

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

SOS-vastuse osalus mutantide tekkesageduses *Pseudomonas putida* pseudouridiini süntaaside
truA ja *rluA* defektsetes tüvedes

Bakalaureusetöö

12 EAP

Lea Lopp

Juhendaja: PhD Heili Ilves

TARTU 2019

Infoleht

SOS-vastuse osalus mutantide tekkesageduses *Pseudomonas putida* pseudouridiini süntaaside *truA* ja *rluA* defektsetes tüvedes

Modifikatsioonid tRNA-s võivad mõjutada translatsiooni täpsust. Pseudouridiinid on ühed enim levinud modifikatsioonid RNA-s. Valesti transleeritud valgud võivad aktiveerida SOS-vastuse, kuna vigade tekkimine translatsioonil on juhuslik, võivad tekkida vead ka DNA replikatsiooni ja parandamisega seotud valkudesse, mille funktsiooni häirumise tulemusena võib tekkida üheaheelist DNA-d või jäävad replikatsiooni käigus DNA-sse tekkinud vead parandamata. TruA ja RluA on pseudouridiini süntaasid, mis sünteesivad pseudouridiini tRNA-sse, antikoodoni lähedusse. Varasemalt on meie laboris näidatud mutatsioonisageduse suurenemist *Pseudomonas putida* tüvedes, kus on puudu TruA ja RluA. Käesolevas töös uurisin kas *truA* ja *rluA* geeni puudumine põhjustab *P. putida* rakkudes SOS vastust, mis omakorda võiks olla suurenenud mutantide tekkesageduse põhjuseks.

Märksõnad: *truA*, *rluA*, pseudouridiin, SOS-vastus, mutatsioonisagedus, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Involvement of SOS response in the mutant frequency of *Pseudomonas putida truA* and *rluA* defective strains.

Modifications in tRNA make tRNA more stable and through that help to keep translation accurate. Pseudouridine is one of the most common modifications in RNA. Mistranslation can lead to initiation of SOS-response through mistakes in proteins associated with DNA replication or repair and that can produce single-stranded DNA in their work. TruA and RluA are pseudouridine synthases synthesizing pseudouridine in tRNA, close to anticodon. Our group has previously shown that mutation rate is increased in *Pseudomonas putida truA* or *rluA* defective strains. In the current work I address the link between higher mutation rate in *Pseudomonas putida truA* and *rluA* defective stains and SOS-response.

Keywords: *truA*, *rluA*, pseudouridine, SOS-response, mutation rate, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	3
Kasutatud lühendid	6
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1 Pseudouridiinid	8
1.1 Pseudouridiinide süntaasid	10
1.1.1 Pseudouridiini süntaas TruA	10
1.1.2 Pseudouridiini süntaas RluA	12
1.2 SOS-vastus bakterites	12
1.3 Mitomütsiin C	15
1.4 SOS-vastus pseudomonaadides	16
2. Eksperimentaalosa	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja meetodika	19
2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid	19
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	20
2.2.3 PCR	20
2.2.4 Geelelektroforees	21
2.2.5 UV-taluvuse testimine	21
2.2.6 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine	22
2.2.7 β -galagtosidaasi aktiivsuse määramine	22
2.2.8 LIVE/DEAD kitiga rakkude värvimine ja mikroskoopeerimine	23
2.2.9 Rif ^R mutantide tekkesageduse määramine Rif ^R / <i>rpoB</i> testsüsteemiga	24
2.2.10 Statistiline analüüs	24
2.3 Tulemused ja arutelu	25
2.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> Δ <i>truA</i> ja Δ <i>rluA</i> tüvede UV-tundlikus	25
2.3.2 SOS reguloni kuuluva <i>dinB</i> geeni promootori aktiivsus <i>P. putida</i> Δ <i>truA</i> ja Δ <i>rluA</i> tüvedes	26
2.3.3 SOS reguloni kuuluva <i>PP_3901</i> geeni promootori aktiivsus <i>P. putida</i> Δ <i>truA</i> ja Δ <i>rluA</i> tüvedes	30

2.3.4	<i>P. putida</i> pseudouridiini süntaaside $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ mutantsete rakkude morfoloogia	32
2.3.5	Rif ^R mutantide sagedus <i>P. putida</i> $\Delta truA$ tüves SOS-vastuse aktiveerumiseks olulise valguga RecA puudumisel	34
	Kokkuvõte	36
	Involvement of SOS response in the mutant frequency of <i>Pseudomonas putida</i> <i>truA</i> and <i>rluA</i> defective strains.	37
	Tänuõnad.....	39
	Kirjanduse loetelu.....	40
	Kasutatud veebiaadressid	42
	Lisad	43
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	44

Kasutatud lühendid

Bp – bensüülpenitsilliin

CAA – kaseiini hüdrolüsaat (inglise k – *casamino acids*)

CFU – kolooniat moodustav ühik (inglise k – *colony forming unit*)

Glc – glükoos (inglise k – *glucose*)

LB – lüsogeenne sööde (inglise k – *lysogeny broth*)

MMC – mitomütsiin C

NER – nukleotiidi väljalõikamise abil parandamine (inglise k – *nucleotide excision repair*)

Pol – polümeraas

Rif – rifampitsiin

RLU – lutsiferaasi suhteline aktiivsus (inglise k – *relative light unit*)

ROS – reaktiivsed hapniku ühendid (inglise k – *reactive oxygen species*)

ssDNA – üheaheelaline DNA (inglise k – *single strand DNA*)

Ψ – pseudouridiin

Sissejuhatus

SOS-vastus on bakterite strateegia kuhjunud DNA-kahjustustega toimetulekuks. Põhiliseks SOS-vastuse vallandajaks on üheaheelaline DNA (ssDNA), mida võivad tekitada näiteks UV-kiirgus, replikatsioonivead, DNA-ga seonduvad kemikaalid, reaktiivsed hapniku ühendid ja radioaktiivne kiirgus. Ka valesti transleeritud valgud võivad esile kutsuda SOS-vastuse aktivatsiooni. SOS-vastuse eelistatud lahenduseks on DNA-s olevate vigade parandamine, näiteks homoloogilise rekombinatsiooniga. Kui aga vigu on liiga palju, aktiveeritakse vigu tegevad DNA polümeraasid, mis on võimelised sünteesima üle vigade. Kuna sellistel spetsialiseeritud DNA polümeraasidel puudub 3'-5' eksonukleasne aktiivsus ehk *proofreading* aktiivsus, siis ei suuda nad DNA sünteesi käigus tehtud vigu parandada. Seega võib SOS-vastuse käigus suurenda ka mutatsioonide arv genoomis (Baharoglu ja Mazel, 2014).

Pseudouridiinid (Ψ) on ühed enim levinud modifikatsioonid RNA-s, mis aitavad tõsta RNA stabiilsust aluspaaride stäkkumise suurendamise ja RNA jäigemaks muutmise kaudu. Pseudouridiin sünteesitakse juba valmis RNA ahelasse, uridiini molekulist. Ensüüme, mis antud protsesse läbi viivad, nimetatakse pseudouridiinide süntaasideks. Ψ -de olulisust on näidatud translatsiooni käigus lugemisraami säilitamisel, temperatuurišoki talumisel ja oksüdatiivse stressi talumisel (Urbonavicius jt., 2001, Kinghorn jt., 2002, Yang jt., 2019).

TruA ja RluA on valgud, mis sünteesivad Ψ -d *Escherichia coli* tRNA antikoodonlingu. Meie laboris on varasemalt näidatud, et pseudouridiini süntaasi *truA* puudumisel suureneb mutatsioonisagedus *P. putida* rakkudes neli korda (Tagel jt., 2016) ning pseudouridiini süntaasi *rluA* puudumisel kolm korda (M. Tagel avaldamata andmed). Kuna tRNA modifikatsioonid võivad olla olulised translatsiooni täpsuses ning kirjanduses on viiteid, et valesti transleeritavad valgud võivad aktiveerida SOS-vastust (Bacher ja Schimmel, 2007), püstitati hüpotees, et *P. putida* rakkudes *truA* ja *rluA* puudumisel nähtav mutatsioonisageduse tõus võib olla põhjustatud SOS-vastusest.

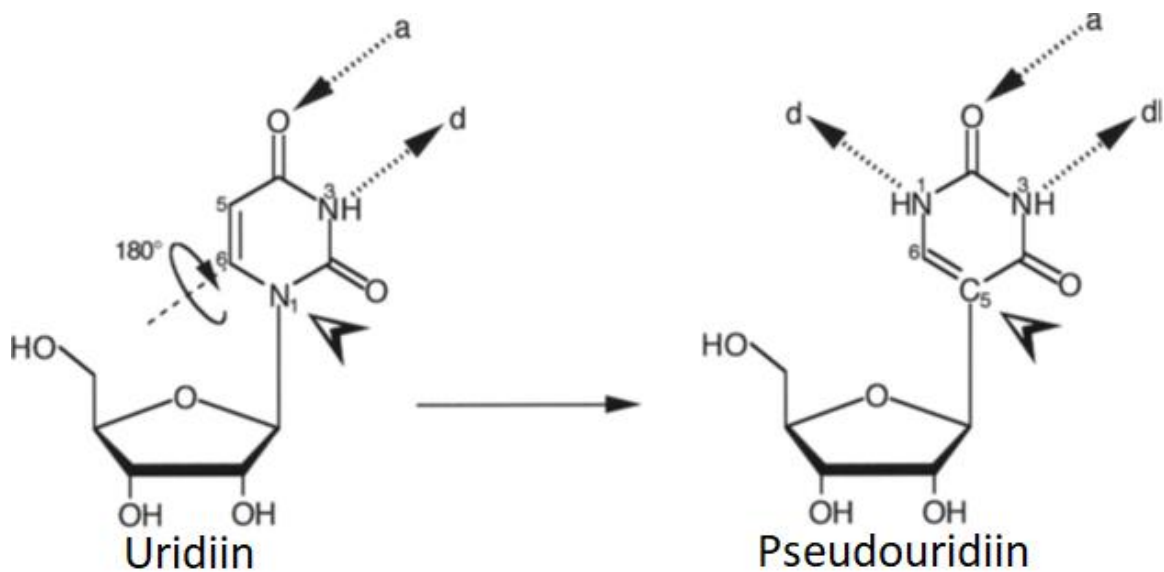
Käesoleva töö eesmärgiks on välja selgitada kas *P. putida* rakkudes on pseudouridiini süntaaside *truA* ja *rluA* puudumisel aktiveeritud SOS-vastus.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Pseudouridiinid

Erinevalt DNA-st esineb RNA-s palju erinevaid modifikatsioone. Vastavalt RNA modifikatsiooniradade andmebaasile (<http://modomics.genesilico.pl/>) on praeguseks RNA-s teada 172 erinevat modifikatsiooni. Modifikatsioone esineb igat tüüpi RNA-des. tRNA-s on modifikatsioone, mille positsioon on konserveerunud kõigi elu domäänide ulatuses, kuid on ka varieeruvaid positsioone (Tuorto ja Lyko, 2016). tRNA kolmemõõtmelist struktuuri vaadates on näha, et modifikatsioonid on koondunud kahte piirkonda: antikoodon ligu ja D- ning T-ligu ühinemiskohta (Lorenz jt., 2017). Levinuimaks modifikatsiooniks on pseudouridiin, mida on nimetatud ka „viendaks nukleotiidiks“ (Charette ja Gray, 2000).

