

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

***Pseudomonas fluorescens* PC20 *ruLAB* operonide roll UV taluvusel ja UV kiirgusest
tingitud mutageneesil**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Marielle Suur

Juhendaja
PhD Signe Saumaa

TARTU 2025

INFOLEHT

***Pseudomonas fluorescens* PC20 *rulAB* operonide roll UV taluvusel ja UV kiirgusest tingitud mutageneesisil**

rulAB geenid kodeerivad *Escherichia coli* vigaderohke DNA polümeraas V ortoloogi, mille osalust on näidatud UV kiirguse tekitatud DNA kahjustuste ülesünteesis. Varasema uuringu käigus isoleeriti fenoolsete ühenditega reostunud Kirde-Eesti veekogust keskkonnabakter *Pseudomonas fluorescens* tüvi PC20, mille DNA sekveneerimisandmetest leiti, et tal leidub lausa kolm koopiat *rulAB* gene. Käesolevas töös uuriti kas üks või mitu *P. fluorescens* PC20 tüve *rulAB* operoni võiksid omada teadaolevat vigaderohke DNA Pol V omadusi. PC20 *rulAB* geenide funktsionaalsuse testimiseks viidi läbi UV taluvuse ja UV mutageneesi eksperimendid, viies *rulAB* geenid plasmidi koosseisus kontrolltüvesse *Pseudomonas putida* PaW85. Paralleelselt tehti samu katseid *P. fluorescens* PC20 tüvest konstrueeritud deletsioontüvedega, mille genoomist on *rulAB* geenid ühekaupa või mitmekesi koos eemaldatud.

Märksõnad: *rulAB*, DNA Pol V, UV kiirgus, mutatsioonisagedus, *Pseudomonas fluorescens*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The role of *Pseudomonas fluorescens* PC20 *rulAB* operons in the tolerance of UV and in UV-induced mutagenesis

rulAB genes code an *Escherichia coli* low fidelity DNA polymerase V ortholog, that has role a in UV induced translesion DNA synthesis. *Pseudomonas fluorescens* strain PC20 has been previously isolated from water in northeastern Estonia polluted with phenolic compounds. Sequencing this strain revealed that it contains three copies of *rulAB* genes. The main goal of this research was to find out if one or several *P. fluorescens* *rulAB* operons could have the properties of DNA Pol V. To test the functionality of PC20 *rulAB* genes, UV tolerance and UV mutagenesis experiments were conducted by delivering the *rulAB* genes into the control strain *Pseudomonas putida* PaW85. The same experiments were also performed with *P. fluorescens* PC20 deletion strains that had one or several of its *rulAB* genes removed from the genome.

Keywords: *rulAB*, DNA Pol V, UV radiation, mutation rate, *Pseudomonas fluorescens*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. DNA kahjustused.....	7
1.1.1. UV kiirgusest tingitud DNA kahjustused	7
1.2. DNA kahjustuste parandamine	8
1.2.1. Nukleotiidi väljalõikamise reparatsioonisüsteem (NER)	8
1.2.2. Lämmastikaluste väljalõikamise reparatsioonisüsteem (BER)	9
1.2.3. Fotoreaktivatsioon	10
1.3. DNA kahjustuste ülesüntees (translesion synthesis, TLS)	11
1.3.1. SOS vastus.....	12
1.3.2. DNA polümeraas II.....	13
1.3.3. DNA polümeraas IV	14
1.3.4. DNA polümeraas V	14
1.3.5. ImuC	15
1.4. Mutatsioonid, nende tüübid ja teke bakterites	15
1.5. Testsüsteemid mutantide tekkesageduse uurimiseks bakterites	17
1.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i> tüvi PC20.....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja meetodika	20
2.2.1. Kasutatud söötmed, plasmiidid ja bakteritüved.....	20
2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	22
2.2.3. Geelelektroforees.....	22
2.2.4. DNA sadestamine	23
2.2.5. DNA restriksioon.....	23
2.2.6. DNA ligeerimine.....	24
2.2.7. Kloneerimine	24
2.2.8. Elektroporatsiooni jaoks kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon.....	24
2.2.9. Plasmiidse DNA eraldamine.....	25
2.2.10. Sekveneerimine	25

2.2.11. UV-C kiirguse taluvuse määramine	26
2.2.12. <i>P. putida</i> ja <i>P. fluorescens</i> spontaansete rifampitsiini-resistentsete (Rif ^R) mutantide tekkesageduse määramine Rif ^R / <i>rpoB</i> testsüsteemiga (fluktuatsiooni test).....	26
2.2.13. <i>P. putida</i> ja <i>P. fluorescens</i> UV kiirgusest tingitud rifampitsiini-resistentsete (Rif ^R) mutantide tekkesageduse määramine Rif ^R / <i>rpoB</i> testsüsteemiga (fluktuatsiooni test).....	27
2.2.14. Statistiline analüüs	27
2.3. Tulemused.....	28
2.3.1. Spontaansete ja UV-C kiirgusest indutseeritud mutatsiooniprotsesside uurimiseks vajalike <i>rulAB</i> operone sisaldavate <i>P. putida</i> PaW85 tüvede ja <i>P. fluorescens</i> PC20 <i>rulAB</i> deletsioontüvede konstrueerimine	28
2.3.2. <i>P. fluorescens</i> PC20 <i>rulAB</i> operonide mõju UV-C kiirguse taluvusele	29
2.3.3. <i>P. fluorescens</i> PC20 <i>rulAB</i> operonide mõju eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude mutantide tekkesagedusele	31
2.3.4. <i>P. fluorescens</i> PC20 <i>rulAB</i> operonide mõju UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedusele mutatsioonisagedusele eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes.....	33
2.4. Arutelu	36
KOKKUVÕTE	40
SUMMARY	42
KIRJANDUSE LOETELU.....	44
LIHTLITSENTS.....	54

KASUTATUD LÜHENDID

AP sait – apuriinne/apürimidiinne sait

BER – lämmastikaluse väljalõikamise reparatsioonisüsteem (*Base Excision Repair*)

CAA – aminohapete hüdroolüsaat (*casamino acids*)

CFU – kolooniaid moodustavate rakkude arv (*Colony Forming Unit*)

LP-BER – pika ulatusega BER (*long-patch BER*)

NER – nukleotiidi väljalõikamise reparatsioonisüsteem (*Nucleotide Excision Repair*)

Pol – polümeraas

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)

SP-BER – lühikese ulatusega BER (*short-patch BER*)

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

TLS – DNA kahjustuste ülesüntees (*translesion synthesis*)

UV – ultraviolettkiirgus

SISSEJUHATUS

Looduskeskkonnas elavad bakterid on pideva stressi all, sest keskkond on väga muutlik. Lisaks sellele ohustavad baktereid erinevad looduses leiduvad kiirgused ja keemilised ühendid, mis kõik kahjustavad bakterite genoomi. DNA kahjustustega võitlemiseks on bakteritel välja kujunenud erinevad DNA reparatsioonisüsteemid, mis parandavad kahjustunud DNA-d täpselt, vigu tegemata. Kui DNA kahjustusi tekib nii palju, et reparatsioonisüsteemid ei jõua neid kõiki enne replikatsiooni ära parandada, võetakse kasutusele spetsialiseerunud DNA polümeraasid, mis suudavad ka kahjustunud DNA-d replitseerida (Fujii ja Fuchs, 2020). Kahjustunud kohad DNA-s ei pruugi olla alati täpselt loetavad, mistõttu võivad spetsialiseerunud polümeraasid teha replikatsiooni käigus vigu, mis kinnituvad DNA-s mutatsioonidena. Üheks selliseks spetsialiseerunud DNA polümeraasiks on *E. coli umuDC* operoni kodeeritud DNA polümeraas V, mis võetakse bakterites kasutusele vaid viimase variandina, kui kõik teised DNA parandamise mehhanismid on nurjunud (Janion, 2008).

Eesti põlevkivitööstuse tõttu fenoolidega saastunud Kirde-Eesti jõeveest isoleeritud bakteritüve, *Pseudomonas fluorescens* PC20, genoomist leiti muuhulgas kolm koopiat *rulAB* geene, mis on *umuDC* ortoloogid (Heinaru *et al.*, 2000; Ilmjärv *et al.*, 2017). Kõikide leitud *rulAB* geenide ekspressioon on indutseeritav DNA kahjustustega ning võiks arvata, et kõik need geenid on funktsionaalsed (Ilmjärv *et al.*, 2017). Täpsemaid katseid *P. fluorescens* PC20 *rulAB* operonidega tehtud ei ole, mistõttu ei ole teada, kas need kõik ka päriselt osalevad DNA kahjustuste talumisel.

Antud bakalaureusetöö eesmärk on välja selgitada, millised *P. fluorescens* tüves PC20 leiduvad *rulAB* operonid on funktsionaalsed ja vastutavad bakteritüve UV taluvuse ning UV kiirgusest tingitud mutageneesi eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. DNA kahjustused

DNA kahjustused bakterites tekivad nii endogeenselt kui eksogeenselt viisil. Endogeenselt kahjustavad DNA-d metabolismi käigus tekkivad reaktiivsed hapnikuühendid (ROS), DNA spontaanne hüdrolyüs ja erinevad bakterites leiduvad alküülivad ühendid (Lindahl ja Barnes, 2000). Eksogeenselt ohustab baktereid radiatsioon, kaasa arvatud ultraviolettkiirgus (UV), ja keskkonnas olevad või sinna sattunud kemikaalid (Friedberg *et al.*, 2006a). Peale selle on keskkond väga muutlik, mis tähendab, et keskkonna toitaineid, hapniku ja vee kättesaadavus ning temperatuur ja pH tase kõiguvad pidevalt (Van Elsas ja Van Overbeek, 1993). Kõikide eelnevalt mainitud asjaolude tulemusena võivad tekkida DNA kahjustused ehk võib toimuda lämmastikaluste modifitseerimine või nende omavaheline kovalentne seondumine, apuriinsete või apürimidiinsete (AP) saitide teke ning ühe- ja kaheaheelaliste DNA katkete teke (Friedberg *et al.*, 2006a).

Igasugused DNA kahjustused on ohtlikud, kuna takistavad replikatsioonikahvli edasi liikumist (Yeeles *et al.*, 2013). Bakteritel on peatunud replikatsioonikahvli taaskäivitamiseks välja kujunenud mitmed süsteemid, kuid kui replikatsiooni ei saada uuesti tööle, võib see kaasa tuua raku surma (Mirkin ja Mirkin, 2007).

1.1.1. UV kiirgusest tingitud DNA kahjustused

Päikeselt tuleb Maale UV kiirgus, mis jaotatakse oma lainepikkuste järgi kolmeks: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) ja UV-C (<280 nm) (Sinha ja Häder, 2002). Maad ümbritsev osoonikiht neelab täielikult endasse kogu emiteeritud UV-C kiirguse ning enamiku UV-B kiirgusest, kuid UV-A ja ülejäänud UV-B kiirgus jõuavad maapinnale, kus need mõjutavad elusorganisme (Madronich *et al.*, 1998). Kõige kahjulikum on maapinnani jõudev UV-B kiirgus, sest see neeldub rakkudes olevas DNA-s. UV-A kiirgus DNA-s ei neeldu, kuid kaudselt võib ka see DNA-d kahjustada (Sinha ja Häder, 2002).

Laboratoorsete eksperimentide läbiviimiseks kasutatakse UV-C kiirgust emiteerivaid lampe (254 nm). Selline kiirgus neeldub väga hästi DNA-s, mille neeldumisspektri piik on 260 nm juures, kuid ei neeldu valkudes, mis muudab UV-C kiirguse tekitatud kahjustused rakkudes spetsiifiliseks DNA suhtes (Friedberg *et al.*, 2006a). Lisaks näitavad uuringud, et UV-C kiirgus

tekitab samasuguseid DNA kahjustusi samas proportsioonis kui UV-B kiirgus (Mitchell *et al.*, 1991).

Peamised DNA kahjustused, mida UV-B ja UV-C kiirgus tekitavad, on pürimidiini dimeerid, kus kahe kõrvuti asetseva pürimidiini (tsütosiin ja/või tümiin) vahele tekib tsüklobutaanring, ja pürimidiinide (6-4) fotoproduktid (Pfeifer, 1997). Kõikide nende kahjustuste tekkimisel nukleotiidid roteeruvad ning DNA konformatsioon muutub, mis blokeerib DNA polümeraaside töö (Becker ja Wang, 1989; Villani *et al.*, 1978). Lisaks otsestele DNA kahjustustele võib UV kiirgus kahjustada DNA-d kaudselt, neeldudes erinevates rakkudes olevates väikestes molekulides ning tootes seekaudu reaktiivseid hapnikuühendeid, mis reageerides DNA-ga oksüdeerivad selles olevaid nukleotiide või tekitavad DNA ahelas katkeid (Ikehata ja Ono, 2011).

1.2. DNA kahjustuste parandamine

DNA kahjustuste talumine on tingitud sellest, kas ja kuidas bakterites olevad DNA kahjustuste kahjuliku mõju eest vastutavad mehhanismid tekkinud DNA kahjustusi parandavad või kuidas tekkinud kahjustustele vaatamata DNA-d replitseerida (Chang ja Cimprich, 2009; Coohill ja Sagripanti, 2008). Järgnevalt kirjeldan täpsemalt neid reparatsioonisüsteeme, mille kasutuselevõtt parandab UV kiirgusest tingitud DNA kahjustused täpselt, ilma mutatsioonide tekitamata. Sellisteks reparatsioonisüsteemideks on nukleotiidi ja lämmastikaluse väljalõikamise reparatsioonirajad ning ensümaatiline fotoreaktivatsioon (Friedberg *et al.*, 2006a).

1.2.1. Nukleotiidi väljalõikamise reparatsioonisüsteem (NER)

Nukleotiidi väljalõikamise reparatsioonisüsteem (*Nucleotide Excision Repair*, NER) on konserveerunud kõikides elusorganismides alates bakteritest kuni inimeseni (Reardon ja Sancar, 2005). NER kaudu parandatakse selliseid DNA kahjustusi, mis muudavad DNA struktuuri, näiteks UV kiirguse tekitatud pürimidiini dimeerid ja (6-4) fotoproduktid (Sancar ja Tang, 1993). NER valkude puudumine üherakulistest organismidest muudab need väga tundlikuks UV kiirguse suhtes (Boyce ja Howard-Flanders, 1964). NER rajas osalevad valgud UvrA, UvrB, UvrC, UvrD, DNA polümeraas (Pol) I ja ligaas, mis tunnevad ära kahjustunud koha DNA-s ning eemaldavad selle 12-13 nukleotiidi pikkuse oligomeerina (Reardon ja Sancar, 2005).

Kahjustustega kohti DNA-s otsib kahest UvrA valgust koosnev dupleks, millega on seostunud ka kaks UvrB valku, moodustades ühise kompleksi (Malta *et al.*, 2007). Kasutades ATP energiat, liigub UvrA₂B₂ kompleks DNA-l ning otsib muutunud konformatsiooniga DNA alasid (Grossman ja Thiagalingam, 1993). Kui UvrA seondub kahjustumata DNA-le, saab toimuda ATP hüdroolüüs, mis vabastab kompleksi DNA küljest. Seondudes aga kahjustunud DNA-le, ei saa ATP hüdroolüüs toimuda, mille tõttu seondub UvrA DNA-le piisavalt kauaks, et kahjustunud DNA külge saaks seonduda UvrB, peale mida vabaneb kompleksist UvrA (Goosen ja Moolenaar, 2001). Seondunud UvrB käitub kui helikaas ning sulatab lahti 5 nukleotiidi pikkuse ala DNA kahjustuse ümber (Sancar, 1996). Seejärel seondub UvrB-ga UvrC. UvrB katalüüsib lõike DNA kahjustusest 4-6 nukleotiidi 3' suunas, misjärel teeb UvrC lõike kahjustusest 8 nukleotiidi 5' suunas (Huang *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1992). UvrD helikaas eemaldab kahjustunud DNA osa, et DNA Pol I saaks tekkinud üheaheelalise DNA lõigu täis sünteesida (Kisker *et al.*, 2013).

Eelnevalt mainitud mehhanism töötab DNA kahjustuste parandamisel genoomi üleselt, kuid NER-il on ka teine, transkriptsioonil põhinev DNA reparatsioonimehhanism (De Laat *et al.*, 1999). Kui DNA kahjustus on tekkinud transkribeeritavasse geeni, peatub kahjustuse juures RNA polümeraas, mille prokarüootides tunneb ära *mfd* geenilt kodeeritud TRCF (*Transcription-Repair Coupling Factor*) valk, mis seob UvrA₂B₂ kompleksi ja toob selle DNA kahjustuse juurde (Selby *et al.*, 1991). UvrA₂B₂ kompleksi seandumisel DNA kahjustusele vabanevad sealt RNA polümeraas ja TRCF valk, edasi toimub DNA parandamine nii nagu eelnevalt kirjeldatud. Kuna transkriptsioon toimub vaid ühelt DNA ahelalt korraga, suudab transkriptsioonil põhinev NER parandada vaid neid kahjustusi, mis on transkribeeritaval ahelal, vastasahelal olevaid DNA kahjustusi see süsteem ei tuvasta (Reardon ja Sancar, 2005).

1.2.2. Lämmastikaluste väljalõikamise reparatsioonisüsteem (BER)

Lämmastikaluse väljalõikamise reparatsioonisüsteem (*Base Excision Repair*, BER) parandab selliseid DNA kahjustusi, kus muutunud ei ole DNA ahela konformatsioon, vaid üks DNA ahelas olev lämmastikalus, näiteks on see deamiinitud, oksüdeeritud või metüleeritud. Paljud sellised kahjustused tekivad spontaanselt raku normaalse elutegevuse juures, kuid neid on võimalik tekitada ka erinevate kemikaalide ja kiirgustega (Krokan ja Bjoras, 2013).

Kahjustunud lämmastikalused eemaldatakse DNA ahelast glükosülaaside kaasabil, mis hüdroolüüsivad glükosiidsideme lämmastikaluse ja ülejäänud nukleotiidi vahel. Erinevaid glükosülaase on rakkudes palju, sest iga glükosülaas tunneb ära vaid ühe või mõne muutunud lämmastikaluse (Fromme ja Verdine, 2004). Lämmastikaluse eemaldamisel DNA ahelast tekib AP sait, mis on substraadiks AP endonukleaasidele, mis hüdroolüüsivad 5' fosfodiestersidet, tekitades DNA polümeraaside jaoks vajaliku 3' otsa, kuid kahjustunud nukleotiidi fragment jääb 5' otsa külge (Zharkov, 2008).

