

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

Translatsiooni täpsuse mõju mutatsioonide tekkele bakteri *Pseudomonas putida*
ribosoomivalgu S5 mutantides

Magistritöö

30 EAP

Carol Luhaäär

Juhendajad PhD Heili Ilves, MSc Karl Jürgenstein

Translatsiooni täpsuse mõju mutatsioonide tekkele bakteri *Pseudomonas putida* ribosoomivalgu S5 mutantides

Translatsioonitäpsus on bakteris mitmete erinevate mehhanismide abil tasakaalustatud protsess. Translatsioonitäpsuse vähenemine võib põhjustada bakteris stressivastust, suurendades rakus vigaste valkude hulka ning häirides seeläbi valkude funktsiooni, kuid samas muutused valkudes võivad bakterile anda uusi ja kasulikke omadusi keskkonnaga toime tulemiseks. Varasemalt on näidatud, et ribosoomi S4 ja S5 valkude mutatsioonid mõjutavad bakteris *E. coli* translatsioonitäpsust, kuid pole selgitatud nende mõju laiemalt ka teistele bakteritele. Meie laboris on näidatud, et tRNA modifikatsiooniensüümide TruA ja RluA puudumine bakteris *Pseudomonas putida* suurendab mutatsioonisagedust ja TruA puudumine vähendab translatsioonitäpsust. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida ka ribosoomi valke S4 ja S5 kodeerivate geenide mutatsioonide mõju *P. putida* translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele.

Märksõnad: ribosoom, translatsioonitäpsus, mutatsioonisagedus, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Effect of translational fidelity on mutagenesis in ribosomal protein S5 mutants of bacterium *Pseudomonas putida*

Translational fidelity is balanced by many different processes in bacteria. Decreased translational fidelity can cause stress responses to occur in bacteria by increasing the amount of mistranslated proteins in the cell and thus disrupting the function of the proteins. Mutations in proteins as a result of decreased translational fidelity can also give bacteria an advantage by potentially giving them new attributes better suited for their environment. It has previously been shown that mutations in ribosomal proteins S4 and S5 affect translational fidelity in *E. coli*, but the mutations' effects on other bacteria has not yet been described. Our research group has shown that the lack of tRNA modification enzymes TruA and RluA increases mutational frequency in *Pseudomonas putida* and lack of TruA decreases translational fidelity. The aim of this thesis was to study the effects of mutations in ribosomal proteins S4 and S5 on the translational fidelity and mutational frequency of *Pseudomonas putida*.

Keywords: ribosome, translational fidelity, mutation frequency, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Translatsioon	7
1.2 Ribosoom	10
1.3 Ribosoomivalgud	12
1.4 Ribosoomi valgud S4 ja S5.....	13
1.5 Mutatsioonisagedus	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1 Töö eesmärgid	19
2.2 Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed.....	20
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	22
2.2.3 PCR.....	23
2.2.4 Restriksioonianalüüs	24
2.2.5 Gelelektroforees	24
2.2.6 Koht-suunatud mutagenees	24
2.2.7 Seleksioon spontaansete spektinomütsiinile resistentsete kolooniate isoleerimiseks.....	25
2.2.8 Sekveneerimine.....	26
2.2.9 Translatsioonitäpsuse mõõtmine topeltlutsiferaasi testsüsteemiga.....	27
2.2.10 Mutatsioonisageduse mõõtmine Rif ^R / <i>rpoB</i> testsüsteemiga	28
2.2.11 Reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) detekteerimine	28
2.2.12 Statistiline analüüs	29
2.3 TULEMUSED.....	30
2.3.1 <i>P. putida</i> ja <i>E. coli</i> 30S ribosoomivalgude S4 ja S5 võrdlus.....	30
2.3.2 <i>Pseudomonas putida</i> ribosoomivalgu S4 kodeeriva <i>rpsD</i> geeni suunatud mutagenees	31
2.3.3 <i>P. putida</i> spektinomütsiiniresistentsete kolooniate selekteerimine <i>rpsE</i> mutantide isoleerimiseks.....	32
2.3.4 Geeni <i>rpsE</i> mutatsioonide mõju bakteri <i>P. putida</i> translatsioonitäpsusele	34
2.3.5 Geeni <i>rpsE</i> mutatsioonide mõju bakteri <i>P. putida</i> mutatsioonisagedusele	37
2.3.6 Geeni <i>rpsE</i> mutatsioonide mõju bakteri <i>P. putida</i> endogeensete ROS-ide tasemele.....	38
2.3.7 Geeni <i>rpsE</i> mutatsioonide mõju bakteri <i>P. putida</i> stressitaluvusele	39
2.4 ARUTELU.....	41
2.4.1 Spektinomütsiini kontsentratsioon seleksioonil.....	41
2.4.2 Geeni <i>rpsE</i> mutatsioonide mõju translatsioonitäpsusele	41

2.4.3	Geeni <i>rpsE</i> mutatsioonide mõju mutatsioonisagedusele	44
2.4.4	Geeni <i>rpsE</i> mutantide külmatundlikkus ja streptomütsiinitundlikkus	45
KOKKUVÕTE.....		47
Summary		48
Tänuõnad.....		49
Kirjanduse loetelu.....		50
Kasutatud veebiaadressid		59

KASUTATUD LÜHENDID

aaRS – aminoatsüül-tRNA süntetaas (ingl k - *aminoacyl-tRNA synthetase*)

aa-tRNA – aminoatsüül-tRNA (ingl k - *aminoacyl-tRNA*)

CAA – kaseiini hüdroosülaad (ingl k - *casamino acids*)

Km – kanamütsiin

LAR – lutsiferaasi reportertesti reagent (ingl k - *luciferase assay reagent*)

Pen – penitsilliin

Rif – rifampitsiin

ROS – hapnikuradikaalid (ingl k - *reactive oxygen species*)

Spc – spektinomütsiin

SISSEJUHATUS

Translatsiooniprotsessi korrektne toimimine võimaldab bakteril kasvada, paljuneda ning kohaneda keskkonnatingimustega. Translatsioonitäpsus on sealjuures faktor, mis määrab translatsiooni edukust. Kui bakteri translatsioonitäpsus väheneb, tekib rohkem vigaseid valke, mis ei suuda oma ülesandeid korrektselt täita. Translatsioonitäpsuse vähenemine võib aga olla ka mitmekesisuse allikas, andes bakteritele läbi muutunud valkude uusi omadusi, nagu resistentsus erinevatele antibiootikumidele.

Ribosoomi valgud S4 ja S5, mida kodeerivad vastavalt geenid *rpsD* ja *rpsE*, mängivad tähtsat rolli ribosoomi kokkupanekul ning funktsioneerimisel, olles kontaktis nii üksteisega, teiste ribosoomi valkudega, kui ka erinevate translatsiooniprotsessil osalevate molekulidega. Varasemalt on leitud, et geenide *rpsD* ja *rpsE* mutatsioonid mõjutavad bakteris *E. coli* translatsioonitäpsust. Samuti on osade translatsiooniga seotud valkude defektsusega seostatud translatsioonitäpsuse langus ja mutatsioonisageduse tõus.

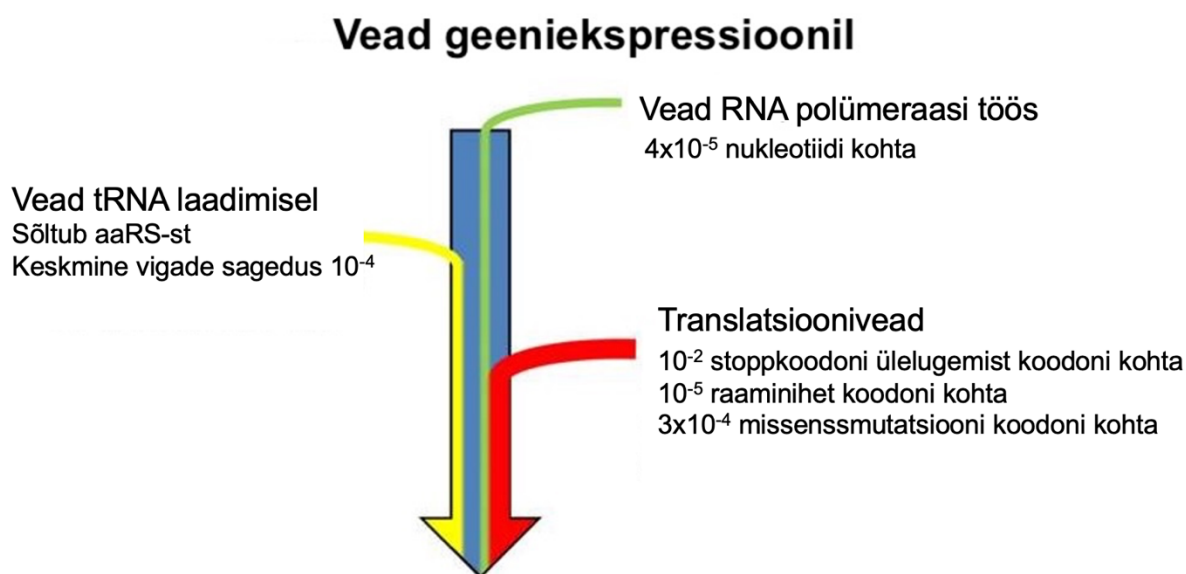
Meie laboris on näidatud, et tRNA modifikatsiooniensüümide TruA ja RluA puudumine vähendab bakteri *P. putida* translatsioonitäpsust ning TruA puudumine suurendab ka bakteri mutatsioonisagedust. Translatsioonitäpsuse vähenemisega kaasneva mutatsioonisageduse tõusu edasiseks uurimiseks sooviti konstrueerida vähenenud translatsioonitäpsusega tüved ning seejärel uurida translatsioonitäpsuse mõju mutatsioonisagedusele. Kuna *rpsD* ja *rpsE* mutantidel on bakteris *E. coli* näidatud translatsioonitäpsuse muutumist, valiti ribosoomi valke S4 ja S5 kodeerivad geenid *rpsD* ja *rpsE*, et luua *P. putida* tüved, milles on translatsioonitäpsus häiritud. Eelnevast lähtudes seati käesoleva töö eesmärgiks konstrueerida *Pseudomonas putida* tüved, millel on mutatsioonid geenides *rpsD* ja *rpsE* ning uurida mutatsioonide mõju bakteri translatsioonitäpsusele ning mutatsioonisagedusele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Translatsioon

Kõikide eluvormide ning ka bakterite elutegevuse üheks aluseks on valgusüntees ehk translatsioon, mille abil avaldub bakteri DNA-s kodeeritud info. Selle protsessi alguses liigub DNA-lt transkribeeritud mRNA ribosoomi, kus translatsioon aset leiab. mRNA põhjal sünteesitakse ribosoomis valk ning sünteesiks vajalikke aminohappeid kannavad ribosoomi tRNA-d. Aminohappe ja tRNA ühendamise reaktsiooni katalüüsivad aminoatsüül-tRNA süntetaasid (aaRS) ning nende korrektsus tRNA laadimisel aminohappega mõjutab oluliselt translatsioonitäpsust (Ling et al., 2009).

mRNA nukleotiidne järjestus on jagatud kolmest nukleotiidist koosnevateks koodoniteks. Koodoneid on 64 ning neist 61 koodonile vastab kindel aminohape. Ülejäänud 3 koodoni lugemisel termineeritakse valgusüntees, seetõttu nimetatakse neid koodoneid ka stoppkoodoniteks (Povolotskaya et al., 2012). Polüpeptiidi sünteesiks on vajalik mRNA koodonite paardumine tRNA komplementaarsete antikoodonitega, et kindlustada õige aminohappe lisamine sünteesitavasse valku.



Joonis 1. Geeniekspressiooni käigus tekkivate vigade sagedus. Kollasega on märgitud tRNA aminohappega laadimise vigade sagedus, rohelisega RNA polümeraasi tehtud vigade sagedus ning punasega valgusünteesi ajal esinevad ribosomaalsete vigade sagedused. (muudetud, Evans et al., 2018).

Valgu korrektseks sünteesiks on tarvis koordineerida mitmete eri molekulaarsete komponentide tööd ja aktiivsust, et translatsiooni tulemuseks oleks funktsionaalsed valgud. Siiski pole enamuse protsesse looduses täiuslikud ning nii transkriptsioonil kui ka translatsioonil tehakse vigu. Vigu võib esineda mitmes eri valgusünteesi etapis, näiteks võib toimuda nihe koodonraamistiku

lugemisel või lülitatakse sünteesitavasse polüpeptiidi vale aminohape. RNA polümeraas teeb DNA-lt RNA transkribeerimise käigus nukleotiidi kohta 4×10^{-5} viga ning valgusünteesi ajal tRNA aminohappegalaadimisel tehakse keskmiselt 10^{-4} viga (joonis 1). Translatsiooni käigus esineb ühe koodoni kohta stoppkoodoni ülelugemist 10^{-2} sagedusega, raaminihet 10^{-5} sagedusega ning missensmutatsioon 3 $\times 10^{-4}$ sagedusega (joonis 1). Hinnatakse, et 300-400 koodoniga geenilt transleeritud valgupopulatsioonis esineb 10-20% valkudest vähemalt üks viga (Evans et al., 2018). Keskmiselt esineb valgusünteesil ühe aminohappejäägi kohta 10^{-4} viga (Gordon et al., 2015).

Vigade esinemist võib selgitada fakt, et translatsioon toimub väga kiirelt, näiteks bakteri *Escherichia coli* valgusünteesi käigus lisatakse sünteesitavasse polüpeptiidi 12-17 aminohappe jääki sekundis (Young & Bremer, 1976). Bakteritel on siiski mitmeid kontrollsüsteeme võimalike vigade esinemise vältimiseks ning translatsioonitäpsuse suurendamiseks. Aminoatsüül-tRNA süntetaasid vahendavad õige aminohappe kinnitumist sobiliku tRNA külge. Selleks ühenduseks ei piisa aga ainult substraadi ja aaRS-i aktiivtsentri vahelisest afiinsusest või ruumilisest sobivusest, kuna mõned aminohapped, nagu isoleutsiin ja valiin, erinevad üksteisest ainult ühe metüülrühma poolest (Mascarenhas et al., 2009). On leitud, et aminoatsüül-tRNA süntetaasidel on ka teise aktiivtsentriga kontrollidomeen, kus tuntakse ära valesti paardunud aminohape ja tRNA ning hüdrolüüsitakse nendevaheline side (Guo & Schimmel, 2012). See mehhanism aitab vähendada valede aminohapete lülitamist sünteesitavasse valku.

Ka koodon-antikoodon interaktsioon aitab translatsioonitäpsust suurendada. Elongatsiooni ajal on ribosoomile kinnitunud kompleks, mis koosneb aminoatsüül-tRNA-st, GTP-st ning elongatsioonifaktorist EF-Tu. Ribosoomi 30S subühiku A-saidis paiknevad valgud kontrollivad koodon-antikoodon heeliksi geomeetrilist struktuuri. Õige struktuuri korral toimuvad valgusünteesi energiaallika GTP kiire hüdrolüüsi jaoks vajalikud konformatsioonilised muutused ning valgusüntees jätkub. Kui A-saiti on sattunud vale tRNA ehk koodon-antikoodon heeliksi struktuur pole korrektne, ei toimu neid konformatsioonilisi muutusi ning GTP hüdrolüüs toimub aeglasemalt, mis suurendab võimalust, et aa-tRNA-GTP-EF-Tu kompleks dissotseerub ribosoomilt. Valgusünteesi jätkumiseks peab GTP-EF-Tu kompleks ära tundma ning ribosoomi viima õige tRNA. (Reynolds et al., 2010). Ribosoomi P-saidis toimub samuti peale peptiidsideme teket uus koodon-antikoodon heeliksi kontroll. Kui ühendus on tekkinud mittesobiva koodoni ja antikoodoni vahel, väheneb ribosoomi A-saidi spetsiifilisus, mis põhjustab rohkem ebasobivate aminohapetega laetud tRNA-de sisenemist A-saiti, tulemusena

kuhjuvad sünteesitavas polüpeptiidis vead ning translatsioon termineeritakse enneaegselt (Zaher & Green, 2009).

Translatsiooni edukaks toimimiseks on olulised ka RNA-s esinevad posttranskriptsioonilised modifikatsioonid, näiteks pseudouridiinid ja metülatsioonid. Bakteri *E. coli* ribosoomis paiknevad 95% modifitseeritud nukleotiididest ribosoomi funktsiooniks olulistes piirkondades, nagu A-, P- ja E-saidid ja peptidüültransferaasne tsenter (Decatur & Fournier, 2002), mis näitab, et organism vajab modifikatsioone translatsiooniprotsessi korrektseks toimumiseks. *E. coli* 16S rRNA positsioonis 1402 paiknev metüleeritud tsütidiin suurendab ribosoomi P-saidis translatsioonitäpsust, aidates translatsiooni initsiatsiooni leida õiget startkoodonit (Kimura & Suzuki, 2010). Translatsioonitäpsuse säilitamiseks olulisemad modifikatsioonid tRNA-s paiknevad antikoodonlingus positsioonides 34 ja 37. Antikoodonlingu positsioon 34 on esimene antikoodoni positsioon, mis paardub koodoni kolmanda nukleotiidiga ja positsioon 37 paikneb antikoodoni kõrval ning nende positsioonide modifikatsioonid (näiteks m¹G37) aitavad suurendada translatsioonitäpsust, hoides õiget lugemisraami (Urbonavičius et al., 2001).

Enamasti pole translatsioonitäpsuse vähenemise tulemusena üksikute valede aminohapete valku sattumine bakteri jaoks suur probleem. Kontrollmehhanismid viivad vigade esinemise miinimumini ning allesjäänud vead ei pruugi valgu funktsiooni ja seega bakteri elu märgatavalt mõjutada. Sageli ekspresseeritavad ja seega bakterile olulised valgud on tihti piisavalt robustsed, et nad säilitavad oma funktsiooni ja õige voltumise isegi juhul, kui polüpeptiidi sünteesil satub valku vale aminohape (Drummond et al., 2005). Bakter *E. coli* kasutab translatsiooniveaks peetavat raaminihet teatud valkude sünteesil lausa enda kasuks, kodeerides ühes lugemisraamis DNA polümeraas III kahte erinevat subühikut τ ja γ ning muutes lugemisraami, et kumbagi neist sünteesida. Bakteris *E. coli* kodeerib DNA polümeraas III τ ja γ subühikuid *dnaX* geen. τ subühik on transleeritav ühe lugemisraamina ja τ subühikut kodeeriva osa positsioonides 428-432 asuvates koodonites asub 6 järjestikust adeniini ning seejärel raamis -1 järjestus UGA, mis võib toimida stoppkoodonina. γ subühik on τ subühikuga võrreldes 212 aminohappe võrra lühem ning on järjestuselt identne τ subühiku N-terminaalse järjestusega, kuid γ subühiku sünteesi on termineerinud varem teises lugemisraamis asuv stoppkoodon. (Blinkowa & Walker, 1990). Ensüümi täielikuks aktiivsuseks peavad mõlemad subühikud DNA polümeraas III kompleksi koosseisus olema (Hawker & McHenry, 1987), seega on sünteesiks tarviliku raaminihke toimumine bakteris eelprogrammeeritud ja vajalik. Mõned mobiilsed elemendid, nagu IS1, kasutavad samuti translatsiooni käigus raaminihke toimumist, et toota transponeerumiseks vajalikku ensüümi transposaasi (Sekine & Ohtsubo, 1992).

Translatsioonitäpsuse vähenemine võib bakterile ka kasulik olla. GatCAB ensüümikompleks katalüüsib paljudes bakterites valesti atsüülitud Glu-tRNA^{Gln} ja Asp-tRNA^{Asn} tagasi korrektse aminohappega paardunud Gln-tRNA^{Gln} ja Asn-tRNA^{Asn}-ks. Mutatsioonid GatCAB kompleksi osa kodeerivas geenis *gatA* vähendavad translatsioonitäpsust, suurendades Gln → Glu ja Asn → Asp translatsioonivigade teket (Su et al., 2016). Selle translatsioonitäpsuse vähenemise tulemusena valesti transleeritud aminohappejäägid RNA polümeraasi β subühikus paiknevas rifampitsiini seondumiskohas annavad bakterile *Mycobacterium smegmatis* resistentsuse rifampitsiini vastu, tõenäoliselt seetõttu, et valesti transleeritud on just rifampitsiini seondumiseks kriitilised aminohappejäägid (Javid et al., 2014).

