

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Mariliis Tark

**DNA reparatsioon *Pseudomonas
putida* rakkudes**

Magistritöö

Juhendajad Andres Tover, PhD
Maia Kivisaar, PhD

TARTU 2006

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
Kirjanduse ülevaade.....	6
1. Raku vastus DNA kahjustustele.....	6
2. Nukleotiidi väljalõike reparatsioon.....	8
2.1. NER-i regulatsioon	9
2.2. NER-i rada <i>E. coli</i> põhjal.....	9
2.2.1. DNA kahjustuse äratundmine	9
2.2.2. DNA kahjustuse eemaldamine.....	13
2.3. Transkriptioniseoseline NER.....	14
3. Paardumisvigade reparatsioon	16
3.1. MMR-i rada <i>E. coli</i> rakkudes	17
3.1.1. DNA kahjustuse äratundmine	17
3.1.2. DNA ahelate eristamine.....	17
3.1.3. Aktiivse DNA kahjustust eemaldava kompleksi moodustamine.....	18
3.1.4. Heterodupleksi eemaldamine.....	24
3.2. MMR valkude seondumine DNA polümeraasi protsessiivsusfaktoriga.....	24
4. NER ja MMR süsteemid perekonnas <i>Pseudomonas</i>	25
5. Mutatsiooniprotsessid nälgivates bakterirakkudes	26
Materjal ja metoodika	29
1. Söötmed ja bakteritüved	29
2. <i>P. putida</i> UvrA ja UvrD ja MutS suhtes defektsete tüvede konstrueerimine	31
2.1. UvrA suhtes defektse tüve konstrueerimine	31
2.2. UvrD suhtes defektse tüve konstrueerimine	31
2.3. MutS suhtes defektse tüve konstrueerimine	32
3. Bakterite konjugatsioon.....	32
4. Bakterite elektroporatsioon.....	33

5. <i>E. coli</i> transformatsioon.....	33
6. PCR.....	34
7. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs.....	36
8. UV-kiiritatud rakkude elumuse määramine.....	36
9. Phe ⁺ mutantide isoleerimine	37
Tulemused	39
1. NER-i ja MMR-i osaluse uurimiseks <i>P. putida</i> rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides kasutatud bakteritüved	39
2. NER-i osalus UV-kiirguse poolt põhjustatud DNA kahjustuste eemaldamisel <i>P. putida</i> rakkudes	40
3. NER-i ja MMR-i osalus kasvavates bakterirakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides	41
3.1. NER-i osalus valepaardumiste eemaldamisel <i>P. putida</i> kasvavates rakkudes.....	42
3.2. MMR-i osalus valepaardumiste eemaldamisel <i>P. putida</i> kasvavates rakkudes	43
3.3. NER-i ja MMR-i topeldefektsuse mõju <i>P. putida</i> kasvavates rakkudes toimuvatele mutatsiooniprotsessidele	43
4. NER-i ja MMR-i osalus nälgivates bakterirakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides	45
4.1. NER-i osalus valepaardumiste eemaldamisel <i>P. putida</i> nälgivates rakkudes.....	45
4.2. MMR-i osalus valepaardumiste eemaldamisel nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes	46
4.3. NER-i ja MMR-i topeldefektsuse mõju nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes toimuvatele mutatsiooniprotsessidele	47
6. UvrD helikaasi osalus MMR-is ja NER-is	49
6.1. UvrD helikaasi osalus MMR-is	49
6.2 UvrD helikaasi osalus NER-is	52
Arutelu	56
Kokkuvõte.....	61
Summary.....	62
Kasutatud kirjandus.....	63
Lisa 1. Signe Saumaa, Kairi Tarassova, Mariliis Tark, Andres Tover, Radi Tegova and Maia Kivisaar: Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of <i>Pseudomonas putida</i> . (2006). DNA Repair (Amst). 5:505-14.	

Kasutatud lühendid

MMR	paardumisvigade reparatsioon (<i>mismatch repair</i>)
NER	nukleotiidi väljalõike raparatsioon (<i>nucleotide excision repair</i>)
BER	aluse väljalõike reparatsioon (<i>base excision repair</i>)
RNAP	RNA polümeraas
SSB	üheaheelalise DNA-ga seonduv valk (<i>single strand binding protein</i>)
Pol	polümeraas
dsDNA	kaheaheelaline DNA
UV	ultraviolet
Phe	fenool
Glc	glükoos
Ap	ampitsilliin
Km	kanamütsiin
Cb	karbenitsilliin
trp	trüptofaan
Tet	tetratsükliin
CAA	<i>casamino acids</i>
GO	oksüdeeritud guaniin (<i>7,8-dihydro-8-oxoguanine</i>)
kDa	kilodalton
kb	kiloaluspaar

Sissejuhatus

Bakterid on looduslikus elukeskkonnas eksponeeritud erinevatele kiirgustele ja kemikaalidele, mis võivad põhjustada DNA kahjustuste ning seega mutatsioonide teket. Samuti tekivad DNA kahjustused oksüdatiivse metabolismi käigus ning spontaansete mutatsioonide teket võivad põhjustada replikatsiooni- ja rekombinatsiooniprotsessides tekkivad vead. Kuna paljud mutatsioonid on kahjulikud, siis on DNA kahjustuste ja replikatsioonivigade eemaldamiseks rakkudes olemas mitmed erinevad DNA reparatsioonisüsteemid. Mõningatel juhtudel, näiteks bakterite kohastumisel uute keskkonnatingimustega, on mutatsioonide teke vajalik, võimaldades välja selekteeruda konkreetsete tingimustega kohasematel bakteripopulatsioonidel. On näidatud, et ebasobivates keskkonnatingimustes nagu näiteks toitainete limitatsiooni korral kasvukeskkonnas, bakterirakkudes mutatsioonisagedus tõuseb. Mutatsioonide tekkesageduse tõusu põhjuseks võib olla kas DNA reparatsioonisüsteemide alatalitus või vigutegevate DNA polümeraaside poolt läbiviidava DNA sünteesi osakaalu suurenemine näljatingimustes.

Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair*) ja paardumisvigade reparatsioon (*mismatch repair*) on bakterirakkudes kaks kõige olulisemat reparatsioonisüsteemi. Nukleotiidi väljalõike reparatsiooni on senini uuritud peamiselt *E. coli* kasvavas populatsioonis, kus see reparatsioonisüsteem on oluline kiirguste ja aktiivsete hapnikuradikaalide poolt põhjustatud DNA kahjustuste parandamisel. Selle kohta, kas nukleotiidi väljalõike reparatsioonisüsteem osaleb DNA kahjustuste eemaldamisel nälgivates rakkudes, on vähe teada. DNA replikatsioonivigade eemaldamisel osaleva paardumisvigade reparatsiooni osalust *E. coli* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides on uuritud nii kasvava kui ka nälgiva populatsiooni rakkudes.

Minu töö eesmärgiks oli selgitada välja, kuidas mõjutavad *P. putida* kasvava ja ka nälgiva populatsiooni rakkudes toimuvaid mutatsiooniprotsesse nukleotiidi väljalõike reparatsioonisüsteem ja paardumisvigade reparatsioonisüsteem ning millisel määral osaleb üks või teine reparatsioonisüsteem DNA kahjustuste eemaldamisel nälgimise erinevates etappides.

Kirjanduse ülevaade

1. Raku vastus DNA kahjustustele

Bakteritel tuleb toime tulla väga erinevate DNA kahjustustega. Nendeks on UV-kiirguse poolt põhjustatud tsüklobutaan pürimidiin dimeerid ja (6-4) fotoproduktid; ioniseeriva kiirguse ja oksüdatiivse metabolismi tulemusel tekkivad kahjustatud lämmastikalused ning ühe- ja kaheaheelalise DNA katked. Samuti seonduvad DNA-ga mitmed keemilised ühendid, milledest mõningad põhjustavad DNA ahelate vaheliste ristsidemete teket ja kahjustavad seeläbi DNA molekuli mõlemat ahelat. Lisaks tekivad vead DNA ahelasse ka spontaanselt replikatsiooni, rekombinatsiooni ja deamineerimise käigus.

DNA kahjustused põhjustavad mutatsioonide teket, mis omakorda võib viia rakkude hukkamisele ning kõrgemates organismides põhjustada näiteks vähi teket. Kõikides elusorganismides on välja kujunenud DNA kahjustuste parandamise mehhanismid. On olemas DNA reparatsioonirajad, mis eemaldavad DNA ahelast kahjustusi ning ka reparatsioonirajad, mis parandavad replikatsiooni käigus tekkinud vigu (valepaardumisi ja raaminihkeid). Osad reparatsioonirajad on väga lihtsad ja koosnevad ühest – kahest valgust, nagu näiteks DNA glükosülaasid, fotolüaas; mõned aga vajavad mitmete erinevate valkude koordineeritud koostööd. Sellisteks süsteemideks on näiteks nukleotiidi väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair* – NER), paardumisvigade reparatsioon (*mismatch repair* – MMR) ja rekombinatsiooniline reparatsioon. Peamised *E. coli* DNA reparatsioonirajad ja nende kahjustuste eemaldamise spetsiifika on toodud tabelis 1. DNA reparatsiooni on võimalik jagada vigadevabaks ja potentsiaalselt vigu tekitavaks. Vigadevaba on nende reparatsioonisüsteemide poolt vahendatud DNA reparatsioon, mis parandavad ainult ühte konkreetset kahjustatud või valesti paardunud nukleotiidi. Potentsiaalselt vigu tekitavad on aga kõik need reparatsioonisüsteemid, mille käigus eemaldatakse koos DNA kahjustusega või replikatsiooniveaga pikem fragment DNA ahelast. Sellised juhul on võimalus, et uue DNA fragmendi sünteesimisel lisab DNA polümeraas ahelasse vale nukleotiidi.

Lisaks erinevatele DNA reparatsioonimehhanismidele on rakkudes olemas ka mehhanismid, mis võimaldavad jätkata replikatsiooni ka DNA kahjustuste korral. Need rajad käivitatakse juhul, kui rakk mingil põhjusel ei suuda erinevate DNA reparatsioonisüsteemide abil DNA kahjustuste eemaldamisega toime tulla. Nendest mehhanismidest tuntakse paremini vigutegevate DNA polümeraaside vahendatud DNA sünteesi.

Tabel 1. Peamised DNA reparatsioonirajad *E. coli*s

Reparatsioonirada	Reparatsioonirajas osalevaid ensüüme	Kahjustuse eemaldamise spetsiifika
Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (NER)	UvrA, UvrB, UvrC	Kõik DNA struktuuri muutvad kahjustused sh. pürimidiinide dimeerid (TT, CC, TC ja CT)
Paardumisvigade reparatsioon (MMR)	MutS, MutL, MutH	Replikatsioonil tekkivad vead – valepaardumised ja raaminihked
Lämmastikaluse väljalõike reparatsioon (BER)	Ung, Mug, Fpg, MutY, Nth, AlkA, Nei XthA, Nfo	Modifitseeritud lämmastikalused Lämmastikaluse eemaldumisel tekkinud apuriinsed/ apürimidiinsed saidid
GO reparatsioon	MutY, MuT, MutM	C deamineerimisel tekkinud U, oksüdeeritud guaniin (GO)
Otsene kahjustuse eemaldamine (<i>direct reversal of damage</i>)	PhrA Ada, AlkB	UV-kiirguse poolt tekitatud pürimidiinide dimeerid Alküülitud lämmastikalused
Homoloogiline rekombinatsioon	RecA, RecF, RecO, RecR	Üheaheelalise ja kaheaheelalise DNA katked, DNA ahelate vahelised ristsidemed, kõik DNA kahjustused, mida teised reparatsioonisüsteemid ära ei paranda

Käesolevas töös kirjeldan kahte olulisemat DNA kahjustuste eemaldamise mehhanismi rakkudes. Nendeks on nukleotiidi väljalõike reparatsioon ja paardumisvigade reparatsioon. Samuti kirjeldan protsesse, mis võimaldavad mutatsioonide teket nälgivates bakterirakkudes.

2. Nukleotiidi väljalõike reparatsioon

Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (NER) on väga laia vigade parandamise spetsiifkaga DNA reparatsioonisüsteem. Selle DNA reparatsioonisüsteemi abil on rakul võimalik DNA ahelast eemaldada erinevaid DNA ahela konformatsiooni muutvaid DNA kahjustusi ja replikatsioonivigu. NER on nii eubakterites, arhedes kui ka eukarüootides peamiseks UV-kiirguse poolt tekitatud DNA kahjustuste eemaldajaks ning tõhusaks tagavarasüsteemiks oksüdatiivsete DNA kahjustuste ning alküülitud aluste parandamisel (Lin ja Sancar, 1989). NER-i on kõige enam uuritud *E. coli* rakkudes. *E. colis* on NER-i toimumiseks vajalik vähemalt 6 erineva valgu koordineeritud koostöö. Nendeks on UvrA, UvrB, UvrC, UvrD, DNA polümeraas I ja DNA ligaas. *E. coli* NER-is osalevad valgud ja nende funktsioonid on äratoodud tabelis 2. NER parandab DNA kahjustusi nii transkribeeritavatel DNA järjestustel kui ka üle kogu genoomi (Reardon ja Sancar, 2005). Transkriptsiooniseoselisel NER-il osaleb lisaks eelpool mainitud valkudele veel valk Mfd, mis on vajalik NER-i ensüümide viimiseks DNA kahjustuse tõttu seiskunud RNA polümeraasile (Selby ja Sancar, 1994). DNA kahjustuste eemaldamise mehhanism on nii transkriptsiooniseoselises kui ka globaalses NER-is sarnane. NER-i rada jagatakse kolmeks eraldi etapiks, nendeks on:

- 1) DNA kahjustuse äratundmine;
- 2) kahjustust sisaldava DNA fragmendi eemaldamine;
- 3) uue DNA süntees.

E. coli NER-i skeem on toodud joonisel 1.

Arvatakse, et bakterirakkudes toimub NER raku sisemembraani pinnal. *E. coli* rakkude membraanifraktsioonist on UV-kiiritamise järgselt identifitseeritud NER-i toimumiseks vajalikud valgud ning UvrA valgust sõltuvalt tõuseb UV-kiiritatud rakkudes DNA-membraan kontaktide arv (Lin jt., 1997).

Tabel 2. *E. coli* NER süsteemi komponendid

Valk	Roll reparatsioonirajas
UvrA	Esmane DNA kahjustuse äratundmine
UvrB	Lõplik DNA kahjustuse äratundmine; DNA lahtiharutamine, painutamine; vajalik kahjustusest 3' suunas sisselõike tegemiseks
UvrC	Katalüüsib sisselõike kahjustusest nii 3' kui ka 5' suunas
UvrD	Kahjustatud DNA fragmendi eemaldamine
Mfd (TRCF)	Transkriptsioonseoselisel NER-il osalev valk

2.1. NER-i regulatsioon

uvrA ja *uvrB* geenide ekspressioon *E. coli* rakkudes on kontrollitud SOS-vastuse poolt. DNA kahjustuste puudumisel on rakus hinnanguliselt 20 molekuli UvrA ja 250 molekuli UvrB valku. SOS-vastuse korral tõuseb nende valkude hulk vastavalt 200 ja 1000 molekulini (Van Houten jt., 2005). Samas on UvrA ja UvrB valkude hulk ka SOS-indutseerimata rakkudes küllaldane DNA reparatsiooni läbiviimiseks. Näiteks Lin jt. on kindlaks teinud, et UV-kiiritamise järel eemaldatakse ~80% tekkinud kahjustustest rakus basaalselt olemasolevate Uvr valkude abil. Ülejäänud 20% DNA kahjustuste eemaldamisel osalevad vastsünteesitud UvrA ja UvrB valgud (Lin jt., 1997). UvrC ekspressioon *E. coli* rakkudes on konstitutiivne.

2.2. NER-i rada *E. coli* põhjal

2.2.1. DNA kahjustuse äratundmine

Kuigi NER-i on uuritud juba enam kui 20 aastat, ei ole senini veel selge, kuidas NER-i ensüümid DNA kahjustusi ära tunnevad. NER-i DNA kahjustust äratundev kompleks koosneb UvrA ja UvrB valkudest. Aktiivne UvrA osaleb kompleksis homodimeerina UvrA₂, mis moodustub ATP seondumisel UvrA monomeeridega (Seeberg ja Steinum, 1982). See, kas UvrB osaleb kompleksis mono- või dimeerina ei ole selge. Röntgenkromatograafia meetodil on näidatud, et DNA kahjustusega seondub heterotrimeerne UvrA₂B kompleks (Theis jt., 1999), kuid *atomic force* mikroskoopia tulemused näitavad UvrA₂B₂ kompleksi olemasolu kahjustatud DNA ahelal (Verhoeven

jt., 2002). Edaspidi nimetan NER-i DNA kahjustust äratundvat kompleksi UvrAB kompleksiks.

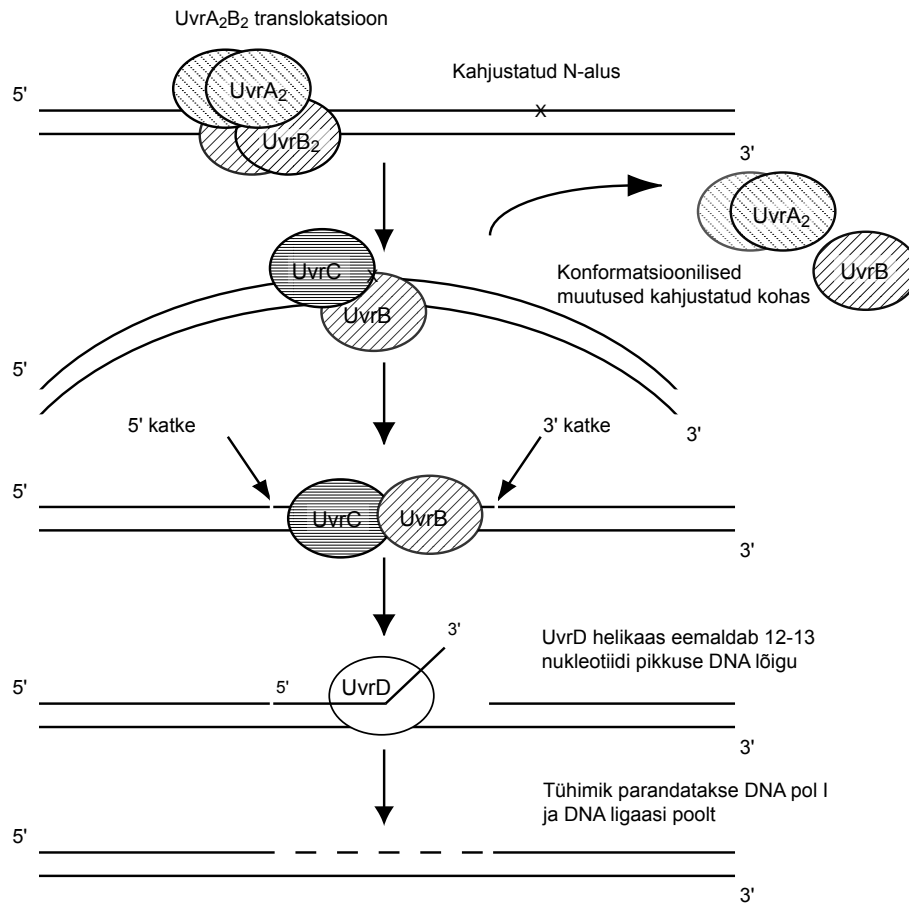
DNA kahjustuse äratundmine UvrAB kompleksi poolt on kaheetapiline protsess. Esimeses etapis lokaliseerib DNA kahjustuse UvrA₂, ning teises etapis moodustub kahjustuse edasiseks eemaldamiseks vajalik UvrB ja kahjustust sisaldava DNA vaheline stabiilne kompleks (Grossman ja Thiagalingam, 1993). Nagu öeldud, tunneb kõigepealt UvrAB kompleksis DNA kahjustuse ära UvrA valgu dimeer (DellaVecchia jt., 2004). Seejärel harutab UvrAB kompleks helikaasse aktiivsuse abil DNA ahela 6-8 aluspaari ulatuses lahti. DNA ahelas toimuvad konformatsioonilised muutused, mille järel asetub UvrB DNA-le sel viisil, et üks DNA ahelatest paikneb UvrB DNA-d siduva β-juuksenõela struktuuri ja DNA kahjustust ära tundva domääni 1b vahel ning on kättesaadav UvrC endonukleasile. UvrB tunneb DNA kahjustuse ära ainult sellel ahelal, mis on paigutatud kahe eelpool nimetatud domääni vahele (Skorvaga jt., 2004). Selline kahekordne DNA kahjustuse äratundmine esmalt UvrA ning seejärel UvrB poolt on vajalik, kuna erinevalt UvrA valgust ei ole UvrB võimeline kaheaheelalise DNA-ga seonduma ega dsDNA-l ka DNA kahjustust ära tundma.

Tulenevalt sellest, et ei teata, kas UvrB osaleb DNA kahjustust äratundvas kompleksis mono- või dimeerina, on selle kohta, kuidas UvrB DNA kahjustuse ära tunneb, kaks erinevat hüpoteesi.

Juhul, kui DNA kahjustust äratundev kompleks esineb kujul UvrA₂B, arvatakse, et DNA kahjustuse äratundmise teine etapp on juhuslik protsess. Kuna UvrB on võimeline DNA kahjustuse olemasolu kindlaks tegema vaid ühel DNA ahelal (Hsu jt., 1995), siis sõltub DNA kahjustuse leidmine sellest, millises orientatsioonis UvrB DNA-le seondub. Kui UvrB β-juuksenõela ja domääni 1b vahele seondunud DNA ahelal kahjustust ära ei tunne, siis UvrA₂B kompleks dissotseerub ahelalt. Kui UvrB tunneb DNA kahjustuse ära, tekib stabiilne UvrB:DNA kompleks, UvrB interaktsioon UvrAga nõrgeneb ning UvrA dissotseerub. UvrA dissotseerumise järgselt seondub UvrB:DNA kompleksile endonukleas UvrC.

Juhul, kui DNA kahjustust äratundvas kompleksis osaleb UvrB dimeer, siis võiks DNA kahjustuse lõplik äratundmine toimuda DNA ahelaid skaneeriva mehhanismi abil. Kahe UvrB subühiku olemasolul UvrAB kompleksis oleks võimalik otsida DNA kahjustust

mõlemalt DNA ahelalt. Mudeli järgi on UvrA₂B₂ kompleksis korruga võimeline DNA-d siduma ehk ATP-ga seotud vormis üks UvrB subühikutest; teine UvrB on inaktiivses, ADP-seoselises vormis. Juhul kui esimene UvrB β-juuksenõela ja domääni 1b vahele seondunud DNA ahelal kahjustust ei tuvasta siis ATP hüdrolyüsitakse ning DNA ahel vabaneb. Esimese UvrB poolne ATP hüdrolyüs stimuleerib teist UvrB molekuli siduma ATP-d ning otsima kahjustust teiselt DNA ahelalt. Peale DNA kahjustuse äratundmist seondub see UvrB molekul, mis DNA kahjustuse ära tundis, stabiilselt DNA-ga. UvrA vabaneb, kuid teine, ADP-ga seotud UvrB subühik jääb UvrB:DNA kompleksiga seotuks kuni UvrC endonukleaasi seondumiseni (Verhoeven jt., 2002). Kuna UvrA ja UvrB DNA kahjustuse äratundmisspetsiifika on mõnevõrra erinev, siis võib juhtuda, et UvrB DNA kahjustust ahelalt ei leia ning UvrAB kompleks dissotseerub.



Joonis 1. NER-i rada *E. colis* juhul, kui DNA kahjustuse äratundmisel osaleb UvrA₂B₂ kompleks (muudetud artiklist: Kivisaar, M. 2004)

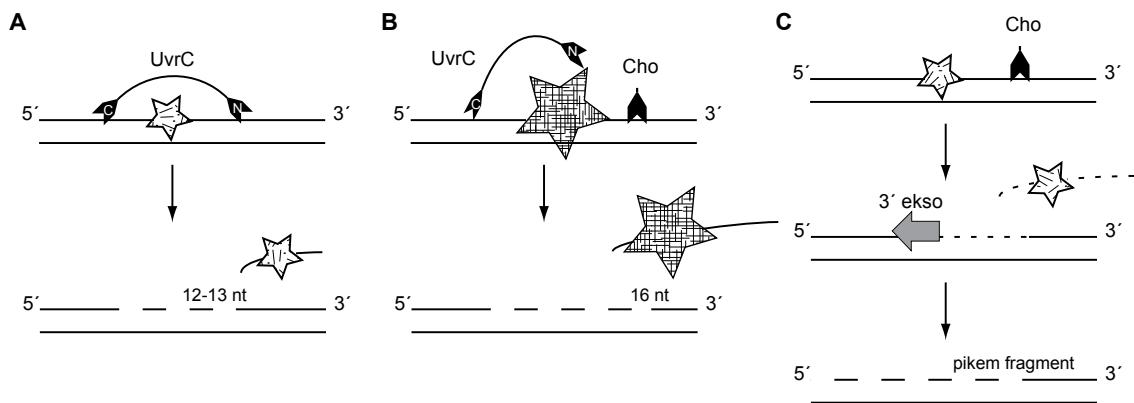
- A. DNA kahjustuse tunneb ära UvrA₂B₂ kompleks;
- B. DNA kahjustuse äratundmise järgselt toimuvad DNA ahelas konformatsioonilised muutused; UvrB:DNA kompleksist lahkeb UvrA ning kompleksile seondub UvrC endonukleaaas; UvrC seondumise järel vabaneb ka üks UvrB molekulidest;
- C. UvrC teeb ssDNA katke kahjustatud nukleotiidist 3' ja 5' suunas;
- D. Kahjustatud DNA fragmenti eemaldab UvrD helikaas;
- E. Kahjustuse eemaldamisel tekkinud 12-13 nukleotiidi pikkuse tühimiku täidab DNA polümeraas I, otsad ühendab DNA ligaas.

2.2.2. DNA kahjustuse eemaldamine

DNA kahjustuse äratundmise järgselt seondub UvrB:DNA kompleksile endonukleas UvrC. UvrC seondumiseks UvrB:DNA kompleksile, peab UvrB olema aktiivses ehk ATP-seoselises vormis (Moolenaar jt., 2000). Seondumise järel katalüüsib UvrC üheaheelalise DNA katke 4 fosfodietersidet DNA kahjustusest 3' suunas ja 8 fosfodietersidet 5' suunas (Joonis 2A). Täpsemalt vahendab 3' sisselõike tegemist UvrC N-terminaalne GIY-YIG domään, mis peab katke tegemiseks olema interakteerunud UvrB C-terminaalse domääniga (Moolenaar jt., 1998). 5' lõike eest vastutab UvrC valgu C-terminuses paiknev EndoV domään. On näidatud, et 5' sisselõige tehakse DNA ahelasse alles peale 3' lõike tegemist. Kahe lõike tulemusel tekib 12-13 nukleotiidine kahjustust sisaldav DNA fragment (Verhoeven jt., 2000). Mõningate suuremate DNA kahjustuste korral ei ole UvrC võimeline 3' lõiget tegema ning seega ei ole NER võimeline neid DNA kahjustusi eemaldama (Zou jt., 1995).

E. coli ja ka mitmetes teistes bakterites on leitud geen *ydjQ*, mille produkt Cho on homoloogiline UvrC valgu N-terminaalse osaga. Sarnaselt UvrC-ga osaleb Cho NER-is, kuid on näidatud, et Cho katalüüsib ainult kahjustusest 3' suunas olevat sisselõiget (Joonis 2B). Cho lõikab DNA-d kaugemalt kui UvrC, kahjustusest 8 fosfodietersideme kauguselt ning selle nukleaasi võime teha üheaheelalise DNA katket kahjustusest 3' suunas ei sõltu DNA kahjustuse iseloomust ega suuruselt (Moolenaar jt., 2002). On näidatud, et Cho osalemine NER-s suurendab selle reparatsioonisüsteemi spetsiifikat ja kiirendab DNA parandamise protsessi. Erinevalt UvrC-st on Cho ekspressioon *E. coli* rakkudes indutseeritud SOS-vastuse poolt (Fernandez de Henestrosa jt., 2000).

Peale kahjustust sisaldava DNA fragmendi eraldamist ülejäänud DNA ahelast UvrC endonukleas dissotseerub ning ahelale seondub UvrD helikaas. UvrD eemaldab kahjustust sisaldava DNA fragmendi ja ka üheaheelalisele DNA-le seondunud UvrB valgu (Orren jt., 1992). Järgnevalt seondub DNA ahelale kas DNA polümeraas I või II, et sünteesida täis kahjustatud DNA fragmendi eemaldamisel tekkinud tühimik (Van Houten jt., 2005). Vastsünteesitud DNA fragmendi otsad ühendab ülejäänud DNA ahelaga DNA ligaas (Caron jt., 1985).