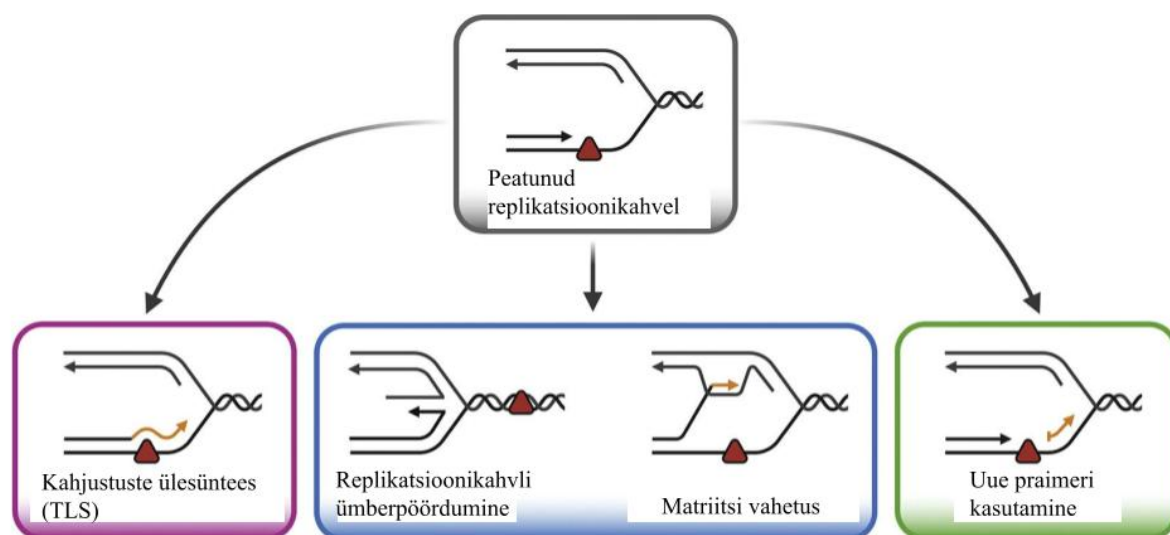
Tekkinud tühimiku täitmiseks on kujunenud kaks viisi, lühikese ulatusega BER (SP-BER, *short-patch* BER) ja pika ulatusega BER (LP-BER, *long-patch* BER). SP-BER käigus sünteesib tekkinud ühe nukleotiidi suuruse tühimiku täis DNA Pol I, mis suudab ka 5' otsa küljes oleva nukleotiidi fragmendi eemaldada, kui seda ei ole teinud teised glükosülaasid või eksonukleaasid (Krwawicz *et al.*, 2007). Kui 5' otsa küljes olevat nukleotiidi fragmenti enne selle eemaldamist modifitseerida, ei suuda DNA Pol I seda sünteesi käigus eemaldada ning jätkab sünteesi ka peale tühimiku täitmist ehk toimub LP-BER. Sünteesi käigus lükkab polümeraas ees olevad nukleotiidid eest ning sünteesib nende asemele uued nukleotiidid. Süntees kestab seni, kuni endonukleaas eemaldab eest lükatud oligonukleotiidi. LP-BER asendab kahjustunud ahelas 2-12 nukleotiidi (Liu *et al.*, 2007).

1.2.3. Fotoreaktivatsioon

Fotoreaktivatsioon avastati, kui märgati, et UV kiirgusega kiiritatud seene *Streptomyces griseus* eoste elumus suurenes kordades, kui neid hoida nähtava valguse käes peale kiiritamist. Piisas ainult mõnest minutist, et efekti näha (Kelner, 1949). Fotoreaktivatsioon suudab parandada vaid pürimidiini dimeere ning teeb seda kasutades ensüümi nimega fotolüaas (Oguma *et al.*, 2001). Fotolüaase on leitud paljudest organismidest, kaasa arvatud arhedest, mistõttu arvatakse, et need on väga vanad reparatsioonivalgud, mis aitasid kaasa esimeste organismide tekkele, kui Maal veel osoonikihti ei olnud (Carell ja Epple, 1998). Fotoreaktivatsiooni põhimõte seisneb fotolüaasi seondumisel pürimidiini dimeerile, peale mida kasutab ensüüm nähtava valguse energiat, et dimeer kaheks monomeeriks lahutada. Fotolüaas võib seonduda DNA kahjustusele ka pimedas. Fotoreaktivatsioon on väga hea DNA parandamise süsteem, sest ei löhu DNA ahelat, ei kasuta kahjustuse parandamiseks ATP energiat ning parandab DNA kahjustuse vigasid tegemata (Sutherland, 1981). Fotolüaasi geen on leitud ka *Pseudomonas* perekonna bakteritel, k.a. *P. fluorescens* (Gunasekera ja Sundin, 2006; Kim ja Sundin, 2001).

1.3. DNA kahjustuste ülesüntees (*translesion synthesis, TLS*)

Kui DNA kahjustuste hulk rakus tõuseb liiga suureks, näiteks rakkude UV kiiritamisel, ei saa DNA reparatsioonisüsteemid kõigi kahjustustega hakkama ning osad neist jäävad ette replikatsioonikahvlile (Fujii ja Fuchs, 2020). Replikatsioon ei peatu, kui kahjustus paikneb DNA-viivisahelal, kuid kahjustusega Okazaki fragment jäetakse sünteesimata. Liiderahelal jäetakse samuti kahjustusega koht vahele ning DNA süntees jätkub peale kahjustust, kus polümeraas alustab replikatsiooni uuest praimerist (joonis 1) (Heller ja Marians, 2006; Marians, 2018). Mõlemal juhul tekib kahjustust sisaldav üheahelaline DNA (ssDNA) lõik, mida tavalised DNA reparatsioonisüsteemid parandada ei suuda (Fujii ja Fuchs, 2020). Tekkiv ssDNA indutseerib rakkudes SOS vastuse, mis lubab läbi viia kahjustuste ülesünteesi, sest SOS vastuse käigus indutseeritakse muuhulgas ka spetsialiseerunud TLS (*translesion synthesis*) polümeraaside ekspressioon (Michel, 2005). Replikatsioonikahvli jõudmisel DNA kahjustusele on olemas ka teine, polümeraaside vahetuse mudel, mille kohaselt DNA replikatsiooni peatumisel vahetatakse replikatiivne DNA Pol III välja TLS polümeraasi vastu, mis sünteesib üle kahjustunud koha DNA-s, peale mida võetakse kasutusele jälle Pol III (joonis 1) (Fujii ja Fuchs, 2004). TLS polümeraasidel on unikaalsed aktiivsaiidid, mistõttu suudavad need ka kahjustunud DNA-d replitseerida, kuid kuna matriitsahela nukleotiidid ei pruugi olla selgelt loetavad, võib polümeraas kahjustuse ülesünteesi korral teha vigu ning tekitada nii mutatsioone (Fuchs ja Fujii, 2013; Yang ja Gao, 2018).



Joonis 1. DNA replikatsiooniga seotud stressivastuste mehhanismid. Replikatsiooni takistavad kahjustused (tähistatud punase kolmnurgaga) peatavad ajutiselt replikatsioonikahvli edasi liikumise. Takistusi on võimalik „tolereerida“ kolme eristatava raja kaudu, et replikatsioonikahvel uuesti tööle saada: kahjustuste ülesüntees (vasak), matriitsi vahetus või replikatsioonikahvli ümberpöördumine (keskel) ja uue praimer kasutamine (parem). Joonis on võetud ja muudetud artiklist Quintet *et al.*, 2021.

Prokarüootide kahjustuste ülesünteesis osalevad DNA polümeraasid II, IV ja V (Goodman ja Woodgate, 2013). Pol IV ja V kuuluvad Y-perekonna DNA polümeraaside hulka, mille replikatsioon on vigaderohke, millel on madal protsessiivsus ning millel puudub 3'-5' eksonukleasne ehk vigu korrigeeriv aktiivsus (Fuchs ja Fujii, 2013; Ohmori *et al.*, 2001). Neljandat teadaolevat TLS polümeraasi kodeerib *imuABC* geenikassett, mida leidub sellistes bakterites, kellel puudub DNA Pol V (Abella *et al.*, 2004; Erill, 2006). Kõigi nelja TLS polümeraasi ekspressiooni kontrollib SOS vastus (Abella *et al.*, 2004; Goodman ja Woodgate, 2013). Järgnevalt kirjeldan täpsemalt erinevaid TLS polümeraase ning nende ekspressiooni reguleerivat SOS vastust.

1.3.1. SOS vastus

SOS vastus kirjeldati bakteris *E. coli*, kuid sellele sarnaseid süsteeme on leitud ka väga paljudes teistes bakterites. SOS vastust reguleerivad LexA ja RecA valgud (Erill *et al.*, 2007). Bakterirakkudes, kus DNA ei ole kahjustada saanud, käitub LexA kui repressor seondues dimeerina selliste geenide operaatorjärjestusele, mis tegelevad DNA kahjustuste parandamise, replikatsioonikahvli töös hoidmise ja enneaegsest rakujagunemisest hoidumisega, takistades nende ekspressiooni (Crowley ja Courcelle, 2002). Erinevatel LexA kontrolli all olevate geenide operaatorjärjestustel on erinev affiinsus LexA suhtes, mis mõjutab seda, millal nende ekspressioon DNA kahjustuse korral indutseeritakse (Butala *et al.*, 2009). Kõige varem indutseeritakse geenid, mis on seotud vigadeta DNA parandamisega, näiteks nukleotiidi väljalõikamise süsteemi geenid *uvrA*, *uvrB* ja *uvrD*. Viimasena, alles 30-40 minutit peale DNA kahjustamist, indutseeritakse DNA Pol V kodeeriv *umuDC* operon (Goodman ja Woodgate, 2013).

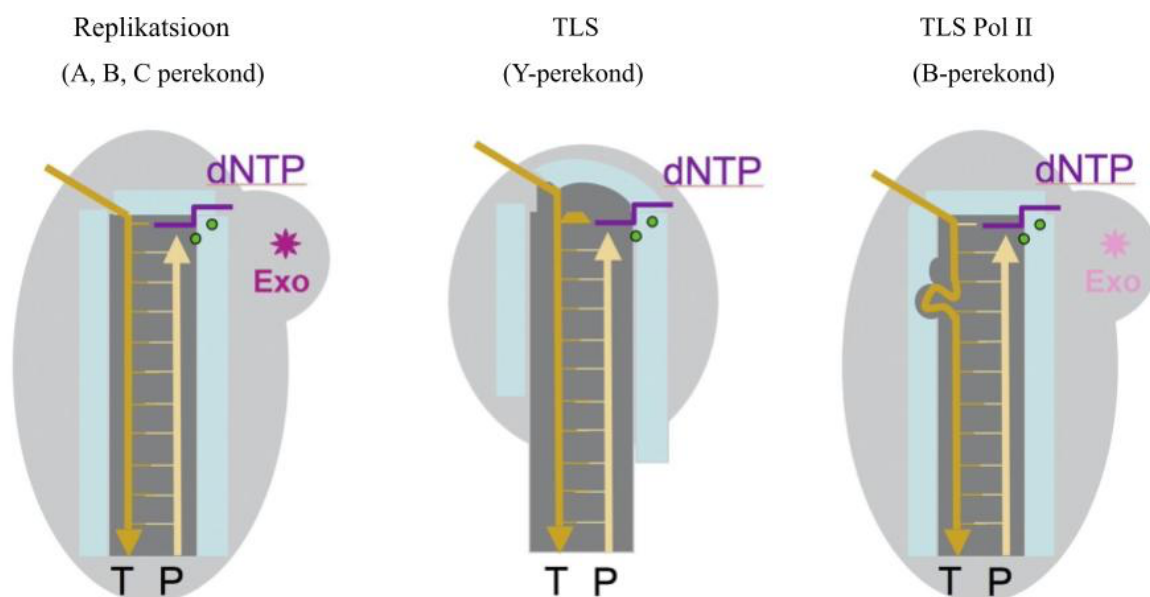
SOS vastuses osalevate geenide ekspressiooni indutseerimiseks on vaja üheaheelalist DNA-d, mis tekib näiteks siis, kui rakk üritab kahjustunud DNA-d replitseerida. ssDNA-le seonduvad ATP juuresolekul RecA valgud, moodustades filamenti ning aktiveerides RecA (Neidhardt, 1996). Aktiveeritud RecA käitub kui ko-proteas ja stimuleerib LexA auto-proteolüüsi kaheks enam-vähem sama suureks osaks (Little, 1991). Lõigatud LexA ei represseri enam SOS vastuse käigus aktiveeritavaid gene ning nende geenide ekspressioonitase tõuseb (Friedberg *et al.*, 2006b).

E. coli rakkudes on SOS vastuse ja LexA kaudu reguleeritud enam kui 40 erineva geeni ekspressioon, mille hulka kuuluvad ka *recA* ja *lexA* (Courcelle *et al.*, 2001; Friedberg *et al.*,

2006b). Kahjustamata *E. coli* rakkudes on umbes 1300 LexA ja 7200 RecA molekuli, mida on piisavalt palju, et vajadusel indutseerida SOS vastus (Sassanfar ja Roberts, 1990). DNA kahjustuste parandamisel üheahelaline DNA kaob, ssDNA-RecA filamendid lõhutakse ning LexA valke enam ei lagundata, mille tõttu taastub rakkude tavapärane olukord (Friedberg *et al.*, 2006b).

1.3.2. DNA polümeraas II

E. coli DNA polümeraas II kuulub B-perekonna polümeraaside hulka, mis on tuntud kui vigadevabad polümeraasid (Al Mamun ja Humayun, 2006). DNA Pol II replikatsioon on täpne, sest omab 3'-5' eksonukleaset aktiivsust, kuid Pol II suudab läbi viia ka kahjustuste ülesünteesi (Cai *et al.*, 1995). Pol II aktiivsaiidi läheduses on väikesed õõnsused, kuhu kahjustunud matriitsahel saab 1-2 nukleotiidistest lingudena minna ning nii replikatsioonist välja jääda (joonis 2) (Wang ja Yang, 2009). DNA Pol II suudab ülesünteesida erinevaid UV kiirguse ja reaktiivsete hapnikuühendite tekitatud DNA kahjustusi, kuid kõige olulisem Pol II roll *E. coli* rakkudes on replikatsioonikahvli taaskäivitamine, kui see on peatunud DNA kahjustuse tõttu (Escarceller *et al.*, 1994; Masker *et al.*, 1973; Rangarajan *et al.*, 1999). Joonisel 2 toodud replikatiivsete ja TLS polümeraaside tunnused.



Joonis 2. Tunnused, mis eristavad reparatsioonis osalevaid ja replikatiivseid polümeraase. Vasakul on kõrge täpsusega polümeraas, millel on väike polümeraasi aktiivsait ja Exo vigu korrigeeriv aktiivsus. Keskkel on iseloomulik Y perekonna polümeraas, millel on suur aktiivsait, kuhu DNA kahjustusi mahutada, ning vigu korrigeeriv aktiivsus puudub. Paremal on Pol II, millel on väikesed taskud matriitsahela kõrval, kuhu DNA kahjustused lingudena mahuvad, ning väiksem vigu korrigeeriv aktiivsus erilise DNA jaotumise tõttu. Vigu korrigeeriv aktiivsus puudub tihti teistes A ja B perekonna TLS polümeraasides. Joonisel tähistab T matriitsahelat (*template*) ja P praimerit. Joonis on võetud ja muudetud artiklist Wang ja Yang, 2009.

1.3.3. DNA polümeraas IV

dinB geenilt kodeeritud DNA Pol IV on TLS polümeraas, mida leidub nii bakterites, eukarüootides kui arhedes (Ohmori *et al.*, 2001). *E. coli* Pol IV ei suuda üksinda oma polümeraasest aktiivsust läbi viia, sest ei seonu DNA peale stabiilselt, kuid koostöös DNA Pol III libiseva klambriga muutub Pol IV protsessiivsemaks ning suudab kuni 400 nukleotiidi järjest sünteesida (Fuchs *et al.*, 2004). *In vitro* suudab *E. coli* Pol IV teostada kahjustuste ülesünteesi oksüdeeritud või amineeritud lämmastikalustega DNA-le ning ka AP saite, pürimidiini dimeere ja (6-4) fotoprodukte sisaldavale DNA-le. *In vivo* aga ei suuda Pol IV kõiki kahjustusi üle sünteesida (Fuchs *et al.*, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* ja *P. putida* liikidel osaleb Pol IV alküülkahjustuste ülesünteesis (Jatsenko *et al.*, 2017). *E. coli* rakkudes on täheldatud, et Pol IV ei osale UV kiirguse või reaktiivsete hapnikuühendite tekitatud kahjustuste ülesünteesis (McKenzie *et al.*, 2001).

1.3.4. DNA polümeraas V

umuDC operon kodeerib *E. coli* DNA Pol V, mis on kõige rohkem uuritud TLS polümeraas. DNA kahjustuste korral on Pol V üks viimaseid valke, mille ekspressioon SOS vastuse kaudu indutseeritakse (Janion, 2008). Pol V koosneb kahest RecA-ssDNA filamendi kaasabil lõigatud UmuD' valgust ja ühest UmuC valgust (Bruck *et al.*, 1996; Burckhardt *et al.*, 1988). Lisaks aktiveerib RecA-ssDNA filament UmuD'₂C kompleksi, kandes üle ühe RecA-ATP molekuli oma filamendi otsast UmuD'₂C kompleksile (Jiang *et al.*, 2009). Varasemalt arvati, et UmuD'₂C kompleks aitab replikatiivsel DNA polümeraasil III kahjustusi ülesünteesida, kuid siis leiti, et vigaderohke DNA süntees on võimalik ka ilma Pol III osaluseta ning UmuC on see valk, millel on polümeraasne aktiivsus (Reuven *et al.*, 1999).

umuDC ortolooge leidub ka teistes bakteriliikides, näiteks bakterites *P. syringae* ja *P. putida*, mille plasmiididel olevat UV-resistentsuse operoni kutsutakse *rulAB*-ks (Sundin *et al.*, 1996; Tark *et al.*, 2005). Varasemalt on näidatud, et *P. putida* *rulAB* operoni ja *E. coli* *umuDC* operoni ees olevad operaatorjärjestused on identsed ning *rulAB* ekspressiooni indutseerimiseks on vaja RecA valgu olemasolu rakus (Tark *et al.*, 2005). Oma suuruse ja konserveerunud aminohapete järgi on RulA UmuD sarnane valk ning RulA valk omab sarnaselt UmuD-le spetsiifilist äratundmisjärjestust RecA lõikamisaktiivsuse läbiviimiseks (Sundin *et al.*, 1996). *rulAB* operonid asuvad tihti plasmiidide peal, mistõttu levivad need lihtsasti erinevate bakterite vahel horisontaalse geeniülekanne kaudu (Zhang ja Sundin, 2004).

1.3.5. ImuC

imuABC geenikassett on laialdaselt leitud selliste bakterite genoomidest, kellel puudub DNA Pol V ning vastutab nendes bakterites DNA kahjustuste ülesünteesi eest (Abella *et al.*, 2004; Erill, 2006). Geenikassett koosneb neljast geenist, *lexA2*, *imuA*, *imuB* ja *imuC* (varasema nimetusega *dnaE2*). *lexA2* kodeerib teist koopiat SOS-vastuse repressorit LexA-d ja *imuA* kodeerib valku, mis sarnaneb oma järjestuselt natuke SulA ja RecA valkudele (Galhardo *et al.*, 2005; Luján *et al.*, 2019). SulA inhibeerib rakujagunemist, kuid ImuA funktsioon kahjustuste ülesünteesis ei ole teada (Abella *et al.*, 2004; Luján *et al.*, 2019). ImuC on madala protsessiivsusega homoloog replikatiivsele DNA Pol III-le ja ImuB on homoloogne Y-perekonna Pol IV polümeraasiga, kuid selle katalüütilises saidis puuduvad polümeraasse aktiivsuse jaoks vajalikud aminohapped (McHenry, 2011; Warner *et al.*, 2010).

