid-encoded *ruAB* genes. *Gene* **177**:77–81.
60. Sung, H.-M., and R. E. Yasbin. 2002. Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**:5641–5653.
61. Sung, H.-M., G. Yeamans, C. A. Ross, and R. E. Yasbin. 2003. Roles of YggJH and YggJW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**:2153–2160.
62. Taddei, F., I. Matic, and M. Radman. 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11736–11740.
63. Tenaillon, O., F. Taddei, M. Radman, and I. Matic. 2001. Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res. Microbiol.* **152**:11–16.
64. Tover, A., E.-L. Ojangu, and M. Kivisaar. 2001. Growth medium composition-determined regulatory mechanisms are superimposed on CatR-mediated transcription from the *pheBA* and *catBCA* promoters in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* **147**:2149–2156.
65. Tsui, H.-C. T., G. Feng, and M. E. Winkler. 1997. Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**:7476–7487.
66. Venturi, V. 2003. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol. Microbiol.* **49**:1–9.
67. Wagner, J., and T. Nohmi. 2000. *Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity. *J. Bacteriol.* **182**:4587–4595.
68. Wagner, J., H. Etienne, R. Janel-Bintz, and R. P. Fuchs. 2002. Genetics of mutagenesis in *E. coli*: various combinations of translesion polymerases (Pol II, IV and V) deal with lesion/sequence context diversity. *DNA Repair* **1**:159–167.
69. Walker, G. C. 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**:60–93.
70. Yeiser, B., E. D. Pepper, M. F. Goodman, and S. E. Finkel. 2002. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8737–8741.