Translatsiooni täpsuse vähenemise tulemusena sünteesitakse rohkem ebatäiuslikke valke, mis võib bakteril põhjustada stressivastust. Kui bakterirakus on näiteks palju valesti voltunud välismembraani poriinivalke, vallandub rakumembraani terviklikkust mõjutava alternatiivse sigmafaktori RpoE vahendatud stressivastus (Ades, 2004). *E. coli lacI* geeni kontekstis on näidatud, et LacI valgu 328 aminohappejäägi seas on 59% protsenti aminohappejääkidest võimalik asendada nii, et valgu funktsioon ei muutu (Markiewicz et al., 1994). Selle põhjal võib järeldada, et kuigi valgud taluvad üsna suurel määral aminohappeasendusi ilma kaasneva funktsioonimuutusega, on siiski märkimisväärne võimalus, et translatsioonitäpsuse muutusest tulenevad asendused valgu koosseisus vähendavad valgu võimet oma eesmärgi täita.

Paradoksaalselt võib bakteril olla ka vajalik kindlate stressorite üleelamiseks translatsioonitäpsust vähendada ja seega suurendada valesti transleeritud valkude kogust organismis. On näidatud, et subinhibitoorse kontsentratsiooni antibiootikumiga või vähese hapnikuga keskkonnas laeb *E. coli* metioniiniga ka mittemetioniini-tRNA süntetaase, kusjuures mutanttüvedes, kus see protsess on takistatud, on bakteril märgatavalt väiksem vastupanu klooramfenikoolile ja teistele stressoritele (M. H. Schwartz et al., 2016). Võimalik seletus sellele nähtusele on metioniini võime kaitsta oksüdatiivse stressi eest, olles oksüdantidele reageerimispartneriks ning takistades nende reageerimist teiste kriitilise tähtsusega või asukohaga aminohapetega (Levine et al., 1996). See näitab, et translatsioonitäpsus ning ka selle reguleerimine on bakteritele ellujäämiseks ja eri tingimustega kohanemiseks oluline.

1.2 Ribosoom

Translatsioon on üks olulisematest bakteris toimuvatest protsessidest, kuna see vahendab otseselt bakteri kasvu, ellujäämist ja paljunemist. Ribosoom on raku molekulaarne masin, kus

toimub translatsioon. Prokarüootne 70S ribosoom koosneb suurest (50S) ja väiksest (30S) subühikust. Bakteri *E. coli* ribosoomi 30S subühik koosneb 16S rRNA-st ja 21 ribosoomivalgust, tähistatud S1-S21 (Giri et al., 1984), ning 50S subühik koosneb ühest 5S rRNAst, ühest 23S rRNAst ja 33 ribosoomivalgust, tähistatud L1-L36 (Aoyama et al., 2022). 30S subühik vastutab mRNA dekodeerimise eest, kontrollides mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni omavahelist komplementaarsust ning 50S subühikus asub peptidüültransferaasne tsenter, mis katalüüsib valgusünteesil aminohapete vahelise peptiidsideme moodustumist (Wimberly et al., 2000). 30S subühik osaleb tRNA valikus ning kontrollib ka seeläbi translatsioonitäpsust (Culver, 2003). Translatsiooni initsiatsioonil ühenduvad 30S ja 50S subühik üheks kompleksiks tänu 12 subühikutevahelise silla tekkele, kusjuures võivad tekkida nii valk-valk, valk-RNA kui RNA-RNA vahelised sillad (Yusupov et al., 2001).

Ribosoomis on kolm tRNA seondumissaiti ehk A-sait (aktseptor-sait), P-sait (peptidüül-sait) ja E-sait (*exit*-sait). Polüpeptiidi sünteesi alustamiseks seondub P-saiti AUG koodonit tuvastav initsiaator-tRNA fMet-tRNA, millega on bakterites seondunud esimesena sünteesitavasse polüpeptiidi lisatav formüleeritud metioniin. Seejäral saab AUG kõrval asuva koodoniga seonduda elongatsioonifaktori EF-Tu vahendusel ribosoomi A-saiti toodud aminoatsüül-tRNA (ehk tRNA, mis kannab sünteesitavasse valku järgmisena lisatavat aminohapet) antikoodon (Kozak, 1999). Aminoatsüül-tRNA aminohappe α -aminorühma ja initsiaator-tRNA karbonüülrühma süsiniku vahel tekib peptiidside. Ribosoomi ühe koodoni võrra toimuva translokatsiooni tõttu liigub A-saidis olev tRNA P-saiti, nüüd juba lisatud aminohappejäägiga, ning jätab A-saidi vabaks, et sinna saaks seonduda järgmist aminohappejääki kandev aminoatsüül-tRNA. P-saidis olev tRNA liigub E-saiti ning seega dissotseerub ribosoomilt (Reynolds et al., 2010). Elongatsiooniprotsess jätkub uute aminoatsüül-tRNAde kohale toomisega, kuni ribosoomi A-saiti jõuab stoppkoodon. Stoppkoodonit tunnevad ära terminatsioonifaktorid RF1 või RF2, mis hüdrolyüsivad tRNA ja polüpeptiidi vahelise sideme ning vastsünteesitud valk vabaneb ribosoomilt (Baggett et al., 2017). Ribosoomi vabastav faktor RFF ja EF-G dissotseerivad ribosoomist, mRNA-st ja tRNA-st koosneva allesjäänud kompleksi ning neid taaskasutatakse uutes translatsioonitsüklites (Janosi et al., 1994).

Ribosoomil on tähtis roll translatsioonitäpsuse hoidmisel, soodustades konformatsiooniliste muutustega valgusünteesi käiku. Kui aa-tRNA seondub ribosoomi A-saiti, liiguvad ribosoomi 30S subühikus mõned konserveerunud nukleotiidid, nagu G530 ja A1492, koodon-antikoodon heeliksi lähedale koodoni ja antikoodoni vaheliste vesiniksidemete õigsust kontrollima ning selle liikumisega kaasneb terve 30S subühiku pea ja õla repositsioneerumine (Hoffer et al.,

2019). Seda protsessi kutsutakse suletud konformatsiooni liikumiseks, mis on optimaalne seisund õigete aa-tRNA-de valikuks ja GTP hüdrolyüsiks (Ogle et al., 2002).

Valgusünteesi kontrollijana on ribosoom oluline sensor, milles toimuvaid muutusi saab bakter kasutada erinevate stressitingimuste tajumiseks ning sobiliku vastuse algatamiseks. Ribosoomi konformatsiooni muutust või sünteesitud valkude seisu on pakutud peamiseks temperatuurišoki signaaliks, mille põhjal rakk tuvastab häiringu translatsiooniprotsessis ja algatab globaalse vastuse stressi üleelamiseks (VanBogelen & Neidhardt, 1990).

1.3 Ribosoomivalgud

Ribosoomivalkude (r-valkude) peamine roll on moodustada koos rRNA-ga terviklik ribosoom, mis oleks optimeeritud valgusünteesi täpseks ja kiireks toimumiseks. Ribosoomivalgud on nii bakterites, eukarüootides kui ka arhedes konserveerunud. 102 ribosoomivalkude perekonnast 32 perekonna esindajaid leidub kõikides eludomeenides, kusjuures suur osa konserveerunud ribosoomivalkudest mängivad olulist rolli ribosoomi subühikute kokkupanekul ja ühinemisel ning interakteeruvad tRNA-ga (Lecompte et al., 2002). *E. coli* 30S subühiku r-valgud koosnevad enamuses kõigest 70-170 aminohappejäägist, kuid suurim r-valk S1 koosneb lausa 557 aminohappejäägist, samas kui 50S subühiku r-valkude koostis jääb 46 ja 233 aminohappejäägi vahele (Wittmann, 1982).

Ribosoomivalgud on otseselt vajalikud enamuse ribosoomi assambleerumiseks vajalike suure ja väikse subühiku vaheliste sildade moodustamiseks, eriti r-valgud S13, S15 ja S19 (Gao et al., 2003a). R-valgud osalevad ka teiste sildade moodustumisel, näiteks ainuke subühikutevaheline valk-valk sild B1b moodustub L5 ja S13 r-valkudest (Gao et al., 2003b). Kuna paljud r-valgud moodustavad kontakte nii tRNA kui mRNA-ga, on r-valkude korrektne konformatsioon ja nende korrektne translatsioon tihti vajalik ribosoomi täpseks tööks. S9 ja S13 r-valkude C-terminaalsed sabad asuvad ribosoomi P-saidis antikoodonlingu lähedal ning nende deletsioon ei ole küll rakule letaalne, aga ribosoomi 30S subühiku afiinsus tRNA suhtes väheneb ja võib suurendada translatsioonil raaminihke tõenäosust (Hoang et al., 2004).

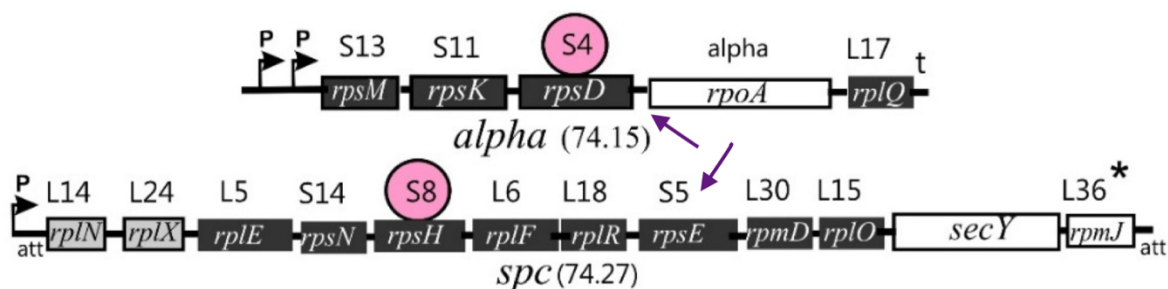
Ribosoomivalkudel on rakus tihti ka muid ülesandeid peale ribosoomi koostisesse kuulumise ja valgusünteesis osalemise. S1 valk on bakteris *E. coli* hädavajalik mRNA translatsiooni initsiatsiooniks ja sünteesitava polüpeptiidi elongatsiooniks (Sørensen et al., 1998) ning samuti aitab kaasa transkriptsiooni tsükli kiirele kordumisele, vabastades RNA polümeraasi RNA pealt ja võimaldades polümeraasil varem uut tsükli alustada (Sukhodolets et al., 2006). *E. coli* 50S

subühiku valgud L15, L16, L18 ja L19 on võimelised käituma nii RNA kui valkude puhul tšaperonidena ehk nad suunavad vastsünteesitud valke või RNA-sid korrektselt voltuma või stabiliseerivad juba korrektselt voltunud valku (Kovacs et al., 2009). Arvestades, et erinevalt muudest spetsiifilistest tšaperon-valkudest (nagu Hsp90) ei vaja mainitud r-valgud tšaperon-aktiivsuseks ATP energiat, võivad r-valgud olla üsna olulised organismi jaoks kiiretel kasvuperioodidel energia kokkuhoidmiseks (Panaretou et al., 1998). Ennetades valkude valesti voltumist väldib rakk stressi sattumist, mis võib olla kasvu ja paljunemist pärssiv ning ATP kokkuhoid tšaperon-valkude aktiivsuse pealt võimaldab rakul kasutada ATP-d olulisemateks protsessideks.

1.4 Ribosoomi valgud S4 ja S5

Ribosoomi valk S4 on üks kahest ribosoomi valgust, mis kontrollivad *E. coli* 30S ribosoomi subühiku assambleerimise initsiatsiooni (Nowotny & Nierhaus, 1988). Ribosoomi valku S4 kodeerib geen *rpsD*. Ribosoomi valk S4 on ribosoomi 16S rRNA 5' otsas ühenduskohaks viiele heeliksile (heeliksid 3, 4, 16, 17 ja 18) ja interakteerub veel heeliksiga 1 ja 21, stabiliseerides nii tervet ribosoomi 16S rRNA 5' domeeni (Ramaswamy & Woodson, 2009).

Ribosoomi valgu S5 kodeerimise eest vastutab geen *rpsE*. Ribosoomi valk S5 mängib olulist rolli ribosoomi 30S subühiku tRNA-d siduva tsentri formatsioonil, vahendades 16S rRNA-le seondudes ka S3 ja S21 valkude seondumist (Held et al., 1974; Ramakrishnan et al., 1986; Vladimirov et al., 1985). Konstrueerides ribosoomi 30S subühiku ilma S5 valguta, on tulemuseks 20-25S subühik, millel on vähenenud võime efektiivselt tRNA-d siduda (Nomura et al., 1969).

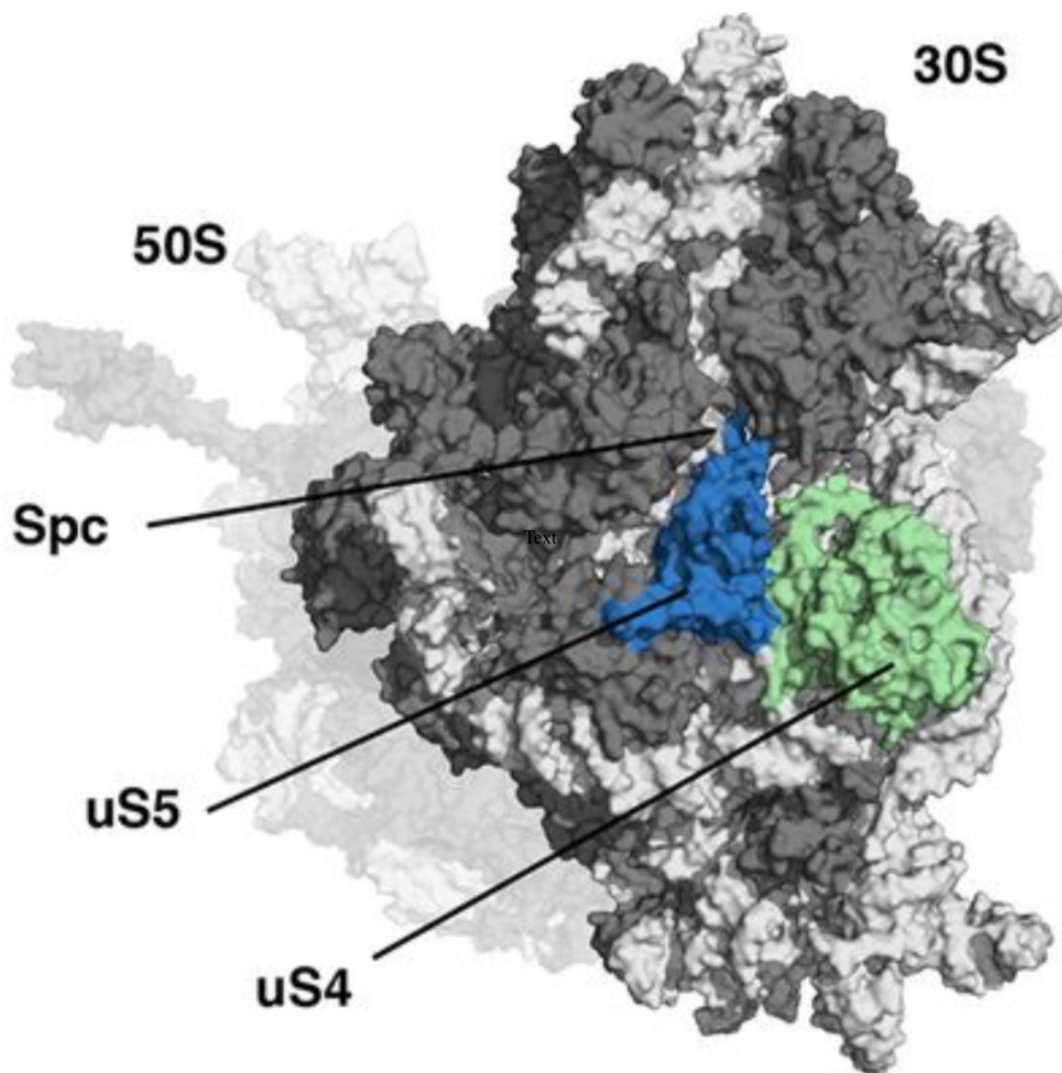


Joonis 2. Lõik *E. coli* kromosoomi operonidest ja nende asukohast kromosoomil. Geenid *rpsD* ja *rpsE* on tähistatud lillade nooltega. Roosa ring S4 valgu ümber tähistab, et S4 valk reguleerib iseennast. (modifitseeritud, Aseev et al., 2024)

E. coli kromosoomis asub *rpsD* geen α -operonis ning *rpsD* geeni kodeeritud S4 valk reguleerib ka α -operoni ekspressiooni (joonis 2, Aseev et al., 2024). Muteeritud *rpsD* geeniga *E. coli* tüves toodetakse liiga palju ribosoomi valke S13, S11 ja S4, mis näitab, et S4 valk funktsioneerib

translatsioonilise repressorina, represseerides ka iseenda produktsiooni (Jinks-Robertson & Nomura, 1982). S4 valk käitub ka transkriptsiooni antiterminaatorina, seondudes RNA polümeraasiga ja aidates rRNA operonides kaasa Rho-sõltuvate terminaatorjärjestuste ülelugemisele (Torres et al., 2001). S4 valgul on seega mitmeid rolle väljaspool ribosoomi koostist ja funktsiooni, reguleerides nii transkriptsiooni kui translatsiooni.

Geen *rpsE* asub *E. coli* kromosoomis *spc* operonis. *Spc* operon nimetati antibiootikumi spektinomütsiin lühendi „spc“ järgi, kuna *rpsE* geeni kodeeritud S5 valk vahendab tundlikkust spektinomütsiinile (Bollen et al., 1969). Spektinomütsiin seondub 16S rRNA heeliksile 34, mis asub 30S subühiku pea piirkonnas S5 valgu lähedal. Spektinomütsiin kuulub aminotsükliitoolide antibiootikumirühma ning takistab ribosoomi translokatsiooni ehk tRNA ja mRNA liikumist ribosoomil valgusünteesi käigus ning häirib seeläbi valgu biosünteesi (Peske et al., 2004).



Joonis 3. Ribosoomi valkude S4 ja S5 asukoht *E. coli* 70S ribosoomis. Helerohelisega on värvitud ribosoomi valk S4, sinisega ribosoomi valk S5, helehalliga rRNA ja tumehalliga ribosoomi valgud. Spc tähistab spektinomütsiini seondumiskohta ribosoomis (Kamath et al., 2017).

S4 ja S5 valkude olemasolu ja korrektsed ühendused teiste valkudega on hädavajalikud ribosoomi kokkupanekuks ja funktsioneerimiseks. Bakteriaalse ribosoomi 30S subühikus asuvad ribosoomi valgud S4 ja S5 lähestikku, moodustades mitmeid ühendusi nii üksteise kui ka teiste lähedal asuvate ribosoomi valkudega (joonis 3, Kamath et al., 2017). S5 valk on 16S rRNA-ga ühenduses ka S4-S5 ühenduse tasapinnast kaugemal (Agarwal et al., 2015). S4 ja S5 valkude ühenduse tasapinnal asuvad mitmed soolasillad, mis 30S domeeni üleminekul suletud olekusse katkevad. Mutatsioonid S4 või S5 valkudes võivad samuti neid ühendusi rikkuda ning on leitud, et mutatsioonid *rpsD* ja *rpsE* geenides võimaldavad ribosoomi 30S subühikul kergemat üleminekut suletud olekusse, kuna enam ei ole tarvis lisaenergiat soolasildade lõhkumiseks ning ka peaaegu sobivad tRNA-d võivad esile kutsuda domeeni sulgumist, vähendades translatsioonitäpsust (Ogle & Ramakrishnan, 2005). Sellisel juhul võiksid kõik lähikognaatsed tRNA-d 30S subühikus suletud olekusse üleminekut esile kutsuda ja seega vähendada translatsioonitäpsust, aga on näidatud, et *E. coli* *rpsD* K529 aminohappe kõikide võimalike asendustega mutandil suurenes hüppeliselt ainult AAU koodoni ülelugemine, mis oli ka *E. coli* WT tüves tihedamini üle loetud (Kramer & Farabaugh, 2007).

1975. aastal näitasid Piepersberg et al., et *E. coli* tüvel, mille *rpsE* geenis on streptomütsiinist sõltuvat fenotüüpi tekitav mutatsioon, tekib ka ribosomaalse ebamäärasuse fenotüüp ehk tüve translatsioonitäpsus on vähenenud (Piepersberg et al., 1975) ning see teadmine sidus *rpsE* geeni mutatsioonid translatsioonitäpsuse muutustega. S5 valk vahendab samuti resistentsust antibiootikumile spektinomütsiin (Bollen et al., 1969). On näidatud, et spektinomütsiinile resistentsel *E. coli* tüvel esineb S5 valgus rohkem lüsiini ja vähem glutamiinhapet kui spektinomütsiinile tundlikul *E. coli* tüvel, seega võib spektinomütsiini resistentsust vahendada mõne S5 valgus paikneva täpsustamata lüsiini konversioon glutamiinhappeks (Herzog & Bollen, 1971).