ImuC on vigaderohke DNA polümeraas *Mycobacterium tuberculosis* ja *Caulobacter crescentus* bakteritüvede puhul, kus see vastutab UV kiirgusest tingitud DNA kahjustuste ülesünteesi eest (Boshoff *et al.*, 2003; Galhardo *et al.*, 2005). ImuA või ImuB puudumine *C. crescentus* tüvest muudab selle sensitiivseks UV kiirguse suhtes, mis viitab sellele, et mõlemad geenid on vajalikud ImuC läbiviidava UV kahjustuste ülesünteesi jaoks (Galhardo *et al.*, 2005). Kuna ImuB-l ei ole polümeraasest aktiivsust kuid interakteerub libiseva klambriga, arvatakse, et ImuB ühendab erinevaid ImuC läbiviidavas kahjustuste ülesünteesis osalevaid valke (McHenry, 2011).

Geenikassetti funktsionaalsuse osas on leitud ka vastandlikke tulemusi. Näiteks *P. putida* puhul on UV kiirgusest tingitud kahjustuste parandamisel mutageenseks polümeraasiks hoopis ImuB ning ImuC on sellisel juhul pigem antimutaator ja ei osale mutatsioonide tekkes (Koorits *et al.*, 2007). Teisalt on leitud, et ImuC osaleb *P. putida* alküülkahjustuste parandamisel ning ImuB või ImuC puudumine muudab tüve tundlikuks erinevatele alküülivatele ühenditele (Jatsenko *et al.*, 2017).

1.4. Mutatsioonid, nende tüübid ja teke bakterites

Mutatsioonid on muutused DNA järjestuses, tavaliselt geeni sees. Mutatsioonid võivad olla asendusmutatsioonid, kus asendatakse DNA järjestuses olev nukleotiid teise nukleotiidi vastu, või insertsioonid ja deletsioonid, kus väike DNA lõik lisatakse või eemaldatakse genoomist. Asendusmutatsioonid võivad olla sünonüümsed, mis ei muuda valgus aminohappelist järjestust,

või *missenss*- ja *nonsenss*mutatsioonid, mille puhul vastavalt muutub valgus olev aminohape või tekib enneaegne stoppkoodon. Insertsioonid ja deletsioonid muudavad valgus lugemisraami ning peaaegu alati muudavad geeni funktsiooni. Mutatsioonid võivad tekkida ka geeni regulatoorses alades, mis seejärel hakkavad mõjutama geeni ekspressiooni (Schroeder *et al.*, 2018).

Mutatsioonid tekivad spontaanselt või erinevate stressorite tõttu. Spontaansed mutatsioonid tekivad DNA replikatsiooni vigadena, kui replikatiivne polümeraas sisestab DNA ahelasse nukleotiide, mida selle 3'-5' eksonukleasne aktiivsus vigadena ei tuvasta (Schroeder *et al.*, 2018). Sellised nukleotiidid võivad olla näiteks oksüdeerunud, nukleotiidide tautomeersed vormid, mis ebakorrektselt Watson-Crick paardumise korral on oma ehituselt sarnased õigesti paardunud nukleotiididega või ribonukleotiidid desoksüribonukleotiidide asemel (Harris *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2013). Spontaansed mutatsioonid tekivad väga harva, ühes generatsioonis toimub üks spontaanne mutatsioon 10^9 või 10^{10} nukleotiidi kohta, mis kinnitub, kui viga enne järgmist replikatsiooni ei parandata (Schroeder *et al.*, 2018). Indutseeritud mutatsioonide puhul võimendub mutatsioonisagedus TLS polümeraaside tõttu vastusena mõnele mutageensele ühendile, mis aktiveerib SOS vastuse (Foster, 2007). Lisaks DNA kahjustustele tõstab mutatsioonisagedust ka näiteks toitainete puudus, kõrge pH ja kokkupuude antibiootikumidega (Blázquez *et al.*, 2018; Bridges, 1994; Musarrat ja Ahmad, 1988). TLS polümeraaside tekitatud mutatsioonisagedus on kõrge, kuni üks mutatsioon 100 nukleotiidi kohta (Henrikus *et al.*, 2018).

Mutatsioonide teke on osa evolutsioonist, sest mutatsioonid muudavad organismide kohastumust. Tavaliselt on tekkivad mutatsioonid organismidele nõ kahjulikud ning kasulikud mutatsioonid tekivad harva (Perfeito *et al.*, 2007). Samas on mutatsioonide teke vajalik, sest bakterite toimetuleku seisukohast kasulikud mutatsioonid aitavad bakteritel muutavas elukeskkonnas paremini hakkama saada (Schroeder *et al.*, 2018). TLS polümeraaside kasutamine DNA kahjustuste ülesünteesis ja sellest tingitud mutatsioonisageduse tõus on seega valik, mille bakterid on langetanud suurenenud ellujäämise ja potentsiaalselt kahjulike mutatsioonide tekke vahel (Smith ja Walker, 1998).

Enamasti on TLS polümeraaside läbiviidava replikatsiooni tulemuseks UV kahjustuste järgselt C → T või CC → TT asendusmutatsioonid (Brash *et al.*, 1991). (6-4) fotoproduktid tekitavad *E. coli* rakkude DNA-s T → C asendusi kohtades, kus on kõrvuti kaks tüümiini (Ikehata ja Ono, 2011). DNA deamiinimise tõttu muutub tsütosiin uratsiiliks, mille replitseerimisel sünteesitakse

sellele vastu adeniin ning toimub GC → AT asendusmutatsioonide teke (Schroeder *et al.*, 2018). AP-saitide sünteesimisel replitseerib DNA Pol V ilma lämmastikaluseta kohale vastu tavaliselt A nukleotiidi, tekitades asendusmutatsioone (Reuven *et al.*, 1998).

1.5. Testsüsteemid mutantide tekkesageduse uurimiseks bakterites

Bakterite mutatsioonisagedust saab määrata fluktuatsiooni testidega, kus määratakse mutantide arv paralleelkultuurides, millele järgneb paralleelide jaotuse analüüsimine, et määrata mutatsioonisagedus (Rosche ja Foster, 2000). Erinevaid mutantide tekkesagedusi tuvastavaid testsüsteeme on palju, näiteks saab *P. putida* tüve puhul uurida statsionaarses kasvufaasis oleva kultuuri mutatsioonisagedust kui viia tüvesse promootorita fenooli lagundamist võimaldavaid *pheBA* gene sisaldav plasmiid ning seejärel kasvatada tüve söötmel, kus ainukeseks süsinikuallikaks on fenool. Sellisel juhul saavad fenooli sisaldaval tardsöötmel kasvama hakata ainult need mutandid, kellel on tekkinud mutatsioon *pheBA* geenide eelsesse alasse, mis võimaldab *pheBA* geenide aktiveerumise (Kasak *et al.*, 1997). *E. coli* tüves FC40 uuritakse mutatsioonisagedust laktoosi kasutuselevõtuga, sest ilma mutatsioonide tekketa ei suuda see tüvi laktoosi minimaalsöötmel kasvada (Foster, 2007). Käesolevas töös kasutati mutatsiooniprotsesside uurimiseks rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinevat testsüsteemi, mida kirjeldan täpsemalt.

1.5.1. Rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinev testsüsteem (Rif^R/*rpoB*) mutatsiooniprotsesside uurimiseks bakterites

Rifampitsiin (Rif) on laia toimespektriga antibiootikum, mille vastu bakterid sagedasti resistentseteks muutuvad. Rifampitsiin seondub bakterite *rpoB* geeni kodeeritud RNA polümeraasi β-subühikule ning blokeerib RNA sünteesi, mis on rakkudele surmav (Campbell *et al.*, 2001). Asendusmutatsioonid või väga lühikesed insertioonid või deletsioonid *rpoB* geenis muudavad β-subühiku konformatsiooni, mille tulemusel rifampitsiin ei saa enam ensüümile seonduda ning rakud muutuvad resistentseteks antud antibiootikumi suhtes. Suurem osa asendusmutatsioonidest, mis muudavad bakterid rifampitsiinile resistentseks, klasterduvad väikesele regioonile *rpoB* geenis (Garibyan, 2003).

Rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinevat testsüsteemi kasutatakse eksponentsiaalses kasvufaasis tekkivate mutatsioonide uurimiseks. Kuna testsüsteem põhineb antibiootikumi vastu resistentsuse tekkimisel, peavad vajalikud mutatsioonid toimuma enne rakkude plaatimist

selektiivsöötmele. Rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinevat testsüsteemi saab kasutada ka pseudomonaadide mutantide tekkesageduse uurimiseks (Garibyan, 2003; Jatsenko *et al.*, 2010).

1.6. *Pseudomonas fluorescens* tüvi PC20

Eestis kasutatakse elektri tootmiseks põlevkivi, kuid selle meetodi kõrvalsaaduseks on tekkivad tuhamäed, millest tulenev vesi liigub ümbritsevasse jõgedesse ning reostab need fenoolsete ühenditega. Heinaru *et al.* (2000) uuringu käigus isoleeriti Kirde-Eestis reostunud jõe- ja mereveest fenooli ja p-kresooli lagundavaid baktereid. Kokku isoleeriti 39 tüve, mis nimetati tüvedeks PC1 kuni PC39 selle järgi, et nad lagundavad fenooli (*phenol*) ja kresooli (*p-cresol*). Üheks isoleeritud tüveks oli *Pseudomonas fluorescens* PC20, mis hilisema töö käigus on sekveneeritud.

Ilmjärv *et al.* 2017 aastal avaldatud töös uuriti seda, kas erinevatel ksenobiootilisi aineid lagundavatel keskkonnabakteritel on kõrgenenud mutatsioonisagedus, mis annaks neile evolutsioonilise eelise teiste bakterite ees. Üheks uuritavaks tüveks osutus *P. fluorescens* PC20. Kuna mutatsioonisagedus tõuseb, kui bakterid kasutavad TLS polümeraase, uuriti tüvede Rif^R mutantide tekkesagedust peale nende kiiritamist UV kiirgusega ning tüvel *P. fluorescens* PC20 ilmnes mutageneesi fenotüüp. Võttes arvesse seda tulemust ja seda, et tüvi on varem samas laboris sekveneeritud, otsustati tüve sekveneerimisandmetest otsida, kas tüves võiks leiduda TLS polümeraase Pol V või ImuC kodeerivaid geene. Leiti, et üllatavalt on tüvel olemas nii *imuABC* operoni kodeeriv järjestus kui ka kolm koopiat Pol V kodeerivat *rulAB* operonide järjestust. Kahe *rulAB* operoni järjestus (*rulAB1* ja *rulAB2*) paikneb bakteri kromosoomis ja kolmas asub plasmiidil pG20.

*rulAB*_{pG20} operon sarnaneb oma DNA järjestuselt *P. putida* pWW0 plasmiidil oleva *rulAB* geenijärjestusega ning kaks kromosoomis asuvat *rulAB* operoni on omavahel sarnased, kuid vähem sarnased *rulAB*_{pG20}-ga. Uurides lähemalt tüve PC20 *RulA* ja *RulB* järjestusi, leiti, et neil on olemas kõik *E. coli* DNA Pol V domäänid ning ka kõik Pol V katalüütiliseks aktiivsuseks vajalikud aminohapped (välja arvatud *RulB* 72. aminohape). Lisaks on tüve PC20 *ImuC-1* olemas katalüütiliseks aktiivsuseks vajalikud aminohapped. Kõikide *P. fluorescens* tüves PC20 olevate TLS polümeraaside ekspressioon on indutseeritav mitomütsiin C tekitatud DNA kahjustustega. Neid andmeid kokku võttes võib eeldada, et kõik *P. fluorescens* PC20 tüves olevad *rulAB* operonid ja *imuABC* on funktsionaalsed (Ilmjärv *et al.*, 2017). Seetõttu tekkis vajadus lähemalt uurida, kas ja milline neist kolmest *P. fluorescens* PC20 tüves leitud *rulAB* operonidest võiks olla funktsionaalne.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie töögrupp on varasemalt genoomi sekveneerimisandmete analüüsimisel leidnud, et fenoolsete ühenditega saastunud veekeskonnast isoleeritud bakteril *P. fluorescens* tüvel PC20 on nii *imuABC* operoni kodeerivad geenid kui ka huvitaval kombel suisa kolm *rulAB* geenide koopiat (Ilmjärv *et al.*, 2017). Identifitseeritud *rulAB* geenidest kaks (*rulAB1* ja *rulAB2*) paiknevad kromosoomis ja üks plasmiidil pG20. Samuti leiti, et DNA kahjutused indutseerisid *rulAB* geenide transkriptsiooni. Kuna eelnevad uuringud viitasid sellele, et *P. fluorescens* PC20 tüve *rulAB* geenid võiksid toimida kui Pol V, siis sai antud bakalaureusetöö eesmärgiks täpsemalt välja selgitada, kas ja milline kolmest *P. fluorescens* tüves PC20 leiduvast *rulAB* geenidest võiks olla funktsionaalne.

rulAB geenide funktsionaalsuse välja selgitamiseks kloneeriti *P. fluorescens* kromosomaalsed *rulAB1* ja *rulAB2* geenid ning plasmiidil pG20 paiknev *rulAB* geen igaüks eraldi vastavasse testplasmidi. Kuna antud eksperimentaalse tööga ehk *rulAB* geenide kloneerimisega plasmidi koosseisu oli juba mõned aastad tagasi algust tehtud, ent töö oli seiskunud, sai esimeseks ülesandeks tuvastada, kas olemasolevate plasmiidsete konstruktide seas on olemas kõik kolm *rulAB* geenide järjestusi sisaldavad plasmiidid. Selgus, et puudu oli *rulAB1* geenide järjestust sisaldav plasmiid, mistõttu tuli *P. fluorescens* tüve *rulAB1* geenid kloneerida plasmidi koosseisu. Vastavaid *rulAB* gene sisaldavad plasmiidid viidi igaüks eraldi kontrolltüvesse *P. putida* PaW85 ning uuriti UV kiirguse taluvust erinevatele rakendatud UV doosidele ja UV kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedust.

UV kiirgusest tingitud mutantide tekkesageduse määramiseks kasutati rifampitsiini resistentsuse tekkel baseeruvat kromosomaalset *rpoB/Rif^R* testsüsteemi. Samuti oli eesmärgiks välja selgitada kuidas mõjutab *P. fluorescens* tüve PC20 *rulAB1*, *rulAB2* ja plasmiidse pG20 *rulAB* geenide puudumine (nii üks kui mitmekesi) PC20 tüve UV taluvust, spontaanset mutantide tekkesagedust ja UV kiirgusest indutseeritud mutantide tekkesagedust kasutades rifampitsiini resistentsuse tekkel baseeruvat kromosomaalset *rpoB/Rif^R* testsüsteemi.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud söötmed, plasmiidid ja bakteritüved

Baktereid kasvatati LB (Luria-Bertani) täissöötmes (Miller, 1992) või M9 baasil tehtud minimaalsöötmes (Adams, 1959). Minimaalsööde koosnes 1 x M9-st, kuhu lisati mikroelementide lahust 2,5 ml/l, aminohapete hüdrolüsaati (*casamino acids*, CAA) koos L-trüptofaaniga (20 µg/ml) ja glükoosi, mõlemaid lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Tardsööde sisaldas 15 g/l agarit. Bakteritüvede ja plasmiidide selektsiooniks lisati vajadusel söötmesse antibiootikume kanamütsiin (Km; 50 µg/ml) või rifampitsiin (Rif; 100 µg/ml). *P. putida* ja *P. fluorescens* tüvesid kasvatati temperatuuril 30 °C, *E. coli* temperatuuril 37 °C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil (180 pööret minutis). Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

BAKTERITÜVI	ISELOOMUSTUS	ALLIKAS
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi- 1 gyrA96 relA1</i>	(Miller, 1992)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Saadud PaW1 tüvest TOL plasmidi pWW0 kaotamise kaudu. Kasutatakse paljudes laborites mudeltüvena	(Bayley et al., 1977)
PaW1	<i>P. putida</i> tüvi, mis sisaldab TOL plasmidi pWW0	(Bayley et al., 1977)
PaWrulAB	PaW1 pWW0 plasmiidilt pärit <i>rulAB</i> geenid on kantud PaW85 kromosoomi	(Tark et al., 2005)
PaW85[pSEVA]	PaW85, mis sisaldab pSEVA plasmidi (Km ^R)	Käesolev töö
PaW85[pSEVArulABI]	PaW85, mis sisaldab pSEVA plasmidi, millesse on sisestatud <i>P. fluorescens</i> PC20 kromosoomist pärit <i>rulABI</i> operon (Km ^R)	Käesolev töö

PaW85[pSEVArulAB2]	PaW85, mis sisaldab pSEVA plasmidi, millesse on sisestatud <i>P. fluorescens</i> PC20 kromosoomist pärit <i>rulAB2</i> operon (Km ^R)	Käesolev töö
PaW85[pSEVArulAB _{pG20}]	PaW85, mis sisaldab pSEVA plasmidi, millesse on sisestatud <i>P. fluorescens</i> PC20 pG20 plasmiidilt pärit <i>rulAB</i> operon (Km ^R)	Käesolev töö
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
PC20	Jõeveest eraldatud fenooli ja <i>p</i> -kresooli lagundav bakter	(Heinaru et al., 2000)
PC20 Δ <i>rulAB1</i>	PC20 tüvi, mille kromosoomist on eemaldatud <i>rulAB1</i> operon	Signe Saumaa
PC20 Δ <i>rulAB2</i>	PC20 tüvi, mille kromosoomist on eemaldatud <i>rulAB2</i> operon	Signe Saumaa
PC20 Δ <i>rulAB</i> _{pG20}	PC20 tüvi, mille plasmiidilt pG20 on eemaldatud <i>rulAB</i> operon	Signe Saumaa
PC20 Δ <i>rulAB1</i> Δ <i>rulAB2</i>	PC20 tüvi, mille kromosoomist on eemaldatud nii <i>rulAB1</i> kui ka <i>rulAB2</i> operonid	Signe Saumaa
PLASMIID	ISELOOMUSTUS	ALLIKAS
pSEVARK2	Multikloonimissaiti sisaldav plasmid (Km ^R)	(Silva-Rocha et al., 2013)
pKS <i>rulAB1</i>	<i>P. fluorescens</i> PC20 tüve kromosoomist <i>rulAB1</i> operon kloonitud pBluescript KS(+) vektorisse, <i>NotI</i> saidis (Amp ^R)	Tanel Ilmjärv
pSEVArulAB1	pSEVA plasmid, mille <i>NotI</i> saidi on kloonitud PC20 kromosoomist pärit <i>rulAB1</i> operon (Km ^R)	Käesolev töö
pSEVArulAB2	pSEVA plasmid, mille <i>NotI</i> saidi on kloonitud PC20 kromosoomist pärit <i>rulAB2</i> operon (Km ^R)	Tanel Ilmjärv

pSEVArulAB _{pG20}	pSEVA plasmiid, mille <i>NotI</i> saiti on klonereitud PC20 plasmiidilt pG20 pärit <i>ruLAB</i> operon (Km ^R)	Tanel Ilmjärv
----------------------------	---	---------------

2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Polümeraasi ahelreaktsiooni kasutati konstrueeritud plasmiidide ja bakteritüvede kontrolliks. PCR viidi läbi reaktsioonisegus, mis sisaldas 1x DreamTaq Green puhvrit (Thermo Scientific), 0,2 mM nukleotiide, 10 pmol praimereid (Tabel 2) ning 0,5 U Taq polümeraasi (J. Sedmani labori toode). Reaktsioonisegusse lisati paljundatava DNA-na väikene kogus bakterirakke või plasmiidset DNA-d. Reaktsioonisegu viidi mahuni 20 µl autoklaavitud milliQ veega.