Pseudouridiin (Ψ) on uridiini 5-ribosüül isomeer, mis saadakse uridiinist ühe glükosiidsideme lõhkumise ja uue sünteesimise läbi (Johnson ja Soll, 1970). Ψ -d leidub nii tRNA-s, rRNA-s, snRNA-s ja snoRNA-s. Ψ saadakse, kui lämmastikalust pööratakse 180° ümber N3-C6 telje (joonis 1), tänu sellele lisandub üks vesiniksideme doonor võrreldes uridiiniga (Charette ja Gray, 2000). On näidatud, et Ψ muudab RNA-d jäigemaks ja seeläbi stabiilsemaks ning suurendab aluspaaride stäkkumist ehk üksteise peal asetsevate aluspaaride vahelist „kleepumist“ (Davis, 1995, Davis jt., 1998).



Joonis 1. Uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks. Valgete nooltega on näidatud koht uratsiilis, kus N-glükosiidsest sidemest saab C-glükosiidne side. Isomerisatsiooni käigus lämmastikalust pööratakse 180° ümber selle N3-C6 telje (katkendlik joon). Tänu isomerisatsioonile on pseudouridiinil lisandunud üks vesiniksideme doonor (katkendlikud nooled, doonor märgitud tähega d ja akstepror a) (Charette ja Gray, 2000, muudetud).

Bakterites on Ψ nii tRNA kui ka rRNA koostises (Decatur ja Fournier, 2002, Bjork ja Hagervall, 2014). *E. coli*'s on näidatud, et Ψ-de olemasolu ribosoomis pole eluliselt oluline. Nimelt, kui eemaldati kõik rRNA pseudouridiini süntaasid (RsuA ja RluA, -B, -C, -D, -E ning -F) *E. coli* rakust, ei avaldanud see suurt mõju ribosoomi biogeneesile ja funktsioonile ning rakkude kasv oli vaid kergelt häiritud (O'Connor jt., 2018). Samas eukarüootidel on ribosoomis paiknevad Ψ-d olulised. Pärmis on näidatud, et kui kahe Ψ modifikatsiooni puudumine ribosoomi heeliksist 69 (kus on neli Ψ-d ja üks 2'-O-metülatsioon) ei oma veel efekti, siis alates kolme modifikatsiooni puudumisest (2'-O-metülatsioon ja Ψ-d) väheneb translatsiooni efektiivsus, sageneb stop-koodonite ülelugemine, suureneb tundlikkus ribosoomile toimivate antibiootikumide suhtes, väheneb rRNA hulk (kuna rRNA ei ole nii stabiilne), muutub rRNA struktuur (Liang jt., 2007). Seega on pärmis ribosoomi funktsioon Ψ-de eemaldamisel häiritud.

Samas, tRNA-s paiknevate Ψ-de olulisust on näidatud ka bakteritel. *E. coli* türosiini transportiva tRNA positsioonis 35 paikneva Ψ eemaldamine vähendab bakteri võimekust transleerida türosiini rikkaid mRNA-sid (Addepalli ja Limbach, 2016). Samuti on Ψ-d olulised bakterite temperatuuritaluvuses. Näiteks kui võrreldi ilma modifikatsioonideta tRNA^{Lys}-i ja tRNA-d, kus oli taastatud positsioonis 39 paiknev Ψ, siis oli Ψ modifikatsiooniga molekuli sulamistemperatuur

5°C võrra kõrgem, kuna stabiliseerus tRNA struktuur (Durant ja Davis, 1999). tRNA modifikatsioonide olulisust temperatuuri taluvusel näitab ka see, et termofiilidel on modifikatsioone tRNA-s rohkem kui psührofiilidel või mesofiilidel (Lorenz jt., 2017). Ψ mängib olulist rolli ka *E. coli* kuumataluvuses. Nimelt kui *E. coli* rakkudes puudus *truB* geen, millelt kodeeritud pseudouridiini süntaas TruB sünteesib Ψ-d tRNA-des positsiooni 55, vähenes oluliselt rakkude elumus järsul temperatuuri tõstmisel 37°C-lt kraadilt 50°C-le (Kinghorn jt., 2002). Lisaks on kirjanduses viiteid, et Ψ-d tRNA-s on olulised erinevates stressitingimustes. Näiteks *Salmonella enterica*-l on näidatud, et Ψ-d sünteesiva geeni *truA* transkriptsioon suureneb oksüdatiivse stressi korral ning selle geeni deleteerimisel ei talu *S. enterica* oksüdatiivset stressi nii hästi kui metsiktüüpi rakud. Sama uurimisgrupp leidis veel, et Ψ-d sünteesiv geen *truA* on oluline *S. enterica* võimes nakatada hiirt laboritingimustes (Yang jt., 2019). Seega võib oletada, et tRNA-s paiknevad Ψ-d on olulised bakterite võimes hakkama saada erinevate stressitingimustega ning võivad mõjutada translatsiooni täpsust.

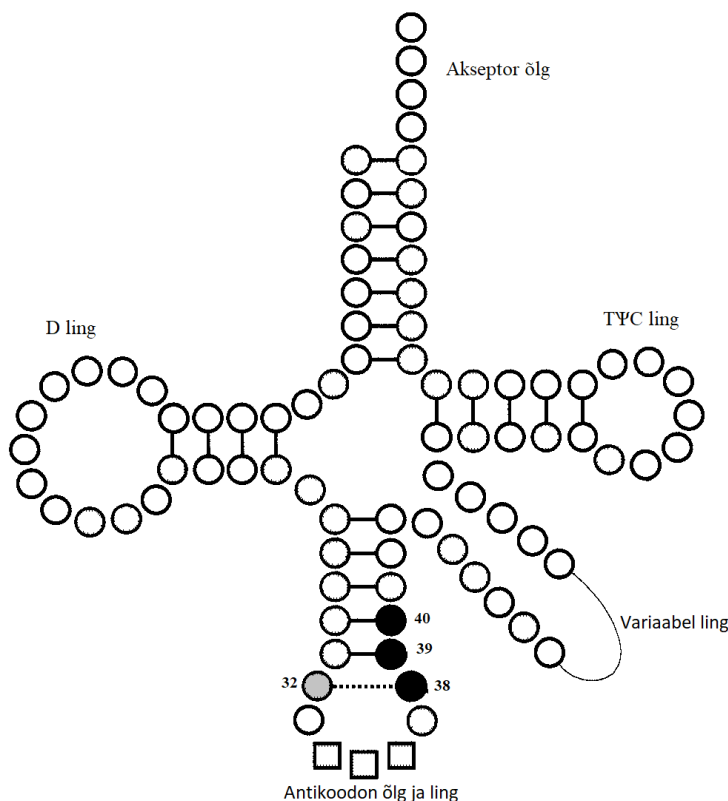
1.1 Pseudouridiinide süntaasid

Pseudouridiini sünteesimine võib toimuda kahel viisil: 1) RNA-st sõltuva mehhanismiga, mis vajab lisaks pseudouridiini sünteesivale ensüümile ja substraat-RNA-le veel ka kindlat valk-RNA kompleksi, mida tuntakse kui box H/ACA RNP, ning 2) RNA-st sõltumatu mehhanismiga, mis ei vaja lisaks pseudouridiini sünteesivale ensüümile ja substraat-RNA-le abistavat valk-RNA kompleksi. Prokarüootides toimub Ψ sünteesimine ainult RNA-st sõltumatu mehhanismiga, eukarüootides on kirjeldatud mõlemat mehhanismi (De Zoysa ja Yu, 2017). Vastavalt järjestusele ja struktuurile jagatakse Ψ-d sünteesivaid ensüüme kuueks klassiks, mis on oma nimed saanud kõige esimesena avastatud antud klassi kuuluva ensüümi järgi. Klasse nimetatakse TruA, RluA, RsuA, PUS10, TruB ja TruD sarnased Ψ süntaasid. Bakterite puhul saab rääkida viiest Ψ süntaasi klassist, klassi PUS10 neil ei esine. Kõigil ensüümidel on sarnane aktiivtsenter. Nimelt paikneb aktiivtsentris asparagiinhape, mis toimib reaktsioonis nukleofiilina (Spenkuch jt., 2014).

1.1.1 Pseudouridiini süntaas TruA

TruA (ja ilmselt ka TruA-ga samasse perekonda kuuluvad Ψ süntaasid) on ainus teadaolev dimeerne Ψ süntaas. Kuna TruA aktiivtsenter on veidi suurem, suudab ta seetõttu modifitseerida uratsiili kolmes positsioonis: 38, 39 ja 40 (joonis 2) (Kammen jt., 1988). TruA monomeeri molekulmassiks on 30 399 daltonit (Arps jt., 1985). *E. coli*-s on näidatud, et TruA puudumisel on suurenenud raaminihke toimumise tõenäosus tRNA^{Leu} korral, samas viie teise tRNA korral

raaminihke tõenäosuse suurenemist näha ei olnud. Täpsemalt toimub lugemisraami libisemine just peptidüül-tRNA (tRNA, mille otsas olev aminohape on juba peptiidsidemega seotud tekkiva valguga) libisemise kaudu (Urbonavičius jt., 2001). TruA olulisust on näidatud ka *Salmonella enterica* virulentsuses ja oksüdatiivse stressiga toimetulekus. Yang jt. (2019) näitasid, et oksüdatiivse stressi olukorras jõudis metsiktüüpi *S. enterica* statsionaarsesse faasi 6 tunni möödudes, kuid *truA* geeni puudumisel alustasid rakud paljunemist alles 10 tunni möödudes. Kui hiiri nakatati *S. enterica truA* mutandi rakkudega, siis oli 24 päeva möödudes elus veel üle 80% hiirtest. Samas metsiktüübiga nakatades hukkusid kõik hiired esimese seitsme päeva jooksul (Yang jt., 2019). Huvitaval kombel võib TruA mõjutada ka mutatsioonide tekkimist DNA-s. Nimelt mullabakteris *Pseudomonas putida* näidati, et *truA* geeni puudumisel suureneb mutatsioonisagedus neli korda võrreldes algse tüvega (Tagel jt., 2016).