Joonis 2. UvrC ja Cho rolli NER-is (Van Houten jt., 2002)

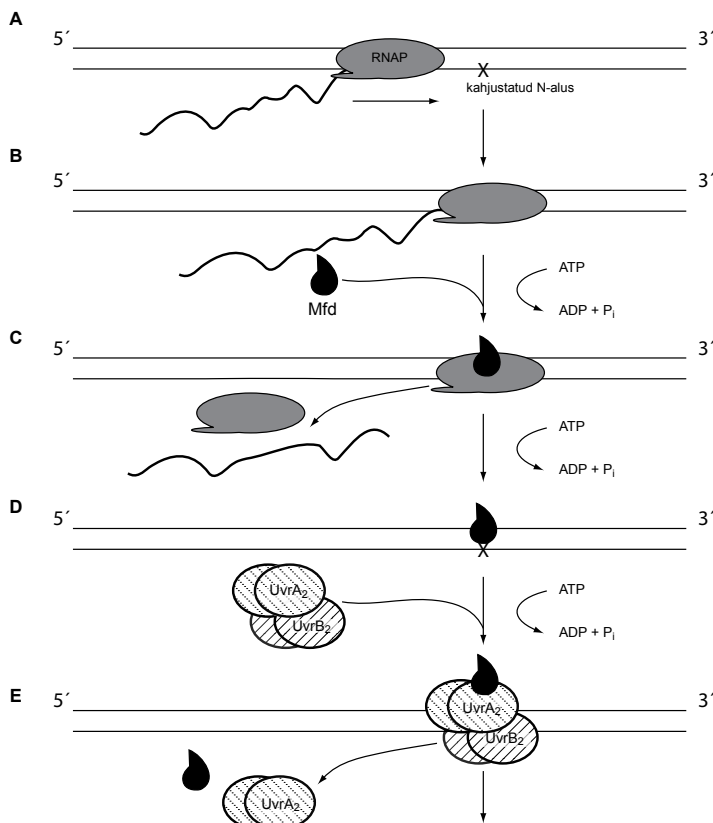
A. Kahjustustust sisaldava DNA fragmendi eemaldamine UvrC abil. **B.** Suuremate DNA kahjustuste eemaldamisel võib UvrC teha koostööd Cho-ga. **C.** *B. burgdorferis* eemaldab Cho kahjustust sisaldava DNA fragmendi 3'-5' eksonukleaaasi aktiivsuse abil.

Mükoplasmadel ja *Borrelia burgdorferi*l puudub endonukleaaas UvrC ning nendes organismides osaleb DNA kahjustuse eemaldamisel Cho valk. Võrreldes *E. coli* Cho valguga on Mükoplasmade ja *B. burgdorferi* Cho valgul üks lisadomään, mis võimaldab UvrC puudumisel NER-i läbi viia. ~69 kDa suurune lisadomään sarnaneb DNA polümeraasi ϵ subühikuga, millel on 3'-5' eksonukleaaasi „proofreading“ aktiivsus. Arvatavasti degradeerib Cho peale kahjustusest 3'suunas katke tegemist kahjustust sisaldava DNA ning seega ei ole DNA kahjustusest 5'suunas vaja DNA katket teha (Joonis 2C) (Van Houten jt., 2002).

2.3. Transkriptsiooniseoseline NER

On täheldatud, et NER eemaldab DNA kahjustusi aktiivselt transkribeeritavatel järjestustel suurema efektiivsusega kui ülejäänud genoomis. Transkriptsiooni toimumine stimuleerib DNA reparatsiooni ainult transkribeeritaval ahelal. Selby ja Sancar leidsid, et eelistatult aktiivselt transkribeeritavate järjestuste parandamist *E. coli* rakkudes põhjustab geeni *mfd* poolt kodeeritud valk Mfd (TRCF). Mfd seondub DNA kahjustuse tõttu seiskunud RNA polümeraasile (RNAP) ning vabastab RNAP koos pooliku transkriptiga DNA ahelalt (Joonis 3). Peale RNAP vabastamist DNA ahelalt transpordib Mfd DNA

kahjustuse kohale kohale UvrAB kompleksi ning DNA kahjustus eemaldatakse NER-i rajast (Selby ja Sancar, 1994). Millises järjekorras toimuvad RNA polümeraasi DNA ahelalt vabastamise ja NER-i valkude DNA kahjustusele laadimise protsessid, ei ole teada. Samuti ei ole teada ka see, kuidas Mfd UvrAB kompleksi kahjustatud nukleotiidile transpordib (Roberts ja Park, 2004).



Joonis 3. DNA kahjustuse äratundmine transkriptsioonseoselisel NER-il (Friedberg jt., 1995)

- A. RNA polümeraas liigub RNA-d sünteesides mööda DNA ahelat;
- B. RNAP seiskub DNA kahjustuse tõttu;
- C. Mfd tunneb ära DNA kahjustuse tõttu seiskunud RNA polümeraasi ning vabastab RNAP ja pooliku transkripti DNA ahelalt;
- D. Mfd toob DNA kahjustusele NER-i DNA kahjustust äratundva kompleksi UvrAB;
- E. DNA kahjustus eemaldatakse NER-i rajast.

3. Paardumisvigade reparatsioon

DNA paardumisvigade reparatsioon (MMR) on oluline genoomi stabiilsuse hoidja rakkudes. Geneetilise informatsiooni terviklikkus sõltub DNA replikatsiooni täpsusest ja erinevate reparatsioonisüsteemide efektiivsusest. Replikatiivse DNA polümeraasi poolt läbiviidav DNA süntees on väga täpne. DNA polümeraas III lülitab DNA sünteesil ahelasse ühe vale nukleotiidi 3-6 x 10⁷ õigesti sisestatud nukleotiidi kohta (Schaaper, 1993). On näidatud, et MMR vähendab replikatsioonil tekkivate vigade hulka 2-3 suurusjärku (Modrich, 1987). DNA replikatsioonil tekkivatest vigadest on enamusele valepaardumised, mõnenukleotiidsed insertsioonid ja deletsioonid (Marti jt., 2002). Sedatüüpi vead on MMR-i peamiseks substraatideks. Lisaks replikatsiooni käigus tekkinud vigade kõrvaldamisele, osaleb MMR ka ebatäpse rekombinatsiooni ärahoidmisel. MMR-i mehhanism on konserveerunud bakterist inimeseni.

MMR süsteemi on kõige enam uuritud *E. coli* rakkudes. Põhilisteks MMR-il osalevateks ensüümideks *E. coli* rakkudes on MutS, MutL, MutH. MMR-il osalevad valgud ning nende funktsioonid on toodud tabelis 3. MMR-i toimumisel on võimalik eristada viit etappi, nendeks on:

- 1) DNA kahjustuse äratundmine;
- 2) vastsünteesitud DNA ahela kindlakstegemine;
- 3) aktiivse MMR kompleksi moodustamine;
- 4) replikatsioonivea eemaldamine;
- 5) uue DNA ahela süntees.

Tabel 3. *E. coli* MMR süsteemi valgud ja nende funktsioonid

Valk	Roll reparatsioonirajas
MutS	valepaardumise, insertsiooni või deletsiooni äratundmine
MutL	MMR-i töö koordineerimine; MutH-i aktiveerimine, UvrD ahelale laadimine
MutH	DNA katke tegemine metüleerimata d(GATC) saidis
UvrD	DNA lahti harutamine
ExoI ja ExoX	3'-5'eksonukleaasid, üheaheelise DNA degradatsioon
RecJ ja ExoVII	5'-3'eksonukleaasid, üheaheelise DNA degradatsioon

3.1. MMR-i rada *E. coli* rakkudes

3.1.1. DNA kahjustuse äratundmine

DNA replikatsioonil tekkinud vead tunneb ära MutS valk. Ei ole teada, kas MutS valgu aktiivne vorm DNA kahjustuste äratundmisel on dimeer või kahest dimeerist moodustunud tetrameer. Mitmed mudelid eeldavad, et kahjustuse tunneb ära MutS dimeer, kuid samas on näidatud, et valgu tetrameerne vorm seondub DNA heterodupleksiga suurema afiinsusega (Bjornson jt., 2000). MutS dimeer seondub DNA heterodupleksile asümmeetriliselt, spetsiifiline kontakt DNA kahjustusega on ainult ühel MutS monomeeril. Teine valgu monomeer stabiliseerib kompleksi seondudes DNA-ga ebaspetsiifiliselt (Marti jt., 2002).

Päris selge ei ole ka see, mille alusel replikatsioonivigasid ära tuntakse. Kuna väga erineva struktuuriga valepaardumisi tuntakse ära sarnase efektiivsusega, siis ilmselt ei tunne MutS ära mingit kindlat DNA struktuuri (Natrajan jt., 2003). Spekuleeritud on, et MutS võiks ära tunda DNA piirkondi, kus lämmastikaluste vahelised vesiniksidemed on nõrgenenud (Duckett jt., 1996; Jiricny, 2000).

E. coli MutS seondub valesti paardunud DNA-le 10 kuni 1500 korda suurema afiinsusega kui DNA homodupleksile. Seondumise afiinsus sõltub sellest, millistest konkreetsetest nukleotiididest valepaardumine koosneb. Kõige paremaks substraadiks MMR-le on G-T valepaardumised ja 1 nukleotiidi pikkused deletsioonid. C-C heterodupleksid, mida tekib DNA replikatsiooni käigus kõige harvemini, on ka MMR süsteemile kõige halvemaks substraadiks (Schofield jt., 2001). Valepaardumiste äratundmisel on oluline ka järjestuse kontekst. On näidatud, et DNA heterodupleksi äratundmise järgselt painutab MutS dimeer DNA ahelat ~60°. Arvatakse, et see DNA ahela painutamine on vajalik lõpliku DNA kahjustuse äratundmiskompleksi moodustamiseks, mille tulemusena MutS seondub stabiilselt DNA-le. Juhul, kui MutS ei ole võimeline DNA-d sobivalt painutama, siis DNA kahjustust äratundvat kompleksi ei moodustu ning MutS dissotseerub ahelalt (Kunkel ja Erie, 2005).

3.1.2. DNA ahelate eristamine

Selleks, et MMR süsteem „teaks“, millisel DNA ahelal heterodupleksis on viga, peab see reparatsioonisüsteem kindlaks tegema, kumb DNA ahelatest on vastsünteesitud. *E. coli*

rakkudes on DNA ahelate eristamise signaaliks MMR süsteemi jaoks hemimetüleeritud d(GATC) järjestus (Modrich, 1987). d(GATC) järjestused metüleerib DNA replikatsiooni järgselt ensüüm Dam metülaas (Modrich ja Lahue, 1996). Dam metülaas metüleerib d(GATC) järjestuse ~2 minutit peale selle sünteesimist (Jiricny, 2006). Seega koheselt peale replikatsiooni toimumist, kui Dam metülaas ei ole d(GATC) järjestuses paiknevale adeniinile metüülrühma üle kandnud, on võimalik kindlaks teha, milline DNA ahelatest on vast sünteesitud. Metüleerimata d(GATC) järjestused tunneb ära MMR süsteemis osalev endonukleas MutH.

Eukarüootides ja ka paljudes bakterites Dam metülaas puudub, samuti ei ole nendes organismides identifitseeritud MutH homoloogi. Arvatakse, et sel juhul eristab MMR DNA ahelaid DNA katkete või vabade otste järgi – näiteks Okazaki fragmentide 5' või 3' otste järgi mahajääval ahelal ning 3' vaba otsa järgi juhtival ahelal (Lacks jt., 1982).

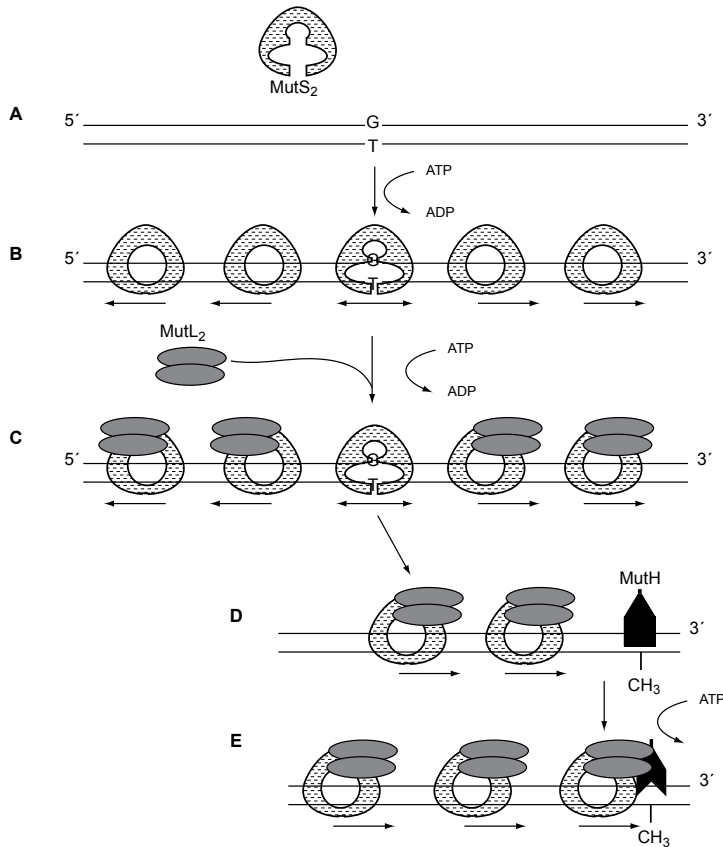
3.1.3. Aktiivse DNA kahjustust eemaldava kompleksi moodustamine

Seda, kuidas toimub MMR-il aktiivse DNA kahjustust eemaldava kompleksi moodustamine ja mil viisil kandub mööda DNA ahelat edasi MMR-i signaal, on uuritud juba väga kaua. Protsessist endast ei teata aga ikka veel piisavalt, et oleks võimalik tuletada üht ja kõikidesse normidesse sobivat mudelit. Seega on erinevad töögrupid esitanud erinevaid mudeleid. Järgnevalt kirjeldan neist nelja.

I Libiseva klambri mudel (Acharya jt., 2003)

Pärast DNA heterodupleksi äratundmist seondub MutS valguga ATP. ATP seondumise tulemusena moodustub stabiilne ATP hüdrolüüsist sõltumatu MutS libisev klamber, mis on võimeline liikuma DNA ahelal heterodupleksist eemale vähemalt 1 kb (Joonis 4). Kui üks ATP-ga seondunud MutS-klamber on kahjustusest eemale libisenud, seondub valepaardumisele järgmine MutS dimeer, seob ATP ja libiseb edasi. MutS-klambriid liiguvad valepaardumisest mõlemas suunas. MutS libisevale klambri seonduvad MutL dimeerid, mis on vajalikud DNA ahelate eristumissignaali d(GATC) paikneva MutH endonukleaasi äratundmiseks. MutLi interaktsioon MutH valguga kiirendab MutLi ATP-ga seondumist, mis omakorda suurendab MutH endonukleasest aktiivsust. Veel on MutL dimeeride seondumine MutS-le vajalik MutS-klambrite mahalaadimiseks DNA ahelalt juhul, kui teisi MMR-i läbiviimiseks vajalikke komponente (näiteks MutH, UvrD)

ei ole rakus piisavalt. Selle mudeli järgi võib ühe heterodupleksi eemaldamisel osaleda sadu MutS-i ja MutL-i molekule. Kuna *E. coli* kasvava kultuuri rakkudes on MutS ja MutL valku vähem kui 200 dimeeri (Feng jt., 1996) ning DNA kahjustuste korral nende valkude hulk rakus ei tõuse, siis selle mudeli kohaselt võiks MMR teoreetiliselt korraga eemaldada vaid ühte DNA replikatsiooniviga.



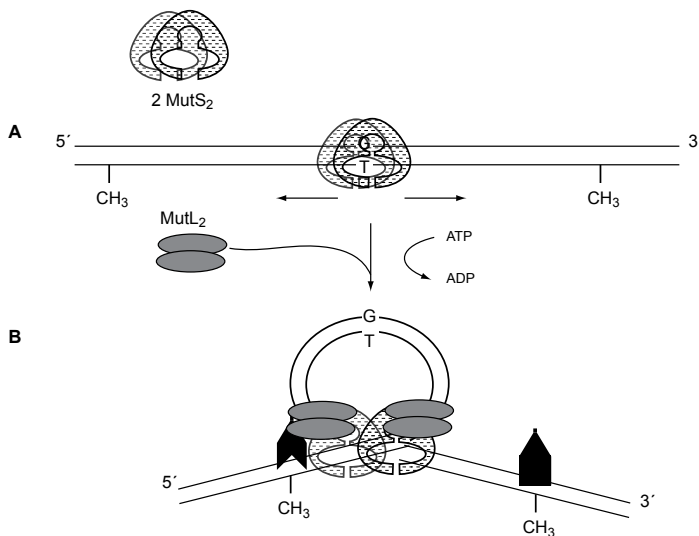
Joonis 4. Aktiivse MMR kompleksi moodustumine libiseva klambri mudeli järgi (Acharya jt., 2003)

- A. DNA replikatsioonil tekkinud vea tunneb ära MutS dimeer;
- B. MutS dimeerid seonduvad valepaardumisele, seovad ATP ja libisevad mööda DNA ahelat valepaardumisest eemale;
- C. MutS dimeeridele seonduvad MutL dimeerid;
- D. MutS:MutL dimeerid liiguvad DNA ahelat mööda edasi kuni jõuavad metüleerimata d(GATC) järjestusega seondunud MutH valguni;
- E. MutL interakteerub MutH valguga ning aktiveerib MutH endonukleasae aktiivsuse.

II Translokatsioonimudel (Allen jt., 1997; Bjornson jt., 2003)

Translokatsioonimudel pakuti välja, kui elektronmikroskoopia abil nähti, et *in vitro* tekivad heterodupleksit sisaldaval DNA ahelal MutS sõltuvalt α -kujulised DNA lingud (Allen jt., 1997). Mudel näeb ette, et heterodupleksile seondub kahest MutS dimeerist moodustunud tetrameer. Peale DNA kahjustuse äratundmist seob MutS ATP ning valgukonformatsioon muutub. Algselt heterodupleksile seondunud MutS dimeerid hakkavad ATP sõltuvalt liikuma mööda DNA ahelat eri suundades, jäädes samaaegselt üksteisega seotuks. MutS:DNA kompleksile seondub MutL dimeer ning tekkinud MutS:MutL kompleks liigub mööda DNA ahelat edasi, kuni DNA ahelate eristamise signaalini. Seejärel interakteerub MutS valguga kompleksis olev MutL otseselt MutH-ga ning aktiveerib MutH (Hall ja Matson, 1999).

Hiljem, kui selgus, et MutS dimeer jääb DNA heterodupleksiga seotuks kogu reparatsiooni protsessi lõpuni (Lamers jt., 2000), muudeti translokatsioonimudelit. Bjornson jt. pakkusid välja, et pärast DNA kahjustuse äratundmist võiks üks MutS dimeeridest jääda seotuks DNA heterodupleksiga, teine aga liikuda mööda DNA ahelat edasi (Bjornson jt., 2003).

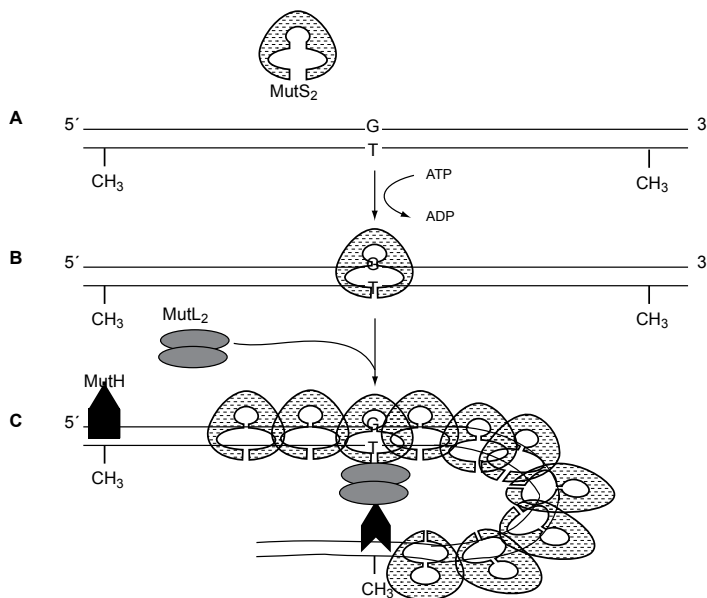


Joonis 5. Aktiivse MMR kompleksi moodustumise translokatsioonimudel (Allen jt., 1997)

- MutS tetrameer tunneb ära replikatsioonil tekkinud vea ning tetrameeri moodustanud MutS dimeerid hakkavad ATP sõltuvalt liikuma mööda DNA ahelat edasi jäädes samaaegselt üksteisega seotuks;
- MutS dimeeridele seonduvad MutL dimeerid. Pärast valkkompleksi jõudmist MutH valguni aktiveerib MutL MutH-i.

III MutS oligomeriseerumise mudel (Hsieh, 2001)

Selle mudeli kohaselt läbib MutS dimeer peale DNA-le seondumist konformatsioonilise muutuse ning seob ATP. ATP hüdroolüüs vahendab MutL dimeeri seondumist MutS:DNA kompleksile (Wu ja Marinus, 1999). Järgnevalt toimub ATP hüdroolüüsist sõltuv MutS valgu homodimeeride oligomeriseerumine heterodupleksile seondunud MutS:MutL kompleksist mõlemas suunas (Joshi ja Rao, 2002). MutS dimeerid katavad DNA ahela heterodupleksile seondunud MutS:MutL kompleksist kuni metüleerimata d(GATC) järjestusega seondunud MutH valguni. Peale MutH valguni jõudmist painutatakse DNA-d nii, et MutH ja heterodupleksil asetsev MutL saaksid interakteeruda. Seejärel aktiveerib MutS:MutL kompleks ATP juuresolekul MutH endonukleaasi.

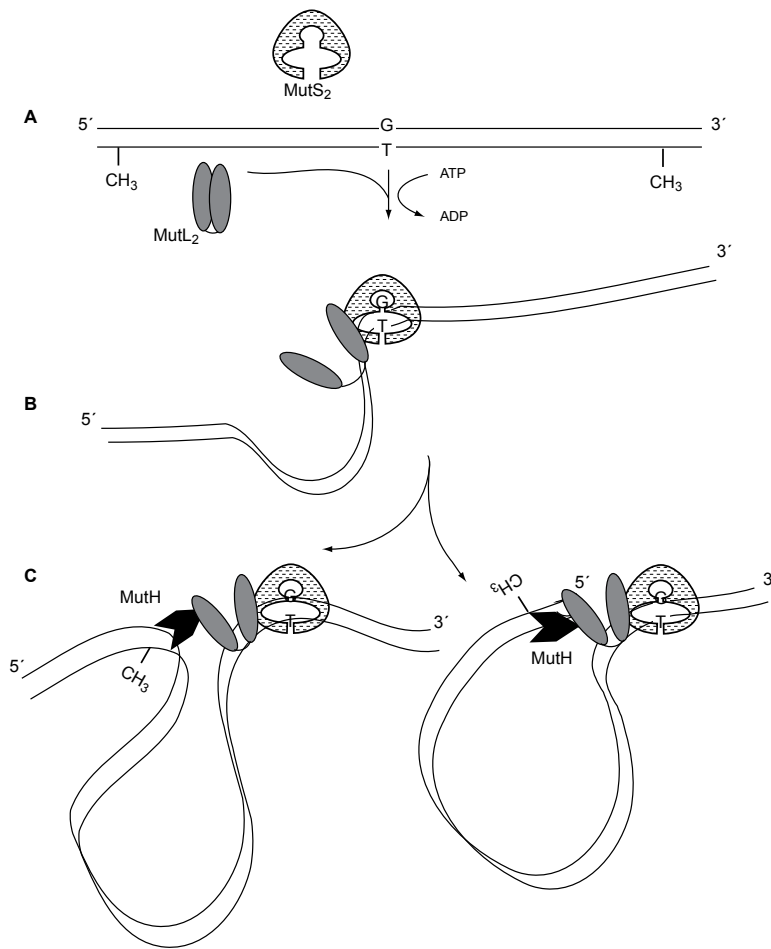


Joonis 6. MMR kompleksi moodustumine MutS oligomeriseerimise mudeli järgi (Hsieh, 2001)

- A. MutS dimeer seondub replikatsiooniveaga;
- B. MutS dimeerile seondub MutL dimeer;
- C. Toimub MutS dimeeride oligomeriseerumine DNA ahelale. MutS dimeeridega kaetakse DNA ahel valepaardumisest kuni d(GATC) järjestusele seondunud MutH valguni. MutS:MutL kompleks seondub MutH-ga ning aktiveerib MutH endonukleasse aktiivsuse.

IV DNA painutamise mudel (Guarne jt., 2004)

Selle mudeli kohaselt moodustub peale MutS dimeeri poolset DNA replikatsioonivea äratundmist ATP juuresolekul heterodupleksi kohale MutS:MutL kompleks. Seejuures MutL-i seondumine takistab MutS valgu liikumist DNA ahelal. Kuna on näidatud, et MutL suudab MutH valku aktiveerida ka *in trans*, siis ei ole MutS:MutL kompleksil vaja mööda DNA ahelat liikuda MutH valguni. Piisab sellest, kui DNA ahelat painutatakse sel viisil, et heterodupleksile seondunud MutS:MutL kompleks ja hemimetüleeritud d(GATC) järjestusel paiknev MutH saaksid omavahel seonduda (Guarne jt., 2004). Sõltuvalt sellest, kas MutH paikneb valepaardumisest 3' või 5' suunas asetseval hemimetüleeritud d(GATC) järjestusel, tuleb muuta DNA lingu konformatsiooni erinevalt, et MutH valgu poolt lõigatav metüleerimata DNA ahel satuks MutH endonukleaasi aktiivsaiti (Modrich ja Lahue, 1996).



Joonis 7. Aktiivse MMR kompleksi moodustumine DNA painutamise mudeli järgi (Guarne jt., 2004)

- A. Replikatsioonivea äratundmise järel moodustub heterodupleksi kohale MutS:MutL kompleks;
- B. MutS:MutL kompleks painutab seni teadmata viisil DNA ahelat, otsides metüleerimata d(GATC) järjestusele seondunud MutH valku;
- C. Peale MutS:MutL kompleksi interakteerumist MutH valguga avaldub MutH endonukleasne aktiivsus. Sõltuvalt sellest, kas MutS:MutL kompleks on seondunud valepaardumisest 3' või 5' suunas paikneva MutH valguga, tuleb muuta DNA lünga konformatsiooni erinevalt, et metüleerimata DNA ahel satuks MutH endonukleasni aktiivsai.

3.1.4. Heterodupleksi eemaldamine

Peale MutL valgu poolset aktiveerimist teeb metüleerimata d(GATC) järjestusele seondunud MutH sisselõike samasse DNA järjestusse G ja A nukleotiidi vahele (Modrich ja Lahue, 1996). d(GATC) järjestus, millesse MutH üheaahelalise katke teeb, võib paikneda valepaardumise kohast kuni 1 kb kaugusel, kas 3' või 5' suunas. On näidatud, et eelistatult lõikab MutH kahjustusele kõige lähemal paiknevat d(GATC) järjestust. Kui MutH on sisselõike teinud, laeb MutL katkestuse kohale DNA helikaasi II ehk UvrD valgu. Kuna UvrD helikaas harutab DNA ahelaid lahti ainult 3'-5' suunas, siis aitab MutL laadida helikaasi DNA ahelale nii, et DNA lahtikeeramine toimuks valepaardumise suunas (Mechanic jt., 2000). DNA lahtiharutamisel seondub matriits-ahelale ja stabiliseerib seda üheaahelalise DNA-ga seonduv valk SSB. Vastsünteesitud ning replikatsiooniviga sisaldav DNA ahel degradeeritakse kas 5' või 3' eksonukleaaside abil olenevalt sellest, kummale poole DNA heterodupleksi MutH sisselõike tegi. Kui MutH tegi sisselõike heterodupleksist 3' suunas, siis degradeeritakse DNA ahel 3' eksonukleaaside ExoI või ExoX poolt. 5' eksonukleaasid RecJ või ExoVII degradeerivad DNA ahela juhul, kui MutH tegi sisselõike heterodupleksist 5' suunas. Uue DNA ahela sünteesib replikatiivne DNA polümeraas III ning DNA ahelate otsad ühendab DNA ligaas.

3.2. MMR valkude seondumine DNA polümeraasi protsessiivsusefaktoriga

Eelnevalt kirjeldasin, et MMR saab parandada DNA ahelas olevaid vigu vaid vahetult peale replikatsiooni toimumist. Selleks, et replikatsiooni käigus tekkivaid vigu efektiivselt eemaldada, on MutS valk *E. coli* rakkudes seotud DNA polümeraasi subühikuga β , mille ülesandeks on hoida DNA polümeraasi ahelal ning suurendada sel viisil replikatsiooni protsessiivsust. Lopez de Saro jt. näitasid hiljuti, et lisaks MutS valgule seondub β -klambriga ka MutL. Juhul, kui MutL või MutS valgu β -klambriga seondumise domään eemaldati, ei olnud MMR enam võimeline DNA ahelalt vigu eemaldama (Lopez de Saro jt., 2006; Lopez de Saro ja O'Donnell, 2001). See tulemus näitab, et paardumisvigade reparatsioon võib olla DNA replikatsiooniga rohkem seotud, kui senini on arvatud. Kuna MutS on β -klambriga seotud ka DNA kahjustuste puudumisel, võib see valk liikuda mööda DNA ahelat otse replikatsiooni teostava polümeraasi järel (Flores-Rozas jt., 2000). MutL valgu interaktsioon β -klambriga ei ole vajalik valepaardumiste leidmiseks vaid

MMR-i lõppjärgus DNA polümeraas III DNA ahelale toomiseks. Ilmselt võimaldab MutS ja MutL interaktsioon β -klambriga kiiremlt ja efektiivsemalt eemaldada replikatsiooni käigus tekkinud vigu (Lopez de Saro jt., 2006). Samuti võib MMR valkude interaktsioon β -klambriga aidata MMR-il eristada sünteesitavat ja matriits-ahelat.