Reaktsioonisegudele teostati PCR kasutades „Eppendorf“ firma PCR masinaid, reaktsiooni etapid olid järgmised:

- 1) eelsoojendamine 96 °C, 3 minutit,
- 2) denaturatsioon 96 °C, 30 sekundit,
- 3) praimerite seondumine 62 °C, 30 sekundit,
- 4) DNA ahelate süntees 72 °C, 3 minutit ja 10 sekundit,
- 5) Järelsüntees 72 °C, 2 minutit.

Etappe 2-4 korrati 30 korda.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid.

NIMETUS	JÄRJESTUS	ISELOOMUSTUS JA SEONDUMISKOHT
PS1	5'-AGGGCGGCGGATTTGTCC-3'	pSEVA universaalpraimer, kasutati sekveneerimiseks ja plasmidi olemasolu tuvastamiseks
PS2	5'-GCGGCAACCGAGCGTTC-3'	pSEVA universaalpraimer, kasutati sekveneerimiseks ja plasmidi olemasolu tuvastamiseks

2.2.3. Geelelektroforees

Plasmiidse DNA, restriksioonifragmentide ja PCR produktide visualiseerimiseks kasutati geelelektroforeesi. Kuna PCR teostati DreamTaq *Green* puhvrri, ei olnud PCR produktide

visualiseerimiseks vaja foreesivärvi lisada, kuid plasmiidse DNA ja restriksioonifragmentide reaktsioonisegude visualiseerimiseks lisati 4 µl foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinise lahus 50%-lises glütseroolis) 20 µl reaktsioonisegu kohta. Proovid kanti 1% agarosgeelile, mis sisaldas 0,4 µg/ml etiidiumbromiidi. DNA fragmentide suuruse määramiseks kasutati DNA markerit *Zipruler Express DNA Ladder 2* (Thermo Scientific). Elektroforees viidi läbi toatemperatuuril 1x TAE puhvril (sisaldab 50 mM Tris-atsetaati, 1 mM EDTA; pH 8,2) pingel 130 V. Tulemusi visualiseeriti UV valguses, kasutades Uvitec Cambridge Uvidoc HD6 masinat.

2.2.4. DNA sadestamine

Plasmiidse DNA sadestamiseks lisati DNA-d sisaldavale segule 1/10 mahust 5 M NaCl lahust ja 2,5 mahtu külma 96% etanooli. Saadud segu hoiti umbes tund aega -20°C juures, peale mida tsentrifuugiti segu 20 minutit toatemperatuuril täispöoretel, kasutades „Eppendorf MiniSpin“ tsentrifuugi (12000 x g). DNA sademelt eemaldati supernatant, lisati 100 µl külma 75% etanooli ning tsentrifuugiti 10 minutit samadel pöoretel. Viimast etappi korrati veel üks kord, kuid seekord tsentrifuugiti proove 5 minutit. DNA sademelt eemaldati etanool ning sellel lasti kuivada 37 °C juures. Sadestatud DNA lahustati autoklaavitud milliQ vees.

2.2.5. DNA restriksioon

pKS*rulABI* vektorist *rulABI* geenide viimiseks pSEVA vektorisse teostati mõlemale vektorile restriksioonireaktsioon. Selleks valmistati 20 µl restriksioonisegud, mis sisaldasid 1x *FastDigest* reaktsioonipuhvrit (Thermo Scientific), 5 U *NotI* restriктаasi ja lõigatavat DNA-d. Restriksioonisegud viidi mahuni 20 µl milliQ veega. Reaktsioonisegusid hoiti 25 minutit 37 °C termostaadis, kuid 15 minuti möödumisel lisati pSEVA vektorile juurde 1 U FastAP aluselist fosfataasi (Thermo Scientific), et vältida restriктаasiga avatud plasmidi kokku ligeerumist. Ensüümide *NotI* ja FastAP töö peatamiseks tõsteti proovid 5 minutiks 80 °C termostaati. Seejärel toimus restriksioonisegude sadestamine ning ligeerimisreaktsiooni teostamine (Materjal ja meetoodika 2.2.4 ja 2.2.6).

Varem kloneeritud plasmiidide kontrollimiseks teostati samasugused restriksioonireaktsioonid, kuid nendele FastAP töötlust ei tehtud. Plasmiidse DNA lõikust kontrolliti geelelektroforeesiga (Materjal ja meetoodika 2.2.3).

2.2.6. DNA ligeerimine

rulABI geenide ligeerimiseks pSEVA plasmidi viidi läbi ligaasireaktsioon. 20 µl ligaasisegu sisaldas peale ligeeritavate DNA-de 1x T4 ligaasipuhvrit (Thermo Scientific), 1 mM ATP-d ja 1 U T4 ligaasi (Thermo Scientific). Ligaasisegu viidi mahuni 20 µl milliQ veega. Reaktsioon toimus üleöö toatemperatuuril. Reaktsiooni lõpetamiseks hoiti segu 20 minutit 65 °C termostaadis, millele järgnes ligaasisegu sadestamine (Materjal ja meetodika 2.2.4). Sadestatud DNA lahustati milliQ vees ja elektroporatsiooni teel bakterirakkudesse.

2.2.7. Kloneerimine

Kloneerimiseks vajaliku DNA fragmendi ja kloneerimisvektori saamiseks töödeldi neid *NotI* restriктаasi (Thermo Scientific) ja pSEVA plasmidi FastAP aluselise fosfataasiga (Thermo Scientific) (Materjal ja meetodika 2.2.7). Õige suurusega DNA fragmendi kättesaamiseks teostati geelelektroforees. Agarosgeelis olev DNA fragmendi, milles sisaldus *rulABI* geenide järjestus, eraldati kasutades firma Macherey-Nagel „NucleoSpin Gel & PCR Clean-Up“ protokoll. Seejärel teostati ligeerimisreaktsioon, peale mida sadestati DNA, mis võeti üles milliQ vees. Ligeerimisproduktide paljundamiseks viidi need elektroporatsiooni teel *E. coli* DH5α tüvesse ja külvati selektiivsöötmele. Kloneerimise õigsuse kontrollimiseks teostati PCR

2.2.8. Elektroporatsiooni jaoks kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Elektroporatsiooni jaoks kompetentsete *E. coli* rakkude tegemiseks kasvatati tüve üleöö LB söötmes 37 °C loksutil. Seejärel tehti kultuurist 25-kordne lahjendus värskesse LB söötmesse ning kasvatati kuni kultuuri optiline tihedus jäi vahemikku $A_{580}=0,6-0,8$. Kõik rakud tsentrifugeeriti põhja toatemperatuuril 45 sekundi jooksul täispöoretel 12000 x g, kasutades „Eppendorf MiniSpin“ lauatsentrifuugi. Rakkude pealt eemaldati sööde, misjärel pesti neid kolm korda 1 ml 10% glütseroolis. Kogu töö käigus hoiti rakke pidevalt jääl. Kompetentsed rakud suspendeeriti 100 µl 10% glütseroolis.

Elektroporatsiooniks kompetentsete *P. putida* rakkude tegemiseks kasvatati tüve üleöö LB söötmes 30 °C loksutil. Üleöö kasvanud bakterikultuuri võeti 400 µl ning rakud tsentrifugeeriti põhja 45 sekundi jooksul täispöoretel 12000 x g kasutades „Eppendorf MiniSpin“ lauatsentrifuugi. Rakkude pealt eemaldati sööde ning rakke pesti kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosilahuses. Kompetentsed rakud suspendeeriti 300 µl 300 mM sahharoosilahuses.

Elektroporatsiooni jaoks segati omavahel kompetentsed rakud ja ~100 ng plasmiidset DNA-d. Saadud segu pipeteeriti elektroporatsiooniküvetti ning teostati elektroporatsioon kasutades „Bio-Rad MicroPulser“ elektroporaatorit pingel 2500 V. Elektroporatsiooni läbinud rakud suspendeeriti 1 ml LB vedelsöötmes ning kasvatati 2 tundi 37 °C (*E. coli*) või 30 °C (*P. putida*) loksutil, peale mida tsentrifuugiti rakud põhja, eemaldati enamuse söötmest ja allesjäänud ligikaudu 100 µl LB söötmes suspendeeritud rakud ning plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.9. Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmidi sisaldavat *E. coli* bakteritüve kasvatati üleöö 5 ml LB söötmes 37°C loksutil. Bakterite söötmest kättesaamiseks tsentrifuugiti kogu kultuur põhja 45 sekundi vältel täispöoretel (12000 x g) lauatsentrifuugiga „Eppendorf MiniSpin“. Rakkudest eraldati plasmiidne DNA järgides FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit protokoll.

2.2.10. Sekveneerimine

Kloneerimise tulemusena saadud konstruktide õigsuse kontrollimiseks teostati peale koloonia-PCR ja plasmiidse DNA eraldamisel saadud plasmiidide restriksioonianalüüsi ka DNA järjestuste kindlaks tegemiseks sekveneerimine. Esmalt teostati vastav PCR reaktsioon, misjärel töödeldi PCR produkte 1 U FastAP aluselise fosfataasiga ja 2,5 U *ExoI* nukleaasiga, et eemaldada PCR reaktsioonisegust allesjäänud praaimerid ja nukleotiidid. Reaktsioonisegu hoiti 30 minutit 37 °C juures ning ensüümide inaktiveerimiseks hoiti segu 15 minutit 80 °C juures.

Sekveneerimiseks valmistati proovid kasutades BigDye Terminator v3,1 Cycle Sequencing Kit-i (Applied Biosystems). 10 µl reaktsioonisegu sisaldas 1 µl töötluste läbinud PCR produkti, 0,7 µl BigDye premixi (BigDye PR-100 mix v3.1), 2 µl 5x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂) ning 1,6 pmol praaimerit (PS1 või PS2, tabel 2). Reaktsioonisegu viidi mahuni 10 µl milliQ veega. Reaktsioon viidi läbi PCR masinas (Eppendorf) ning etapid olid järgmised:

- 1) denaturatsioon 95 °C, 15 sekundit,
- 2) praaimerite seondumine 50 °C, 15 sekundit,
- 3) DNA süntees 60 °C, 45 sekundit.

Kõiki etappe korrati 30 korda.

Reaktsiooni läbinud proovid sadestati. Selleks lisati proovidele 2,5 µl 125 mM EDTA ja 30 µl -20 °C 96% etanooli, proove hoiti toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel tsentrifuugiti proove 15 minuti jooksul toatemperatuuril täispöoretel 12000 x g, kasutades firma „Eppendorf“

tseentrifuugi 5430. Tseentrifuugitud proovidel lasti kuivada, misjärel lisati 30 µl 75% etanooli ning tseentrifuugiti uuesti 10 minutit samadel pööretel. Viimast etappi korrati veel ühe korra. Tseentrifuugitud proovidel lasti täielikult kuivada ning need võeti üles 10 µl 70% formamiidis. Sekvencerimise teostas Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklabor ning saadud järjestusi analüüsiti esmalt BioEdit ja seejärel UniProt ClustalO ja BLAST programme kasutades.

2.2.11. UV-C kiirguse taluvuse määramine

Selleks et saada teada, kuidas UV kiirgus mõjutab bakteritüvede ellujäämist, määrati nende UV-taluvus erinevatel kiirgusdoosidel. Katses kasutatud tüvesid kasvatati üleöö glükoosi ja CAA-d sisaldavas M9 minimaalsöötmes. Tüvedest tehti kümnekordsed lahjendusteread 1 x M9 lahuses, mis külvati tilkkülvi meetodil 10 µl kaupa glükoosi sisaldavatele minimaaltassidele (vesiagarisse lisatud 10 x M9 (lõppkontsentratsioon söötmes 1 x M9), mikroelemendite lahus 2,5 ml/l ja glükoos lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Kuivanud tilkadega tasse kiiritati UV-C kiirgusega (254 nm) kasutades firma Capitol Scientific CX-2000 Crosslinker masinat kiirgusdoosidel 5, 10, 20 ja 30 J/m². Elusrakkude arvukuse määramiseks jäeti tassid kiiritamata. Tasse inkubeeriti 48 tundi 30 °C termostaadis, misjärel loendati tekkinud kolooniad. Kolooniate arvu põhjal arvutati elusrakkude hulk 1 ml-s kolooniaid moodustava ühikuna (*Colony Forming Unit*, CFU). Kiiritamisel ellujäänud rakkude osakaal arvutati CFU alusel protsentides, kasutades järgnevat valemit:

$$\text{ellujäänud rakkude osakaal} = \frac{\text{ellujäänud rakkude arv/ml}}{\text{elusrakkude arv/ml}} \times 100\%$$

2.2.12. *P. putida* ja *P. fluorescens* spontaansete rifampitsiini-resistentsete (Rif^R) mutantide tekkesageduse määramine Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga (fluktuatsiooni test)

Spontaansete mutantide tekkesageduse määramiseks eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes kasutati Rif^R/*rpoB* testsüsteemi. Selleks kasvatati tüvesid esmalt 6 tundi 30 °C loksutil (180 rpm) M9-glükoos-CAA minimaalsöötmes, kuni bakterirakud saavutasid hilise logaritmilise kasvufaasi. Peale seda tehti kultuuridest 10⁻⁵ lahjendus värskesse M9-glükoos-CAA söötmesse. Tehtud lahjendus jaotati 2,35 ml kaupa katseklaasidesse ning kultuure kasvatati 30 °C loksutil (180 rpm) 20 tundi. Seejärel plaaditi igast kultuurist 500 µl LB-Rif tassidele ning tasse inkubeeriti 30 °C juures. Tassidelt loendati tekkinud Rif^R kolooniad 24 ja 48 tunni möödudes, *P. fluorescens* PC20 tüvedega tassidelt ka 72 tunni möödudes, sest see tüvi kasvab aeglasemalt.

Tüvede üldise elumuse määramiseks tehti kultuuridest lahjendusteread 1 x M9 puhvrise, mis külvati tilkkülvi meetodil 10 µl kaupa LB tassidele. Tasse inkubeeriti 24 h toatemperatuuril, misjärel loendati neilt tekkinud kolooniad ning määrati elusrakkude CFU. Spontaanselt tekkinud Rif^R mutantide tekkesageduse määramiseks kasutati järgmist valemit:

$$\text{mutantide sagedus} = \frac{\text{mutantide arv/ml}}{\text{elusrakkude arv/ml}}$$

2.2.13. *P. putida* ja *P. fluorescens* UV kiirgusest tingitud rifampitsiini-resistentsete (Rif^R) mutantide tekkesageduse määramine Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga (fluktuatsiooni test)

UV kiirgusest tingitud mutantide tekkesageduse määramiseks kasutati Rif^R/*rpoB* testsüsteemi, võttes aluseks Ilmjärv *et al.* (2017) artikli. Katses uuritavaid tüvesid aereeriti üleöö 30 °C loksutil (180 rpm) M9-glükoos-CAA söötmes. Üleöö kasvanud kultuurist tehti 100-kordne lahjendus 20 ml värskesse söötmesse ning kasvatati loksutil, kuni kultuuri optiline tihedus jäi vahemikku 0,6-0,8 (OD₅₈₀). Seejärel valati 11 ml kultuuri steriilsele Petri tassile. Petri tassil olevaid rakke kiiritati UV-C kiirgusega doosil 5 J/m². Kiiritatud tassilt pipeteeriti kultuurid 1,6 ml kaupa katseklaasidesse, mida kasvatati üleöö 30 °C loksutil (180 rpm). Üleöö kasvanud kultuuri plaaditi olenevalt tüvest 100-500 µl LB-Rif tassidele, mida inkubeeriti 30 °C juures. Tassidelt loeti tekkinud Rif^R kolooniaid 24 ja 48 tunni möödudes, *P. fluorescens* PC20 tüvedel ka 72 tunni möödudes, sest see tüvi kasvab aeglasemalt.

Elusrakkude arvukuse määramiseks tehti kultuuridest lahjendusteread 1 x M9 puhvrise, mis külvati 10 µl kaupa tilkkülvi meetodil LB tassidele. LB tasse inkubeeriti 24 tundi toatemperatuuril, misjärel loendati neilt tekkinud kolooniad ning määrati elusrakkude CFU. UV kiirgusest tingitud mutatsioonide tekkesageduse määramiseks kasutati järgmist valemit:

$$\text{mutantide sagedus} = \frac{\text{mutantide arv/ml}}{\text{elusrakkude arv/ml}}$$

2.2.14. Statistiline analüüs

UV taluvuse ja mutatsioonisageduste analüüsimiseks kasutati Student T-testi andmehulkade statistilise erinevuse leidmiseks. Graafikute koostamiseks kasutati programmi Microsoft Excel.

2.3. Tulemused

Genoomi kuhjunud DNA kahjustuste üleelamiseks on nii prokarüootsetel kui ka eukarüootsetel rakkudel välja kujunenud spetsiaalsed DNA polümeraasid, mis suudavad DNA kahjustusi ülesünteesida, kui tavalised replikatiivsed polümeraasid hätta jäävad. DNA kahjustuste ülesüntees on tavaliselt vigaderohke ja tekitab mutatsioone. Üks hästi tuntud TLS polümeraas on *E. coli*'s kirjeldatud *umuDC* operoni kodeeritud DNA Pol V, mille ortoloog *rulAB* leiti kolme koopiana (2 kromosomaalselt ja 1 plasmiidil pG20) bakterist *P. fluorescens* PC20 (Ilmjärv *et al.*, 2017). Samas uuringus leiti, et kõik *rulAB* koopiad võiksid funktsioneerida kui DNA kahjustuste ülesünteesis osalev SOS DNA Pol V, sest võrreldes RulA ja RulB järjestusi *E. coli* DNA Pol V järjestustega, siis tüve PC20 RulA ja RulB sisaldavad kõiki Pol V domääne ning lisaks on olemas ka Pol V katalüütilise aktiivsuse jaoks vajalikud aminohappejäägid (v.a. RulB aminohape positsioonis 72) (Ilmjärv *et al.*, 2017). Sellest tulenevalt on selle bakalaureusetöö eesmärk välja selgitada, kas ja milline PC20 *rulAB* geenikoopia on funktsionaalne.

