

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Louise Injarabian

**UvrD ja geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi roll
mutatsiooniprotsessides bakteris *Pseudomonas putida***

Bakalaureusetöö

Juhendajad: doktorant Kärt Ukkivi, MSc
professor Maia Kivisaar, PhD

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Helikaasid	6
1.1.1 Helikaaside klassifikatsioon ja ehitus	6
1.1.2 SF1 perekonna helikaasid	7
1.1.3 SF2 perekonna helikaasid	8
1.1.4 Heksameersed helikaasid SF3-SF6.....	10
1.2 UvrD helikaas	11
1.2.1 UvrD roll NER-is.....	12
1.2.2 UvrD roll replikatsioonis	14
1.2.3 UvrD roll MMR-is	14
1.2.4 UvrD roll homoloogilises rekombinatsioonis.....	16
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	17
2.1 Töö eesmärk.....	17
2.2 Materjal ja meetodika	18
2.2.1 Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid.....	18
2.2.2 UvrD ja geeni <i>PP368I</i> pool kodeeritud helikaasi defektsete tüvede konstrueerimine	20
2.2.3 <i>mutS</i> defektsete tüvede konstrueerimine.....	21
2.2.4 Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs.....	22
2.2.5 Bakterite konjugatsioon	22
2.2.6 Elektroporatsioon.....	23
2.2.7 PCR.....	23
2.2.8 Geelelektroforees	26
2.2.9 DNA sekveneerimine.....	26
2.2.10 Mutatsioonide tekkesageduse määramine plasmiidse TAG testsüsteemiga	27
2.2.11 Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine	28
2.2.12 UV-kiirguse taluvuskatse.....	28
2.2.13 Kemikaalide tundlikkuse katse	28
2.2.14 Rakkude elumuse määramine	28
2.2.15 Rakkude värvimine ja fenotüübi vaatamine mikroskoobiga	29

2.2.16	<i>P. putida</i> helikaaside valkude joondamine ja virtuaalne analüüs	29
2.3	Tulemused.....	30
2.3.1	<i>P. putida</i> helikaaside valkude joondamine ja virtuaalne analüüs	30
2.3.2	<i>P. putida uvrD</i> ja <i>PP3681</i> defektsete tüvede tundlikkus UV-kiirgusele	31
2.3.3	<i>P. putida uvrD</i> ja <i>PP3681</i> defektsete tüvede tundlikkus DNA-d kahjustavatele kemikaalidele.....	32
2.3.4	<i>uvrD</i> ja <i>PP3681</i> deletsiooni mõju <i>P. putida</i> rakkude fenotübile	33
2.3.5	<i>uvrD</i> ja <i>PP3681</i> deletsiooniga <i>P. putida</i> tüvede spontaansete mutatsioonide tekkesagedus.....	34
2.3.6	Statsionaarse faasi mutatsioonisagedus <i>UvrD</i> ja <i>PP3681</i> defektsetes tüvedes.....	36
2.4	Arutelu	39
	KOKKUVÕTE.....	44
	SUMMARY	46
	TÄNUAVALDUSED	48
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	49
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID	57

KASUTATUD LÜHENDID

AAA+ – *ATPase Associated with diverse cellular Activities*

Amp – ampitsilliin

ASCE – *Additional Strand Catalytic glutamate*

Bp – bensüülpenitsilliin

CAA – *casamino acids*

dsDNA – kaheahelaline DNA (*double-stranded DNA*)

GG-NER – globaalne genoomne NER (*global genomic NER*)

Glc – glükoos

HD – helikaasi domään (*helicase domain*)

Km – kanamütsiin

LB – lüsogeenne sööde (*lysogenic broth*)

MMC – mitomütsiin C

MMR – valepaardumisi eemaldav reparatsioon (*mismatch repair*)

MMS – metüülmetaansulfonaat

MNNG – 1-metüül-3-nitro-1-nitrosoguanidiin

NER – nukleotiidide väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair*)

NQO – nitrokinoliin

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

Phe – fenool

Pol I – polümeraas I

Rif – rifampitsiin

SF – *superfamily*

ssDNA – üheahelaline DNA (*single-stranded DNA*)

TC-NER – transkriptsiooniseoseline NER (*transcription coupled NER*)

TS – *target sequence*

SISSEJUHATUS

Elusorganismid puutuvad pidevalt kokku nii endogeense kui ka eksogeense stressiga, mis võib põhjustada DNA kahjustusi ja viia mutatsioonide tekkeni, millest paljud on kahjulikud või lausa letaalse toimega. Kahjustuste eemaldamiseks DNA-st on välja kujunenud reparatsioonimehhanismid, mis aitavad DNA terviklikkust säilitada. Sellisteks DNA reparatsioonimehhanismideks on näiteks valepaardumisi eemaldav reparatsioon (MMR) ning nukleotiidide väljalõikereparatsioon (NER), mis on eluslooduses väga konserveerunud. Samas on mutatsioonid alusmaterjaliks evolutsioonile. Lisaks kahjulike ja neutraalsetele mutatsioonidele tekib ka kasulikke mutatsioone, millel on oluline roll uue elukeskkonnaga adapteerumises. Näiteks bakterite puhul on leitud, et kasvu mittesoodustavates tingimustes (stressitingimustes) võib neis mutatsioonisagedus suurened. Kuigi enamasti on mutatsioonisageduse tõus seotud DNA reparatsiooni läbiviivate valkude geenide (sealhulgas ka helikaaside geenid) inaktivatsiooniga, on hiljuti avastatud, et lisaks vigade kõrvaldamisele võivad DNA reparatsioonivalgud osaleda ka mutatsioonide tekitamises.

Helikaasid on ensüümid, mis osalevad erinevates DNA ja RNA metabolismiradades. Näiteks osalevad DNA helikaasid reparatsiooniradades, kus nende funktsiooniks on DNA ahelate lahtikeeramine ning vigase ahela eemaldamine. Kuigi helikaaside rolli nii prokarüootide kui ka eukarüootide DNA reparatsiooniradades on palju uuritud, pole nende täpne funktsioon siiani selge ning nende osalust mutatsiooniprotsessides on vähe uuritud.

Antud töö eesmärgiks oligi uurida helikaaside UvrD ja temaga suguluses oleva geeni *PP3681* poolt kodeeritava helikaasi rolli mutatsiooniprotsessides bakteris *Pseudomonas putida*. Lisaks uurisin helikaaside UvrD ja *PP3681* geeni poolt kodeeritud helikaasi rolli valepaardumisi eemaldavas reparatsioonis (MMR) ja nukleotiidide väljalõikereparatsioonis (NER), selgitamaks välja kas *PP3681* geeni poolt kodeeritud helikaas on võimeline UvrD-d nendes reparatsioonides asendama.

Märksõnad: geneetika, helikaasid, mutatsiooniprotsessid, reparatsioonimehhanismid, NER, MMR

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Helikaasid

Helikaasid on ensüümid, mida leidub viirustes, prokarüootides ja eukarüootides. DNA helikaase kirjeldatakse kui mootoriga valke, mis kasutavad keemilist energiat DNA ahelate lahutamiseks. Mõned helikaasid toimivad lisaks veel ka kui valkude translokaasid (näiteks UvrD, PcrA ja NS3), teistel see aktiivsus jällegi puudub (näiteks Ded1). Esimene DNA helikaas TraI avastati bakteris *Escherichia coli* 1976. aastal (Abdel-Monem jt., 1976; Abdel-Monem jt., 1977). Veidi hiljem tuvastati helikaasidele ainuomased motiivid, mille järgi neid liigitama hakati (Gorbalenya ja Koonin, 1993). ATPaasidena on neil ATP sidumiseks ja hüdroolüüsiks vajalik masinavärk ASCE (*Additional Strand Catalytic glutamate*), kuuludes seetõttu fosfaadi- ehk P-silmuste (NTPaaside) valkude perekonda, mis omakorda jaguneb RecA-sarnasteks ja AAA+ (*ATPase Associated with diverse cellular Activities*) valkudeks (Leipe jt., 2003). P-silmuste perekonna liikmetena leidub neis Walker A ja Walker B motiiv mille vahel asub lisaahel (Medagli ja Onesti, 2013).

Helikaasidel on väga oluline roll DNA ja RNA metabolismis, näiteks DNA replikatsioonis, rekombinatsioonis ja reparatsioonis ning seetõttu on nende rolli ja rakus funktsioneerimise mõistmine on väga oluline. Arvatakse koguni, et 1% prokarüootide ja eukarüootide genoomist kodeerib helikaasete motiividega valke. Eukarüootsed helikaasid on oluline märklaud meditsiinis. Hiljutiste uuringute põhjal on välja pakutud, et helikaaside selektiivset inaktivatsiooni saaks ära kasutada teraapias, kus vähirakke kõrvaldatakse tsütotoksiliste ravimitega mõjutades (Gupta ja Brosh, 2008).

1.1.1 Helikaaside klassifikatsioon ja ehitus

DNA helikaase jagatakse helikaasete motiivide alusel kuude erinevasse superperekonda SF1-SF6. Üldisemalt saab aga helikaase jagada kaheks, vastavalt nende subühikute arvule toimivas ensüümis, kus SF1 ja SF2 perekonna valgud esinevad mono- või dimeeridena ning SF3-SF6 perekonna helikaasid esinevad ringikujuliste heksameeridena (Medagli ja Onesti, 2013). Võimalik on ka klassifitseerimine nukleiinhappe sidumise põhjal, sest kuigi mõned helikaasid suudavad lahti harutada nii RNA-d kui ka DNA-d, seob valdav enamus helikaase ainult ühte tüüpi nukleiinhapet.

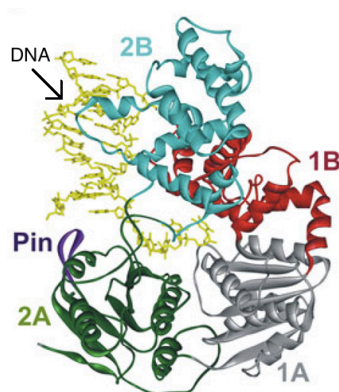
SF1-SF6 ensüümide helikaasid motiivid on aminohappelised järjestused, mis on helikaasidel perekonnasiseselt konserveerunud. Näiteks on perekondade SF1 ja SF2

helikaasidel vähemalt 7 konserveerunud helikaasset motiivi, mille homoloogia aste on kõrge (Singleton jt., 2007; Gorbalenya jt., 1989). C- ja N-terminused on helikaasidel tihti väga varieeruvad ning vastutavad valk-valk interaktsioonide, rakusisese lokaliseerumise ja DNA äratundmise eest (Raney jt., 2013).

1.1.2 SF1 perekonna helikaasid

SF1 helikaaside perekond sisaldab nii monomeerses vormis esinevaid helikaase, kui ka dimeerseid valke. Koos SF2 perekonnaga kuuluvad nad ASCE mootoriga RecA-sarnaste NTPaaside perekonda, omades kahte konserveerunud RecA-sarnast domääni 1A ja 2A, mis osalevad ATP sidumises ja hüdrolyüüsis. Nende domäänide vahel asetsevad konserveerunud järjestused (helikaasset motiivid), mis moodustavad ATP-d siduva "tasku" (Raney jt., 2013). RecA-sarnane struktuur koosneb keskel asetsevast β -lehest ning kahest α -heeliksist (Story jt., 1992). β 1 ahela otsas asub väga konserveerunud Walker A motiiv, mida nimetatakse ka fosfaadi- ehk P-silmuseks (*P-loop*) ning β 3 ahelas asub vähem konserveerunud Walker B motiiv (Koonin, 1993). Kui β -lehed on üldiselt konserveerunud, siis α -heeliksist RecA-sarnastes motiivides pigem varieeruvad (Ye jt., 2004). DNA ahelate lahtiharutamisele aitab kaasa *pin* struktuur, mille positsioon varieerub vastavalt ensüümi liikumise suunale (Velankar jt., 1999; Saikrishnan jt., 2008). Lisaks on SF1 helikaasidel veel domäänid 1B ja 2B, mis vastutavad DNA sidumise eest.

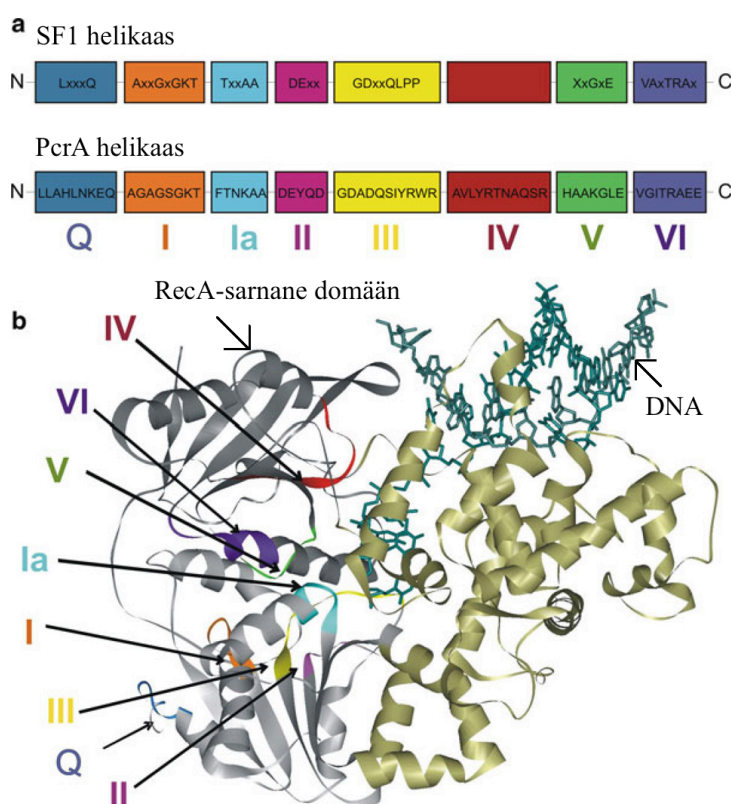
SF1 perekonda kuulub näiteks DNA helikaas UvrD, mis osaleb nii DNA reparatsioonis, DNA replikatsioonis ja rekombinatsioonis ning millest tuleb täpsemalt juttu UvrD helikaasi peatükis. Bakteris *Bacillus subtilis* on leitud UvrD ja Rep helikaasi homoloog PcrA, mille struktuur ja funktsionaalsed domäänid on toodud joonisel 1.



Joonis 1. SF1 perekonda kuuluva helikaasi PcrA struktuur (muudetud kujul Raney jt., 2013). Joonisel on erinevate värvidega näidatud SF1 helikaasi domäänid 2A, 2B, 1B, 1A, *pin* struktuur ja dsDNA. *Pin* struktuur hõlbustab DNA kaksikahela lahtiharutamist, domäänid 2A ja 1A seovad ATP-d ning domäänid 2B ja 1B seovad DNA-d.

Enamus SF1 helikaase seondub üheaahelisele DNA-le (ssDNA), kuid on ka grupp ensüüme, mis eelistavad kaheaahelist DNA-d (dsDNA). ssDNA helikaasideks on näiteks Rep, UvrD, PcrA ning dsDNA helikaasideks on eIF4A, RecG ja PriA (Hall ja Matson, 1999; Tuteja ja Tuteja, 2004). Vastavalt SF1 helikaaside liikumise suunale saab neid jagada gruppidesse SF1A ja SF1B (vastavalt 3'-5' või 5'-3' suunalised helikaasid). SF1A helikaasideks on näiteks PcrA, Rep ja UvrD (Hall ja Matson, 1999; Tuteja ja Tuteja, 2004) ning SF1B gruppi kuuluvad helikaasid RecD ja Dda (Saikrishnan jt., 2008; Saikrishnan jt., 2009).

SF1 perekonna helikaasidel on 8 erineva funktsiooniga konserveerunud motiivi. Motiivid ja nende funktsioonid on kirjeldatud joonisel 2.

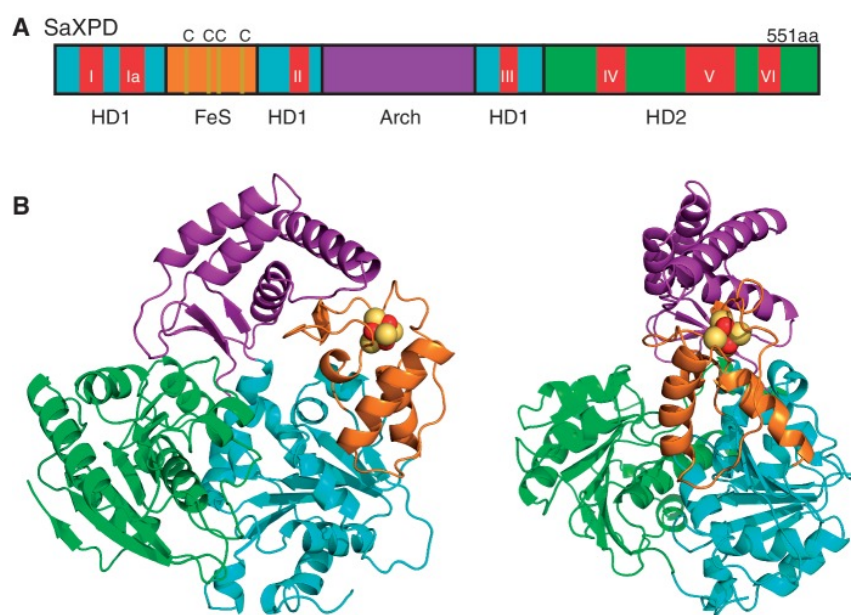


Joonis 2. SF1 perekonda kuuluvate helikaaside konserveerunud motiivid PcrA helikaasi näitel (joonis muudetud kujul Raney jt., 2013). A) Skemaatiline aminohappeline järjestus; B) Valgu struktuur. Motiivid Q, Walker A (I), Walker B (II) ja IV seovad ATP-d (Tanner, 2003; Gorbalenya jt., 1989; Hall ja Matson, 1999; Fairman-Williams jt., 2013; Velankar jt., 1999). Motiivid Ia, III, IV, V ja VI seovad DNA-d (Hall ja Matson, 1999; Korolev jt., 1997; Hall jt., 1998). Joonisel on kujutatud halli värviga 2 RecA-sarnast domääni, mille vahele jäävad eelmainitud motiivid.