Võrreldes *E. coli* metsiktüvega on leitud, et *rpsD* geeni I199N punktmutatsiooniga *E. coli* tüves esineb 5 korda sagedamini UAG stoppkoodoni ülelugemist ning samuti leiti, et *rpsD* geeni I199N punktmutatsiooniga *E. coli* tüves on võrreldes *E. coli* metsiktüvega ülesreguleeritud 17 geeni, millest 14 reguleerib otseselt geen *rpoS*. RpoS on *E. coli*-s sigmafaktor, mille kontrollitud geenid aitavad bakteril kohaneda stressoritega nagu toitainete puudus statsionaarses faasis (Battesti et al., 2011). *rpsD* geeni I199N punktmutatsiooniga *E. coli* tüves ülesreguleeritud geenide hulka kuuluvad ka geenid *katE* ja *osmC*, mille regulatsioon on samuti otseselt geeni *rpoS* kontrolli all. Geen *katE* kodeerib *E. coli*-s H₂O₂ siduvat katalaasi HP_{II}, mille tase suureneb rakus statsionaarse faasi ajal, kui suureneb ka RpoS tase (Loewen et al., 1985). Geeni *osmC* kodeeritud valk kaitseb bakterit orgaaniliste hüdroperoksiidide eest (Conter et al., 2001). Leiti,

et *rpsD* geeni I199N punktmutatsiooniga tüvel on võrreldes *E. coli* metsiktüvega märgatavalt suurem ellujäämistase H_2O_2 juuresolekul ning kui mutanttüve *rpsD* geen metsiktüvega võrreldavaks reverteerida, taastus reverteeritud tüvel metsik fenotüüp ehk H_2O_2 taluvuse andis mutanttüvele just *rpsD* mutatsiooni tekitatud translatsioonitäpsuse vähenemine. (Fan et al., 2015). Seega on seotud mutatsioonid *rpsD* geenis ja bakteri stressitaluvus.

E. coli rpsD ja *rpsE* mutatsioonide mõju translatsioonitäpsusele uurimiseks on viidud nendesse geenidesse juhuslikke mutatsioone, kasutades geenide paljundamiseks vigaderohket polümeraasi ning selektiivsöödet mutantide tuvastamiseks. Leiti, et enamuse mutatsioone nendes geenides vähendavad translatsioonitäpsust suuremal või vähemal määral, kuid mõni mutatsioon teeb translatsiooniprotsessi ka täpsemaks. S4 valgu aminohappeasendus G86C ning S5 valgu aminohappeasendus I104L põhjustasid UGA koodoni ülelugemise vähenemist. Kõige tugevamat efekti UGA koodoni ülelugemise suurenemisel andsid S4 valgu mutatsioonid E165*, E201* ja K205E ning S5 valgu mutatsioonid N134Y, A109V ja T102I. Tärnid tähistavad mutatsioone, mis tekitasid selles positsioonis valgu enneaegset terminatsiooni. Nimetatud S4 valgu mutatsioonid põhjustavad ribosoomi 30S subühiku S4-S5 kokkupuutepinna ühenduseks olulise C-terminaalse α -heeliksi formatsiooni häirumist, mis võib omakorda häirida ribosoomi tööd ja põhjustada translatsioonitäpsuse vähenemist. Samuti mõõdeti, kas lüsiini tRNA, mis tavaliselt dekodeerib lüsiini koodoneid AAA ja AAG, tunneb ära ka asparagiinhapet kodeerivat AAU koodonit. Ka seal nähti sarnaseid tulemusi – S4 valgu mutatsioonid Q53P, E165* ja K204E ning S5 mutatsioonid Q96E ja A106V põhjustasid rohkem dekodeerimisvigu ehk vale aminohappe lülitamist sünteesitavasse polüpeptiidi ning translatsioonitäpsus vähenes. S4 valgu mutatsioonid G86C ja L202F ning S5 valgu mutatsioonid I104L ja E115Q põhjustasid translatsioonitäpsuse suurenemist ehk WT tüvega võrreldes lisati polüpeptiidi harvemini asparagiinhappe asemele lüsiin. (Agarwal et al., 2015)

1.5 Mutatsioonisagedus

Mutatsioonilised muutused, mis suurendavad populatsiooni geneetilist varieeruvust uute variantide tekke kaudu, võib jaotada muutusteks kromosoomide tasemel (eukarüootides muutused kromosoomide arvus ja struktuuris) ning muutusteks geeni tasemel, kus enamasti on tegemist muutustega spetsiifilistes DNA järjestuses. Viimaseid nimetatakse punktmutatsioonideks. Punktmutatsioonid on asendusmutatsioonid, kus üks aluspaar DNA järjestuses asendub teise aluspaariga. Genoomis võivad aset leida ka insertioonid ja

deletsioonid ühe või enama nukleotiidi ulatuses. Suuremad DNA fragmendid võivad genoomis ka inverteeruda, translokeeruda või duplitseeruda (Gordo et al., 2012).

Mutatsioonid võivad tekkida spontaanselt DNA replikatsiooni ajal tehtud vigade tõttu või indutseerivad neid erinevad mutageenid nagu UV-kiirgus või hapnikuradikaalid (ROS). Nagu eelnevalt mainitud, teevad DNA polümeraasid tihti DNA replikatsioonil vigu, jättes näiteks nukleotiide sünteesimata, sünteesides liigseid nukleotiide või lisades replitseeritavasse DNA-sse vale nukleotiidi. Kui neid vigu ei parandata, säilivad vead genoomis mutatsioonidena. Vigade parandamiseks on *E. coli* peamisel replikatsiooniensüümil DNA polümeraas III kompleksil eksonukleaasi domeen, mis loeb sünteesitud DNA-d 3'-5' suunas ning eemaldab lisatud nukleotiidi, kui see ei vasta lämmastikaluste komplementaarsusele (Livingston & Richardson, 1975). DNA *mismatch repair* (MMR) süsteem eemaldab nii DNA replikatsioonil tekkinud vigu kui ka mutageenide tekitatud vigu, näiteks ROS-põhjustatud guaniini mutatsiooni 8-oksoguaaniiniks (Wyrzykowski & Volkert, 2003). Kui bakteris on vähenenud translatsioonitäpsus, võivad DNA parandamises osalevad valgud olla mittefunktsionaalsed, tulemusena jääb genoomi rohkem mutatsioone ning bakteri mutatsioonisagedus suureneb.

Spontaansed mutatsioonid on erakordselt olulised bakterite evolutsioonis, andes neile uusi ja paremaid omadusi keskkonnaga toime tulemiseks, näiteks bakter *Mycobacterium tuberculosis* omandas resistentsuse antibiootikumi rifampitsiin vastu tänu mutatsioonidele geenis *rpoB*, mis kodeerib RNA polümeraasi β subühikut (Zaw et al., 2018). Mutatsioonid võivad aga olla ka neutraalsed, ehk mutatsioon ei mõjuta suuresti bakteri elu, või kahjulikud, häirides bakteri võimet ellu jääda või paljuneda (Eyre-Walker & Keightley, 2007). On leitud, et *E. coli* kahjulike mutatsioonide sagedus on 2×10^{-4} kuni 8×10^{-4} ühe raku jagunemise kohta (Boe et al., 2000) ning kasulike mutatsioonide sagedus on 4×10^{-9} ühe raku jagunemise kohta (Imhof & Schlötterer, 2001), seega on enamus mutatsioone bakterile pigem kahjulikud. Bakteril on seetõttu tarvis hoida mutatsioonisagedus piisavalt madalal, et viia kahjulike mutatsioonide tekkevõimalus miinimumini, aga samas piisavalt kõrgel tasemel, et mutatsioonisageduse vähendamine translatsioonitäpsuse tõstmise arvelt ei vajaks ületamatuid energiakulutusi (Drake, 1991).

DNA kahjustuse korral, mida tekitavad näiteks reaktiivsed hapnikuühendid või UV-kiirgus, käivitub bakterites SOS-vastus, mida juhivad LexA ja RecA valgud (Little & Mount, 1982). LexA seondumine RecA-ga derepresseerib SOS-geene (Butala et al., 2011), millest paljud kodeerivad valke, mis on seotud DNA parandamise ja rekombinatsiooniga (Foster, 2007). Kui DNA on nii kahjustunud, et replikatsioon on võimatu, ei piisa vigade parandamiseks vaid ühenukleotiidiseid vigu parandavatest ensüümidest. Sellisel juhul vähendab rakk DNA

replikatsioonitäpsust ja suurendab mutatsioonisagedust läbi vigaderohkete DNA polümeraaside ülesreguleerimise (Patel et al., 2010).

Kui keskkonnatingimused, nagu pH, temperatuur või kahjulike ühendite hulk, muutuvad bakterile ebasoodsaks ja stressitekitavaks, muutub bakterites paljude geenide ekspressioon, et raskemates tingimustes vastu pidada. Peamine stressitingimustes ülesreguleeritav geen on *E. coli*-s sigmafaktorit RpoS kodeeriv geen *rpoS*, mis reguleerib otseselt või kaudselt 10% *E. coli* geenidest (Weber et al., 2005) ja seeläbi aitab rakkudel stressiga toime tulla. RpoS ülesregulatsioon omakorda suurendab rakkude spontaanset mutatsioonisagedust, indutseerides *E. coli*-s hilises statsionaarses faasis vigaderohke DNA polümeraas IV taseme suurenemist rakus (Layton & Foster, 2003). Sarnast efekti on nähtud ka bakteris *Pseudomonas putida* - näljutatud ja seega stressis rakkudel esineb genoomis rohkem DNA polümeraas IV sõltuvaid ühenukleotiidseid deletsioone (Tegova et al., 2004). Kõrgem DNA polümeraas IV tase rakus võib kaasa tuua rohkem vigu DNA replikatsioonil. Kui need vead kinnistuvad mutatsioonidena, annab see bakterile geneetilist mitmekesisust ja võib soodustada stressitingimuste üleelamist.

Translatsioonitäpsus on otseselt mutatsioonisagedusega seotud, kuna translatsioonitäpsuse vähenemine suurendab tõenäosust, et bakteri genoomi satub rohkem mutatsioone. Translatsioonitäpsuse vähenemise tulemusena on rakus rohkem valke, mis sisaldavad oma järjestuses vigu ning vigaste valkude alla võivad kuuluda ka sellised valgud, mille eesmärgiks on mutatsioonide tekkimist ja kinnistumist ära hoida, nagu DNA parandamises osalevad ensüümid. Pseudouridiini süntaasid TruA ja RluA katalüüsivad bakteris *E. coli* uridiini modifitseerimist pseudouridiiniks vastavalt tRNA positsioonides 38-40 (TruA) ning 23S rRNA positsioonis 746 ja nelja erineva tRNA positsioonis 32 (RluA), sarnased sihtmärgid on nendel ensüümidel ka bakteris *P. putida* (Tagel et al., 2021). TruA sünteesitud pseudouridiinide puudumine tRNA antikoodonlingus suurendab nii *E. coli*-s kui *P. putida*-s -1 raaminihke esinemist ja UAG stoppkoodoni ülelugemist, RluA sünteesitud pseudouridiinide puudumine antikoodonlingus aga hoopis suurendas translatsioonitäpsust, vähendades nii raaminihke esinemist kui stoppkoodonite UAG ja UGA ülelugemist (Jürgenstein et al., 2022). TruA ja RluA sünteesitud pseudouridiinide puudumine bakteris *P. putida* suurendab mutatsioonisagedust vastavalt viis või kolm korda, mis näitab, et modifikatsioonide puudumise tulemusena translatsioonitäpsuse vähenemine võib suurendada tõenäosust, et bakteris on häiritud mõne mutatsioonisagedust kontrolli all hoidva valgu süntees (Tagel et al., 2021).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Translatsiooniliste vigade tõus võib bakteri jaoks tähendada seda, et vigaselt sünteesitud valgud võivad häirida bakteri elutegevust või teisalt hoopis võimaldada näiteks resistentsuse teket antibakteriaalsetele ühenditele. Translatsioonitäpsust mõjutavad RNA posttranskriptsioonilised modifikatsioonid, näiteks pseudouridiinid (Urbonavičius et al., 2001); koodon-antikoodon interaktsioonid (Reynolds et al., 2010) ning mutatsioonid ribosoomi valkudes (Agarwal et al., 2015).

Varasemalt on meie laboris näidatud, et tRNA modifikatsiooniensüümide TruA ja RluA puudumine suurendab mutatsioonisagedust bakteris *P. putida* (Tagel et al., 2021) ning leitud, et TruA modifitseeritud pseudouridiinide puudumisel muutub translatsioon vähem täpsemaks, kuna suureneb nii -1 raaminihke toimumise sagedus kui ka stoppkoodoni UAG ülelugemine *P. putida* rakkudes (Jürgenstein et al., 2022). Bakteris *E. coli* tehtud katsete põhjal on oletatud, et translatsioonivead võivad tõsta DNA-s tekkivate mutatsioonide sagedust (Al Mamun et al., 2006; Balashov & Humayun, 2002)

Translatsioonitäpsuse ja mutatsioonisageduse vahelise seose uurimist *P. putida* rakkudes võimaldaksid vähenenud translatsioonitäpsusega tüved, kus ribosoomi valkude geenid on muteeritud või asendatud alleelidega, mille kohta on teada, et need vähendavad translatsiooni täpsust. *E. coli* põhjal on teada, et mutatsioonid ribosoomi valke S4 ja S5 kodeerivates geenides *rpsD* ja *rpsE* mõjutavad translatsioonitäpsust (Agarwal et al., 2015). Seega mutatsioonid bakteri *P. putida* *rpsD* ning *rpsE* geenides võiksid samuti mõjutada translatsioonitäpsust ning võimaldada uurida translatsioonitäpsuse ja mutatsioonisageduse seost *P. putida* rakkudes. Sellest lähtuvalt püstitusid käesoleva töö eesmärgid:

1. Konstrueerida *Pseudomonas putida* vähenenud translatsioonitäpsusega tüved mutatsioonidega ribosoomi valke kodeerivates geenides *rpsD* ja *rpsE*
2. Selgitada välja *rpsD* ja *rpsE* mutatsioonide mõju *Pseudomonas putida* translatsioonitäpsusele
3. Uurida translatsioonitäpsuse mõju DNA mutatsioonide tekkesagedusele, kasutades *P. putida* vähenenud translatsioonitäpsusega tüvedes rifampitsiini (Rif) resistentsuse tekkel põhinevat testsüsteemi Rif^R mutantide tekkesageduse hindamiseks

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed

Baktereid kasvatati LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöötmes või M9-glükoos-CAA (ingl k – *casamino acids*) söötmes (edaspidi glcCAA), mille valmistamiseks lisati M9 puhvrissi (42 mM KH_2PO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 , 19 mM NH_4Cl , 9 mM NaCl) mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 666 μM MgO , 50 μM CaCO_3 , 40 μM FeSO_4 , 12,5 μM ZnSO_4 , 12,5 μM MnSO_4 , 2,5 μM CuSO_4 , 2,5 μM CoSO_4 , 1,9 μM H_3BO_4), glükoosi (lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ja kaseiini hüdroüsulaati (lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Vedelsöötmes kasvatades aereeriti kultuure loksutil. Tardsöötme valmistamiseks lisati söötmesse agarit 15 g/l. Kasutatud bakteritüvede ja plasmiidide loetelu on toodud tabelis 1.

Selektiooni jaoks kasutati järgmisi antibiootikume: kanamütsiin (Km, 50 $\mu\text{g/ml}$), rifampitsiin (Rif, 100 $\mu\text{g/ml}$), spektinomütsiin (Spc, 1750 $\mu\text{g/ml}$), streptomütsiin (Sm, 25-30 $\mu\text{g/ml}$). *Pseudomonas putida* rakke kasvatati temperatuuril 30°C või temperatuuril 20°C.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüved	Iseloomustus	Allikas
<i>P. putida</i> PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud KT2440 tüvega, säilitatakse CELMS kollektsioonis (https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php)	(Bayley et al., 1977)
<i>P. putida</i> PaW85 V22I	Geenis <i>rpsE</i> mutatsioon GTT → ATT S5 valgu positsioonis 24 asuva valiini koodonis, kus aminohape valiin on asendunud isoleutsiiniga	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaW85 K24E	Geenis <i>rpsE</i> mutatsioon AAA → GAA S5 valgu positsioonis 24 asuva lüsiini koodonis, kus lüsiin on asendunud glutamiinhappega	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaW85 G28D	Geenis <i>rpsE</i> mutatsioon GGC → GAC S5 valgu positsioonis 28 asuva glütsiini koodonis, kus glütsiin on asendunud asparagiinhappega	Käesolev töö

<i>P. putida</i> PaW85 G29R	Geenis <i>rpsE</i> mutatsioon GGC → CGC S5 valgu positsioonis 29 asuva glütsiini koodonis, kus glütsiin on asendunud arginiiniga	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaW85 T33I	Geenis <i>rpsE</i> mutatsioon ACC → ATC S5 valgu positsioonis 33 asuva treoniini koodonis, kus treoniin on asendunud isoleutsiiniga	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaW85 T33P	Geenis <i>rpsE</i> mutatsioon ACC → CCC S5 valgu positsioonis 33 asuva treoniini koodonis, kus treoniin on asendunud proliiniga	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaW85 Δ34-35	Geenis <i>rpsE</i> S5 valgu 34.-35. aminohapet kodeerivate nukleotiidide deletsioon	Käesolev töö
Plasmiidid		
pSNW2	I-SceI restriksioonisaite ja multikloonimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid, P14g(BCD2)→msfGFP, Km ^R	(Volke et al., 2020)
pSNW2/rpsD Q53P	pSNW2 plasmiid S4 ribosoomivalgu 53. positsiooni aminohappe Q53P muutmiseks	H. Ilves, avaldamata
pSNW2/rpsD G87C	pSNW2 plasmiid S4 ribosoomivalgu 87. positsiooni aminohappe G87C muutmiseks	H. Ilves, avaldamata
pSNW2/rpsD I200N	pSNW2 plasmiid S4 ribosoomivalgu 200. positsiooni aminohappe I200N muutmiseks	H. Ilves, avaldamata
pSNW2/rpsD S204T	pSNW2 plasmiid S4 ribosoomivalgu 204. positsiooni aminohappe S204T muutmiseks	H. Ilves, avaldamata

pSNW2/rpsD K206E	pSNW2 plasmiid S4 ribosoomivalgu 206. positsiooni aminohappe K206E muutmiseks	H. Ilves, avaldamata
pSEVA AD2	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja <i>linker</i> -regioonis -1 raaminihet	(Jürgenstein et al., 2022)
pSEVA AD7	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja <i>linker</i> -regioonis -1 raaminihet	(Jürgenstein et al., 2022)
pSEVA UUC -1	pSEVA lacI-tac RF derivaat, mis sisaldab libisevat polü-U järjestust, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja <i>linker</i> -regioonis -1 raaminihet	(Jürgenstein et al., 2022)
pSEVA UUC +1	pSEVA lacI-tac RF derivaat, mis sisaldab libisevat polü-U järjestust, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja <i>linker</i> -regioonis +1 raaminihet	(Jürgenstein et al., 2022)
pSEVA 304	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja UAG stoppkoodoni ülelugemist positsioonis 304	(Jürgenstein et al., 2022)
pSEVA 417	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja UGA stoppkoodoni ülelugemist positsioonis 417	(Jürgenstein et al., 2022)

2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Pseudomonas putida kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml LB vedelsöötmes temperatuuril 30°C. 100-250 µl üleöökuultuuri tsentrifuugiti kokku (1 min 12000 x g) ja pesti kolm korda 300 mM sahharoosilahusega. Rakud suspendeeriti ligikaudu 100 µl 300 mM sahharoosilahuses.

Plasmiidne DNA viidi kompetentsetesse rakkudesse elektroporatsiooni teel. Rakkudele lisati 100 ng plasmiidset DNA-d. Elektroporatsiooniks kasutati firma *BioRad* elektroporaatorit „E.

coli Pulser“ pingel 2500V. Elektroporatsiooni järgselt lisati rakkudele 1 ml värsket LB vedelsöödet, kasvatati loksutil 45 minutit 30°C juures ning plaaditi seejärel selektiivsöötmel.

2.2.3 PCR

PCR-i kasutati kointegraatide ja plasmiidide kontrolliks. Reaktsioonisegu lõppmahuks oli 20 µl ning see sisaldas: 1x PCR-i puhvrit; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP-d; 0,5 U Taq või Phusion polümeraasi; praimereid kontsentratsiooniga 10 pmol reaktsiooni kohta. Töös kasutatud praimerid on toodud tabelis 2. Taq polümeraasi asemel Phusion polümeraasi kasutades järgiti tootja protokoll. Matriitsina kasutati bakterirakkude DNA-d.