2.3.1. Spontaansete ja UV-C kiirgusest indutseeritud mutatsiooniprotsesside uurimiseks vajalike *rulAB* operone sisaldavate *P. putida* PaW85 tüvede ja *P. fluorescens* PC20 *rulAB* deletsioontüvede konstrueerimine

Selleks, et välja selgitada, kas keskkonnabakteril *P. fluorescens* PC20 leitud kolme *rulAB* geenikoopia seas võiks olla *E. coli* puhul hästi kirjeldatud vigaderohke DNA polümeraasile V omistatud funktsioone, otsustati uurida, kas *rulAB* geeniprodukt(id) osalevad DNA-d kahjustava UV-C kiirguse talumisel ning UV-C kiirgusega töötlemise järgses mutageneesis. Küsimusele vastuse leidmiseks konstrueeriti algselt plasmiidid, mis sisaldavad ühte PC20 päritoluga *rulAB* geenikoopiat. Laboris tehtud varasema töö käigus olid juba *rulAB2* ja *rulAB_{pG20}* geenid kloneeritud pSEVA testplasmiididesse (pSEVA*rulAB2* ja pSEVA*rulAB_{pG20}*, Materjal ja meetoodika tabel 1), seega selle töö käigus konstrueeriti kolmas, *rulAB1* gene sisaldav plasmiid pSEVA*rulAB1*. Selleks kloneeriti laboris olemasolevast plasmiidist pKS*rulAB1* *rulAB1* geenid pSEVA vektorisse, saades plasmidi pSEVA*rulAB1* (Materjal ja meetoodika tabel 1). Konstrukti õigsust kontrolliti nii polümeraasi ahelreaktsiooni, restriksioonianalüüsi kui ka sekvenceerimise teel. Nii plasmiidid, mis sisaldasid PC20-st pärit *rulAB* gene, kui ilma insertioonita pSEVA plasmiid viidi elektroporatsiooni teel labori mudelbakterisse mullabakter *P. putida* PaW85 ning saadi 4 katsetes kasutatavat tüve (Materjal ja meetoodika, tabel 1). Lisaks neljale plasmidi sisaldavale PaW85 tüvele võeti katsetesse ka algtüvi PaW85 ning positiivseteks kontrolltüvedeks PaW1 ja PaWrulAB, millel on TOL plasmidi pWW0 päritoluga *rulAB* geenid vastavalt pWW0 plasmiidil või bakteri kromosoomis.

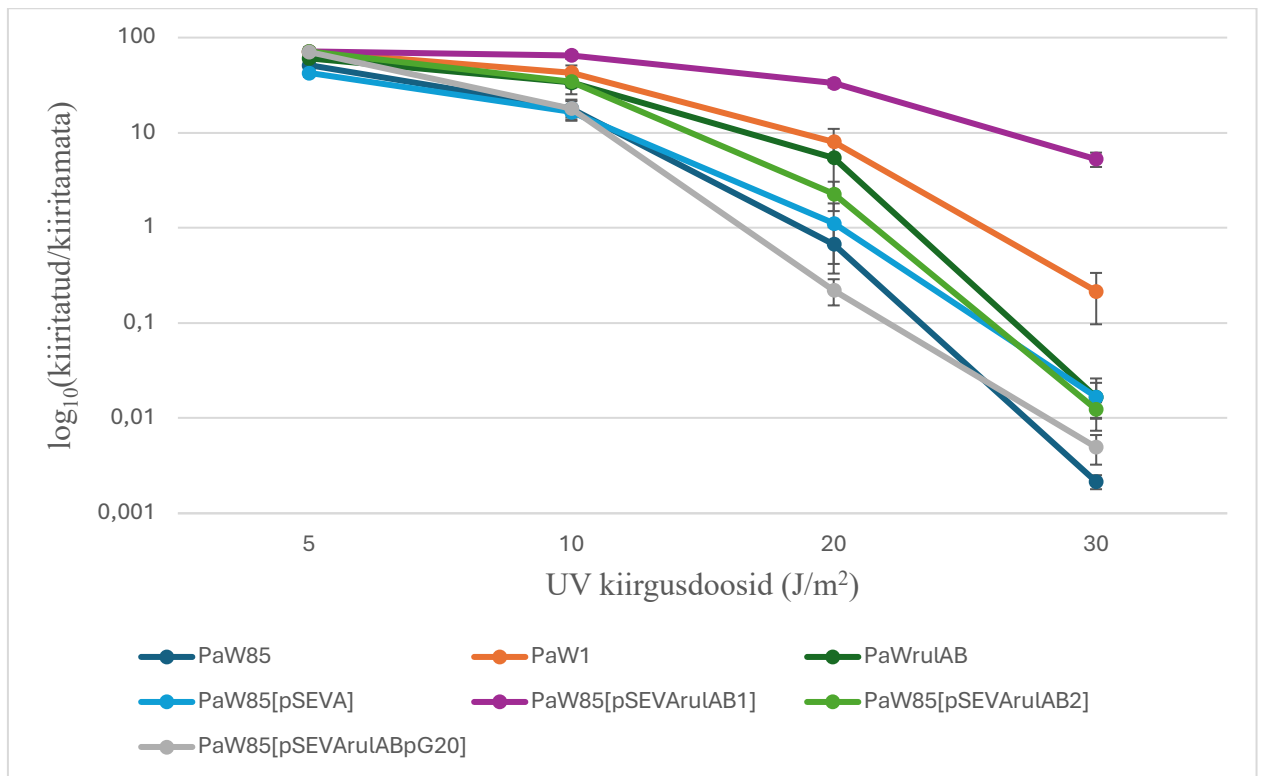
Tark *et al.* (2005) on näidanud, et PaW1 ja PaWrulAB tüvede *rulAB* geenid aitavad tüvedel tolereerida UV kiirgust ning vastutavad tüve UV mutageneesi eest.

Paralleelselt uuriti, kuidas *rulAB* geenide puudumine mõjutab *P. fluorescens* PC20 UV taluvust ja UV kiirgusest tingitud mutageneesi. Selleks konstrueeris Signe Saumaa PC20 deletsioontüved, kust eemaldati *rulAB* geenid ühe kaupa ning ka mitmekesi koos (Materjal ja meetoodika tabel 1). PC20 deletsioontüvesid on kokku seitse, kuid katseid jõuti teha vaid nelja tüvega: $\Delta rulAB1$, $\Delta rulAB2$, $\Delta rulAB_{pG20}$ ja $\Delta rulAB1\Delta rulAB2$. Lisaks neljale konstrueeritud tüvele võeti katsetesse ka algtüvi *P. fluorescens* PC20.

2.3.2. *P. fluorescens* PC20 *rulAB* operonide mõju UV-C kiirguse taluvusele

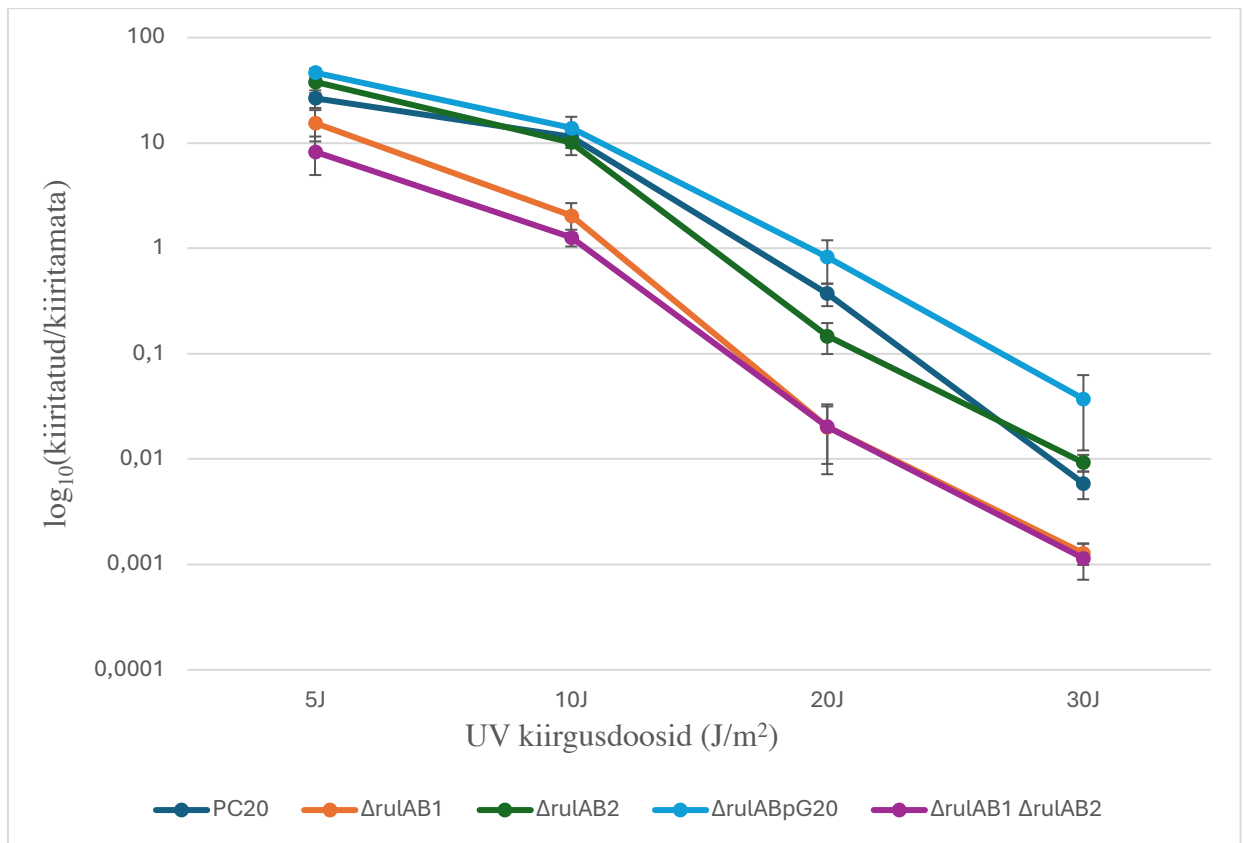
Selleks et uurida, milline mõju on *P. fluorescens* tüve PC20 *rulAB* geenidel tüvede UV-C kiirguse taluvumisele, viidi läbi UV-C kiirguse talvuskatsed (Materjal ja meetoodika 2.2.11). UV taluvuse eksperimendi tulemuste analüüsimisel võib väita, et inserdita pSEVA plasmidi viimine tüvesse PaW85 ei muuda tüve UV taluvust ning erinevus PaW85 ja PaW85[pSEVA] tüvede vahel ei ole ühelgi rakendatud kiirgusdoosil statistiliselt oluline (joonis 3). Siin ja edaspidi on tulemus statistiliselt oluline siis, kui p-väärtus on väiksem kui 0.05. Üllatavalt ei ole ka statistiliselt oluline erinevus elumuses positiivse kontrolltüve PaWrulAB ja PaW85 vahel, v.a. 30 J/m² kiirgusdoosi juures, kus PaWrulAB UV-C taluvus on PaW85 omast keskmiselt 8 korda suurem.

PC20 päritolu *rulAB* geenide viimisel plasmidi pSEVA koosseisus tüvesse PaW85 tõusis UV-C kiirguse taluvus statistiliselt olulisel määral vaid *rulAB1* (PaW85[pSEVA*rulAB1*]) kuid mitte *rulAB2* ja *rulAB_{pG20}* (PaW85[pSEVA*rulAB2*] ja PaW85[pSEVA*rulAB_{pG20}*]) puhul võrreldes PaW85[pSEVA] tüvega (joonis 3). *rulAB1* mõju tuleb välja 20 J/m² kiirgusdoosi juures, kus tüve PaW85[pSEVA*rulAB1*] UV taluvus on umbes 30 korda suurem kui tüvel PaW85[pSEVA], kuid eriti drastiline on erinevus 30 J/m² kiirgusdoosi juures, kus PaW85[pSEVA*rulAB1*] UV taluvus on peaaegu 315 korda kõrgem, kui tüvel PaW85[pSEVA]. Tulemused on kokku võetud joonisel 3.



Joonis 3. *P. putida* algtüve PaW85, kontrolltüvede PaW1, PaWrulAB ja plasmiididega pSEVA, pSEVArulAB1, pSEVArulAB2, pSEVArulAB_{pG20} PaW85 tüvede UV taluvuskatsete tulemused doosidel 5, 10, 20, 30 J/m². Joonisel on esitatud vähemalt 50 sõltumatu paralleelkatse tulemused ning standardviga. UV taluvus on arvatatud protsentides ning esitatud logaritmilisel skaalal.

rulAB1 operoni olulisus UV-C kiirguse taluvuse juures on nähtav ka *P. fluorescens* PC20 deletsioontüvedega teostatud UV-C taluvuse eksperimentidel (joonis 4). *P. fluorescens* PC20 tüvedel, millel on puudu *rulAB1* operon (Δ *rulAB1* ja Δ *rulAB1* Δ *rulAB2*), erinevad UV-C taluvuse poolest statistiliselt olulisel määral algtüvest PC20 kiirgusdoosidel 10, 20 ja 30 J/m². PC20 Δ *rulAB2* ja PC20 Δ *rulAB*_{pG20} tüvedel statistiliselt olulist erinevust ei ole võrreldes PC20 algtüvega. Kiiritades PC20 Δ *rulAB1* tüve kiirgusdoosil 10 J/m² on selle UV-C taluvus 5,5 korda väiksem kui algtüvel PC20 ning Δ *rulAB1* Δ *rulAB2* UV-C taluvus on 9 korda väiksem kui algtüvel PC20. 20 J/m² ja 30 J/m² kiiritades on mõlematel tüvedel (Δ *rulAB1* ja Δ *rulAB1* Δ *rulAB2*) sarnaselt UV taluvus vastavalt 18 ja 5 korda väiksem kui algtüvel PC20. Tulemused on võetud kokku joonisel 4.



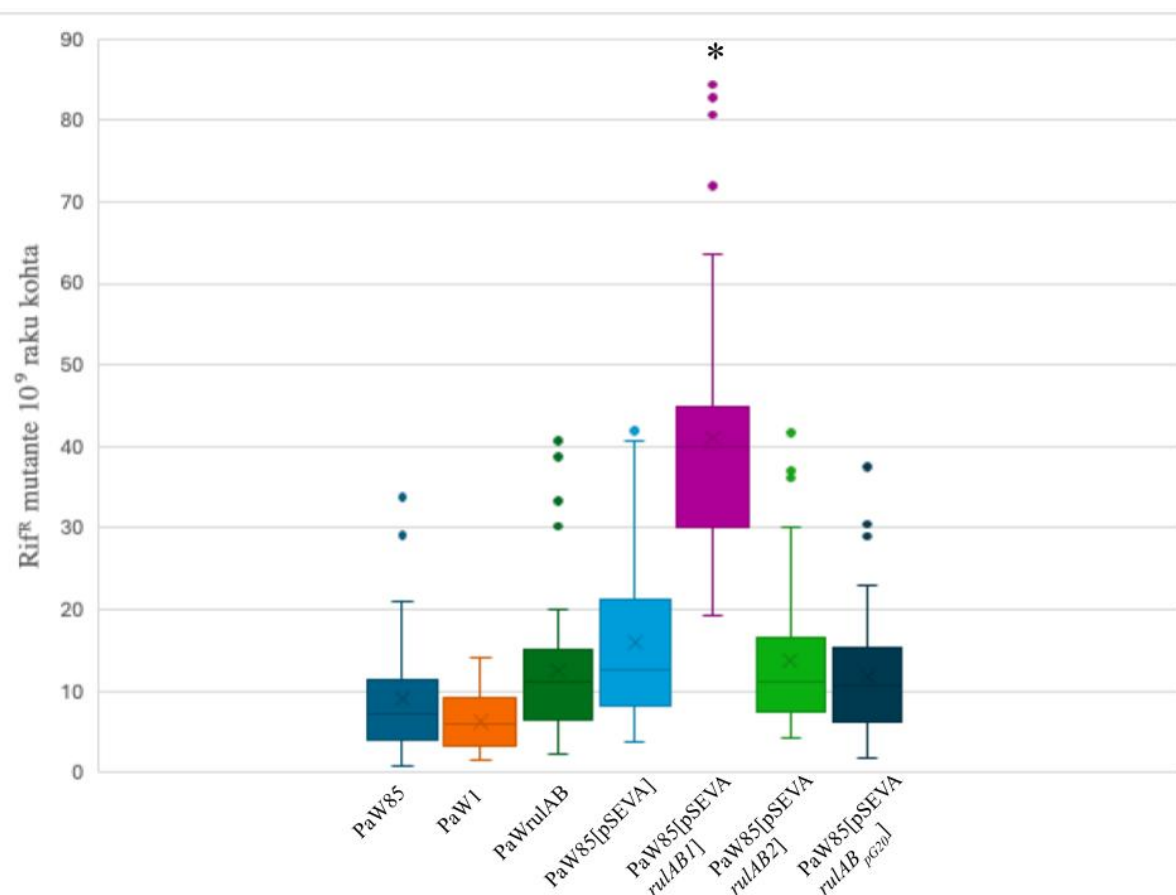
Joonis 4. *P. fluorescens* PC20 ja PC20 *rulAB* deletsioontüvede PC20 Δ *rulAB1* (Δ *rulAB1*), PC20 Δ *rulAB2* (Δ *rulAB2*), PC20 Δ *rulABpG20* (Δ *rulABpG20*) ja PC20 Δ *rulAB1* Δ *rulAB2* (Δ *rulAB1* Δ *rulAB2*) UV-C taluvuskatsete tulemused. Joonisel on esitatud vähemalt 12 sõltumatu paralleelkatse tulemused ning standardviga. UV-C taluvus on arvatatud protsentides ning esitatud logaritmilisel skaalal.

2.3.3. *P. fluorescens* PC20 *rulAB* operonide mõju eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude mutantide tekkesagedusele

Selleks, et uurida, kuidas *P. fluorescens* tüve PC20 *rulAB* geenid mõjutavad eksponentsiaalses kasvufaasis olevate bakterirakkude spontaanselt tekkivate mutantide tekkesagedust, kasutati Rif^R/*rpoB* testsüsteemi (Materjal ja meetodika 2.2.12). Rif^R/*rpoB* on letaalne testsüsteem ehk rifampitsiini sisaldaval LB tardsöötmeel moodustavad kolooniaid vaid need bakterid, millede genoomis on *rpoB* geen enne plaatimist muteerunud. Antud katses loendati rifampitsiini resistentseid *P. putida* kolooniaid 24 ja 48 tundi peale plaatimist ning *P. fluorescens* tüvede kolooniaid ka 72 tundi peale plaatimist, sest need tüved kasvavad aeglasemalt. Rif^R mutantide tekkesagedus arvutati üldise elusrakkude hulga kohta.