4. NER ja MMR süsteemid perekonnas *Pseudomonas*

NER-i ja ka MMR-i toimumist ei ole seni põhjalikult uuritud üheski perekonna *Pseudomonas* bakteriliigis. Rivera jt. on kindlaks teinud, et NER süsteemis kahjustuse äratundmisel osalevate valkude UvrA ja UvrB ekspressioon on *Pseudomonas aeruginosa* rakkudes erinevalt *E. coli*st konstitutiivne ning ei ole mõjutatud DNA kahjustuste olemasolust (Rivera jt., 1997, 1996). Sundini töögrupp, kus tegeletakse päikesekiirguse mõju uurimisega fülloosfääris elavatele bakteritele on uurinud UvrA suhtes defektse *Pseudomonas syringae* tüve võimet taluda UV-B kiirgust. Nad leidsid, et NER defektse tüve elumus langes rakkude eksponeerimisel UV-B kiirgusele (290-320 nm 4.5 kJ/m²) 100 korda ning järeldasid sellest, et NER on ka perekonnas *Pseudomonas* oluline UV-kiirguse tagajärjel tekkinud DNA kahjustuste eemaldamisel (Gunasekera ja Sundin, 2006). Sama töögrupp kasutas fotolüaasi rolli uurimisel *P. syringae* ja *P. aeruginosa* rakkudes *uvrA*-tüvesid. Nii *P. syringae* kui ka *P. aeruginosa* osutus NER-i roll UV-kiirguse poolt põhjustatud kahjustuste eemaldamisel rakule olulisemaks kui fotolüaasi roll (Kim ja Sundin, 2001).

MMR-i töötamist on uuritud *P. aeruginosa* kliinilistes isolaatides. On leitud, et krooniliselt kopsupõletikku põdevatelt tsüstilise fibroosi patsientidelt isoleeritud patogeensed *P. aeruginosa* tüved on sageli MMR-i suhtes defektsed ning seega on nendel tüvedel kõrgenenud spontaanne mutatsioonide tekke sagedus (Oliver jt., 2000). On näidatud, kõrgenenud mutatsioonisagedus on peamiseks multiresistentsete vormide tekke põhjuseks krooniliste *P. aeruginosa* infektsioonide korral (Macia jt., 2005).

P. aeruginosa valgud MutS ja MutL on *E. coli* tüve K-12 MutS ja MutL valkudega vastavalt 60% ja 46% identsed. Hoolimata suurest sarnasusest ei suuda *P. aeruginosa* MMR-i valgud komplementeerida *E. coli* MMR defektseid tüvesid. Võimalik, et MMR süsteemi valkude vahelised interaktsioonid eri organismides on erinevad (Oliver jt., 2002). MMR süsteemi erinevust *Pseudomonase* ja *E. coli* tüvedes näitab seegi, et MutH valgule ei ole ühegi senini sekveneeritud *Pseudomonase* genoomist homoloogi leitud. Samuti puudub *Pseudomonas stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. syringae* ning ka *P. putida*

rakkudes Dam metülaas ning d(GATC) järjestusi ei metüleerita (Meier ja Wackernagel, 2005).

Kurusu jt. on leidnud, et *Pseudomonas putida* tüves 33015 on MutS geen lühem, võrreldes teiste seni uuritud bakteritüvedega. Kuigi *mutS* geeni algusest puudub ~800 aluspaari, kodeerib see *mutS* geen funktsionaalset valku ning suudab komplementeerida *E. coli* ja ka *B. subtilise mutS* defekteid tüvesid (Kurusu jt., 2000). *P. putida* tüves KT2440 ja ka teistes perekonna *Pseudomonas* sekveneeritud tüvedes on järjestuse analüüsil leitud täispikk *mutS* geen.

5. Mutatsiooniprotsessid nälgivates bakterirakkudes

Evolutsioonis on oluline geneetilise info säilitamine ja edasikandmine muutumatul kujul. Kuna suurem osa tekkivatest mutatsioonidest on kahjulikud, siis on kujunenud välja täpsed DNA sünteesi, selle korrigeerimise ja parandamise süsteemid, mille abil hoitakse mutatsioonide tekkesagedust võimalikult madalal (Drake jt., 1998). Samas on bakterite elukeskkond muutlik ning uute tingimustega kohastumiseks on vajalik mutatsioonide teke. Paljudel juhtudel on näidatud, et stressitingimustes tõuseb bakterites mutantide tekkesagedus (Bjedov jt., 2003; Kivisaar, 2003; Taddei jt., 1997; Cairns ja Foster, 1991) Stressitingimustes viibivates rakkudes toimuvate mutatsiooniprotsesside kohta esineb kaks eri arvamust. Ühel juhul arvatakse, et mutatsioonide tekkesageduse tõus statsionaarses faasis on mehhanism, mille abil bakterid suurendavad populatsiooni võimet rasketes tingimustes ellu jääda (Rosenberg jt., 1998). Teisalt on võimalik, et statsionaarse faasi mutagenees ei ole mehhanism bakterite kohastumiseks, vaid pigem stressitingimustes suurenenud DNA kahjustuste hulga tagajärg (Bridges, 1998).

Kuna paljud tekkivatest mutatsioonidest on rakkudele letaalsed, siis hoitakse mutatsioonide tekkesagedust rakus madalal tasemel ning konstitutiivseid kõrgeenenud mutatsioonisagedusega bakterid püsivad populatsioonis lühikest aega (Drake, 1991). Samas on näidatud, et patogeensete ja kommensaalsete bakterite populatsioonides esineb alati väike hulk mutaatoreid ning nende hulk kasvab, kui bakteripopulatsioon adapteerub uute keskkonnatingimustega (Hughes ja Andersson, 1997).

On spekulatsioonid, et näljatingimustes võiks mutatsioonide tekkesageduse tõusu põhjustada DNA replikatsiooni täpsuse ja ka reparatsioonisüsteemide aktiivsuse langus. Seda teooriat kinnitavad mitmed andmed. Näiteks lisaks replikatiivsetele DNA polümeraasidele on bakterirakkudes olemas ka vigutegevad DNA polümeraasid, millede ekspressioon suureneb juhul, kui bakterid viibivad stressitingimustes (Kim jt., 2001). Vigutegevate DNA polümeraaside aktiivtsenter on replikatiivse DNA polümeraasi aktiivtsentrist paindlikum, mistõttu suudavad need DNA polümeraasid jätkata DNA sünteesi DNA kahjustuse korral, kuid samas võimaldab aktiivtsentri paindlikkus ka Watson-Crick paaridest erinevate nukleotiidipaaride teket DNA sünteesil (Ling jt., 2001). Kuna vigutegevatel DNA polümeraasidel puudub 3'-5' eksonukleasne aktiivsus ehk „proofreading“, siis jäävad replikatsioonil tekkinud vead DNA ahelast eemaldamata. Vigutegevate DNA polümeraaside protsessiivsus on madal ning nad võivad lühiajaliselt DNA sünteesi läbi viia vaid juhul, kui DNA polümeraas III DNA kahjustuse tõttu ahelalt dissotseerub (Goodman, 2002). *E. coli* rakkudes on vigutegevateks DNA polümeraasideks DNA polümeraasid IV ja V. On näidatud, et nälgivates *E. coli* rakkudes põhjustab DNA polümeraasi V poolt läbiviidav DNA süntees asendusmutatsioonide hulga suurenemist (Bhamre jt., 2001). Samuti on näidatud DNA polümeraas IV sõltuvate -1 raaminihkemutatsioonide tõusu nii *E. coli* kui ka *P. putida* rakkudes (McKenzie jt., 2001; Tegova jt., 2004). Kuna vigutegevate DNA polümeraaside suhtes defektsed *E. coli* tüved ei ole näljatingimustes suutelised konkureerima algse tüve populatsiooniga (Tark jt., 2005; Yeiser jt., 2002), siis on vigutegevate DNA polümeraaside poolt põhjustatud mutatsioonid vajalikud bakterite kohastumisel erinevate keskkonnatingimustega (Yeiser jt., 2002).

E. coli puhul on näidatud, et kõrgenenud mutatsioonisagedusega tüvedel on sageli defektne kas DNA polümeraasi III ϵ subühik, mis vastutab vigu korrigeeriva aktiivsuse eest või mõni MMR süsteemi valk. Kuna näljatingimustes suureneb -1 raaminihkemutatsioonide hulk ning MMR süsteemi jaoks on sedatüüpi mutatsioonid üks parimaid substraate, siis arvasid Feng jt., et nälgivates *E. coli* rakkudes võiks MMR süsteem olla replikatsioonivigade eemaldamisel vähem efektiivne kui kasvava kultuuri rakkudes. Kvantitatiivse Western-immunoblot meetodil näidati, et rakkude sisenemisel statsionaarsesse kasvufaasi langes MutS valgu hulk kuni 10 ja MutH hulk kuni kolm korda, MMR-i kolmanda valgu MutL hulk ei muutunud (Feng jt., 1996). Samas on näidatud, et MutL valgu aktiivsus nälgivates rakkudes langeb (Harris jt., 1997). Esineb ka arvamus, et statsionaarse faasi rakkudes tekib kahjustusi nii palju, et rakkudes ei

jätku piisavalt palju molekule MutS ja MutL valku, et kogu genoomi ulatuses DNA reparatsiooni läbi viia (Negishi jt., 2002).

Näljatingimustes suureneb rakus ka oksüdatiivsete kahjustuste hulk (Saint Ruf jt., 2004). Peamiseks oksüdatiivseks DNA kahjustuseks on oksüdeeritud guaniin (GO). Kuna GO võib paarduda nii C kui ka A nukleotiidiga, siis tekivad (GO) olemasolul rakkudes DNA ahelasse spontaanselt asendusmutatsioonid (Maki ja Segiguchi, 1992). GO eemaldamiseks bakterirakkudest on olemas MutY, MutT ja MutM valkudest koosnev reparatsioonisüsteem. On näidatud, et GO reparatsioonil osalevate valkude üleekspresseerimisel nälgivates rakkudes asendusmutatsioonide hulk väheneb (Bridges jt., 1996).

Materjal ja meetodika

1. Söötmed ja bakteritüved

Söötmetena kasutasime LB-söödet (Miller, 1972) ja minimaalsöödet M9 baasil (Adams, 1959). Minimaalsööde sisaldas lisaks M9-le 2,5 ml/l mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960), aminohapete hüdroolüsaati CAA (*casamino acids*) lõppkontsentratsiooniga 0,2% ja süsinikuallikana glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Tardsöötme saamiseks lisasime vedelsöötmele agarit (15 g/l).

Plasmiidide ja bakteritüvede selektsiooniks kasutasime antibiootikume: ampitsilliini (Ap) 100 µg/ml, kanamütsiini (Km) 50 µg/ml, tetratsükliini (Tet) 80 µg/ml ja karbenitsilliini (Cb) 1000-3000 µg/ml.

P. putida rakke kasvasime 30°C juures, *E. coli* rakke 37°C juures. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelites 4a ja 4b.

Tabel 4a. Töös kasutatud bakteritüved

Bakteritüvi	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
C118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am)</i>	Herrero jt., 1990
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (r_Bm_B⁻) recA13proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1 -1</i>	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Tn4652, identne tüvega KT2440	Bayley jt., 1977
PaWUvrA	PaW85 <i>uvrA::km</i>	käesolev töö
PaWMutS	PaW85 <i>mutS::km</i>	Saamaa jt., 2006
PaWUvrD	PaW85 <i>uvrD::km</i>	käesolev töö
PaWUvrAUvrD	PaW85 <i>uvrA::tet uvrD::km</i>	käesolev töö
PaWMutSUvrA	PaW85 <i>mutS::tet uvrA::km</i>	käesolev töö
PaWMutSUvrD	PaW85 <i>mutS::tet uvrD::km</i>	käesolev töö

Tabel 4b. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
pBluescript KS(+)	kloneerimisvektor (Ap ^r)	Stratagene
pGP704L	konjugatiivne plasmiid (Ap ^r)	Pavel jt., 1994
pKT240	keskmise koopiaarvuga laia peremeesringi kloneerimisvektor (Ap ^r , Km ^r)	Bagdasarjan jt., 1983
pKTpheA22TAG	mutantne <i>pheA</i> geen plasmiidis pKT240, kus aminohapet Leu kodeeriva koodoni CTG asemel asub <i>pheA</i> geeni 22 positsioonis stoppkoodon TAG	Tegova jt., 2004
pBR322	kloneerimisvektor (Tet ^r , Ap ^r)	Stratagene
ptetKS	<i>tet^r</i> geen kloneerituna vektorisse pBluescript KS(+)	Tegova, 2004
pKStet	<i>tet^r</i> geen kloneerituna vektorisse pBluescript KS(+)	käesolev töö
pKSkm	<i>km^r</i> geen kloneerituna vektorisse pBluescript KS(+)	Tark jt., 2005
pGP704mutS::km	<i>mutS::km</i> kloneeritud plasmidi pGP704L	Saumaa jt., 2006
pSKmutS	<i>mutS</i> geen kloneerituna vektorisse pBluescript SK(+)	Saumaa jt., 2006
pSKmutS::tet	tetratsükliini resistentsusgeeniga katkestatud <i>mutS</i> geen vektoris pBluescript SK(+)	käesolev töö
pGP704mutS::tet	<i>mutS::tet</i> kloneeritud plasmidi pGP704L	käesolev töö
pKSuvrA	<i>uvrA</i> geen kloneerituna vektorisse pBluescript KS(+)	käesolev töö
pKSuvrA::tet	tetratsükliini resistentsusgeeniga katkestatud <i>uvrA</i> geen vektoris pBluescript KS(+)	käesolev töö
pGP704uvrA::tet	<i>uvrA::tet</i> kloneeritud plasmidi pGP704L	käesolev töö
pKSuvrA::km	kanamütsiini resistentsusgeeniga katkestatud <i>uvrA</i> geen vektoris pBluescript KS(+)	käesolev töö
pGP704uvrA::km	<i>uvrA::km</i> kloneeritud plasmidi pGP704L	käesolev töö
pKSuvrD	<i>uvrD</i> geen kloneerituna vektorisse pBluescript KS(+)	käesolev töö
pKSuvrD::km	kanamütsiini resistentsusgeeniga katkestatud <i>uvrA</i> geen vektoris pBluescript KS(+)	käesolev töö
pGP704uvrD::km	<i>uvrD::km</i> kloneeritud plasmidi pGP704L	käesolev töö

2. *P. putida* UvrA ja UvrD ja MutS suhtes defektsete tüvede konstrueerimine

2.1. UvrA suhtes defektse tüve konstrueerimine

Selleks, et konstrueerida UvrA suhtes defektne *P. putida* tüvi, amplifitseerisime PCR meetodil *uvrA* geeni, kasutades selleks primereid *uvrAylem* ja *uvrAalum* (Tabel 5). Amplifitseeritud 2799 aluspaari pikkuse *uvrA* geeni sisaldava järjestuse kloonisime restriктаasiga *EcoRV* avatud vektorisse pBluescript KS. Selle tulemusena saime plasmidi pKSuvrA. Selleks, et kombineerida *uvrA* geeni katkestust teiste geenide juba varem konstrueeritud katkestustega, oli vajalik katkestada *uvrA* geen kahe erineva resistentsusgeeniga.

***uvrA* geeni katkestamiseks kanamütsiini resistentsusgeeniga** tõstisime vektorist pKSk_m *km^r* geeni restriктаasi *HincII* fragmendina restriктаasidega *EheI* ja *Eco47III* avatud plasmidi pKSuvrA *uvrA* geeni lugemisraami. *EheI* ja *Eco47III* lõikesaidid asuvad vastavalt *uvrA* geeni positsioonides 825 ja 2305, alates *uvrA* geeni initsiaatorkoodonist. Saime plasmidi pKSuvrA::*km*, kus 1480 aluspaari pikkune *uvrA* geeni fragment on asendatud *km^r* geeniga.

***uvrA* geeni katkestamiseks tetratsükliini resistentsusgeeniga** tõstisime vektorist ptetKS *tet^r* geeni restriктаasidega *XbaI* ja *Ecl136II* fragmendina restriктаasidega *EheI* ja *Eco47III* avatud plasmidi pKSuvrA *uvrA* lugemisraami. *XbaI* lõikusest tekkinud kleepuvad otsad täitsime Klenowi fragmendi abil. Saime plasmidi pKSuvrA::*tet*, kus 1480 aluspaari pikkune *uvrA* geeni fragment on asendatud *tet^r* geeniga.

Saadud plasmiididest pKSuvrA::*km* ja pKSuvrA::*tet* viisime katkestatud geenid *XbaI* ja *Acc65I* fragmendina samade restriктаasidega avatud vektorisse pGP704L. Saadud plasmiididega, pGP704uvrA::*km* ja pGP704uvrA::*tet*, oli võimalik *uvrA* geeni katkestus viia homoloogilise rekombinatsiooni käigus üle *P. putida* kromosoomi.

2.2. UvrD suhtes defektse tüve konstrueerimine

UvrD suhtes defektse tüve konstrueerimiseks amplifitseerisime PCR meetodil *uvrD* geeni, kasutades selleks primereid *uvrDylem* ja *uvrDalum* (Tabel 5). Amplifitseeritud 2184

aluspaari pikkuse *uvrD* geeni sisaldava fragmendi viisime restriiktaasiga *EcoRV* avatud vektorisse pBluescript KS. Selle tulemusena saime plasmidi pKSuvrD. *uvrD* geeni katkestamiseks kanamütsiini resistentsusgeeniga klonerisime plasmidist pKSk^m *km^r* geeni *HincII* fragmendina restriiktaasidega *Eco72I* ja *Eco47III* avatud plasmidi pKSuvrD. Selle tulemusena saime plasmidi pKSuvrD::km, kus 493 aluspaari pikkune *uvrD* geeni fragment oli asendatud *km^r* geeniga. Plasmidist pKSuvrD::km viisime katkestatud *uvrD* geeni restriiktaaside *Acc65I* ja *XbaI* fragmendina samade restriiktaasidega avatud vektorisse pGP704L. Saime plasmidi pGP704uvrD::km, mille abil oli võimalik viia *uvrD* geeni katkestus homoloogilise rekombinatsiooni käigus *P. putida* kromosoomi.

2.3. MutS suhtes defektse tüve konstrueerimine

MutS defektse tüve konstrueerimiseks oli meie laboris eelnevalt olemas homoloogilise rekombinatsiooni teel geeni katkestamiseks vajalik plasmid pGP704mutS::km (Saumaa jt., 2006). Geenide *mutS* ja *uvrA* ning *mutS* ja *uvrD* suhtes topeltdefektsete tüvede konstrueerimiseks oli meil vaja viia *mutS* geeni järjestusse *km^r*-st erinev resistentsusgeen. Viisime *mutS* geeni lugemisraami tetratsükliini resistentsusgeeni. *tet^r* geeni lõikasime restriiktaasidega *EcoRI* ja *Van91I* välja vektorist pBR322 ning viisime esmalt restriiktaasiga *EcoRV* avatud plasmidi pBluescript KS. *EcoRI* ja *Van91I* lõikusel tekkinud kleepuvad otsad täitsime Klenowi fragmendi abil. Saadud plasmidist pKStet viisime *tet^r* geeni *SmaI* ja *Acc65I* fragmendina restriiktaasiga *SmaI* avatud plasmidi pSKmutS *mutS* geeni lugemisraami. *Acc65I* lõikusel tekkinud kleepuvad otsad täitsime Klenowi fragmendi abil. Saadud plasmidi nimetasime pSKmutS::tet. Järgnevalt viisime katkestatud *mutS* geeni restriiktaasi *Acc65I* fragmendina sama restriiktaasiga avatud plasmidi pGP704L. Saime plasmidi pGP704mutS::tet, mille abil oli võimalik viia *mutS* geeni katkestus homoloogilise rekombinatsiooni käigus üle *P. putida* kromosoomi.

3. Bakterite konjugatsioon

Homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks algse ja katkestatud geeni vahel *P. putida* rakkudes kasutasime bakterite konjugatsiooni. Selleks kasvasime üleöö *E. coli* tüve CC118λpir, mis sisaldas homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks vajalikku konjugatiivset plasmidi, retsipienttüve ja plasmiidide ülekandeks vajalikku

helperplasmii RK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101. Lahjendasime üleöö LB-vedelsöötmes plasmiidide selektsiooniks vajalike antibiootikumide juuresolekul kasvanud kultuurid tiheduseni $A_{580} = 0,1$ ja kasvatasime loksutil ~2-3 tundi. Segasime kokku võrdse koguse doonor-, retsipient- ja helpertüve kultuurist ja pipeteerisime 100 µl segu LB-tassile. Rakke kasvatasime üleöö 30°C juures. Seejärel suspendeerisime rakukultuuri 5 ml 1 x M9 lahuses ja plaatisime sellest 100 µl kogused minimaal-selektiivtassidele.

Mutatsiooniprotsesside uurimiseks vajalike testplasmiidide ülekandeks *P. putida* rakkudesse segasime 100 µl LB-s kokku võrdses mahus plasmii sisaldavat doonortüve DH5α, retsipienttüve ja plasmii ülekandeks vajaliku helperplasmii sisaldava tüve HB101[pRK2013] rakke. 15 minuti möödudes plaatisime ristamissegust ~2 µl rakke minimaalselektiivtassile.

4. Bakterite elektroporatsioon

P. putida rakkude elektroporatsioonil kasutasime Sharma ja Schimke (1996) meetodit. Retsipienttüve rakke kasvatasime YENB-söötmes (0,75% “Bacto yeast extract”; 0,8% “Bacto nutrient broth”) optilise tiheduseni $A_{580} = 1-1,5$. Rakud tsentrifugisime söötmest välja, pesime kolm korda 10%-se glütserooliga. Rakud tsentrifugisime põhja 12100 x g 30 sekundi vältel firma “Eppendorf” lauatsentrifuugiga “Mini Spin”, kõik tsentrifugimised teostasime samadel tingimustel. 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 kasvatasime ligikaudu tund aega loksutil 30 °C juures. Seejärel tsentrifugisime rakud söötmest välja ja plaatisime selektiivtassidele.

5. *E. coli* transformatsioon

Kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatasime *E. coli* rakke üleöö 4 ml LB-puljongis 37°C juures. Seejärel lahjendasime rakukultuuri ~20 korda ja kasvatasime rakke samadel tingimustel tiheduseni $A_{580} = 0,2-0,5$. Rakud tsentrifugisime põhja 12100 x g 30 sekundi vältel firma “Eppendorf” lauatsentrifuugiga “Mini Spin” ja eemaldasime

söötme. Kõik tseentrifuugimised teostasime samadel tingimustel. Suspendeerisime rakud 500 µl transformatsioonilahuses I (10 mM NaOAc, 50 mM MnCl₂, 5 mM NaCl; pH 5,6-6) ja hoidsime rakke 10 min jääl. Seejärel tseentrifuugisime rakud uuesti põhja ja suspendeerisime 50 µl transformatsioonilahuses II (10 mM NaOAc, 70 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂, 5% glütserool; pH 5,6-6) ja hoidsime rakke 30 min jääl.

Transformatsiooniks lisasime kompetentsetele rakkudele ligaasisegu või ~100 ng plasmiidset DNA-d ja hoidsime rakke 30 min jääl. Seejärel inkubeerisime rakususpensiooni 5 min 37°C juures ja viisime transformatsioonisegu veel 2 minutiks jääle. Lisasime 200 µl LB-söödet ja kasvasime rakke 1 tund 37°C juures. Peale seda tseentrifuugisime rakud söötmest välja ja plaatisime selektiivsöötmele.

6. PCR

PCR-i (polümeraasi ahelreaktsioon) kasutasime *P. putida uvrA* ja *uvrD* geenijärjestuste amplifitseerimiseks genomist ja meie poolt tehtud konstruktide ning konstrueeritud bakteritüvede õigsuse kontrollimiseks.

Reatsiooni maht oli 20 µl. Reaktsioon toimus PCR-i puhvril, mis sisaldas: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Triton X 100, 0,5% Ficoll 40, 1 mM tartrasiini. Eelnevale lisasime veel 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 u firma “Fermentas” Taq polümeraasi, 10 pmol praimereid (tabel 5) ja ~10 ng isoleeritud DNA-d või rakke.

Tabel 5. Töös kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus	Seondumiskoht
uvrAylem	5'-GTGGACAAGATCCTGATTCG-3'	komplementaarne <i>uvrA</i> geeni GTG piirkonnaga 1-20, suunaga geeni sisse
uvrAalum	5'-ATG GCCGGTATATGACTGCT-3'	komplementaarne <i>uvrA</i> geeni stoppkoodoni regiooniga positsioonides 2780-2799, suunaga geeni sisse
uvrA1lookus	5'-ATGCCCCGCAAGCGAGGC-3'	komplementaarne <i>uvrA</i> geenieelse järjestusega positsioonides -5 kuni -22 initsiaatorkoodon GTG-st, suunaga geeni poole
uvrDylem	5'-ATGCGCACAGACGACCTCT-3'	komplementaarne <i>uvrD</i> geeni ATG piirkonnaga 1-19, suunaga geeni sisse

Nimi	Järjestus	Seandumiskoht
uvrDalum	5'-GACAGCCTCGAGCTTGGC-3'	komplementaarne <i>uvrA</i> geeni stoppkoodoni regiooniga positsioonides 2780-2799, suunaga geeni sisse
uvrDsisylem	5'-TCGATCTACGGCTGGCGC-3'	komplementaarne <i>uvrA</i> geenile positsioonides 763-780 initsiaator-koodon ATG-st, suunaga geeni sisse
uvrDsisalum	5'-GATGGTTTCCACGACATAGC-3'	komplementaarne <i>uvrA</i> geenile positsioonides 1000-1019 initsiaator-koodon ATG-st, suunaga geeni alguse poole
mutSylem	5'-CCTGCGCGATGCGCTGGGCG-3'	komplementaarne <i>mutS</i> geeni piirkonnaga positsioonides 1023-1043 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geeni sisse
mutSalum	5'-CCAGTTCGGCCAGGCGGTGC-3'	komplementaarne <i>mutS</i> geeni piirkonnaga positsioonides 1580-1459 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geeni alguse poole
PpmutSNdel	5'-CATATGTCAGATCTTTCCGCACAC-3'	komplementaarne <i>mutS</i> geeni piirkonnaga positsioonides -3 kuni 21 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geeni sisse
tetOc	5'-ATGACGATGACCGCATTATT-3'	seondub <i>tet</i> geenile positsioonides 1-20, suunaga geeni algusest välja
kmOc	5'-TCGAGCAAGACGTTTCCC-3'	komplementaarne <i>km</i> geenile positsioonides 17-34, suunaga geeni algusest välja
pheABamei	5'-AAGGCGGCTCCC GTAAGACA-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni -40 initsiaatorkoodon ATG-st, suunaga geeni poole
pheAts	5'-GTTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni alaga positsioonides 295 kuni 313 nukleotiidi allapoole translatsiooni startkoodonist ATG

PCR-i teostasime firma "Biometra" PCR-i masinaga tingimustel: denaturatsioon 96°C 30 sekundit kuni 1 minut, praimerid seandumine 50 kuni 54°C 30 sekundit kuni 1 minut, DNA süntees 72°C juures 30 sekundit kuni 3 minutit (Saiki jt., 1986). Kokku toimus reaktsioon 25 tsükli.

7. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasvasime plasmidi sisaldavaid *E. coli* rakke üleöö 4 ml LB-söötmes. Tsentrifugisime rakud põhja 30 sekundi vältel ja suspendeerisime 300 µl-s SET puhvril (10% sahharoos, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl; pH 8,0). Kõik tsentrifugimised viisime läbi maksimumpöõretel (12100 x g), kasutades firma "Eppendorf" lauatsentrifuugi "Mini Spin". Lisasime suspensioonile 50 µl lüsotsüümi lahust (20 mg/ml), segasime ja hoidsime toatemperatuuril 5 minutit. Seejärel lisasime 300 µl TET lahust (1% Triton X 100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl; pH 8,0), segasime ja kuumutasime 3 minutit 96°C juures. Lüüsunud rakkude kestad ja kromosoomvalkkompleksi tsentrifugisime põhja 20 minuti jooksul, sademe eemaldasime tikuga. DNA sadestamiseks lisasime lahusele 800 µl isopropanooli, segasime ja seejärel tsentrifugisime 6 minutit. Eemaldasime supernatandi ja lahustasime sademe 200 µl RNAasA-d (2 µg/ml) sisaldavas lahuses ja hoidsime RNA lagundamiseks 10 minutit 37°C juures. Peale RNAasi töötlust ekstraheerisime lahust fenooli ja kloroformiga. DNA sadestasime 1/10 mahu 5 M NaCl ja 2,5 mahu 96%-lise etanooliga, tsentrifugisime 10 minutit. DNA sadet pesime 80%-lise etanooliga ja lahustasime 50 µl Milli-Q vees.