1.1.3 SF2 perekonna helikaasid

SF2 perekonna helikaasid moodustavad suurima ja kõige komplekssema helikaaside ja translokaaside grupi. Suurema osa perekonna liikmetest moodustavad RNA-helikaasid

(DEAD-box helikaasid), millele järgnevad arvukuse poolest DNA-helikaasid. SF2 helikaasid osalevad transkriptsioonis, DNA reparatsioonis, kromatiini ümberkorraldamises ning kõigis RNA metabolismiradades (Jankowsky ja Fairman, 2007). Konserveerunud helikaasete motiivide hulka kuuluvad 2 RecA-sarnast motiivi: helikaasi domään 1 (HD1) ja helikaasi domään 2 (HD2). HD1 ja HD2 on SF1 perekonna 1A ja 2A domäänide homologid ning sisaldavad 11 konserveerunud järjestust (Fairman-Williams jt., 2013; Singleton jt., 2007). Need järjestused on skemaatiliselt esitatud joonisel 3 XPD helikaasi näitel. XPD helikaas osaleb inimesel nukleotiidi väljalõike reparatsioonis.



Joonis 3. SF2 perekonda kuuluva XPD helikaasi struktuurist (Wu ja Spies, 2013). A) Domäänide asukoht valgus; B) XPD valgus struktuur pealtvaates ja külgsuunas. Lisaks tavapärastele konserveerunud motiividele I, Ia, II, III, IV, V ja VI omab XPD helikaas unikaalseid Arch ja Fe-S konserveerunud motiive.

SF2 helikaase, nagu ka eelmainitud SF1 helikaase, liigitatakse alamgruppidesse vastavalt nende liikumise suunale. SF2A helikaasid liiguvad 3'-5' suunas ning SF2B helikaasid 5'-3' suunas. SF2 perekonna esindajateks prokarüootides on näiteks RecQ, RecG perekonna helikaasid ja Rad3, kus Rad3 perekonna liikmed on ainsad SF2 helikaasid, millel on tähendatud ssDNA 5'-3' suunalist translokatsiooni (Sung jt., 1987).

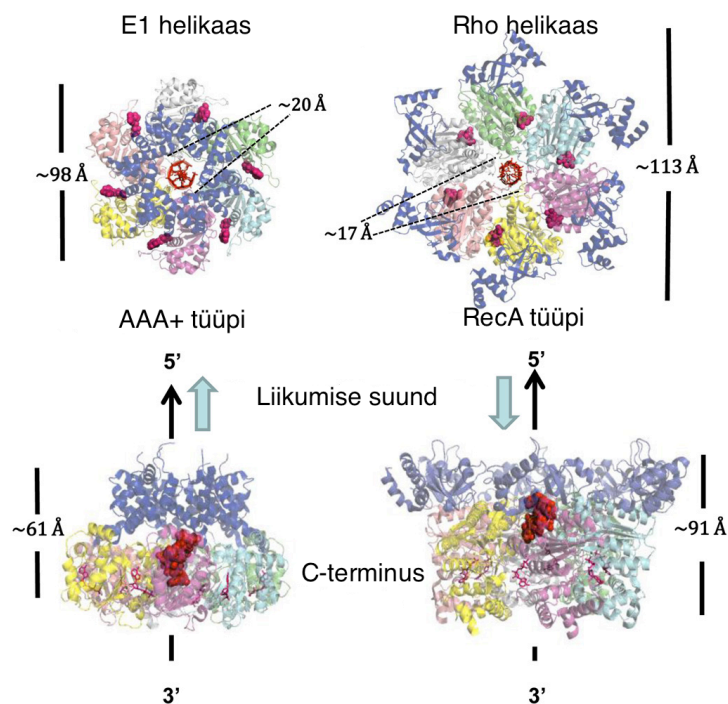
SF2 perekonda kuuluvad eukarüootsed helikaasid BLM, WRN ja RecQ on meditsiinilisest seisukohast olulisel kohal. Äsjamainitud helikaaside geenide mutatsioone seostatakse vastavalt Bloome'i, Werner'i ja Rothmun-Thomsoni sündroomidega, mis on kaasasündinud autosomaalsed retsessiivsed haigused (Wu, 2007; Bernstein jt., 2010; Wu ja Brosh, 2010).

1.1.4 Heksameersed helikaasid SF3-SF6

Heksameersed helikaasid on ringikujulised ensüümid, mis osalevad enamasti DNA replikatsiooni initsiatsioonis ja elongatsioonis. Lisaks on täheldatud nende rolli rekombinatsioonis (West ja Connolly, 1992; West, 1992) ja transkriptsiooni terminatsioonis (Richardson, 1993; Richardson, 1996). Kõik SF3-SF6 perekonna liikmed, välja arvatud eukarüootide MCM (*minichromosomal maintenance*) helikaas, on monoheksameerid. Ringikujuline struktuur moodustab helikaasi keskele kanali, mis ümbritseb ahelate lahtiharutamise käigus DNA-d või RNA-d (Egelman jt., 1995). Kanali diameeter on väga varieeruv, kõikides 13 ja 50 Å vahel (Enemark ja Joshua-Tor, 2006; Thomson ja Berger, 2009; Pape jt., 2003; Bailey jt., 2007; Lo jt., 2009). DNA kanalisse saamiseks kasutab helikaas laadimis-valke (*loading proteins*), mis võivad olla eraldiseisvad valgud (ATPaasid) või helikaasi enda spetsialiseeritud domäänid. Valgud võivad DNA sisestamiseks helikaasi ringistruktuuri nii lõhkuda kui ka moodustada. Ebastabiilsete heksameeride puhul moodustabki laadimis-valk DNA ümber funktsioneeriva helikaasi (Sen ja Patel, 2013).

Ringikujulise struktuuriga saavutab helikaas tõhusama protsessiivsuse ning püsib DNA-l või RNA-l paremini peal (Kuriyan ja O'Donnell, 1993), sidudes korraga 20-35 nukleotiidi (Hingorani ja Patel, 1993; Bujalowski ja Jezewska, 1995; Jezewska jt., 1996). Kuigi heksameersed helikaasid suudavad siduda nii DNA-d kui ka RNA-d, on enamus neist DNA helikaasid. RNA helikaasid on vähelevinud ning siiani on neid leitud ainult bakteritest ja viirustest (Rabhi jt., 2010; Jankowsky, 2011).

Erinevalt SF1-SF2 perekonna helikaasidest, mis omavad ühte ASCE mootorit ATP sidumiseks, omavad heksameersed helikaasid iga monomeeri kohta ühte ASCE-d. Kui SF1 ja SF2 perekonna helikaasid kuuluvad kõik RecA perekonna ASCE-de hulka, võivad mõned heksameersete helikaaside perekonnad (SF3 ja SF6) kuuluda AAA+ valkude perekonda (Medagli ja Onesti, 2013). RecA-sarnaste ja AAA+ valkude erinevust kirjeldab täpsemalt joonis 4. Selleks, et kaks RecA sarnast motiivi saaksid omavahel kontaktis olla, sisaldavad nad arginiini-sõrme (*arginine finger*) struktuuri. Eelnimetatud struktuur on ainult ühel RecA-sarnasel domäänil, mis võimaldab tal teise RecA-sarnase domääni aktiivsaiti siseneda (*poke*). AAA+ perekonna valgud omavad sarnast arginiini-sõrme struktuuri, kuid seda SRH motiivis (*second region of homology*), mis asub β -lehe Walker A ja B motiivide vahel (Beyer, 1997; Neuwald jt., 1999). Kuigi heksameersete helikaaside liikumise suuna mehhanismi pole veel piisavalt uuritud, arvatakse praeguste uurimuste põhjal, et RecA-sarnase domääniga heksameersed helikaasid liiguvad 5'-3' suunas ning AAA+ struktuuriga valgud 3'-5' suunas.



Joonis 4. RecA ja AAA+ perekonda kuuluvate helikaaside struktuurid papilloomviiruse E1 ja Rho helikaasi näitel (muudetud kujul Patel jt., 2011). Ülemistel joonistel on kujutatud helikaase pealtvaates, alumistel külgvaatest. Oligomerisatsioonidomäänid on välja toodud sinisega. Nukleiinhape (RNA või DNA) seondub keskel asuvasse kanalisse, mille suurus helikaasidel varieerub. Igal heksameeril on 6 nukleotiidi sidumise saiti, mis on kujutatud erinevate värvidega (roheline, kollane, roosa, tumeroosa, helesinine, valge). Seotud nukleotiidid on kujutatud punase värviga, E1 oligomerisatsioonidomään ja Rho N-terminaalne domään on kujutatud sinisega. Sinised nooled tähistavad helikaasi liikumise suunda ning mustad nooled tähistavad nukleiinhappe suunda kanalisis.

1.2 UvrD helikaas

UvrD helikaas kuulub SF1A helikaaside perekonda. UvrD osaleb paljudes DNA metabolismiradades, näiteks DNA replikatsioonis, rekominatsioonis ning DNA reparatsiooniradades, näiteks valepaardumisi eemaldavas reparatsioonis (MMR-is) ja nukleotiidide väljalõikeraparatsioonis (NER-is). SF1 perekonna liikmena sisaldab ensüüm kahte Rec-A sarnast domääni 1A ja 2A ning domääne 1B ja 2B. Kuigi UvrD suudab monomeerina ssDNA-d siduda ning omab siis translokaasset aktiivsust, arvatakse, et helikasse aktiivsuse omamiseks peab ta polümeriseeruma (Maluf jt., 2003a; Maluf jt., 2003b; Niedziela-Majka jt., 2007; Sun jt., 2008; Yokota jt., 2013). UvrD monomeeride liitumist *in vitro* on kirjeldatud 2 mudeli abil (Maluf jt., 2003b). Esimese puhul liitub DNA-le juba dimeriseerunud molekul, teise mudeli kohaselt liituvad monomeerid DNA-l.

Kõige põhjalikumalt on UvrD-d uuritud bakteris *Escherichia coli*, kus teda tuntakse kui DNA helikaas II-te. 1991. aastal kirjeldasid B. K. Washburn ja S. R. Kushner *E. coli* $\Delta uvrD$ tüve suurenenud tundlikkust UV-kiirgusele ning kõrgeenenud homoloogilise rekombinatsiooni ja spontaanse mutageneesi taset. Bakterite elumusele *uvrD* puudumine ei mõjunud, mille tõttu nad järeldasid, et UvrD olemasolu ei ole raku elus püsimisele hädavajalik. Avastati ka UvrD homoloog, Rep, mis võttis UvrD puudumisel selle funktsioonid üle (Washburn ja Kushner, 1991). Hiljem selgus, et kuigi UvrD ja Rep on homoloogid, on nende *in vivo* aktiivsused erinevad (Veaute jt., 2005).

UvrD roll võib erinevates organismides varieeruda. Näiteks bakteris *Deinococcus radiodurans* on UvrD oluline kaheaahelaliste katkete (DSB-de) parandamises, bakteris *E. coli* osalevad DSB reparatsioonis aga teised valgud (Bentchikou jt., 2010).

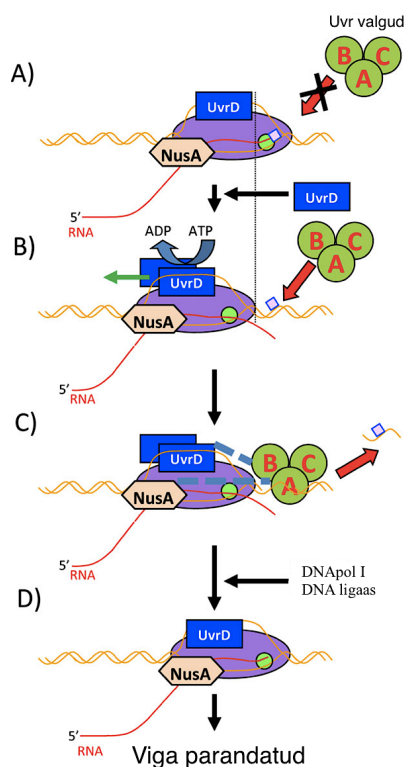
1.2.1 UvrD roll NER-is

Nukleotiidide väljalõikereparatsioon ehk ekstsisioonireparatsioon (NER) on prokariootidest eukariootideni conserveerunud reparatsioonimehhanism. Bakteris *Escherichia coli* teostavad väljalõikereparatsiooni Uvr-valgud, teistes organismides esinevad nende homoloogid. NER-i peamiseks ülesandeks on UV-kiirguse tõttu tekkinud 6-4-fotoproduktide ja tsüklobutaan pürimidiini dimeeride eemaldamine DNA ahelatest.

Kuigi väljalõikereparatsiooni saab jagada kaheks, globaalseks (GG-NER) ja transkriptsiooniseoseliseks (TC-NER) reparatsiooniks, erinevad need ainult initsiatsiooni mehhanismi poolest. Globaalse reparatsiooni puhul skanneerib genoomi UvrA₂-UvrB₂ kompleks, mille seondumisafiinsus on kahjustunud DNA-le kõrgem kui kahjustamata DNA-le (Croteau jt., 2007). Transkriptsiooniseoselise reparatsiooni puhul toimub initsiatsioon transkribeeritava ahelal seisma jäänud RNA polümeraasi tõttu. Kahjustusel seisma jäänud RNA polümeraasi tunneb ära *mfd* (*Mutation Frequency Decline*) geeni poolt kodeeritud valk Mfd. Mfd seondub RNA polümeraasile, eemaldab selle DNA-ahelalt, paljastab vea ning suunab sinna NER valgud UvrA ja UvrB. Järgnevad etapid on mõlemal reparatsioonimehhanismil samad. UvrA₂-UvrB₂ kompleks põhjustab DNA ahelate lahtihargnemise, mille järgselt UvrA vabaneb kompleksist. Järgnevalt seondub UvrB-le endonukleaas UvrC, mille kaks nukleaasset domääni võimaldavad tal lõigata fosfodiestersidemeid (Verhoeven jt., 2000). UvrC teostab lõiked kahjustusest 8 nukleotiidi kauguselt 5' otsast ning 4-5 nukleotiidi kauguselt 3' otsast (Lin ja Sancar, 1990). Pärast katkete tegemist eemaldab UvrD 12-13 nukleotiidi pikkuse fragmendi, DNA polümeraas I sünteesib tühimiku täis ning DNA ligaas liidab DNA otsad kokku.

Ehkki UvrD toimimise mehhanism *in vivo* pole veel selge, on tema rolli NER-is põhjalikult uuritud. Vea leidmisel DNA ahelas suudab UvrAB kompleks DNA ahelaid lahutada, kuid mitte neid eemaldada. Ahelaid eemaldada ning neid selleks lahti keerata suudab ainult UvrD. Atkinson ja kolleegid leidsid, et UvrAB kompleks stimuleerib UvrD helikaasset aktiivsust *in vivo*, mis viitab sellele, et helikaasid toimivad pigem kompleksis kui iseseisvalt (Atkinson jt., 2009).

Lisaks osalemisele GG-NER-is, omistatakse hiljutiste uuringute põhjal UvrD-le roll ka TC-NER-is. Nimelt avastati, et UvrD seondub RNA polümeraasiga (nii *in vitro* kui ka *in vivo*) transkriptsiooni elongatsiooni etapis ning tõmbab polümeraasi tahapoole, tuues esile vead DNA-s (Epshtein jt., 2014). Tagasitõmbamine RNA sünteesi terminatsiooni ei põhjusta ning võimaldab NER-i ensüümidel vigasele DNA-le seonduda. UvrD osalus transkriptsiooniseoselises NER-is on kujutatud joonisel 5.



Joonis 5. Mudel, mis kirjeldab RNA polümeraasi tagasitõmbamist UvrD poolt, võimaldades NER-i ensüümidel DNA katkele liikuda (muudetud kujul Epshtein jt., 2014). A) RNAP jõuab veani ning jääb seisma. Transkriptsioonikompleks ei lase Uvr valke vigastusele ligi; B) UvrD dimeriseerub ning liigutab transkriptsioonikompleksi tahapoole. Abivalk NusA abistab UvrD-d; C) Uvr valgud saavad vigastusele liikuda ning vea ära parandada; D) Uvr valgud ja 1 UvrD monomeeridest lahkub ahelalt. DNA polümeraas (joonisel DNA Pol I) sünteesib tühimiku täis ning DNA ligaas liidab otsad kokku. Seejärel saab RNA polümeraas oma tööd jätkata.

1.2.2 UvrD roll replikatsioonis

Replikatsioonis on monomeerse UvrD ülesandeks eemaldada valke DNA ahelatelt. Tema rolli translokaasina on nähtud nii Tus valkude (Bidnenko jt., 2006) kui ka RecA valkude eemaldamises (Veaute jt., 2005). RecA on DNA-ga seonduv ATP-aas, mis osaleb homoloogilises rekombinatsioonis ja DNA reparatsioonis (Cox 2002; Anderson ja Kowalczykowski, 1997; Jiang jt., 2009) ning assotsieerub DNA-l nukleoproteiinseks filamendiks (Arenson jt., 1999; Bell 2005). Pärast DNA järjestuse parandamist on RecA eemaldamine DNA ahelalt hädavajalik replikatsioonikahvli edasi liikumiseks. Petrova ja kolleegid on näidanud, et UvrD kasutab valkude eemaldamiseks ATP hüdroolüüsi energiat, kuigi tema ATPaasne aktiivsus RecA eemaldamise käigus on madalam kui teiste translokaasete ja helikaasete funktsioonide täitmisel (Petrova jt., 2015).

Tus valkude eemaldamine on oluline rekombinatsioonist sõltuva replikatsiooni alustamiseks. Bakteri kromosoomis asuvad *Ter*-saidid, millele seonduvad Tus-valgud. *Ter*-Tus kompleksid takistavad replikatsiooni läbiviiva kompleksi liikumist ning asuvad tavaliselt terminaator-piirkonnas. Selleks, et replikatsioonikahvel saaks edasi liikuda, on vaja Tus-valgud eemaldada.

Lisaks DNA polümeraasile Pol I osaleb ka UvrD Okazaki fragmentide protsessimises. Nimelt avastasid Moolenaar ja kolleegid (2000), et bakteritüved, millest olid deleteeritud nii DNA polümeraas I kui ka UvrD geenid, ei olnud eluvõimelised.