Joonis 2. Skemaatiline joonis tRNA sekundaarstruktuurist. Halliga on tähistatud RluA sünteesitud Ψ ja mustaga TruA sünteesitud Ψ (Charette ja Gray, 2000, muudetud).

1.1.2 Pseudouridiini süntaas RluA

RluA sünteesib *E. coli*-s Ψ -d tRNA-s positsiooni 32 (joons 2) ja 23S rRNA-s positsioonis 746 (Raychaudhuri jt., 1999). *E. coli*-s on tegu on 219-e aminohappelise ja 24 432 daltonilise monomeerse valguga (Wrzesinski jt., 1995). Kõigil RluA substraatidel on konserveerunud järjestus Ψ UXXAAA, kus X tähistab ükskõik millist nukleotiidi. Samuti paikneb antud järjestus nii tRNA-s kui ka rRNA-s heeliks-lingus ning on struktuurselt sarnane. Kui enamik teisi Ψ süntaase tunnevad põhiliselt ära vaid substraadi struktuuri, on RluA puhul oluline lisaks substraadi struktuurile ka seal paiknev konserveerunud järjestus (Hoang jt., 2006). Kirjandusest on teada, et *E. coli* genoomist *rluA* deleteerimine ei mõjuta kasvu nii 24, 37 kui ka 42°C juures, kuid konkurentsikatses jääb *rluA* mutant metsiktüübile alla (Raychaudhuri jt., 1999). Meie labori avaldamata katsed näitavad, et RluA puudumisel suureneb *P. putida* Rif^R mutantide tekkesagedus ligikaudu kolm korda.

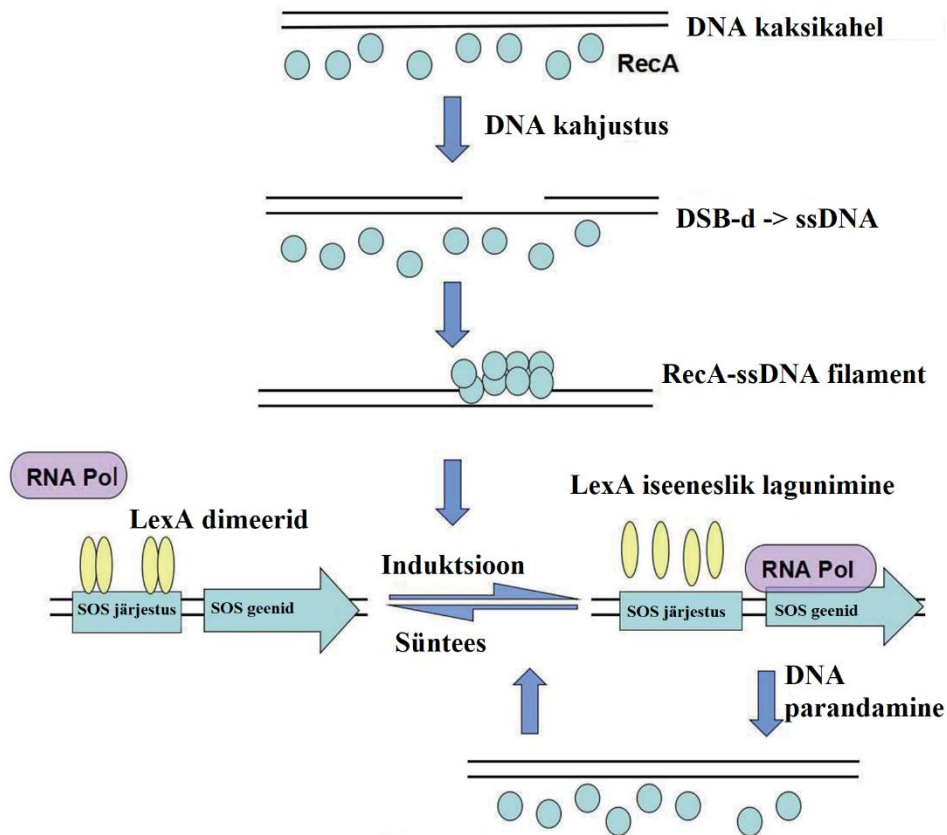
On näidatud, et *E. coli* türosiini transportiva tRNA antikoodonlingu 35ndas positsioonis paikneva Ψ eemaldamine vähendab bakteri võimekust transleerida türosiini rikkaid mRNA-sid ja seega suurendavad translatsioonitäpsust (Addepalli ja Limbach, 2016). Kuna TruA ja RluA sünteesivad Ψ -d antikoodonlingu läheduses, võivad antud valgud olla olulised tRNA võimes lülitada õige aminohape kasvavasse peptiidi.

1.2 SOS-vastus bakterites

Elutegevuse käigus seisavad bakterid silmitsi muutuvate keskkonnatingimustega ning peavad toime tulema erinevate stressiallikatega. Selleks on neil välja kujunenud eri mehhanismid. Üks sellistest mehhanismidest on SOS-vastus, mis aitab bakteritel üle elada järsu DNA-kahjustuste hulga tõusu. Põhiliseks SOS-vastust käivitavaks teguriks on ssDNA, mida võivad tekitada replikatsioonivead, UV-kiirgus, radioaktiivne kiirgus, kõrge rõhk, ROS (reaktiivsed hapniku ühendid), antibiootikumid. Ka väliskeskkonnast transformatsiooni käigus sisse võetud ssDNA võib põhjustada SOS-vastuse aktiveerumist (Qin jt., 2015).

Kuid SOS-vastus võib aktiveeruda ka stressiallikate kaudu, mis otseselt ssDNA-d ei tekita. Sellisel juhul aktiveerivad teised stressivastuste rajad SOS-vastuse või tekib rakudesse ssDNA kaudsete mehhanismide läbi. Otseselt ssDNA-d mitte tekitavad stressiallikad, mis SOS-vastust esile kutsuvad, on näiteks rakuseinastress, näljastress ja valesti transleeritud valgud (Humayun, 1998, Baharoglu ja Mazel, 2014).

SOS-vastuse üldine mehhanism prokariootides DNA kaheahelaliste katkete korral on järgmine: kui tekib DNA kaheahelaline katke, tunneb katke ära valkude kompleks RecBCD, mis keerab DNA-d lahti ja lagundab seda, alustades kaheahelalise katke tulemusena tekkinud otsast, kusjuures 3' otsast lagundab valk DNA-d tunduvalt kiiremini kui 5' otsast (Dixon ja Kowalczykowski, 1993). Üheaahelaliseks jäänud osaga seondub RecA ning tekib ssDNA ja RecA nukleoproteiinfilament (joonis 3). Kui rakus on olemas üheaahelalise osaga homoloogiline ala, toimub järgmiseks homoloogiline rekombinatsioon (Cox, 2007).



Joonis 3. SOS-vastus bakterites. Joonisel on näha, kuidas üheaahelalise DNA lõiguga seondub RecA (sinised ringid). Tekkiv RecA-ssDNA filament aktiveerib SOS-geenide repressori LexA (kollased ovaalid) iseenesliku lagunemise ning RNA polümeraas saab seonduda SOS reguloni geenide promootoritele ning alustada transkriptsiooni. SOS-vastusena aktiveeritud valgud aitavad DNA-s oleva kahjustuse parandada. Samal ajal toimub ka LexA valgu süntees ning kui DNA kahjustused on parandatud, ei ole enam RecA-l üheaahelalist DNA osa, millega seonduda ning LexA iseeneslikku lagunemist enam ei toimu ja SOS-geenide avaldumine lõppeb (Qin jt., 2015, muudetud).

Kui aga homoloogiline ala puudub ning kahjustuste parandamine homoloogilise rekombinatsiooni abil ei õnnestu, aktiveerib ssDNA – RecA nukleoproteiinfilament LexA

iseenesliku lagunemise (joonis 3). LexA on repressorvalk, mis on tavatingimustes seondunud SOS-vastuse geenide promootorjärjestuse spetsiifilise piirkonnaga, SOS-järjestusega (*SOS-box*), takistades transkriptsiooni toimumist. Bakteris *E. coli* on kokku ligikaudu 40 SOS-vastuse geeni, mis alluvad LexA kontrollile (Courcelle jt., 2001). Samas varieerub LexA kontrollile alluvate geenide arv bakteriliigiti. Näiteks bakteril *Bacillus subtilis* on leitud 33 LexA kontrollitud geeni, millest vaid 8 on homoloogsed *E. coli* genoomis leiduvate SOS-geenidega (Au jt., 2005). Enamik gene, mida LexA valk kontrollib, on DNA parandamisega seotud, näiteks homoloogilise rekombinatsiooni ensüümide, NER raja ensüümide ja spetsialiseerunud Y perekonna e „vigaderohkete“ DNA polümeraaside geenid (Baharoglu ja Mazel, 2014). Enamikes bakterites on vaid üks *lexA* geen, kuid mitmetel *Pseudomonas* ja *Xanthomonas* liikidel on vastavaid gene kaks, *lexA1* ja *lexA2* (Abella jt., 2007). Nendest geenidest räägin täpsemalt kirjanduse peatükis SOS-vastus pseudomonaadides.

Kui muude mehhanismidega ei ole suudetud DNA-d parandada (nukleotiidide välja lõikamine, homoloogiline rekombinatsioon), aktiveeritakse „vigaderohked“ DNA polümeraasid, mis on võimelised sünteesima üle DNA kahjustuse (Courcelle jt., 2001). Vigu tegevateks polümeraasideks on bakterites polümeraasid (Pol) IV (DinB), II ja V. Nende polümeraaside avaldumiseks on vaja kas SOS-vastust või RpoS-i (sigma faktor, mis reguleerib statsionaarse faasi geenide avaldumist ning stressivastust). Näiteks polümeraas V vajab aktiveerumiseks ssDNA ja RecA nukleoproteofilamenti (Schlacher jt., 2006). Pol IV ja II põhiliseks aktiveerijaks on RpoS (Frisch jt., 2010), kuid Pol IV aktiveerub ka SOS-vastuse käigus (McKenzie jt., 2001). On näidatud, et Pol V suudab kahjustuse DNA-s (TT (6± 4) fotoprodukt, TT *cis±syn* fotodimeer ja ilma lämmastikaluseta kohad) ületada 30 sekundiga, kui Pol III, mis on sünteesib DNA-d tavatingimustes, suudab ületada kahjustatud koha alles kaheksa minuti möödudes või hiljemgi (Tang jt., 2000).