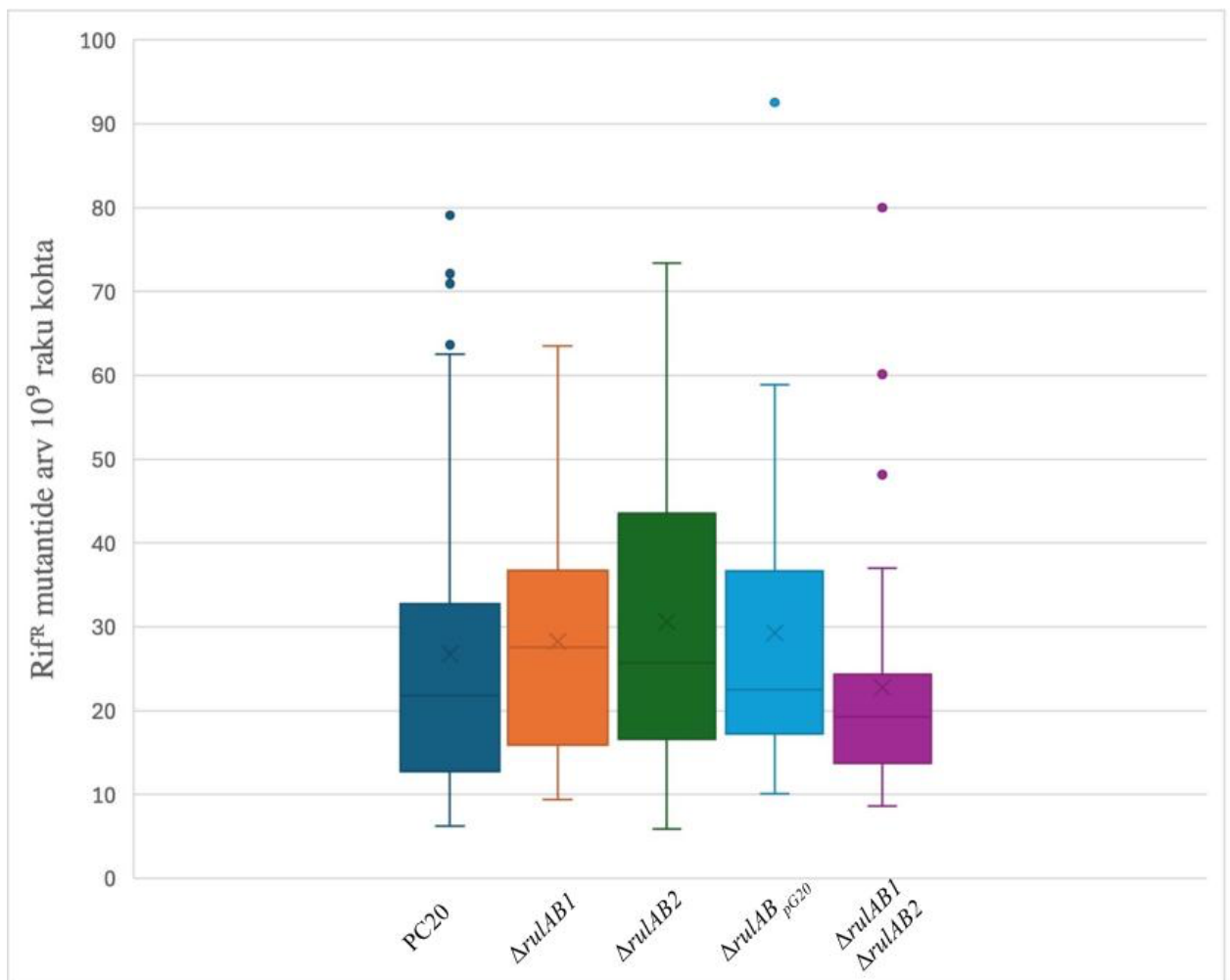
Katses analüüsitud testplasmiidi kontrolltüvel PaW85[pSEVA] erineb spontaanne Rif^R mutantide tekkesagedus statistiliselt olulisel määral PaW85 tüves saadud tulemusest ning see erinevus on 1,75-kordne. Kui võrrelda PaW85[pSEVA] tulemusi PaW85[pSEVA*rulAB1*], PaW85[pSEVA*rulAB2*] ja PaW85[pSEVA*rulABpG20*] tulemustega, siis spontaansete Rif^R

mutantide tekkesageduse poolest erineb statistiliselt olulisel määral PaW85[pSEVA] tüvest vaid PaW85[pSEVArulABI] (joonis 5). Joonisel 5 on näha, et PaW85[pSEVArulABI] spontaanste Rif^R mutantide tekkesagedus on teiste eksperimendis osalenud tüvedega võrreldes eriti kõrge ning erinevus tüvega PaW85[pSEVA] on 2,6- ja algtüvega PaW85 on 4,5-kordne. Tulemused on võetud kokku joonisel 5.



Joonis 5. Spontaanste Rif^R mutantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes võrdluses algtüvi PaW85, kontrolltüved PaW1 ja PaWrulAB ning PaW85 tüved plasmiididega pSEVA, pSEVArulABI, pSEVArulAB2, pSEVArulAB_{pG20}. Joonisel on esitatud vähemalt 3 sõltumatu katse tulemused ehk iga tüve kohta vähemalt 30 tassi, kus rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning kasti sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk “väljalöögid” on esitatud punktadena, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Tulemusi analüüsiti kasutades Student T-testi, * tähistab p-väärtust <0.05.

P. fluorescens PC20 *rulAB* deletsioontüvede spontaanste Rif^R mutantide tekkesagedustes võrreldes algtüvega PC20 statistiliselt olulist erinevust ei ole. *P. fluorescens* tüve PC20 spontaanste Rif^R mutantide tekkesagedus on keskmiselt 3 korda kõrgem kui *P. putida* tüvel PaW85. Tulemused on võetud kokku joonisel 6.



Joonis 6. Spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes võrdluses algtüvi PC20 ja PC20 *rulAB* deletsioontüved PC20 Δ *rulAB1* (Δ *rulAB1*), PC20 Δ *rulAB2* (Δ *rulAB2*), PC20 Δ *rulAB*_{pG20} (Δ *rulAB*_{pG20}) ja PC20 Δ *rulAB1* Δ *rulAB2* (Δ *rulAB1* Δ *rulAB2*). Joonisel on esitatud vähemalt 3 sõltumatu katse tulemused ehk iga tüve kohta vähemalt 30 tassi, kus rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning kasti sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk “väljalöögid” on esitatud punktidenä, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Tulemusi analüüsiti kasutades Student T-testi,

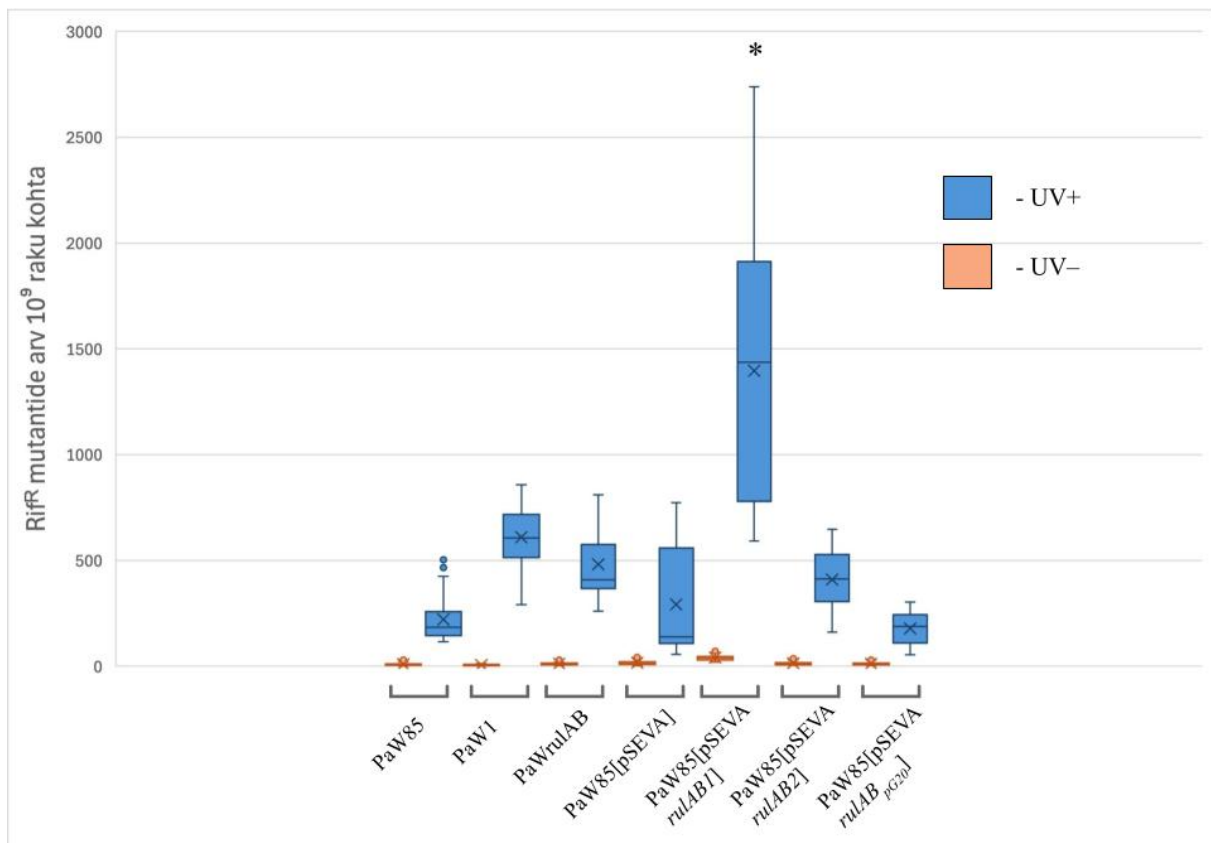
2.3.4. *P. fluorescens* PC20 *rulAB* operonide mõju UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedusele mutatsioonisagedusele eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes

Selleks, et uurida, kuidas *P. fluorescens* tüve PC20 *rulAB* geenid mõjutavad eksponentsiaalses kasvufaasis olevate rakkude UV-C kiirgusest tingitud mutatsioonide tekkesagedust, kasutati juba eelnevalt kirjeldatud Rif^R/*rpoB* testsüsteemi (Materjal ja meetodika 2.2.13). Saadud UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedusi võrreldi spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedusega, mis joonistel on nii-öelda kiiritamata kontrolltüvedeks (UV-) (joonised 7 ja 8). UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesageduse määramise eksperiment teostati UV kiirgusdoosil 5 J/m^2 , sest Ilmjärv *et al.* (2017) tulemustest oli näha, et standardne UV

mutageneesi eksperimentides rakendatav UV-C doos 100 J/m^2 oli *P. fluorescens* PC20 tüvele väga raskesti talutav. Sellel kiirgusdoosil ilmnes ka Ilmjärv *et al.* (2017) artiklis kõikide tüvede puhul UV mutageneesi fenotüüp.

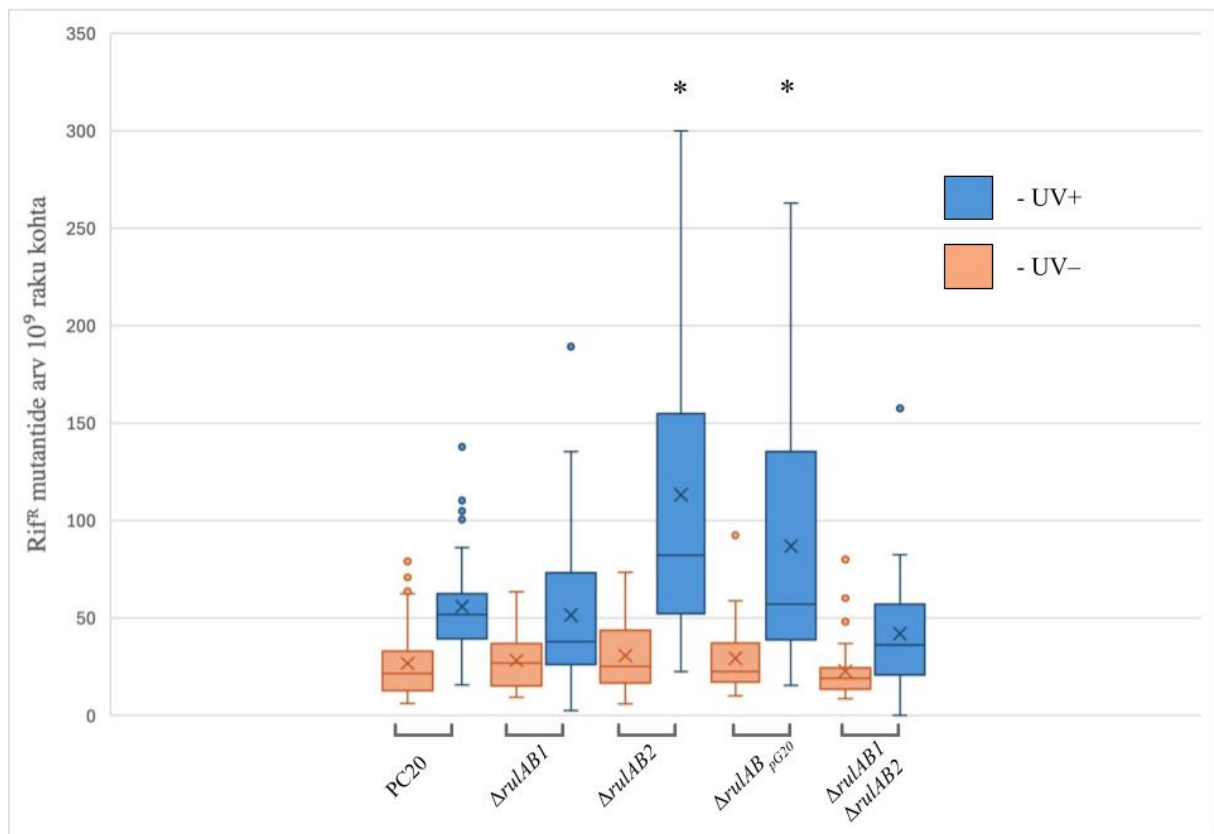
Joonistel 7 ja 8 on näha, et, rakendatud UV-C doosi juures (5 J/m^2) on samuti kõikidel tüvedel UV-C kiirgusest tingitud mutageneesi fenotüüp selgelt tuvastatav, ka *P. putida* PaW85 ja PaW85[pSEVA] tüvedel, millel *rulAB* geenid puuduvad.

Rakendatud 5 J/m^2 UV-C kiirgusdoosil on statistiliselt oluline erinevus ainult tüvede PaW85[pSEVA*rulABI*] ja PaW85[pSEVA] UV-C kiirgusest tingitud Rif^R mutantide tekkesageduses, kus PaW85[pSEVA*rulABI*] UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedus on peaaegu 5 korda kõrgem kui tüvel PaW85[pSEVA]. Statistiliselt olulist erinevust Rif^R mutantide tekkesageduses tüvede PaW85[pSEVA*rulAB2*] ja PaW85[pSEVA] ning PaW85[pSEVA*rulAB_{pG20}*] ja PaW85[pSEVA] vahel ei ole. Võrreldes PaW85[pSEVA*rulABI*] spontaansete ja UV-C kiirgusest indutseeritud Rif^R mutantide tekkesagedusi, oli tüve UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedus 34 korda kõrgem kui sama tüve spontaansete mutantide tekkesagedus. PaW85[pSEVA*rulAB2*] ja PaW85[pSEVA*rulAB_{pG20}*] tüvedel on UV-C kiirgusest indutseeritud Rif^R mutantide tekkesagedus vastavalt 30 ja 15 korda kõrgem, kui samade tüvede spontaanne Rif^R mutantide tekkesagedus.



Joonis 7. Spontaansed (oranž kast) ja UV-C kiirgusest (5 J/m^2 , sinine kast) tingitud Rif^R mutantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes võrdluses algtüvi PaW85, kontrolltüved PaW1, PaWrulAB ning PaW85 tüved plasmiididega pSEVA, pSEVArulAB1, pSEVArulAB2 ja pSEVArulAB_{PC20}. Joonisel on esitatud vähemalt 5 sõltumatu katse tulemused ehk iga tüve kohta vähemalt 25 tassi, kus rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning kasti sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Kiiritatud tüvede omavaheliseks analüüsiks kasutati Student T-testi, * tähistab p-väärtust <0.05 .

Ka *P. fluorescens* PC20 *rulAB* deletsioontüvede uurimisel ilmneb *rulAB1* geenide olulisus PC20 DNA kahjustuste ülesünteesis. *rulAB1* operoni olemasolul (tüved Δ *rulAB2* ja Δ *rulABpG20*) on tüve UV-C kiirgusest tingitud Rif^R mutantide tekkesageduse erinevus võrreldes PC20 algtüvega statistiliselt oluline, erinedes kiiritatud algtüve PC20 mutantide tekkesagedusest vastavalt 2 ja 1,5 korda. Kiiritatud tüvede Rif^R mutantide tekkesagedus võrreldes kiiritatud algtüvega PC20 ei ole statistiliselt oluline sellisel juhul, kui *rulAB1* geenid tüvest eemaldada (tüved Δ *rulAB1* ja Δ *rulAB1\Delta**rulAB2*). Tulemused on kokku võetud joonisel 8.



Joonis 8. Spontaansed (oranž kast) ja UV-C kiirgusest (5 J/m^2 , sinine kast) tingitud Rif^R mutantide tekkesagedus 1×10^9 elusraku kohta eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes võrdluses algtüvi PC20 ja PC20 *rulAB* deletsioontüved PC20 Δ *rulAB1* (Δ *rulAB1*), PC20 Δ *rulAB2* (Δ *rulAB2*), PC20 Δ *rulAB*_{pG20} (Δ *rulAB*_{pG20}) ja PC20 Δ *rulAB1* Δ *rulAB2* (Δ *rulAB1* Δ *rulAB2*). Joonisel on esitatud vähemalt 6 sõltumatu katse tulemused ehk iga tüve kohta vähemalt 30 tassi, kus rist näitab mutatsioonisageduse keskmist, kasti sisse mahub 50% tulemustest ning kasti sees olev horisontaalne joon tähistab mediaanväärtust, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri, võõrväärtused ehk “väljalöögid” on esitatud punktidena, kasti ülemine äär – ülemine kvartiil (75% tulemustest jääb selle alla), kasti alumine äär – alumine kvartiil (25% tulemustest jääb selle alla). Kiiritatud tüvede omavaheliseks analüüsiks kasutati Student T-testi, * tähistab p-väärtust <0.05.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada, kas ja milline *P. fluorescens* PC20 leiduv *rulAB* geenide koopia võiks olla funktsionaalne ehk millise operoni produkt võiks osaleda UV kiirguse tekitatud DNA kahjustuste ülesünteesil. Ilmjärv *et al.* (2017) uuringus, kus analüüsiti nii *rulAB* kui ka *imuC* geenide sekveneerimisandmeid ning vaadeldi nende geenide ekspressioonitaset vastusena DNA-d kahjustavale ühendile mitomütsiin C, järeldati, et kõik PC20 tüvest leitud *rulAB* geenid võiksid olla funktsionaalsed, kuid täpsemaid katseid nendega toona edasi ei tehtud. Antud töö eesmärgi saavutamiseks amplifitseeriti PC20 genoomist ja plasmiidist pG20 vastavad *rulAB* geenid ning kioneeriti igaüks eraldi pSEVA testplasmidi. Plasmiidid pSEV*rulAB1*, pSEV*rulAB2* ja pSEV*rulAB*_{pG20} viidi labori mudelbakterisse mullabakter

Pseudomonas putida tüvesse PaW85. Samuti tehti PC20 tüvest deletsioontüved ehk eemaldati seal leiduvad *rulAB* geenid ühekaupa ja mitmekesi koos. Kõikide bakteritüvede, nii plasmiididega *P. putida* PaW85 kui ka konstrueeritud PC20 deletsioontüvedel, määrati UV taluvus. Samuti määrati kõikide töös kasutatud tüvede puhul nii spontaansete kui UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedused, kasutades selleks Rif^R/*rpoB* testsüsteemi.