1.2.3 UvrD roll MMR-is

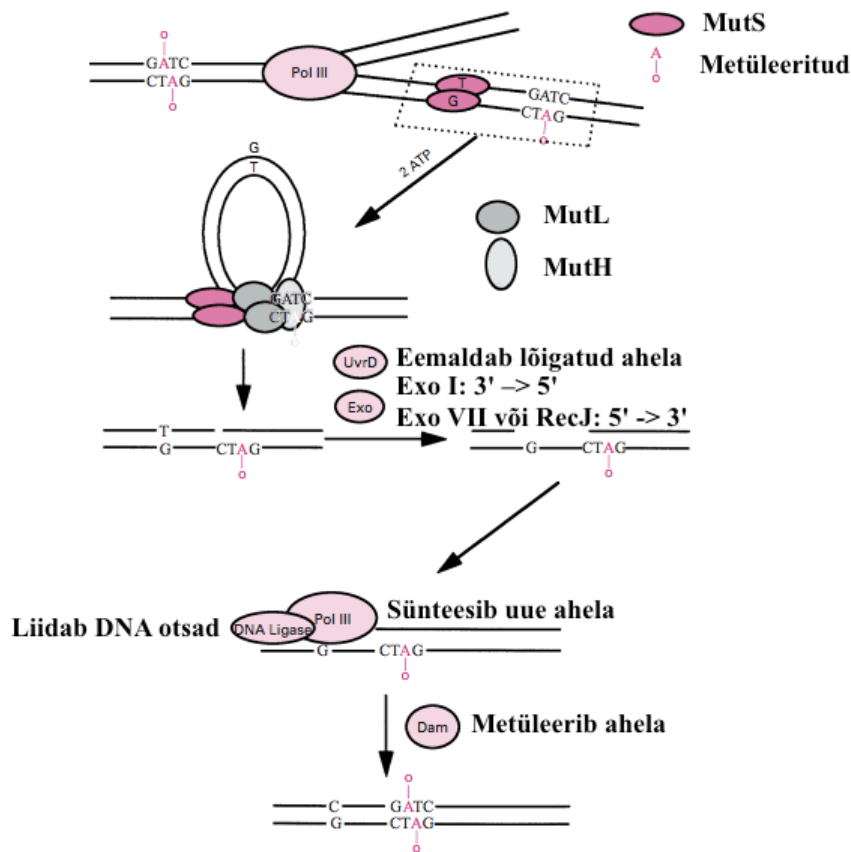
Valepaardumise reparatsioon ehk MMR (*mismatch repair*) on bakterist imetajani konserveerunud replikatsioonijärgne DNA reparatsioonimehhanism. Kõige enam on MMR süsteemi uuritud bakteri *E. coli* rakkudes, kus see suurendab DNA sünteesi täpsust 20-400 korda (Schaaper, 1993). MMR-i peamiseks ülesanneteks on DNA replikatsioonil tekkinud valepaardumiste eemaldamine ning ebatäpse rekombinatsiooni ärahoidmine.

MMR jaguneb kaheks, kus ühte tüüpi mehhanism on levinud eukarüootide ja bakterite hulgas ning teine on spetsiifiline ainult gammaproteobakteritele, sealhulgas ka *E. coli*-le. Peamine erinevus on vigase ahela ära tundmises. Vahetult pärast DNA replikatsiooni on uus DNA ahel mõnda aega metüleerimata. *E. coli*-s tunneb uue ahela ära metüleerimise puudumise järgi MutH. Eukarüootides ja teistes bakterites pole uue ahela eristamise mehhanism siiani päris selge (Reyes jt., 2015). Arvatakse, et näiteks eukarüootides võiks *E.*

E. coli MutH valgu rolli täita MutL-i homoloogid, MutL α ja MutL γ , mis omavad endonukleasest aktiivsust ning tunnevad ära valepaardumisi (Kadyrov jt., 2006).

E. coli MMR-is osalevad MutS, MutL ja MutH valgud, kusjuures MutS ja MutL valkudel esineb teistes organismides homolooge, MutH-l aga puuduvad homoloogid. Valepaardumise reparatsioon käivitub kui MutS-i homodimeer tunneb ära valesti paardunud lämmastikaluse. Seejärel liitub MutS-DNA kompleksile MutL homodimeer. MutL aktiveerib MutH endonukleasi, mis teeb löike metüleerimata DNA-ahelasse hemimetüleeritud dGATC järjestusest 5' suunas. Pärast katkete tegemist alustab UvrD ahelate lahtikeeramist 3'-5' suunas (Mechanic jt., 2002) ning UvrD-le järgnev eksonukleas degradeerib lahtikeerdunud ahela (joonis 6) (Yamagata jt., 2002; Burdett jt., 2001). *E. coli* MMR rada on kujutatud joonisel 6.

Kuigi eelnevalt on teada, et MutL aktiveerib lisaks MutH-le ka UvrD-d (Yamaguchi jt., 1998), pole siiani täpne mehhanism teada. Niedziela-Majka ja kolleegid arvavad, et võimalikke aktiveerimismehhanisme on kaks: MutS stabiliseerib UvrD dimeeri, tõstes sellega tema aktiivsust või MutS aktiveerib UvrD monomeeri helikaasse aktiivsuse (Niedziela-Majka jt., 2011). Lisaks tõstab MutL UvrD protsessiivsust MMR-is võrreldes NER-ga (Matson ja Robertson, 2006). Nimelt NER-is eemaldab UvrD umbes 12 aluspaarilisi, MMR-is aga 1000-2000 aluspaarilisi segmente. Uuringute kohaselt seondub MutL DNA-ga ning hakkab siis UvrD-d DNA ahelatele "laadima" (Mechanic jt., 2002). Arvatakse, et interaktsioonid MutL-DNA ja MutL-UvrD on võrdse tähtsusega UvrD helikaasse funktsiooni stimuleerimiseks (Mechanic jt., 2002).



Joonis 6. Valepaardumisi eemaldav DNA reparatsioonimehhanism (MMR) bakteris *E. coli* (muudetud kujul artiklist Marra ja Schär, 1999). Joonisel on näidatud äsjasünteesitud DNA ahelas sünteesi käigus tekkinud veast põhjustatud T-G valepaardumist, mille tunneb ära MutS. Järgmisena liituvad valepaardumist sisaldavale ahelale MutL ja MutH. MutH teeb ahelasse lõike, UvrD keerab ahela lahti ning eksonukleas (joonisel Exo) degradeerib valepaardumist sisaldava ahela. DNA polümeeras III holoensüüm (joonisel Pol III) sünteesib uue ahela ning DNA ligaas liidab otsad kokku. Seejärel saab Dam metülaas (joonisel Dam) ahela metüleerida.

1.2.4 UvrD roll homoloogilises rekombinatsioonis

Lisaks MMR-le osaleb UvrD koos teiste MMR-i vakudega homoloogilise rekombinatsiooni protsessis. MutS ja MutL pärsivad homoloogilise rekombinatsiooni toimumist, kasutades selleks kaheetapilist rada – varajast ja hilist. Varajane etapp on seotud UvrD ja RecBCD nukleasi kaasamisega ning toimub enne DNA replikatsiooni. Hiline rada on DNA sünteesi järgne, sõltub MutH-st ning vajab metüleerimata GATC järjestust (Štambuk ja Radman, 1998). Samuti omistatakse UvrD-le roll Holliday ühenduste lahti keeramises. Siiani avaldatud informatsiooni alusel arvatakse, et UvrD on võimeline Holliday ühendusi ära tundma ning neid lahti harutama (Carter jt., 2012).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Helikaasid osalevad väga paljudes protsessides, mis aitavad rakkude genoomi stabiilsena hoida. Kuigi helikaaside rolli on reparatsiooniradades uuritud, on nende funktsioonist mutatsiooniprotsessides siiani vähe teada. Samas on mutatsiooniprotsesside uurimine väga oluline bakterite evolutsioneerumise, näiteks antibiootikumi resistentsuse saavutamise mõistmiseks. Kuigi mutatsioone tekib kõikides organismides, on just bakterite puhul hästi jälgitav nende kiire kohanemine keskkonna muutustele.

Peamiselt on helikaaside rolli prokarüootides uuritud bakteris *Escherichia coli*, kuid teistes bakterites võivad neile homoloogsed helikaasid omada erinevat rolli. UvrD on helikaas, mille puhul on teada tema osalemine *E. coli* NER-is ja MMR-is, kus ta on teadaolevalt ainuke vigast ahelat eemaldav helikaas. Gammaproteobakteritel on äsjamainitud reparatsioonirajad konserveerunud ning seega osalevad ka bakteris *Pseudomonas putida* reparatsiooniradades *E. coli* valkude homoloogid. Meie töörühmas on eelnevalt nähtud, et UvrD ei ole bakteris *P. putida* ainus MMR-is osalev helikaas, mistõttu arvame, et selles reparatsioonirajas võiks osaleda veel teinegi helikaas (Tark, 2006). Selleks teiseks helikaasiks pakuti välja *PP3681* geeni poolt kodeeritud helikaas, mis on UvrD-le pärast Rep-helikaasi kõige lähim sugulane. Minu töö eesmärgiks saigi uurida helikaaside UvrD ja *PP3681* geeni poolt kodeeritud helikaasi mõju mutatsiooniprotsessides bakteris *P. putida*. Tahtsime näha, kas geeni *PP3681* poolt kodeeritud valk suudab UvrD puudumisel viimase rolli üle võtta ning selgitasime ka UvrD ja *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi rolli reparatsiooniradades NER ja MMR.

2.2 Materjal ja meetoodika

2.2.1 Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Täissöötmena kasutasime LB-söödet (Miller, 1972) ning minimaalsöötmena kasutasime M9 baasil valmistatud söödet (Adams, 1959). Minimaalsööde sisaldas lisaks M9-le ka mikroelementide lahust 2,5 ml/l (Bauchpo ja Elsdén, 1960), aminohapete hüdroolüsaati (CAA) lõppkontsentratsiooniga 0,2% ning süsinikuallikana kas glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM või fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. Tardsöötme saamiseks lisasime vedelsöötmele agarit 15 g/l.

Bakteritüvede ja plasmiidide seleksiooniks kasutasime antibiootikume: ampitsilliini (Amp) 100 µg/ml, kanamütsiini (Km) 50 µg/ml, rifampitsiini (Rif) 100 µg/ml, bensüülpenitsilliini (Bp) 7,5-10 µg/ml .

Pseudomonas putida tüvesid kasvasime temperatuuril 30° C ja *Escherichia coli* tüvesid temperatuuril 37° C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil 180 pööret/min.

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
CC118λpir	$\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galk phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am)$	Herrero jt, 1990
HB101	subE44 subF58 hsdS3 (rB-mB-) recA13 proΔ2 lacY1 galk2 rsp20 xyl-5 mt1-1	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi	Bayley jt, 1977
PaWΔuvrA	PaW85 tüvest ΔuvrA	K. Ukkivi avaldamata andmed
PaWΔuvrB	PaW85 tüvest ΔuvrB	K. Ukkivi avaldamata andmed
PaWΔuvrD	PaW85 tüvest ΔuvrD	Käesolev töö

PaW Δ PP3681	PaW85 tüvest Δ PP3681	Käesolev töö
PaW Δ uvrD Δ PP3681	PaW Δ uvrD tüvest Δ PP3681	Käesolev töö
PaWmutS	PaW85 tüvest <i>mutS::Km</i>	Käesolev töö
PaW Δ uvrDmutS	PaW Δ uvrD tüvest <i>mutS::Km</i>	Käesolev töö
PaW Δ PP3681mutS	PaW Δ PP368 tüvest <i>mutS::Km</i>	Käesolev töö
PaW Δ uvrD Δ PP3681mutS	PaW Δ uvrD Δ PP3681 tüvest <i>mutS::Km</i>	Käesolev töö

Plasmiid

pJPuvrD	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on kloneeritud restriктаasiga SmaI <i>uvrD</i> geeni eelse ja järgse ala liitfragment (Km ^r)	Käesolev töö
pJPPP3681	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on kloneeritud restriктаasidega EcoRI ja BamHI <i>PP3681</i> geeni eelse ja järgse ala liitfragment (Km ^r)	Käesolev töö
pSW(I-SceI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmiid (Amp ^r ja Cb ^r)	Wong ja Mekalanos, 2000
pKTpheA22TAG	Aluste asendusmutatsioonide detekteeriv plasmiidne testsüsteem, kus plasmiidi pKT240 viidud <i>pheA</i> geeni 22. koodon CTG (Leu) on asendatud stoppkoodoniga TAG (Bp ^r)	Tegova jt., 2004
pRK2013	Kojugatsiooni abi-plasmiid (Km ^r)	Figurski ja Helinski, 1979
pKT204	Kloneerimisvektor (Amp ^r)	Bagdasarian jt., 1983
pGP704mutS::km	pGP704L plasmiid, mis sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeniga katkestatud <i>mutS</i> geeni (Km ^r , Bp ^r)	Saumaa jt., 2006
pJP5603-I-SceI _{v2}	I-SceI restriktionisaite ja multikloneerimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid (Km ^r)	Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011

2.2.2 UvrD ja geeni *PP3681* pool kodeeritud helikaasi defektsete tüvede konstrueerimine

2.2.2.1 *uvrD* geeni deletsiooniga *P. putida* tüvede konstrueerimine

$\Delta uvrD$ tüvede saamiseks kasutasime Podfai jt. (1999) ja Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud meetodit.

$\Delta uvrD$ tüvede saamiseks amplifitseerisime PCR-ga geeni eelse ning geeni järgse ala, vastavalt TS1 (*target sequence 1*) ja TS2 (*target sequence 2*), mis olid mõlemad umbes 600 aluspaari pikad. Amplifikatsiooniks kasutasime *Phusion* polümeraasi, praimereid UvrDTS1F ja UvrDTS1R ning UvrDTS2F ja UvrDTS2Rev (tabel 2), kus praimer UvrDTS1R 5' ots sisaldas UvrDTS2F praimeriga komplementaarset järjestust, et järgnevas etapis oleks võimalik TS1 ja TS2 fragmendid „*Sewing*” PCR-ga omavahel kokku liita TS1TS2 fragmendiks. TS1TS2 fragmendi saamiseks tegime PCR'i, kus kasutasime praimereid UvrDTS1F ja UvrDTS2Rev ning *Phusion* polümeraasi. Saadud liitfragmendi kloneerisime plasmiiidi pJP5603-I-SceI_{v2} (Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011). Nimetasime vastava plasmiiidi pJPUvrD-ks. Plasmiiidi ja fragmendi lõikamisel kasutasime firma „Fermentas” restriктаasi. TS1TS2 fragmendiga plasmiiidi selekteerisime *E. coli* tüves CC118λpir kanamütsiini sisaldaval söötmel. Seejärel amplifitseerisime TS1TS2 fragmenti PCR-ga, kasutades praimereid Fw ja Rev (tabel 2) ning sekveneerisime, kasutades praimereid Fw ja Rev. Sekveneerimise eesmärgiks oli teada saada võimalikest mutatsioonidest TS1TS2 fragmendis. Järgnevalt viisime mutatsioonivaba TS1TS2 fragmendiga pJP5603-I-SceI_{v2} plasmiiidi konjugatsiooni teel bakterisse *P. putida*, kus plasmiid ei replitseeru ning plasmiid inserteerub homoloogilise rekombinatsiooni teel bakterikromosoomi. Tekkinud kointegraadiga rakke selekteerisime Glc-Km söötmel, millel olid võimelised kasvama ainult kointegraati sisaldavad *P. putida* rakud. Seejärel kontrollisime kointegraadi olemasolu praimeritega UvrDTS1F ja UvrDTS2Rev. Järgnevalt viisime rakkudesse elektroporatsiooni teel I-SceI nukleaasi ekspresseeriva plasmiiidi pSW(I-SceI) (Wong ja Mekalanos, 2000), kasutades seleksiooniks Bp-d sisaldavat glükoosi tardsöödet. pSW(I-SceI) tekitas lõiked I-SceI restriksioonisaitides kromosoomi integreerunud plasmiidis pJPUvrD, mille tulemusena peaks umbes pooltest rakkudest elimineeruma plasmiid koos *uvrD* geeniga. Külvasime kolooniaid paralleelselt Bp ja Km sisaldavatele minimaalsöötmetele, kus meid huvitavad rakud ei kasvanud kanamütsiini sisaldaval söötmel. *uvrD* deleteerumise kontrollimiseks tegime PCR-i, kasutades praimereid *uvrD*ylem ja *uvrD*sis.alum. Kasvatasime rakke üleöö 5 ml glükoos-CAA vedelsöötmes 30° C loksutil, et pSW plasmiidist rakkudes lahti saada.

Üleöökultuuridest tegime 10^{-6} lahjenduse ning plaatisime glükoosi sisaldavale tardsöötmele. Tekkinud kolooniatele tegime paralleelkülvi glükoosi sisaldavale söötmele ning bensüülpenitsilliini ja glükoosi sisaldavale söötmele, kus viimasel meid huvitavad rakud enam kolooniaid moodustada ei saa, sest neil puudub pSW plasmiid. Bensüülpenitsilliini tundlikke kolooniaid kontrollisime PCR-ga, kasutades primereid pSW-F ja pSW-R ning uvrDylem ja uvrDsis.alum.

2.2.2.2 PP3681 geeni deletsiooniga *P. putida* tüvede konstrueerimine

$\Delta PP3681$ tüve konstrueerimisel kasutasime eelpool mainitud Podfai jt. (1999) ja Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud meetodit. *PP3681* geeni-eelse ning geeni-järgse ala amplifitseerimiseks kasutasime primereid PP3681TS1F ja PP3681TS1R ning PP3681TS2F ja PP3681TS2R. TS1TS2 framendi tegemiseks kasutasime primereid PP3681TS1F ja PP3681TS2R. pJP5603-I-SceI_{v2} ja TS1TS2 fragmendi lõikamiseks kasutasime restriktase EcoRI ja XbaI, ülejäänud meetoodika oli identne $\Delta uvrD$ tüvede konstrueerimisega. Geeni deleteerumist kontrollisime PCR-ga, kasutades primereid PP3681TS1F ja PP3681kontroll.

2.2.2.3 *uvrD* ja *PP3681* geeni deletsiooniga *P. putida* tüvede konstrueerimine

PaW $\Delta uvrD\Delta PP3681$ tüve konstrueerimiseks viisime PaW $\Delta uvrD$ tüvesse elektroporatsiooni teel sisse plasmidi pJPPP3681. Järgenev meetoodika oli identne eelpool mainitud $\Delta PP3681$ ja $\Delta uvrD$ tüvede konstrueerimisega. Geenide deleteerumist kontrollisime PCR-ga, kasutades primereid PP3681TS1F ja PP3681kontroll ning UvrDylem ja UvrDsis.alum.