Ka valesti transleeritud valgud võivad põhjustada SOS-vastuse aktivatsiooni, kuna statistilise tõenäosusega võib translatsiooni käigus tekkida viga valgus, mis mängib olulist rolli näiteks DNA replikatsioonis või DNA parandamises ning mille funktsiooni häirumise tõttu tekib üheaheelaline DNA või katke DNA ahelas. *E. coli*-s on näidatud, et kui muteerida *ileS* (tRNA isoleutsiiniga laadimise kompleks) geen nii, et tRNA aminohappega laadimise kompleksi kontrollmehhanismis on 11 koodonit asendatudalaniini koodonitega, suurenes valesti transleeritud valkude hulk. Translatsiooni käigus tekkivate vigade arv võis suurenedaseeläbi, et

esines rohkem tRNA-sid, mis kandsid endaga vale aminohapet, kuna tRNA aminohappega laadimise kompleks ei olnud võimeline eemaldama valesti külge saanud aminohapet tRNA küljest. Lisaks translatsioonivigade tõusule oli suurenenud mutantse tüve puhul ka mutatsioonisagedus DNA-s. Kui aga muteerida lisaks *ileS* geenile ka repressorvalk LexA (üks põhilisi SOS-geenide repressoreid), nii, et see ei ole enam võimeline lagunema, alanes mutatsioonisagedus tunduvalt. Seega võib oletada, et suurenenud mutatsioonisagedus on põhjustatud SOS-vastusest, mille on aktiveerinud valesti transleeritud valgud (Bacher ja Schimmel, 2007). Translatsioonivigade ja mutatsioonisageduse seos pakuti välja juba 1992-l aastal kui leiti, et streptomütsiin (Sm) indutseerib Sm⁺ mutantide teket *E. coli* metsiktüüpi rakkudes, kuid mutantide sagedus vähenes streptomütsiinile resistentse *rpsL* (kodeerib 30S ribosoomi valku) mutandi korral. Samuti vähenes mutatsioonisagedus ülitäpsete ribosoomide korral (Boe, 1992).

Laboritingimustes kasutatakse SOS-vastuse esile kutsumiseks üldiselt UV-kiirgust (Sassanfar ja Roberts, 1990, Courcelle jt., 2001), antibiootikume (tsiprofloksatsiin (Dorr jt., 2009, Guerin jt., 2009), beetalaktaamid (Miller jt., 2004, Guerin jt., 2009), trimetoprim (Guerin jt., 2009)) ja DNA-d kahjustavaid kemikaale (mitomütsiin C (Davidov jt., 2000, Abella jt., 2007, Guerin jt., 2009), H₂O₂ (Guerin jt., 2009)).

1.3 Mitomütsiin C

Mitomütsiin C (MMC) on antibakteriaalne ja vähivastane aine, mis põhjustab DNA kahjustusi nii imetajarakkudes kui ka bakterites. MMC ise rakus kahjustusi ei tekita, vaid aktiveerub lagunemise käigus. Keemilise või ensümaatilise lagunemise toimetel rakus muutub MMC tugevaks alküülivaks ühendiks. Põhiline mehhanism on lämmastikalustega reageerides DNA ahelate vaheliste ristsidemete tekitamine. Juba üks selline ristside on rakule letaalne, blokeerides DNA replikatsiooni ja transkriptsiooni (Iyer ja Szybalski, 1964).

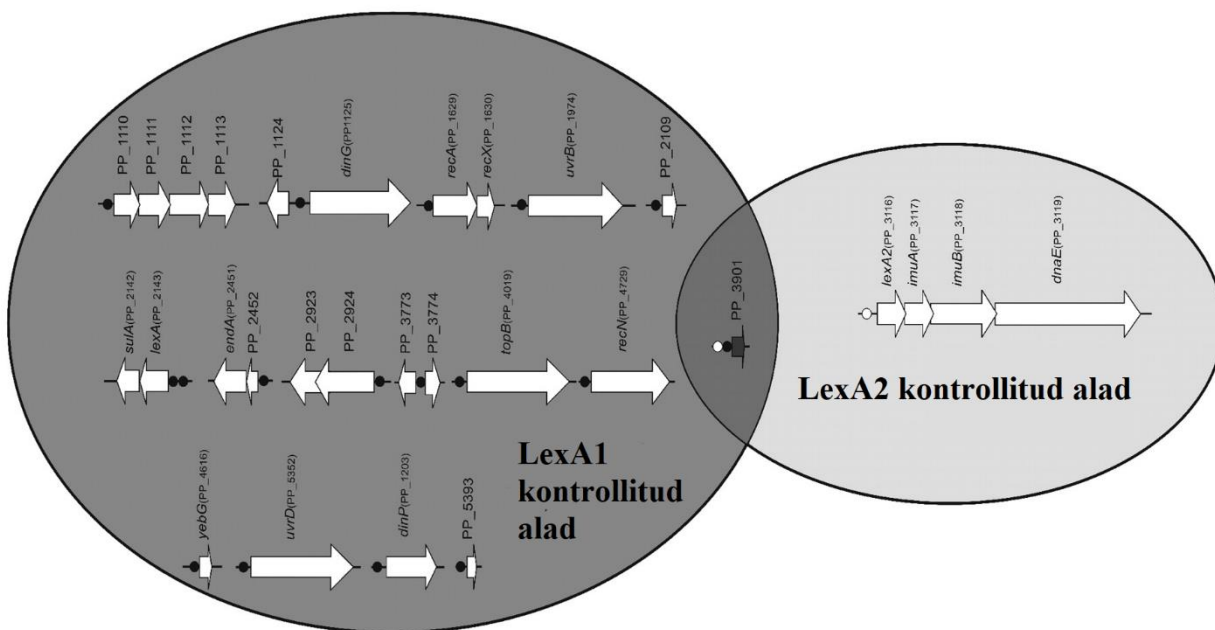
Lisaks DNA ristsidumisele ja alküüleerimisele põhjustab MMC rakkudes ka oksüdatiivset stressi, kui MMC lagunemise käigus tekib H₂O₂. H₂O₂ ei teki mitte ainult vaba MMC lagunemise käigus, vaid ka juba osaliselt lagunenu MMC edasise lagunemise käigus (Tomasz, 1976).

E. coli rakkudes põhjustab MMC-ga töötlemine peaaegu 30% geenide ekspressioonitaseme muutust. Üles on reguleeritud lisaks SOS-vastuse geenidele ka teiste stressivastuse radade geenid,

nagu näiteks osmootse ja oksüdatsiivse stressi raja geenid. Alla on reguleeritud paljud valgusünteesi geenid (Khil ja Camerini-Otero, 2002).

1.4 SOS-vastus pseudomonaadides

Kui enamikes bakterites on vaid üks LexA valk, siis paljudel *Pseudomonas* ja *Xanthomonas* liikidel on kaks erinevat LexA valku (LexA1 ja LexA2), mis kontrollivad erinevate geenide avaldumist SOS-vastuses. *P. putida* LexA1 ja LexA2 seondumisjärjestused DNA-l on erinevad ja nad kontrollivad erinevate geenide avaldumist (joonis 4).



Joonis 4. *Pseudomonas putida* geenid, mille avaldumist kontrollivad LexA1 ja LexA2. Tumedad ringid geeni ees märgivad LexA1 seondumiskohta ja valged ringid LexA2 seondumiskohta, nool näitab transkriptsiooni suunda (Abella jt., 2007).

P. putida rakkudes kontrollib LexA1 kokku 18 transkriptsioonilist ühikut, mis on sarnased nendele, mida kontrollib LexA *E. coli* rakkudes. Enamik nendelt geenidelt kodeeritud valkudest on seotud DNA parandamise ja rekombinatsiooniga. Samas *P. putida* LexA2 kontrollib vaid kahte transkriptsioonilist ühikut. Üks on LexA2 enda transkriptsiooniline ühik, kuhu kuuluvad lisaks *lexA2*-le veel, *imuA*, *imuB* ja *dnaE2*, mis osalevad DNA kahjustuste tolereerimisrajas. Veel kontrollib LexA2 profaagi geeni *PP_3901*. Kusjuures, *PP_3901* geeni kontrollib lisaks LexA2-le ka LexA1, kuid selline topelt kontrollimine esineb ainult *P. putida*-s, paljudes teistes perekond *Pseudomonas* liikides on *PP_3901* geeni ees vaid LexA1 seondumiskoht. On näidatud, et

PP_3901 geeni puudumisel ei aktiveeru SOS-vastuse käigus teised *P. putida* genoomis paiknevate profaagide geenid (Abella jt., 2007).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Meie laboris on varasemalt näidatud, et Ψ süntaasi geeni *truA* puudumisel suureneb mutatsioonisagedus *P. putida* rakkudes neli korda (Tagel jt., 2016) ning *rluA* (samuti Ψ süntaas) puudumisel kolm korda (M. Tagel avaldamata andmed). TruA ja RluA on valgud, mis *E. coli* rakkudes sünteesivad pseudouridiini tRNA antikoodonlingus (Kammen jt., 1988, Raychaudhuri jt., 1999). tRNA modifikatsioonid võivad muuhulgas olla olulised valgusünteesi täpsuse säilitamisel, nende puudumisel võib suurenda mRNA-de valesti transleerimine (Urbonavicius jt., 2001, Addepalli ja Limbach, 2016). Valesti transleeritud valgud võivad bakterites põhjustada SOS-vastust, mille käigus aktiveeruvad DNA sünteesil vigu tegevad DNA polümeraasid. Seeläbi võivad valesti transleeritud valgud tõsta ühtlasi ka mutatsioonisagedust (Bacher ja Schimmel, 2007).

Varasematele andmetele tuginedes sai minu töö eesmärgiks välja selgitada, kas suurenenud mutatsioonisagedus *P. putida* *truA* ja *rluA* deletsioontüvedes võib olla tingitud SOS-vastusest. Selleks, et välja selgitada, kas *truA* ja *rluA* puudumine põhjustab *P. putida* rakkudes SOS-vastust, kasutasin erinevaid lähenemisviise SOS vastuse hindamiseks:

1. võrdlesin *truA* ja *rluA* mutandi UV-taluvust metsiktüübiga
2. mõõtsin *P. putida* SOS-reguloni kuuluvate geenide (*dinB* ja *PP_3901*) promootorite aktiivsust
3. testisin mutatsioonisagedust RecA valgu puudumisel (SOS-vastuse initsiaator) metsiktüübis ning *truA* mutandis
4. Võrdlesin mikroskoobi all *truA* ja *rluA* mutandi rakke metsiktüübi rakkudega ja seda nii indutseerimata kui indutseeritud SOS-vastuse tingimustes.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid

Bakterite kasvatamisel kasutasin kas LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöödet (Miller, 1993) või M9-glükoos-CAA (ingl k – *casamino acids*) söödet (edaspidi glc-CAA). glc-CAA söötme valmistamisel lisasin M9 puhvrise (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl) glükoosi (glc, lõppkontsentratsioon 0,2%), mikroelemente (lõppkontsentratsioonid: 667 µM MgO, 50 µM CaCO₃, 40 µM FeSO₄, 12,5 µM ZnSO₄, 12,5 µM MnSO₄, 2,5 µM CuSO₄, 2,5 µM CoSO₄, 1,9 µM H₃BO₄) ja kaseiini hüdrolüsaati (lõppkontsentratsioon 0,2%). Vedelsöötmes kasvatatavaid kultuure aereerisin loksutil. Tardsöötme valmistamisel lisasin söötmesse agarit kontsentratsiooniga 1,5 g/l. Töös kasutatud tüvede nimekiri on toodud tabelis 1.