PCR-i reaktsioon koosnes 25 tsüklist. Ühe tsükli moodustas: 1) DNA denaturatsioon 96°C juures 30 sekundit; 2) praimerite seondumine DNA-le 55-59°C juures 30 sekundit, temperatuur sõltus praimeri GC sisaldusest; 3) DNA süntees 72°C juures 40-90 sekundit, aeg sõltus amplifitseeritava DNA lõigu pikkusest. Esimesele tsüklile eelnes 2-10 minuti pikkune eelkuumutus 96°C juures. Viimasele tsüklile järgnes 5 minuti pikkune järelsüntees 72°C juures, mille käigus sünteesiti lõpuni kõik pooleli olevad DNA fragmendid.

Tabel 2. Kasutatud praimerid

Praimer	Nukleotiidne järjestus	Kasutamine
Prtac	5'-AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3'	Kasutati topeltlutsiferaasi testsüsteemi kontrollimiseks.
FlucDIR1	5'AGCTTCTGCCAACCGAACGGAC-3'	
fw	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Kasutati sekveneerimisel. Plasmidi pNSW2 universaalpraimerid.
rev	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	
pSW-F	5'-GGACGCTTCGCTGAAACTA-3'	Kasutati pSW(I-SceI) plasmidi kontrollimiseks.
pSW-R	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAA-3'	

rpsD fw	5'-CCGAAGAAGCGTCGCGTG-3'	Kasutati geeni <i>rpsD</i> amplifitseerimiseks.
rpsD rev	5'-GCGGGGAGTCAGGAACTC-3'	
del rpsE2 fw ER	5'- CGAATTCTCGACAAGCAGCTGGTAGGTC- 3'	Kasutati geeni <i>rpsE</i> amplifitseerimiseks.
del rpsE rev BH	5'- CGGATCCTGTGCTGGTTGATCACGTTGG- 3'	

2.2.4 Restriksioonianalüüs

Eraldatud plasmidi kontrollimiseks ning homoloogilise rekombinatsiooni õnnestumise kontrolliks tehti restriksioonianalüüs. DNA restriksiooniks kasutati firma *Thermo Scientific* restriктаase, järgides analüüsil tootja tingimusi. Restriksioonianalüüsi tulemusi visualiseeriti geelelektroforeesiga.

2.2.5 Geelelektroforees

PCR-i produkte ja restriктаasidega lõigatud DNA-d analüüsiti geelelektroforeesil. Analüüsitavale proovile lisati 4 µl foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis) ning seejärel kanti proov 1% agarosgeelile 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi kontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati firma *Thermo Scientific* DNA markerit. Elektroforees toimus pingel 130 V. Tulemusi visualiseeriti UV valguses.

2.2.6 Koht-suunatud mutagenees

Vastavalt Agarwali artiklile valiti esmalt välja *E. coli* geeni *rpsD* mutatsioonid, mida ka *P. putida* *rpsD* geenis muteerida (Agarwal et al., 2015). Nendeks osutusid *rpsD* geeni mutatsioonid, mis põhjustasid S4 valgus aminohappe asendusi Q53P, G87C, I199N, S204T ja K205E, kuna nendes positsioonides toimunud asendustel oli bakteris *E. coli* kõige suuremad translatsioonitäpsust vähendavad või suurendavad efektid. *P. putida* S4 aminohapete numbriduse järgi oleksid need mutatsioonid vastavalt Q53P, G87C, I199N, S204T ja K205E.

Protsessi eesmärgiks oli saada ribosoomivalgu S4 kindlate aminohappe asendusega *P. putida* PaW85 tüved. Selleks kasutati Heili Ilvese konstrueeritud plasmide: pSNW2/rpsD Q53P, pSNW2/rpsD G87C, pSNW2/rpsD I199N, pSNW2/rpsD S204T, pSNW2/rpsD K205E, ja P. Nikeli grupis väljatöötatud meetodika (Wirth et al., 2020) kohandatud versiooni.

Geeni *rpsD* mutatsiooni sisaldav plasmid viidi elektroporatsiooniga *P. putida* rakkudesse ning kuna plasmid bakteris ei replitseeru, integreerub see bakteri kromosoomi. Kointegraati sisaldavaid rakke selekteeriti Km sisaldaval LB tardsöötmele (75 µg/ml). Seejärel elektroporeeriti kointegraadiga rakkudesse plasmid pSW(I-SceI), mis sisaldab I-SceI endonukleaasi kodeerivat geeni, ning plasmidiga pSW(I-SceI) rakkude selekteerimiseks kasutati Pen sisaldavat LB tardsöödet. Plasmidi olemasolu kontrolliti PCR-iga, kasutades praimereid pSW-R ja pSW-F. I-SceI nukleaasi indutseerimiseks kasvatati rakke üleöö loksutil LB söötmes 3 mM meta-toluaadi ja penitsilliini juuresolekul temperatuuril 30°C. I-SceI endonukleas tekitab kaheahelalisi lõikeid kromosoomi integreerunud *rpsD* mutatsiooni sisaldava plasmidi I-SceI lõikesaitides. Selline lõikamine võimaldab homoloogilisel rekombinatsioonil toimuda bakteri genoomis oleva *rpsD* geeni eelse ja järgse ala ning plasmidis sisalduva muteeritud *rpsD* geeni vahel. Homoloogilise rekombinatsiooni tulemusena peaks genoomi pooltel juhtudel jääma metsiktüüpi lookus ning pooltel juhtudel mutatsiooni sisaldav lookus. Kui rakkudes on kointegraat lahutatud ja homoloogiline rekombinatsioon on toimunud, siis need rakud ei kasva Km sisaldaval söötmele ning samuti enam ei helenda sinises valguses, kuna rekombinatsiooni tulemusena ei sisalda genoom enam pSNW2 plasmidis olevat Km resistentsusgeeni ega ka roheliselt fluorestseeruvat valku kodeerivat *gfp* geeni. Homoloogilise rekombinatsiooni toimumise kontrollimiseks tehti üleöö kultuuridest lahjendusrida, mis külvati LB tassile. Mitteharendavad kolooniad külvati paralleelselt LB tassile ja kanamütsiini sisaldavale LB tassile. Geeni *rpsD* mutatsiooni olemasolu kontrolliks tehti Km-l mittekasvavatele *P. putida* kloonidele PCR, kasutades praimereid rpsD fw ja rpsD rev. PCR produktid kas sekveneeriti või asenduse G87C juhtudel lõigati PCR produkte restriktasiga BshTI ning asenduse Q53P juhtudel restriktasiga PvuII, mis võimaldas eristada algset ja mutatsiooniga *rpsD* varianti.

2.2.7 Seleksioon spontaansete spektinomütsiinile resistentsete kolooniate isoleerimiseks

Seleksioonil kasutati modifitseerituna Kamath, Gregory ja O'Connori töögrupi loodud meetodit (Kamath et al., 2017). Spektinomütsiini seleksiooni jaoks kasvatati *Pseudomonas*

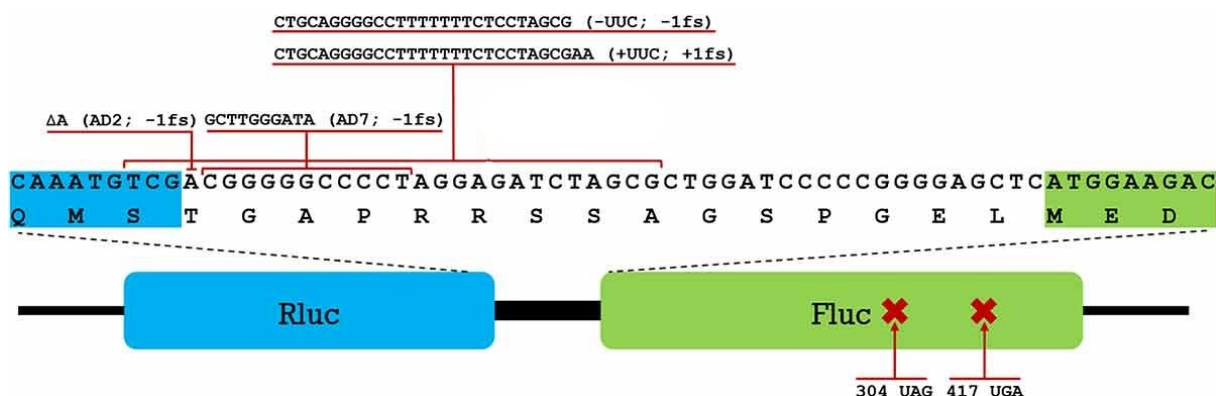
putida PaW85 tüve rakke 4 ml LB vedelsöötmes 6h 30°C juures. 6 tundi kasvanud kultuuri lahjendati 100x värskesse LB vedelsöötmesse ning lahjendus lisati 300 µl kaupa 1,3 ml LB vedelsöötmega 20 katseklaasi. Katseklaasid kasvasid loksutil 30°C juures 20 tundi. Seejärel plaaditi igast katseklaasist 100 µl kultuuri 1750 µg/ml spektinomütsiini sisaldavatele LB tardsöötmetele ja tasse inkubeeriti 48 tundi 30°C juures. Igalt LB spektinomütsiinitassilt külvati 3 kolooniat värsketele 1750 µg/ml spektinomütsiini sisaldavale LB tardsöötmele ning inkubeeriti 24h 30°C juures. Isoleeriti 33 *P. putida* spektinomütsiiniresistentset mutanti, mille *rpsE* geeni kontrollimiseks tehti PCR praimeritega del rpsE2 fw ER ja del rpsE rev BH ning *rpsE* geeni PCR produktid sekveneeriti samu primereid kasutades. Sekveneerimise tulemusena tuvastati, et 33-st mutandist 21 mutandil oli S5 valgus T33I aminohappe asendus. Järgnevateks katseteks valiti välja 7 erinevat *P. putida* *rpsE* mutanti (tabel 1).

2.2.8 Sekveneerimine

Sekveneerimist kasutati mutantsete tüvede *rpsE* geenide ja plasmiidide kontrolliks. Sekveneerimise reaktsioonisegu jaoks töödeldi esiteks PCR-i reaktsioonisegu 2,5 U eksonukleasiga ExoI (*Thermo Scientific*) ja 1 U aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*), et eemaldada PCR-i reaktsioonisegust üle jäänud praimerid ja nukleotiidid. Töötlus toimus 15 minutit temperatuuril 37°C, seejärel inaktiveeriti ensüümid 15 minuti jooksul temperatuuril 80°C. Sekveneerimiseks valmistati proovid ette kitiga „*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*“ firmalt *Applied Biosystem*. Sekveneerimise jaoks lisati reaktsioonisegusse (lõppmahuga 10 µl) 0,5 µl töödeldud PCR produkti ning primereid fw ja rev, 1,6 pmol reaktsiooni kohta. Reaktsioon koosnes 30 tsüklist. Ühe tsükli etapid olid: 1) DNA denaturatsioon 15 sekundit temperatuuril 96°C; 2) praimeri seondumine 10 sekundit temperatuuril 50°C; 3) DNA süntees 1 minut temperatuuril 60°C. DNA järjestused määrati firma *Applied Biosystems* 3730xl kapillaarsekvenaatoriga. Samuti sekveneeriti *rpsE* mutantide kogu genoom, et kindlaks teha, et genoomis pole väljaspool *rpsE* geeni kaasuvaid mutatsioone. Selleks kasutati Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklabori teenuseid ning firma *Applied Biosystems* 3730xl DNA Analyzer kapillaarsekvenaatorit.

2.2.9 Translatsioonitäpsuse mõõtmine topeltlutsiferaasi testsüsteemiga

Topeltlutsiferaasi testsüsteemiga translatsioonitäpsuse mõõtmiseks viidi *P. putida* metsiktüvesse ja *rpsE* mutantidesse reporterplasmiidid pSEVA AD2, pSEVA AD7, pSEVA UUC -1, pSEVA UUC +1, pSEVA 304 ja pSEVA 417 (joonis 4). Plasmiidide olemasolu bakteri kromosoomis kontrolliti koloonia PCR-iga, kasutades praimeripaari Prtac ja FlucDIR1.



Joonis 4. Skemaatiline esitus topeltlutsiferaasi testsüsteemist. Joonisel on näidatud testsüsteemilt kodeeritud liitvalk, kus fluorestseeruvad Rluc ja Fluc lutsiferaasid on märgitud vastavalt sinise ja rohelisega ning nende vaheline *linker*-regioon on märgitud paksu musta joonega. Liitvalgu joonise kohal on näidatud vastavates värvides nii lutsiferaaside kui nende vahelise linker-regiooni nukleotiidne ja aminohappeline järjestus. Nukleotiidses järjestuses on märgitud vastavates vektorites olevad mutatsioonid. Punaste ristidega on tähistatud stoppkoodoneid sisaldavad vektorid. (Jürgenstein et al., 2022, muudetud)

Plasmiidiga rakkudega inokuleeriti 1,5 ml glcCAA söödet, kuhu oli lisatud antibiootikumi kanamütsiin (50 µg/ml) ning rakke kasvatati 17-19 tundi temperatuuril 30°C. Üleöö kultuuri optiline tihedus mõõdeti 580 nm juures ning seejärel lahjendati rakukultuuri kuni OD₅₈₀=0,1. Lahjendus tehti 2 ml värskesse glcCAA vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud IPTG (lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM) ja rakke kasvatati 3 tundi temperatuuril 30°C. Mõõtmiseks tsentrifuugiti kokku 1 ml tüvede rakukultuuri (2,5 min 12100 x g). Supernatant eemaldati ja rakud külmutati vedelas lämmastikus. Külmutatud rakud suspendeeriti 400 µl firma *Promega* 1x lüüsipuhvrts.

Mõõtmist teostati *TECAN infinite M200 Pro* mikrotiiterplaadilugejaga. Mikrotiiterplaadile kanti 50 µl rakke sisaldavat lüüsipuhvrit ning 50 µl firma *Promega* topeltlutsiferaasi testsüsteemi Fluc-i substraati LAR II-te (LAR – *luciferase assay reagent*). Lahused segati suspendeerides ning LAR II lisamisel käivitati kell. Mikrotiiterplaadilugeja mõõtis lahuse luminesentsi 2 minutit peale LAR II lisamist. Plaadil olev reaktsioonisegu lahjendati 50x 1x lüüsipuhvrts. 100 µl lahjendatud reaktsioonisegule lisati LAR II lisamisest 4 minuti möödudes 50 µl Stop&Glo Rluc-i substraati, mis peatab LAR II reaktsiooni ning on substraadiks Rluc-i

reaktsioonile. Mikrotiiterplaadilugeja mõõtis lahuse luminesentsi, kui Stop&Glo lisamisest oli möödunud 2 minutit.

2.2.10 Mutatsioonisageduse mõõtmine Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga

Rif^R/*rpoB* testsüsteemi kasutati *P. putida* metsiktüve ja *rpsE* mutanttüvede mutatsioonisageduse võrdlemiseks. *P. putida* metsiktüve ja *rpsE* mutanttüvesid kasvatati glcCAA söötmes 6-7 tundi temperatuuril 30°C. Kultuuridest tehti 10⁵ lahjendus 25 ml värske glcCAA vedelsöötme sisse ning jaotati 2,3 ml kaupa katseklaasidesse. Kultuure kasvatati loksutil 18h temperatuuril 30°C. Seejärel plaaditi 500 µl igast kultuurist rifampitsiini sisaldavatele LB-tassidele ning inkubeeriti kaks päeva temperatuuril 30°C. Kolooniaid loendati 24 ja 48 tunni möödudes. (Jatsenko et al., 2010)

Bakterirakkude elumust määrati kolooniaid moodustavate rakkude (CFU, ingl k – *colony forming unit*) arvukuse abil. Selleks tehti üleöö kasvanud bakterikultuuridest 1xM9 puhvrissi lahjendusterida ja kanti lahjendustest 5 µl tilgad LB-tassile. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 30°C ning seejärel loendati tassil kasvanud kolooniad. Kolooniade arvu ja rakukultuuri lahjenduse põhjal arvutati elusrakkude hulk 1 ml üleöökultuuris. Arvestades rakukultuuri elumust ja Rif-söötmele ilmunud antibiootikumiresistentsete kolooniade arvu, arvutati mutantide tekkesagedus järgneva valemiga:

$$\text{Mutantide sagedus} = \frac{\text{Mutantide arv/ml}}{\text{CFU/ml}}$$

2.2.11 Reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) detekteerimine

Reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) detekteerimiseks kasutati Svenningseni töögrupi (Svenningsen et al., 2015) loodud meetodit. ROS-ide taseme määramiseks mõõdeti üleöö glcCAA vedelsöötmes kasvanud kultuuride optiline tihedus 600 nm juures ning lahjendati kultuure värskesse glcCAA vedelsöötmesse, et kultuuri optiline tihedus oleks 0,1. Lahjenduskultuure kasvatati loksutis 3 tundi temperatuuril 30°C. 3 tunni möödudes võeti iga bakteritüve kohta 1 ml kultuuri. Rakud tsentrifuugiti põhja (1 min 12 000 g) ning võeti üles 1 ml 1xM9 puhvrissi. Rakkudele lisati 20 µl H₂DCFDA lahust (1 mg/ml, lahustatud DMSO-s) ning lasti värvil mõjuda pimedas toatemperatuuril 30 minutit. Seejärel tsentrifuugiti rakud põhja 1 min, pesti 1xM9 puhvriga, tsentrifuugiti uuesti põhja ning võeti üles 1 ml 1xM9 puhvrissi. Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol mikrotiiterplaadile kanti igast tüvest 100 µl viies

korduses. *Tecan M200 Infinite Pro* mikrotiiterplaadilugejaga mõõdeti iga tüve OD600 ja fluorestsentsi intensiivsus (emissioon 525 nm ja ergastus 485 nm).

2.2.12 Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati firma *Graphpad Software* programmi GraphPad Prism v10.4.2. Statistilise analüüsi tegemiseks eeldati, et andmed ei jaotu normaaljaotuse järgi ning analüüsiks kasutati Kruskal-Wallise mitteparameetrilist testi koos Dunn'i *post-hoc* testiga.

2.3 TULEMUSED

2.3.1 *P. putida* ja *E. coli* 30S ribosoomivalkude S4 ja S5 võrdlus

Kuna bakteris *Pseudomonas putida* pole ribosoomivalke S4 ja S5 uuritud ning enamik kirjanduses avaldatud teadmistest pärineb bakterist *E. coli*, siis võrreldi kõigepealt *E. coli* ja *P. putida* S4 ja S5 ribosoomivalke kodeerivate geenide *rpsD* ja *rpsE* sarnasust.

P. putida ja *E. coli* *rpsD* ja *rpsE* geenide sarnasuse leidmiseks joondati geenid CLUSTALO programmi kasutades. Selgus, et nende bakterite *rpsD* geenide nukleotiidsete järjestuste identsuse protsent on 67,31% ning *rpsE* geenide identsuse protsent on 69,68%, mis tähendab, et geenid on suures osas konserveerunud, aga leidub siiski erisusi. Sarnasust kontrolliti ka spetsiifiliselt *rpsE* geeni kodeeritud S5 valgu ling 2 regioonis ehk aminohappejääkide 20-31 piirkonnas (nukleotiidid 58-93), lisades sellele ka lingust kaugemale jäävad aminohappejäägid 32-35 (nukleotiidid 94-105). *E. coli* ja *P. putida* *rpsE* geenide nukleotiidide 58-105 lõigus oli identsuse protsent 80%. See näitab, et S5 valgu spektinomütsiini tundlikkust vahendav ling on nii bakteris *E. coli* kui bakteris *P. putida* konserveerunud.

Lisaks *rpsD* ning *rpsE* geenide joondamisele võrreldi ka bakterite *P. putida* ja *E. coli* S4 ja S5 valkude aminohappelisi järjestusi ning leiti, et bakterite S4 valkude aminohappeliste järjestuste identsuse protsent on 73,3% ja S5 valkude identsuse protsent on 72,73% (joonised 5 ja 6). *E. coli* S5 valgu positsioonidele 20-35 vastavate aminohapete seas on *E. coli*-s ja *P. putida*-s pea kõik samad aminohapped. Erinevused on positsioonis 23, kus *P. putida*-l paiknebalaniin ja *E. coli*-l seriin ning positsioonis 33, kus *P. putida*-l paikneb treoniin ja *E. coli*-l seriin.

```
P. putida S4  MARYIGPKCKLSRREGTDLFLKSGVRALESKCNIEAAPGIHQRRGRQSYGTLLREKQK 60
E. coli S4    MARYLGPKLKLRSRREGTDLFLKSGVRAIDTKCKIEQAPGQHGARKPRLSDYGVLLREKQK 60
****:* ** *****:***:*** ** * * * * *

P. putida S4  VRRYIGVLERQFRGYYQAAASKKGATGENLLQLLECRLDNVVYRMGFGSTRSESRLVSH 120
E. coli S4    VRRYIGVLERQFRNYYKEAARLKGNTGENLLALLEGRLDNVVYRMGFGATRAEARQLVSH 120
*****.* ** : ** * * ***** * * *****:***:***

P. putida S4  KAISVNGKTVNIPSYQVRPGDVAVREKSLGQLRIVQALELCAQRGRVEWVDVDAKKSG 180
E. coli S4    KAIMVNGRVVNIASYQVSPNDVVSIREKAKKQSRVKAALAEQREKPTWLEVDAGKMEG 180
*** ***:*** * * * * * .***:***: * *: ****. * *: *:***.*

P. putida S4  VFKNVPARSDLSADINENLIVELYSK 206
E. coli S4    TFKRKPERSDLSADINEHLIVELYSK 206
.*. * *****:*****
```

Joonis 5. *P. putida* ja *E. coli* S4 valkude aminohappeliste järjestuste võrdlus. Rohelisega on esile tõstetud aminohapped, mida kodeerivates nukleotiidides on pNSW2/rpsD plasmiidides mutatsioonid. Joonduse all olevad tärnid tähistavad konserveerunud, mõlemas valgus identseid aminohappeid; koolonid tähistavad, et erinevates valkudes on sarnaste omadustega aminohapped (Gonnet PAM 250 maatriksi skoor >0,5); punktid tähistavad, et erinevates valkudes on erinevate omadustega aminohapped (Gonnet PAM 250 maatriksi skoor =<0,5).