2.2.3 *mutS* defektsete tüvede konstrueerimine

mutS::km tüvede konstrueerimiseks kasutasime plasmidi pGP704*mutS::km* (Saumaa jt., 2006), kus plasmidi pGP704L viidud *mutS* geen on katkestatud kanamütsiini resistentsusgeeniga. Plasmidi viisime *P. putida*-sse konjugatsiooni teel. Transkonjugante selekteerisime glükoos-kanamütsiin söötmel ning kasvasime üleöö temperatuuril 30° C juures. Transkonjugandid külvasime paralleelselt kanamütsiini, bensüülpenitsilliini või rifampitsiini sisaldavatele glükoosi tardsöötmetele. *mutS* defektsetel tüvedel on resistentsus kanamütsiini vastu ning kuna *mutS* defektsetel tüvedel on spontaanne mutatsioonisagedus kõrge, on nad võimelised moodustama kolooniaid Rif-i sisaldaval söötmel. Meid huvitavatel kolooniatel pidi pGP704L plasmiid olema elimineerunud ning resistentsus bensüülpenitsilliini vastu puuduma, mistõttu nad Bp-d sisaldaval söötmel kasvada ei saa. Eelmainitud omaduste

põhjal valisime välja meid huvitavad kolooniad, mida kontrollisime PCR-ga, kasutades praimereid PpmutSSD ja KmOc2.

2.2.4 Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutasime „*FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*”-i. Selleks kasvasime plasmidi sisaldavaid *E. coli* CC118λpir rakke üleöö 5 ml LB-söötmes, kuhu oli lisatud plasmidi selektsiooniks vajalik antibiootikum. Seejärel tsentrifugisime 1-4 ml rakukultuuri 60 sekundiga tuubi põhja. Tsentrifugimise järgselt eemaldasime supernatandi ning lisasime 200 µl FAPD1 puhvrit, millele oli lisatud RNAas A. Suspendeerisime segu ja rakkude lüüsimiseks lisasime 200 µl FADP2 puhvrit ning pöörasime tuube aeglaselt, et rakud lüüsuksid. Järgnevalt inkubeerisime tuube toatemperatuuril 2 minutit. Seejärel lisasime 300 µl FAPD3 puhvrit ning segasime kiiresti lüsaadiga. Siis tsentrifugisime tuube 5 minutit täispööretel. Tõstisime supernatandi ettevaatlikult kollektor-tuubi asetatud kolonni ning tsentrifugisime 30 sekundit. Eemaldasime kollektor-tuubi tekkinud vedeliku. Seejärel lisasime 400 µl W1 puhvrit kolonni ning tsentrifugisime 30 sekundit ja eemaldasime jällegi kollektor-tuubi tekkinud vedeliku. Siis lisasime kolonni 600 µl pesupuhvrit (*Wash Buffer*). Tsentrifugisime 30 sekundit ning eemaldasime kollektor-tuubist vedeliku. Järgnevalt tsentrifugisime veel 3 minutit, et kolonni vedelikust kuivatada. Siis asetaskime FAPD kolonni uude 1,5 ml tuubi ning lisasime 75 µl elueerimispuhvrit (*Elution Buffer*) FAPD kolonni membraani keskele. Lasime tuubidel toatemperatuuril 2 minutit seista ning tsentrifugisime 1 minuti täispööretel, saades 1,5 ml tuubi DNA eralduse.

Kõik tsentrifugimised viisime läbi maksimumpööretel (13400 pööret/min), kasutades firma „Eppendorf” lauatsentrifuugi „Mini Spin”.

DNA restriksiooniks kasutasime firma „Fermentas” ensüüme. Reaktsioonid viisime läbi tingimustel, mis olid vastavuses ensüüme tootva firma koostatud kataloogi informatsiooniga.

2.2.5 Bakterite konjugatsioon

Bakterite konjugatsiooni meetodit kasutasime pJPuvrD ja pJPPP3681 plasmiidide viimiseks *E. coli*-st *P. putida*-sse ning plasmidi pGP704mutS::km üleviimiseks *P. putida*-sse.

Bakterite konjugatsiooniks kasvasime retsipienttüve, helperplasmidi RK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101 ning vajaliku plasmiidiga *E. coli* tüve CC118λpir üleöö LB-vedelsöötmes, millele oli lisatud plasmidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi. Seejärel

lahjendasime üleöö kasvanud kultuurid tiheduseni $A_{580} = 0,1$ antibiootikumivabasse LB-söötmesse ning kasvasime rakke eksponentsiaalse kasvufaasi tiheduseni $A_{580} = 0,6-0,8$. Seejärel segasime igast tüvest (doonor, retsipient, helper) 100 μ l kokku ning kandsime segu LB-tardsöötmele. Konjugatsioon toimus üleöö temperatuuril 30° C. Järgnevalt suspendeerisime rakukultuuri 1 ml 1 x M9 lahuses ning plaatisime sellest 100 μ l selektiivsöötmele, millel saaksid kasvada ainult meid huvitavad transkonjugandid.

2.2.6 Elektroporatsioon

E. coli rakkude elektroporatsiooniks kasutasime muudatustega Sharma ja Schimke (1996) meetodit. *E. coli* tüvesid kasvasime üleöö 1,5 ml LB-vedelsöötmes ning kompetentide saamiseks lahjendasime üleöö kultuuri optilise tiheduseni $A_{580} = 0,1$ ja kasvasime loksutil 1,5-2 tundi optilise tiheduseni $A_{580} = 1-1,5$. Tsentrifugisime kogu rakukultuuri 45 sekundit ning eemaldasime söötme. Pesime *E. coli* rakke kaks korda 700 μ l 10%-se külma glütserooliga ja suspendeerisime rakud 50 μ l 10% glütseroolis üles. Tsentrifugisime rakususpensiooni temperatuuril 4° C täispööretel ning tsentrifuugimiste vahepeal hoidsime rakke jääl.

P. putida rakkude puhul kasutasime elektroporatsiooniks Choi jt. (2006) meetodit. Selleks kasvasime *P. putida* rakke 1,5 LB-söötmes. Tsentrifugisime 200-500 ml üleöö kultuuri 45 sekundiga täispööretel põhja ning eemaldasime söötme. Rakke pesime 2 korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega. Suspendeerisime rakud üles 50 μ l-s 300 mM sahharoosi lahuses.

Kompetentsetele *E. coli* või *P. putida* rakkudele lisasime 100-500 ng plasmiidset DNA-d. Elektroporatsiooni viisime läbi firma „BioRad” elektroporaatoriga „*E. coli* Pulser” pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisasime rakkudele 1,5 LB-vedelsöödet ning kasvasime kultuuri ligikaudu 1 tunni loksutil. Seejärel tsentrifuugisime rakud 45 sekundiga täispööretel põhja, eemaldasime suurema osa söötimest ning plaatisime kultuuri selektiivsele tardsöötmele.

2.2.7 PCR

PCR-i ehk polümeraasi ahelreaktsiooni maht oli 15-20 μ l. Reaktsioonisegu sisaldas 1 x PCR-i puhvrit (10 x puhvri koostis oli: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Triton X 100; 0,5% Ficoll 40; 1 mM tartrasiin; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP-d) 0,5 ühikut professor Juhan Sedmani laboris puhastatud Taq polümeraasi ja praimerid kontsentratsiooniga 10 pmol reaktsiooni kohta. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on

toodud tabelis 3. PCR-i segule lisasime bakterirakke või ligikaudu 10 ng eraldatud DNA-d. PCR-i teostasime firmade „Biometra“ ja „Fermentas“ PCR-i masinatega. PCR programmi tingimused olid: DNA denaturatsioon 96° C 30 sekundit kuni 1 minut, praimerite seondumine temperatuuril 56-63° C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72° C 30 sekundit kuni 1,5 minutit. Tingimused sõltusid vastavalt amplifitseeritava DNA pikkusest, praimerite oligonukleotiidsest järjestusest ning DNA polümeraasist. Reaktsioon toimus kokku 25-30 tsükli.

Kloneerimiseks kasutatavate PCR produktide sünteesimiseks lisasime PCR reaktsiooni Taq polümeraasi asemel *Phusion* polümeraasi, mis erinevalt Taq-ist omab 3'-5' endonukleaaset aktiivsust. PCR reaktsiooni tingimused olid samad, mis Taq polümeraasi kasutades, välja arvatud DNA sünteesi pikkus 72° C juures, mis jäi vahemikku 15-40 sekundit ning praimerite seondumise aeg, mis oli 8 sekundit.

Tabel 3. Kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus	Seondumiskoht
UvrDTS1F	5'-ATAGGTACCGCATGATGACCAAGAG CCCA-3'	Sisaldab 5' otsas KpnI lõikesaiti, komplementaarne <i>uvrD</i> geeni eelse alaga positsioonides -534 kuni -514.
UvrDTS1R	5'-AAAGTTGGCAGGCCCGACGCCGGGT AAGGGGCAAATA-3'	Komplementaarne <i>uvrD</i> geeni eelse alaga positsioonides -38 kuni -20 ja sisaldab UvrDTS2F praimeriga komplementaarset osa, suunaga geenist eemale.
UvrDTS2F	5'-GTCGGGCCTGCCAACTTT-3'	Komplementaarne <i>uvrD</i> geeni järgse alaga positsioonides +11 kuni +29 suunaga geenist eemale.
UvrDTS2Rev	5'-ATATCTAGACGACTGGAAGTGGTTAC GGG-3'	Sisaldab 5' otsas XbaI lõikesaiti, komplementaarne <i>uvrD</i> geeni järgse alaga positsioonides +672 kuni +652 suunaga geeni poole.
PP3681TS1F	5'-ATAGAATTCGCGCCATGTCAATCACT	Sisaldab 5' otsas EcoRI lõikesaiti,

	TCT-3'	komplementaarne geeni <i>PP3681</i> eelse alaga positsioonides -593 kuni -574.
PP3681TS1R	5'-CGCACAGATTGGTTGAGAGCTCACTC GGGAGATTCCTCA-3'	Komplementaarne geeni <i>PP3681</i> sisese ning eelse alaga positsioonides 4 kuni -15 ning sisaldab PP3681TS2F praimeriga komplementaarset osa, suunaga geenist eemale.
PP3681TS2F	5'-GCTCTCAACCAATCTGTGCG-3'	Komplementaarne geeni <i>PP3681</i> järgse alaga positsioonides +1 kuni +21.
PP3681TS2R	5'-ATATCTAGAGGTGAGGGATTCTGCGT CTT-3'	Sisaldab 5' otsas XbaI lõikesaiti, komplementaarne geeni <i>PP3681</i> järgse alaga positsioonides +590 kuni +570 suunaga geeni poole.
PP3681kontroll	5'-CGCGAACAACGCTCCATGCA-3'	Komplementaarne geeni <i>PP3681</i> sisese alaga positsioonides 73 kuni 53 suunaga geeni alguse poole.
PpmutSSD	5'-GTACCATTACGGGTTTACTACCAT-3'	Komplementaarne <i>P. putida</i> geeni <i>mutS</i> eelse alaga positsioonides 31 kuni 51 suunaga geeni alguse poole.
KmOc2	5'-GTTGAATATGGCTCATAACACC-3'	Komplementaarne kanamütsiini resistentsusgeeni eelse alaga positsioonides -6 kuni geenisisese alaga positsioonides 16 suunaga geenist eemale.
psW-F	5'-GGACGCTTCGCTGAAAATA-3'	Komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole.
pSW-R	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAA-3'	Komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega,

		suunaga multikloneerimisjärjest use poole.
UvrDylem	5'-ATGCGCACAGACGACCTCT-3'	Komplementaarne <i>uvrD</i> geeni ATG piirkonnaga 1-19, suunaga geeni sisse.
UvrDsis.alum	5'-GATGGTTTCCACGACATAGC-3'	Komplementaarne <i>uvrD</i> geeni-ga positsioonides 1000-1019 initsiaator-koodon ATG-st, suunaga geeni sisse.
pheABamei	5'-AAGGCGCTCCCGTAAGACA-3'	Komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni -40 initsiaator-koodon ATG-st, suunaga geeni poole.
pheAtsII	5'-GTTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	Komplementaarne <i>pheA</i> geeni alaga positsioonides 295-313 nukleotiidi allavoolu translatsiooni startkoodonist ATG.

2.2.8 Geelelektroforees

Geelelektroforeesi kasutasime PCR produktide, eraldatud plasmiidse DNA ja DNA fragmentide pikkuse hindamiseks. Plasmiidsele DNA-le lisasime värvimiseks 0,04% broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis (20 µl DNA kohta 4µl), PCR produktidel oli juba eelnevalt värv 10 x PCR puhvis olemas. Proovid kandsime 1%-sele horisontaalsele agarosgeelile 1 x TAE puhvis (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldas 0,4 µg/ml etiidiumbromiidi. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutasime firma „Fermentas” markerit „ZipRuler Express DNA Ladder 2”. Elektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril pingel 10-15 V/cm 10 minuti jooksul. Geeli pildistasime ultravioletvalguses.

2.2.9 DNA sekveneerimine

Enne DNA sekveneerimiseks ettevalmistavat reaktsiooni eemaldasime reaktsioonisegust DNA sünteesist järele jäänud praimerid ja nukleotiidid. Selleks töötlesime reaktsioonisegu aluselise fosfataasi (SAP; 1 U/µl) ja eksonukleas I-ga (ExoI; 2,5 U/µl), reaktsiooni mahuks oli 10 µl. Reaktsioon toimus 30 minutit temperatuuril 37° C, millele järgnes ensüümide inaktiveerimise etapp 15 minutit temperatuuril 80° C.

Sekvenerimise proovid valmistasime ette kitiga „*Big Dye Terminator v3,1 Cycle Sequencing kit*” firmalt „Applied Biosystems”. Reaktsioonisegusse lisasime 1 µl eelnevalt töödeldud produkti ning ühe paimeri (Fw või Rev).

DNA järjestused määrati firma „Applied Biosystems” 3730x1 kapillaarsekvenaatoriga.

2.2.10 Mutatsioonide tekkesageduse määramine plasmiidse TAG testsüsteemiga

Asendusmutatsioonide tekkesageduse määramiseks *P. putida* rakkudes kasutasime plasmiidset asendusmutatsiooni tuvastavat pKTpheA22TAG testsüsteemi, kus fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* on viidud TAG stopp koodon (Tegova jt., 2004). TAG testsüsteem võimaldab uurida reparatsioonisüsteemide osalust nälgivas bakteripopulatsioonis. Selles testsüsteemis on plasmidi pKT240 viidud geen *pheA*, mille 22. koodon (leutsiin) on asendatud stoppkoodoniga TAG ning vastava geeni transkriptsioon on indutseeritud konstitutiivse promootoriga. Bakterid saavad hakata kasvama fenooli sisaldaval süsinikuallikal, kui on tekkinud mutatsioon, mis muudab ära stopp koodoni.

Mutatsioonide tekkesageduse määramiseks viisime plasmidi pKTpheA22TAG uuritavatesse *Pseudomonas putida* tüvedesse elektroporatsiooni teel. Plasmidi sisaldavaid rakke selekteerisime bensüülpenitsilliini sisaldaval glükoosi tardsöötmele. Plasmidi olemasolu rakkudes kontrollisime PCR-ga, kasutades primereid pheAtsII ja pheABamei.

Järgnevalt kasvasime rakke 1 ml-s glükoos-CAA vedelsöötmes, kuhu lisasime bensüülpenitsilliini 5 µg/ml. 6 tunni möödudes tegime tüvedest 10^{-6} lahjendused ning kasvasime 20-24 tundi 2,3 ml-s Glc-CAA minimaalsöötmes. Kõiki tüvesid välja arvatud PaWmutS plaatisime 500 µl (ligikaudu 1×10^8 rakku) fenooli ainsa süsinikuallikana sisaldavale minimaalsöötmele. Tüve mutS::Km puhul plaatisime 50 µl testsüsteemi sisaldavaid rakke koos 450 µl taustarakkudega (PaW tüvi, mis sisaldas plasmidi pKT240), et plaaditud rakkude hulk selektiivsöötmele oleks võrreldav teiste tüvede omaga. Phe⁺ mutantide teket jälgisime 2-10 päeva jooksul. 3-10 päeval (statsionaarses faasis) tekkinud mutantide tekkesageduse arvutasime tassil olevate testsüsteemi sisaldavate elusrakkude kohta.

Tulemusi analüüsisime “*STATISTICA 10*” programmiga, analüüsid tüvede mutatsioonisagedust ühepoolse (*one-way*) ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. P-väärtused leidsime Bonferroni testiga programmis Post-hoc.

2.2.11 Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine

Spontaansete mutatsioonide tekkesageduse määramiseks kasvasime meid huvitavaid *P. putida* tüvesid 1 ml Glc-CAA minimaalsöötmes 4-6 tundi, tegime kultuuridest 10^6 lahjendused ning kasvasime rakke 2,3 ml glükoos-CAA minimaalsöötmes 20-24 tundi. Järgnevalt plaatisime igast kultuurist 10-500 μ l rifampitsiini sisaldavale LB-tardsöötmele. Tasse inkubeerisime temperatuuril 30° C ning kolooniaid loendasime 1-2 päeva jooksul. Üleöö kasvanud vedelkultuurides määrasime elus olevate rakude arvu. 2 päeva jooksul tekkinud mutantide tekkesageduse arvutasime 1 ml üleöö kultuuris olevate rakkude kohta.

Tulemusi analüüsisime “*STATISTICA 10*” programmiga, analüüsidest tüvede mutatsioonisagedust ühepoolse (*one-way*) ANOVA-ga usaldusnivool 0,05. P-väärtused leidsime Bonferroni testiga programmis Post-hoc.

2.2.12 UV-kiirguse talvuskatse

UV-kiirguse talvuse uurimiseks kasvasime *P. putida* tüvesid temperatuuril 30° C üleöö 1,5 ml glükoos-CAA minimaalsöötmes. Üleöökultuuridest tegime 1 x M9-s 10-kordsed lahjenduste read, kandsime glükoosi sisaldavale tardsöötmele 10 μ l täpid ning lasime täppidel ära kuivada. Seejärel kiiritasime tase lainepikkusel 254 nm doosidega 0-30 J/m², kasutades firma „Stratagene” masinat „UV-stratalinker 1800”. Kiiritamise järgselt hoidsime tase 30° C termostaadis 1-2 päeva.

2.2.13 Kemikaalide tundlikkuse katse

Selleks, et määrata bakterite tundlikkust DNA-d kahjustavate kemikaalide suhtes kasvasime rakke üleöö loksutil 1,5 ml LB-söötmes. Üleöökultuuridest tegime 20x lahjendused ning kasvasime rakud eksponentsiaalsesse kasvufaasi. Statsionaarse ja eksponentsiaalse kasvufaasi rakukultuuridest tegime 10x lahjenduste read ning kandsime lahjendused 10 μ l täppidena erinevaid kemikaale sisaldavatele tassidele. Tasse inkubeerisime temperatuuril 30° C 2 päeva ning hindasime rakkude kasvu tassidel.