Geelektroforeesiks lisasime DNA proovile 0,04%-list broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis, 20 µl proovi kohta 4 µl. Proovid kandsime horisontaalsele 1%-sele agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldas etiidiumbromiidi 0,1 µg/ml. Elektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 100-150 volti. Geeli pildistasime ultravioletvalguses.

DNA restriksiooniks kasutasime firma "Fermentas" ensüüme. Reaktsioonid viisime läbi tingimustel, mis olid ette nähtud firma poolt koostatud ensüümide kataloogis.

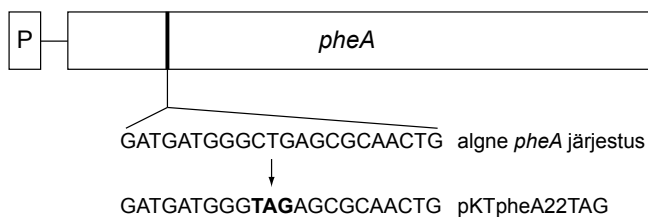
8. UV-kiiritatud rakkude elumuse määramine

Elumuse määramiseks kasvasime *P. putida* tüvesid üleöö LB-söötmes. Lahjendasime kultuuri tiheduseni $A_{580} = 0,1$ ja kasvasime eksponentsiaalsesse kasvufaasi tiheduseni vahemikus $A_{580} = 0,6-0,8$. Seejärel tegime kultuuridest lahjendused 1×10^9 lahusesse. Plaatisime LB-tassile PaWUvrD ja PaWUvrA kultuurist 10^{-1} lahjenduse ja *P. putida* algse tüve kultuurist 10^{-3} lahjenduse. Kiiritasime rakukultuuriga tase lainepikkuse 254 nm juures 50 J/m², kasutades firma "Stratagene" aparati "UV-stratalinker 1800".

Pärast kiiritamist kasvasime kultuure üleöö 30°C juures. Elusrakkude määramiseks plaatisime kultuuridest 10⁻⁶ lahjendused LB-tassidele ja inkubeerisime samuti 30°C juures. Järgmisel päeval lugesime tekkinud kolooniad ja arvasime, kui suur osa tassil kiiritatud rakkudest jäi ellu. Tulemused esitasime protsendina elusrakkude suhtes.

9. *Phe*⁺ mutantide isoleerimine

Reparatsioonisüsteemide osaluse uurimiseks nälgivas bakteripopulatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides kasutasime fenooli monooksügenaasi geenil *pheA* põhinevat testsüsteemi pKT*pheA*22TAG (Tegova jt., 2004). See testsüsteem võimaldab jälgida asendusmutatsioonide teket. Plasmiidis pKT*pheA*22TAG paiknevas *pheA* geenis on 22. koodon CTG asendatud translatsioonistoppkoodoniga TAG (joonis 8). Stoppkoodonit TAG muutva asendusmutatsiooni toimumisel muteeritud *pheA* järjestuses saavad rakud hakata tarvitama süsinikuallikana fenooli.



Joonis 8. Asendusmutatsioonide uurimiseks vajalik testsüsteem.

Plasmiidis pKT*pheA*22TAG olevasse *pheA* geenis on kodeerivasse järjestusse sisseviidud stoppkoodon TAG.

Esmalt viisime *P. putida* algse tüve ja reparatsioonisüsteemide suhtes defektsete tüvede rakkudesse plasmidi pKT*pheA*22TAG. Testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* rakke kasvasime 20-24 tundi minimaalsöötmes 30°C juures. Seejärel plaatisime 2,5-250 µl rakke minimaaltassidele, mis sisaldasid ainsa süsinikuallikana fenooli (2,5 mM) ja plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi (Cb). Plaaditava rakkude koguse valisime selle järgi, et Phe-Cb tassidele tekiks päevas 1-5 Phe⁺ revertanti. Juhul, kui me plaatisime Phe-Cb tassidele vähem kui 250 µl uuritava *P. putida* tüve rakke, siis lisasime selleks, et kõikides katsetes oleks rakke tassidel võrdsel hulgal, samadele tassidele taustkultuuri

rakke. Tauskultuuri rakke lisasime sellise koguse, et uuritava ja taustkultuuri rakkude kogus kokku oleks 250 μ l. Taustkultuurina kasutasime tüve PaW85 rakke, mis sisaldasid plasmidi pKT240. pKT240 annab taustkultuuri rakkudele resistentsuse Cb suhtes, kuid ei võimalda Phe⁺ kolooniate teket. Phe⁺ revertantide akumulatsioonist selektiivtassidele jälgisime kümne päeva jooksul peale rakkude plaatimist. Kasvavas kultuuris plaatimise eelselt tekkinud Phe⁺ revertandid ilmusid tassidel nähtavale katse teisel päeval. Hilisematel päevadel tassidele ilmunud Phe⁺ kolooniate puhul olid mutatsioonid tekkinud süsinikunälja tingimustes fenooli minimaaltassidel olevates rakkudes (Kasak jt., 1997). Kõikide uuritavate tüvedega viisime läbi vähemalt 3 sõltumatut katset, igas katses oli 20 paralleeli.

Selleks, et arvutada Phe⁺ revertantide tekkesagedust, määrasime *P. putida* algse tüve PaW85 ja reparatsioonidefektsete tüvede elusrakkude arvu kogu katse jooksul. Kasvavas kultuuris olevate elusrakkude määramiseks tegime lahjendused samadest kultuuridest, mida plaatisime Phe-Cb rakkudele ning plaatisime 10⁻⁷ lahjendused LB tassidele. Selleks, et hinnata, kuidas muutus uuritavate tüvede elusrakkude arvukus Phe-Cb tassidel, lõikasime 1 ml pipetiotsikuga akumulatsioonitassist välja agariketta, vältides tassil tekkinud Phe⁺ kolooniaid. Agariketta pindala moodustab 1/100 kogu tassi pindalast. Bakterirakud eemaldasime agarsöötmetükilt, loksutades seda 1 ml-s 1xM9 lahuses. Saadud rakususpensioonist plaatisime sobiva lahjenduse antibiootikumi (Km või Tet olenevalt uuritava tüve resistentsusest) sisaldavatele LB tassidele. Inkubeerisime tase üleöö 30°C juures ning seejärel lugesime tassidele tekkinud kolooniad kokku ning leidsime elusrakkude arvu Phe-Cb tassidel. Elusrakkude arvu määrasime vähemalt viiest sõltumatust sama tüve nälgivast bakterikultuurist.

Phe⁺ revertantide tekkesageduse arvutamiseks kasutasime lihtsustatud valemit (Rosche ja Foster, 2000):

$$\text{Phe}^+ \text{ revertantide tekkesagedus (f)} = \frac{\text{Phe}^+ \text{ revertantide arv Phe-Cb tassil (r)}}{\text{elusrakkude arv Phe-Cb tassil (N)}} \quad (1)$$

Phe⁺ revertantide tekkesageduse arvutasime 10⁹ elusraku kohta.

Tulemused

Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (NER) ja paardumisvigade reparatsioon (MMR) on kaks kõige laiemat DNA kahjustuste äratundmis- ja parandamisspetsiifikaga DNA reparatsioonisüsteemi. NER tunneb ära ja parandab kõiki DNA kahjustusi, mis muudavad DNA konformatsiooni. Zou jt. on näidanud, et NER-i DNA kahjustuste äratundmise efektiivsus on otseses sõltuvuses sellest, kui tugevalt on DNA kaksikahela struktuur häiritud (Zou jt., 2001). DNA konformatsiooni muudavad näiteks UV-kiirguse tagajärjel tekkivad pürimidiinide dimeerid, valepaardumised ja enamasti DNA-ga seonduvaid keemilisi ühendeid. MMR-i spetsiifika on kitsam, see reparatsioonisüsteem osaleb peamiselt replikatsiooni käigus tekkinud valepaardumiste ja raaminihete parandamisel ning eemaldab DNA ahelast mõningaid üksikuid DNA-ga seonduvaid keemilisi ühendeid.

Nii NER-i kui ka MMR-i puhul eemaldatakse kahjustust sisaldav DNA lõik DNA ahelast helikaasi abil. *E. coli* rakkudes osaleb mõlemas reparatsioonirajas UvrD helikaas ning selle puudumisel ei ole NER ega ka MMR võimelised kahjustust DNA ahelast eemaldama (Yamaguchi jt., 1998; Orren jt., 1992).

DNA reparatsioonisüsteemidel on oluline roll mutatsiooniprotsesside kontrollimisel rakus. Ühelt poolt tagavad reparatsioonisüsteemid genoomi stabiilsuse, hoides ära DNA kahjustuste ja replikatsioonivigade tõttu tekkivaid mutatsioone. Teisalt peavad need süsteemid võimaldama mutatsioonide teket, mis on vajalik bakterite kohastumiseks uute keskkonnatingimustega.

Selle töö eesmärgiks oli välja selgitada DNA reparatsioonisüsteemide NER ja MMR osalus *P. putida* populatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides.

1. NER-i ja MMR-i osaluse uurimiseks *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides kasutatud bakteritüved

Selleks, et uurida NER-i ja MMR-i osalust mutatsiooniprotsessides nii nälgivas kui ka kasvavas mullabakter *Pseudomonas putida* bakteripopulatsioonis, konstrueerisime NER-i ja ka MMR-i suhtes defektsed *P. putida* tüved. Mõlemal juhul rikkusime ära DNA kahjustuse äratundmisel osalevaid valke kodeerivate geenide lugemisraamid.

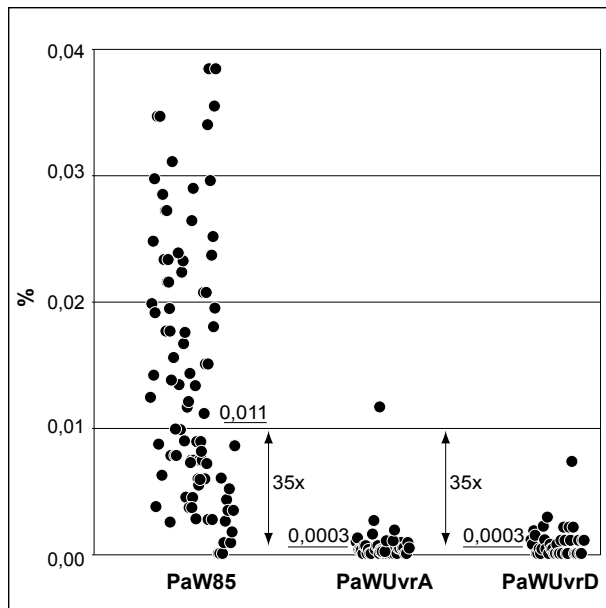
NER-is osaleb DNA kahjustuse äratundmisel UvrA valk, seega konstrueerisime NER-i funktsiooni uurimiseks *uvrA* geeni suhtes defektse tüve PaWUvrA. MMR-is täidab sama funktsiooni MutS valk ning MMR-i osaluse uurimiseks *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides kasutasime MutS defektset tüve PaWMutS (Saumaa jt., 2006).

Kuna *E. coli* puhul kasutavad nii NER kui ka MMR kahjustatud DNA regiooni eemaldamiseks UvrD helikaasi, siis selleks, et teada saada, kuidas mõjutab UvrD puudumine *P. putida* rakkudes toimuvaid mutatsiooniprotsesse, konstrueerisime *uvrD* geeni suhtes defektse tüve PaWUvrD.

2. NER-i osalus UV-kiirguse poolt põhjustatud DNA kahjustuste eemaldamisel *P. putida* rakkudes

Bakterites on kirjeldatud neli erinevat mehhanismi, mille abil on bakterirakul võimalik UV-kiirguse poolt tekitatud DNA kahjustusi eemaldada või kahjustuste olemasolul ellu jääda. Nendeks on fotolüaas-sõltuv fotoreaktivatsioon, NER, DNA polümeraas V vahendatud vigutegev DNA süntees ja rekombinatsiooniline reparatsioon. Nende mehhanismide puudumisel jäävad UV-kiirguse poolt põhjustatud kahjustused DNA ahelast eemaldamata. Kuna peale DNA polümeraasi V ei suuda ükski teine DNA ega ka RNA polümeraas sedatüüpi kahjustusi ületada, siis peatuvad nii DNA kui ka RNA süntees ja rakud hukuvad. Perekonna *Pseudomonas* esindajate genoomides puuduvad DNA polümeraasi V kodeerivad geenid. Nii *P. aeruginosa* kui ka *P. syringae* puhul on näidatud, et fotolüaasi osalus on nendes bakteritüvedes UV-kiirguse poolt tekitatud kahjustuste eemaldamisel minimaalne (Kim ja Sundin, 2001). Järelikult võiks NER *P. putida* rakkudes olla üks olulisematest UV-kiirguse poolt põhjustatud kahjustuste eemaldamisel osalevatest mehhanismidest. Selleks, et selgitada välja, milline on NER-i osalus UV-kiirguse poolt põhjustatud pürimidiini dimeeride ja (6-4) fotoproduktide eemaldamisel *P. putida* rakkudes, määrasime kindlaks NER süsteemi suhtes defektse tüve UV-tundlikkuse. Selleks kiiritasime UvrA defektse tüve ning UvrD helikaasi suhtes defektse tüve rakke UV-C kiirgusega lainepikkuse 254 nm juures, 50 J/m².

Joonisel 9 on näha, et nii *P. putida* tüvede PaWUvrA kui ka PaWUvrD rakkudest jäi UV-kiirgamise järgselt ellu ~35 korda vähem rakke kui algses tüves. Nendest tulemusest võime järeldada, et NER süsteem töötab *P. putida* rakkudes efektiivselt ja on vajalik UV-kiirguse poolt põhjustatud DNA kahjustuste eemaldamiseks.



Joonis 9. UV-kiiritamisjärgne elumus *P. putida* tüvedel PaW85, PaWUvrA ja PaWUvrD.

Iga täpp joonisel tähistab sõltumatu katse tulemust. Horisontaalse joonega on näidatud tüvede PaW85, PaWUvrA ja PaWUvrD sõltumatute katsete põhjal arvatud mediaani asukoht, joone kohal asuv arv on mediaani väärtus. Kahepoolse noolega on näidatud tüvede PaW85 ja PaWUvrA või PaWUvrD tulemuste mediaanide erinevus kordades. Statistiliselt on tüvede PaW85 ja PaWUvrA ning PaW85 ja PaWUvrD UV-kiiritamisjärgne elumus erinev ($P < 0,01$) ning tüvede PaWUvrA ja PaWUvrD UV-kiiritamisjärgne elumus sarnane ($P = 0,27$). P-väärtused on leitud Mann-Whitney testi abil (Sokal ja Rohlf, 1981). Arvutuste tegemisel on kasutatud statistikaprogrammi Statgraphics Plus.

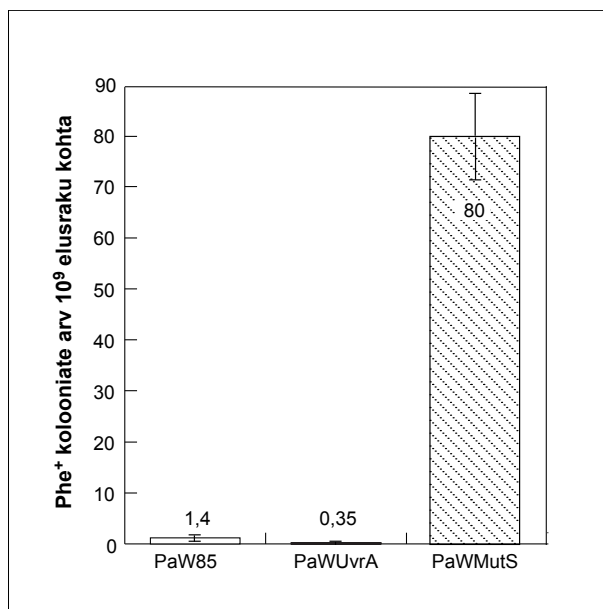
3. *NER-i* ja *MMR-i* osalus kasvavates bakterirakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides

Seni on *NER-i* osalust DNA reparatsioonil näidatud peamiselt indutseeritud mutageneesil (UV-kiirgus, mitomütsiin C), seetõttu otsustasime uurida, kas *NER* võiks osaleda ka spontaansete mutatsioonide kõrvaldamisel kasvavates bakterirakkudes. Kasvavas populatsioonis toimuvate mutatsiooniprotsesside iseloomustamiseks kasutasime fenooli monooksügenaasi geenil *pheA* põhinevat plasmiidset testsüsteemi pKTp*pheA*22TAG, kus *pheA* geeni järjestusse on viidud translatsiooni stoppkoodon TAG (Tegova jt., 2004). Stoppkoodonit muutva asendusmutatsiooni tekkimisel muteeritud *pheA* järjestuses suudavad bakterid hakata kasutama süsinikuallikana fenooli. Kasvavas

populatsioonis toimuvaid mutatsiooniprotsesse iseloomustavad teisel katsepäeval fenool-minimaaltassidele ilmunud Phe⁺ revertandid.

3.1. NER-i osalus valepaardumiste eemaldamisel *P. putida* kasvavates rakkudes

Selleks, et uurida NER-i osalust kasvavates *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides, jälgisime Phe⁺ revertantide teket algses tüves ja UvrA suhtes defektse tüves. Tüves PaWUvrA tekkis Phe⁺ revertante ligikaudu neli korda vähem kui algses tüves (Joonis 10, tabel 6). PaWUvrA madalam mutatsioonisagedus võis olla põhjustatud sellest, et UvrA seondub madala afiinsusega ka kahjustamata DNA ahelale ning initsieerib NER süsteemi teiste valkude tööd (Zou jt., 2001). Sel juhul teeb UvrBC endonukleas DNA ahelasse üheaahelalise DNA katked, mis võivad olla substraadiks vigutegevatele DNA polümeraasidele ja rekombinatsioonil osalevatele valkudele. Samuti võivad tekkida mutatsioonid NER-i poolt läbiviidava DNA reparatsiooni käigus, kuna uue DNA fragmendi sünteesimisel DNA polümeraaside I ja II poolt võidakse DNA ahelasse lülitada mittekomplementaarseid nukleotiide.



Joonis 10. MMR-i ja NER-i osalus kasvavas populatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides.

Teisel katsepäeval asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide arvukus tüvedes PaWUvrA, PaWMutS ja PaW85. Joonisel on esitatud vähemalt 60 sõltumatu katsetulemuse aritmeetilise keskmise põhjal leitud väärtused ning standardviga.

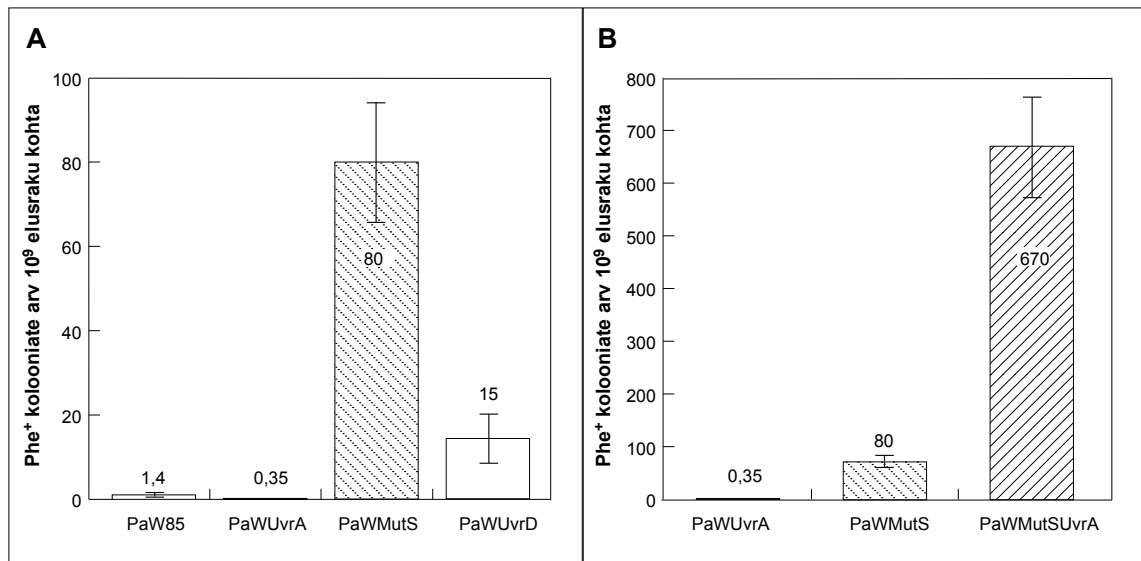
3.2. MMR-i osalus valepaardumiste eemaldamisel *P. putida* kasvavates rakkudes

Selleks, et hinnata MMR süsteemi osalust valepaardumiste eemaldamisel *P. putida* kasvavates rakkudes, jälgisime teise päeva Phe⁺ revertantide teket PaWMutS tüves. Joonisel 10 on näha, et tüves PaWMutS tekkis Phe⁺ revertante ligikaudu 60 korda rohkem kui alguses tüves, seega on MMR kasvavates *P. putida* rakkudes oluline reparatsioonisüsteem asendusmutatsioonide ärahoidmisel.

3.3. NER-i ja MMR-i topeldefektsuse mõju *P. putida* kasvavates rakkudes toimuvatele mutatsiooniprotsessidele

Kuna kirjandusest on teada, et UvrD puudumisel *E. coli* rakkudes ei funktsioneerigi NER ega MMR, otsustasime uurida seda, kuidas mõjutab nende kahe reparatsioonisüsteemi defektsus mutatsiooniprotsesse *P. putida* populatsioonis UvrD suhtes defektses tüves PaWUvrD.

Tüves PaWUvrD tõusis Phe⁺ revertantide tekkesagedus võrreldes algse *P. putida* tüvega ligikaudu 10 korda (Joonis 11A, tabel 6). Üllatusena jäi tüves PaWUvrD võrreldes tüvega PaWMutS Phe⁺ revertantide teke ligikaudu viis korda madalamaks. See tulemus viitab sellele, et *P. putida* UvrD suhtes defektses tüves on MMR süsteem funktsionaalne. Kuna on teada, et kahjustust sisaldavat DNA fragmenti on võimalik ahelast eemaldada vaid helikaasi abil (Georg jt., 1994), siis võib MMR-is UvrD helikaasi funktsiooni täita mõni teine *P. putida* helikaas.



Joonis 11. MMR-i ja NER-i topeldefektsuse mõju *P. putida* kasvavas populatsioonis toimuvatele mutatsiooniprotsessidele.

A. Teisel katsepäeval asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon tüvedes PaW85, PaWUvrA, PaWUvrD ja PaWMutS. **B.** Teiselkatse päeval asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide arvukus tüvedes PaWUvrA, PaWMutS ja PaWMutSUvrA. Joonisel on esitatud vähemalt 60 sõltumatu katsetulemuse aritmeetilise keskmise põhjal leitud väärtused ning standardviga.

Kuna UvrD puudumisel oli MMR süsteem funktsionaalne, siis ei olnud meil võimalik PaWUvrD tüve abil hinnata MMR ja NER süsteemide olulisust *P. putida* rakkudes toimivas mutatsiooniprotsessides. Seega konstrueerisime NER-i ja MMR-i osaluse uurimiseks *P. putida* rakkudes tekkivate valepaardumiste parandamisel MutS ja UvrA topeldefektse tüve PaWMutSUvrA, milles ei funktsioneerigi NER ega ka MMR süsteem. Tüves PaWMutSUvrA tekkis Phe⁺ revertante võrreldes algse tüvega ligikaudu 500 korda suurema sagedusega (Joonised 11A ja 11B, tabel 6). Võrreldes tüvega PaWUvrA tekkis Phe⁺ revertante MMR ja NER topeldefektse tüves ~2000 korda rohkem ning võrreldes tüvega PaWMutS ~8 korda rohkem (Joonis 11B). Kuna mõlema reparatsioonisüsteemi suhtes defektse tüves oli Phe⁺ revertantide tekkesagedus kõrgem võrreldes NER ja MMR defektsete tüvedega eraldi, siis võime järeldada, et mõlemad reparatsioonisüsteemid eemaldavad *P. putida* kasvavates rakkudes valepaardumisi. Samuti on NER-i ja MMR-i funktsioonid suurel määral teineteise poolt komplementeeritud. Analüüsid tulemusi täpsemalt võime öelda, et kuna tüves PaWUvrA, milles on MMR süsteem funktsionaalne, tekkis Phe⁺ revertante 4 korda vähem, kui algse tüves, siis on MMR võimeline

täielikult eemaldama NER-i defektsuse korral parandamata jäävad valepaardumised. Ka NER süsteem parandab valepaardumisi kasvavas *P. putida* populatsioonis, kuna tüves PaWMutS, milles on NER süsteem funktsionaalne, tekkis Phe⁺ revertante 8 korda madalama sagedusega võrreldes mõlema reparatsioonisüsteemi suhtes defektse tüvega PaWMutSUvrA. Kuna MutS suhtes defektse tüves oli Phe⁺ revertantide tekkesagedus ~60 korda kõrgem võrreldes algse tüvega, on NER süsteemi osalus kasvavas *P. putida* populatsioonis valepaardumiste eemaldamisel võrreldes MMR-iga vähem oluline.

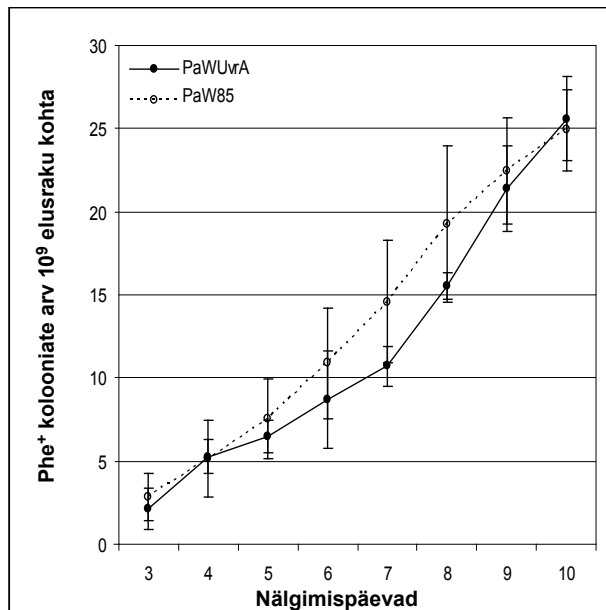
4. NER-i ja MMR-i osalus nälgivates bakterirakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides

Järgnevalt uurisime, kas ja millisel määral osalevad NER ja MMR DNA reparatsioonis nälgivates *P. putida* rakkudes. Mutatsiooniprotsesside iseloomustamiseks nälgivas populatsioonis kasutasime eelpoolkirjeldatud fenooli monooksügenaasi geenil *pheA* põhinevat plasmiidset testsüsteemi pKTpheA22TAG. Nälgivas populatsioonis toimuvaid mutatsiooniprotsesse kirjeldavad alates kolmandast katsepäevast fenool-minimaaltassidele ilmunud Phe⁺ revertandid.

4.1. NER-i osalus valepaardumiste eemaldamisel *P. putida* nälgivates rakkudes

Selleks, et uurida NER-i osalust nälgivas bakteripopulatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides, jälgisime Phe⁺ revertantide akumulatsioonist testplasmidi pKTpheA22TAG sisaldavas *P. putida* algse tüves ja tüves PaWUvrA.

Tüves PaWUvrA tekkis Phe⁺ revertante kogu nälgimisperioodi jooksul algse tüvega võrreldavalt (Joonis 12, tabel 6). Mõningaid erinevusi esines vaid revertantide akumulatsiooni dünaamikas. Näiteks tõusis tüves PaWUvrA nälgimise hilisel perioodil (8.-10. päev), Phe⁺ revertantide tekkesagedus võrreldes nälgimise algperioodiga (3.-5. päev) kaks korda ($P < 0,01$), samas kui algse tüves toimus Phe⁺ revertantide teke ühtlase kiirusega kogu katse vältel ($P = 0,014$). Saadud tulemused näitavad, et NER kas ei osale nälgivates *P. putida* rakkudes valepaardumiste eemaldamisel või ei ole NER-i roll sedatüüpi vigade parandamisel oluline, kuna teised reparatsioonisüsteemid (MMR, BER) suudavad tekkinud valepaardumised eemaldada ka NER-i puudumisel.

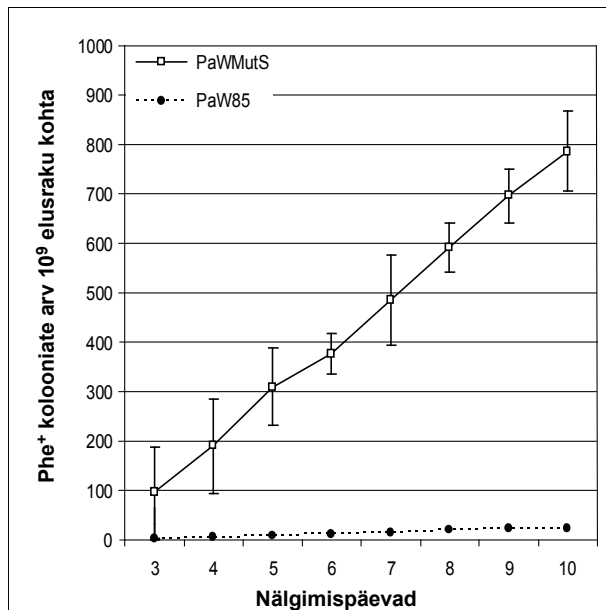


Joonis 12. NER-i osalus nälgivas bakteripopulatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides.

Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon tüvedes PaW85 ja PaWUvrA Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvatud 1×10^9 elusraku raku kohta. Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

4.2. MMR-i osalus valepaardumiste eemaldamisel nälgivates *P. putida* rakkudes

MMR-i osaluse uurimiseks *P. putida* nälgivates rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides võrdlesime Phe⁺ revertantide akumulatsioonitaset testplasmidi pKTpheA22TAG sisaldavas *P. putida* algse tüves ja tüves PaWMutS. MMR osalust *P. putida* nälgivates rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides kirjeldavad tulemused on avaldatud artiklis Saumaa jt, 2006 (Vt lisa 1) Joonisel 13 on näha, et tüves PaWMutS tekkis Phe⁺ revertante võrreldes algse tüvega ligikaudu 25 korda rohkem. Seega osaleb MMR nälgivates *P. putida* rakkudes tekkivate mutatsioonide ärahoidmisel. Kuna Phe⁺ revertantide akumulatsioon MutS suhtes defektses tüves oli kogu katseperioodi jooksul ühtlane ning nälgimise süvenedes ei langenud, siis võime öelda, et MMR-i efektiivsus nälgimisel ei lange.



Joonis 13. MMR-i osalus nälgivas bakteripopulatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides.

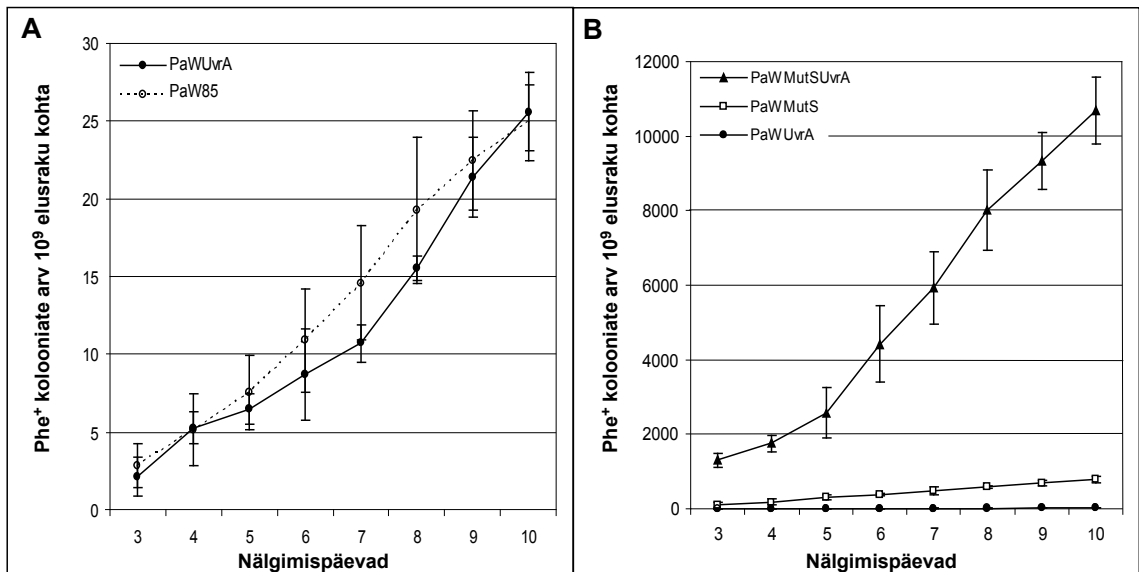
Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon tüvedes PaW85 ja PaWMutS. Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvatud 1×10^9 elusraku raku kohta. Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

4.3. NER-i ja MMR-i topeltdefektsuse mõju nälgivates *P. putida* rakkudes toimuvatele mutatsiooniprotsessidele

Järgnevalt vaatlesime NER-i ja MMR-i osalust nälgivas populatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides. Tabelis 6 on näha, et keskmiselt tekkis tüvedes PaWUvrA, PaWMutS ja PaWMutSUvrA vastavalt 3,1, 98 ja 1248 Phe⁺ revertanti 10^9 elusraku kohta. Kuna mõlema reparatsioonisüsteemi suhtes defektses tüves oli Phe⁺ revertantide tekkesagedus kogu nälgimise jooksul kõrgem võrreldes ainult NER-i või MMR-i defektsete tüvedega (Joonised 14A ja 14B), siis võime järeldada, et nii NER kui ka MMR osalevad valepaardumiste parandamisel ka näljatingimustes.

Eelnevalt olime kirjeldanud, et MMR-i efektiivsus valepaardumiste eemaldamisel nälgimise süvenedes ei langenud (Vt peatükk 4.3). Selleks, et hinnata NER süsteemi funktsioneerimist nälgivas *P. putida* populatsioonis võrdlesime omavahel tüvedes PaWMutS ja PaWMutSUvrA toimuvat Phe⁺ revertantide teket (Joonis 14B). Phe⁺

revertantide tekkesageduste erinevus tüvede PaWMutSUvrA ja PaWMutS-i vahel kirjeldab NER-i osalust valepaardumiste eemaldamisel. Kuna tüves PaWMutSUvrA oli Phe⁺ revertantide tekkesagedus 15 korda kõrgem võrreldes tüvega PaWMutS ja kuna mõlemas tüves Phe⁺ revertantide teke nälgimisel ei langenud, siis järelikult ei vähene nälgimisel sarnaselt MMR-ile ka NER-i efektiivsus



Joonis 14. MMR-i ja NER-i topeldefektsuse mõju *P. putida* nälgivas populatsioonis toimuvatele mutatsiooniprotsessidele.

A. Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon tüvedes PaW85 ja PaWUvrA.
B. Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon tüvedes PaWMutSUvrA, PaWMutS ja PaWUvrA. Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvatud 1 x 10⁹ elusraku raku kohta. Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

Tabel 6. Phe⁺ revertantide tekkesagedus (f) uuritavates tüvedes.

Tüvi	Nälgiv kultuur			Kasvav kultuur
	Kogu nälgimise periood (3-10. päev)	Nälgimise varane periood (3-5. päev)	Nälgimise hiline periood (8-10. päev)	
PaW85	3,1 ^a	2,5	3,4	1,4
PaWUvrA	3,2	2,2	5,0	0,35
PaWMutS	98	103	100	80
PaWUvrD	53	33	62	15
PaWMutSUvrA	1248	626	1585	670
PaWMutSUvrD	653	477	475	653
PaWUvrAUvrD	15,4	9,4	22,5	10,4

^a Phe⁺ revertante 10⁹ elusraku kohta

6. UvrD helikaasi osalus MMR-is ja NER-is

Eelnevatest tulemustest selgus, et MMR on võimeline *P. putida* rakkudes ka UvrD helikaasi puudumisel funktsioneerima. Seni avaldatud artiklites ei ole analoogset olukorda kirjeldatud. Sellest tulenevalt tegime järgnevalt kindlaks, millisel määral on UvrD helikaas MMR-i toimumiseks vajalik ning kas ka NER süsteemis on UvrD helikaas asendatav.

6.1. UvrD helikaasi osalus MMR-is

Selleks, et selgitada välja, millisel määral on UvrD helikaas MMR-is vajalik, konstrueerisime UvrA ja UvrD suhtes topeltdefektse *P. putida* tüve PaWUvrAUvrD ning võrdlesime omavahel tüvede PaWUvrAUvrD ja PaWUvrA Phe⁺ revertantide tekkesagedusi. UvrA puudumisel *P. putida* rakkudes on meil võimalik vaadelda UvrD osalust konkreetselt MMR-is. Juhul, kui tüvedes PaWUvrA ja PaWUvrAUvrD on Phe⁺ revertantide tekkesagedused võrreldavad, siis ei ole MMR toimumiseks UvrD helikaasi ei vaja. Joonisel 15 ja tabelis 6 on näha, et tüves PaWUvrAUvrD tekkis kasvavas populatsioonis Phe⁺ revertante kolmkümmend korda rohkem kui tüves PaWUvrA. Kuna UvrD puudumine lisaks NER süsteemi defektsusele põhjustas ~30-kordse

mutatsioonisageduse tõusu, siis võime öelda, et UvrD helikaas osaleb mingil määral *P. putida* kasvavates rakkudes MMR süsteemis.

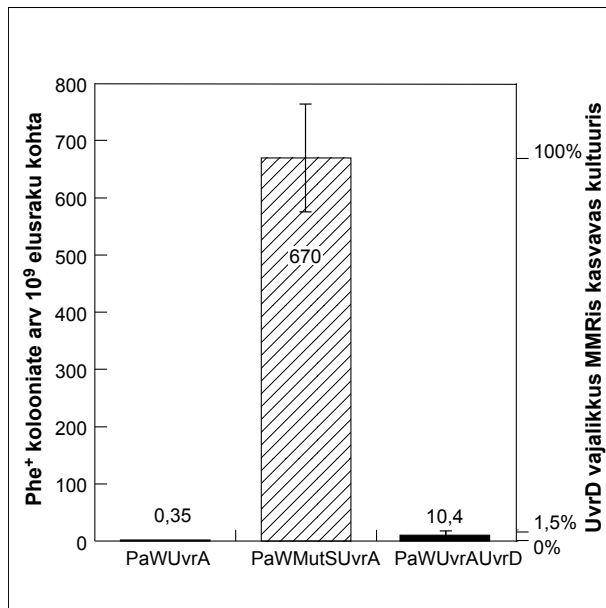
Täpsemalt oli võimalik teha kindlaks, millisel määral on UvrD MMR süsteemi funktsioneerimisele vajalik tüvede PaWUvrAUvrD ja PaWMutSUvrA Phe⁺ revertantide tekkesageduste omavahelisel võrdlemisel. Juhul, kui MMR-i toimumiseks on vajalik peamiselt UvrD helikaas, peaks MMR-i ja NER-i topeltdefektses tüves PaWMutSUvrA ning tüves PaWUvrAUvrD tekkima Phe⁺ revertante võrreldava sagedusega. Joonisel 15 on näha, et tüves PaWUvrAUvrD oli Phe⁺ revertantide tekkesagedus ligikaudu 65 korda madalam kui tüves PaWMutSUvrA. Järelikult ei ole UvrD helikaasi osalus MMR-i toimumiseks *P. putida* kasvavates rakkudes vajalik ning UvrD funktsiooni täidab selles reparatsioonisüsteemis efektiivselt mõni teine helikaas.

UvrD osalust MMR-is on võimalik hinnata ka arvuliselt. Selleks, et näha UvrD helikaasi osalust ainult MMR-is võrdlesime Phe⁺ revertantide tekkesagedusi NER defektsetes tüvedes. Tüves PaWUvrA on defektne ainult NER, MMR-i toimumist UvrA defektsus ei mõjuta. Kui tüvedes PaWUvrAUvrD ja PaWUvrA oleks Phe⁺ revertantide tekkesagedus võrreldav, siis oleks UvrD osalus MMR-is 0%. *P. putida* tüves PaWMutSUvrA on lisaks NER-ile 100% defektne ka MMR. Juhul, kui Phe⁺ revertantide tekkesagedused tüvedes PaWMutSUvrA ja PaWUvrAUvrD oleksid võrreldavad, oleks UvrD 100% vajalik MMR-i toimumiseks. Olles määranud kindlaks UvrD MMR-is osalemise skaala ülemise ja alumise piiri ning teades tüve PaWUvrAUvrD Phe⁺ revertantide tekkesagedust, on võimalik leida mitme protsendi ulatuses on UvrD MMR-i funktsioneerimiseks vajalik. Eelneva arutluskäigu põhjal tuletasime UvrD helikaasi vajalikkuse arvutamiseks MMR-is valemi 2.

$$\frac{(f_{\text{PaWUvrAUvrD}} - f_{\text{PaWUvrA}})}{(f_{\text{PaWMutSUvrA}} - f_{\text{PaWUvrA}})} \times 100 \quad (2)$$

f – Phe⁺ revertantide tekkesagedus

Järgnevalt leidsime valemi 2 abil UvrD helikaasi vajalikkuse MMR-is. Kasvavas populatsioonis tekkis tüves PaWUvrA keskmiselt 0,35 ning tüves PaWMutSUvrA 670 Phe⁺ revertanti 10⁹ elusraku kohta (Joonis 15, tabel 6). Tüves PaWUvrAUvrD oli keskmine Phe⁺ revertantide tekkesagedus 10,4 10⁹ elusraku kohta. *P. putida* kasvava kultuuri rakkudes saime UvrD vajalikkuseks MMR-is 1,5%.

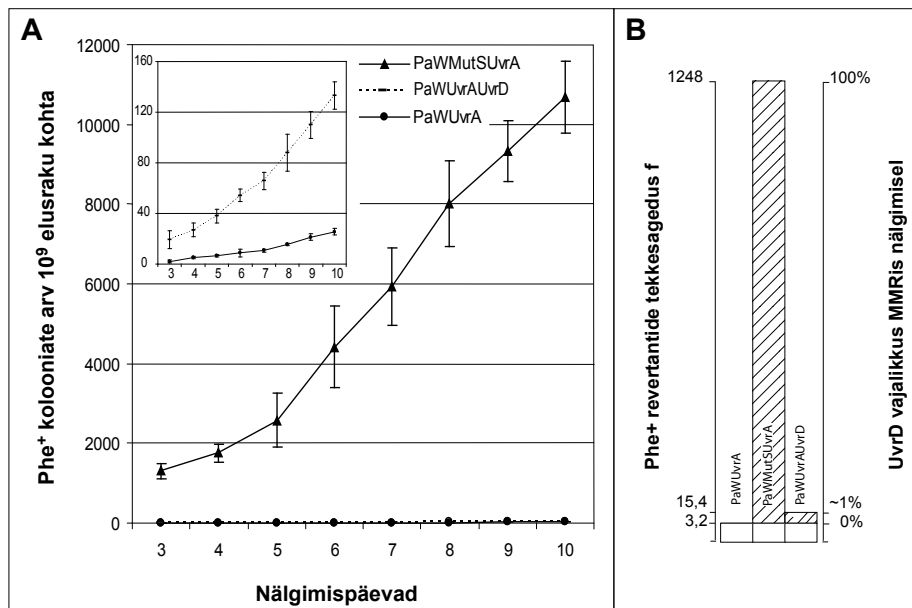


Joonis 15. UvrD osalus MMR süsteemis kasvates *P. putida* rakkudes.

Teisel katsepäeval asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide arvukus tüvedes PaWUvrA, PaWMutSUvrA ja PaWUvrAUvrD. Joonisel on esitatud vähemalt 60 sõltumatu katse aritmeetiline keskmine ning standardviga. UvrD vajalikkus MMR süsteemis on leitud valemi 2 abil keskmise Phe⁺ revertantide tekkesagedus järgi.

Selleks, et selgitada välja, kui suurel määral osaleb UvrD helikaas MMR süsteemis *P. putida* nälgivates rakkudes, võrdlesime nälgimisperioodil keskmiselt tekkinud Phe⁺ revertantide sagedusi NER defektsetes tüvedes PaWUvrA, PaWUvrAUvrD ning MMR ja NER topeltdefektsetes tüves PaWMutSUvrA. Tüves PaWUvrAUvrD oli keskmine Phe⁺ revertantide tekkesagedus ligikaudu viis korda kõrgem kui tüves PaWUvrA ja ligikaudu 80 korda madalam kui tüves PaWMutSUvrA (Joonis 16, tabel 6). Arvutades lk 50 toodud valemi 2 abil, mil määral on UvrD vajalik MMR-il, selgus, et UvrD on nälgivas populatsioonis MMR-i toimumiseks vajalik vaid ~1% ulatuses.

MMR süsteem on nii kasvavates kui ka nälgivates *P. putida* rakkudes võimeline funktsioneerima ka UvrD puudumisel ning ilmselt on UvrD MMR süsteemis asendatav mõne teise helikaasi poolt.



Joonis 16. UvrD osalus MMR süsteemis nälgivates *P. putida* rakkudes.

A. Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon tüvedes PaWUvrA, PaWUvrAUvrD ja PaWMutSUvrA. Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvutatud 1 x 10⁹ elusraku raku kohta. Joonisel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

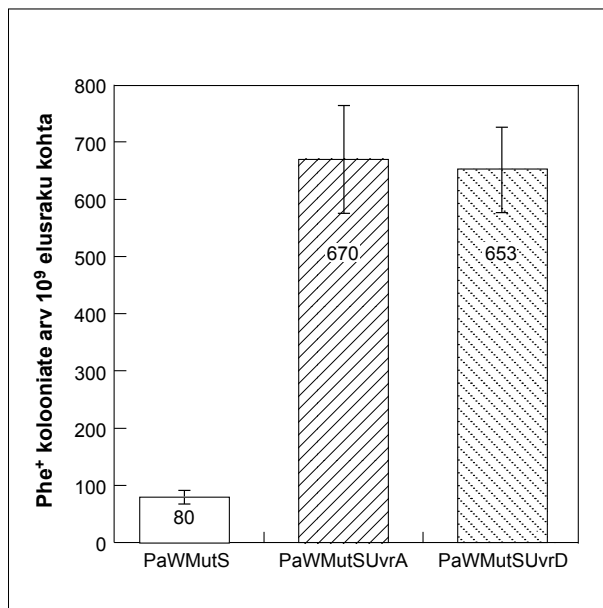
B. Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide tekkesagedus f tüvedes PaWUvrA, PaWUvrAUvrD ja PaWMutSUvrA. UvrD vajalikkus MMR süsteemis on leitud valemi 2 abil keskmise Phe⁺ revertantide tekkesagedus järgi.

6.2 UvrD helikaasi osalus NER-is

Selleks, et uurida UvrD helikaasi vajalikkust NER süsteemis, konstrueerisime MutS ja UvrD topeltdefektse tüve PaWMutSUvrD, milles täielikult puudub MMR. Eelnevalt näitasime, et MutS defektses tüves eemaldab valepaardumisi NER süsteem ning juhul, kui võrrelda tüvede PaWMutS ja PaWMutSUvrD Phe⁺ revertantide tekkesagedusi, on võimalik hinnata, kas UvrD funktsioneerib NER süsteemis. Juhul, kui UvrD osaleb kasvavates *P. putida* rakkudes NER süsteemis, siis peaks Phe⁺ revertantide teke tüves PaWMutSUvrD olema kõrgem PaWMutS-st. Tõepoolest tõusis tüves PaWMutSUvrD, Phe⁺ revertantide tekkesagedus võrreldes PaWMutS tüvega 8 korda (Joonis 17), järelikult osaleb UvrD helikaas *P. putida* kasvavates rakkudes NER-is.

Selleks, et selgitada välja, kui suures osas on UvrD helikaas NER-is vajalik, võrdlesime Phe⁺ revertantide tekkesagedust tüvedes PaWMutSUvrD ja PaWMutSUvrA. Juhul, kui

UvrD oleks NER süsteemis absoluutselt vajalik helikaas, siis peaks nendes tüvedes tekkima Phe⁺ revertante võrreldavalt. Joonisel 17 on näha, et tüvedes PaWMutSUvrD ja PaWMutSUvrA tekkis teise päeva Phe⁺ revertante võrreldavalt ($P = 0,9$), järelikult põhjustas UvrD puudumine tüves PaWMutSUvrD NER defektsuse.



Joonis 17. UvrD osalus NER süsteemis kasvavates *P. putida* rakkudes.

Teisel katse päeval asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide arvukus tüvedes PaWMutS, PaWMutSUvrD ja PaWMutSUvrA. Joonisel on esitatud vähemalt 60 sõltumatu katse aritmeetiline keskmine ning standardviga. Statistiliselt Phe⁺ revertantide tekkesagedus tüvedes PaWMutSUvrA ja PaWMutSUvrD sarnane ($P = 0,9$). P-väärtused on leitud Mann-Whitney testi abil (Sokal ja Rohlf, 1981). Arvutuste tegemisel on kasutatud statistikaprogrammi Statgraphics Plus.

Selleks, et selgitada välja, kas UvrD helikaas on ka *P. putida* nälgivates rakkudes NER-is vajalik, võrdlesime Phe⁺ revertantide tekkesagedust tüvedes PaWMutSUvrD, PaWMutS ja PaWMutSUvrA. Tüves PaWMutSUvrD tekkis Phe⁺ revertante kogu nälgimise jooksul 4-5 korda rohkem võrreldes tüvega PaWMutS (Joonis 18A, tabel 6). Samas võrreldes tüvega PaWMutSUvrA, milles ei tööta ei NER ega MMR, tekkis MutSUvrD topeltdefektsetes tüves kolmandast kuni viienda nälgimispäevani vaid 1,3 korda vähem Phe⁺ revertante. Alates kuuendast nälgimispäevast tekkis tüves PaWMutSUvrD võrreldes tüvega PaWMutSUvrA kolm korda vähem Phe⁺ revertante. Saadud tulemused näitavad, et nälgimise varasel perioodil on UvrD NER süsteemis peamiseks helikaasiks, kuid

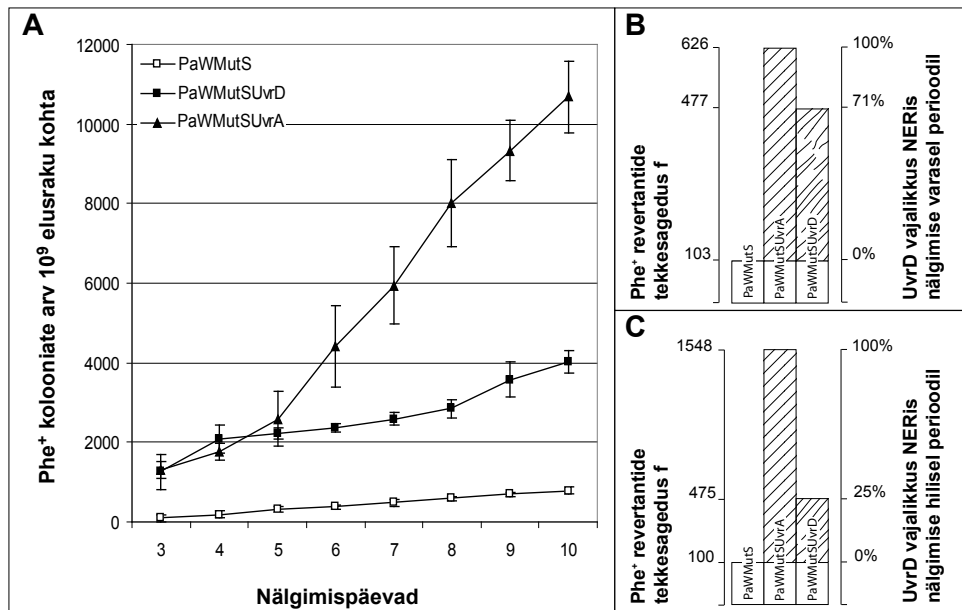
näljatingimuste süvenedes võib UvrD helikaasi funktsiooni NER süsteemis üle võtta mõni teine helikaas.

Selleks, et kindlaks teha, mitme protsendi ulatuses on UvrD helikaas nälgivates *P. putida* rakkudes NER-is vajalik, võrdlesime Phe⁺ revertantide tekkesagedusi MMR defektsetes tüvedes. Juhul, kui UvrD puudumisel oleks Phe⁺ revertantide arvukus tüvedes PaWMutSUvrD ja PaWMutS võrreldav, siis puuduks UvrD helikaasil mõju NER-i toimumisele, UvrD vajalikkus NER-is oleks seega 0%. *P. putida* tüves PaWMutSUvrA puuduvad nii MMR kui ka NER. Kui tüvedes PaWMutSUvrA ja PaWMutSUvrD, milles puudub lisaks MMR süsteemile UvrD, tekiks Phe⁺ revertante võrreldavalt, siis põhjustaks UvrD puudumine *P. putida* rakkudes täieliku NER süsteemi defektsuse. Sellisel juhul oleks UvrD NER-is 100% vajalik helikaas. Eelneva arutluskäigu põhjal tuletasime UvrD vajalikkuse leidmiseks NER-is valemi 3.

$$\frac{(f_{\text{PaWMutSUvrD}} - f_{\text{PaWMutS}})}{(f_{\text{PaWMutSUvrA}} - f_{\text{PaWMutS}})} \times 100 \quad (3)$$

f – Phe⁺ revertantide tekkesagedus

Eelnevalt selgus, et UvrD helikaasi osalus NER-is on nälgimise varasel ja hilisel perioodil erinev. Seega leidsime ka UvrD vajalikkuse protsendi NER-is eraldi mõlema perioodi kohta. Tüvedes PaWMutSUvrD ja PaWMutS tekkis vastavalt 475 ja 100 Phe⁺ revertanti päevas 10⁹ elusraku kohta, seda nii varasel kui ka hilisel nälgimisperioodil (Tabel 6, joonised 18B ja 18C). Tüves PaWMutSUvrA oli Phe⁺ revertantide tekkesagedus nälgimise varasel perioodil 626 ning hilisel perioodil 1585 Phe⁺ revertanti 10⁹ elusraku kohta. Valemi 3 järgi leidsime, et UvrD puudumine põhjustas varasel nälgimise perioodil 71% ning hilisel nälgimise perioodil 25% languse NER-i töö efektiivsuses (Joonised 18B ja 18C). Tulemused viitavad sellele, et nälgimise süvenedes muutub UvrD helikaas NER süsteemis asendatavaks. UvrD vajalikkus NER-is väheneb *P. putida* rakkude pikemal viibimisel süsinikunälja tingimustes.



Joonis 18. UvrD osalus NER süsteemis nälgivates *P. putida* rakkudes.

A. Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon tüvedes PaWMutS, PaWMutSUvrD ja PaWMutSUvrA. Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvatud 1×10^9 elusraku raku kohta. Joonistel on esitatud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

B. Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide tekkesagedus f tüvedes PaWMutS, PaWMutSUvrD ja PaWMutSUvrA nälgimise varasel perioodil (3.-5. päev). UvrD vajalikkuse NER süsteemis on leitud valemi 3 abil perioodi keskmise Phe⁺ revertantide tekkesagedus järgi.

C. Asendusmutatsioonide tagajärjel tekkinud Phe⁺ revertantide tekkesagedus f tüvedes PaWMutS, PaWMutSUvrD ja PaWMutSUvrA nälgimise hilisel perioodil (8.-10. päev). UvrD vajalikkuse NER süsteemis on leitud valemi 3 abil perioodi keskmise Phe⁺ revertantide tekkesagedus järgi.

Arutelu

Looduslikus elukeskkonnas puutuvad bakterid kokku paljude DNA-d kahjustavate teguritega. Erinevad kiirgused, kemikaalid ja ka raku metabolismi poolt tekitatud oksüdatiivsed kahjustused võivad põhjustada mutatsioonide tekkesageduse suurenemist. NER on üks peamistest UV-kiirguse poolt põhjustatud kahjustuste eemaldamises osalevatest reparatsioonisüsteemidest bakterirakkudes. Näitasime, et NER-i ensüümide puudumine *Pseudomonas putidas* muutis rakud UV-kiirguse suhtes ~35 korda tundlikumaks võrreldes algse tüvega. Sarnast NER-i puudumisest tingitud UV-elumuse langust on täheldatud ka mitmetes teistes bakteriliikides, näiteks *E. colis*, *Streptococcus pneumoniaes*, *Mycobacterium tuberculosis* ja *Shewanella oneidensis* (Tang ja Ross, 1985; Sicard jt., 1992; Qiu jt. 2004; Darwin ja Nathan, 2005). Huvitav on aga see, et *P. putida* algne tüvi oli UV-tundlikum võrreldes mitmete teiste bakteriliikidega. Kui *P. putidas* jäi UV-kiiritamise järgselt ellu vaid 0,011% rakkudest, siis samades tingimustes (UV-C 50 J/m²) jäi *E. colis* ellu 100 korda enam rakke, ligikaudu 1% (Friedberg jt., 1995). Mis võiks olla *P. putida* rakkude suurema UV-tundlikkuse põhjuseks võrreldes *E. coliga*? *E. coli* rakkudes on näidatud, et UV-kiirguse poolt põhjustatud DNA kahjustusi suudab eemaldada või selliste DNA kahjustuste korral replikatsiooni jätkata neli erinevat süsteemi. Nendeks on NER, fotolüaas, rekombinatsiooniline reparatsioon ja DNA polümeraas V-st sõltuv vigutegev DNA süntees. Kuna *P. putida* kromosoomist ei ole leitud DNA polümeraasi V homologit, siis võib selle puudumine olla üheks *P. putida* UV-tundlikkuse põhjuseks. Samas on kindlaks tehtud, et ligikaudu 1/3 erinevate looduslike *Pseudomonas* hulgast levivatest plasmiididest kannab UV-resistentsust andvaid, ilmselt DNA polümeraasi V homologit kodeerivaid geene (Simonson jt., 1990; Jacoby jt., 1983). Näiteks TOL plasmiidis paiknev DNA polümeraasi V homologit kodeeriv *rulAB* operon tõstab *P. putida* rakkudes UV-kiiritamise järgselt rakkude elumust võrreldes algse tüvega ~10 korda (Tark jt., 2005). Seega võivad osad *P. putida* looduslikud tüved taluda UV-kiirgust paremini võrreldes meie kasutatud laboritüvega, mis ei sisalda DNA polümeraasi V homologit kodeerivaid geene. Samuti võib perekonna *Pseudomonas* baktereid UV-tundlikumaks muuta ka fotolüaasi vähene aktiivsus. *E. coli* fotolüaasi suhtes defektsetes rakkudes jäi UV-B kiirguse juures 25 J/m² ellu vaid 0,0001% rakkudest, samas *P. aeruginosa* ja *P. syringae* fotolüaasi suhtes defektsed tüved talusid ka 60 korda kõrgemat UV-B doosi. Isegi 1500 J/m² juures jäi *P. aeruginosa* ja *P. syringae* fotolüaasi suhtes defektsetes tüvedes ellu ~1% rakkudest

(Kim ja Sundin, 2001). Rekombinatsioonilise reparatsiooni osalust UV-kiirguse poolt põhjustatud DNA kahjustuste eemaldamisel ei ole uuritud ei *E. coli* ega *Pseudomonase* perekonna rakkudes. Teada on vaid, et RecA defektsuse korral ei olnud *E. coli* ega ka *P. aeruginosa* peale rakkude eksponeerimist UV-kiirgusele doosiga 50 J/m² võimalik detekteerida elusrakke (McBeth, 1990; Lovett jt., 1988).