<i>P. putida</i> S5	MANNDQKRDEGYIEKLVQVNRVAKTVKGGRIETFTALTVVGDGKGRVGFGRGKSREVPAA	60
<i>E. coli</i> S5	-MAHIEKQAGELQEKLIQVNRVSKTVKGGRIFSFTALTVVGDGNGRVGFGYKAREVPAA	59
	: *: : ***: ***: *****: *****: *****: *****: *****	
<i>P. putida</i> S5	IQKAMEAARRNMIQVDLKGTTLQYATKAAHGASKVYMQPASEGTGIIAGGAMRAVLEVAG	120
<i>E. coli</i> S5	IQKAMEKARRNMINVALNNGTLQHPVKGVHTGSRVFMQPASEGTGIIAGGAMRAVLEVAG	119
	***** *****: * *: . ***: .*..* .*: *****: *****	
<i>P. putida</i> S5	VQNVLAACYGSTNPVNVVYATFKGLKAMQSPESIAAKRGKSVEEIF--	166
<i>E. coli</i> S5	VHNVLAAYGSTNPINVVRATIDGLENMNSPEMVAAKRGKSVEEILGK	167
	*: *****: *****: *** *: . ** : *: *** : *****:	

Joonis 6. *P. putida* ja *E. coli* S5 valkude aminohappeliste järjestuste võrdlus. Sinisega on esile tõstetud aminohapped, mis on *rpsE* mutanttüvedes asendatud. Joonduse all olevad tärnid tähistavad konserveerunud, mõlemas valgus identseid aminohappeid; koolonid tähistavad, et erinevates valkudes on sarnaste omadustega aminohapped (Gonnet PAM 250 maatriksi skoor >0,5); punktid tähistavad, et erinevates valkudes on erinevate omadustega aminohapped (Gonnet PAM 250 maatriksi skoor ≤0,5).

Kuna *P. putida* ja *E. coli* S4 ja S5 valkude aminohappelised järjestused on sarnased, siis järelikult võib *P. putida* S4 ja S5 valkude muteerimisel aluseks võtta bakteris *E. coli* leitud oluliselt translatsioonitäpsust mõjutavad aminohapete asendused S4 ja S5 valkudes.

2.3.2 *Pseudomonas putida* ribosoomivalku S4 kodeeriva *rpsD* geeni suunatud mutagenees

Selleks, et välja selgitada, kas translatsioonitäpsus mõjutab *P. putida* rakkudes mutatsioonide teket, oli esmalt vaja konstrueerida *P. putida* tüved, milles translatsioonitäpsus on vähenenud. *E. coli* rakkudega tehtud katsetest oli teada, et teatud asendusmutatsioonid ribosoomi 30S subühiku valku S4 kodeerivas *rpsD* geenis muudavad translatsiooni vähem täpsemaks, näiteks *rpsD* mutatsioonid, mis põhjustasid aminohapete muutusi positsioonides Q53P, G87C, I199N, S204T ja K205E (Agarwal et al., 2015). Sellest lähtudes otsustati koos juhendajatega kasutada suunatud mutageneesi meetodikat, et viia samad aminohappe muutused *P. putida* S4 ribosoomivalku. Selleks kasutati juhendaja konstrueeritud plasmide ja Wirthi töögrupi avaldatud meetodika kohandatud versiooni (Wirth et al., 2020). Tuleb aga ära mainida, et eelnevalt kirjeldatud tegevused ei andnud soovitud tulemusi ja käesolevas magistritöös on neid mainitud vaid töökäigu ilmetamiseks. Suunatud mutageneesi kallal töötati koos juhendajate abiga.

Koostöös juhendaja Heili Ilvesega õnnestus töö käigus konstrueerida viis pSNW2 plasmide, mis kandsid igaüks ühte *rpsD* geeni mutatsiooni, milleks olid Q53P, G86C, I200N, S204T ja K206E. Eduka suunatud mutageneesi puhul peaks mutatsioonidega pSNW2/*rpsD* plasmidid homoloogilise rekombinatsiooni teel integreeruma bakteri kromosoomi. Mutatsioonidega pSNW2/*rpsD* plasmide elektroporeeriti *P. putida* PaW85 rakkudesse, kuid seniteadmata põhjustel ei andnud homoloogiline rekombinatsioon soovitud tulemusi ning taastus metsiktüüpi lookus ehk kõik kolooniad sisaldasid ainult metsiktüüpi *rpsD* lookust. Kokku analüüsiti

mutantse *rpsD* geeni leidmiseks Q53P mutatsiooni puhul vähemalt 508 kolooniat ning G86C puhul vähemalt 95 kolooniat. Paralleelselt töötas käesoleva magistritöö juhendaja Karl Jürgeisen *rpsE* mutatsioonidega plasmiidide konstrueerimisega ja plasmiidide *P. putida* metsiktüvesse viimisega, kuid ka see tegevus ei andnud tulemusi.

Hetkel ei ole täpselt teada, miks suunatud mutageneesi meetoodika abil soovitud mutatsioone *rpsD* ja *rpsE* geenidesse viia ei õnnestunud ning seda oleks ka raske hetkel teadaoleva informatsiooni põhjal öelda. Võimalik seletus on, et soovitud mutatsioonid *rpsD* geenis oleksid bakteris *P. putida* liialt olulised valgufunktsiooni jaoks ning nende mutatsioonidega bakterid ei oleks elujõulised. Samuti võivad kasutatud meetoodika nüansid olla nende spetsiifiliste mutatsioonide sisseviimiseks puudulikud.

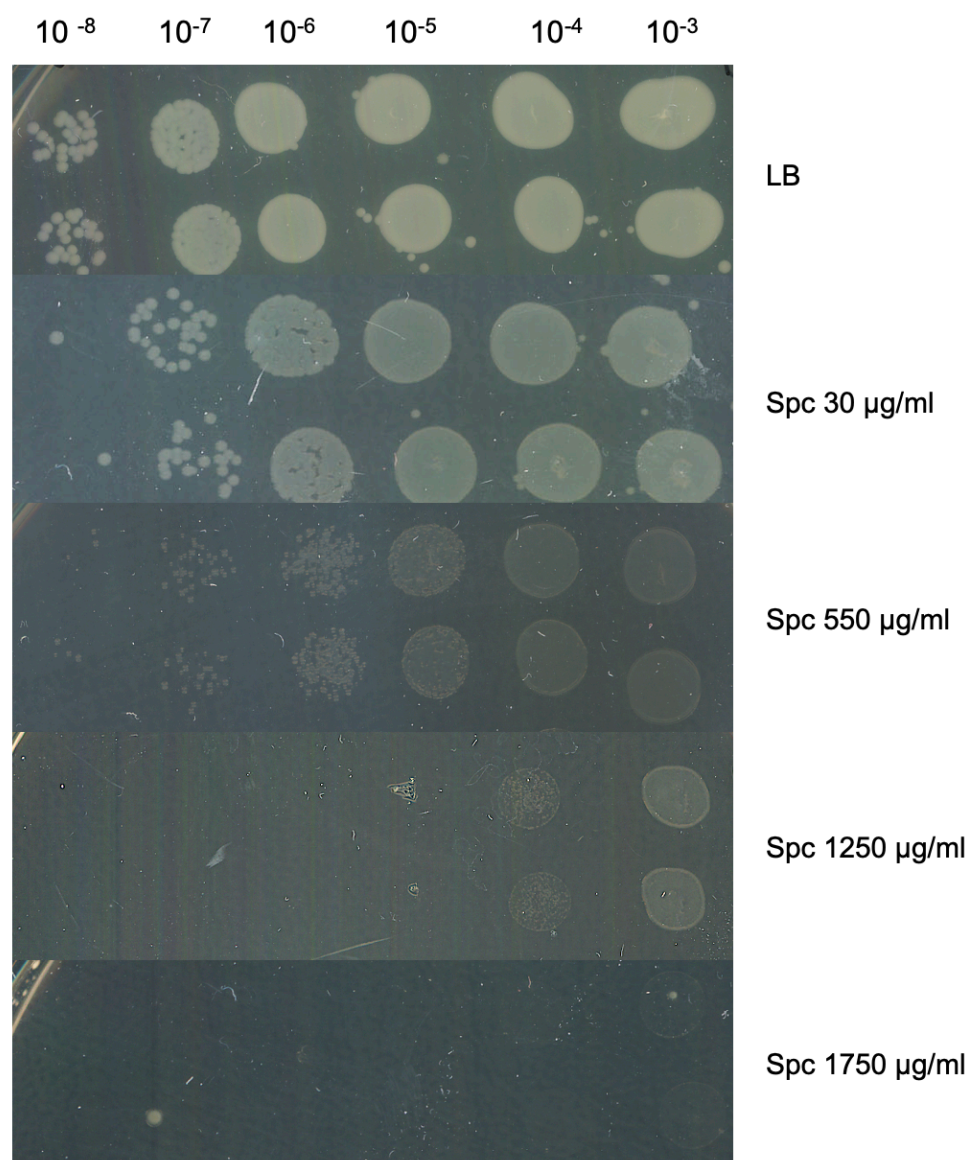
2.3.3 *P. putida* spektinomütsiiniresistentsete kolooniate selekteerimine *rpsE* mutantide isoleerimiseks

Kuna suunatud mutageneesi meetoodikaga ei õnnestunud konstrueerida *P. putida* geenide *rpsD* ja *rpsE* mutatsioonidega tüvesid, kasutati *P. putida* *rpsE* mutanttüvede saamiseks teistsugust lähenemist, mida on varem kirjeldatud *E. coli* *rpsE* geeni spontaansete mutantide isoleerimisel, selekteerides spektinomütsiini suhtes resistentseid mutante spektinomütsiini sisaldavatel selektiivsootmetel (Kamath et al., 2017). Selleks plaaditi üleöö kasvanud *E. coli* metsiktüve kultuurist 100 µl 60 µg/ml spektinomütsiini sisaldavale LB tardsöötmele. Isoleeritud *E. coli* mutantidel leiti mutatsioone selles *rpsE* geeni osas, mis kodeerib S5 valgus 2 domeeni. Selle meetodi rakendamiseks *P. putida* jaoks oli esmalt vaja välja selgitada, millise spektinomütsiini kontsentratsiooni juures *P. putida* metsiktüvi enam ei kasva.

P. putida *rpsE* geeni nukleotiidsete järjestuste põhjal ennustatud aminohappelise järjestuse võrdlusest *E. coli* järjestusega selgus, et spektinomütsiini peaks saama kasutada *rpsE* mutantide selektsiooniks, kuna ka *P. putida* *rpsE* geeni kodeeritud S5 valgus asub bakteris *E. coli* spektinomütsiini tundlikkusega seostatud 2 regioon. Mutatsioonid *rpsE* geeni kodeeritud S5 valgus 2 piirkonnas, täpsemalt aminohappejääkides 20-31, võivad vähendada spektinomütsiini afiinsust oma seondumiskoha suhtes, rikkudes spektinomütsiini võime ribosoomi 30S subühikule kinnituda ning andes bakterile resistentsuse spektinomütsiini vastu (Kamath et al., 2017).

Selleks, et isoleerida spektinomütsiini suhtes resistentseid *P. putida* mutante, oli kõigepealt tarvis välja selgitada, millise spektinomütsiini koguse juures *P. putida* PaW85 metsiktüvi enam

ei kasva, et eristada antibiootikumiga tardsöötmele kasvavaid resistentsust põhjustava mutatsiooniga *rpsE* mutante metsiktüve rakkudest. Selle jaoks tehti tilkkülvid üleöö LB vedelsöötmes kasvanud *P. putida* rakkude lahjendusreast erineva koguse spektinomütsiini (30 kuni 2000 µg/ml) LB tardsöötmele, millest valitud osa on näha joonisel 7. Leiti, et sobiv spektinomütsiini kogus selektsiooniks on 1750 µg/ml. Selle spektinomütsiini koguse juures oli *P. putida* metsiktüve kasv takistatud (joonis 7). Spektinomütsiini tardsöötmetele *P. putida* WT üleöökuultuurist 100 µl plaatides oli 24 tunni järel enamasti näha ainult mõnda kolooniat. Keskmiselt 10% spektinomütsiini tardsöötmetest kasvas 24 tunni järel rohkem kui paar kolooniat. Igalt spektinomütsiinitassilt plaaditi kuni 3 üleöökuultuurist kasvanud kolooniat värsketele 1750 µg/ml spektinomütsiini sisaldavatele LB tardsöötmele ning nendelt tardsöötmetelt isoleeriti töös kasutatud *rpsE* mutandid.



Joonis 7. *Pseudomonas putida* PaW85 metsiktüve spektinomütsiinitaluvus. Pildi kohal on toodud vastavate ridade lahjendusastmed ning iga pildi kõrval vastava spektinomütsiini sisaldava LB tardsöötme spektinomütsiini kontsentratsioon.

Selektsiooni tulemusena isoleeritud mutantidest valiti edasiseks tööks välja 7 spektinomütsiini resistentset *P. putida* tüve, millel olid erinevad mutatsioonid *rpsE* geenis. DNA sekveneerimisel selgus, et selektsiooni käigus saadud *rpsE* mutanttüvede mutatsioonid asuvad kõik S5 valgu spektinomütsiini tundlikkust vahendava ling 2 regiooni kodeerivas *rpsE* geeni osas või selle lähedal. Tartu Ülikooli tuumiklaborilt tellitud ülegenoomse sekveneerimisega tehti kindlaks, et nendel tüvedel on mutatsioonid vaid ribosoomi valku S5 kodeerivas *rpsE* geenis ning mujal genoomis kaasuvaid mutatsioone ei ole. Tüved nimetati *rpsE* geenis toimunud aminohappeasenduste või deletsioonide järgi (Tabel 1). Edasiseks tööks välja valitud tüved olid V22I, K24E, G28D, G29R, T33I, T33P ning $\Delta 34-35$.

Selektsiooni tulemusena sekveneeritud 33 *rpsE* mutandist 21 mutanti olid T33I mutatsiooniga. Sellele efektile ei ole selget põhjust, aga võib oletada, et T33I asendus mängib järelkult töös vaadeldud mutatsioonidest kõige suuremat rolli spektinomütsiini resistentsuse omandamisel. Selektiivse käigus kasvatati *rpsE* mutante 1750 µg/ml spektinomütsiini sisaldaval tardsöötmel. Edasiseks uurimiseks oleks huvitav välja selgitada, kas *P. putida rpsE* T33I mutandil on teiste mutantidega võrreldes tugevam resistentsus spektinomütsiinile ehk kas T33I mutant suudab kasvada ka kõrgemal spektinomütsiini kontsentratsioonil.

2.3.4 Geeni *rpsE* mutatsioonide mõju bakteri *P. putida* translatsioonitäpsusele

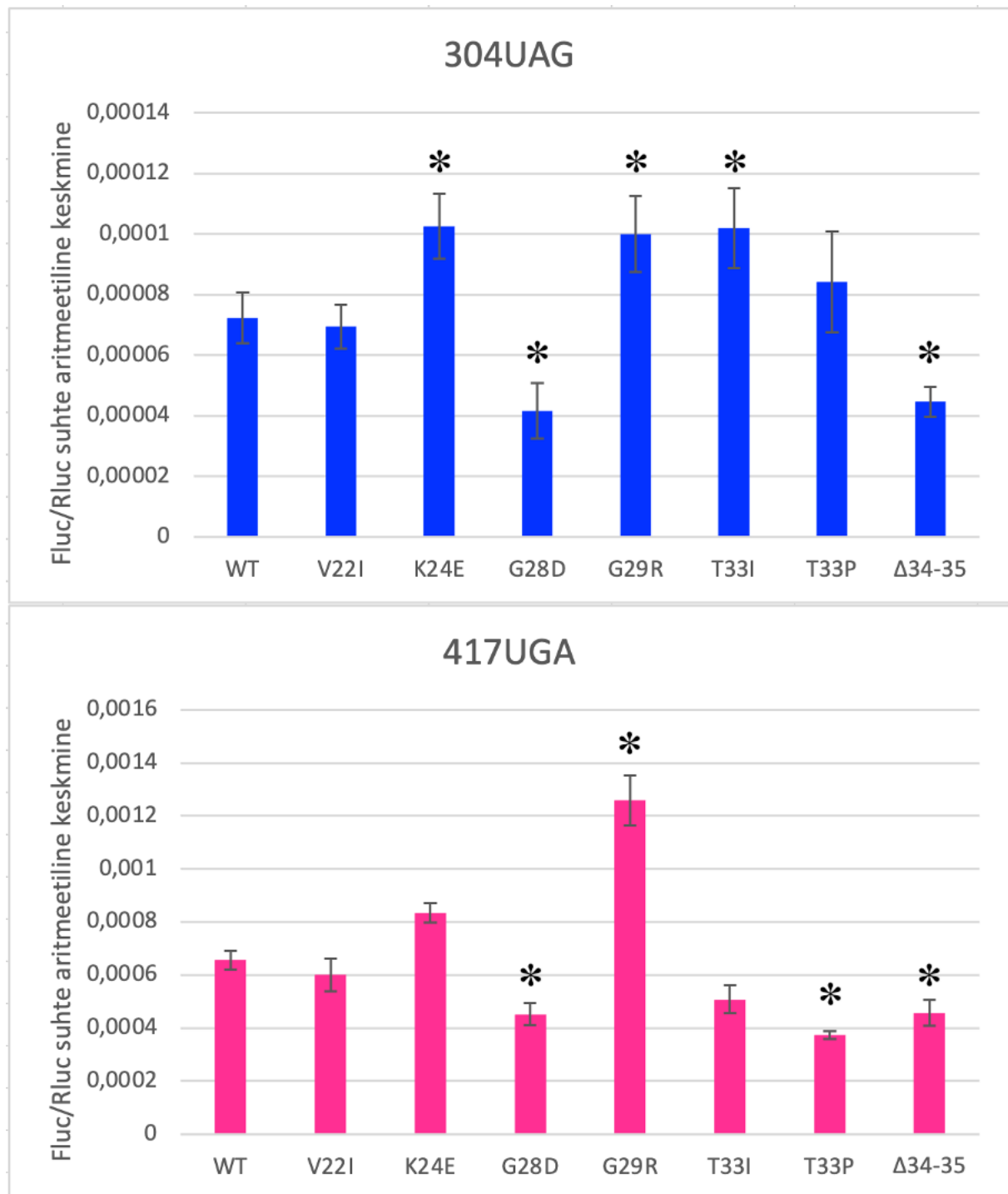
P. putida rpsE mutanttüvede translatsioonitäpsuse võrdlemiseks *P. putida* metsiktüvega kasutati meie laboris väljatöötatud topeltlutsiferaasi testsüsteemi (Jürgenstein et al., 2022). Selles testsüsteemis on Fluc ja Rluc lutsiferaasid liidetud üheks valguks neid ühendava *linker*-regiooni abil. Mõlema valgu aktiivsust on testsüsteemis võimalik eraldi mõõta. Lutsiferaase kodeerivate geenide vahelisse *linker*-regiooni on sisse viidud enneaegne stoppkoodon või on *linker*-regiooni lisatud või sealt eemaldatud nukleotiide, et geeni lugemisraam muutuks. Sel juhul toodetakse funktsionaalset Fluc valku ainult juhul, kui translatsioonil need vead kompenseeritakse ehk toimub raaminihe või stoppkoodoni ülelugemine. Funktsionaalset Rluc valku toodetakse translatsioonivigadest olenemata ning see näitab operoni normaalset translatsiooni taset. Seetõttu saab Fluc ja Rluc valkude aktiivsuse suhte abil määrata uuritava translatsioonivea toimumise suhtelist sagedust. Käesolevas töös uuriti -1 raaminihke toimumist, kasutades plasmide pSEVA AD2, pSEVA AD7 ja pSEVA UUC -1FS, ning +1 raaminihke toimumist, kasutades plasmidi pSEVA UUC +1FS. Uuriti ka UAG ja UGA stoppkoodonite ülelugemist, kasutades vastavalt plasmide pSEVA 304 ja pSEVA 417.