Kasutasime järgnevaid kemikaale: metüül metaansulfonaat (MMS), mitomütsiin C (MMC), nitrokinoliin (NQO), 1-metüül-3-nitro-1-nitrosoguanidiin (MNNG) ning Paraquat.

2.2.14 Rakkude elumuse määramine

Bakterirakkude elumuse määramiseks TAG testsüsteemi katses lõikasime steriilse 1 ml pipetiotsikuga fenooli sisaldavalt selektiivsöötmele tüki, millele olid plaaditud TAG testsüsteemi sisaldavad rakud. Saadud agaritüki aetasime 1 ml 1x M9 sisaldavasse 1,5 ml

tuubi ning loksutasime 30° C termostaadis 20 minutit 800 pööret/min, et rakud agaritüki küljest lahti tuleksid. Järgnevalt tegime 10-kordsed lahjendused ning kandsime lahjendused glükoosi sisaldavatele minimaalsöötmetele, mis sisaldasid testsüsteemi sisaldavate rakkude selektsiooniks vajalikku antibiootikumi bensüülpenitsilliini (Bp-d). Tasse hoidsime 30° C juures 1-2 päeva, et kolooniad piisavalt suureks kasvaksid. Tassile tekkinud kolooniate arvust ja tehtud lahjenduste astmest lähtudes arvutasime tassil olevate elusrakkude arvu.

Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramiseks katses tegime üleöö kasvanud vedelkultuurist 10-kordsed lahjendused 1xM9-s. Lahjendused kandsime 10 µl täppidena LB-d sisaldavale tardsöötmele. Lähtudes tardsöötmele tekkinud kolooniate arvust ja lahjendusfaktorist arvutasime rakkude elumuse 1 ml üleöö kultuuri kohta ja arvutasime mutatsioonisageduse ümber 10⁻⁹ raku kohta.

2.2.15 Rakkude värvimine ja fenotüübi vaatamine mikroskoobiga

Rakkude värvimiseks võtsime tuubi 3 µl meid huvitavate tüvede rakususpensiooni ja segasime selle 3 µl interkaleeruvate ühendite seguga (LIVE/DEAD BacLight kit, Invitrogen), mis sisaldas 10 µM SYTO9-t ja 60 µM propiidiumjodiidi (PI) segatuna destilleeritud veega. Järgnevalt hoidsime tuube 10 minutit toatemperatuuril pimedas. Seejärel kandsime 6 µl segu glükoosi ainsa süsinikuallikana sisaldavale agarsöötmele ning lasime neil ära kuivada. Lõikasime värvitud rakke sisaldava agari tüki söötmelt välja ning asetasinge alusklaasile ja katsime katteklasaasiga. Rakukultuuri vaatamiseks kasutasime Olympus BX 41 epifluorestsents mikroskoopi. Proovi ergastasime 470 nm lainepikkuse juures ning vaatlesime 1000x suurendusega.

2.2.16 *P. putida* helikaaside valkude joondamine ja virtuaalne analüüs

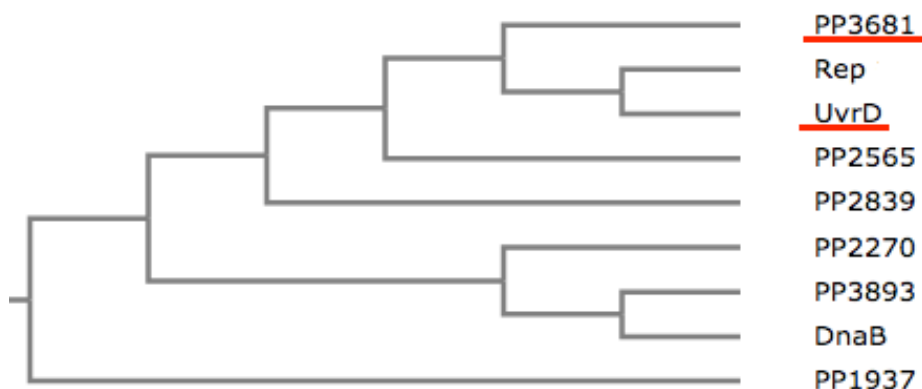
Joondasime meie PaW tüvega identse *P. putida* tüve KT2440 helikaaside valgujärjestused. Valgujärjestused saime andmebaasist *Pseudomonas* genoomi andmebaas (*Pseudomonas Genome database*) (www.pseudomonas.com). Fasta formaadis järjestused joondamise Clustal Omega joondusprogrammis (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> 06.05.2015). Joondusprogrammi väljundina kasutasime „Clustal w/o numbers”.

2.3 Tulemused

2.3.1 *P. putida* helikaaside valkude joondamine ja virtuaalne analüüs

Eelnevalt on meie töörühmas leitud, et UvrD puudumisel ei tõuse mutatsioonisagedus sama palju kui MutS-i puudumisel (Tark, 2006). MutS-i puudumisel on aga MMR täielikult seiskunud ning valepaardumisi DNA-st ei eemaldata. Sellisest tulemusest saab järeldada, et MMR funktsioneerib UvrD puudumise korral ning bakteris *Pseudomonas putida* osaleb MMR-is lisaks UvrD-le veel teinegi helikaas. Kuigi eelnevalt on UvrD-d asendavaks helikaasiks pakutud geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi (Tark, 2006; Saumaa jt., 2006; Tark jt., 2008), on vahepeal andmebaas täienenud, mille tõttu otsustasime joondada *P. putida* helikaaside valgud, selgitamaks välja UvrD-ga kõige suuremas suguluses olevad helikaasid. Valgujärjestused võtsime *Pseudomonase* Genoomi andmebaasist (www.pseudomonas.com) ning joondamiseks kasutasime Clustal Omega joendusprogrammi (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

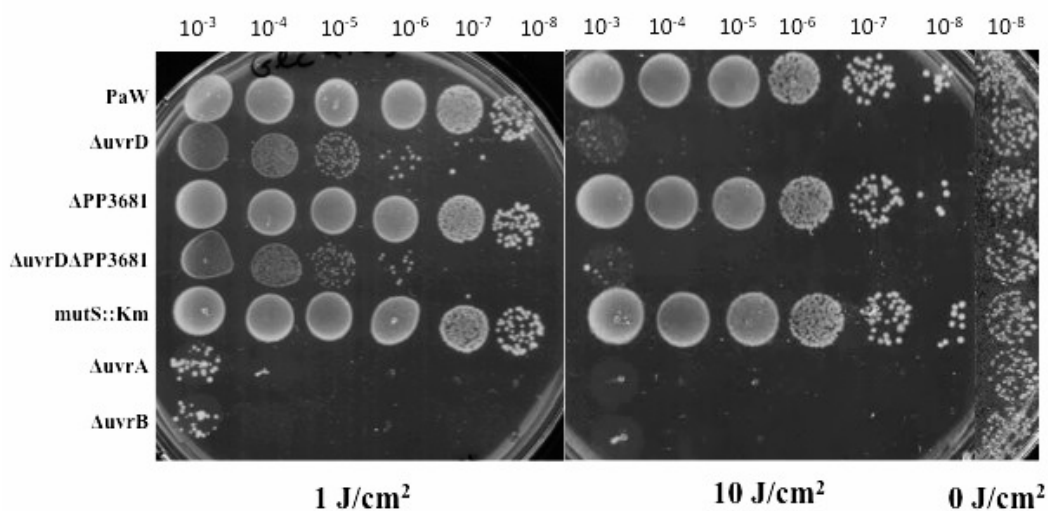
Joendusprogrammiga saime valgujärjestuste fülogeneesipuu (joonis 7), millelt on näha, et UvrD-ga on kõige lähemas suguluses helikaasid Rep ning *PP3681* geeni poolt kodeeritud helikaas, identsusprotsentidega 37,65 ja 25,19. Kuigi Rep defektsus rakkudele surma ei põhjusta, põhjustab defektsus siiski näiteks bakteris *E. coli* rakkude kasvuhäireid ja ebanormaalselt kõrget DNA kogust raku kohta. Lisaks on nähtud *repuvrD* topeltdeletsiooni letaalsel mõju rakkudele, mille tõttu ei ole võimalik Rep ja UvrD topeltdefektseid tüvesid konstrueerida (Washburn ja Kushner, 1991). Seetõttu valisime edasisteks katseteks geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi, mida me antud töös nimetame PP3681 helikaasiks.



Joonis 7. *P. putida* helikaaside juuritud fülogeneesipuu. Puu on saadud *P. putida* helikaaside valgujärjestuste joondamisel Clustal Omega joendustööriistaga (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.3.2 *P. putida uvrD* ja *PP3681* defektsete tüvede tundlikkus UV-kiirgusele

Bakterites eemaldab UV-kiirgusest tekkinud kahjustused peamiselt NER, mida on palju uuritud bakteris *E. coli*. Soovisime näha, kas sama mehhanism kehtib ka bakteris *P. putida*. Lisaks soovisime teada saada, kas ka helikaas *PP3681* osaleb NER-is. Seetõttu võrdlesime *UvrD* ja *PP3681* defektsete tüvede UV-kiirguse tundlikkust metsiktüvega PaW85. Selleks, et näha, kas *PP3681* puudumine lisaks *UvrD* puudumisele suurendab UV tundlikkust, testisime ka topeltdeletandi UV-kiirguse tundlikkust. Katsetesse võtsime ka *uvrA* ja *uvrB* deletsiooniga tüved, kus NER on defektne ja selle tõttu on tüved väga tundlikud UV-kiirgusele. Eelnevalt on meie töörühmas nähtud, et *uvrA* või *uvrB* deleteerimisel *P. putida* kromosoomist tekivad kahe fenotüübiga rakud: mitteadapteerunud, mis moodustavad filamente, ja adapteerunud, mis sarnaselt metsiktüvega PaW85 filamente ei moodusta (Sidorenko jt., 2015). Kuna UV-kiirguse taluvuses nendel kahel tüvel erinevust ei olnud, on meie katses kiiritatud adapteerunud *UvrA* ja *UvrB* defektseid tüvesid. Lisaks kiiritasime ka *MutS* defektset PaWmutS tüve, mis ei peaks UV-kiirgusele tundlik olema, sest MMR UV-kahjustuste eemaldamises ei osale.



Joonis 8. *uvrD*, *PP3681*, *mutS*, *uvrA* või *uvrB* defektsete rakkude tundlikkus UV-kiirgusele. Eelmainitud tüvede elumus UV-kiirguse tasemetel 1 ja 10 J/cm². Võrdluseks on võetud 0 J/cm² (kiiritamata) rakkude 10⁻⁸ elumus, näitamaks, et erinevate tüvede UV-ga kiiritamata rakukultuuride kasvus erinevust ei olnud ning kõigis katsetes oli võrdne kogus rakke. Söötmele on pipeteeritud statsionaarse faasi bakterikultuuride 10-kordsed lahjendusread 10 µl kaupa.

Kuigi *UvrD* puudumisel olid bakterid väga tundlikud UV-kiirgusele võrreldes metsiktüvega PaW85, ei olnud *uvrD* defektne tüvi UV-kiirgusele sama tundlik kui *uvrA* ja *uvrB* defektsete tüved. Sellest saab järeldada, et kui *UvrA* ja *UvrB* puudumisel NER ei funktsioneeriks, siis *UvrD* puudumisel see reparatsioonimehhanism täielikult välja lülitatud ei

ole. PP3681 puudumisel rakkude tundlikkus UV-kiirgusele võrreldes metsiktüvega ei muutunud, milles saab järeldada, et vastav helikaas ei osale UV-kahjustuste eemaldamises. Metsiktüvest ei erinenud ka PaWmutS tüvi, mis on kooskõlas teadmiselega, et MMR ei osale UV-kahjustuste eemaldamises. Samuti on näha, et topeltdeletant PaW Δ uvrD Δ PP3681 on UV-kiirgusele sama tundlik kui *uvrD* deletsiooniga tüvi, millest võib järeldada, et UV-kiirgusest põhjustatud kahjustuste eemaldamises osaleb selles tüves ainult UvrD ning PP3681 puudumine seetõttu lisaefekti ei anna.

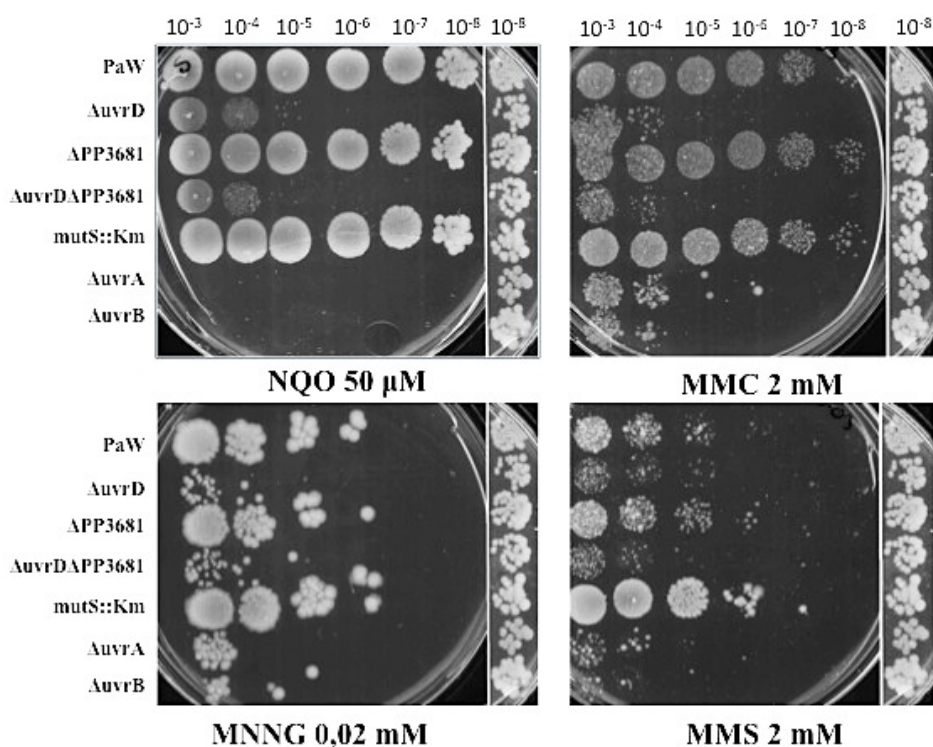
Ekspponentsiaalse faasi rakkude puhul me olulisi erinevusi UV taluvuses võrreldes statsionaarse faasi rakkudega ei näinud (andmed ei ole esitatud).

2.3.3 *P. putida uvrD* ja *PP3681* defektsete tüvede tundlikkus DNA-d kahjustavatele kemikaalidele

Selleks, et näha millistele kahjustele *uvrD* ja *PP3681* defektset tüved tundlikud on, tegime kemikaali taluvuse katse (peatükk 2.2.15). Selleks kasvasime UvrD ja PP3681 defektseid tüvesid erinevaid DNA kahjustusi tekitavate kemikaalide juuresolekul:

- MMC: põhjustab ristisirdeid DNA-s ja kaheaheelalisi DNA katkeid
- MMS: põhjustab DNA alküülkahjustusi (N-metüülatsioon)
- NQO: põhjustab kaheaheelalisi DNA katkeid, oksüdatiivseid kahjustusi ja DNA struktuurseid muutusi
- MNNG: põhjustab DNA alküülkahjustusi (N- ja O-metüülatsioon)

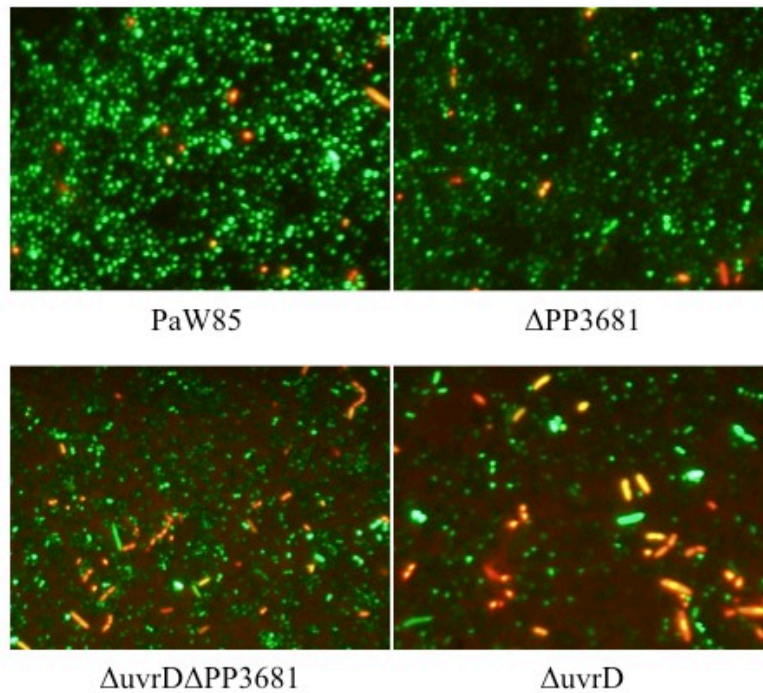
Katsetulemused viitasid sellele, et UvrD ja teised Uvr-valgud osalevad kõikide meie poolt kasutatud kemikaalidest põhjustatud kahjustuste eemaldamises. Ainsat erinevust UvrD ja teiste NER valkude defektsete tüvede puhul nägime nitrokinoliini (NQO) tundlikkuse osas, kus UvrD defektne tüvi talus seda võrreldes UvrA ja UvrB defektse tüvega paremini. Sellest saab järeldada, et NQO kahjustuste eemaldamises osaleb küll NER, kuid sel juhul UvrD puudumisel osaleb seal mõni teine helikaas. PP3681 defektne tüvi talus kemikaale võrreldes metsiktüvega PaW85 sarnaselt, millest saab järeldada, et kasutatud kemikaalidest tekkinud kahjustuste eemaldamises vastav helikaas ei osale. UvrD ja PP3681 topeltdeletandi ja *uvrD* defektse tüve sarnane kemikaalide talumine viitab samuti sellele, et PP3681 ei osale kasutatud kemikaalide poolt põhjustatud kahjustuste eemaldamises.



Joonis 9. MutS, PP3681 ja NER valkude defektsete tüvede tundlikkus kemikaalidele NQO, MMC, MNNG ja MMS. Tardsöötmele on kantud 10-kordsed lahjenduste read ning võrdluseks on toodud kemikaalita LB tardsöötmelega tassil 10^{-8} lahjendatud bakterikultuuride elumus.