Seleksiooniks kasutasin järgmiseid antibiootikume: bensüülpenitsilliin (Bp; 1,5 mg/ml), penitsilliin (Pen; 1,5 mg/ml), rifampitsiin (Rif; 100 µg/ml). Rakke kasvasin 30°C juures. Kolooniates *lacZ* geeni ekspressiooni tuvastamiseks lisasin LB söötmele X-gal-i (100 µg/ml). SOS-vastus indutseerisin MMC-ga (PanReac AppliChem).

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

BAKTERITÜVI	ISELOOMUSTUS	ALLIKAS
<i>P. putida</i> PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi, isogeenne sekveneeritud KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
<i>P. putida</i> PaW85 Δ <i>truA</i>	deleteeritud geen <i>truA</i>	(Tagel jt., 2016)
<i>P. putida</i> PaW85 Δ <i>rluA</i>	deleteeritud geen <i>rluA</i>	Aneth Lvovs bakalaureusetöö
<i>P. putida</i> PaW85 Δ <i>truA</i> Δ <i>recA</i>	deleteeritud geenid <i>truA</i> ja <i>recA</i>	Heili Ilves, avaldamata
<i>P. putida</i> PaW85 Δ <i>recA</i>	deleteeritud geen <i>recA</i>	Heili Ilves, avaldamata
Plasmiidid		
pKTPdinBluxAB	pKT plasmiid, kus <i>dinB</i> promootorala on kloonitud <i>luxAB</i> geenide ette, <i>bla</i> geeniga	(Tegova jt., 2004)
pKTluxAB	Promootorita testvektor, <i>bla</i> geeniga	(Tegova jt., 2004)

pKTlacZ	Promootorita testvektor, <i>bla</i> geeniga	(Horak ja Kivisaar, 1998)
pKTPP_3901lacZ	pKT plasmiid, kus <i>PP_3901</i> promotorala on kloneritud <i>lacZ</i> geeni ette, <i>bla</i> geeniga	Rita Hõrak, avaldamata

2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

P. putida kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvasin neid 5 ml LB vedelsöötmes üleöö. Seejärel tsentrifuugisin (1 min 12000 x g) 300 µl üleöö kasvanud kultuurist rakud välja ning pesin rakusadet kolm korda 300 µl 300 mM saharoosi lahusega. Seejärel suspendeerisin rakud 100 µl 300 mM saharoosi lahuses.

Elektroporatsiooniks lisasin rakkudele ligikaudu 100 ng plasmiidset DNA-d. Kasutasin firma *BioRad* elektroporaatorit „*E. coli Pulser*“ pingel 2500 V. Pärast elektroporeerimist lisasin rakkudele 700 µl LB vedelsöödet ning kasvasin umbes tund aega loksutil, 30 °C juures. Seejärel tsentrifuugisin rakud põhja, eemaldasid söötme ning resuspendeerisin rakud ~ 100 µl LB vedelsöötmes, misjärel plaatisin rakud selektiivsöötmega tassile.

2.2.3 PCR

PCR-i kasutasin tüvede kontrollimisel. Ühe reaktsiooni maht oli 20 µl. Reaktsioonisegu koosnes 1x PCR puhvrist, 2,5 mM MgCl₂-st, 0,2 mM dNTP-st, 0,5-st ühikust Taq polümeraasist reaktsiooni kohta ja praimeritest, kumbagi 10 pmol reaktsiooni kohta. Tabelis 2 on kasutatud praimerite nimekiri. PCR segule lisasin bakteritakke või ligikaudu 10 ng plasmiidset DNA-d (kontrolliks).

PCR-i tingimused olid järgmised: DNA denaturatsioon 96°C, 30-60 sekundit; praimerite seondumise temperatuur 55-56°C (olenevalt praimerite pikkusest ja GC sisaldusest), 30 sekundit; DNA sünteesi temperatuur 72°C, 30-90 sekundit (sõltuvalt amplifitseeritava DNA pikkusest). Reaktsioon toimus 25 tsükli, esimesele tsükli eelnes 2 minutit eelkuumutust temperatuuril 96°C rakkude lõhkumiseks, viimasele tsükli järgnes 3-4 minuti pikkune järelsüntees 72°C juures, et pooleli olevad fragmendid lõpuni sünteesitaks.

Tabel 2. Kasutatud praimerid

Nimetus	Järjestus	Iseloomustus
Luxylemine	5'-CTTCCTTCTCACTTATCAGCC-3'	komplementaarne luxAB geeni positsioonidega 15 kuni 35, suunaga geeni poole
Luxsisemine	5'-CAGTCCATTAAGGCTCGGC-3'	komplementaarne luxAB geeni positsioonidega 389 kuni 371, suunaga geeni alguse poole
lacZ-seq	5'-GGG GAT GTG CTG CAA GGC G-3'	Seondub <i>LacZ</i> geeni algusega
3900-Hind	5'-GAGA-AGCTTTTCTTGCTTAGACATT-3'	Seondub enne <i>3901</i> geeni, <i>3900</i> geeni sisse. Punasega on märgitud HindIII lõikesait.

2.2.4 Geelelektroforees

PCR produkte analüüsisin geelelektroforeesil. Selleks lisasin 20-le µl-le PCR produktile 5 µl foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis) ja kandsin proovid etiidiumbromiidiga (kontsentratsiooniga 0,33 µg/ml) agarosgeelile (1%-ne) 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). DNA fragmentide suuruse hindamiseks, kasutasin firma *Thermo Scientific* DNA suurusmarkerit. Elektroforeesil kasutasin pinget vahemikus 120-150 V, DNA visualiseerimisel kasutasin UV-valgust.

2.2.5 UV-taluvuse testimine

P. putida PaW85, $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvesid kasvasin üleöö 1,5 ml glc-CAA vedelsöötmes. Üleöö kultuurist tegin 40-kordse lahjenduse värskesse glc-CAA söötmesse ning lasin kasvada 2 h, et rakud jõuaks eksponentsiaalsesse kasvufaasi. Nii üleöö kasvanud statsionaarses kasvufaasi kui ka eksponentsiaalse kasvufaasi kultuuridest tegin lahjendusterea (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ja 10^{-7} rakku/ml), millest pipeteerisin 10 µl tilgad paralleelselt kahele LB tardsöötmele (UV-ga kiiritatav tass ja kiiritamata kontrolltass). Lasin tilgad ära kuivada. Statsionaarse kasvufaasi rakke kiiritasin lainepikkusel 254 nm doosiga 30 J/m², eksponentsiaalse faasi rakke doosiga 10 J/m² (UV Crosslinker mudel CX-2000; tootja: UVP, USA). Doosid said valitud vastavalt meie labori varasematele katsetele. Kontrolltasse ei kiiritatud. Pärast kiiritamist inkubeerisin tasse üleöö 30°C

juures. Lugesin tilkkülvist väljakasvanud bakterikolooniate arvu. Seejärel arvutasin ellujäänud rakkude arvu milliliitris.

2.2.6 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

Lutsiferaasi aktiivsused määrasin *P. putida* PaW85, $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ rakkudest, mis sisaldasid plasmidi pKTPdinBluxAB või plasmidi pKTPluxAB (lutsiferaasi reportergeenid *luxAB* on saadud *Vibrio fischer*-st). Rakke kasvasin üleöö 2 ml glc-CAA-Bp söötmes. Hommikul tegin igast bakterikultuurist kuus paralleelset 40-kordse lahjendust 2 ml glc-CAA-Bp söötmega katseklaasi. Seejärel lasin rakkudel kasvada 2 tundi eksponentsiaalsesse kasvufaasi. Kahe tunni möödudes lisasin pooltele katseklaasidele SOS-vastuse indutseerimiseks MMC kontsentratsiooniga 12 $\mu\text{g/ml}$. Lasin rakkudel kasvada veel tund aega, et SOS-vastus saaks aktiveeruda. Lutsiferaasi aktiivsuse määramiseks segasin spetsiaalses testküvetis kokku reaktsioonisegu, mis sisaldas 990 μl fosfaatpuhvrit (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ [pH 7]) ja 10 μl dekanaali (5 mM dekanaal etanoolis). Reaktsiooni käivitasin 100 μl bakterikultuuri lisamisega ning valguse eraldumine mõõdeti pärast 10 minuti möödumist luminomeetriga (TD-20/20; Turner Designs). Lutsiferaasi suhteline aktiivsus (RLU) leiti jagades luminomeetri näit bakterikultuuri tihedusega 580 nm juures ning seejärel leiti paralleelide keskmine.

Katseks sobiva MMC kontsentratsiooni leidmiseks kasvasin *P. putida* Paw85 rakke, mis sisaldasid pKTPdinBluxAB plasmidi, üleöö glc-CAA-Bp söötmes. Hommikul tegin kultuurist 40-kordse lahjenduse kaheksasse eri katseklaasi ning lasin rakkudel kasvada eksponentsiaalsesse kasvufaasi (2h). Seejärel lisasin eri kontsentratsioonidega MMC-d (0, 2, 4, 6 $\mu\text{g/ml}$) ning lasin rakkudel kasvada veel tund aega, et SOS-vastus saaks aktiveeruda. Lutsiferaasi aktiivsust mõõtsin nii, nagu eelnevalt kirjeldatud. Katses võtsin kasutusele MMC kontsentratsiooni 12 $\mu\text{g/ml}$, kuna erinevust oli näha alles 6 $\mu\text{g/ml}$ juures ning rakkude kasvule ei avaldanud antud kontsentratsioon mõju (vt peatükk 2.3.2.1).

2.2.7 β -galaktosidaasi aktiivsuse määramine

β -galaktosidaasi aktiivsused määrasin *P. putida* PaW85, $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ rakkudest, mis sisaldasid plasmidi pKTPP_3901lacZ või plasmidi pKTlacZ. Rakke kasvatati üleöö paralleelselt kahes 1,5 ml LB-Bp söötmes, millest ühele lisati söötmesse SOS-vastuse indutseerimiseks MMC-d kontsentratsiooniga 5 $\mu\text{g/ml}$. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks segasin kokku reaktsioonisegu, mis sisaldas: 1,6 ml Z-puhvrit (60 mM Na_2HPO_4 ; 40 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; 50 mM β -merkaptopetanool; 0,0005 % naatriumdodetsüülsulfaat (SDS); pH

7), 0,4 ml ONPG-lahust (o-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml) ja 0,1 ml kloroformi. Reaktsioonisegusse lisasin reaktsiooni käivitamiseks 50 μ l üleöö kasvanud rakukultuuri ning fikseerisin aeg rakkude lisamisest kuni reaktsiooni peatamiseni. Reaktsioon peatasin 1 ml Na_2CO_3 (1 M) lisamisega.