Joonis 8. Raaminihke toimumise suhteline sagedus bakteris *Pseudomonas putida*. Tabelite pealkirjad tähistavad kasutatud plasmidi ja raaminihke iseloomu. X-teljel on WT-ga tähistatud *P. putida* metsiktüve PaW85 tulemused ning vastavate mutatsioonidega *rpsE* mutantide tulemused. Y-teljel on näidatud Fluc ja Rluc valkude aktiivsuste suhte väärtuste aritmeetiline keskmine. Joonisel on toodud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemuste keskvaartused koos 95% usalduspiiridega. Igas katses oli mõõtmisel 4 bioloogilist replikaati. * tähistab p-väärtust <0,05, võrreldes tähistatud tulemust metsiktüve tulemusega.

Joonisel 8 on näha, et metsiktüvega võrreldes toimub AD2 vektori kontekstis -1 raaminihe sagedamini *rpsE* mutantides T33I, T33P, V22I ja Δ34-35, vastavalt 1,27 korda, 1,4 korda, 1,32 korda ja 1,44 korda. Ülejäänud mutantides oli AD2 vektori kontekstis raaminihke toimumine võrreldav metsiktüvega. AD7 vektori kontekstis oli näha sarnast efekti – kõige sagedamini toimus -1 raaminihe samuti *rpsE* mutandis Δ34-35, metsiktüvega võrreldes 1,5 korda rohkem. Efekt oli samuti märgatavam *rpsE* mutantides T33I ja V22I, kus -1 raaminihe toimus metsiktüvega võrreldes vastavalt 1,41 ja 1,31 korda sagedamini. Ka UUC -1 vektorit kasutades oli kõige suurem efekt *rpsE* mutandis Δ34-35, kus toimus -1 raaminihe 1,38 korda sagedamini.

UUC +1 raaminihet tekitavat vektorit kasutades oli kõige märgatavam tulemus *rpsE* mutandis G29R, kus raaminihe toimus metsiktüvega võrreldes 1,19 korda sagedamini. Ülejäänud mutantide puhul oli raaminihke toimumise sagedus võrreldav metsiktüvega või veidi väiksem, näiteks *rpsE* mutandis G28D toimus +1 raaminihe 1,14 korda harvemini. UUC+ vektori kontekstis ei olnud erinevused statistiliselt olulised.

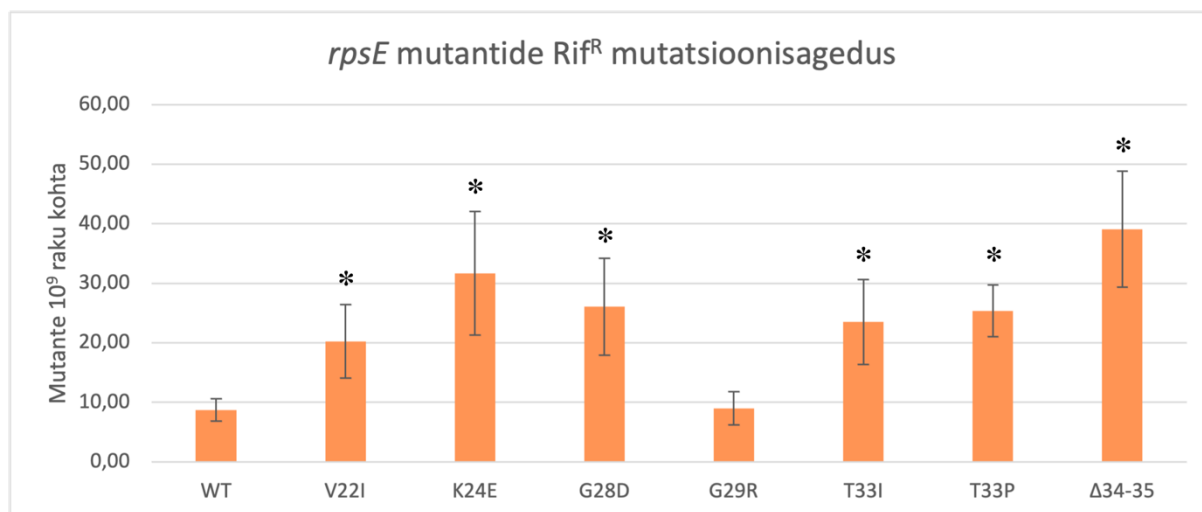


Joonis 9. Stoppkoodonite ülelugemise suhteline sagedus bakteris *Pseudomonas putida*. Tabelite pealkirjad tähistavad kasutatud plasmidi ja testsüsteemis kasutatavat enneaegset stoppkoodonit. X-teljel on WT-ga tähistatud *P. putida* metsiktüve PaW85 tulemused ning vastavate mutatsioonidega *rpsE* mutantide tulemused. Y-teljel on näidatud Fluc ja Rluc valkude aktiivsuste suhte väärtuste aritmeetiline keskmine. Joonisel on toodud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemuste keskvaartused koos 95% usalduspiiridega. Igas katses oli mõõtmisel 4 bioloogilist replikaati. * tähistab p-väärtust <0,05, võrreldes tähistatud tulemust metsiktüve tulemusega.

Jooniselt 9 selgub, et võrreldes metsiktüvega on UAG stoppkoodoni ülelugemine umbes 1,4 korda suurenenud *rpsE* mutantides G29R, K24E ja T33I. UAG stoppkoodoni ülelugemine on aga märkimisväärselt vähenenud *rpsE* mutantides G28D ja $\Delta 34-35$, toimudes vastavalt 1,42 ja 1,38 korda harvemini. UGA stoppkoodoni ülelugemine toimub märgatavalt rohkem *rpsE* mutandis G29R, metsiktüvega võrreldes pea kaks korda sagedamini. Metsiktüvega võrreldes on UGA stoppkoodoni ülelugemine vähenenud eelkõige *rpsE* mutantides G28D, T33P ja $\Delta 34-35$, vastavalt 1,31, 1,43 ja 1,3 korda. Mutatsioonid geeni *rpsE* kodeeritud ribosoomi valgus S5 mõjutavad seega *P. putida* translatsioonitäpsust, välja arvatud +1 raaminihke toimumise kontekstis.

2.3.5 Geeni *rpsE* mutatsioonide mõju bakteri *P. putida* mutatsioonisagedusele

Geeni *rpsE* mutatsioonide mõju *P. putida* mutatsioonisagedusele väljaselgitamiseks kasutati Rif^R/*rpoB* testsüsteemi. Geen *rpoB* kodeerib RNA polümeraasi β subühikut ning see on antibiootikumi rifampitsiini sihtmärkiks. Rifampitsiini seondumine RNA polümeraasi β subühikuga põhjustab RNA sünteesi algusfaasis sünteesitava RNA terminatsiooni, mistõttu ei ole bakter võimeline sünteesima pikemaid kui 2-3 nukleotiidseid RNA-sid. Kui *rpoB* geeni tekib mutatsioon, mis ei pärsi RNA polümeraasi β subühiku funktsiooni, kuid vähendavad rifampitsiini seondumisafiinsust, siis on bakter muutunud rifampitsiini suhtes resistentseks. (Campbell et al., 2001; Jatsenko et al., 2010). Katses lisati LB tardsöötmesse rifampitsiini kontsentratsiooniga 100 $\mu\text{g/ml}$, mis on *P. putida* rakkudele letaalne. Kuna tegemist on bakteriotsiidse antibiootikumiga, peavad rakud olema resistentsuse omandanud enne rifampitsiini sisaldavale tardsöötmele plaatimist. Selle jaoks kasvatatakse rakke enne tardsöötmele plaatimist glc+CAA M9 vedelsöötmes ilma antibiootikumita. Katses võrreldi Rif^R mutantide tekkesagedust *P. putida* metsiktüves ja *rpsE* mutantides.

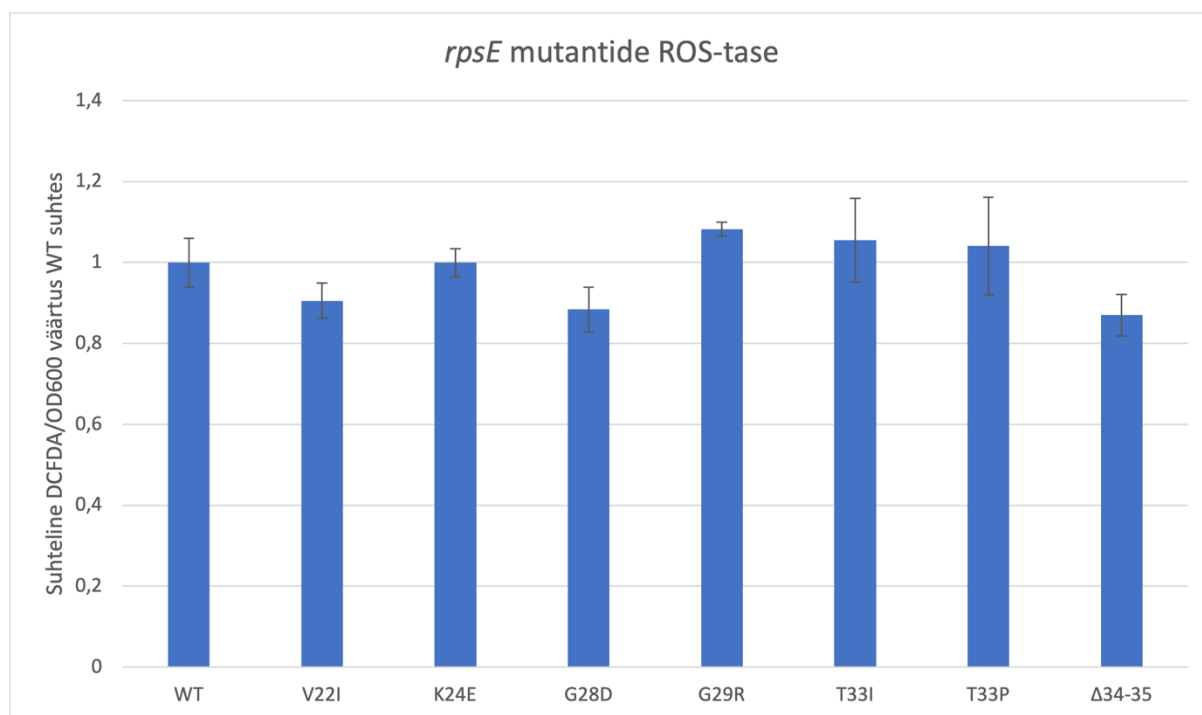


Joonis 10. Rif^R mutantide tekkesagedus bakteris *P. putida*. Y-teljel on näidatud *rpsE* mutandid ning WT-ga on tähistatud *P. putida* metsiktüvi PaW85. X-teljel on Rif^R mutantide arv 10⁹ raku kohta. Esitatud on iga tüve 30 sõltumatu kultuuri Rif^R mutantide arvu keskväärtused 10⁹ raku kohta koos 95% usalduspiiridega kolmest sõltumatust bioloogilisest katsest. * tähistab p-väärtust <0,05, võrreldes tähistatud tulemust metsiktüve tulemusega.

Joonisel 10 näidatud tulemustest selgub, et *rpsE* mutantidest on metsiktüüpi *P. putida* mutatsioonisagedusega võrreldaval tasemel ainukesena *rpsE* mutant G29R. Suurimat efekti on näha *rpsE* mutandi Δ34-35 puhul, mille Rif^R mutantide tekkesagedus on metsiktüvega võrreldes 4,48 korda suurem. Mutantide G28D, T33I ja T33P Rif^R mutatsioonisagedused on kõik umbes 3 korda metsiktüvest suuremad. V22I mutandi mutatsioonisagedus on metsiktüvest 2,31 korda suurem ning K24E mutandi mutatsioonisagedus on metsiktüvega võrreldes 3,62 korda suurem. Pea kõik uuritud *rpsE* mutatsioonid suurendavad seega bakteri *P. putida* mutatsioonisagedust.

2.3.6 Geeni *rpsE* mutatsioonide mõju bakteri *P. putida* endogeensete ROS-ide tasemele

Varasemalt on näidatud, et ROS-ide põhjustatud DNA kahjustused suurendavad bakteri mutatsioonisagedust läbi vigaderohkete DNA polümeraaside indutseerimise (Patel et al., 2010). Seetõttu oli vajalik uurida geeni *rpsE* mutanttüvede endogeensete ROS-ide taset, et välistada võimalus, et Rif^R mutatsioonisageduse tõus on põhjustatud stressitingimustest tingitud ROS-ide tõusust. Selleks mõõdeti nii metsiktüve kui ka *rpsE* mutanttüvede rakkude endogeenset ROS-ide taset. ROS-ide taseme mõõtmise jaoks kasutatavas meetodis kasutatakse värvina estrit CM-H₂DCFDA, mis läbib vabalt rakumembraani. Rakku jõudes eemaldavad rakusisesed esteraasid CM-H₂DCFDA küljest atsetaatrühmi ning tekib ühend DCFDA, mis ROS-idega reageerides fluorestseerub (Kristiansen et al., 2009). Selle fluorestsentsi järgi saab hinnata rakus olevate ROS-ide taset.

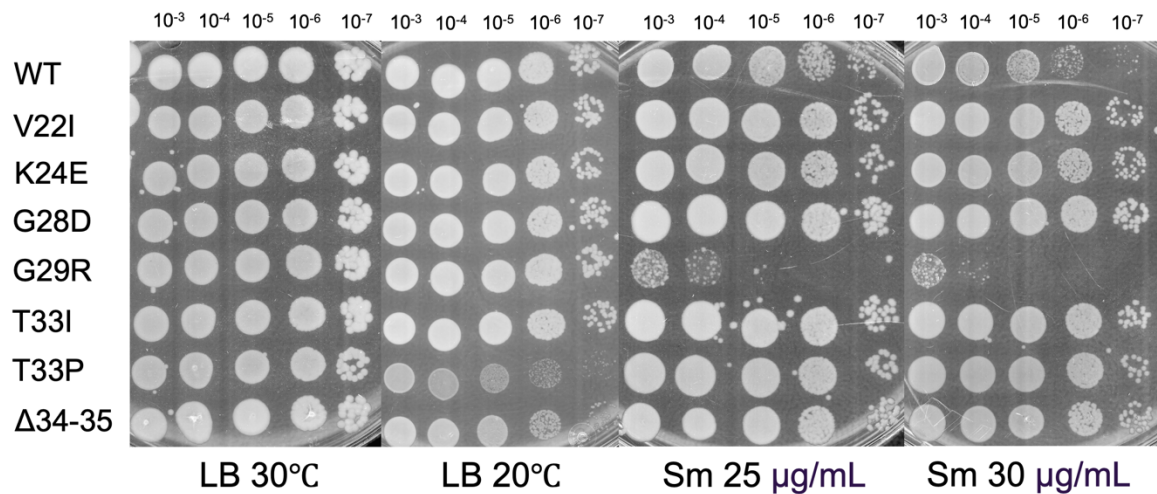


Joonis 11. ROS-tase bakteris *P. putida*. Y-teljel on näidatud *rpsE* mutandid ning WT-ga on tähistatud *P. putida* metsiktüvi PaW85. X-teljel on toodud fluorestseeruva ühendi DCFDA ja bakterikultuuri 600 nm juures mõõdetud optilise tiheduse suhte aritmeetiline keskmine, normaliseeritud WT suhtes. Joonisel on toodud kolme sõltumatu katse tulemuste keskväärtsed koos 95% usalduspiiridega. Igas katses oli mõõtmisel vähemalt 6 bioloogilist replikaati.

Joonisel 11 on näha, et *rpsE* mutatsioonidega *P. putida* mutantidel ei ole ROS-tase oluliselt tõusnud ning erinevused ei olnud ka statistiliselt olulised. Järelikult geeni *rpsE* mutatsioonid ei mõjuta *P. putida* ROS-taset.

2.3.7 Geeni *rpsE* mutatsioonide mõju bakteri *P. putida* stressitaluvusele

Varasemalt on näidatud, et mutatsioonid S5 ribosoomivalkudes võivad muuta bakteri tundlikkust streptomütsiinile ning häirida bakteri kasvu madalamatel temperatuuridel (Itoh & Wittmann, 1973). Kamathi töögrupi uuritud *E. coli rpsE* mutantides nähti samuti, et mutantidel oli suurenenud või vähenenud tundlikkus streptomütsiinile ning mõnel uuritud mutandil esines kasvudefekte temperatuuril 20°C (Kamath et al., 2017). Et teada saada, kas eelnevalt vaadeldud efektid bakteris *E. coli* kehtivad ka bakteris *P. putida*, kontrolliti *P. putida rpsE* mutantide stressitaluvust ning võrreldi seda bakteri *P. putida* metsiktüve stressitaluvusega. Uuriti nii metsiktüve kui mutanttüvede tundlikkust streptomütsiinile ning ka võimet kasvada optimumist madalamal temperatuuril ehk 20°C juures. Tassidele kanti 5 µl üleöö kasvanud kultuurist tehtud kümnekordsetest lahjendustest ning tase inkubeeriti 24 tundi.



Joonis 12. *Pseudomonas putida* metsiktüve ja *rpsE* mutantide stressitaluvuse võrdlus. Joonise vasakul pool on märgitud ära tasside peal olevate tüvede külvid, metsiktüvi on tähistatud WT-ga. Petri tasside piltide kohal on märgitud vastava rea lahjendusaste. Petri tasside piltide all on ära märgitud tassi kasvatustingimused või tassile lisatud antibiootikum ja selle kontsentratsioon.

Joonisel 12 on näha, et temperatuuril 20°C kasvavad aeglasemalt *rpsE* mutandid T33P ja Δ34-35, kusjuures T33P on madalamale temperatuurile tundlikum kui Δ34-35. Ülejäänud mutantide kasv 20°C juures oli võrreldav metsiktüvega. Geeni *rpsE* mutandil G29R on oluliselt suurenenud tundlikkus streptomütsiinile. Streptomütsiini kontsentratsiooniga 30 μg/ml tassil on kõige efektsemalt näha, et kõikidel *rpsE* mutantidel, välja arvatud G29R, on metsiktüvega võrreldes veidi parem streptomütsiini taluvus. Geeni *rpsE* mutatsioonid võivad seega mõjutada bakteri *P. putida* külmatundlikkust ning tundlikkust streptomütsiinile.

2.4 ARUTELU

2.4.1 Spektinomütsiini kontsentratsioon selektsioonil

Käesolevas uurimistöös isoleeriti *P. putida* spektinomütsiini resistentseid mutante eesmärgiga selgitada välja, kas need mutatsioonid tekivad ribosoomi valgu S5 geenis *rpsE* ning kas need mõjutavad translatsioonitäpsust ja mutatsioonisagedust bakteris *P. putida*. Viies läbi spontaansete spektinomütsiinile resistentsete kolooniate selektsiooni bakteriga *E. coli*, on selektsiooniks vajalik spektinomütsiini kogus LB tardsöötmes 60 µg/ml (Kamath et al., 2017), mis on kordades vähem kui *P. putida* puhul selektsiooniks vajalik 1750 µg/ml. *E. coli* on seega palju tundlikum spektinomütsiinile kui *P. putida*. Võimalik seletus sellele efektile on *E. coli* ja *P. putida* erinev väljavoolupumpade arv. Väljavoolupumbad on osa bakteri kaitsesüsteemist antibiootikumide, raskemetallide ja muude toksiliste ainete vastu, transportides kahjulikke aineid raku seest läbi rakumembraani rakust välja. Väljavoolupumbad jagunevad viieks suureks perekonnaks, mis on konserveerunud nii eukarüootides, prokarüootides kui ka arhedes (Daniels & Ramos, 2009). Töös kasutatud *P. putida* PaW85 tüvega isogeenses *P. putida* KT2440 tüves on kirjeldatud 14 RND perekonda kuuluvat väljavoolupumpa (Godoy et al., 2010), samas kui bakteris *E. coli* on kirjeldatud 6 RND perekonda kuuluvat väljavoolupumpa (Anes et al., 2015). Kuigi bakteris *P. putida* pole tervet väljavoolupumpade sortimenti ja nende mõju täpselt uuritud, võib juba RND perekonda kuuluvate väljavoolupumpade arvu järgi järeldada, et *P. putida* on mingil määral *E. coli*-st paremini varustatud antibiootikumide mõju vähendavate pumpadega, mis aitab kaasa bakteri resistentsusele antibiootikumide vastu.