2.3.4 *uvrD* ja *PP3681* deletsiooni mõju *P. putida* rakkude fenotüübile

Eelnevalt on meie töögrupis nähtud, et *uvrA* ja *uvrB* defektsetel tüvedel on rakujagunemine häiritud ning rakud filamenteeruvad (Sidorenko jt., 2015). Meid huvitas, kas UvrD või/ja PP3681 valgu defektsetel tüvedel esineb samuti rakujagunemise häireid, mis põhjustab rakkude filamenteerumist. Bakteriraku filamenteerumine on tavaliselt põhjustatud SOS-vastusest, mis viitab sellele, et raku on suurenenud DNA kahjustuste hulk. Rakkude fenotüübi vaatamiseks värvisime UvrD ja PP3681 defektsete tüvede rakke nukleiinhappega interkaleerivate ühenditega SYTO9 ja propiidiumjodiid ning vaatlesime rakke mikroskoobis 1000-kordse suurendusega (peatükk 2.2.14). SYTO9 pääseb oma väikeste mõõtmete tõttu rakumembraanist läbi ning seondudes DNA-ga põhjustab kahjustamata membraaniga rakkude fluorestseerumise roheliselt. Propiidiumjodiid on suur molekul, mis ei pääse oma mõõtmete tõttu rakumembraanist läbi, küll aga suudab ta siseneda läbi surnud rakkude rakumembraani või läbi kahjustatud membraani, mis on läbilaskvam. Propiidiumjodiid seob DNA-d tugevamalt kui SYTO9, mistõttu fluorestseeruvad kahjustatud membraaniga rakud ka SYTO9 juuresolekul punaselt.

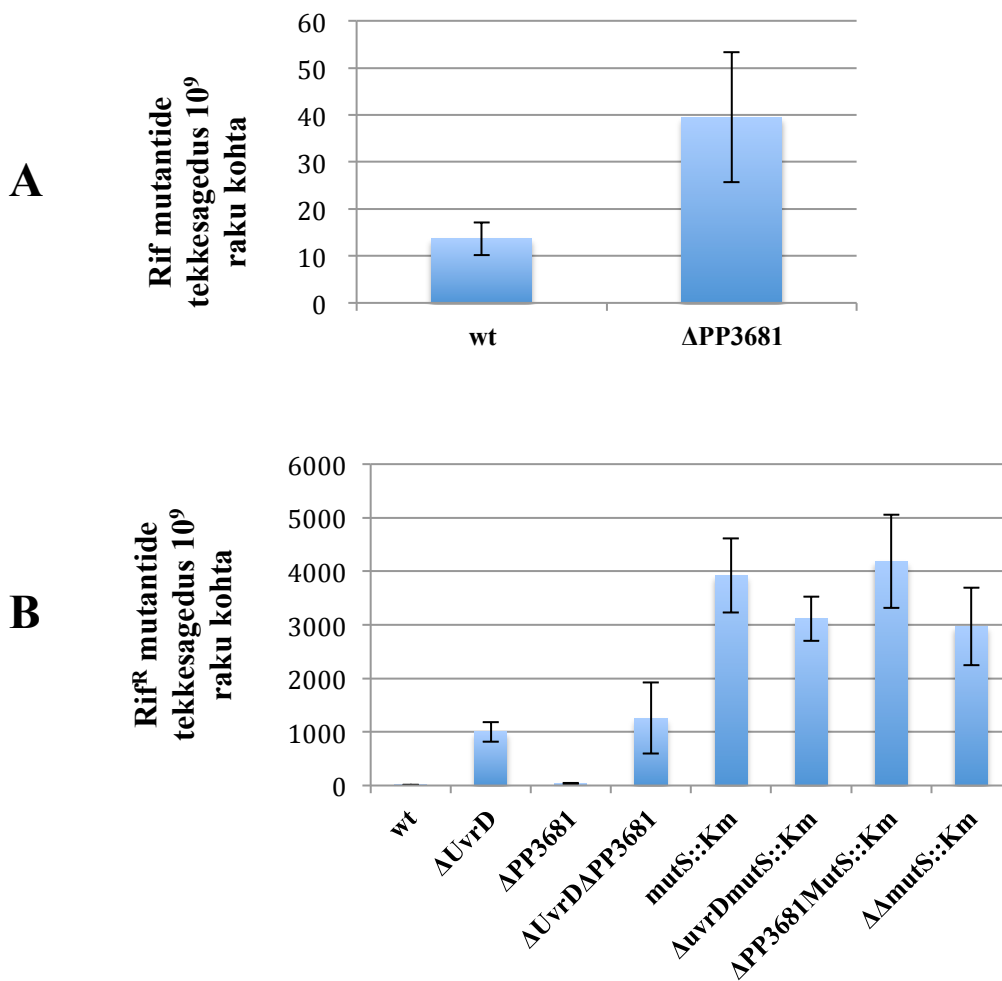


Joonis 10. „LIVE/DEAD BacLight kit”-ga värvitud UvrD ja PP3681 defektsed *P. putida* rakud. Kahjustamata membraaniga rakud on värvunud roheliselt, kahjustatud membraaniga ja surnud rakud punaselt. Rakke on pildistatud 1000-kordse suurendusega.

Rakkude fenotüübi vaatlemisel nägime, et UvrD defektne tüvi moodustab filamente ning *PP3681* defektne tüvi sarnaneb metsiktüübiga. Topeltdeletandi PaW Δ uvrD Δ PP3681 fenotüübi puhul nägime samasugust filamentide moodustamist nagu UvrD defektse tüve puhul, mis tähendab, et filamenteerumine on põhjustatud UvrD puutumisest.

2.3.5 *uvrD* ja *PP3681* deletsiooniga *P. putida* tüvede spontaansete mutatsioonide tekkesagedus

Selleks, et uurida, kas UvrD ja PP3681 defektsus mõjutab *P. putida* spontaanset mutatsioonisagedust, määrasime Rif^R mutantide tekkesageduse 2 päeva jooksul (peatükk 2.2.11). Rifampitsiin (Rif) on antibiootikum, millega saab tuvastada spontaansete mutatsioonide teket kasvavates rakkudes. Rif seondub RNA polümeraasi β -subühikuga RpoB, takistades seeläbi RNA sünteesi. Rakkude kasvamiseks Rif-i sisaldaval söötmel peab *rpoB* geen muteeruma, nii et RpoB ei seonu enam Rif-ga. Mida rohkem tekib Rif^R mutante, seda kõrgem on uuritava tüve mutatsioonisagedus. UvrD ja PP3681 osaluse selgitamiseks mutatsiooniprotsessides konstrueerisime UvrD ja PP3681 üksikmutandid ning MMR defektsed MutS ja UvrD või MutS ja PP3681 topeltdeletandid (peatükid 2.2.2 ja 2.2.3)



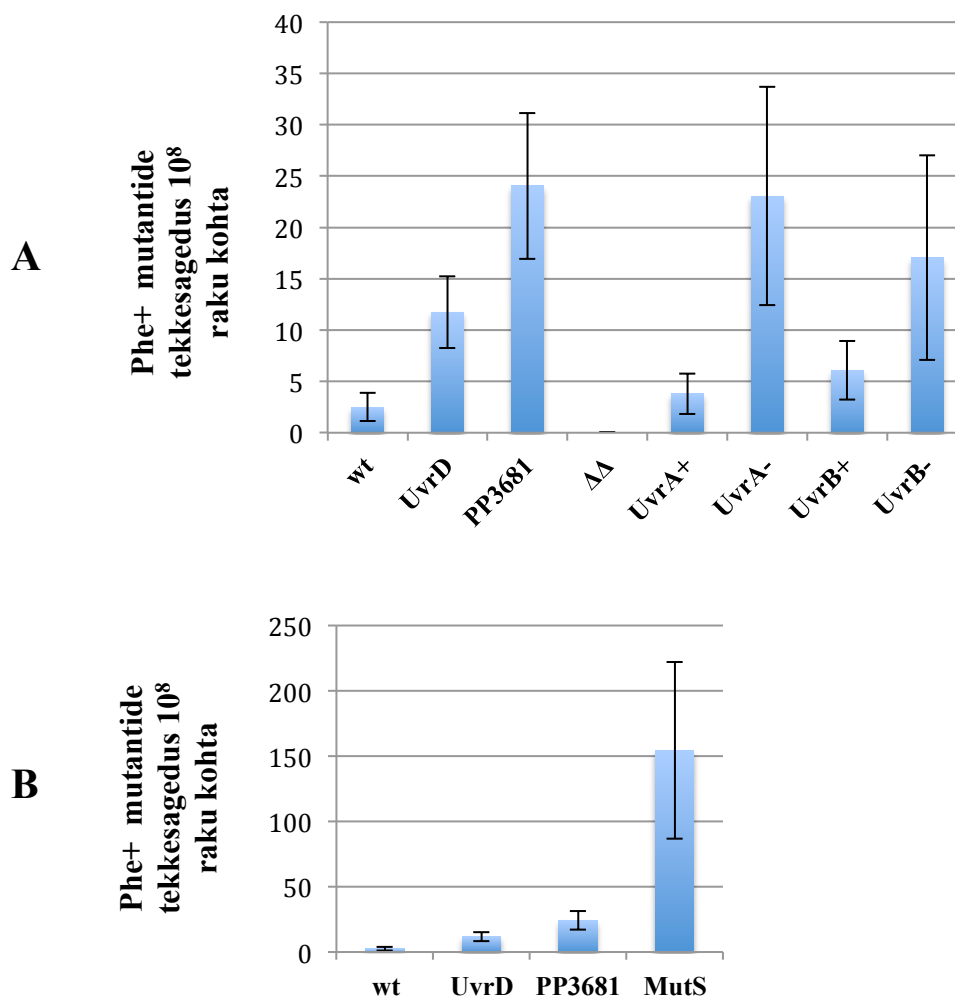
Joonis 11. Rif^R mutantide tekkesagedus erinevates *P. putida* DNA reparatsioonidefektsetes tüvedes. A) Rif^R mutantide tekkesagedus PP3681 defektsetes tüves ja metsiktüves PaW85 (wt); B) Rif^R mutantide tekkesagedus *P. putida* UvrD, PP3681 ja MutS defektsetes tüvedes ning metsiktüves PaW85 (wt) (“ΔΔ” tähistab joonisel *uvrD* ja *PP3681* geenide deletsiooni). Tulemused pärinevad kolmest sõltumatust katses, kus kahel päeval tekkinud mutantide koguarv on toodud tulpadena. Rif^R mutantide tekkesagedus on toodud 10⁹ raku kohta ning joonisel on esitatud 95% usalduspiirid.

Selgus, et kõikide katsesse võetud tüvede mutatsioonisagedused on metsiktüvega võrreldes statistiliselt oluliselt kõrgemad (p -väärtus $<0,05$). Selles katses täheldasime ka PP3681 puudmisel fenotüübilist efekti: Rif^R mutantide tekkesagedus oli PP3681 defektsetes tüves võrreldes metsiktüvega ligikaudu 3 korda suurenenud. Võrreldes PP3681 defektse tüve mutatsioonisagedusega oli aga UvrD defektse tüve mutatsioonisagedus ligikaudu 25 korda kõrgem ($p < 0,01$). UvrD üksikmutandi ja UvrD ning PP3681 suhtes topeltmutandi mutatsioonisagedustes erinevust ei olnud, kuid samas oli PP3681 üksikmutant tunduvalt madalama mutatsioonisagedusega kui topeltdeletant ($p < 0,01$). Selles võib järeldada, et UvrD ja PP3681 topeltdeletandi kõrgem mutatsioonisagedus on põhjustatud UvrD puudumisest. UvrD ja/või PP3681 defektsus PaWmutS tüves mutatsioonisagedust võrreldes MutS

üksikmutandiga oluliselt ei muutnud. Lisaks täheldasime, et UvrD ja PP3681 defektsete tüvede mutatsioonisagedused oli MutS-defektsete tüvede mutatsioonisagedustest oluliselt madalamad ($p < 0,01$), mis viitab jällegi MMR-i funktsioneerimisele äsjamainitud helikaaside puudumisel.

2.3.6 Statsionaarse faasi mutatsioonisagedus UvrD ja PP3681 defektsetes tüvedes

Statsionaarses faasis tekkinud mutatsioonide sageduse määramiseks kasutasime plasmiidset asendusmutatsiooni tuvastavat pKTpheA22TAG testsüsteemi. Testsüsteemis on fenooli monooksügenaasi geen *pheA* TAG stoppkoodon, mille tõttu peab TAG stoppkoodon muteeruma, et rakud fenoolil kasvada saaksid. Lisaks UvrD ja PP3681 defektsetele tüvedele võtsime katsesse UvrA ja UvrB geenide osas deletsioontüved $PaW\Delta uvrA^+$, $PaW\Delta uvrA^-$, $PaW\Delta uvrB^+$, $PaW\Delta uvrB^-$ tüved, et selgitada UvrD ja PP3681 defektsete tüvede mutatsioonisageduse sarnasust või erinevust võrreldes NER-i teostavate valkude UvrA ja UvrB puudumise korral. UvrA ja UvrB tüvedest võtsime katsesse nii adapteerunud (+) kui ka adapteerumata tüved (-) (vaata peatükki 2.3.2). MutS-i defektse tüve puhul oli eelnevalt täheldatud statsionaarse faasi mutatsioonide sageduses suurt tõusu, mida soovisime oma deletantide mutatsioonisagedusega võrrelda (Saumaa jt., 2006).



Joonis 12. Statsionaarse faasi mutatsioonisagedus NER, PP3681 ja MutS defektsetes tüvedes. A) Statsionaarse faasi mutatsioonisagedus UvrA, UvrB adapteerunud (+) ja adapteerumata (-), UvrD ja PP3681 defektsetes tüvedes ning metsiktüves PaW85 (wt) (UvrD ja PP topeltdeletant on tähistatud “ΔΔ“-ga); B) Statsionaarse faasi mutatsioonisagedus UvrD ja MutS defektsetes tüvedes ja metsiktüves PaW85 (wt). Tulemused pärinevad neljast sõltumatust katses. Phe+ mutantite akumulatsiooni selektiivsöötmel on alates 3. päevast 10. päevani ning mutantide arv on summeeritud. Mutantide tekkesagedus on arvatud 10⁸ raku kohta lähtudes elusrakkude arvust populatsioonis. Tulemused on esitatud koos 95% usalduspiiridega.

Selgus, et ka statsionaarse faasi populatsioonides on UvrD ja PP3681 defektsetel tüvedel metsiktüvest PaW85 kõrgem mutatsioonisagedus ($p < 0,01$) ning ka PP3681 ja UvrD defektsete tüvede mutatsioonisagedused erinevad omavahel ($p < 0,05$), kusjuures geeni *PP3681* deleteerimisel on võrreldes *uvrD* geeni deleteerimisega isegi suurem efekt. Sellised tulemused viitavad UvrD ja PP3681 helikaaside olulisusele mutatsioonide ära hoidmises statsionaases faasis. Samas oli UvrD ja PP3681 topeltdeletandi mutatsioonisagedus madalam võrreldes metsiktüve, PP3681 ja UvrD üksikmutantidega ($p < 0,01$). Selleks, et selgitada, kas UvrD ja PP3681 topeltdeletandi suutmatus kolooniaid moodustada on põhjustatud plasmidi pKTpheA22TAG replikatsiooni häiretest, kasvatasime topeltdeletandid statsionaarsesse faasi,

tegime bakterikultuuridest 10-kordsed lahjendusread ning kontrollisime PCR-ga plasmidi olemasolu rakkudes. Esiolgu andmete kohaselt plasmidi koopiaarvu võrdlemises metsiktüves ja helikaaside topeltmutandis selgus, et UvrD ja PP3681 topeltdeletandis on plasmidi replikatsiooni tase väga madal või olematu, mis võib viidata UvrD ja PP3681 osalusele selle plasmidi replikatsioonis (andmeid ei ole esitatud). Metsiktüve võrdlemisel UvrA ja UvrB defektsete tüvedega nägime, et adapteerunud tüvede mutatsioonisagedused sarnanesid metsiktüves PaW85 täheldatud mutatsioonisagedusega ning mitteadapteerunud tüvedel oli mutatsioonisagedus võrreldes metsiktüvega oluliselt kõrgem ($p < 0,05$). Võrreldes UvrD defektse tüve mutatsioonisagedust teiste Uvr-alkude defektsete tüvede mutatsioonisagedusega selgus, et ainsana erineb UvrD defektsest tüvest adapteerunud UvrA defektne tüvi ($p < 0,01$), omades võrreldes UvrD defektse tüvega madalamat mutatsioonisagedust. PP3681 defektse tüve mutatsioonisagedus oli sarnane adapteerumata UvrA ja UvrB defektsete tüvedega ning oluliselt kõrgem adapteerunud tüvede omast ($p < 0,01$). PaWmutS tüve puhul oli mutatsioonisagedus ligikaudu 2 suurusjärku kõrgem võrreldes kõigi teiste tüvedega ($p < 0,01$). Selliste tulemuste põhjal võib järeldada, et kuigi UvrD ja PP3681 puudumine põhjustab rakkudes võrreldes metsiktüvega PaW85 kõrge mutatsioonisageduse, jääb see sagedus siiski madalamaks võrreldes MutS defektse tüve mutatsioonisagedusega. Sellest saab jällegi järeldada, et UvrD ja PP3681 puudumise korral MMR funktsioneerib ning PP3681 ei asenda UvrD-d selles reparatsioonimehhanismis.

2.4 Arutelu

Prokarüoodid ja eukarüoodid puutuvad pidevalt kokku nii endo- kui ka eksogeense stressiga. Selleks, et elus püsida, toimub rakkudes DNA reparatsioon, mis eemaldab DNA-s tekkinud vigu. Põhilisteks DNA reparatsiooniradadeks on näiteks NER ja MMR, mis on eluslooduses väga konserveerunud. Samas on mutatsioonidel keskkonna muutlikkuse tõttu evolutsioonis oluline roll aitamaks organismidel kohaneda uute tingimustega. Eelnevalt on näidatud, et reparatsiooniradades osalevate valkude geenide deleteerimisel genomist tõuseb mutatsioonisagedus märgatavalt. Sellisteks geenideks on näiteks MMR-is osalevad Mut-valkude geenid (Turrientes jt., 2013; Schaaper ja Dunn, 1987; Debora jt., 2011) ja *uvrD* geen (Arthur ja Lloyd, 1980), millede puudumisel peaks mutatsioonisagedus rakus vähemalt 10-kordselt tõusma. Samas ei põhjusta mutatsioonisageduse tõusu kõikide reparatsioonimehhanismides osalevate valkude geenide deleteerimine. Näiteks MMR-is osalevate nukleaaside geenide puudumine mõjutab mutatsioonisagedust vähem kui näiteks MutS-i puudumine (Burdett jt., 2001). Samas võivad reparatsiooniprotsessides osalevad valgud hoopiski omada rolli mutatsioonide tekitamises. Näiteks on meie laboris varem täheldatud, et bakteris *P. putida* osade NER valkude geenide inaktiveerimisel mutatsioonisagedus hoopiski väheneb (Tark jt., 2008).