E. coli puhul on kirjeldatud, et NER-i ülesandeks on eemaldada DNA ahelast erinevaid DNA ahela konformatsiooni muutvaid kahjustusi, sealhulgas ka valepaardumisi. NER-i mõju uurimisel leidsime, et *P. putida* UvrA defektses tüves langes vastupidiselt oodatule kasvavas kultuuris asendusmutatsioonide tagajärjel tekkivate Phe⁺ revertantide sagedus võrreldes algse tüvega neli korda. Ilmselt ei näita see, et kasvavates *P. putida* rakkudes DNA kahjustusi, mille parandamisel NER on oluline, ei teki, vaid et vead, mis tekivad, parandatakse teiste reparatsioonisüsteemide poolt ära. Sellele, miks UvrA olemasolul tekkis rohkem mutatsioone võrreldes algse tüvega, on kaks võimalikku seletust. Esiteks, kuna NER-is eemaldatakse koos DNA kahjustusega, 12-13 nukleotiidi pikkune DNA fragment, siis selle täissünteesimisel DNA polümeraaside I või II poolt, võivad potentsiaalselt tekkida DNA ahelasse vead (Van Houten jt., 2005). Samuti võivad UvrBC endonukleaasikompleksi poolt DNA ahelasse tehtud üheaahelalise DNA katked olla substraadiks vigutegevatele DNA polümeraasidele ning initsieerida rekombinatsiooni.

NER-i osalust nälgivates bakterirakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides on uurinud vaid kaks töögruppi. Saadud tulemused on vastandlikud. Ühel juhul leiti, et *E. coli* NER defektsetes tüvedes tõusis trüptofaanil nälgides trp⁺ revertantide arvukus võrreldes algse tüvega 10²-10³ korda (Hall, 1995). Teisel juhul ei mõjutanud NER-i puudumine nälgivates *E. coli* rakkudes mutatsioonide teket (Bridges, 1998). Meie näitasime, et nälgivates *P. putida* rakkudes ei põhjustanud UvrA defektsus Phe⁺ revertantide tekkesageduse muutust võrreldes algse tüvega. See, et UvrA defektsuse korral mutatsioonide tekkesagedus ei muutunud, võis olla põhjustatud sellest, et tekkinud DNA valepaardumised eemaldati NER-i puudumisel teiste reparatsioonisüsteemide poolt. Tõepoolest, juhul, kui *P. putida* rakkudes olid defektsed nii NER kui ka MMR suurenes mutatsioonisagedus võrreldes ainult MMR-i suhtes defektse tüvega 15 korda. See näitab, et NER osaleb nälgivates bakterirakkudes DNA reparatsioonil ja mõlemad reparatsioonisüsteemid on võimelised üksteist komplementeerima. See, et UvrA defektses tüves ei suurenenud asendusmutatsioonide tekkesagedus võrreldes algse tüvega, kuid MutS defektsuse korral suurenes see ~30 korda, näitab, et MMR-i tase

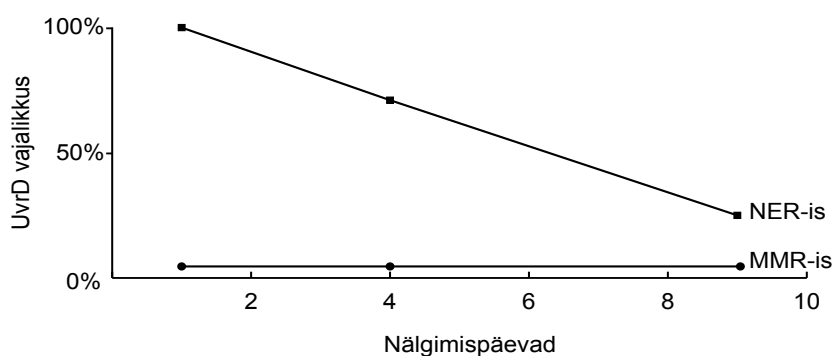
nälgivates rakkudes on piisav, et hoida mutatsioonisagedust NER-i puudumise korral algse tüvega võrreldaval tasemel. Samuti viitab see sellele, et MMR eemaldab võrreldes NER-iga efektiivsemalt replikatsioonil tekkivaid vigu.

Süsinikunälja tingimustes, kus DNA replikatsiooni tase peaks olema rakkudes oluliselt langenud, kuid sellest hoolimata tekib populatsioonis pidevalt juurde uusi mutante, peaks mutatsioonisagedus olema suurenenud kas replikatsiooni täpsuse langusest või reparatsioonisüsteemide alatalitlusest. On näidatud, et stressitingimustes tõuseb *E. coli* rakkudes vigutegevate DNA polümeraaside ekspressioon (Bhamre jt., 2001; McKenzie jt., 2001). Samuti langeb näljatingimustes MMR süsteemi efektiivsus (Feng jt., 1996; Harris jt., 1997). Meie tulemused näitavad, et *P. putida* puhul parandavad nii NER kui ka MMR DNA-s tekkinud vigu ning nende reparatsioonisüsteemide efektiivsus bakteripopulatsiooni nälgimisel ei lange.

Nii NER kui ka MMR vajavad DNA kahjustuse eemaldamiseks helikaasi. *E. coli* rakkudes osaleb mõlemas reparatsioonisüsteemis UvrD helikaas. Meie katsed viitavad sellele, et UvrD helikaas osaleb MMR-is vaid 1% ulatuses. Seega on ilmne, et MMR kasutab *P. putida* rakkudes lisaks UvrD helikaasile ka mõnda teist helikaasi. Analüüsides UvrD osalust NER-is leidsime, et erinevalt MMR-ist, kus UvrD oli peaaegu täielikult asendatav, osutus UvrD helikaas NER-is vajalikuks. Leidsime, et UvrD osalus NER-is sõltus sellest, kui kaua oli bakteripopulatsioon viibinud süsinikunälja tingimustes. Kasvava kultuuri rakkudes osutus UvrD helikaas NER-i toimumiseks hädavajalikuks (Joonis 19), kuid juba peale paari päeva viibimist süsinikunälja tingimustes oli NER võimeline funktsioneerima ka UvrD puudumisel. Nälgimise varasel perioodil, 3.-5. katsepäevani, oli UvrD NER-i toimumiseks vajalik 71% ulatuses, kuid nälgimise hilisel perioodil vaid 25% ulatuses. Seega meie tulemused näitasid, et nii MMR kui ka NER kasutavad *P. putida* rakkudes lisaks UvrD helikaasile veel mõnda teist helikaasi. Tekib küsimus, kuidas võiks olla reguleeritud DNA kahjustust sisaldavat fragmenti eemaldavate helikaaside osalus NER-is?

- 1) On võimalik, et UvrD valgu hulk *P. putida* rakkudes süsinikunälja tingimustes langeb;
- 2) Mõne teise NER-is osaleva DNA helikaasi hulk võib näljatingimustes suureneada, ning asendada NER-is UvrD helikaasi;

3) *E. coli* puhul on näidatud, et NER-is osaleb UvrB UvrD helikaasi DNA ahelale laadimisel (Ahn, 2000). Ilmselt on helikaasi interaktsioon UvrB valguga vajalik ka *P. putida* rakkudes. Võimalik, et näljatingimustes toimuvad muutused UvrB:DNA kompleksi konformatsioonis, mille tõttu on NER süsteem mõne teise helikaasi suhtes afiinsem kui UvrD suhtes.



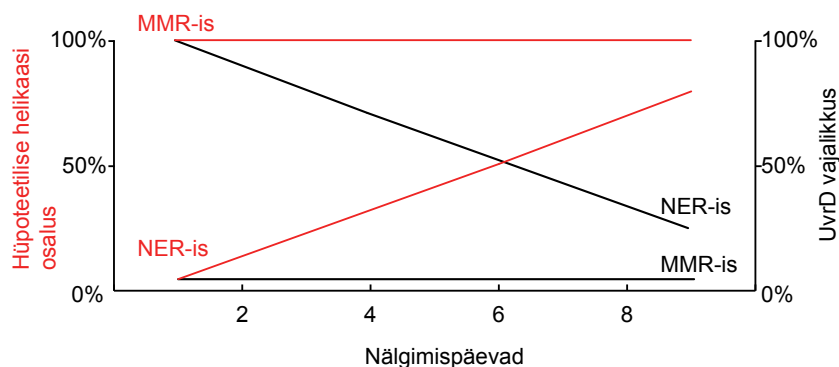
Joonis 19. UvrD vajalikkus NER-is ja MMR-is *P. putida* rakkude pikemaajalisel nälgimisel.

Kuigi *E. coli* rakkudes on lisaks UvrD helikaasile veel üks UvrD/Rep perekonna helikaas, ei osale UvrD valguga 40% ulatuses identne Rep helikaas ei NER-is ega ka MMR-is (Yamaguchi jt., 1998; Orren jt., 1992). Rep helikaasi ja UvrD rollid ja mehhanism rakus arvatakse olevat üksteisest erinevad. UvrD on seotud rekombinatsiooni- ja reparatsiooniprotsessidega ning Rep osaleb ilmselt replikatsioonil (Veaute jt., 2005). *Bacillus subtilise* genoomis kodeeritakse vaid ühte UvrD/Rep perekonna helikaasi PcrA, mis võiks täita rakus nii Rep kui ka UvrD helikaasi funktsiooni. Kuna *B. subtilise* rakkudele on PcrA defektsus letaalne, siis ei ole PcrA osalust MMR-is ja NER-is *B. subtilise* rakkudes uuritud (Petit jt., 1998).

Analüüsid *P. putida* genoomi UvrD/Rep perekonna helikaaside suhtes leidsime lisaks UvrD ja Rep helikaasi kodeerivatele geenidele kolmanda, hüpoteetilise helikaasi kodeeriva ORFi PP3681. See hüpoteetiline helikaas on UvrD ja Rep helikaasiga vastavalt 46,2% ja 42% sarnane ning fülogeneesi analüüsi järgi võiks see olla Rep ja UvrD helikaasi ühiseks eellaseks. Ennustasime nende kolme helikaasi struktuuri programmi ModBase [<http://salilab.org/modbase> (Pieper jt., 2004)] abil ning leidsime, et nii UvrD

kui ka hüpoteetiline helikaas PP3681 võiksid rakkudes olla *Bacillus stearothermophiluse* helikaas PcrA-ga sarnase struktuuriga. *P. putida* Rep helikaasi oletatav struktuur sarnanes aga kõige enam *E. coli* Rep helikaasi struktuurile. Seega võib hüpoteetiline helikaas PP3681 olla *P. putida* rakkudes UvrD homoloog või sarnaselt *B. subtilise* PcrA-ga omada Rep ja UvrD helikaaside funktsioone.

ORFi PP3681 sarnane hüpoteetiline helikaasi kodeeriv geen on olemas ka kõigi teiste tänaseks sekveneeritud perekonna *Pseudomonas* liikide genoomides välja arvatud *P. aeruginosa* genoomis. Kuna *P. aeruginosa* rakkudes põhjustab UvrD puudumine MMR süsteemi defektsuse (Oliver jt., 2002), siis võib *P. putida* rakkudes suure tõenäosusega osaleda MMR-is ja NER-s just ORF PP3681 poolt kodeeritud hüpoteetiline helikaas (Joonis 20). See, milline *P. putida* helikaas tegelikkuses MMR-is ja NER-is lisaks UvrD helikaasile osaleb, vajab lisauuringuid.



Joonis 20. Hüpoteetiline skeem sellest, kuidas võiksid *P. putida* rakkudes MMR-is ja NER-is osaleda kaks erinevat helikaasi.

Musta joonega on tähistatud tulemuste põhjal arvatatud UvrD helikaasi osalus nii NER-is kui ka MMR is. Punane joon näitab ORF-i PP3681 poolt kodeeritud hüpoteetilise helikaasi võimalikku osalust nendes reparatsioonisüsteemides.

Kokkuvõte

DNA reparatsioonisüsteemidel on oluline roll DNA kahjustuste ja replikatsioonivigade tõttu tekkivate mutatsioonide ära hoidmisel, mille tulemusena tagatakse genoomi stabiilsus.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaates kirjeldasin kahte peamist DNA reparatsioonisüsteemi - nukleotiidi väljalõike reparatsiooni (NER) ja paardumisvigade reparatsiooni (MMR) ning andsin ülevaate nälgivates rakkudes toimuvatest mutatsiooniprotsessidest.

Töö praktilises osas uurisin NER-i ja MMR-i osalust *Pseudomonas putida* kasvavates ja nälgivates rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides. Samuti selgitasin välja, millisel määral on NER ja MMR võimelised DNA kahjustuste eemaldamisel üksteise funktsioone *P. putida* rakkudes komplementeerima. Katsetest erinevate MMR-i ja NER-i defektsete *P. putida* tüvedega selgus, et erinevalt *E. colist* oli UvrD helikaas *P. putida* rakkudes mõlemas reparatsioonisüsteemis asendatav. Sellest tulenevalt uurisin oma töös ka seda, millisel määral on UvrD helikaas ühes või teises reparatsioonisüsteemis asendatav.

Töö tulemused võime kokku võtta järgnevalt:

- 1) NER on *P. putida* rakkudes vajalik UV-kiirguse poolt põhjustatud DNA kahjustuste eemaldamiseks;
- 2) Nii NER kui ka MMR eemaldavad DNA kahjustusi kasvavas ja nälgivas *P. putida* populatsioonis ning on võimelised üksteise funktsioone komplementeerima;
- 3) MMR-i ja ka NER-i efektiivsus nälgimise jooksul ei lange;
- 4) NER-il on rakkudes kahetine roll, ühelt poolt on NER oluline DNA kahjustuste parandamisel, kuid teisalt võib NER-i olemasolu rakkudes põhjustada mutatsioonisageduse tõusu;
- 5) MMR ei vaja *P. putida* rakkudes UvrD helikaasi, kuid UvrD helikaasi osalus NER-is sõltus bakteripopulatsiooni seisundist. Kasvavas populatsioonis ei olnud NER UvrD puudumisel võimeline funktsioneerima, kuid bakteripopulatsiooni pikemajalisel viibimisel süsinikunälja tingimustes oli UvrD funktsiooni võimeline osaliselt komplementeerima mõni teine *P. putida* helikaas.

Summary

DNA repair mechanisms provide genomic stability by correcting various types of DNA damage and replication errors which when left unrepaired may cause mutations.

Literature review of this study describes two major DNA repair mechanisms - nucleotide excision repair (NER) and mismatch repair (MMR) in *E. coli*. Additionally it gives an overview of stationary phase mutations that occur in bacterial populations.

The experimental part of this study demonstrates involvement of NER and MMR in mutational processes in growing and starving *Pseudomonas putida* cells. Furthermore, the ability of these DNA repair mechanisms to complement each other was monitored. Studies of MMR and NER in *P. putida* revealed that UvrD helicase which is crucial in MMR and NER in *E. coli*, was dispensable in these repair-systems in *P. putida*. Therefore the role of UvrD helicase in NER and MMR was also observed.

The results of this study can be summarized as follows:

- 1) NER is major pathway in removal of UV-induced DNA damage in *P. putida* cells;
- 2) NER and MMR correct DNA in growing and starving populations of *P. putida* and these two repair mechanisms are able to complement each other in DNA repair;
- 3) NER and MMR are still functional under conditions of long-term starvation of bacteria and their efficiency does not decline during starvation;
- 4) NER has a dual role in mutagenic process - on one side this repair system removes DNA damage, but on the other side the presence of NER may increase the level of mutation frequency;
- 5) MMR and NER are able to function in the absence of UvrD helicase in *P. putida*. UvrD is almost entirely dispensable in MMR but the displacability of UvrD in NER depends on the condition of bacterial population. UvrD is essential in NER in growing population, but during carbon starvation some other helicase may partially displace the role of UvrD.

Kasutatud kirjandus

- Acharya, S., Foster, P. L., Brooks, P., Fishel, R. (2003).** The coordinated functions of the E. coli MutS and MutL proteins in mismatch repair. *Mol Cell.* 12:233-46.
- Adams, M.H. 1959.** Bacteriophages, pp 445-447. Interscience Publishers Inc. N Y.
- Ahn, B. (2000).** A physical interaction of UvrD with nucleotide excision repair protein UvrB. *Mol Cells.* 10:592-7.
- Allen, D. J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P., Griffith, J. D. (1997).** MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *EMBO J.*16:4467-76.
- Bagdasarian, M. M., Ammann, E., Lurz, R., Ruckert, B., 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., Elsdén, S.R. (1960).** The growth of microorganisms in relation their energy supply. *J of Gen Microbiol.* 23: 469-475.
- Bayley, S.A., Duggleby, C.J., Worsey, M.J., Williams, P.A., Hardy, K.G., Broda, P. (1977).** Two modes of loss of the Tol function from Pseudomonas putida mt-2. *Mol Gen Genet.* 154:203-4.
- Bhamre, S., Gadea, B. B, Koyama, C. A, White, S. J., Fowler, R. G. (2001).** An aerobic recA-, umuC-dependent pathway of spontaneous base-pair substitution mutagenesis in Escherichia coli. *Mutat Res.* 473:229-47.
- Bjedov, I., Tenailon, O., Gérard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F., Matic, I. (2003).** Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science.* 300:1404-1409.
- Bjornson, K. P., Allen, D. J., Modrich, P. (2000).** Modulation of MutS ATP hydrolysis by DNA cofactors. *Biochemistry.* 39:3176-83.
- Bjornson, K. P., Blackwell, L. J., Sage, H., Baitinger, C., Allen, D., Modrich, P. (2003).** Assembly and molecular activities of the MutS tetramer. *J Biol Chem.* 278:34667-73.
- Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol.* 41:459-72.
- Bridges, B. A. (1998).** The role of DNA damage in stationary phase ('adaptive') mutation. *Mutat Res.* 408:1-9.

Bridges, B. A., Sekiguchi, M., Tajiri, T. (1996). Effect of mutY and mutM/fpg-1 mutations on starvation-associated mutation in Escherichia coli: implications for the role of 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Mol Gen Genet.* 251:352-7.

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

Caron, P. R., Kushner, S. R., Grossman, L. (1985). Involvement of helicase II (uvrD gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the uvrABC protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:4925-9.

Claassen, L. A., Grossman, L. (1991). Deletion Mutagenesis of the Escherichia coli UvrA Protein Localizes Domains for DNA Binding, Damage Recognition, and Protein-Protein Interactions *J Biol Chem.* 266:11380-7.

Darwin, K. H., Nathan, C. F. (2005). Role for nucleotide excision repair in virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 73:4581-7.

DellaVecchia, M. J., Croteau, D. L., Skorvaga M., Dezhurov, S. V., Lavrik, O. I., Van Houten, B. (2004). Analyzing the handoff of DNA from UvrA to UvrB utilizing DNA-protein photoaffinity labeling. *J Biol Chem.* 279:45245-56.

Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics.* 148:1667-86.

Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7160-4.

Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M., Modrich, P. (1996). Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:6443-7.

Feng, G., Tsui, H. C. Winkler, M. E. (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.* 178:2388-96.

Fernandez De Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J. J., Ohmori, H., Woodgate, R. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 35:1560-72.

Flores-Rozas, H., Clark, D., Kolodner, R. D. (2000). Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. *Nat Genet.* 26:375-8.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C. ASM Press.

George, J. W., Brosh, R. M. Jr., Matson, S. W. (1994). A dominant negative allele of the Escherichia coli uvrD gene encoding DNA helicase II. A biochemical and genetic characterization. J Mol Biol. 235:424-35.

Goodman, M. F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. Annu Rev Biochem. 71:17-50.

Grossman, L., Thiagalingam, S. (1993). Nucleotide excision repair, a tracking mechanism in search of damage. J Biol Chem. 268:16871-4.

Guarne A, Ramon-Maiques S, Wolff EM, Ghirlando R, Hu X, Miller JH, Yang W. (2004). Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. EMBO J. 23:4134-45.

Gunasekera, T. S., Sundin, G. W. (2006). Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of Pseudomonas syringae pv. syringae B728a. J Appl Microbiol. 100:1073-83.

Hall, B. G. (1995). Genetics of selection-induced mutations: I. uvrA, uvrB, uvrC, and uvrD are selection-induced specific mutator loci. J Mol Evol. 40:86-93.

Hall, M. C., Matson, S. W. (1999). The Escherichia coli MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. J Biol Chem. 274:1306-12.

Harris, R. S., Feng, G., Ross, K. J., Sidhu, R., Thulin, C., Longerich, S., Szigety, S. K., Hastings, P. J., Winkler, M. E., Rosenberg, S. M. (1999). Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation. Mutat Res. 437:51-60.

Harris, R. S., Feng, G., Ross, K. J., Sidhu, R., Thulin, C., Longerich, S., Szigety, S. K., Winkler, M. E., Rosenberg, S. M. (1997). Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation. Genes Dev. 11:2426-37.

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

Hsieh, P. (2001). Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. Mutat Res. 486:71-87.

Hsu, D. S., Kim, S. T., Sun, Q., Sancar, A. (1995). Structure and function of the UvrB protein. J Biol Chem. 270:8319-27.

- Hughes, D., Andersson, D. I. (1997).** Carbon starvation of *Salmonella typhimurium* does not cause a general increase of mutation rates. *J Bacteriol.* 179:6688-91.
- Jacoby, G. A., Sutton, L., Knobel, L., Mammen, P. (1983).** Properties of IncP-2 plasmids of *Pseudomonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 24:168-75.
- Jiricny, J. (2006).** The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:335-46.
- Jiricny, J. (2000).** Mismatch repair: The praying hands of fidelity. *Curr Biol.* 10:R788-90.
- Joshi, A., Rao, B. J. (2002).** ATP hydrolysis induces expansion of MutS contacts on heteroduplex: a case for MutS treadmill? *Biochemistry.* 41:3654-66.
- Kasak, L., Hōrak, 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.* 94:3134-9.
- Kim, J. J., Sundin, G. W. (2001).** Construction and analysis of photolyase mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*: contribution of photoreactivation, nucleotide excision repair, and mutagenic DNA repair to cell survival and mutability following exposure to UV-B radiation. *Appl Environ Microbiol.* 67:1405-11.
- Kim, S. R., 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.* 266:207-15.
- Kivisaar, M. (2003).** Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environ. Microbiol.* 5:814-827.
- Kivisaar, M. 2004.** *Pseudomonas* Volume I. Genomics, Life Style and Molecular Architecture. Kluwer Academic/Plenum Publishers, p.261-316.
- Kunkel, T. A., Erie, D. A. (2005).** DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem.* 74:681-710.
- Kurusu, Y., Narita, T., Suzuki, M., Watanabe, T. (2000).** Genetic analysis of an incomplete *mutS* gene from *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 182:5278-9.
- Lacks, S. A., Dunn, J. J., Greenberg, B. (1982).** Identification of base mismatches recognized by the heteroduplex-DNA-repair system of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell.* 31:327-36.
- Lamers, M. H., Perrakis, A., Enzlin, J. H., Winterwerp, H. H., de Wind, N., Sixma, T. K. (2000).** The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature.* 407:711-7.

- Lin, C. G., Kovalsky, O., Grossman, L. (1997).** DNA damage-dependent recruitment of nucleotide excision repair and transcription proteins to Escherichia coli inner membranes. *Nucleic Acids Res.* 25:3151-8.
- Lin, J.J., Sancar, A. (1989).** A new mechanism for repairing oxidative damage to DNA: (A)BC excinuclease removes AP sites and thymine glycols from DNA. *Biochemistry.* 28:7979-84.
- 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.*107:91-102.
- Lopez de Saro F. J., Marinus, M. G., Modrich, P., O'donnell, M. (2006).** The beta sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS. *J Biol Chem.* [Epub ahead of print]
- Lopez de Saro F. J., O'Donnell, M (2001).** Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8376-80.
- Lovett, S. T., Luisi-DeLuca, C., Kolodner, R. D. (1988).** The genetic dependence of recombination in recD mutants of Escherichia coli. *Genetics.* 120:37-45.
- Macia, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J. L., Oliver, A. (2005).** Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3382-6.
- Maki, H., Sekiguchi, M. (1992).** MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature.* 355:273-5.
- Marti, T. M., Kunz, C., Fleck, O. (2002).** DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol.* 191:28-41.
- Mazur, S. J., Grossman, L. (1991).** Dimerization of Escherichia coli UvrA and its binding to undamaged and ultraviolet light damaged DNA. *Biochemistry.* 30:4432-43.
- McBeth, D. L. (1990).** The CAM-OCT plasmid enhances UV responses of Pseudomonas aeruginosa recA mutants. *J Bacteriol.* 172:1340–1344.
- McKenzie, G.J., Lee, P. L., Lombardo, M. J., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. (2001).** SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol Cell.* 7:571-9.
- McLenigan, M. P., Kulaeva, O. I., Ennis, D. G., Levine, A. S., Woodgate, R. (1999).** The bacteriophage P1 HumD protein is a functional homolog of the prokaryotic UmuD'-like proteins and facilitates SOS mutagenesis in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 181:7005-13.

- Mechanic, L. E., Frankel, B. A., Matson, S.W. (2000).** Escherichia coli MutL loads DNA helicase II onto DNA. *J Biol Chem.* 275:38337-46.
- Mechanic, L. E., Hall, M. C. Matson, S. W. (1999).** Escherichia coli DNA helicase II is active as a monomer. *J Biol Chem.* 274:12488-98.
- Meier, P., Wackernagel, W. (2005).** Impact of mutS inactivation on foreign DNA acquisition by natural transformation in *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol.* 187:143-54.
- Miller, J.H. 1972.** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Press, N.Y
- Modrich, P. (1987).** DNA mismatch correction. *Annu Rev Biochem.* 56:435-66.
- Modrich, P., Lahue, R. (1996).** Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* 65:101-33.
- Moolenaar, G. F., Herron, M. F., Monaco, V., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Visse, R., Goosen, N. (2000).** The role of ATP binding and hydrolysis by UvrB during nucleotide excision repair. *J Biol Chem.* 275:8044-50.
- Moolenaar, G. F., Uiterkamp, R. S., Zwijnenburg, D. A., Goosen, N. (1998).** The C-terminal region of the Escherichia coli UvrC protein, which is homologous to the C-terminal region of the human ERCC1 protein, is involved in DNA binding and 5'-incision. *Nucleic Acids Res.* 26:462-8.
- Moolenaar, G. F., van Rossum-Fikkert, S., van Kesteren, M., Goosen, N. (2002).** Cho, a second endonuclease involved in Escherichia coli nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:1467-72.
- Natrajan, G., Lamers, M. H., Enzlin, J. H., Winterwerp, H. H., Perrakis, A., Sixma, T. K. (2003).** Structures of Escherichia coli DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res.* 31:4814-21.
- Negishi, K., Loakes, D., Schaaper, R. M. (2002).** Saturation of DNA mismatch repair and error catastrophe by a base analogue in Escherichia coli. *Genetics.* 161:1363-71.
- Oliver, A., Baquero, F., Blazquez, J. (2002).** The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol.* 43:1641-50.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., Blazquez, J. (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 288:1251-4.

Orren, D. K., Selby, C. P., Hearst, J. E., Sancar, A. (1992). Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrBC-DNA complex by helicase II and DNA polymerase I. *J Biol Chem.* 267: 780-8.

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.* 176:7550-7.

Petit, M. A., Dervyn, E., Rose, M., Entian, K. D., McGovern, S., Ehrlich, S. D., Bruand, C. (1998). PcrA is an essential DNA helicase of *Bacillus subtilis* fulfilling functions both in repair and rolling-circle replication. *Mol Microbiol.* 29:261-73.