Eelnevalt mainitud eksperimendid sooritati sellepärast, et töö käigus uuritav *rulAB* operon, mis on *E. coli umuDC* ortoloog, kodeerib vigaderohket DNA polümeraasi V. Keskkonnabakterite (nagu *P. fluorescens*) elukeskkond on muutlik ning neil tekib erinevate tegurite, nt. UV kiirguse tõttu palju DNA kahjustusi (Pfeifer, 1997). UV kiirgusest tekkinud DNA kahjustuste parandamiseks on bakteritel erinevad DNA reparatsioonisüsteemid, kuid kui kahjustusi on väga palju, ei jõuta neid enne replikatsiooni ära parandada (Fujii ja Fuchs, 2020). Kui replikatiivne DNA polümeraas üritab kahjustusega DNA-d replitseerida, tekib üheaahelaline DNA, mis kutsub rakkudes esile SOS vastuse, mille käigus indutseeritakse erinevate TLS DNA polümeraaside ekspressioon (Fujii ja Fuchs, 2020; Neidhardt, 1996). DNA Pol V ekspressioon indutseeritakse kõige viimasena, kui kõik teised DNA reparatsioonimeetmed on ebaõnnestunud, sest selle läbiviidav replikatsioon on vigaderohke ning võib tekitada mutatsioone (Janion, 2008).

Mudelbakterina eksperimentide läbiviimisel kasutati *P. putida* tüve PaW85, mis on saadud PaW1 tüvest TOL plasmidi eemaldamisel, mistõttu PaW85-l *rulAB* geene ei ole (Bayley *et al.*, 1977). TOL plasmiid koos *rulAB* geenidega on aga olemas kontrolltüvena kasutatud PaW1 tüvel, mille puhul on näidatud *rulAB* geenidest sõltuvat UV talumist ning UV kiirgusest tingitud mutageneesi olemasolu (Tark *et al.*, 2005). Tark *et al.* (2005) konstrueerisid ka teise kontrolltüve PaWrulAB, kui TOL plasmiidil olevad *rulAB* geenid viidi *P. putida* PaW85 kromosoomi. Kuigi tolles uuringus kasutati UV taluvuse ja UV kiirguse indutseeritud mutageneesi uurimisel teisi UV-C kiirgusdoose (vastavalt 50 ja 100 J/m²), leiti, et PaW1 tüvi talub UV kiirgust 1,3 korda paremini kui PaWrulAB ning PaW1 UV kiirgusest tingitud Rif^R mutantide tekkesagedus on kõrgem kui PaWrulAB tüvel. Sama tendents ilmneb ka käesoleva bakalaureuse töö käigus.

Nii PaW85 tüvedega, milledes olid pSEVA plasmidi koosseisus eraldi kolme *P. fluorescens* PC20 *rulAB* geenid, kui ka PC20 deletsioontüvedega tehtud UV taluvuse katsetest selgub *rulABI* geenide osalus UV kiirguse tekitatud DNA kahjustuste ülesünteesil, sest tüve PaW85[pSEVArulABI] UV taluvus on UV-C kiirgusdoosidel 20 ja 30 J/m² vastavalt 30 ja 315

korda kõrgem võrreldes tüvega PaW85[pSEVA] (joonis 3) ning *rulABI* geeni eemaldamisel tüvest PC20 (tüved $\Delta*rulABI*$ ja $\Delta*rulABI*\Delta*rulAB2*$) muutub tüvi palju tundlikumaks UV-C kiirguse suhtes. *rulAB2* ja *rulAB_{pG20}* geenide osalust UV kiirguse talumise juures märgata ei ole ning tüvede PaW85[pSEVA*rulAB2*] ja PaW85[pSEVA*rulAB_{pG20}*] UV-C kiirguse taluvus ei erine statistiliselt olulisel määral tüve PaW85[pSEVA] UV-C kiirguse talumise tulemustest. Tüve PC20 puhul ei tule samuti *rulAB2* ja *rulAB_{pG20}* geenide osalus UV talumise juures välja, sest tüvede PC20 $\Delta*rulABI*$ ja PC20 $\Delta*rulABI*\Delta*rulAB2*$ vahel statistiliselt olulist erinevust ühelgi kasutatud UV-C kiirgusdoosil ei ole. Üleüldiselt on PaW85 UV taluvus umbes 2 korda parem kui tüvel PC20 ning PC20 talub UV kiirgust üsna kehvasti, vaatamata tema genoomist leitud kolmele *rulAB* operonile ja *imuABC* operonile. Siiski, PC20 *rulAB* geenide klonereimisel pSEVA plasmidi ning seejärel need PaW85 tüvesse viies tõuseb PaW85 UV taluvus, mis võib viidata sellele, et erinevates bakteritüvedes on UV kahjustusele vastuse genereerimisel erinevad mehhanismid.

rulABI operoni osalust UV kiirguse talumisel on näha läbiviidud UV-C kiirgusest indutseeritud Rif^R mutantide tekkesageduse hindamise eksperimendis, kus katses osalevaid tüvesid töödeldi UV-C kiirgusega doosil 5 J/m². *rulABI* geenide olemasolul on UV kiirgusest tingitud Rif^R mutantide tekkesagedus PaW85[pSEVA*rulABI*] tüvel umbes 5 korda kõrgem kui see on PaW85[pSEVA] kiiritatud tüvel. Kuid PaW85[pSEVA*rulABI*] tüvel on ka spontaanne Rif^R mutantide tekkesagedus kõrgem kui teistel töös uuritud tüvedel, millest tulenevalt on PaW85[pSEVA*rulABI*] UV kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedus 34 korda kõrgem võrreldes sama tüve spontaansete mutantide tekkesagedusega. Kontrolltüvel PaW1 on UV kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedus peaaegu 100 korda kõrgem kui sama tüve spontaansete mutantide tekkesagedus. PaW85[pSEVA*rulABI*] kõrgem spontaansete mutantide tekkesagedus võib olla tingitud sellest, et *rulABI* geenide basaalne ekspressioonitase tüves PC20 on suhteliselt kõrgem võrreldes teiste PC20 *rulAB* geenidega ja PaW1 *rulAB* geenidega (Ilmjärv *et al.*, 2017). *rulABI* operoni tähtsust on näha ka PC20 $\Delta*rulAB2*$ ja PC20 $\Delta*rulAB_{pG20}*$ tüvede puhul, millel on keskmiselt umbes 2,2 korda kõrgem UV-C kiirgusest tingitud Rif^R mutantide tekkesagedus (joonis 8) võrreldes kiiritatud tüvedega PC20 $\Delta*rulABI*$ ja PC20 $\Delta*rulABI*\Delta*rulAB2*$. *rulAB2* ja *rulAB_{pG20}* operonide osalust UV kiirgusest indutseeritud mutageneesis ei ole märgata nii PaW85 tüvede kui PC20 deletsioontüvede puhul, sest nende tüvedega UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesageduse eksperimentide tulemused ei erine statistiliselt olulisel määral oma algtüvedega sooritatud eksperimentide tulemustest. PC20 $\Delta*rulABI*$ ja PC20 $\Delta*rulABI*\Delta*rulAB2*$ tüvede UV-C kiirguse tekitatud Rif^R mutantide tekkesagedus on sarnane, mis viitab ka pigem *rulABI* osalusele UV mutageneesis.

Võttes kokku kõik eelnevalt mainitud andmed, võib väita, et *P. fluorescens* PC20 tüves leidub üks funktsionaalne *rulAB* operon, *rulAB1*, mille produkt võiks osaleda DNA kahjustuste ülesünteesil, mis toimub siis, kui teised DNA reparatsioonüsteemid ei ole DNA kahjustuste parandamisega hakkama saanud, ning vastutada tüve UV-C kiirguse taluvuse ja UV-C kiirgusest tingitud mutageneesi eest. Kuigi tüvel PC20 on genoomis kolm koopiat *rulAB* geene, talub PC20 ise halvasti UV-C kiirgust, mis võib olla selgitatav *P. putida* ja *P. fluorescens* tüvede erineva vastusega UV-C kiirgusest tingitud DNA kahjustustele. *rulAB2* ja *rulAB_{pG20}* operonide olulisus antud katsetes ja antud tingimustel välja ei tulnud, kuid kuna ka nende geenide ekspressioon on PC20 tüves DNA kahjustustega indutseeritav, võib siin küsimus olla pigem katsetingimustes. *P. fluorescens* PC20 *rulAB* operonide täpsemaks uurimiseks on vaja katseid korrata kaasates nendesse ka teised PC20 *rulAB* deletsioontüved PC20 Δ *rulAB1* Δ *rulAB_{pG20}*, PC20 Δ *rulAB2* Δ *rulAB_{pG20}* ja PC20 Δ *rulAB1* Δ *rulAB2* Δ *rulAB_{pG20}*, millega antud bakalaureusetöö raames katseid teha ei jõutud. Samuti oleks vaja edaspidi uurida *P. fluorescens* tüve PC20 DNA kahjustustest indutseeritud *imuABC* operoni osalust erinevate DNA kahjustuste talumisel ja mutageneesis.

KOKKUVÕTE

Keskkonnabakteri *Pseudomonas fluorescens* PC20 sekveneerimisandmete analüüsil on varasemalt kindlaks tehtud, et tüve genoomis on kolm koopiat *rulAB* gene. *rulAB* gene on tuvastatud ka teistes *Pseudomonas* perekonna liikidel, kus nende osalust on näidatud UV kiirguse talumisel. *rulAB* geenid kodeerivad vigaderohket DNA polümeraasi V, mis on üks viimastest TLS polümeraasidest, mis võetakse SOS vastuse tulemusena rakkudes kasutusele, kui neis on palju DNA kahjustusi. DNA Pol V läbiviidav replikatsioon ei pruugi olla täpne, sest sellel puudub 3'-5' eksonukleasne aktiivsus ning replikatsiooni käigus tekkinud vead salvestuvad mutatsioonidena.

Käesoleva töö praktilises osas uuriti *P. fluorescens* tüve PC20 *rulAB* geenide funktsionaalsust, konstrueerides selleks varasemast olemasolevatele plasmiididele lisaks puuduoleva plasmiidse konstrukti, mis kõik sisaldavad ühte PC20 *rulAB* operoni. Plasmiidid on igaüks eraldi viidud mudelbakteri *P. putida* tüvesse PaW85. Lisaks kasutati *P. fluorescens* PC20 tüvesid, millelt oli eemaldatud kõik kolm *rulAB* operoni ühekaupa või mõlemad kromosomaalsed *rulAB* operonid. Kõikide mainitud *P. putida* PaW85 ja *P. fluorescens* PC20 tüvedega sooritati sarnased UV-C kiirguse taluvuskatsed ning määrati tüvede spontaansete ja UV-C kiirgusest tingitud mutantide tekkesagedused. Mutantide tekkesageduse määramiseks kasutati Rif^R/*rpoB* testsüsteemi.

Käesoleva töö tulemused saab kokku võtta järgnevalt:

1. Konstrueeriti puuduolev pSEVArulABI plasmiid kloneerides *P. fluorescens* PC20 *rulABI* geenid pSEVA plasmidi.
2. *rulAB* gene sisaldavate *P. putida* PaW85 tüvede ning PC20 *rulAB* deletsioontüvedega tehti UV taluvuskatsed ja UV kiirgusest tingitud mutageneesi katsed. UV kiirgusest tingitud mutageneesi katsed teostati UV-C kiirgusdoosiga 5 J/m². Sellel doosil oli kõikidel uuritud tüvedel olemas UV mutageneesi fenotüüp.
3. UV taluvuse eksperimentides kasutatud UV-C kiirgusdooside (5, 10, 20, 30 J/m²) puhul eristus selgelt tüvi PaW85[pSEVArulABI], mis talus UV-C kiirgust doosidel 20 J/m² ja 30 J/m² vastavalt 30 ja 315 korda paremini kui PaW85[pSEVA] samadel doosidel. Tüvede PaW85[pSEVArulAB2] ja PaW85[pSEVArulAB_{pG20}] puhul erinevused PaW85[pSEVA] tüvega puudusid kõikidel kiirgusdoosidel.

4. Tüvede PC20 $\Delta rulAB1$ ja $\Delta rulAB1\Delta rulAB2$ UV taluvus oli kiirgusdoosidel 20 J/m² ja 30 J/m² sarnaselt vastavalt 18 ja 5 korda madalam kui algtüve PC20 UV taluvus. Tüvede $\Delta rulAB2$ ja $\Delta rulAB_{pG20}$ UV taluvus jäi algtüvega PC20 samale tasemele.
5. Uurides tüvede 5 J/m² UV-C kiirguse tekitatud Rif^R mutantide tekkesagedust selgus, et tüve PaW85[pSEVArulAB1] Rif^R mutantide tekkesagedus oli kiiritatud rakkudel 5 korda kõrgem kui kiiritatud PaW85[pSEVA] tüvel. Tüvede PaW85[pSEVArulAB2] ja PaW85[pSEVArulAB_{pG20}] puhul on UV kiirgusest tingitud Rif^R mutantide tekkesagedus sarnane PaW85[pSEVA] tüvega.
6. *P. fluorescens* PC20 $\Delta rulAB2$ ja $\Delta rulAB_{pG20}$ tüvedel, millel on *rulAB1* geenid olemas, on UV-C kiirgusest tekitatud Rif^R mutantide tekkesagedus keskmiselt 2,2 korda kõrgem kui PC20 $\Delta rulAB1$ ja $\Delta rulAB1\Delta rulAB2$ tüvedel, millel *rulAB1* geenid puuduvad. PC20 $\Delta rulAB1$ ja $\Delta rulAB1\Delta rulAB2$ tüvede UV kiirgusest indutseeritud mutantide tekkesagedus on sarnane algtüvega PC20.
7. Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et vaadeldud kolme *P. fluorescens* PC20 tüve *rulAB* operonist võiks kromosomaalselt kodeeritud *rulAB1* geenidel olla roll UV-C kiiritamis-järgsete DNA kahjustuste talumisel ja üleelamisel.

The role of *Pseudomonas fluorescens* PC20 *ruLAB* operons in the tolerance of UV and in UV-induced mutagenesis

SUMMARY

Marielle Suur

Bacteria have developed different DNA repair mechanisms to manage both endogenous and exogenous DNA damage. Increased amounts of DNA damage stops replication and specialized polymerases are needed to execute translesion DNA synthesis. Translesion synthesis polymerase V is used as a last resort to replicate damaged DNA because there is a good chance of mutations. In a previous study *Pseudomonas fluorescens* strain PC20 was isolated from water polluted with phenolic compounds in northeastern Estonia. Analysing the sequence of its genome, it was shown that PC20 has three copies of *ruLAB* genes, two in the chromosome and one on plasmid pG20. *ruLAB* codes a DNA Pol V ortholog.

In the practical part of this work I investigated the function of *P. fluorescens* PC20 *ruLAB* genes by constructing plasmids that each carry one of PC20 *ruLAB* genes. The plasmids were delivered into *P. putida* PaW85 cells. We also studied *P. fluorescens* PC20 strains that had one of its *ruLAB* genes deleted or both of its chromosomal *ruLAB* genes deleted. All of these constructed *P. putida* PaW85 and *P. fluorescens* PC20 strains were used in UV irradiation and UV mutagenesis experiments.

The results of this work can be summarized as follows:

1. We constructed the missing pSEVArulABI plasmid by cloning the *P. fluorescens* PC20 *ruLAB1* genes into a pSEVA plasmid.
2. *P. putida* PaW85 strains with plasmids containing PC20 *ruLAB* genes and PC20 *ruLAB* deletion strains were used in UV irradiation and UV mutagenesis experiments. UV mutagenesis experiments were performed at UV-C dose 5 J/m². At this dose all of the studies strains exhibited the UV mutagenesis phenotype.
3. UV irradiation was performed at UV-C doses 5, 10, 20 and 30 J/m². PaW85[pSEVArulABI] strain clearly stood out as compared to others. At dose 20 J/m² PaW85[pSEVArulABI] tolerated UV 30 times better than PaW85[pSEVA] and at dose 30 J/m² it tolerated UV 315 times better than PaW85[pSEVA]. The results of UV tolerance experiments conducted with strains PaW85[pSEVArulAB2] and

PaW85[pSEVArulAB_{pG20}] did not differ from the results obtained with PaW85[pSEVA] at any used dose.

4. UV tolerance of strains PC20 Δ rulAB1 and PC20 Δ rulAB1 Δ rulAB2 at dose 20 J/m² was 18 times lower than UV tolerance of PC20 and at dose 30 J/m² it was 5 times lower than that of PC20. UV tolerance of strains PC20 Δ rulAB2 and PC20 Δ rulAB_{pG20} did not differ from that of strain PC20.
5. UV-induced mutation rate of strain PaW85[pSEVArulAB1] was 5 times higher than that of PaW85[pSEVA]. UV-induced mutation rate of strains PaW85[pSEVArulAB2] and PaW85[pSEVArulAB_{pG20}] was similar to PaW85[pSEVA].
6. *P. fluorescens* PC20 strains PC20 Δ rulAB2 and PC20 Δ rulAB_{pG20} that have *rulAB1* genes had 2,2 times higher UV-induced mutation rate than strains PC20 Δ rulAB1 and PC20 Δ rulAB1 Δ rulAB2 that had its *rulAB1* genes deleted. UV-induced mutation rate of strains PC20 Δ rulAB1 and PC20 Δ rulAB1 Δ rulAB2 was similar to PC20.
7. From these results it can be concluded that *rulAB1* operon of *P. fluorescens* PC20 might be involved in UV induced DNA damage tolerance and survival.

KIRJANDUSE LOETELU

Abella, M., Erill, I., Jara, M., Mazón, G., Campoy, S. and Barbé, J. (2004). Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum. *Mol Microbiol*, *54*(1), 212–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04260.x>

Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers Inc. N. Y.