2.4.2 Geeni *rpsE* mutatsioonide mõju translatsioonitäpsusele

Varasemalt on näidatud, et *E. coli rpsE* G28D mutatsiooniga mutanttüves esineb metsiktüvega võrreldes rohkem raaminihkeid, nii -1 kui +1 kontekstis (Kirthi et al., 2006). Samuti on kindlaks tehtud, et paljud *E. coli rpsE* mutatsioonid vähendavad olulisel määral translatsioonitäpsust, kuna mutatsioonidega tüvedes esineb tihti rohkem nii koodonite valesti dekodeerimist kui ka stoppkoodonite ülelugemist (Agarwal et al., 2015). Käesoleva töö raames tehtud translatsioonitäpsuse mõõtmise katsetest selgus, et nii AD2, AD7 kui ka UUC- vektorite kontekstides mõjutavad geeni *rpsE* mutatsioonid bakteri *P. putida* translatsioonitäpsust raaminihke toimumise suhtes ning kõik statistiliselt olulised erinevused näitasid, et mutanttüvedes toimub metsiktüvega võrreldes -1 raaminihet sagedamini (joonis 8). Vähenenud translatsioonitäpsusega mutandid olid V22I, G29R, T33I, T33P ning Δ34-35. Meie tulemused

sobivad seega varasemalt näidatuga – *rpsE* mutatsioonid mõjutavad ka bakteris *P. putida* translatsioonitäpsust.

Stoppkoodonite UAG ja UGA ülelugemise kontekstis olid käesoleva töö tulemused mitmekesisemad ning mutantidel esines nii translatsioonitäpsuse suurenemist kui vähenemist. UAG stoppkoodoni ülelugemise kontekstis vähenes translatsioonitäpsus statistiliselt olulisel määral *rpsE* mutantidel K24E, G29R ja T33I ning translatsioonitäpsus suurenes statistiliselt olulisel määral mutantidel G28D ja Δ34-35 (joonis 9). UGA stoppkoodoni ülelugemise kontekstis aga mutandi K24E translatsioonitäpsus vähenes statistiliselt ebaolulisel määral, mutandi G29R translatsioonitäpsus vähenes taas statistiliselt olulisel määral ning mutantide G28D ja Δ34-35 translatsioonitäpsused suurenesid samuti statistiliselt olulisel määral. UGA stoppkoodoni ülelugemise kontekstis muutis T33P asendus S5 valgus hoopis translatsiooni täpsemaks. Bakteris *E. coli* on *rpsE* mutantide korral nähtud sarnaseid tulemusi – enamik mutatsioone suurendavad bakteri tõenäosust teha translatsioonil vigu, aga mõned, nagu G26D ja G26V, teevad translatsiooni täpsemaks ja vähendavad stoppkoodoni UAG ülelugemist (Kamath et al., 2017).

Aminohappe asendus G28D ribosoomivalgus S5 kallutab bakterit *P. putida* translatsioonitäpsuse suurenemise poole. Tulemuste peatükis esitatud andmetest selgub, et raaminihke uurimisel mõjutab G28D muutus bakterit minimaalselt. Raaminihke esinemine on G28D mutandis kas *P. putida* metsiktüvega võrreldav või kuni 1,15 korda harvem või sagedasem ning need erinevused ei olnud ka statistiliselt olulised (joonis 8). Stoppkoodonite UAG ja UGA ülelugemisel oli aga näha G28D mutandi puhul metsiktüvega võrreldes vastavalt 1,42 ja 1,31 korda vähem stoppkoodoni ülelugemist, ehk bakteri translatsioonitäpsus suurenes (joonis 9). Sarnaseid tulemusi kirjeldati ka Kamath et al. 2017. aasta artiklis, kus *E. coli* S5 valgu mutant G26D, millele bakteri *P. putida* S5 valgu puhul vastab mutant G28D, toimus samuti UAG stoppkoodoni ülelugemine umbes 1,6 korda harvemini kui metsiktüves. UAG stoppkoodoni ülelugemise ja lähikognaatsete tRNA-de äratundmise kontekstis nähti translatsioonitäpsust tõstvat fenotüüpi, kuigi mutatsiooni mõju oli *E. coli* kontekstis tugevam kui käesolevas töös saadud tulemuste põhjal (Kamath et al., 2017). Võimalik, et *P. putida* S5 valgu G28D asendus asub S5 valgus soodsas positsioonis, võimaldades rohkem kontakte teiste ümbritsevate ribosoomivalgudega ning seeläbi soodustab ribosoomi üleminekut suletud olekusse, mis tähendaks rangemat translatsioonitäpsuse kontrolli. S5 G28D mutandil muteerus S5 valgu 28. positsioonis asuv glütsiin asparagiinhappeks. Glütsiin lühima aminohappena mõjutab valgu struktuuri erineval viisil kui negatiivse laenguga kõrvalahelaga asparagiinhape. Asparagiinhappe negatiivne laeng võib võimaldada uute kontaktide teket lähedalolevate

valkudega, mis muudaks ribosoomi konformatsiooni vähem paindlikuks ja võimaldaks ribosoomil kergemini minna üle avatud olekust translatsioonitäpsust soodustavasse suletud olekusse.

Kokkuvõtlikult vähenes $\Delta 34-35$ mutandil translatsioonitäpsus -1 raaminihke kontekstis, kuid suurenes mõlema stoppkoodoni ülelugemise kontekstis. Kahe aminohappe deletsioon mõjutab S5 valgu funktsiooni kindlasti rohkem, kui ülejäänud mutantide puhul toimunud vaid ühe aminohappe asendus, kuna valgus toimunud muutus on drastilisem. Kuna $\Delta 34-35$ mutandi mutatsioon on teistest uuritud mutantidest tõenäoliselt suurema mõjuga, on raskem pakkuda seletust, miks stoppkoodonite ülelugemisel translatsioonitäpsus suurenes, kuna deletsiooni efekt valgule võib olla ulatuslikum ning täpsete põhjuste välja selgitamiseks oleks vaja täiendavat mutandi uurimist. Võimalik seletus seisneb translatsiooni elongatsiooni ja terminatsiooni erinevustes. Elongatsiooni käigus tuuakse ribosoomi A-saiti uusi aminohappeid kandvaid tRNA-sid ning toimub dekodeerimine ning peptiidsideme süntees, mille järel liigub mRNA ribosoomis kolme nukleotiidi võrra edasi ning protsess toimub uuesti (Schmeing & Ramakrishnan, 2009). Kui ribosoom tunneb ära stoppkoodoni ning on tarvis valgusüntees lõpetada, seonduvad ribosoomile terminatsioonifaktorid RF1 või RF2, mis hüdrolüüsivad tRNA ja vastsünteesitud valgu vahelise sideme ning valk vabaneb ribosoomilt (Baggett et al., 2017). On võimalik, et $\Delta 34-35$ mutandi S5 valgu kahe aminohappe deletsioon võimaldab terminatsioonifaktoritel hõlpsamalt ribosoomile seonduda ning see lihtsustab translatsiooni terminatsiooni toimumist ning vähendab mutanttüves stoppkoodoni ülelugemist, kuid raaminihke toimumise kontekstis on deletsiooni tõttu translatsioonitäpsus siiski vähenenud.

Geeni *rpsE* kodeeritud S5 valgu ling 2 domeen ei moodusta kontakte S4 valguga (joonis 3) ja seega ei tohiks *rpsE* mutatsioonid otseselt S4-S5 valkude ühise tasapinna kaudu mõjutada translatsioonitäpsust. Käesoleva töö tulemustest on näha, et translatsioonitäpsus on siiski paljudes *rpsE* mutantides muutunud. S5 valgu ling 2 domeen moodustab aga kontakte 16S rRNA-ga. 16S rRNA seondub tRNA antikoodoniga (I. Schwartz & Ofengand, 1978) ning seondub 3' otsast ka mRNA-ga (Czernilofsky et al., 1975), mõjutades nii translatsiooni. Mutatsioonide tõttu 16S rRNA ja S5 valgu ühenduse häirumine võib ka seeläbi translatsioonitäpsust mõjutada. On samuti võimalik, et ling 2 mutatsioonid mõjutavad S4-S5 valkude tasapinda kaudselt teiste ühenduste kaudu.

2.4.3 Geeni *rpsE* mutatsioonide mõju mutatsioonisagedusele

Mutatsioonid *rpsE* geenis suurendasid pea kõigil juhtudel *P. putida* mutatsioonisagedust statistiliselt olulisel määral, välja arvatud mutandis G29R (joonis 10). Suurimat mutatsioonisageduse tõusu täheldati *P. putida* mutandis $\Delta 34-35$, kus oli tõenäoliselt kõige ulatuslikuma mõjuga mutatsioon. Mutandis $\Delta 34-35$ täheldati iga uuritud testsüsteemi korral ka translatsioonitäpsuse muutumist. Translatsioonitäpsuse muutumine võib põhjustada valesti transleeritud valkude puhul probleeme korrektse voltumise ning eesmärgi täitmisega. Kui vigasteks osutuvad DNA parandamise ja mutatsioonide tekke kontrolli all hoidmiseks vajalikud valgud, on need valgud vähem võimelised oma eesmärki täitma ning tulemusena suureneb bakteri mutatsioonisagedus. Käesoleva töö tulemustest võib järeldada, et S5 valgu 34. ja 35. aminohappe deletsioon mõjutab ribosoomi ning DNA parandamisega seotud valkude translatsiooni sel määral, et vigaste valkude tõttu võiksid tekkinud vead DNA-s jääda parandamata, mistõttu näeme bakterites mutatsioonisageduse suurenemist.

Translatsioonitäpsuse vähenemise tulemusena suureneb tõenäosus, et rakku kuhjuvad valesti sünteesitud valgud, sealhulgas ka valgud, mis tavatingimustes aitaksid vähendada või ennetada ROS-ide kahjulikku mõju DNA-le. ROS-ide taseme tõus võib suurendada mutatsioonisagedust läbi vigaderohkete DNA polümeraaside indutseerimise SOS-vastuse näol (Patel et al., 2010). Samas leidsime, et ROS-tase ei olnud üheski mutandis statistiliselt oluliselt suurenenud (joonis 11), seega pole põhjust arvata, et mutatsioonisageduse suurenemise põhjuseks oleks ulatuslik SOS-vastus. Pigem on mutatsioonisageduse tõus mutantides põhjustatud raku tavaolukorras aktiivsete DNA parandusensüümide funktsionaalsuse muutusest.

Kuigi mutanttüves G29R oli stoppkoodonite UAG ja UGA ülelugemine oluliselt suurenenud, ei mõjutanud see mutatsioonisagedust. Kuigi täpset põhjust oleks hetkel teadaoleva informatsiooni põhjal raske tuua, ei saa siiski välistada võimalust, et translatsioonitäpsuse muutumise mõju mutatsioonisagedusele vahendavad mõned konkreetset seniteadmata valgud, mille vigane translatsioon tooks kaasa mutatsioonisageduse suurenemise, kuid G29R mutandis ilmnunud translatsioonivigu ei teki nende konkreetsete valkude translatsiooni puhul piisavalt, et avaldada mõju mutatsioonisagedusele. Samas teiste käesolevas töös vaadeldud mutantide puhul nähtud translatsioonivead avaldavad potentsiaalselt suuremat mõju mutatsioonisagedusega seotud valkudele, mistõttu näeme ka mutatsioonisageduse suurenemist.

2.4.4 Geeni *rpsE* mutantide külmatundlikkus ja streptomütsiinitundlikkus

Geeni *rpsE* kodeeritud S5 valgu ling 2 regiooni mutante on seostatud külmatundlikkusega ehk nende kasv on tugevalt häiritud väljaspool optimaalset temperatuuri (Kamath et al., 2017). Käesoleva töö tulemustes olid külmatundlikud *P. putida* S5 mutandid T33P ning Δ34-35, mille kasv 20°C juures oli *P. putida* metsiktüvega võrreldes aeglasem (joonis 12). Kuigi bakteris *E. coli* pole samade positsioonide mutante kirjeldatud, ühtivad need tulemused siiski varasemalt nähtuga. *P. putida* külmatundlikel T33P ja Δ34-35 mutantidel oli võrreldes teiste S5 mutantidega suuremal määral vähenenud translatsioonitäpsus -1 raaminihke toimumise kontekstis, seega on võimalik seletus nende mutantide temperatuuritundlikkusele külmašokivalkude valesti voltumine. Külmašokivalkude translatsiooni indutseeritakse, kui rakk tajub temperatuuri jähkemist ning nende peamiseks ülesandeks on temperatuuri langemisest tingitud translatsiooni initsiatsiooni inhibeerimisest ülesaamine, seondudes ribosoomi subühikutega ja aidates ribosoomidel kohaneda ning translatsiooni jätkata (Jones & Inouye, 1996). Käesolevas töös kasvatati temperatuuritundlikkuse kontrollimiseks *P. putida* metsiktüve ja *rpsE* mutante temperatuuril 20°C. Sellel temperatuuril indutseeritakse bakteris *E. coli* külmašokivalke CspA, CspB ja CspG (Wang et al., 1999) ning bakteri *P. putida* genoomis leidub neist vähemalt CspA puhul kaks paraloogset valku (Nelson et al., 2002). Vähenenud translatsioonitäpsusega tüvedel võib esineda translatsiooni käigus lugemisraami muutust ning selle tulemusena esineb rakus rohkem valke, mis on vale pikkusega või mille aminohappeline järjestus on lugemisraami nihkumise kohast muutunud. Sellistel valkudel on suurem tõenäosus valesti voltuda. Valesti voltunud valgud ei saa oma eesmärgi täita ning kui nendeks valesti voltunud valkudeks juhtuvad olema valgud, mis juhivad raku vastust külmašokile, on rakk tundlikum madalamatele temperatuuridele.

Varasemalt on näidatud, et *E. coli* S5 G28D (*P. putida* nummerduse järgi G29D) mutandil leiti nii vähenenud translatsioonitäpsus stoppkoodoni ülelugemise ja raaminihke toimumise kontekstides kui ka külmatundlikkus temperatuuril 20°C. Samal *E. coli* S5 G28D mutandil avastati ka ribosoomi biogeneesi defekte. 70S ribosoomi kokkupanek oli *E. coli* G28D mutandil tugevalt häiritud – rakus tuvastati suures koguses 30S ja 50S subühikuid, kuid temperatuuril 37°C esines vähe 70S ribosoomi ning temperatuuril 20°C tuvastati veel vähem 70S ribosoomi (Kirthi et al., 2006). Kuigi käesolevas töös leitud külmatundlike mutantide T33P ja Δ34-35 *rpsE* geenides asuvad mutatsioonid paiknesid 29. positsiooni aminohapet kodeerivast koodonist veidi kaugemal, näitavad varasemad andmed siiski selget seost külmatundlikkuse ja ribosoomi

biogeneesi häirete vahel ning sama võiks toimuda ka bakteris *P. putida*. T33P ja $\Delta 34-35$ mutantide mutatsioonid võivad samuti häirida ribosoomi biogeneesi ja edasiseks uurimiseks oleks sobilik analüüsida *P. putida rpsE* mutantide ribosoomi ning võrrelda neid metsiktüve ribosoomidega.

Käesolevas töös tehtud katsest selgus samuti, et *rpsE* geeni kodeeritud S5 valgu G29R mutant on metsiktüvega võrreldes palju tundlikum streptomütsiinile (joonis 12). Streptomütsiin seondub ribosoomi subühikute vahelisele alale, suure subühiku L11 ja väikse subühiku S5 valkude lähedusse (Abad & Amils, 1994). S5 valgu muutus G29R mõjutab seega S5 valgu konformatsiooni piisavalt, et muuta lähedalasuva streptomütsiini seondumiskoha afiinsust streptomütsiini suhtes suuremaks, näiteks seondumiskohta streptomütsiinile ligipääsetavamaks muutes. G29R mutatsiooni tulemusena muutus S5 valgu 29. positsioonis asuv glütsiin arginiiniks, millel on pikem kõrvalahel ning kõrvalahelal ka positiivne laeng, mis tekitab valgus nii steerilist konflikti kui ka sidemete muutumist arginiini positiivse laengu tõttu. Sarnaseid tulemusi on näidatud ka bakteris *E. coli*, kus S5 F30V ja S5 N121H mutant olid metsiktüvega võrreldes vähem tundlikud streptomütsiinile, aga S5 mutandid L75R ja N134Y muutusid *rpsE* geeni mutatsiooni tõttu streptomütsiinile tundlikumaks (Agarwal et al., 2015).

KOKKUVÕTE

Translatsioonitäpsuse muutumisel võib olla bakteritele nii kasulikke kui ka kahjulikke mõjusid. Translatsioonivigade suurenemisel võivad mõned muutunud omadustega valgud võimaldada antud keskkonnatingimustega paremini kohaneda. Samas võib translatsioonitäpsuse vähenemine ka pärssida valkude korrektset sünteesi, häirides nende valkude funktsiooni ning mõjudes bakteri elutegevust tagavatele protsessidele negatiivselt. Ribosoomis on mitmeid eri mehhanisme translatsioonitäpsuse kontrollimiseks, nagu koodon-antikoodon paardumine ning ribosoomi enda konformatsiooni muutumine valgusünteesi hõlbustamiseks. Ribosoomi valgud mängivad selles protsessis olulist rolli ning tõhusaks valgusünteesiks on vajalik ribosoomi valkude korrektne kontakt nii üksteisega kui RNA-ga.

Varasemalt on meie laboris näidatud, et tRNA modifikatsiooniensüümide TruA ja RluA sünteesitud pseudouridiinide puudumine suurendab bakteri *P. putida* mutatsioonisagedust ning TruA puudumine vähendab ka bakteri translatsioonitäpsust. Samuti on varasemalt kirjanduses näidatud, et mutatsioonid ribosoomi valke S4 ja S5 kodeerivates geenides *rpsD* ja *rpsE* mõjutavad translatsioonitäpsust bakteris *E. coli*. Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida *P. putida* tüved mutatsioonidega *rpsD* ja *rpsE* geenides ning uurida mutatsioonide mõju bakteri translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele. Kuna alguses planeeritud mutatsioonidega tüvede konstrueerimine ei õnnestunud, siis keskenduti spektinomütsiini suhtes resistentsete *rpsE* geeni mutantide isoleerimisele ja iseloomustamisele. Tulemustest selgus, et:

1. Enamus käesolevas tööd uuritud geeni *rpsE* mutatsioonid mõjutavad bakteri *P. putida* translatsioonitäpsust, sõltuvalt kontekstist kas translatsioonitäpsust langetades või suurendades. S5 mutantides esines valdavalt translatsioonitäpsuse vähenemist ning translatsioonitäpsuse tõusu täheldati ainult stoppkoodoni ülelugemise kontekstis. Need tulemused ühtivad varasemalt bakteris *E. coli* nähtuga.
2. Leiti, et enamus geeni *rpsE* mutatsioonidest tingitud translatsioonitäpsuse muutustest suurendavad ka bakteri *P. putida* mutatsioonisagedust.
3. Osadel S5 mutantidest ilmnas sarnaselt *E. coli* S5 mutantidele ka külmatundlikkus (mutandid T33P ning Δ34-35), mis võiks olla selgitatav ribosoomi biogeneesi häiretega ning suurenenud streptomütsiini tundlikkus mutandil G29R tänu muutustele valgu struktuuris, mis võiks suurendada streptomütsiini ligipääsu ribosoomi subühikute vahelisele alale.

Effect of translational fidelity on mutagenesis in ribosomal protein S5 mutants of bacterium *Pseudomonas putida*

Carol Luhaäär

Summary

Translation is one of the main processes helping cells grow, develop and reproduce. Translational fidelity needs to be balanced for the synthesis of correctly translated and correctly folded proteins. Bacteria have many checkpoints to ensure accurate translation, such as codon-anticodon interactions and editing domains in aminoacyl-tRNA-synthetases. Decreased translational fidelity can lead to misfolded or mistranslated proteins, which often cannot fulfill their roles as accurately as correctly translated proteins and thus can create problems in the functioning of the cell. Mutation frequency is also affected by translational fidelity. If proteins that help cells keep mutation frequency balanced, like DNA repair systems, are mistranslated, mutations in DNA can accumulate as a result of deficient repair systems.

Ribosomal proteins S4 and S5 play important roles in translation and ribosomal assembly, making contacts with other ribosomal proteins and with RNA. Mutations in ribosomal proteins S4 and S5 can disrupt those contacts and affect translation. It has previously been shown that mutations in ribosomal proteins S4 and S5 affect translational fidelity in *E. coli*. In our research group, previous work has also shown that lack of tRNA modification enzymes TruA and RluA increases mutational frequency in *P. putida* and lack of TruA decreases translational fidelity. The aim of this thesis was to construct *P. putida* strains with mutations in the genes *rpsD* and *rpsE* and study the effects of these mutations on translational fidelity and mutational frequency in *P. putida*. Since the construction of *rpsD* mutants was unsuccessful, this thesis instead focused on obtaining *P. putida rpsE* mutants using selection with spectinomycin and characterizing spectinomycin-resistant mutants.