Pieper, U., Eswar, N., Braberg, H., Madhusudhan, M. S., Davis, F. P., Stuart, A. C., Mirkovic, N., Rossi, A., Marti-Renom, M. A., Fiser, A., Webb, B., Greenblatt, D., Huang, C. C., Ferrin, T. E., Sali, A. (2004). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 32:D217-22.

Qiu, X., Sundin, G. W., Chai, B., Tiedje, J. M. (2004). Survival of *Shewanella oneidensis* MR-1 after UV radiation exposure. *Appl Environ Microbiol.* 70:6435-43.

Reardon, J. T., Sancar, A. (2005). Nucleotide excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 79:183-235.

Rivera, E., Vila, L., Barbe, J. (1997). Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *uvrA* gene is constitutive. *Mutat Res.* 377:149-55.

Rivera, E., Vila, L., Barbe, J. (1996). The *uvrB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is not DNA damage inducible. *J Bacteriol.* 178:5550-4.

Roberts, J., Park, J. S. (2004). Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. *Curr Opin Microbiol.* 7:120-5.

Rosche, W. A., Foster, P. L. (2000). Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods.* 20:4-17.

Rosenberg, S. M., Thulin, C., Harris, R. S. (1998). Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature. *Genetics.* 148:1559-66.

Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 324:163-6.

Saint-Ruf, C., Taddei, F., Matic, I. (2004). Stress and survival of aging *Escherichia coli* *rpoS* colonies. *Genetics.* 168:541-6.

- Saamaa, S., Tarassova, K., Tark, M., Tover, A., Tegova, R., Kivisaar, M. (2006).** Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. *DNA Repair (Amst)*. 5:505-14.
- Schaaper, R. M. (1993).** Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 268:23762-5.
- Schofield, M. J., Brownell, F. E., Nayak, S., Du, C., Kool E. T., Hsieh, P. (2001).** The Phe-X-Glu DNA binding motif of MutS. The role of hydrogen bonding in mismatch recognition. *J Biol Chem*. 76:45505-8.
- Seeberg, E., Steinum, A. L. (1982).** Purification and properties of the *uvrA* protein from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:988-92.
- Selby, C. P., Sancar, A. (1994).** Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline. *Microbiol Rev*. 58:317-29.
- Sharma RC., Schimke RT. (1996).** Preparation of electro-competent *E. coli* using saltfree growth medium. *BioTechniques*. 20:42-44.
- Sicard, N., Oreglia, J., Estevenon, A. M. (1992).** Structure of the gene complementing *uvr-402* in *Streptococcus pneumoniae*: homology with *Escherichia coli uvrB* and the homologous gene in *Micrococcus luteus*. *J Bacteriol*. 174:2412-5.
- Simonson, C. S., Kokjohn, T. A., Miller, R. V. (1990).** Inducible UV repair potential of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Gen Microbiol*. 136:1241-9.
- Skorvaga, M., DellaVecchia, M. J., Croteau, D. L., Theis, K., Truglio, J. J., Mandavilli, B. S., Kisker, C., Van Houten, B. (2004).** Identification of residues within *UvrB* that are important for efficient DNA binding and damage processing. *J Biol Chem*. 279:51574-80.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1981.** *Biometry*. W. H. Freeman. San Fransisco. Calif.
- Taddei, F., Radman, M., Maynard-Smith, J., Toupance, B., Gouyon, P.H., Godelle, B. (1997).** Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature*. 387:700-2.
- Tang, M. S., Ross, L. (1985).** Single-strand breakage of DNA in UV-irradiated *uvrA*, *uvrB*, and *uvrC* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 161:933-8.
- Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Horak, R., Kivisaar, M. (2005).** A DNA polymerase V homologue encoded by TOL plasmid pWW0 confers evolutionary fitness on *Pseudomonas putida* under conditions of environmental stress. *J Bacteriol*. 187:5203-13.
- Tegova, R. (2004).** DNA polümeeraas IV osalus *Pseudomonas putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides Magistritöö geneetika erialal

- Tegova, R., Tover, A., Tarassova, K., Tark, M., Kivisaar, M. (2004).** Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 186:2735-44.
- Theis, K., Chen, P. J., Skorvaga, M., Van Houten, B., Kisker, C. (1999).** Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *EMBO J.* 18:6899-907.
- Van Houten, B., Croteau, D. L., DellaVecchia, M. J., Wang, H., Kisker, C. (2005).** 'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. *Mutat Res.* 577:92-117.
- Van Houten, B., Eisen, J. A., Hanawalt, P. C. (2002).** A cut above: discovery of an alternative excision repair pathway in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:2581-3.
- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Le Cam, E., Matic, I., Fabre, F., Petit, M. A. (2005).** UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 24:180-9.
- Verhoeven, E. E., van Kesteren, M., Moolenaar, G. F., Visse, R., Goosen, N. (2000).** Catalytic sites for 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC. *J Biol Chem.* 275:5120-3.
- Verhoeven, E. E., Wyman, C., Moolenaar, G. F., Goosen, N. (2002).** The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands. *EMBO J.* 21:4196-205.
- Wu, T. H., Marinus, M. G. (1999).** Deletion mutation analysis of the *mutS* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 274:5948-52.
- Yamaguchi, M., Dao, V., Modrich, P. (1998).** MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *J Biol Chem.* 273: 9197-201.
- Yeiser, B., Pepper, E. D., Goodman, M. F., Finkel, S. E. (2002).** SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:8737-41.
- Zou, Y., Liu, T. M., Geacintov, N. E., Van Houten, B. (1995).** Interaction of the UvrABC nuclease system with a DNA duplex containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-BPDE. *Biochemistry.* 34:13582-93.
- Zou, Y., Luo, C., Geacintov, N. E. (2001).** Hierarchy of DNA damage recognition in *Escherichia coli* nucleotide excision repair. *Biochemistry.* 40: 2923-31.

Lisa 1. Signe Saumaa, Kairi Tarassova, Mariliis Tark, Andres Tover, Radi Tegova and Maia Kivisaar: Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. (2006). *DNA Repair (Amst)*. 5:505-14.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair**Brief report**

Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*

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

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

ARTICLE INFO**Article history:**

Received 17 October 2005
Received in revised form 5
December 2005
Accepted 5 December 2005
Published on line 18 January 2006

Keywords:

DNA mismatch repair
Stationary-phase mutagenesis
Long-term starvation of bacteria
Pseudomonas putida

ABSTRACT

One of the popular ideas is that decline in methyl-directed mismatch repair (MMR) in carbon-starved bacteria might facilitate occurrence of stationary-phase mutations. We compared the frequency of accumulation of stationary-phase mutations in carbon-starved *Pseudomonas putida* wild-type and MMR-defective strains and found that knockout of MMR system increased significantly emergence of base substitutions in starving *P. putida*. At the same time, the appearance of 1-bp deletion mutations was less affected by MMR in this bacterium. The spectrum of base substitution mutations which occurred in starving populations of *P. putida* wild-type strain was distinct from mutation spectrum identified in MMR-defective strains. The spectrum of base substitutions differed also in this case when mutants emerged in starved populations of MutS or MutL-defective strains were comparatively analyzed. Based on our results we suppose that other mechanisms than malfunctioning of MMR system in resting cells might be considered to explain the accumulation of stationary-phase mutations in *P. putida*. To further characterize populations of *P. putida* starved on selective plates, we stained bacteria with LIVE/DEAD kit in situ on agar plates. We found that although the overall number of colony forming units (CFU) did not decline in long-term-starved populations, these populations were very heterogeneous on the plates and contained many dead cells. Our results imply that slow growth of subpopulation of cells at the expenses of dead cells on selective plates might be important for the generation of stationary-phase mutations in *P. putida*. Additionally, the different survival patterns of *P. putida* on the same selective plates hint that competitive interactions taking place under conditions of prolonged starvation of microbial populations on semi-solid surfaces might be more complicated than previously assumed.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Due to intense competition for nutrients, bacteria spend the majority of their lives under starvation conditions. Evolution occurs very rapidly in starved populations and takes advantage of different types of mutations. Apparently

* Corresponding author. Tel.: +372 7 375036; fax: +372 7 420286.
E-mail address: maiak@ebc.ee (M. Kivisaar).

static microbial populations under the nonlethal selective pressure accumulate mutations called as adaptive mutations or stationary-phase mutations (reviewed in Refs. [1,2]). In addition to the appearance of mutants able to utilize novel growth substrates, starvation selects mutants with enhanced abilities to scavenge amino acids released from dead cells in bacterial populations (e.g. [3,4]). Cells with growth advantage in stationary-phase (GASP) phenotype either co-exist with the parental majority or displace the parent [3,5]. Foster [1] has pointed out that the rate of mutation under starvation conditions is too high to be accounted for by the amount of DNA synthesis if it is assumed that DNA synthesis in stationary-phase cells involves the whole genome and has an overall error rate similar to that of DNA replication in growing cells. However, some published reports [6,7] have implied that there was considerably more DNA synthesis under the starvation conditions than might have been assumed.

Starvation conditions encountered during stationary-phase incubation may permit a transient increase in the rate of mutation. Transient mutability induced by starvation has been shown in most natural isolates of *Escherichia coli* [8]. Also, results by Loewe et al. [9] suggest a correlation between deleterious mutation rate and the time bacteria spend in the stationary-phase. It is known, for example, that DNA damage, such as the formation of the 7,8-dihydro-8-oxoguanine (GO) can give rise to stationary-phase mutations [6,7,10]. Additionally, error-prone DNA polymerases including the members of DinB/UmuDC superfamily are implicated in stationary-phase mutations [11–15]. It is also possible that methyl-directed mismatch repair (MMR) might be disabled transiently during stationary-phase mutagenesis. This idea, although it has met controversy [16,17], was initially supported by the finding that the mutation spectrum observed in Lac⁺ revertants emerging in a starving *E. coli* population was reproduced by MMR deficiency in growing cells [18]. Subsequent studies [19,20] demonstrated that MutS and MutH decline to levels appropriate for decreased DNA synthesis in stationary-phase *E. coli*, whereas functional MutL is limiting for MMR specifically during stationary-phase [20]. Some other studies, originally proposed by Schaaper and Radman [21], suggest that MMR deficiency is caused by saturation of the MMR system with an excess of DNA replication errors.

The genus *Pseudomonas* represents one of the largest groups of bacteria including both pathogenic and non-pathogenic species. Bacteria from the genus *Pseudomonas* are known for their ability to colonize multiple habitats and to adapt rapidly to new environments. The results of our recently published studies of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida* suggest that mutation processes in cells that have been starved for a short period are not entirely compatible with those from a prolonged starvation [15,22]. In the current study we have investigated whether the mechanisms of occurrence of stationary-phase mutations in populations of long-term-starved *P. putida* could be explained by malfunctioning of MMR in this bacterium under starvation conditions. Our results indicated that MMR is not entirely disabled in starving *P. putida*. Specifically, we found that the frequency of accumulation of base substitution mutations was higher in MMR-deficient *P. putida* compared to the wild-type during the 2-week starvation period studied. Moreover, the spectrum of

base substitutions which occurred in starved *P. putida* wild-type strain was distinct from that identified in MMR-defective strains. Characterization of populations of *P. putida* starved on selective plates by staining bacteria with LIVE/DEAD kit in situ on agar plates revealed that the ratio of living to dead cells varied regionally on the same plate whereas the proportion of dead cells increased with time of starvation. Hence, we suppose that the death of a subpopulation of cells under carbon starvation conditions allows slow growth of the other cells and this might be necessary for DNA replication and generation of mutations in long-term-starved populations of *P. putida*. Involvement of different stress-induced DNA polymerases in stationary-phase mutagenesis in *P. putida* will be also discussed.

2. Materials and methods

2.1. 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 [23]. M9 minimal medium [24] was supplemented with solution of trace salts [25] at final concentration 2.5 ml/l. The content of this solution was following: 10.75 g MgO, 2 g CaCO₃, 4.5 g FeSO₄·7H₂O, 1.44 g ZnSO₄·7H₂O, 1.12 g MnSO₄·4H₂O, 0.25 g CuSO₄·5H₂O, 0.28 g CoSO₄·7H₂O, and 0.06 g H₃BO₄ dissolved in 1 l water, supplemented by 51.3 ml concentrated HCl. Solid medium contained 1.5% Difco agar. Casamino acids (CAA) and glucose were added to the minimal medium at final concentrations 0.4% and 0.2%, respectively. Phenol minimal plates contained 2.5 mM phenol as a sole carbon and energy source. Antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin at 100 µg/ml, kanamycin at 50 µg/ml; tetracycline at 80 µg/ml; carbenicillin at 1000–3000 µg/ml and rifampin at 100 µg/ml. *E. coli* was incubated at 37 °C and *P. putida* at 30 °C. *E. coli* was transformed with plasmid DNA as described by Hanahan [26]. *P. putida* was electrotransformed as described by Sharma and Schimke [27]. *E. coli* strain TG1 [28] or DH5α (Invitrogen) was used for the DNA cloning procedures.

2.2. Construction of *P. putida* DNA mismatch repair-deficient strains

The part of the *mutS* gene of *P. putida* strain KT2440 lacking 796 nucleotides from 5' end of the original 2571 nucleotide-long *mutS* (PP1626) was obtained from cosmid pMIR13415 [29]. The 5-kb BamHI–ClaI DNA fragment containing sequence of the *mutS* gene was cloned from cosmid pMIR13415 into the BamHI- and EcoRV-cleaved pBluescript SK (+) to obtain pSKrpoSmutS. The ClaI ends were blunt ended before the ligation. Then we deleted approximately 2.5-kb ClaI–EcoRI DNA fragment containing DNA sequences locating downstream of the *mutS* gene in pSKrpoSmutS to obtain pSKmutS. To interrupt the *mutS* sequence with antibiotic resistance gene, the Eco47III-cleaved DNA fragment containing the Km^r gene from pUTmini-Tn5 Km2 [30] was inserted into the SmaI-cleaved pSKmutS. The XbaI- and HincII-generated DNA fragment from pSKmutS::km was subsequently cloned into plasmid pGP704 L [31] by using XbaI and Ecl136II sites.

Table 1 – Bacterial strains and plasmids used for 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>	[28]
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
CC118 λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (A_m) recA1 λpir phage lysogen</i>	[32]
<i>P. putida</i>		
PaW85	Wild type	[33]
PaWMutS	<i>mutS::km</i>	This study
PaWMutL	<i>ΔmutL::km</i>	This study
Plasmids		
pBluescript KS (+)	Cloning vector (Ap ^r)	Stratagene
pBluescript SK (+)	Cloning vector (Ap ^r)	Stratagene
pUTmini-Tn5 Km2	Delivery plasmid for mini-Tn5 Km2 (Ap ^r Km ^r)	[30]
pGP704 L	Delivery plasmid for homologous recombination (Ap ^r)	[31]
pRK2013	Helper plasmid for conjugal transfer of pGP704 L (Km ^r)	[34]
pMIR13415	Cosmid carrying partial sequence of the <i>mutS</i> gene from <i>P. putida</i>	[29]
pSKrpoSmutS	pBluescript SK (+) containing BamHI-ClaI fragment from pMIR13415 cloned into BamHI-EcoRV-cleaved vector	This study
pSKmutS	pSKrpoSmutS with deletion of 2.5-kb ClaI-EcoRI fragment	This study
pSKmutS::km	<i>mutS</i> in pSKmutS is interrupted with Km ^r gene from pUTmini-Tn5 Km2	This study
pGP704mutS::km	pGP704 L with XbaI-HincII fragment of <i>mutS::km</i> from pSKmutS::km in XbaI-Ecl136II-cleaved vector	This study
pSKmutLlopp	pBluescript SK (+) containing PCR-amplified <i>mutL</i> DNA region encoding C-terminal part of MutL inserted as EcoRV-XhoI fragment	This study
pSKmutL	pSKmutLlopp containing PCR-amplified <i>mutL</i> DNA region encoding N-terminal part of MutL inserted as AvilI-XhoI fragment in XhoI site	This study
pSKΔmutL::km	<i>mutL</i> in pSKmutL is interrupted with Km ^r gene from pUTmini-Tn5 Km2 by replacing AatII-Bsp119I-generated fragment from <i>mutL</i> with Km ^r gene	This study
pGP704ΔmutL::km	pGP704 L with XbaI-Bpu1102I fragment of <i>ΔmutL::km</i> from pSKΔmutL::km in EcoRV-cleaved vector	This study
pKTpheA56+A	Test system for detection of Phe ⁺ revertants occurring due to 1-bp deletions	[15]
pKTpheA22TGA	Test system for detection of Phe ⁺ revertants occurring due to base substitutions	[15]
pKTpheA22TAA	Test system for detection of Phe ⁺ revertants occurring due to base substitutions	[15]
pKTpheA22TAG	Test system for detection of Phe ⁺ revertants occurring due to base substitutions	[15]
pKTluxAB	pKT240-derivative carrying <i>luxAB</i> genes (Ap ^r)	[15]

Plasmid pGP704mutS::km was selected in *E. coli* strain CC118 λpir [32]. The interrupted *mutS* gene was inserted into the chromosome of *P. putida* PaW85 [33] by homologous recombination. Plasmid pGP704mutS::km, not able to replicate in hosts other than *E. coli* CC118 λpir, was conjugatively transferred into *P. putida* PaW85 by using helper plasmid pRK2013 [34]. The PaW85 *mutS::km* knockout strain PaWMutS was verified by PCR analysis using primers PpmutSNdeI (5'-CATATGTCAGATCTTTCCGCACAC-3'), complementary to the sequences -3 to +21 relatively to the ATG initiator codon of the *mutS* gene, and KmOc (5'-TCGAGCAAGAGTTTCCC-3'), complementary to the sequences 34–16 nucleotides downstream of the ATG initiator codon of Km^r gene, respectively. Additionally, we could confirm that the spontaneous frequency of mutation to rifampin resistance was about 1000-fold higher in MutS-defective bacteria compared to the wild-type strain.

The *mutL* (PP4896) gene sequence of *P. putida* KT2440 was obtained from The Institute for Genomic Research website (<http://www.tigr.org>). The *mutL* gene was amplified by PCR from genomic DNA of *P. putida* PaW85, which is isogenic to *P. putida* strain KT2440. Four primers were used for the amplification of the *mutL* gene. Firstly, two primers, MutLloppRev (5'-GCCGGTGGGGTGGGCAGCG-3'), complementary to

the sequence +193 to +174 downstream of the TGA stop codon and MutLloppFW (5'-GGCACCTTGCACCGTGCCGTT-3'), complementary to the sequence +978 to +998 nucleotides downstream of the ATG initiator codon of the *mutL* gene, were used to amplify 1125-nucleotide DNA region of the 1896 nucleotide-long *mutL* gene. The PCR product was cleaved with EcoRV and XhoI enzymes generating 905-bp DNA fragment which was subsequently subcloned into EcoRV- and XhoI-cleaved pBluescript SK (+), to obtain pSKmutLlopp. The second half of the *mutL* gene was amplified using two primers, MutLalgausRev (5'-GTGCCCCTGGCTTTCCGGCAG-3') complementary to the sequence +1313 to +1293 downstream of the ATG initiator codon and MutLalgausFW (5'-ACCGTACGCCCTGGCAAACC-3') complementary to the sequence -149 to -129 upstream of the ATG initiator codon of the *mutL* gene. The amplified 1500-bp DNA fragment containing the second half of the *mutL* gene was cleaved with AvilI and XhoI, and the obtained 1212-bp DNA fragment was inserted into XhoI-cleaved pSKmutLlopp resulting in plasmid pSKmutL. The Km^r gene was amplified by PCR from plasmid pUTmini-Tn5 Km2 by using the primer KmSac [35]. The Ecl136II-cleaved DNA fragment containing the Km^r gene was used to replace the AatII- and Bsp119I-generated 880-bp fragment in the *mutL* gene in plasmid pSKmutL.

The resulting $\Delta\text{mutL}::\text{km}$ sequence from pSK $\Delta\text{mutL}::\text{km}$ was inserted into EcoRV-cleaved plasmid pGP704 L by using XbaI and Bpu1102I sites. The XbaI and Bpu1102I ends were blunt ended before the ligation. Plasmid pGP704 $\Delta\text{mutL}::\text{km}$ was selected in *E. coli* strain CC118 λpir . The interrupted *mutL* gene containing the internal deletion was inserted into the chromosome of *P. putida* PaW85 by homologous recombination. Plasmid pGP704 $\Delta\text{mutL}::\text{km}$, not able to replicate in hosts other than *E. coli* CC118 λpir , was conjugatively transferred into *P. putida* PaW85 by using helper plasmid pRK2013. The PaW85 $\Delta\text{mutL}::\text{km}$ knockout strain PaWMutL was verified by PCR analysis using primers KmOc and MutL_{algus}FW and by measuring the spontaneous frequency of mutation to rifampin resistance. Similarly to the PaWMutS, the frequency of mutation of Rif^r was increased about 1000-fold in PaWMutL compared to the wild-type strain.

2.3. Isolation and analysis of Phe⁺ revertants

Test systems used for detection of different point mutations were the same as previously described [15]. When phenol monooxygenase *pheA*-expressing plasmid is introduced into phenol-nondegrading *P. putida* strain PaW85 lacking this gene in a chromosome, bacteria gain the ability to utilize phenol as a sole carbon source. Sequence of the reporter gene *pheA* encoding phenol monooxygenase was altered in RSF1010-derived tester plasmids either by +1 frameshift mutation (plasmid pKT*pheA*56+A) or by introducing different translational stop codons into the same position (Leu-22) of the *pheA* sequence (plasmids pKT*pheA*22TAA, pKT*pheA*22TGA, or pKT*pheA*22TAG). Incubation of *P. putida* strain carrying any of these tester plasmids with mutated *pheA* sequence on minimal selective plates containing phenol as an only carbon source enables to isolate phenol-growing (Phe⁺) revertants. Independent cultures of *P. putida* strains carrying different tester plasmids for the detection of Phe⁺ revertants [15] were generated by growing cells to late logarithmic growth phase in M9 medium containing glucose and CAA, diluting this culture by 10⁵ into fresh glucose and CAA-containing M9 medium, dispensing 2-ml aliquots into test tubes and allowing cells to reach saturation by growing cells for 18–20 h. Cells sampled from the culture were harvested by centrifugation and washed in M9 solution. Approximately 5 × 10⁸ cells of *P. putida* wild-type and 2 × 10⁸ cells of MMR-defective strains with test system measuring frameshift mutations, or 2 × 10⁷ cells of MMR-defective strains carrying test systems allowing detection of base substitution mutations were spread onto phenol minimal plates containing 1500 μg/ml carbenicillin. When fewer amounts of cells of the tester strains were plated onto selective plates, they were plated with approximately 5 × 10⁸ scavenger cells. Scavenger cells (*P. putida* PaW85 carrying plasmid pKT*luxAB* [15]) were grown to saturation in M9 minimal medium containing glucose and CAA. In order to avoid inhibition of accumulation of mutants caused by the presence of earlier-emerged mutant colonies on selective plates [22], all counted colonies were removed, as soon as they appeared, by cutting them off on small agar plugs. We have previously shown [15,36] that Phe⁺ colonies appearing on phenol minimal plates on day 2 contained mutations that occurred before the plating in a growing culture, whereas colonies that emerged

on selective plates on day 3 and later contained mutations that occurred after the cells were plated. The latter were called as stationary-phase mutations. Based on our previous studies [15,36] we can confirm that the copy number of the tester plasmids is not affected by the growth phase of the bacteria. Here, we addressed the same question by comparing the number of the plasmid copies in MMR-defective and wild-type strains but no differences were found.

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 as described previously [15]. The DNA sequencing reactions were analyzed with an ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer).

2.4. Measurement of number of colony forming units (CFU) in starving *P. putida* cultures incubated on phenol minimal plates

In order to control whether bacteria would die during starvation on the selective medium, we measured the number of colony forming units (CFU) for at least five independent starving cultures of wild-type or MMR-defective strains. The viability of bacteria was determined on the same plates that were used for the isolation of Phe⁺ revertants. Using sterile 1-ml pipette tips, small plugs were cut out from the phenol-containing minimal plates avoiding Phe⁺ colonies. Bacteria from the plugs were suspended in M9 solution by shaking. Thereafter, appropriate dilutions were made and plated onto LB plates to determine the number of CFU. The similar results were obtained despite CFU determinations were performed by plating bacteria onto LB or M9 minimal glucose medium in the presence or absence of carbenicillin. As the resistance to carbenicillin is provided by plasmids carrying the test systems for detection of point mutations, these results confirm that the tester plasmids are stably maintained in cells survived in *P. putida* starving populations.

2.5. Cell staining and microscopic examination of *P. putida* starved populations on phenol minimal plates

We cut approximately 1 cm² agar pieces containing starved *P. putida* cells from phenol-containing selective plates and placed these pieces onto a glass slide. Thereafter, we added 10 μl of diluted LIVE/DEAD BacLight 7012 kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) stain mixture of SYTO 9 and propidium iodide at final concentrations of 10 and 60 μM, respectively, onto the surface of the agar containing the cell lawn and covered gently with coverslip. The samples were incubated with stain mixture in the dark for 10 min at room temperature. Stained cell populations were observed under an Olympus BX 41 epifluorescent microscope equipped with a mercury lamp and with the appropriate filters. The samples were excited at 470 nm allowing simultaneous viewing red and green fluorescent cells. Green fluorescent cells were considered to be alive; other cells were considered to be dead [37]. In all cases, a 100× objective was used with immersion oil, giving a total magnification of 1000×. Images were captured with an Olympus U-TV0.5XC camera and were processed with DP Controller 1.2.1. 108 and DP Manager 1.2.1. 107. A minimum of 20 fields selected at random were examined on each sample.

3. Results and discussion

3.1. Mismatch repair is involved in avoidance of stationary-phase mutations both in growing and starving populations of *P. putida*

One of the widely disputed ideas is that MMR is active and essential for mutation avoidance in growing bacteria but its malfunctioning in starving cells might facilitate occurrence of stationary-phase mutations [16,17]. Here, we studied whether the occurrence of stationary-phase mutations in *P. putida* could be explained by malfunctioning of MMR during prolonged starvation of bacteria. For that purpose, we constructed *P. putida* MMR-defective strains PaWMutS and PaWMutL either defective in MutS or MutL and compared the frequency of occurrence of mutants in these strains with that in the wild-type strain PaW85. The test systems used for the selection of mutants measured appearance of phenol-degrading (Phe⁺) revertants as previously described [15]. No differences were observed in viability between the wild-type strain PaW85 and MMR-deficient strains PaWMutS and PaWMutL even during prolonged incubation of bacteria under starvation conditions, and the number of CFU did not decline in starving populations (Fig. 1A).

The results presented in Fig. 1B show the accumulation of the Phe⁺ revertants which occurred in starving populations of *P. putida* wild-type strain and MMR-defective strains due to base substitution mutations eliminating TAG stop codon. The similar accumulation curves appeared when we used two other assay systems detecting changes removing either TAA or TGA stop codon (data not shown). Base substitution mutants accumulated in *P. putida* wild-type strain at well-detectable level already at the beginning of starvation and the frequency

of appearance of these revertants remained constant during the 2-week-starvation period studied. The similar accumulation dynamics of the base substitution mutants became evident also with MMR-defective strains PaWMutS and PaWMutL (Fig. 1B). At the same time, the frequency of accumulation of base substitution mutants was approximately 25 times elevated in starved populations of PaWMutS and PaWMutL strains compared to the wild-type strain throughout all starvation period studied (Fig. 1B). This indicated that the efficiency of MMR in repairing base substitutions did not decline with time of starvation of *P. putida*.