β -galaktosidaasi eriaktiivsuse arvutamiseks kasutasin kollase värvuse tekkimiseks kulunud aega, kollase värvi intensiivsust ja rakukultuuri tihedust. Tekkinud produkti orto-nitrofenooli hulga määrasin spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 420 nm. Määrasin ka lüüsitud rakkude tiheduse lainepikkusel 550 nm. Eriaktiivsuse hindamiseks milleri ühikutes kasutasin valemit: $E = \frac{1000 \times (OD_{420} - 1,75 \times OD_{550})}{t \times V \times OD_{580}}$, kus t on reaktsiooniks kulunud aeg, V on reaktsioonis kasutatud bakterikultuuri maht milliliitrites, OD_{420} on neeldumine 420 nm juures (tekkinud produkti hulk), OD_{550} on neeldumine 550 nm juures (lüüsunud rakkude hulk) ja OD_{580} on kasutatud rakukultuuri tihedus, mõõdetuna 580 nm juures (Miller, 1972).

2.2.8 LIVE/DEAD kitiga rakkude värvimine ja mikroskoopeerimine

Kasvatasin baktereid üleöö 1,5 ml LB vedelsöötmes nii MMC-ga (5 μ g/ml) kui ilma. Hommikul tegin lahjendused kultuuridest, millele ei olnud lisatud MMC-d ja kasvatasin neid veel 2 tundi. Seejärel lisasin pooltele eksponentsiaalses kasvufaasis olevatele bakterikultuuridele MMC-d kontsentratsiooniga 12 μ g/ml ning lasin kasvada veel tund aega. Värvimiseks kasutasin LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA) kiti värvi SYTO 9. SYTO 9 on väike molekul, mis siseneb rakkudesse läbi kahjustamata rakumembraani. Värvist tegin lahjenduse. Selleks segasin kõigepealt kokku 100 μ l filtreeritud M9-t ning 3 μ l värvi SYTO 9. Seejärel lisasin 990 μ l-le filtreeritud M9-le 10 μ l eelnevalt saadud värvi lahjendust.

Üleöö ilma MMC-ta kasvanud rakkudest tegin kahekordse lahjenduse filtreeritud M9-sse, segades kokku 300 μ l rakke ja 300 μ l M9-t. Üleöö MMC-ga kasvanud rakkudest ja eksponentsiaalse faasi rakkudest lahjendust ei teinud. Seejärel segasin kokku 10 μ l rakke (vastavalt kultuurile kas lahjendatud rakke või eksponentsiaalse faasi kultuuri) ning 10 μ l värvi lahjendust. Saadud segust kandsin 10 μ l tilga 1,5 x 1,5 cm suurusele vesiagari tükile, mis olin asetatud alusklaasile. Kui tilk oli kuivanud, asetasin peale katteklaasi. Värvunud bakterirakke vaatasin fluorestsentsmikroskoobis 100x10 kordse suurendusega. Rakke vaatlesin nii tavalises valguses kui ka kasutades filtrit, mis võimaldas näha roheliselt fluorestseeruvaid baktereid.

2.2.9 Rif^R mutantide tekkesageduse määramine Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga

Mutatsioonisageduse leidmiseks eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes kasutasin Rif^R/*rpoB* testsüsteemi. Katse läbiviimiseks kasvasin bakteritüvesid 6 tundi glc-CAA söötmes. Seejärel tegin tüvedest -5 lahjendused värskesse glc-CAA söötmesse ning jagasin 2,5 ml kaupa katseklaasidesse laiali. Edasi kasvasin baktereid 30°C juures loksutil. Pärast 18-20 tunni möödumist plaatisin 500 µl igast kultuurist LB tardsöötmele, LB tardsöötmele lisasin Rif-i lõppkonsentratsiooniga 100 µg/ml, mis on *P. putida* rakkudele letaalne. Tasse inkubeerisin 30°C juures kaks päeva. Tekkinud Rif^R kolooniaid loendasin 24 ja 48 tunni möödudes (Jatsenko jt., 2010).

Bakterite üldise elumuse määramiseks tegin ühekordsesse M9 puhvrise lahjendused ning kandsin 5 µl tilgad lahjendatud kultuurist LB tassidele. Tasse inkubeerisin 30°C juures üleöö ning järgmisel päeval loendasin kolooniad. Tekkinud kolooniate arvu põhjal leidsin elusrakkude hulga 1 ml-s üleökultuuris kolooniaid moodustava ühikuna (CFU, ingl. K – *colony forming unit*). Kasutades plaaditud kultuuri elusrakkude arvu ja selektiivsöötmele kasvanud Rif^R kolooniate arvu, arvutasin mutantide sageduse kasutades järgmist valemit:

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

2.2.10 Statistiline analüüs

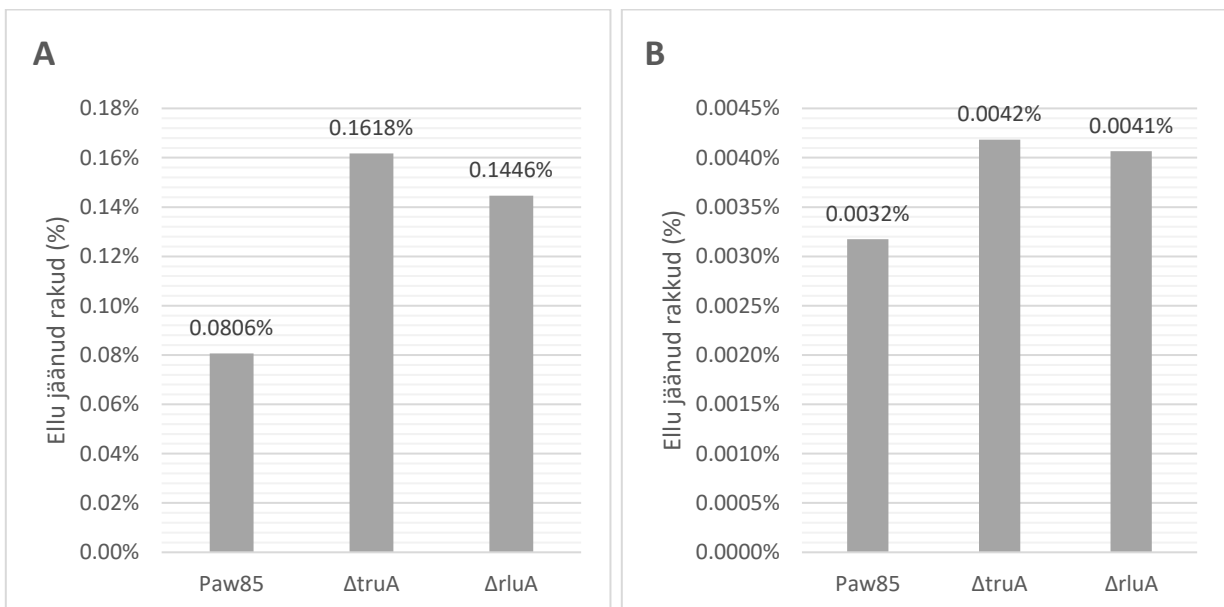
Tulemuste statistiliselt olulise erinevuse leidmiseks kasutasin vabavaralist andmetöötlusprogrammi programmi R dispersioonanalüüsi (one-way ANOVA) ja paariviisilist võrdlemist p-väärtuste leidmiseks. Graafikud koostasid kasutades Microsoft Excelit. p-väärtused on esitatud lisas 1.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 *Pseudomonas putida* Δ truA ja Δ rluA tüvede UV-tundlikkus

Selleks, et välja selgitada, kas pseudouridiini süntaaside TruA ja RluA puudumine aktiveerib SOS vastuse *P. putida* rakkudes, võrdlesin kõigepealt metsiktüübi ning Δ truA ja Δ rluA deletsioontüvede UV-tundlikkust. UV-kiirgus põhjustab rakkudes DNA kahjustusi ning aktiveerib seeläbi SOS vastust (Qin jt., 2015). Juhul kui rakkudes on juba eelnevalt, enne UV-kiirgusega kokkupuudet, SOS vastus ülesse reguleeritud, siis suudavad sellised rakud uuele stressorile kiiremini reageerida ning UV-kiirguses paremini ellu jääda.

P. putida PaW85, Δ truA ja Δ rluA tüvede UV-taluvust võrdlesin nii eksponentsiaalse (joonis 5 A) kui ka statsionaarse kasvufaasi rakkudel (joonis 5 B). Eksponentsiaalse kasvufaasi rakke kiiritasin lainepikkusel 254 nm doosiga 10 J/m², statsionaarse faasi rakke doosiga 30 J/m² doosiga. Doosid said valitud lähtuvalt meie labori varasematest katsetest.



Joonis 5. *P. putida* PaW85, Δ truA ja Δ rluA eksponentsiaalse (A) ja statsionaarse (B) kasvufaasi kultuuride keskmine ellujäämisprotsent peale UV-kiirgusega kiiritamist. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakke kiiritati doosiga 10 J/m² ja statsionaarse kasvufaasi rakke doosiga 30 J/m². Esitatud on kolme sõltumatu katse keskmised tulemused.