Meie töörühmas on nähtud, et bakteris *P. putida* suurendab UvrD puudumine mutatsioonisagedust vähem kui MutS-i puudumine (Saumaa jt., 2006). Samas on teada, et MutS-i puudumisel MMR ei toimu. Selline tulemus viitab aga MMR-i funktsioneerimisele UvrD puudumisel, mis erineb bakteri *E. coli* puhul läbi viidud katsete tulemustest, mille põhjal UvrD on ainus MMR-is osalev helikaas. Selline vastuolu tekitas mõtte, et võib-olla reparatsioonirajad nagu MMR pole gammaproteobakterites nii konserveerunud, kui arvatakse, ning et vähemalt bakteris *P. putida* osaleb MMR-is veel teinegi helikaas. *P. putida* helikaaside joondamisel nägime, et UvrD-ga on kõige suuremas suguluses Rep helikaas. Samas esineb *rep* geeni deletsiooniga rakkudel kasvuhäireid ning rakud on Rep-i puudumisest väga häiritud, mistõttu nendega on raske katseid läbi viia. Seetõttu valisime oma katsetesse UvrD-ga järgmise suguluses oleva helikaasi, PP3681, mille funktsiooni pole enne uuritud. Kuigi UvrD ja PP3681 helikaaside identsusprotsent on madal (25,19 %), võivad PP3681 helikaasil ikkagi olla mõned UvrD funktsioonid.

Nagu arutelu alguses mainitud sai, on mutatsioonidel bakterite evolutsioneerumises ja uue keskkonnaga kohanemises väga oluline roll. Näiteks võiks tuua antibiootikumi resistentsuse tekke. Mutatsioonide vajalikkust tõestab ka DNA reparatsioonientsüümide

kahetine funktsioon, kus lisaks DNA parandamisele osalevad mõned reparatsioonivalgud ka mutatsioonide tekitamises (Tark jt., 2008; Hasegawa jt., 2008). NER ja MMR reparatsiooniradades osaleva UvrD kohta on kirjandusest teada, et bakteris *E. coli* on täheldanud UvrD puudumisel rakkude kõrgeenenud spontaanset mutatsioonisagedust (Washburn ja Kushner, 1991). Ka meie katsetest eksponentsiaalse faasi rakkudes mutatsioonisageduse mõõtmisel bakteris *P. putida* selgus sarnaselt *E. coli*-s nähtuga, et UvrD puudumine põhjustab spontaansete mutatsioonide sageduse kõrgenemist umbes 70 korda. Sellest võib järeldada, et UvrD on vajalik bakteris *P. putida* mutatsioonide ära hoidmiseks. UvrD-le lähima helikaasi PP3681 defektsuse puhul nägime aga ligikaudu 3 kordset Rif^R mutatsioonide tekkesageduse suurenemist võrreldes metsiktüvega, millest võib järeldada, et sarnaselt UvrD-le osaleb ka PP3681 helikaas reparatsioonis ja on vajalik mutatsioonide ära hoidmises. Samas ei olnud PP3681 puudumisel UvrD defektsetest tüvedest (topeltdeletant) mutatsioonisagedusele mõju (jäi UvrD üksikmutandiga võrreldavaks), millest võib järeldada, et PP3681 omab rakkudes mutatsioonide ära hoidmiseks väiksemat rolli kui UvrD. Kuigi nii MutS-i kui ka UvrD ja PP3681 puudumine *P. putida* rakkudes põhjustasid spontaansete mutatsioonide sageduse tõusu, olid UvrD ja PP3681 defektsete tüvede mutatsioonisagedused MutS defektse tüve mutatsioonisagedusest vastavalt umbes 4 ja 100 korda madalamad. Võttes arvesse, et MutS-i puudumisel MMR ei funktsioneerib ja MMR ei funktsioneerib ka siis, kui vigane ahel jääb helikaasi poolt kõrvaldamata, võib saadud tulemustest järeldada, et UvrD või PP3681 puudumisel MMR-i täielikku defektsust ei esine. Selline tulemus viitab sellele, et lisaks UvrD-le osaleb *P. putida* MMR-is mõni teine DNA helikaas (näiteks Rep helikaas), kuid geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaas selleks ei ole.

Lisaks eksponentsiaalses faasis tekkivatele mutatsioonidele vaatasime ka UvrD ja PP3681 defektsete tüvede statsionaarse faasi mutatsioonide teket. On teada, et ka kasvu piiravates ja stressi põhjustavates tingimustes võivad bakterid tänu mutatsioonidele kiiresti evolutsioneeruda. Eelnevalt on meie töögrupis nähtud, et UvrD defektse tüve mutatsioonisagedus on statsionaarse faasi rakkude puhul võrreldes metsiktüvega kõrgem, kuid MutS defektsest tüvest madalam (Saumaa jt., 2006). Käesolevas töös nägime samuti, et UvrD puudumisel tõusis asendusmutatsioonide tekkesagedus tunduvalt võrreldes metsiktüvega PaW85. Samas jäi UvrD defektse tüve mutatsioonisagedus võrreldes MutS defektse tüve sagedusega ka statsionaarses faasis umbes 16 korda madalamaks. Kuigi UvrD defektsus põhjustab eksponentsiaalses faasis kõrgemat mutatsioonisagedust kui statsionaarses faasis, jääb see siiski alla MutS defektse tüve mutatsioonisagedusele mõlemal juhul. Sellest võib järeldada, et nii eksponentsiaalses faasis kui ka statsionaarses faasis funktsioneerib MMR

UvrD puudumisel, kuigi eksponentsiaalses faasis võiks UvrD osalus reparatsioonis olla olulisem kui statsionaarses faasis. Selline tulemus viitab jällegi teise helikaasi osalusele MMR-is. Ka PP3681 defektse tüve asendusmutatsioonide tekkesagedus jäi tunduvalt madalamaks (umbes 6 korda) võrreldes MutS defektse tüvega, välistades PP3681 rolli MMR-is peamise või ainsa helikaasina. Samas kui PP3681 defektse tüve mutatsioonisagedus oli eksponentsiaalses faasis UvrD defektse tüve mutatsioonisagedusest madalam, siis statsionaarses faasis oli see UvrD defektse tüve mutatsioonisagedusest kõrgem (ligikaudu 2 korda). Sellest võib järeldada, et helikaas PP3681 on oluline eeskätt statsionaarses faasis mutatsioonide ära hoidmises. Huvitav oli aga see, et kuigi nii UvrD kui ka PP3681 defektsete tüvede puhul täheldasime võrreldes metsiktüvega kõrgemat mutatsioonisagedust, oli UvrD ja PP3681 topeltmutandi statsionaarse faasi mutatsioonisagedus metsiktüve mutatsioonisagedusest madalam, mis võib olla põhjustatud plasmidi replikatsioonihäiretest või mutatsioonide puudumisest. Meie esialgsete andmete kohaselt võiks UvrD ja PP3681 topeltdefektsus põhjustada töös kasutatud plasmidse testsüsteemi koopiaarvu vähenemist või plasmidi puudumist. See tulemus vajaks veel täiendavat kontrolli.

Nagu juba töös eelnevalt mainitud, on meie töörühmas nähtud, et UvrA ja UvrB adapteerumata tüved (-) on stressis ja moodustavad filamente ning adapteerunud tüved (+) on nende valkude puudumisega kohanenud, saanud üle replikatsiooni blokist ja sarnanevad oma metsiktüübilt pigem metsiktüvega (Sidorenko jt., 2015). Sellega on kooskõlas ka UvrD ja PP3681 defektsetes tüvedes mõõdetud mutatsioonisageduse sarnanemine pigem mitteadapteerunud kui adapteerunud tüvede mutatsioonisagedusega. UvrD defektsete tüvede mutatsioonisageduse sarnanemisest teiste Uvr-valkude defektsete tüvede mutatsioonisagedusega võiks arvata, et UvrD puudumisel on mutatsioonisageduse tõus põhjustatud NER-i defektsusest. Ka PP3681 puudumisest tingitud mutatsioonisageduse tõusu kohta võiks teha sama järelduse. Samas aga, kuna me nägime UV- ja kemikaalide taluvuse katses, et PP3681 defektne tüvi ei osale NER-is, siis ei saa antud juhul PP3681 defektse tüve mutatsioonisageduse tõus olla põhjustatud NER defektsusest. Siit võiks järeldada, et PP3681 küll osaleb näiteks rakkude DNA reparatsiooniprotsessides, kuid erinevalt UvrD-st ei osale PP3681 NER-is.

Teades, et MMR-is ei pruugi UvrD olla ainus vigastusi eemaldav helikaas, tõstatas see küsimuse UvrD ja PP3681 rolli üle NER-is. Meie töörühmas on eelnevalt nähtud, et UvrA või UvrB valgu puudumisel on rakud väga tundlikud UV-kiirgusele ning NER nendes tüvedes ei funktsioneer (Sidorenko jt., 2015). Ka käesolevas töös nägime oma katsetes Uvr-valkude defektsete tüvede puhul UV-kiirguse suhtes suurenenud tundlikkust. Huvitav oli aga UvrD

suurenenud UV-kiirguse talumine madalamatel kiiritusdoosidel (1-4 J/cm²) võrreldes UvrA/UvrB defektsete tüvedega. Kuigi UvrD paremat UV-kiirguse taluvust võrreldes UvrA defektse tüve UV-kiirguse taluvusega on ka bakteris *E. coli* juba nähtud (Newton jt., 2012), ei ole keegi sellise tulemuse põhjust selgitanud. Meie järeltame UvrD defektse tüve paremast UV-kiirguse talumisest võrreldes UvrA või UvrB defektsete tüvedega seda, et sarnaselt MMR-le osaleb bakteris *P. putida* ka NER-is lisaks UvrD-le mõni teine helikaas. PP3681 puudumise korral ei märganud me võrreldes metsiktüvega kõrgeenenud tundlikkust UV-kiirguse suhtes, mis viitab sellele, et vastav helikaas ei osale UV-kiirgusest põhjustatud kahjustuste eemaldamises.

Lisaks UV-kiirgusest põhjustatud kahjustuste eemaldamisele huvitas meid ka UvrD ja PP3681 roll teiste DNA kahjustuste eemaldamises. Varemavaldatud artiklites on bakteris *E. coli* kirjeldatud UvrD osalust kemikaalide MMC, NQO, MNNG ja MMS poolt tekitatud kahjustuste eemaldamises (Epshtein jt., 2014; Ossanna ja Mount, 1989; Mendonca jt., 1995). Kasvatades bakterit *P. putida* vastavate kemikaalide juuresolekul nägime, et UvrD ja teised NER-is osalevate valkude defektset tüved on tõepoolest NQO-le, MMC-le, MNNG-le ja MMS-le tundlikumad kui *P. putida* metsiktüvi PaW85. Lisaks erines UvrD defektne tüvi ka MutS defektsest tüvest, mis talus kemikaale sama hästi kui metsiktüvi. Võrreldes jällegi UvrA ja UvrB defektsete tüvede tundlikkust UvrD defektse tüve tundlikkusega, nägime, et UvrD defektne tüvi talus NQO-d paremini. Sellest saab jällegi järeldada, et NER-is osaleb NQO tekitatud kahjustuste eemaldamises peale UvrD veel teinegi helikaas. Lisaks saab järeldada, et UvrD defektsete rakkude tundlikkus käesolevas töös kasutatud kemikaalidele on pigem põhjustatud NER-i puudulikkusest kui MMR-i puudulikkusest. PP3681 defektne tüvi talus kõiki kemikaale sarnaselt võrreldes metsiktüvega PaW85, mis näitab, et PP3681 ei osale nende kemikaalide poolt tekitatud kahjustuste eemaldamises. PP3681 osaluse puudumisele kahjustuste eemaldamises viitas ka *PP3681* ja *uvrD* geeni topeltdeletant, mis sarnanes kemikaalide talumise poolest UvrD üksikmutandiga ja millest saab järeldada, et PP3681 ei ole võimeline UvrD-d asendama selliste kahjustuste eemaldamisel.

Kuna nägime UvrD ja PP3681 osalust mutatsiooniprotsessides huvitas meid ka nende valkude puudumise mõju rakkude fenotüübile, mis peegeldab tavaliselt raku heaolu. Filamenteerunud fenotüüp näitab rakujagunemise häireid ning SOS-vastuse tekkimist rakkudes, mis võib olla põhjustatud nii eksogeensest kui ka endogeensest stressist. Kirjandusest on teada, et bakteris *E. coli* indutseerib UvrD puudumine SOS-vastuse (Ossanna ja Mount, 1989), mis omakorda põhjustab häireid rakkude jagunemises. Meie tulemustest selgus, et sarnaselt *E. coli* UvrD defektse tüvega põhjustab ka bakteris *P. putida* UvrD

puudumine rakkude filamenteerunud fenotüüpi, viidates SOS-vastuse tekkele rakkudes. Eelnevalt on meie töögrupis nähtud, et ka UvrA ja UvrB valkude puudumisel on fenotüübis näha filamenteerumist (Siderenko jt., 2015). Sellest saab järeldada, et NER-i puudulikkus viib SOS-vastuse tekkele ning UvrD puudumisel on rakkude jagunemine endogeense stressi tõttu häiritud. PP3681 puudumisel me sarnaselt metsiktüvega rakkude filamenteerumist ei näinud ning seega PP3681 puudumine rakkudele endogeenset stressi ei tekita. *uvrD* ja *PP3681* geenide topeltdelētandi puhul nägime sarnast filamenteerumist nagu UvrD defekse tüve fenotüübis, mis võiks jällegi viidata PP3681 mõju puudumisele SOS-vastuse tekkes ning UvrD olulisusele rakkude homöostaasi säilitamises. Sarnaselt kemikaalide tundlikkusele ja UV-kiirguse talumisele saab ka sellest katsest järeldada, et helikaasi PP3681 puudumine ei ole rakkudele nii oluline kui helikaasi UvrD puudumine.

KOKKUVÕTE

Bakterid puutuvad pidevalt kokku nii endogeense kui ka eksogeense stressiga, mis võib viia mutatsioonide tekkeni. Selleks, et vähendada mutatsioonide potentsiaalset kahjulikku mõju, on rakkudes erinevad DNA reparatsioonimehhanismid, mis tekkinud vigu DNA-st eemaldavad. Reparatsioonimehhanismid on tavaliselt prokarüootidest eukarüootideni konserveerunud ning neil on väga oluline roll raku genoomi stabiilsuse hoidmises. Samas ei pruugi mutatsioonid aga alati rakkudele ainult kahjulikud olla, vaid on ka vajalikud uue keskkonnaga adapteerumiseks. Hiljutiste uurimuste põhjal on selgunud, et reparatsioonimehhanismid ei ole seotud ainult vigade eemaldamisega, vaid ka vigade genereerimisega. Näiteks on meie töörühmas nähtud, et näiteks NER-i valkude puudumisel mutatsioonisagedus rakkudes hoopiski langeb. Sellised avastused viitavad sellele, et mutatsiooniprotsesside ning reparatsioonimehhanismide vahel võib eksisteerida tugev seos bakterite kohanemisega eluks uues keskkonnas. Reparatsiooniprotsessides osalevate valkude hulka kuuluvad ka DNA helikaasid, mis on vajalikud vigase DNA ahela lahti keeramiseks ning eemaldamiseks, olles seega olulised genoomi stabiilsuse säilitamises. Kuigi reparatsioonivalke on palju uuritud, pole helikaasidele väga suurt tähelepanu pööratud ning nende roll erinevates reparatsiooniradades vajab veel selgitamist.

Töö kirjanduse ülevaates kirjutasin helikaasidest ning nende jaotumisest helikaasete motiivide alusel helikaaside superperekondadesse. Lisaks kirjeldasin põhjalikumalt helikaasi UvrD ning tema osalemist reparatsioonimehhanismides NER ja MMR.

Töö praktilises osas uurisin helikaaside UvrD ning temaga suguluses oleva geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi rolli mutatsiooniprotsessides bakteris *Pseudomonas putida* nii kasvavates kui ka statsionaarse faasi rakkudes. Lisaks testisin UvrD ja geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi defektsete rakkude tundlikkust DNA-d kahjustavatele kemikaalidele, võrdlesin nende tüvede UV-kiirguse taluvust ning UvrD ja *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi defektsuse mõju rakkude jagunemisele.

Bakalaureusetöö tulemused võib kokku võtta järgmiselt:

- 1) *P. putida* UvrD helikaas osaleb vigastuste eemaldamises MMR-is ja NER-is, kuid pole ainus nendes reparatsiooniradades osalev helikaas.
- 2) *P. putida* geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaas ei osale MMR-is ega ka NER-is ning ei asenda UvrD-d nendes radades. Samas on *PP3681* poolt kodeeritud helikaasil

roll mutatsioonide ära hoidmises, osaledes arvatavasti alternatiivsetes reparatsiooniradades.

- 3) UvrD on vajalik rakkude homöostaasi hoidmiseks ning UvrD puudumisel on rakkude jagunemine häiritud. *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi puudumisel rakkude jagunemisele mõju ei ole.
- 4) UvrD on oluline eksponentsiaalse faasi mutatsioonide ära hoidmiseks ning geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi olulisus suureneb statsionaarse faasi mutatsioonide ära hoidmisel.

Influence of UvrD and *PP3681*-encoded helicases in mutational processes in bacterium *Pseudomonas putida*

Louise Injarabian

SUMMARY

It is common for bacteria to encounter endogenous and exogenous stress in their everyday habitat which can lead to mutations in their DNA. To diminish the harmful impact of mutations the cells have developed different types of DNA repair mechanisms that remove various types of DNA damage. These DNA repair pathways MMR and NER are highly conserved in both prokaryotes and eukaryotes as they play a crucial role in maintaining genome integrity. On the other hand, mutations do not always have a negative role, as they are needed for adapting to new environmental conditions. Recent studies suggest that DNA repair enzymes are not only involved in DNA error-removal but are also involved in mutagenic pathways. For example, it has been shown in our workgroup that deletions of some of the genes that encode NER proteins can lead to decrease in mutation frequency in *Pseudomonas putida*. These results suggest that there may be a strong connection between DNA repair pathways and mutational processes in the adaptation to a new environmental habitat. Being part of the DNA repair machinery, DNA helicases are needed for unwinding and removing the damaged DNA strand and thereby contribute to the maintenance of genome stability. Even though repair pathway proteins have been extensively studied, the role of DNA helicases in repair processes still remains unclear.