We have previously shown that the frequency of accumulation of 1-bp deletion mutants significantly increased in long-term-starved *P. putida* populations [15]. The results presented in Fig. 1C demonstrated that during the first 7 days of carbon starvation, the absence of MutL or MutS in *P. putida* increased the frequency of accumulation of 1-bp deletants approximately four and seven times, respectively, compared to the wild-type populations. Similarly to the wild-type strain, the frequency of appearance of the Phe⁺ revertants increased significantly with time of starvation in MMR-defective strains as well. For example, during the shorter period of starvation (days 3–7) in average 0.44 deletion mutants appeared per day per 5×10^8 cells of MutS-defective strain, whereas on longer starvation period of PaWMutS (days 11–15) the frequency of accumulation of the revertants was elevated 10 times (in average 4.2 mutants per day per 5×10^8 cells). The remarkable increase in the rate of the accumulation of the revertants (about 15-fold) appeared also in this case when we used PaWMutL. At the same time, these results demonstrated that the lack of the MMR system has less influence upon rate of the occurrence of 1-bp deletion mutants compared to the emergence of base substitution mutants in starving *P. putida* populations (compare Fig. 1B and C). Moreover, if we compared

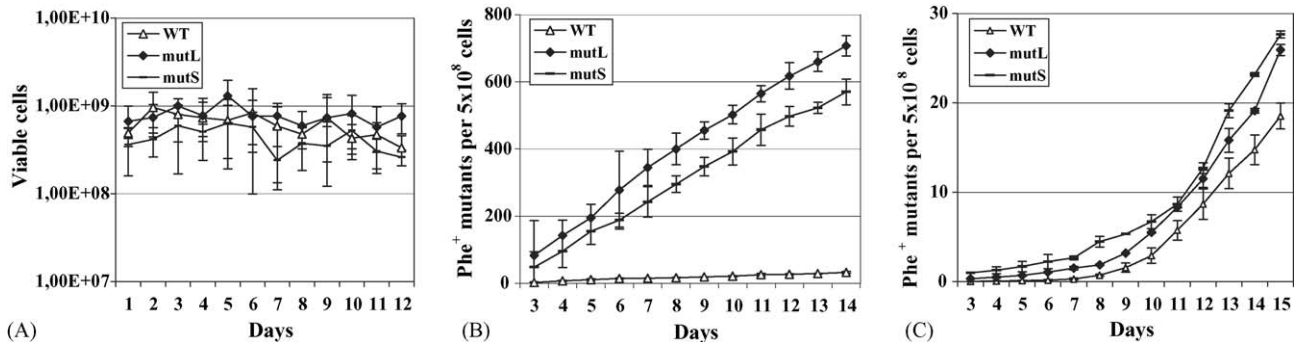


Fig. 1 – (A) Viability of *P. putida* wild-type strain PaW85 (WT), and its MMR-defective derivatives PaWMutS (mutS) and PaWMutL (mutL) on phenol minimal plates. Mean \pm standard deviation (error bars) for at least five independent determinations are shown. 1.0E + 08, for example, indicates 10^8 viable cells. (B) Accumulation of Phe⁺ revertants on phenol minimal plates in *P. putida* wild-type strain PaW85, and in its MMR-defective derivatives PaWMutS and PaWMutL carrying the tester plasmid pKTpheaA22TAG which measures elimination of TAG stop codon by the base substitutions within the *pheA* gene. About 5×10^8 *P. putida* wild-type cells or 2×10^7 MMR-defective cells with 5×10^8 scavenger cells (PaW85 carrying pKTluxAB) were plated from overnight in liquid M9 medium-grown independent cultures onto phenol minimal plates. Such amounts of tester plasmid-carrying cells produced no more than two colonies per plate per day in average. (C) Accumulation of Phe⁺ mutants on phenol minimal plates in *P. putida* wild-type strain PaW85, and in its MMR-defective derivatives carrying the tester plasmid pKTpheaA56+A which measures reversion of +1 frameshift within the *pheA* gene. About 5×10^8 *P. putida* wild-type cells or 2×10^8 MMR-defective cells with 5×10^8 scavenger cells (PaW85 carrying pKTluxAB) were plated from overnight in liquid M9 medium-grown independent cultures onto phenol minimal plates. In all cases, mean \pm standard deviations (error bars) for at least 10 plates calculated per 5×10^8 are shown.

the frequency of accumulation of 1-bp deletion mutations in the MMR-defective strains to that in the wild-type on day 10 and later, we did not detect remarkable differences at all. It is possible that different types of errors are corrected by MMR with different efficiency in starving *P. putida*. Also, our previous results demonstrated that *dinB* (PP1203)-encoded Pol IV homologue is required for most 1-bp deletions detected in long-term-starved populations of *P. putida* [15]. As the frequency of accumulation of the revertants increased with time of starvation also in MMR-defective strains, this data implied that the increased accumulation rate of the DinB-dependent mutations in the long-term-starved *P. putida* wild-type populations might be (at least partially) ascribed to increase in the activity and/or amount of DinB. At the same time, some studies, originally proposed by Schaaper and Radman [21], suggest that MMR deficiency is caused by saturation of the MMR system with an excess of DNA replication errors. Indeed, the results by Wagner and Nohmi [38] have demonstrated saturation of the MMR system as a result of accumulation of errors made by overproduction of Pol IV in *E. coli*. The spectrum of stationary-phase mutations of Lac⁺ revertants in *E. coli* FC40 system which also measures frameshift mutations resembled mutations that appear in MMR-deficient cells [18], whereas Pol IV was required specifically for 1-bp deletions in stationary-phase cells but not in growing cells [12,13]. Hence, drawing parallels with these reports, and comparing the results presented herein we cannot exclude the possibility that the appearance of 1-bp deletion mutants in long-term-starved *P. putida* wild-type strain is in some extent facilitated by partial titration of MMR due to increase in DinB-caused replication errors in starving *P. putida*.

3.2. Spectrum of base substitution mutations is affected by growth phase of *P. putida* and the presence of DNA repair functions in bacteria

In order to study whether and how the spectrum of base substitution mutations could be affected by the activity of MMR enzymes MutS and MutL in *P. putida* and whether the growth phase of bacteria could influence the frequency of occurrence of different nucleotide changes, we analyzed the phenol monooxygenase gene *pheA* sequence of the Phe⁺ revertants either collected from growing or stationary-phase populations of the wild-type and MMR-defective strains. The results of the DNA sequence analysis of the Phe⁺ mutants which occurred due to elimination of TAG, TAA or TGA stop codons are summarized in Table 2. The T-to-C transition was the most prominent change in all cases studied. However, the spectra of mutations which eliminated either TGA or TAG stop codon in the *pheA* gene were more heterogeneous than the spectrum of substitutions which resulted in elimination of TAA codon. Although the usage of TAA codon did not allow detection of A-to-G transitions due to the generation of other stop codons TGA or TAG, we did not notice other changes (e.g., substitutions T-to-A; A-to-C; A-to-T) that potentially could also eliminate this stop codon.

The spectra of base substitutions identified among revertants isolated in growing cultures were distinct from those characterized for mutants accumulated in starving populations. These spectra were also dependent on the sequence of

the stop codon used in the particular assay system. In the wild-type strain, the mutants isolated in growing cultures revealed the most heterogeneous spectrum of changes with the test system which measured the elimination of TGA stop codon. At the same time, if bacteria were starved, the TAG codon was eliminated with wider spectrum of mutations than the elimination of TGA or TAA codons.

The spectra of the base substitutions identified in starving populations of the wild-type strain were distinct from those characterized in MMR-defective strains. Presumably, if the MMR system is non-functional in starving bacteria, then the spectrum of mutations described in the starving wild-type strain should resemble spectrum observed in the MMR-defective strains. We can confirm that the mutation spectra characterized in the wild-type and MMR-defective strains differed from each other also in this case if mutants emerged in more than 1-week-starved populations were analyzed separately from the earlier arisen mutants (data not shown). Thus, the results of the analysis of spectra of base substitution mutations in different genetic backgrounds support the idea that the MMR system is functional at least during 2-week carbon starvation period in stationary-phase *P. putida*. Both types of base substitutions, transversions and transitions, were represented among the Phe⁺ revertants which were isolated in the wild-type *P. putida* populations. However, the revertants which were collected in populations of MMR-defective strains contained mostly two types of transitions, T-to-C or A-to-G. Thus, similarly to *E. coli* MMR system [39], the MMR pathway in *P. putida* preferentially avoids transition mutations.

Surprisingly, spectrum of mutations which restored the functional *pheA* sequence in MMR-defective bacteria was also dependent on which component of MMR was inactivated. This difference appeared only in this case when we characterized stationary-phase mutations. The dissimilarity was the most significant between the spectra of mutations which eliminated the TAG stop codon in the *pheA* coding sequence (Table 2). In the MutS-defective strain the proportion of the A-to-G transitions increased from 18% in growing cells to 70% in starved populations, but the change was less significant when the revertants collected in the MutL defective strain were analyzed (14% A-to-G transitions in growing cells versus 33% in starved bacteria). One possible explanation of this phenomenon is that the absence of MutS or MutL in cells might influence differently DNA replication. Data from the literature indicate that different DNA polymerases may create different spectra of mutations within the same DNA sequence [40]. In *E. coli* it has been shown that the β processivity clamp of the replicative DNA polymerase Pol III communicates directly with multiple proteins to promote DNA replication and DNA repair [41]. Besides interacting with different DNA polymerases, *E. coli* β processivity clamp binds the MMR protein MutS and ligase [42]. The finding that the clamp loader and all the polymerases present in *E. coli* interact with the β clamp at the same location has suggested that clamp binding may be competitive and regulated [43]. A pentapeptide motif QL[SD]LF which is sufficient to enable interaction of these proteins with an archetypical *E. coli* β clamp is present in most sequenced members of eubacterial DNA polymerases and MutS proteins [44]. As *P. putida* MutS protein also contains this motif, it is very likely that the MutS protein interacts with β clamp in this organism. Thus, one may

Table 2 – Reversion of different nonsense mutations (TGA, TAA, TAG) in Phe⁺ mutants accumulating in *P. putida* wild-type strain and its MutS- and MutL-defective derivatives^a

Target ^b	DNA change	Occurrences						Reversion	Amino acid change
		Wild type growing cells	Starving cells	mutS Growing cells	Starving cells	mutL Growing cells	Starving cells		
TGA	T → C	38 (69%)	13 (54%)	65(92%)	117 (76%)	25 (93%)	82 (81%)	CGA	Arg
	T → G	3 (5.5%)	5 (21%)	0	0	0	3 (3%)	GGA	Gly
	T → A	1 (2%)	0	0	0	0	1 (1%)	AGA	Arg
	G → C	4 (7%)	0	0	0	0	0	TCA	Ser
	G → T	3 (5.5%)	4 (17%)	0	0	0	0	TTA	Leu
	A → C	4 (7%)	2 (8%)	3 (4%)	0	0	0	TGC	Cys
	A → G	0	0	3 (4%)	37 (24%)	2 (7%)	15 (15%)	TGG	Trp
	A → T	2 (4%)	0	0	0	0	0	TGT	Cys
TAA	T → C	56 (100%)	38 (88%)	63 (100%)	144 (99%)	17 (100%)	114 (100%)	CAA	Gln
	T → G	0	5 (12%)	0	1 (1%)	0	0	GAA	Glu
TAG	T → C	48 (98%)	44 (61%)	60 (82%)	26 (28%)	18 (86%)	62 (67%)	CAG	Gln
	T → G	0	6 (8.5%)	0	0	0	0	GAG	Glu
	T → A	0	1 (1.5%)	0	0	0	0	AAG	Lys
	G → C	0	1 (1.5%)	0	0	0	0	TAC	Tyr
	G → T	0	8 (11%)	0	0	0	0	TAT	Tyr
	A → C	0	0	0	2 (2%)	0	0	TCG	Ser
	A → G	0	11 (15%)	13 (18%)	66 (70%)	3 (14%)	30 (33%)	TGG	Trp
	A → T	1 (2%)	1 (1.5%)	0	0	0	0	TTG	Leu

^a The spectrum of base substitutions occurring in growing bacteria was derived from analysis of DNA sequence of Phe⁺ revertants appeared onto selective plates on day 2. Mutant colonies used for identification of stationary-phase mutations were picked up on days 3–12. Approximately 10–15 mutants were analyzed per each day. We did not notice remarkable changes in the spectrum of mutations in revertants either derived from earlier or later period of starvation (days 3–7 or days 8–12, respectively).

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

hypothesize that the absence of MutS may somehow influence competitive interactions of different DNA polymerases with the β clamp.

In *E. coli*, the involvement of Pol V in stationary-phase mutagenesis has demonstrated in assaying reversion of base pair substitutions [11] but not in test systems that measure frameshift mutations [11–13]. Unlike *E. coli*, *Pseudomonas* species do not harbor chromosomally encoded Pol V. Instead, the genome of *P. putida* like the vast majority of recently sequenced bacterial genomes carries a second copy of the *dnaE* gene (PP3119) (<http://www.tigr.org>). The deduced amino acid sequence of this gene exhibits 30% identity to the deduced amino acid sequence of *dnaE* gene PP1606 encoding catalytic subunit of Pol III. Here we decided to name this *dnaE* homologue (PP3119) in *P. putida* as *dnaE2*. In the pathogen *Mycobacterium tuberculosis* DnaE1 is the replicative polymerase but DnaE2 mediates SOS mutagenesis and contributes to the emergence of drug resistance in vivo [45]. In *Caulobacter crescentus* an operon composed of two hypothetical genes and *dnaE2* is damage-inducible in a *recA*-dependent manner and is responsible for most DNA damage-induced mutations [46]. This widespread operon has been shown to be regulated by LexA also in *P. putida* [47]. Our preliminary results (not shown in this paper) have demonstrated that inactivation of *dnaE2* in MutS-defective strain resulted in reduction in the fraction of A-to-G transitions to the level similar to that observed in MutL-defective strain PaWMutL. Therefore, it is possible that DnaE2 might be involved in stationary-phase mutagenesis, this polymerase may create different spectrum of mutations than other DNA polymerase(s) and MutS may somehow suppress access

of DnaE2 to the replication apparatus. Further studies are necessary to examine this intriguing possibility.

3.3. Starving populations of *P. putida* are highly heterogeneous

Our results presented above demonstrated that the frequency of accumulation of stationary-phase mutations was higher in MMR knockout strains PaWMutS and PaWMutL compared to the wild-type strain. According to the model that only a few cells in a stationary-phase population differentiate into a hypermutable state [48–51] one may argue that MMR becomes limiting only in a small subpopulation and therefore the overall frequency of mutations in starving wild-type population cannot be as high as in experiments performed with MMR-defective strains. However, the facts that the spectra of base substitution mutations characterized in starving populations of *P. putida* wild-type strain were distinct from those identified in the MMR-defective strains and that the frequency of frameshift mutations increased with time of starvation also in MMR-defective strains do not support this idea. Thus, the occurrence of stationary-phase mutations in *P. putida* cannot be explained simply by malfunctioning of MMR in long-term-starved bacteria.

To further characterize starving *P. putida* populations on phenol selective plates, we stained bacteria in situ on agar medium with LIVE/DEAD kit and visualized cells by epifluorescent microscopy using a 1000-fold magnification. The staining kit contains two nucleic acid stains and distinguishes live bacterial cells from dead by means of membrane integrity. The

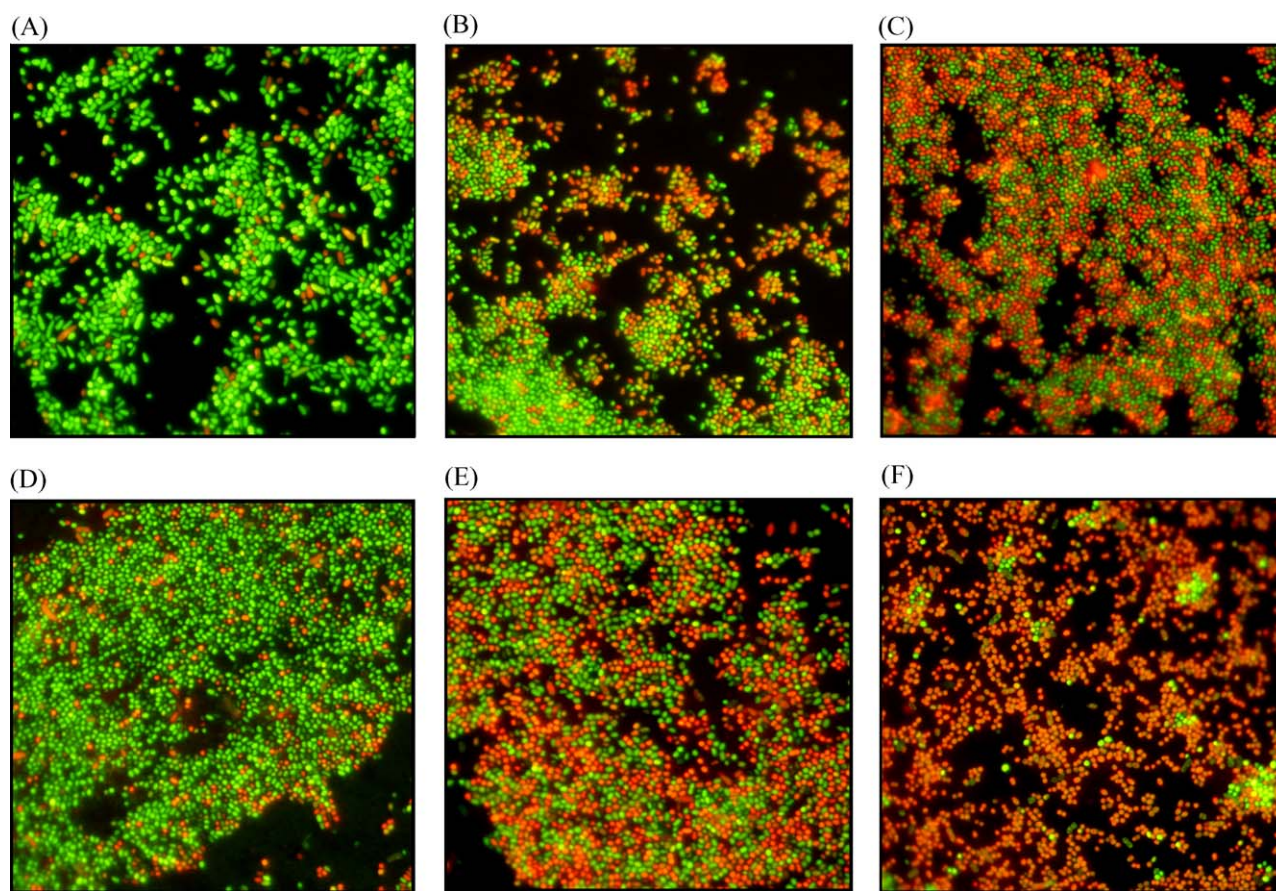


Fig. 2 – Characterization of *P. putida* populations on phenol minimal plates. Bacteria were stained with the LIVE/DEAD kit and visualized by epifluorescent microscopy using 1000-fold magnification. Samples are taken at different time points. (A) Cells immediately after plating; (B) and (C) 1-day-starved populations; (D), (E) and (F) 1-week-starved populations.

green fluorochrome (SYTO 9) is a small molecule that can penetrate intact plasma membranes while the larger red fluorochrome propidium iodide penetrates only compromised membranes. Bacterial suspensions incubated in the two stains simultaneously and then excited at 470 nm contain red and green fluorescent cells, depending on whether the bacteria are dead or live [37]. The most representative images of *P. putida* populations stained in situ on selective plates with LIVE/DEAD kit at different stages of starvation are shown in Fig. 2. Fig. 2A shows the image of *P. putida* wild-type cells that were stained directly after plating of 5×10^8 cells from stationary-phase liquid cultures onto phenol minimal plates. In this case, the majority of cells were green-colored. However, a small fraction of the cells was colored red which indicated that the plated bacterial populations contained some dead cells as well. During the next days of incubation of bacteria on selective plates the starving populations became significantly heterogeneous. The differences appeared already in this case when we examined 1-day-starved populations. The proportion of red-colored cells was increased in all studied fields. However, some fields contained more red-colored cells than the others (Fig. 2B and C) which indicated that cells incubated at the same selective plate may reside in different microenvironments. Visualization of *P. putida* populations starved for 1 week on phenol-containing minimal agar plates revealed the

presence of many red-colored cells in populations. However, the ratio of green-to red-colored cells varied regionally on the same plate (Fig. 2D–F). Based on such variation, three different sub-classes were distinguished. Fig. 2D represents fields that mostly contained green-colored cells and red-colored cells were in minority. Fig. 2F depicts an opposite situation where majority of cells were red-colored. An intermediate survival pattern is visualized in Fig. 2E. Screening at random at least 20–30 fields on the same sample revealed that these three sub-classes were almost equally represented. The similar heterogeneity appeared by visualization of *P. putida* populations when we stained 2-week-starved cells or when we examined starved populations of MMR-defective strains (data not shown). At the same time, as already noted above (Fig. 1A), the number of CFU did not decline in *P. putida* populations with time of starvation. This discrepancy is difficult to explain. One may speculate that just after the plating bacteria can multiply a few generations on selective plates but this remains undetected because a fraction of cells which are colored green at the beginning of starvation are metabolically active but unable to form colony. Later, with time of starvation membranes of these cells become more compromised, these cells die and are colored red. Further experiments are needed to evaluate this intriguing possibility. However, the presence of many dead cells in long-term-starved population implies that a fraction of

cells in *P. putida* starving populations can grow at the expenses of nutrients released from the dead ones. Hence, we suppose that slow growth of fraction of cells might be necessary for DNA replication and generation of mutations in long-term-starved populations of *P. putida*.

Populations of stationary-phase cells have been shown to be highly dynamic: waves of fitter mutants constantly arise and take over previous populations [52]. The growth advantage in stationary-phase (GASP) phenotype has been observed in many different bacterial species [4,52]. So far, the appearance of GASP mutants has been studied in homogeneous liquid media. However, in natural habitats bacteria are living in a structured environment: they usually grow as biofilms, organised communities of cells embedded in an extracellular polysaccharide matrix and attached to a surface [53]. Our results of in situ staining of bacteria on selective plates (Fig. 2) provide insight into the processes of development of heterogeneity in starving microbial populations on semi-solid surface. We have noticed unequal distribution of living and dying cells in the different regions on the same selective plate. This implies that in the structured environment (e.g., on agar plates), the dying of bacteria may not occur randomly but is stimulated under certain conditions provided by a local environment. It is also possible that the emergence of individual GASP mutants on semi-solid surface may locally affect living conditions of the remaining cells, leading to different survival patterns at territory of the whole population. Thus, competitive interactions taking place in microbial populations might be more complicated than are currently appreciated.

Acknowledgments

We thank laboratory members for their comments on this manuscript. This work was supported by grants 4482 and 5757 from the Estonian Science Foundation and by grant HHMI #55000316 from the Howard Hughes Medical Institute International Research Scholars Program.

REFERENCES

- [1] P.L. Foster, Adaptive mutation: the uses of adversity, *Annu. Rev. Microbiol.* 47 (1993) 467–504.
- [2] P.L. Foster, Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation, *Annu. Rev. Genet.* 33 (1999) 57–88.
- [3] M.M. Zambrano, D.A. Siegele, M. Almiron, A. Tormo, R. Kolter, Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures, *Science* 259 (1993) 1757–1760.
- [4] E.R. Zinser, R. Kolter, *Escherichia coli* evolution during stationary phase, *Res. Microbiol.* 155 (2004) 328–336.
- [5] B. Yeiser, E.D. Pepper, M.F. Goodman, S.E. Finkel, SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 8737–8741.
- [6] B.A. Bridges, Elevated mutation rate in *mutT* bacteria during starvation: evidence for DNA turnover? *J. Bacteriol.* 178 (1996) 2709–2711.
- [7] B.A. Bridges, S. Ereira, DNA synthesis and viability of a *mutT* derivative of *Escherichia coli* WP2 under conditions of amino acid starvation and relation to stationary-phase (adaptive) mutation, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2906–2910.
- [8] I. Bjedov, O. Tenaillon, B. Gérard, V. Souza, E. Denamur, M. Radman, F. Taddei, I. Matic, Stress-induced mutagenesis in bacteria, *Science* 300 (2003) 1404–1409.
- [9] L. Loewe, V. Textor, S. Scherer, High deleterious genomic mutation rate in stationary phase of *Escherichia coli*, *Science* 302 (2003) 1558–1560.
- [10] B.A. Bridges, Spontaneous mutation in stationary-phase *Escherichia coli* WP2 carrying various DNA repair alleles, *Mutat. Res.* 302 (1993) 173–176.
- [11] S. Bhamre, B.B. Gadea, C.A. Koyama, S.J. White, R.G. Fowler, An aerobic *recA*, *umuC*-dependent pathway of spontaneous base-pair substitution mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.* 473 (2001) 229–247.
- [12] H.J. Bull, M.-J. Lombardo, S.M. Rosenberg, Stationary-phase mutation in the bacterial chromosome: recombination protein and DNA polymerase IV dependence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 8334–8341.
- [13] G.J. McKenzie, P.L. Lee, M.-J. Lombardo, P.J. Hastings, S.M. Rosenberg, SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification, *Mol. Cell* 7 (2001) 571–579.
- [14] H.-M. Sung, G. Yeaman, C.A. Ross, R.E. Yasbin, 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 (2003) 2153–2160.
- [15] R. Tegova, A. Tover, K. Tarassova, M. Tark, M. Kivisaar, Involvement of error-prone DNA polymerase pol IV on stationary phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 2735–2744.
- [16] P.L. Foster, Are adaptive mutations due to decline in mismatch repair? The evidence is lacking, *Mutat. Res.* 436 (1999) 179–184.
- [17] R.S. Harris, G. Feng, K.J. Ross, R. Sidhu, C. Thulin, S. Longrich, S.K. Szigety, P.J. Hastings, M.E. Winkler, S.M. Rosenberg, Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation, *Mutat. Res.* 437 (1999) 51–60.
- [18] S. Longrich, A.M. Galloway, R.S. Harris, C. Wong, S.M. Rosenberg, Adaptive mutation sequences reproduced by mismatch repair deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 12017–12020.
- [19] G. Feng, H.-C.T. Tsui, M.E. Winkler, 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 (1996) 2388–2396.
- [20] R.S. Harris, G. Feng, K.J. Ross, R. Sidhu, C. Thulin, S. Longrich, S.K. Szigety, M.E. Winkler, S.M. Rosenberg, Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation, *Genes Dev.* 11 (1997) 2426–2437.
- [21] R.M. Schaaper, M. Radman, The extreme mutator effect of *Escherichia coli mutD5* results from saturation of mismatch repair by excessive DNA replication errors, *EMBO J.* 8 (1989) 3511–3516.
- [22] S. Saumaa, A. Tover, L. Kasak, M. Kivisaar, 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 (2002) 6957–6965.
- [23] J.H. Miller, *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [24] M.H. Adams, *Bacteriophages*, Interscience Publishers Inc., New York, 1959, pp. 445–447.
- [25] T. Bauchop, S.R. Elsdon, The growth of micro-organisms in relation to their energy supply, *J. Gen. Microbiol.* 23 (1960) 457–469.

- [26] D. Hanahan, Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 577-580.
- [27] R.C. Sharma, R.T. Schimke, Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium, *BioTechniques* 20 (1996) 42-44.
- [28] P. Carter, H. Bedouelle, G. Winter, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13 (1985) 4431-4443.
- [29] M.I. Ramos-González, S. Molin, Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 3421-3431.
- [30] V. de Lorenzo, M. Herrero, U. Jakobzik, K.N. Timmis, Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 6568-6572.
- [31] H. Pavel, M. Forsman, V. Shingler, 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 (1994) 7550-7557.
- [32] M. Herrero, V. de Lorenzo, K.N. Timmis, Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 6557-6567.
- [33] S.A. Bayley, C.J. Duggleby, M.J. Worsey, P.A. Williams, K.G. Hardy, P. Broda, Two modes of loss of the TOL function from *Pseudomonas putida* mt-2, *Mol. Gen. Genet.* 154 (1977) 203-204.
- [34] D.H. Figurski, D.R. Helinski, 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 (1979) 1648-1652.
- [35] R. Hórák, H. Ilves, P. Pruunsild, M. Kuljus, M. Kivisaar, The ColR-ColS two-component signal transduction system is involved in regulation of Tn4652 transposition in *Pseudomonas putida* under starvation conditions, *Mol. Microbiol.* 54 (2004) 795-807.
- [36] L. Kasak, R. Hórák, M. Kivisaar, Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 3134-3139.
- [37] R.P. Haugland, Assays for cells viability, proliferation and function, in: M.T.Z. Spence (Ed.), *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes Inc., Eugene, 1996, pp. 365-398.
- [38] J. Wagner, T. Nohmi, *Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 4587-4595.
- [39] R.M. Schaaper, Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 23762-23765.
- [40] E.C. Friedberg, R. Wagner, M. Radman, Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations, *Science* 296 (2002) 1627-1630.
- [41] M.D. Sutton, G.C. Walker, Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 8342-8349.
- [42] F.J. López de Saro, M. O'Donnell, Interaction of the β sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 8376-8380.
- [43] F.J. López de Saro, R.E. Georgescu, M.F. Goodman, M. O'Donnell, Competitive processivity-clamp usage by DNA polymerases during DNA replication and repair, *EMBO J.* 22 (2003) 6408-6418.
- [44] B. Dalrymple, K. Kongsuwan, G. Wijffels, N.E. Dixon, P.A. Jennings, A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 11627-11632.
- [45] H.I.M. Boshoff, M.B. Reed, C.E. Barry III, V. Mizrahi, DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Cell* 113 (2003) 183-193.
- [46] R.S. Galhardo, R.P. Rocha, M.V. Marques, C.F.M. Menck, An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*, *Nucl. Acids Res.* 33 (2005) 2603-2614.
- [47] M. Abella, I. Eril, M. Jara, G. Mazón, S. Campoy, J. Barbé, Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum, *Mol. Microbiol.* 54 (2004) 212-222.
- [48] B.G. Hall, Spontaneous point mutations that occur more often when they are advantageous than when they are neutral, *Genetics* 126 (1990) 5-16.
- [49] B.A. Bridges, Hypermutation under stress, *Nature* 387 (1997) 557-558.
- [50] P.L. Foster, Nonadaptive mutations occur on the F'episome during adaptive mutation conditions in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1550-1554.
- [51] J. Torkelson, R.S. Harris, M.-J. Lombardo, J. Nagendran, C. Thulin, S.M. Rosenberg, Genome-wide hypermutation in a subpopulation of stationary-phase cells underlies recombination-dependent adaptive mutation, *EMBO J.* 16 (1997) 3303-3311.
- [52] S.E. Finkel, E.R. Zinser, R. Kolter, Long-term survival and evolution in the stationary phase, in: G. Storz, R. Hengge-Aronis (Eds.), *Bacterial Stress Responses*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 2000, pp. 231-238.
- [53] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott, Microbial biofilms, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 711-745.