Joonisel 5 on näha kolme bioloogiliselt sõltumatu UV-kiiritamise katsete koondtulemused. Pärast UV-kiirgusega kiiritamist jäi eksponentsiaalse faasi rakkudest keskmiselt ellu 0,08% metsiktüüpi rakke, 0,16% Δ truA rakke ja 0,14% Δ rluA rakke. Statsionaarse faasi rakkudest jäi ellu 0,0032% metsiktüüpi rakke, 0,0042% Δ truA rakke ja 0,0041% Δ rluA rakke. Tulemused olid katsete lõikes

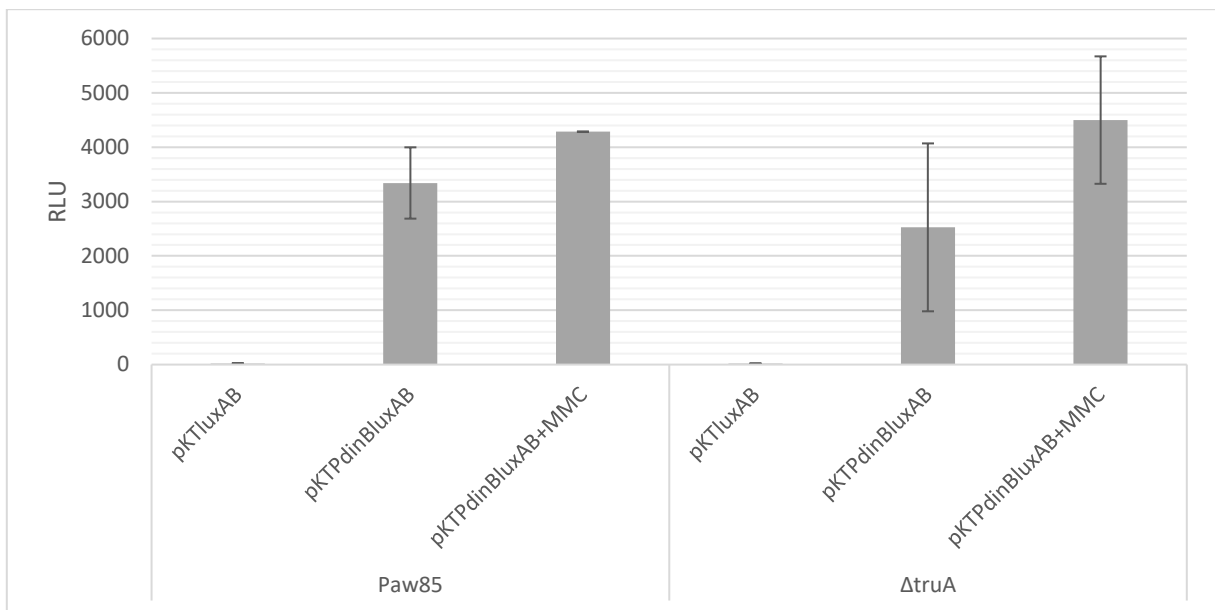
suure varieeruvusega. Metsiktüüpi rakkude ellu jäämine varieerus vahemikus 0,0007% kuni 0,0085%, $\Delta truA$ puhul 0,0012% kuni 0,0085 % ja $\Delta rluA$ puhul 0,0003% kuni 0,0081%. Katsest saan järeldada, et *truA* ja *rluA* geeni puudumine pigem ei mõjuta *P. putida* UV-taluvust. Kuna UV tundlikkuse katsetulemused olid väga varieeruvad, siis otsustasin hinnata SOS vastuse olemasolu *P. putida* *truA* ja *rluA* tüvedes SOS-reguloni kuuluvate geenide aktivatsiooni kaudu.

2.3.2 SOS reguloni kuuluva *dinB* geeni promootori aktiivsus *P. putida* $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedes

DinB (varasemalt kirjanduses nimetatud kui DinP, ka teooria osa peatüki joonisel 4 tähistatud kui DinP) on DNA sünteesil vigu tegev DNA polümeraas IV, mille ekspressioon aktiveeritakse *E. coli* rakkudes SOS-vastuse tulemusena (McKenzie jt., 2001). *P. putida*-s kontrollib *dinB* avaldumist LexA1. Seega saab *dinB* promootorilt lähtuva transkriptsiooni aktivatsiooni järgi hinnata rakkudes LexA1 vahendatud SOS-vastust. Selleks, kasutasin pKTPdinBluxAB plasmidi, kus *P. putida* *dinB* promootor on kioneeritud *Vibrio fischeri* pärinevate lutsiferaasi kodeerivate reportergeenide (*luxAB*) ette (Tegova jt., 2004). Positiivse kontrollina tekitasin rakkudes SOS-vastuse MMC-ga.

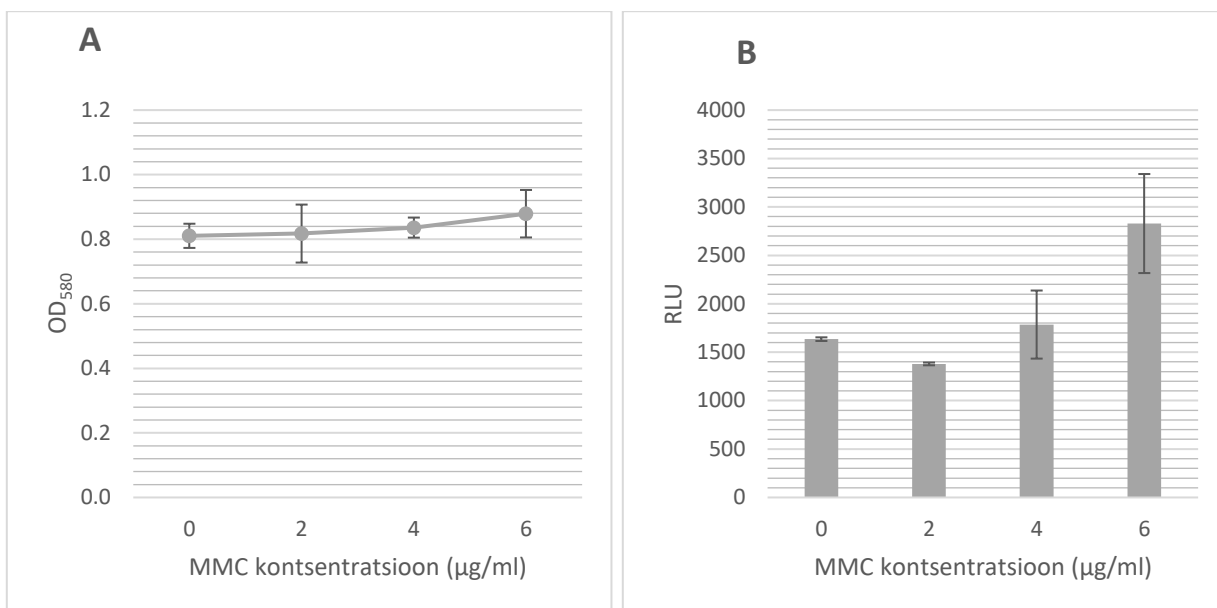
2.3.2.1 SOS vastust indutseeriv MMC kontsentratsioon *P. putida* rakkudes

P. putida rakkudes on võimalik SOS vastust esile kutsuda näiteks MMC lisamisega kasvukeskkonda. MMC on antibakteriaalne ja vähivastane aine, mis põhjustab DNA kahjustusi nii imetajarakkudes kui ka bakterites, tekitades ristsidemeid DNA ahelate vahele (vt peatükk 1.3) (Iyer ja Szybalski, 1964). Varasemalt on meie laboris mõõdetud *P. putida* *dinB* promootori transkriptsiooni aktivatsiooni kasutades SOS vastuse indutseerimiseks MMC-d lõppkontsentratsiooniga 2 $\mu\text{g/ml}$ (Tegova jt., 2004). Lähtusin avaldatud artikli meetodikast, kasvatades bakterirakke LB vedelsöötmes ja SOS vastuse tekitamiseks kasutasin MMC lõppkontsentratsiooniga 2 $\mu\text{g/ml}$.



Joonis 6. *dinB* promootorilt lähtuv lutsiferaasi aktiivsus *P. putida* PaW85 ja $\Delta truA$ tüvedes nii MMC-ga kui ilma, kasvatatud LB vedelsöötmes. Joonisel on esitatud ühe bioloogilise katse keskmine lutsiferaasi aktiivsus koos standardhälbega.

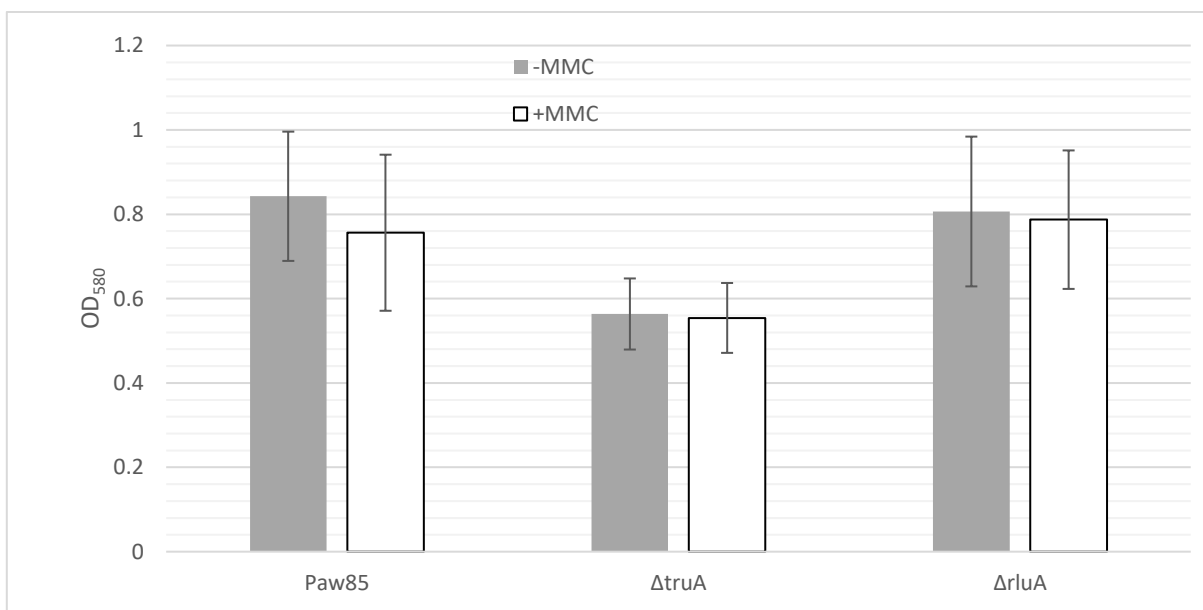
Kuna 2 $\mu\text{g/ml}$ MMC-ga indutseerimisel ei näinud ma *P. putida* rakkudes *dinB* promootorilt lähtuva lutsiferaasi aktiivsuse märgatavat tõusu võrreldes ilma MMC-ta kasvanud rakkudega ning $\Delta truA$ tüve puhul olid tulemused suhteliselt varieeruvad (joonis 6), otsustasin testida MMC erinevaid kontsentratsioone ja kasutada kasvatamisel glükoos-CAA söödet (glc-CAA), mis on defineeritud sööde ning seega on katsetingimused paremini kontrollitavamad ning katsed omavahel paremini võrreldavamad. Selleks kasvasin pKTPdinBluxAB plasmidi sisaldavat *P. putida* PaW85 tüve glc-CAA-Bp vedelsöötmes nii ilma MMC-ta kui erinevate MMC kontsentratsioonide (2, 4 ja 6 $\mu\text{g/ml}$) juuresolekul. Rakkudel lasti kasvada ilma kemikaali juuresolekuta eksponentsiaalsesse kasvufaasi ning seejärel lisati MMC. Rakkudel lasti kasvada veel tund aega, et kemikaal jõuaks avaldada mõju. Joonisel 7 (A) on näha, et kasutatud MMC kogused ei mõjutanud bakterikultuuri optilist tihedust. Joonisel 7 (B) tulemustest on näha, et *dinB* promootorilt lähtuv transkriptsioon suurenes 1,7 korda MMC 6 $\mu\text{g/ml}$ juures, kuid samas see erinevus ei olnud veel statistiliselt oluline (lisa 1). Seega, otsustasin *P. putida dinB* promootori aktiivsuse mõõtmiseks kasutada järgmisi tingimusi: söötmena kasutan defineeritud glc-CAA söödet ning positiivsetel kontrollidel aktiveerin SOS-vastuse MMC-ga kontsentratsiooniga 12 $\mu\text{g/ml}$.