The results of this thesis can be summarized as follows:

1. Mutations in ribosomal protein S5 affect translational fidelity in *P. putida*, with some mutations decreasing translational fidelity and some making translation more accurate, depending on context.
2. All but one of the mutations in ribosomal protein S5 studied in this thesis increase mutational frequency in *P. putida*.
3. Some *rpsE* mutants exhibit a cold sensitivity phenotype and an increased sensitivity to streptomycin, both of which have previously been described in *E. coli*.

Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajaid Heilit ja Karli nõuannete, alati aitamise ja murede kuulamise eest. Tänan ka kõiki teisi laborikaaslasid mõnusa õhkkonna loomise eest. Suur tänu ka Maia Kivisaarele töö ülevaatamise ja väärtuslike paranduste eest.

Kirjanduse loetelu

- Abad, J. P., & Amils, R. (1994). Location of the Streptomycin Ribosomal Binding Site Explains its Pleiotropic Effects on Protein Biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 235(4), 1251–1260. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1078>
- Ades, S. E. (2004). Control of the alternative sigma factor σ^E in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(2), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.02.010>
- Agarwal, D., Kamath, D., Gregory, S. T., & O'Connor, M. (2015). Modulation of Decoding Fidelity by Ribosomal Proteins S4 and S5. *Journal of Bacteriology*, 197(6), 1017–1025. <https://doi.org/10.1128/jb.02485-14>
- Al Mamun, A. A. M., Gautam, S., & Humayun, M. Z. (2006). Hypermutagenesis in *mutA* cells is mediated by mistranslational corruption of polymerase, and is accompanied by replication fork collapse. *Molecular Microbiology*, 62(6), 1752–1763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05490.x>
- Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00587>
- Aoyama, R., Masuda, K., Shimojo, M., Kanamori, T., Ueda, T., & Shimizu, Y. (2022). In vitro reconstitution of the *Escherichia coli* 70S ribosome with a full set of recombinant ribosomal proteins. *The Journal of Biochemistry*, 171(2), 227–237. <https://doi.org/10.1093/jb/mvab121>
- Aseev, L. V., Koledinskaya, L. S., & Boni, I. V. (2024). Extraribosomal Functions of Bacterial Ribosomal Proteins—An Update, 2023. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms25052957>
- Baggett, N. E., Zhang, Y., & Gross, C. A. (2017). Global analysis of translation termination in *E. coli*. *PLOS Genetics*, 13(3), e1006676. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006676>
- Balashov, S., & Humayun, M. Z. (2002). Mistranslation induced by streptomycin provokes a RecABC/RuvABC-dependent mutator phenotype in *Escherichia coli* cells¹. *Journal of Molecular Biology*, 315(4), 513–527. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5273>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 65, 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the *tol* function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular and General Genetics MGG*, 154(2), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF00330838>

- Blinkowa, A. L., & Walker, J. R. (1990). Programmed ribosomal frameshifting generates the *Escherichia coli* DNA polymerase III γ subunit from within the τ subunit reading frame. *Nucleic Acids Research*, 18(7), 1725–1729. <https://doi.org/10.1093/nar/18.7.1725>
- Boe, L., Danielsen, M., Knudsen, S., Petersen, J. B., Maymann, J., & Jensen, P. R. (2000). The frequency of mutators in populations of *Escherichia coli*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 448(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00239-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00239-0)
- Bollen, A., Davies, J., Ozaki, M., & Mizushima, S. (1969). Ribosomal Protein Conferring Sensitivity to the Antibiotic Spectinomycin in *Escherichia coli*. *Science*, 165(3888), 85–86. <https://doi.org/10.1126/science.165.3888.85>
- Butala, M., Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlesek, Z., Klare, J. P., Anderluh, G., Busby, S. J. W., Steinhoff, H.-J., & Žgur-Bertok, D. (2011). Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Research*, 39(15), 6546–6557. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr265>
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, 104(6), 901–912. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0)
- Conter, A., Gangneux, C., Suzanne, M., & Gutierrez, C. (2001). Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: Effects of aeration, NaCl, and the *rpoS* and *osmC* gene products. *Research in Microbiology*, 152(1), 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01164-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01164-5)
- Culver, G. M. (2003). Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Biopolymers*, 68(2), 234–249. <https://doi.org/10.1002/bip.10221>
- Czernilofsky, A. p., Kurland, C. g., & Stöffler, G. (1975). 30S Ribosomal proteins associated with the 3'-terminus of 16S RNA. *FEBS Letters*, 58(1–2), 281–284. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80279-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80279-1)
- Daniels, C., & Ramos, J. L. (2009). Adaptive drug resistance mediated by root–nodulation–cell division efflux pumps. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 32–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02693.x>
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 344–351. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7160–7164.

- Drummond, D. A., Bloom, J. D., Adami, C., Wilke, C. O., & Arnold, F. H. (2005). Why highly expressed proteins evolve slowly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(40), 14338–14343. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504070102>
- Evans, C. R., Fan, Y., Weiss, K., & Ling, J. (2018). Errors during Gene Expression: Single-Cell Heterogeneity, Stress Resistance, and Microbe-Host Interactions. *mBio*, 9(4), e01018-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01018-18>
- Eyre-Walker, A., & Keightley, P. D. (2007). The distribution of fitness effects of new mutations. *Nature Reviews Genetics*, 8(8), 610–618. <https://doi.org/10.1038/nrg2146>
- Fan, Y., Wu, J., Ung, M. H., De Lay, N., Cheng, C., & Ling, J. (2015). Protein mistranslation protects bacteria against oxidative stress. *Nucleic Acids Research*, 43(3), 1740–1748. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1404>
- Foster, P. L. (2007). Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 373–397. <https://doi.org/10.1080/10409230701648494>
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., Van Roey, P., Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S., & Frank, J. (2003a). Study of the Structural Dynamics of the *E. coli* 70S Ribosome Using Real-Space Refinement. *Cell*, 113(6), 789–801. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00427-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00427-6)
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., Van Roey, P., Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S., & Frank, J. (2003b). Study of the Structural Dynamics of the *E. coli* 70S Ribosome Using Real-Space Refinement. *Cell*, 113(6), 789–801. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00427-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00427-6)
- Giri, L., Hill, W. E., Wittmann, H. G., & Wittmann-Liebold, B. (1984). Ribosomal Proteins: Their Structure and Spatial Arrangement in Prokaryotic Ribosomes: With an APPENDIX: Primary Structure of Escherichia coli Ribosomal Proteins†. In C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, & F. M. Richards (Eds.), *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 36, pp. 1–78). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60295-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60295-8)
- Godoy, P., Molina-Henares, A. J., De La Torre, J., Duque, E., & Ramos, J. L. (2010). Characterization of the RND family of multidrug efflux pumps: In silico to in vivo confirmation of four functionally distinct subgroups. *Microbial Biotechnology*, 3(6), 691–700. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00189.x>
- Gordo, I., Perfeito, L., & Sousa, A. (2012). Fitness Effects of Mutations in Bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(1–2), 20–35. <https://doi.org/10.1159/000332747>
- Gordon, A. J., Satory, D., Halliday, J. A., & Herman, C. (2015). Lost in transcription: Transient errors in information transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.010>

- Guo, M., & Schimmel, P. (2012). Structural analyses clarify the complex control of mistranslation by tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.11.008>
- Hawker, J. R., & McHenry, C. S. (1987). Monoclonal antibodies specific for the tau subunit of the DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. Use to demonstrate that tau is the product of the dnaZX gene and that both it and gamma, the dnaZ gene product, are integral components of the same enzyme assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 262(26), 12722–12727. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45265-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45265-9)
- Held, W. A., Ballou, B., Mizushima, S., & Nomura, M. (1974). Assembly Mapping of 30 S Ribosomal Proteins from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 249(10), 3103–3111. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42644-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42644-6)
- Herzog, A., & Bollen, A. (1971). Characterization of an amino-acid substitution leading to spectinomycin resistance in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 17(1), 21–22. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80553-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80553-7)
- Hoang, L., Fredrick, K., & Noller, H. F. (2004). Creating ribosomes with an all-RNA 30S subunit P site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12439–12443. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405227101>
- Hoffer, E. D., Maehigashi, T., Fredrick, K., & Dunham, C. M. (2019). Ribosomal ambiguity (ram) mutations promote the open (off) to closed (on) transition and thereby increase miscoding. *Nucleic Acids Research*, 47(3), 1557–1563. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1178>
- Imhof, M., & Schlötterer, C. (2001). Fitness effects of advantageous mutations in evolving *Escherichia coli* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 1113–1117. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1113>
- Itoh, T., & Wittmann, H. G. (1973). Amino acid replacements in proteins S5 and S12 of two *Escherichia coli* revertants from streptomycin dependence to independence. *Molecular and General Genetics MGG*, 127(1), 19–32. <https://doi.org/10.1007/BF00267779>
- Janosi, L., Shimizu, I., & Kaji, A. (1994). Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4249–4253. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4249>
- Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R., & Kivisaar, M. (2010a). Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 683(1), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.015>
- Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R., & Kivisaar, M. (2010b). Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutation*

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 683(1), 106–114.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.015>

Javid, B., Sorrentino, F., Toosky, M., Zheng, W., Pinkham, J. T., Jain, N., Pan, M., Deighan, P., & Rubin, E. J. (2014). Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 1132–1137.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1317580111>

Jinks-Robertson, S., & Nomura, M. (1982). Ribosomal protein S4 acts in trans as a translational repressor to regulate expression of the alpha operon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 151(1), 193–202. <https://doi.org/10.1128/jb.151.1.193-202.1982>

Jones, P. G., & Inouye, M. (1996). RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Molecular Microbiology*, 21(6), 1207–1218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02582.x>

Jürgenstein, K., Tagel, Mari, Ilves, Heili, Leppik, Margus, Kivisaar, Maia, & and Remme, J. (2022). Variance in translational fidelity of different bacterial species is affected by pseudouridines in the tRNA anticodon stem-loop. *RNA Biology*, 19(1), 1050–1058.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2121447>

Kamath, D., Gregory, S. T., & O'Connor, M. (2017a). The Loop 2 Region of Ribosomal Protein uS5 Influences Spectinomycin Sensitivity, Translational Fidelity, and Ribosome Biogenesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), 10.1128/aac.01186-16.
<https://doi.org/10.1128/aac.01186-16>

Kamath, D., Gregory, S. T., & O'Connor, M. (2017b). The Loop 2 Region of Ribosomal Protein uS5 Influences Spectinomycin Sensitivity, Translational Fidelity, and Ribosome Biogenesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), 10.1128/aac.01186-16.
<https://doi.org/10.1128/aac.01186-16>

Kimura, S., & Suzuki, T. (2010). Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Research*, 38(4), 1341–1352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1073>

Kirithi, N., Roy-Chaudhuri, B., Kelley, T., & Culver, G. M. (2006). A novel single amino acid change in small subunit ribosomal protein S5 has profound effects on translational fidelity. *RNA*, 12(12), 2080–2091. <https://doi.org/10.1261/rna.302006>

Kovacs, D., Rakacs, M., Agoston, B., Lenkey, K., Semrad, K., Schroeder, R., & Tompa, P. (2009). Janus chaperones: Assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS Letters*, 583(1), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.049>

Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234(2), 187–208. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00210-3)

- Kramer, E. B., & Farabaugh, P. J. (2007). The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA*, 13(1), 87–96.
<https://doi.org/10.1261/rna.294907>
- Kristiansen, K. A., Jensen, P. E., Møller, I. M., & Schulz, A. (2009). Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H2DCFDA and confocal laser microscopy. *Physiologia Plantarum*, 136(4), 369–383.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01243.x>
- Layton, J. C., & Foster, P. L. (2003). Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 50(2), 549–561. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03704.x>
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J., Moras, D., & Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: An example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Research*, 30(24), 5382–5390.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkf693>
- Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), 15036–15040. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15036>
- Ling, J., So, B. R., Yadavalli, S. S., Roy, H., Shoji, S., Fredrick, K., Musier-Forsyth, K., & Ibba, M. (2009). Resampling and Editing of Mischarged tRNA Prior to Translation Elongation. *Molecular Cell*, 33(5), 654–660.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.031>
- Little, J. W., & Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90085-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90085-X)
- Livingston, D. M., & Richardson, C. C. (1975). Deoxyribonucleic acid polymerase III of *Escherichia coli*. Characterization of associated exonuclease activities. *Journal of Biological Chemistry*, 250(2), 470–478. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41921-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41921-2)
- Loewen, P. C., Switala, J., & Triggs-Raine, B. L. (1985). Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 243(1), 144–149. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90782-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90782-9)
- Markiewicz, P., Kleina, L. G., Cruz, C., Ehret, S., & Miller, J. H. (1994). Genetic Studies of the *lac* Repressor. XIV. Analysis of 4000 Altered *Escherichia coli lac* Repressors Reveals Essential and Non-essential Residues, as well as “Spacers” which do not Require a Specific Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 240(5), 421–433.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1458>
- Mascarenhas, A. P., An, S., Rosen, A. E., Martinis, S. A., & Musier-Forsyth, K. (2009). Fidelity Mechanisms of the Aminoacyl-tRNA Synthetases. In C. Köhrer & U. L. RajBhandary (Eds.), *Protein Engineering* (pp. 155–203). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-70941-1_6

- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. a. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Nomura, M., Mizushima, S., Ozaki, M., Traub, P., & Lowry, C. V. (1969). Structure and Function of Ribosomes and Their Molecular Components. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 34, 49–61. <https://doi.org/10.1101/SQB.1969.034.01.009>
- Nowotny, V., & Nierhaus, K. H. (1988). Assembly of the 30S subunit from *Escherichia coli* ribosomes occurs via two assembly domains which are initiated by S4 and S7. *Biochemistry*, 27(18), 7051–7055. <https://doi.org/10.1021/bi00418a057>
- Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., & Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the Ribosome Requires a Transition from an Open to a Closed Form. *Cell*, 111(5), 721–732. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01086-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01086-3)
- Ogle, J. M., & Ramakrishnan, V. (2005). Structural insights into translational fidelity. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 129–177. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.061903.155440>
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., & Pearl, L. H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO Journal*, 17(16), 4829–4836. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4829>
- Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M. M., & Goodman, M. F. (2010). A New Model for SOS-induced Mutagenesis: How RecA Protein Activates DNA Polymerase V. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(3), 171–184. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.480968>
- Peske, F., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2004). Conformational Changes of the Small Ribosomal Subunit During Elongation Factor G-dependent tRNA–mRNA Translocation. *Journal of Molecular Biology*, 343(5), 1183–1194. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.097>
- Piepersberg, W., Böck, A., & Wittmann, H. G. (1975). Effect of different mutations in ribosomal protein S5 of *Escherichia coli* on translational fidelity. *Molecular and General Genetics MGG*, 140(2), 91–100. <https://doi.org/10.1007/BF00329777>
- Povolotskaya, I. S., Kondrashov, F. A., Ledda, A., & Vlasov, P. K. (2012). Stop codons in bacteria are not selectively equivalent. *Biology Direct*, 7(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-30>

- Ramakrishnan, V., Graziano, V., & Capel, M. S. (1986). A role for proteins S3 and S14 in the 30 S ribosomal subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 15049–15052. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66827-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66827-9)
- Ramaswamy, P., & Woodson, S. A. (2009). Global Stabilization of rRNA Structure by Ribosomal Proteins S4, S17, and S20. *Journal of Molecular Biology*, 392(3), 666–677. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.032>
- Reynolds, N. M., Lazazzera, B. A., & Ibba, M. (2010). Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), 849–856. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2472>
- Schmeing, T. M., & Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, 461(7268), 1234–1242. <https://doi.org/10.1038/nature08403>
- Schwartz, I., & Ofengand, J. (1978). Photochemical crosslinking unmodified acetylvalyl-tRNA to 16S RNA at the ribosomal P site. *Biochemistry*, 17(13), 2524–2530. <https://doi.org/10.1021/bi00606a011>
- Schwartz, M. H., Waldbauer, J. R., Zhang, L., & Pan, T. (2016). Global tRNA misacylation induced by anaerobiosis and antibiotic exposure broadly increases stress resistance in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 44(21), 10292–10303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw856>
- Sekine, Y., & Ohtsubo, E. (1992). DNA sequences required for translational frameshifting in production of the transposase encoded by IS 1. *Molecular and General Genetics MGG*, 235(2), 325–332. <https://doi.org/10.1007/BF00279377>
- Sørensen, M. A., Fricke, J., & Pedersen, S. (1998). Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli in vivo*. *Journal of Molecular Biology*, 280(4), 561–569. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1909>
- Su, H.-W., Zhu, J.-H., Li, H., Cai, R.-J., Ealand, C., Wang, X., Chen, Y.-X., Kayani, M. ur R., Zhu, T. F., Moradigaravand, D., Huang, H., Kana, B. D., & Javid, B. (2016). The essential mycobacterial amidotransferase GatCAB is a modulator of specific translational fidelity. *Nature Microbiology*, 1(11), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.147>
- Sukhodolets, M. V., Garges, S., & Adhya, S. (2006). Ribosomal protein S1 promotes transcriptional cycling. *RNA*, 12(8), 1505–1513. <https://doi.org/10.1261/rna.2321606>
- Svenningsen, N. B., Pérez-Pantoja, D., Nikel, P. I., Nicolaisen, M. H., de Lorenzo, V., & Nybroe, O. (2015). *Pseudomonas putida* mt-2 tolerates reactive oxygen species generated during matrix stress by inducing a major oxidative defense response. *BMC Microbiology*, 15(1), 202. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0542-1>
- Tagel, M., Ilves, H., Leppik, M., Jürgenstein, K., Remme, J., & Kivisaar, M. (2021). Pseudouridines of tRNA Anticodon Stem-Loop Have Unexpected Role in Mutagenesis in

Pseudomonas sp. *Microorganisms*, 9(1), Article 1.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010025>

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*. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2735–2744. <https://doi.org/10.1128/jb.186.9.2735-2744.2004>

Torres, M., Condon, C., Balada, J., Squires, C., & Squires, C. L. (2001). Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *The EMBO Journal*, 20(14), 3811–3820. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3811>

Urbonavičius, J., Qian, Q., Durand, J. M. B., Hagervall, T. G., & Björk, G. R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4863>

VanBogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(15), 5589–5593. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5589>

Vladimirov, S. n., Graifer, D. m., Karpova, G. g., Semenov, Yu. P., Makhno, V. i., & Kirillov, S. v. (1985). The effect of GTP hydrolysis and transpeptidation on the arrangement of aminoacyl-tRNA at the A-site of *Escherichia coli* 70 S ribosomes. *FEBS Letters*, 181(2), 367–372. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80294-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80294-5)

Volke, D. C., Friis, L., Wirth, N. T., Turlin, J., & Nikel, P. I. (2020). Synthetic control of plasmid replication enables target- and self-curing of vectors and expedites genome engineering of *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering Communications*, 10, e00126. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00126>

Wang, N., Yamanaka, K., & Inouye, M. (1999). CspI, the Ninth Member of the CspA Family of *Escherichia coli*, Is Induced upon Cold Shock. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1603–1609. <https://doi.org/10.1128/jb.181.5.1603-1609.1999>

Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1591–1603. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005>

Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327–339. <https://doi.org/10.1038/35030006>

Wirth, N. T., Kozaeva, E., & Nikel, P. I. (2020). Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI—mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 233–249. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13396>

- Wittmann, H. G. (1982). Components of Bacterial Ribosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 51(Volume 51, 1982), 155–183.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.001103>
- Wyrzykowski, J., & Volkert, M. R. (2003). The Escherichia coli Methyl-Directed Mismatch Repair System Repairs Base Pairs Containing Oxidative Lesions. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1701–1704. <https://doi.org/10.1128/jb.185.5.1701-1704.2003>
- Young, R., & Bremer, H. (1976). Polypeptide-chain-elongation rate in Escherichia coli B/r as a function of growth rate. *Biochemical Journal*, 160(2), 185–194.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Zh., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., & Noller, H. F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292(5518), 883–896. <https://doi.org/10.1126/science.1060089>
- Zaher, H. S., & Green, R. (2009). Quality control by the ribosome following peptide bond formation. *Nature*, 457(7226), 161–166. <https://doi.org/10.1038/nature07582>
- Zaw, M. T., Emran, N. A., & Lin, Z. (2018). Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health*, 11(5), 605–610.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.005>

Kasutatud veebiaadressid

<https://pseudomonas.com>

<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>

<https://ecocyc.org>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Carol Luhaäär,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Translatsiooni täpsuse mõju mutatsioonide tekkele bakteri *Pseudomonas putida* ribosoomivalgu S5 mutantides“, mille juhendajad on Heili Ilves, PhD, ja Karl Jürgenstein, MSc, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Carol Luhaäär

29.05.2025