Al Mamun, A. A. M. and Humayun, M. Z. (2006). *Escherichia coli* DNA polymerase II can efficiently bypass 3,*N*⁴-ethenocytosine lesions in vitro and in vivo. *Mutat Res-Fund Mol M*, *593*(1–2), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.07.016>

Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G. and Broda, P. (1977). Two modes of loss of the *tol* function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet*, *154*(2), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF00330838>

Becker, M. M. and Wang, Z. (1989). Origin of ultraviolet damage in DNA. *J Mol Biol*, *210*(3), 429–438. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90120-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90120-4)

Blázquez, J., Rodríguez-Beltrán, J. and Matic, I. (2018). Antibiotic-Induced Genetic Variation: How It Arises and How It Can Be Prevented. *Annu Rev Microbiol*, *72*(1), 209–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062139>

Boshoff, H. I. M., Reed, M. B., Barry, C. E. and Mizrahi, V. (2003). DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, *113*(2), 183–193. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00270-8)

Boyce, R. P. and Howard-Flanders, P. (1964). Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12. *P Natl A Sci*, *51*(2), 293–300. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.2.293>

Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. and Pontén, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *P Natl Acad Sci USA*, *88*(22), 10124–10128. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10124>

Bridges, B. (1994). Starvation-associated mutation in *Escherichia coli*: A spontaneous lesion hypothesis for “directed” mutation. *Mut Res-Fund Mol M*, *307*(1), 149–156. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90287-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90287-9)

- Bruck, I., Woodgate, R., McEntee, K. and Goodman, M. F. (1996). Purification of a Soluble UmuD'C Complex from *Escherichia coli*: cooperative binding of UmuD'C to single-stranded DNA. *J Biol Chem*, *271*(18), 10767–10774. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10767>
- Burckhardt, S. E., Woodgate, R., Scheuermann, R. H. and Echols, H. (1988). UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA. *P Natl Acad Sci USA*, *85*(6), 1811–1815. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.6.1811>
- Butala, M., Žgur-Bertok, D. and Busby, S. J. W. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci*, *66*(1), 82–93. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8378-6>
- Cai, H., Yu, H., McEntee, K., Kunkel, T. A. and Goodman, M. F. (1995). Purification and Properties of Wild-type and Exonuclease-deficient DNA Polymerase II from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *270*(25), 15327–15335. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15327>
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. and 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)
- Carell, T. and Epple, R. (1998). Repair of UV Light Induced DNA Lesions: A Comparative Study with Model Compounds. *Eur J Org Chem*, *1998*(7), 1245–1258. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199807\)1998:7<1245::AID-EJOC1245>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199807)1998:7<1245::AID-EJOC1245>3.0.CO;2-8)
- Chang, D. J. and Cimprich, K. A. (2009). DNA damage tolerance: When it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol*, *5*(2), 82–90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.139>
- Coohill, T. P. and Sagripanti, J. (2008). Overview of the Inactivation by 254 nm Ultraviolet Radiation of Bacteria with Particular Relevance to Biodefense. *Photochem Photobiol*, *84*(5), 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00387.x>
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O. and Hanawalt, P. C. (2001). Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, *158*(1), 41–64. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.1.41>
- Crowley, D. J. and Courcelle, J. (2002). Answering the Call: Coping with DNA Damage at the Most Inopportune Time. *BioMed Res Int*, *2*(2), 66–74. <https://doi.org/10.1155/S1110724302202016>
- De Laat, W. L., Jaspers, N. G. J. and Hoeijmakers, J. H. J. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Gene Dev*, *13*(7), 768–785. <https://doi.org/10.1101/gad.13.7.768>

- Erill, I. (2006). Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res*, *34*(1), 66–77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj412>
- Erill, I., Campoy, S. and Barbé, J. (2007). Aeons of distress: An evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev*, *31*(6), 637–656. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x>
- Escarceller, M., Hicks, J., Gudmundsson, G., Trump, G., Touati, D., Lovett, S., Foster, P. L., McEntee, K. and Goodman, M. F. (1994). Involvement of *Escherichia coli* DNA polymerase II in response to oxidative damage and adaptive mutation. *J Bacteriol*, *176*(20), 6221–6228. <https://doi.org/10.1128/jb.176.20.6221-6228.1994>
- Foster, P. L. (2007). Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Crit Rev Biochem Mol*, *42*(5), 373–397. <https://doi.org/10.1080/10409230701648494>
- Friedberg, E. C. 2006a. DNA Damage, p. 9-70. In E. C. Friedberg, R. D. Wood, G. C. Walker, R. A. Schultz, W. Siede, and T. Ellenberger (ed.), *DNA repair and mutagenesis*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Friedberg, E. C. 2006b. The SOS Responses of Prokaryotes to DNA Damage, p. 463-508. In E. C. Friedberg, R. D. Wood, G. C. Walker, R. A. Schultz, W. Siede, and T. Ellenberger (ed.), *DNA repair and mutagenesis*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Fromme, J. C. and Verdine, G. L. 2004. Base Excision Repair, p. 1-41. In W. Yang (ed.), *Advances in Protein Chemistry*, Volume 69: DNA Repair and Replication, Academic Press, Cambridge, Massachusetts
- Fuchs, R. P. and Fujii, S. (2013). Translesion DNA synthesis and mutagenesis in prokaryotes. *CSH Perspect Biol*, *5*(12), a012682. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012682>
- Fuchs, R. P., Fujii, S. and Wagner, J. 2004. Properties and Functions of *Escherichia Coli*: Pol IV and Pol V., p. 229-264. In W. Yang (ed.), *Advances in Protein Chemistry*, Volume 69: DNA Repair and Replication, Academic Press, Cambridge, Massachusetts
- Fujii, S. and Fuchs, R. P. (2004). Defining the position of the switches between replicative and bypass DNA polymerases. *EMBO J*, *23*(21), 4342–4352. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600438>
- Fujii, S. and Fuchs, R. P. (2020). A Comprehensive View of Translesion Synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol R*, *84*(3), e00002-20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-20>

- Galhardo, R. S., Rocha, R. P., Marques, M. V. and Menck, C. F. M. (2005). An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*, 33(8), 2603–2614. <https://doi.org/10.1093/nar/gki551>
- Garibyan, L. (2003). Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair*, 2(5), 593–608. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(03\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(03)00024-7)
- Goodman, M. F. and Woodgate, R. (2013). Translesion DNA Polymerases. *CSH Perspect Biol*, 5(10), a010363–a010363. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010363>
- Goosen, N. and Moolenaar, G. F. (2001). Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair. *Res Microbiol*, 152(3–4), 401–409. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01211-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01211-6)
- Grossman, L. and Thiagalingam, S. (1993). Nucleotide excision repair, a tracking mechanism in search of damage. *J Biol Chem*, 268(23), 16871–16874. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85273-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85273-0)
- Gunasekera, T. S. and Sundin, G. W. (2006). Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *J Appl Microbiol*, 100(5), 1073–1083. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02841.x>
- Harris, V. H., Smith, C. L., Cummins, W. J., Hamilton, A. L., Adams, H., Dickman, M., Hornby, D. P. and Williams, D. M. (2003). The Effect of Tautomeric Constant on the Specificity of Nucleotide Incorporation during DNA Replication: Support for the Rare Tautomer Hypothesis of Substitution Mutagenesis. *J Mol Biol*, 326(5), 1389–1401. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00051-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00051-2)
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U. and Heinaru, A. (2000). Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol Ecol*, 31(3), 195–205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00684.x>
- Heller, R. C. and Marians, K. J. (2006). Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature*, 439(7076), 557–562. <https://doi.org/10.1038/nature04329>
- Henrikus, S. S., Wood, E. A., McDonald, J. P., Cox, M. M., Woodgate, R., Goodman, M. F., Van Oijen, A. M. and Robinson, A. (2018). DNA polymerase IV primarily operates outside of

DNA replication forks in *Escherichia coli*. PLOS Genet, 14(1), e1007161. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007161>

Huang, J. C., Hsu, D. S., Kazantsev, A. and Sancar, A. (1994). Substrate spectrum of human excinuclease: Repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. P Natl Acad Sci, 91(25), 12213–12217. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12213>

Ikehata, H. and Ono, T. (2011). The Mechanisms of UV Mutagenesis. J Radiat Res, 52(2), 115–125. <https://doi.org/10.1269/jrr.10175>

Ilmjärvi, T., Naanuri, E. and Kivisaar, M. (2017). Contribution of increased mutagenesis to the evolution of pollutants-degrading indigenous bacteria. PLOS ONE, 12(8), e0182484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182484>

Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. Int J Biol Sci, 4(6), 338–344. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.338>

Jatsenko, T., Sidorenko, J., Saumaa, S. and Kivisaar, M. (2017). DNA Polymerases ImuC and DinB Are Involved in DNA Alkylation Damage Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. PLOS ONE, 12(1), e0170719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170719>

Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R. and Kivisaar, M. (2010). Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. Mutat Res-Fund Mol M, 683(1–2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.015>

Jiang, Q., Karata, K., Woodgate, R., Cox, M. M. and Goodman, M. F. (2009). The active form of DNA polymerase V is UmuD₂C–RecA–ATP. Nature, 460(7253), 359–363. <https://doi.org/10.1038/nature08178>

Kasak, L., Hõrak, R. and Kivisaar, M. (1997). Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: A model system for the study of mutation in starving bacteria. P Natl Acad Sci, 94(7), 3134–3139. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3134>

Kelner, A. (1949). Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury. P Natl Acad Sci, 35(2), 73–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.35.2.73>

Kim, J. J. and Sundin, G. W. (2001). Construction and Analysis of Photolyase Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*: Contribution of Photoreactivation, Nucleotide Excision Repair, and Mutagenic DNA Repair to Cell Survival and Mutability

- following Exposure to UV-B Radiation. *Appl Environ Microb*, 67(4), 1405–1411. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1405-1411.2001>
- Kisker, C., Kuper, J. and Van Houten, B. (2013). Prokaryotic Nucleotide Excision Repair. *CSH Perspect Biol*, 5(3), a012591–a012591. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012591>
- Koorits, L., Tegova, R., Tark, M., Tarassova, K., Tover, A. and Kivisaar, M. (2007). Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair*, 6(6), 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.01.010>
- Krokan, H. E. and Bjoras, M. (2013). Base Excision Repair. *CSH Perspect Biol*, 5(4), a012583–a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>
- Krwawicz, J., Arczewska, K. D., Speina, E., Maciejewska, A. and Grzesiuk, E. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Pol*, 54(3), 413–434.
- Lin, J. J., Phillips, A. M., Hearst, J. E. and Sancar, A. (1992). Active site of (A)BC excinuclease. II. Binding, bending, and catalysis mutants of UvrB reveal a direct role in 3' and an indirect role in 5' incision. *J Biol Chem*, 267(25), 17693–17700.
- Lindahl, T. and Barnes, D. E. (2000). Repair of Endogenous DNA Damage. *Cold Spring Harb Sym*, 65(0), 127–134. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>
- Little, J. W. (1991). Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*, 73(4), 411–421. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(91\)90108-D](https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90108-D)
- Liu, Y., Prasad, R., Beard, W. A., Kedar, P. S., Hou, E. W., Shock, D. D. and Wilson, S. H. (2007). Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β . *J Biol Chem*, 282(18), 13532–13541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611295200>
- Luján, A. M., Moyano, A. J., Martino, R. A., Feliziani, S., Urretavizcaya, M. and Smania, A. M. (2019). ImuB and ImuC contribute to UV-induced mutagenesis as part of the SOS regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Mol Mutagen*, 60(7), 594–601. <https://doi.org/10.1002/em.22290>
- Madronich, S., McKenzie, R. L., Björn, L. O. and Caldwell, M. M. (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photoch Photobio B*, 46(1–3), 5–19. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00182-1)

- Malta, E., Moolenaar, G. F. and Goosen, N. (2007). Dynamics of the UvrABC Nucleotide Excision Repair Proteins Analyzed by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biochemistry*, 46(31), 9080–9088. <https://doi.org/10.1021/bi7002235>
- Marians, K. J. (2018). Lesion Bypass and the Reactivation of Stalled Replication Forks. *Annu Rev Biochem*, 87, 217–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011921>
- Masker, W., Hanawalt, P. and Shizuya, H. (1973). Role of DNA Polymerase II in Repair Replication in *Escherichia coli*. *Nature-New Biol*, 244(138), 242–243. <https://doi.org/10.1038/newbio244242a0>
- McHenry, C. S. (2011). Breaking the rules: Bacteria that use several DNA polymerase IIIs. *EMBO Rep*, 12(5), 408–414. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.51>
- McKenzie, G. J., Lee, P. L., Lombardo, M.-J., Hastings, P. J. and Rosenberg, S. M. (2001). SOS Mutator DNA Polymerase IV Functions in Adaptive Mutation and Not Adaptive Amplification. *Mol Cell*, 7(3), 571–579. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00204-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00204-0)
- Michel, B. (2005). After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. *PLoS Biol*, 3(7), e255. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030255>
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Mirkin, E. V. and Mirkin, S. M. (2007). Replication Fork Stalling at Natural Impediments. *Microbiol Mol Biol R*, 71(1), 13–35. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-06>
- Mitchell, D. L., Jen, J. and Cleaver, J. E. (1991). Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol*, 54(5), 741–746. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02084.x>
- Musarrat, J. and Ahmad, M. (1988). pH induced damage and repair in *E. coli*. *Mutat Res-DNA Repair*, 193(3), 219–227. [https://doi.org/10.1016/0167-8817\(88\)90032-6](https://doi.org/10.1016/0167-8817(88)90032-6)
- Neidhardt, F. C. (1996). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (2nd ed). American society for microbiology.
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T. and Ohgaki, S. (2001). Determination of Pyrimidine Dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during

- UV Light Inactivation, Photoreactivation, and Dark Repair. *Appl Environ Microb*, 67(10), 4630–4637. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4630-4637.2001>
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P. P., ... Woodgate, R. (2001). The Y-Family of DNA Polymerases. *Mol Cell*, 8(1), 7–8. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00278-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00278-7)
- Perfeito, L., Fernandes, L., Mota, C. and Gordo, I. (2007). Adaptive Mutations in Bacteria: High Rate and Small Effects. *Science*, 317(5839), 813–815. <https://doi.org/10.1126/science.1142284>
- Pfeifer, G. P. (1997). Formation and Processing of UV Photoproducts: Effects of DNA Sequence and Chromatin Environment. *Photochem Photobiol*, 65(2), 270–283. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08560.x>
- Quinet, A., Tirman, S., Cybulla, E., Meroni, A. and Vindigni, A. (2021). To skip or not to skip: Choosing repriming to tolerate DNA damage. *Mol Cell*, 81(4), 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.012>
- Rangarajan, S., Woodgate, R. and Goodman, M. F. (1999). A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: A pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*. *P Natl Acad Sci*, 96(16), 9224–9229. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9224>
- Reardon, J. T. and Sancar, A. 2005. Nucleotide Excision Repair, p. 183-235. In K. Moldave (ed.) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Volume 79. Academic Press, Cambridge, Massachusetts
- Reuven, N. B., Arad, G., Maor-Shoshani, A. and Livneh, Z. (1999). The Mutagenesis Protein UmuC Is a DNA Polymerase Activated by UmuD', RecA, and SSB and Is Specialized for Translesion Replication. *J Biol Chem*, 274(45), 31763–31766. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31763>
- Reuven, N. B., Tomer, G. and Livneh, Z. (1998). The Mutagenesis Proteins UmuD' and UmuC Prevent Lethal Frameshifts While Increasing Base Substitution Mutations. *Mol Cell*, 2(2), 191–199. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80129-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80129-X)
- Rosche, W. A. and Foster, P. L. (2000). Determining Mutation Rates in Bacterial Populations. *Methods*, 20(1), 4–17. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0901>
- Sancar, A. (1996). DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*, 65(1), 43–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.000355>
- Sancar, A. and Tang, M. (1993). Nucleotide Excision Repair. *Photochem Photobiol*, 57(5), 905–921. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb09233.x>

- Sassanfar, M. and Roberts, J. W. (1990). Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*: The involvement of DNA replication. *J Mol Biol*, *212*(1), 79–96. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90306-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90306-7)
- Schroeder, J. W., Yeesin, P., Simmons, L. A. and Wang, J. D. (2018). Sources of spontaneous mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol*, *53*(1), 29–48. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1394262>
- Selby, C. P., Witkin, E. M. and Sancar, A. (1991). *Escherichia coli mfd* mutant deficient in „mutation frequency decline“ lacks strand-specific repair: In vitro complementation with purified coupling factor. *P Natl Acad Sci USA*, *88*(24), 11574–11578. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11574>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., ... de Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res*, *41*(D1), D666-675. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Sinha, R. P. and Häder, D.-P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photoch Photobio Sciences*, *1*(4), 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
- Smith, B. T. and Walker, G. C. (1998). Mutagenesis and More: umuDC and the *Escherichia coli* SOS Response. *Genetics*, *148*(4), 1599–1610. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1599>
- Sundin, G. W., Kidambi, S. P., Ullrich, M. and Bender, C. L. (1996). Resistance to ultraviolet light in *Pseudomonas syringae*: Sequence and functional analysis of the plasmid-encoded *rulAB* genes. *Gene*, *177*(1–2), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00273-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00273-9)
- Sutherland, B. M. (1981). Photoreactivation. *BioScience*, *31*(6), 439–444. <https://doi.org/10.2307/1308431>
- Zhang, S. and Sundin, G. W. (2004). Mutagenic DNA repair potential in *Pseudomonas* spp., and characterization of the *rulAB*_{P_c} operon from the highly mutable strain *Pseudomonas cichorii* 302959. *Can J Microbiol*, *50*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1139/w03-105>
- Zharkov, D. O. (2008). Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci*, *65*(10), 1544–1565. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7543-2>
- Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Hõrak, R. and Kivisaar, M. (2005). A DNA Polymerase V Homologue Encoded by TOL Plasmid pWW0 Confers Evolutionary

- Fitness on *Pseudomonas putida* under Conditions of Environmental Stress. *J Bacteriol*, *187*(15), 5203–5213. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5203-5213.2005>
- Van Elsas, J. D. and Van Overbeek, L. S. 1993. Bacterial Responses to Soil Stimuli, p. 55-79. In S. Kjelleberg (ed.), *Starvation in Bacteria*. Springer US
- Villani, G., Boiteux, S. and Radman, M. (1978). Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: Extent and fidelity of in vitro DNA synthesis on irradiated templates. *P Natl Acad Sci USA*, *75*(7), 3037–3041. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.7.3037>
- Wang, F. and Yang, W. (2009). Structural Insight into Translesion Synthesis by DNA Pol II. *Cell*, *139*(7), 1279–1289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.043>
- Warner, D. F., Ndwandwe, D. E., Abrahams, G. L., Kana, B. D., Machowski, E. E., Venclovas, Č. and Mizrahi, V. (2010). Essential roles for *imuA* '- and *imuB*-encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *P Natl Acad Sci*, *107*(29), 13093–13098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002614107>
- Yamada, M., Shimizu, M., Katafuchi, A., Grúz, P., Fujii, S., Usui, Y., Fuchs, R. P. and Nohmi, T. (2012). *Escherichia coli* DNA polymerase III is responsible for the high level of spontaneous mutations in *mutT* strains. *Mol Microbiol*, *86*(6), 1364–1375. <https://doi.org/10.1111/mmi.12061>
- Yang, W. and Gao, Y. (2018). Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism. *Annu Rev Biochem*, *87*(1), 239–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012405>
- Yao, N. Y., Schroeder, J. W., Yurieva, O., Simmons, L. A. and O'Donnell, M. E. (2013). Cost of rNTP/dNTP pool imbalance at the replication fork. *P Natl Acad Sci*, *110*(32), 12942–12947. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309506110>
- Yeeles, J. T. P., Poli, J., Mariani, K. J. and Pasero, P. (2013). Rescuing stalled or damaged replication forks. *CSH Perspect Biol*, *5*(5), a012815. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012815>

LIHTLITSENTS

Mina, Marielle Suur

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

***Pseudomonas fluorescens* PC20 *ruAB* operonide roll UV taluvusel ja UV kiirgusest tingitud mutageneesil,**

mille juhendaja on PhD Signe Saumaa,

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 Commonsi 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.

Marielle Suur

26.05.2025