In the literature review of my thesis I described DNA helicases and their classification into superfamilies based on their helicase motifs. In addition I described more thoroughly the UvrD helicase and its activity in NER and MMR.

The experimental part of this thesis describes the influence of UvrD and its closely related *PP3681*-encoded helicase on stationary- and exponential-phase mutational processes in bacterium *Pseudomonas putida*. Furthermore, I tested the sensitivity of UvrD and *PP3681*-encoded helicase deficient cells to DNA damaging chemicals, UV radiation and studied the impact of UvrD and *PP3681*-encoded helicase deficiency on cell division.

The results of this thesis can be summarized as follows:

- 1) *P. putida* UvrD participates in both MMR and NER but is not the only helicase involved in these DNA repair pathways.

- 2) *P. putida* *PP3681*-encoded helicase does not participate in MMR or NER and is not able to substitute the role of UvrD in these repair pathways. However, *PP3681*-encoded helicase does have a role in reducing mutation frequency, presumably being a part of an alternative repair pathway.
- 3) The UvrD helicase is needed for cell homeostasis and in the case of UvrD deficiency the cells have division problems. The lack of *PP3681*-encoded helicase does not have an effect to cell division.
- 4) The role of UvrD helicase in preventing mutations is more significant in the exponential phase, as the role of *PP3681*-encoded helicase became more evident in the stationary-phase.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin kogu südamest tänada oma juhendajat Kärti, kes suutis mulle alati aega leida, nõu anda ning toeks olla olenemata olukorrast, ning Maiat, kelle abivalmidus ja soovitusel aitasid suuresti selle töö valmimisele kaasa. Sooviksin ka tänada teisi meie labori liikmeid, kes tegid laboris veedetud aja alati meeldivaks ning oma perekonda ja sõpru suure toetuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdel-Monem, M., Durwald, H., Hoffmann-Berling, H. (1976).** Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. *Eur. J. Biochem.* 65: 431-449.
- Abdel-Monem, M., Lauppe, H. F., Kartenbeck, J., Dürwald, H., Hoffmann-Berling, H. (1977).** Enzymatic unwinding of DNA. III. Mode of action of *Escherichia coli* DNA unwinding enzyme. *J. Mol. Biol.* 110: 667-685.
- Adams, M. H. (1959).** Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. N. Y. lk. 445-447.
- Anderson, D. G., Kowalczykowski, S. C. (1997).** The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a chi-regulated manner. *Cell.* 90: 77-86.
- Arenson, T. A., Tsodikov, O. V., Cox, M. M. (1999).** Quantitative analysis of the kinetics end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. *J. Mol. Biol.* 288: 381-401.
- Arthur, H. M., Lloyd, R. G. 1980. Hyper-recombination in *uvrD* mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 180: 185-191.
- Atkinson, J., Guy, C. P., Cadman, C. J., Moolenaar, G. F., Goosen, N., McGlynn, P. (2009).** Stimulation of UvrD Helicase by UvrAB. *J. Biol. Chem.* 284(14): 9612-9623.
- 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.
- Bailey, S., Eliason, W. K., Steitz, T. A., (2007).** Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science.* 318: 459-63.
- Bauchpo, T., Elsdén, S. R. (1960).** The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *Gen. Microbiol.* 23(3): 457-469.
- Bailey, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., Broda, P. (1977).** Two models of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* 154: 203-204.
- Bell, C. E. (2005).** Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase. *Mol. Microbiol.* 58: 358-366.
- Bentchikou, E., Servant, P., Coste, G., Sommer, S. (2010).** A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet.* 6(1): e1000774.
- Bernstein, K. A., Gangloff, S., Rothstein, R. (2010).** The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annu. Rev. Genet.* 44: 393-417.

Beyer, A. (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* 6: 2043-2058.

Bidnenko, V., Lestini, R., Michel, B. (2006). The *Escherichia coli* UvrD helicase is essential for Thus removal during recombination-dependent replication restart from Ter sites. *Mol. Microbiol.* 62(2): 382-396.

Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation of the restriction and modification of DNA in *Escherichi coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.

Bujalowski, W., Jezewska, M. J. (1995). Interactions of *Escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein with single-stranded DNA. The nucleic acid does not wrap around the protein hexamer. *Biochem.* 34: 8513-8519.

Burdett, V., Baitinger, C., Viswanathan M., Lovett, S. T., Modrich, P. (2001). In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.US A.* 98(12): 6765-6770.

Carter, A. S., Tahmaseb, K., Compton, S. A., Matson, S. W. (2012). Resolving Holliday junctions with *Escherichia coli* UvrD helicase. *J. Biol. Chem.* 287(11): 8126-8134.

Choi, K. H., Kumar, A., Jscheizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation ofhighly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods.* 64(3): 391-397.

Cox, M. M. (2002). The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.* 510: 107-120.

Croteau, D. L., DellaVecchia, M. J., Perera, L., Van Houten, B. (2007). Cooperative damage recognition by UvrA and UvrB: Identification of UvrA residues that mediate DNA binding. *DNA Repair.* 7(3): 392-404.

Debora, B. N., Vidales, L. E., Amirez, R., Ramirez, M., Robleto, E. A., Yasbin, R. E., Pedraza-Reyes, M. (2011). Mismatch Repair Modulation of MutY Activity Drives *Bacillus subtilis* Stationary-Phase Mutagenesis. *J. Bacteriol.* 197(12): 236-245.

Egelman, E. H., Yu, X., Wild, R., Hingorani, M. M., Patel, S. S. (1995). Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 92(9): 3869-3873.

Enemark, E. J., Joshua-Tor, L. (2006). Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature.* 442: 270-275.

Epshtein, V., Kamarthapu, V., McGary, K., Svetlov, V., Ueberheide, B., Proshkin, S., Mironov, A., Nudler, E. (2014). UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards. *Nature.* 505: 372-377.

- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U. P., Jankowsky, E. (2013).** SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20(3): 313-324.
- Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979).** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(4): 1648-1652.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. (1993).** Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 419-29.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. O., Blinov, V. M. (1989).** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Re.* 17: 4713-1730.
- Gupta, R., Brosh, R. M. Jr. (2008).** Helicases as prospective targets for anti-cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8(4): 390-401.
- Hall, M. C., Matson, S. W. (1999).** Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol. Microbiol.* 34: 867-877.
- Hall, M. C., Ozsoy, A. Z., Matson, S. W. (1998).** Site-directed mutations in motif VI of *Escherichia coli* DNA helicase II result in multiple biochemical defects: evidence for the involvement of motif VI in the coupling of ATPase and DNA binding activities via conformational changes. *J. Mol. Biol.* 277(2):257-271.
- Hasegawa, K., Yoshiyama, K., Maki, H. (2008).** Spontaneous mutagenesis associated with nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Genes Cells.* 13(5): 459-469.
- 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: 6557-6567.
- Hingorani, M. M., Patel, S. S. (1993).** Interactions of bacteriophage T7 DNA primase/helicase protein with single-stranded and double-stranded DNAs. *Biochem.* 32: 12478-87.
- Jankowsky, E. (2011).** RNA helicases at W85ork: binding and rearranging, *Trends Biochem. Sci.* 36: 19-29.
- Jankowsky, E., Fairman, M. E. (2007).** RNA helicases – one fold for many functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 316-324.
- Jezewska, M. J., Kim, U. S., Bujalowski, W. (1996).** Binding of *Escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein to single-stranded DNA. Long-range allosteric conformational changes W85ithin the protein hexamer. *Biochem* 35: 2129-45.
- Jiang, Q., Karata, K., Woodgate, R., Cox, M. M., Goodman, M. F. (2009).** The active form of DNA polymerase V is UmuD'2C•RecA•ATP. *Nature.* 460: 359-363.

- Kadyrov, F. A., Dzantiev, L., Constantin, N., Modrich, P. (2006).** Endonucleolytic Function of MutL α in Human Mismatch Repair. *Cell*. 126(2): 297-308.
- Koonin, E. V. (1993).** A Superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J. Mol. Biol.* 229(4): 1165-1117.
- Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G. H., Lohman, T. M., Waksman, G. (1997).** Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell*. 90: 635-47.
- Kuriyan, J., O'Donnell, M. (1993).** Sliding clamps of DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 234 (4): 915-25.
- Leipe, D. D., Koonin, E. V., Aravind, L. (2003).** Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J. Mol. Biol.* 333: 781-815.
- Lin, J. J., Sancar, A. (1990).** Reconstitution of Nucleotide Excision Nuclease with UvrA and UvrB Proteins from *Escherichia coli* and UvrC Protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 34: 21337-21341.
- Lo, Y. H., Tsai, K. L., Sun, Y. J., Chen, W. T., Huang, C. Y., Hsiao, C. D., (2009).** The crystal structure of a replicative hexameric helicase DnaC and its complex with single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 37: 804-14.
- Maluf, N. K., Ali, J. A., Lohman, T. M. (2003a).** Kinetic mechanism for formation of the active, dimeric UvrD helicase-DNA complex. *J. Biol. Chem.* 278: 31930-31940.
- Maluf, N. K., Fischer, C. J., Lohman, T. M. (2003b).** A Dimer of *Escherichia coli* UvrD is the active form of the helicase in vitro. *J. Mol. Biol.* 325: 913-935.
- Marra, G., Schär, P. (1999).** Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J.* 338: 1-13.
- Martinez-Garcia, E., de Lorenzo, V. (2011).** Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 13(10): 2702-2716
- Matson, S. W., Robertson, A. B. (2006).** The UvrD helicase and its modulation by the mismatch repair protein MutL. *Nucleic Acids Res.* 34: 4089-4097.
- Medagli, B., Onesti, S. (2013).** Structure and Mechanism of Hexameric Helicases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 973: 75-95.
- Mechanic, L. E., Frankel, B. A., Matson, S. W. (2002).** *Escherichia coli* MutL Loads DNA Helicase II onto DNA. *J. Biol. Chem.* 275: 38337-38346.
- Mendonca, V. M., Kaiser-Rogers, K., Matson, S. W. (1995).** Double helicase II (uvrD)-helicase (held) deletion mutants are defective in the recombination pathways of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175(15): 464-451.

- Miller, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. Lk. 466.
- Moolenaar, G. F., Moorman, C., Goosen, N. (2000).** Role of the *Escherichia coli* Nucleotide Repair Proteins in DNA Replication. *J. Bacteriol.* 182(20): 5706-5714.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Souge, J. L., Koonin, E. V. (1999).** AAA+: a class of chaperon-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9: 27-43.
- Newton, K. N., Courcelle, C. T., Courcelle, J. (2012).** UvrD Participation in Nucleotide Excision Repair Is Required for the Recovery of DNA Synthesis following UV-Induced Damage in *Escherichia coli*. *Journal of Nucleic Acids.* 2012: 271453.
- Niedziela-Majka, A., Chesnik, M. A., Tomko, E. J., Lohman, T. M. (2007).** *Bacillus stearothermophilus* PcrA monomer is a single-stranded DNA translocase but not a processive helicase in vitro. *J. Biol. Chem.* 282: 27076-27085.
- Niedziela-Majka, A., Maluf, N. K., Antony, E., Lohman, T. M. (2011).** Self-assembly of *E. coli* MutL and its complexes with DNA. *Biochem.* 50(37): 7868-7880.
- Ossanna, N., Mount, D. W. (1989).** Mutations in *uvrD* induce the SOS response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171(1): 303-307.
- Pape, T., Meka, H., Chen, S., Vincentini, G., van Heel, M., Onesti S. (2003).** Hexameric ring structure of the full-length archaeal MCM protein complex. *EMBO Rep.* 4: 1079-83.
- Patel, S. S., Pandey, M., Nandakumar, D. (2011).** Dynamic coupling between the motors of DNA replication: hexameric helicase, DNA polymerase, and primase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15(5): 595-605.
- Petrova, V., Chen, S. H., Molzberger, E. T., Tomko, E., Chitteni-Pattu, S., Jia, H., Ordabayev, Y., Lohman, T. M., Cox, M. M. (2015).** Active displacement of RecA filaments by UvrD translocase activity. *Nucleic Acids Res.* 43(8): 4133-4149.
- Podfai, G., Kolisnychenko, V., Berezki, Z., Blattner, F. R. (1999).** Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res.* 27(22): 4409-4415.
- Rabhi, M., Tuma, R., Boudvillain, M. (2010).** RNA remodeling by hexameric RNA helicases. *RNA Biol.* 7: 655-66.
- Raney, K. D., Byrd, A. K., Aarattuthodiyil, S. (2013).** Structure and Mechanisms of SF1 DNA Helicases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 767: 17-46.
- Reyes, G. X., Schmidt, T. T., Kolodner, R. D., Hombauer, H. 2015.** New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma.* DOI: 10.1007/s00412-015-0514-0.
- Richardson J. P. (1993).** Transcription termination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 1-30.

- Richardson, J. P., (1996).** Structural organization of transcription termination factor Rho. *J. Biol. Chem.* 271: 1251-4.
- Saikrishnan, K., Griffiths, S. P., Cook, N., Court, R., Wigley, D. B. (2008).** DNA winding to RecD: role of the 1B domain in SF1B helicase activity. *EMBO J.* 27: 2222-2229.
- Saikrishnan, K., Powell, B., Cook, N. J., Webb, M. R., Wigley, D. B. (2009).** Mechanistic basis of 5'-3' translocation in SF1B helicases. *Cell.* 137: 849-859.
- Saumaa, 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.* 5(4): 505-514.
- Sen, D., Patel, S. S. (2013).** DNA helicases: Hexameric Enzyme Action, lk. 21-27. *In* Lennarz, W. J., Lane, M. D. (eds), *The Encyclopedia of Biological Chemistry* vol. 2, Waltham, MA: Academic Press, Elsevier Inc.
- Sharma, R. C., Schimke, R. T. (1996).** Preparation of electrocompetent *E. coli* using saltfree growth medium. *Biotech.* 20(1): 42-44.
- Schaaper, R. M., Dunn, R. L. (1987).** Spectra of spontaneous mutations in *Escherichia coli* strains defective in mismatch correction: the nature of in vivo DNA replication errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(17): 6220-6224.
- Schaaper, R. M. (1993).** Base selection, proofreading and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry.* 268(32): 23762-23765.
- Sidorenko, J., Ukkivi, K., Kivisaar M. (2015).** NER enzymes maintain genome integrity and suppress homologous recombination in the absence of exogenously induced DNA damage in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair.* 25(2015): 15-26.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., Wigley, D. B. (2007).** Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 23-50.
- Story, R. M., Weber, I. T., Steitz, T. A. (1992).** The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer. *Nature.* 355(6358): 318-325.
- Sun, B., Wei, K. J., Zhang, X. H., Dou, S. X., Li, M., Xi, X. G. (2008).** Impediment of *E. Coli* UvrD by DNA-destabilizing force reveals a strained-inchworm mechanism of DNA unwinding. *EMBO J.* 27: 3279-3287.
- Sung, P., Prakash, L., Matson, S. W., Prakash, S. (1987).** RAD3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8951-8955.
- Štambuk, S., Radman, M. (1998).** Mechanism and Control of Interspecies Recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch Repair, Methylation, Recombination and Replication Functions. *Genetics.* 150(2): 533-542.

- Tanner, N. K. (2003).** The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition. *Cell Cycle*. 2: 18-19.
- Tark, M. (2006).** DNA reparatsioon *Pseudomonas putida* rakkudes. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Tark, M., Tover, A., Koorits, L., Tegova, R., Kivisaar, M. (2008).** Dual role of NER in mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair*. 7(1): 20-30.
- 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(9): 2735-2744.
- Thomson, N. D., Berger, J. M. (2009).** Running in reverse: the structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. *Cell*. 139(3): 523-534.
- Turrientes, M. C., Baquero, F., Levin, B. R., Martinez, J. L., Ripoll, A., Gonzalez-Alba, J. M., Tobes, R., Manrique, M., Baquero, M. R., Rodriguez-Dominguez, M. J., Canton, R. (2013).** Normal mutation rate variants arise in a Mutator (MutS) *Escherichia coli* population. *PLoS One*. 8(9): e72963.
- Tuteja, N., Tuteja, R. (2004).** Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases. Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur. J. Biochem.* 271: 1835-1848.
- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Le Cam, E., Matic, I., Faber, F., Petit, M. A. (2005).** UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filament in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 24(1): 180-189.
- Velankar, S. S., Soutanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S., Wigley, D. B. (1999).** Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*. 97: 75-84.
- Verhoeven, E. E. A., 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: 5120-5123.
- Washburn, B. K., Kushner, S. R. (1991).** Construction and Analysis of Deletions in the Structural Gene (*uvrD*) for DNA Helicase II of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173(8): 2569-2575.
- West, S. C. (1992).** Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 603-40.
- West, S. C., Connolly, B. (1992).** Biological roles of the *Escherichia coli* RuvA, RuvB and RuvC proteins revealed. *Mol. Microbiol.* 6: 2755-59.
- Wong, S. M., Mekalanos, J. J. (2000).** Genetic Footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(18): 10191-10196.

- Wu, L. (2007).** Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA Repair*. 6(7): 936-944.
- Wu, Y., Brosh, R. M. (2010).** Distinct roles of RECQ1 in the maintenance of genomic stability. *DNA Repair*. 9(3): 315-324.
- Wu, C. G., Spies, M. (2013).** Overview: what are helicases? *Adv. Exp. Med. Biol.* 767: 1-16.
- Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R., Fukuyama, K. (2002).** The crystal structure of exonuclease RecJ bound Mn²⁺ ion suggests hoW85 its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99(9): 5908-5912.
- Yamaguchi, M., Dao, V., Modrich, P. (1998).** MutS and MutL Activate DNA Helicase II in a Mismatch-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 17: 1535-1541.
- Ye, J., Osborne, A. R., Groll, M., Rapoport, T. A. (2004).** RecA-like motor ATP-ases - lessons from structures. *Biochim. Biophys Acta*. 1659(1): 1-18.
- Yokota, H., Chujo, Y. A., Harada, Y. (2013).** Single-molecule imaging of the oligomer formation of the nonhexameric *Escherichia coli* UvrD helicase. *Biophys. J.* 104(4): 924-33.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

www.pseudomonas.com

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Louise Injarabian (30.11.1992)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

UvrD ja geeni *PP3681* poolt kodeeritud helikaasi roll mutatsiooniprotsesside bakteris *Pseudomonas putida*

Mille juhendajad olid Kärt Ukkivi ja Maia Kivisaar,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015