Joonis 7. *P. putida* pKTPdinBluxAB eksponentsiaalsesse kasvufaasi jõudnud bakterikultuuri optiline tihedus erinevatel MMC kontsentratsioonidel (A) ja lutsiferaasi suhteline aktiivsus (B), kasvatatud glc-CAA vedelsöötmes. Joonistel on näidatud katse tulemused koos standardhälbega.

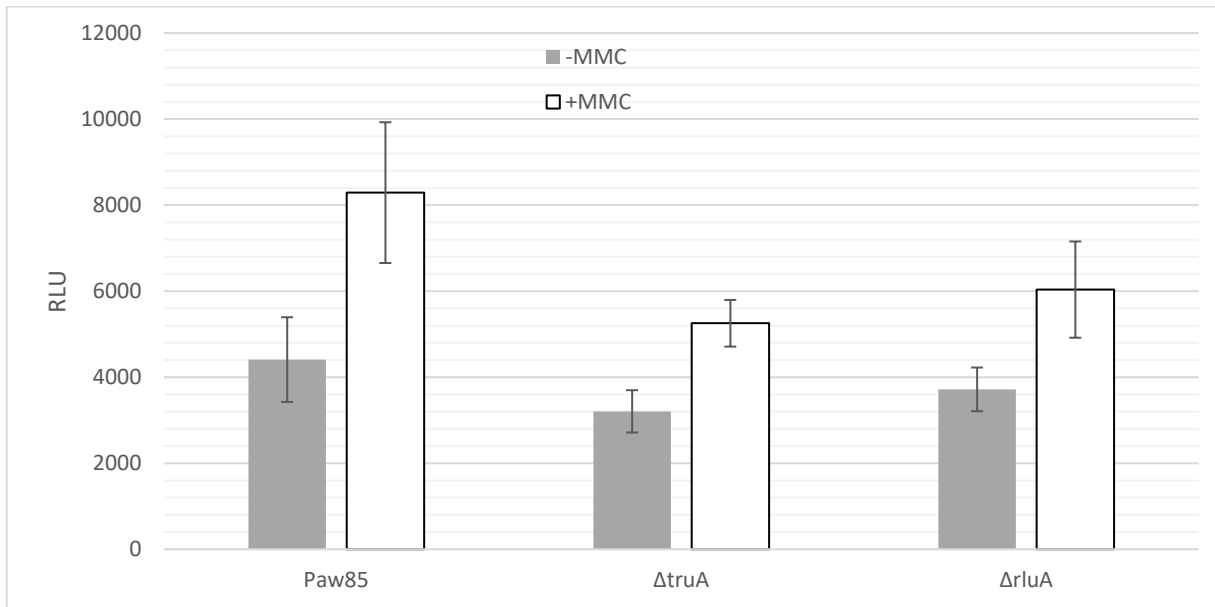
2.3.2.2 *P. putida* *dinB* geeni promotori aktiivsus Δ *truA* ja Δ *rluA* tüvedes

dinB promoororilt lähtuvat lutsiferaasi aktiivsust mõõtsin *P. putida* PaW85, Δ *truA* ja Δ *rluA* tüvede eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest, kasutades plasmidi pKTPdinBluxAB. Positiivseks kontrolliks aktiveerisin SOS-vastuse MMC-ga (12 µg/ml).



Joonis 8. *P. putida* PaW85, Δ *truA* ja Δ *rluA* tüvede kasv 12 µg/ml MMC juuresolekul, kasvatatud glc-CAA vedelsöötmes. Joonisel on näidatud kahe sõltumatu katse keskmised rakutihedused koos standardhälbega.

Jooniselt 8 näeme, et koos MMC-ga ühe tunni jooksul kasvamine ei avaldanud bakterikultuuride kasvule mõju ka 12 µg/ml kontsentratsiooni juures. Sellest järeldasin, et 12 µg/ml on sobiv kontsentratsioon katse läbiviimiseks.



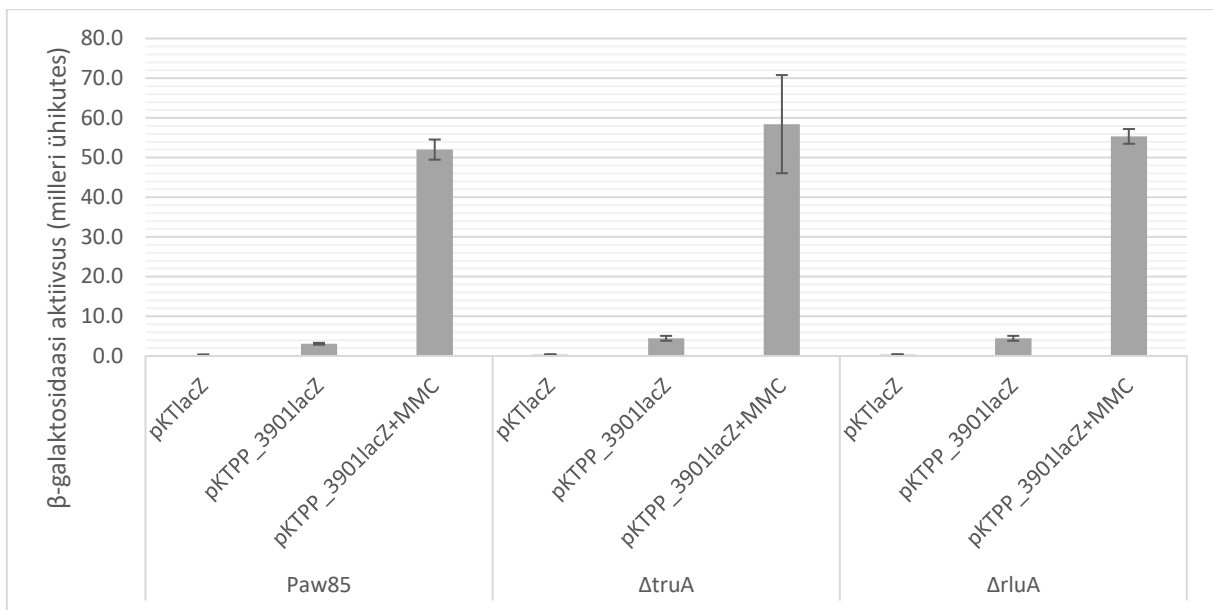
Joonis 9. *dinB* promootorilt lähtuv lutsiferaasi aktiivsus *P. putida* tüvedes PaW85, $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$, kasvatatuna glc-CAA vedelsöötmes. y-teljel on esitatud suhteline valguse eraldumine ehk RLU. Joonisel on näidatud kahe sõltumatu katse keskmised tulemused koos standardhälbe. Positiivse kontrollina indutseeriti SOS-vastus MMC-ga (kontsentratsioon 12 µg/ml).

Joonisel 9 esitatud tulemustest on näha, et nii $\Delta truA$ kui ka $\Delta rluA$ tüves on *dinB* promootori aktiivsus võrreldav metsiktüübiga. Samas kui SOS-vastuse indutseerimisel MMC-ga tõuseb metsiktüübis *dinB* promootorilt transkriptsioon ligi kaks korda, siis $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedes 1,6 korda. Erinevus metsiktüübi ja mutantide vahel on ka statistiliselt oluline (vt lisa 1). Kuna *truA* ja *rluA* deletsioontüvedes on *dinB* promootorilt lähtuv transkriptsioon võrreldav ilma MMC-ta kasvatatud metsiktüübi omaga, siis võib järeldada, et LexA1 kontrollitud SOS-vastuse reguloni geenid pole *truA* ja *rluA* puudumisel *P. putida* rakkudes aktiveeritud. Pseudomonaadidest on *Pseudomonas aeruginosa*-l DNA-mikrokiibiga näidatud, et *dinB* geeni ekspressioonitase tõuseb 3,7 korda pärast kaht tundi indutseerimist tsiprofloksatsiiniga (Cirz jt., 2006), mis on sarnane minu tulemustega, kui tunni aja möödudes nägin kahekordset promootori aktivatsiooni tõusu. Samas huvitaval kombel oli MMC juuresolekul *dinB* promootori aktiivsus madalam pseudouridiini süntaaside TruA ja RluA puudumisel. Kirjandusest sellisele fenomenile seletust leida ei õnnestunud. Võib oletada, et põhjus seisneb MMC sisenemises rakkudesse. Juhul kui

truA või *rluA* mutantsete rakkudes on näiteks vähenenud membraani läbilaskvus, siis MMC sisenemine rakku ei toimu sama efektiivselt kui metsiktüübil. Samas tasuks antud fenomeni edasi uurida.

2.3.3 SOS reguloni kuuluva *PP_3901* geeni promootori aktiivsus *P. putida* Δ *truA* ja Δ *rluA* tüvedes

Kui enamikes bakterites on vaid üks LexA valk, siis *P. putida*-l on neid kaks (vt kirjanduse ülevaade, peatükk 1.4). Enamasti kontrollib SOS-reguloni geene üks kahest LexA valgust, kuid on ka üks SOS-reguloni geen, *PP_3901*, mille transkriptsiooni kontrollivad mõlemad *P. putida* LexA valgud. Seega, *PP_3901* geeni transkriptsiooni aktivatsiooni põhjal saab hinnata nii LexA1 kui LexA2 vahendatud SOS vastust *P. putida* rakkudes. *PP_3901* promootori aktiivsuse mõõtmiseks kasutasin plasmidi pKTPP_3901lacZ kus *PP_3901* promootorala on kloonitud β -galaktosidaasi (*lacZ*) reportergeeni ette. *PP_3901* promootorilt lähtuvat β -galaktosidaasi aktiivsust mõõtsin nii *P. putida* PaW85, Δ *truA* kui ka Δ *rluA* tüvede statsionaarse kasvufaasi rakkudest. Kuna üleöö kasvatades 12 μ g/ml MMC toimeefekt kumuleerus ja mõjutas bakterikultuuri kasvu, alandasin katses kasutatavat MMC kogust. Positiivse kontrollina indutseerisin SOS-vastuse 5 μ g/ml MMC-ga. MMC kontsentratsioonil 5 μ g/ml oli kõigi katses olnud *P. putida* tüvede optiline tihedus ligikaudu kolm korda madalam kui ilma MMC-ta. Kuna β -galaktosidaasi suhtelise aktiivsuse arvutamisel võetakse arvesse ka rakukultuuri tihedust, siis pole selles katses oluline, et erinevatel bakteritüvedel oleks sama optiline tihedus.

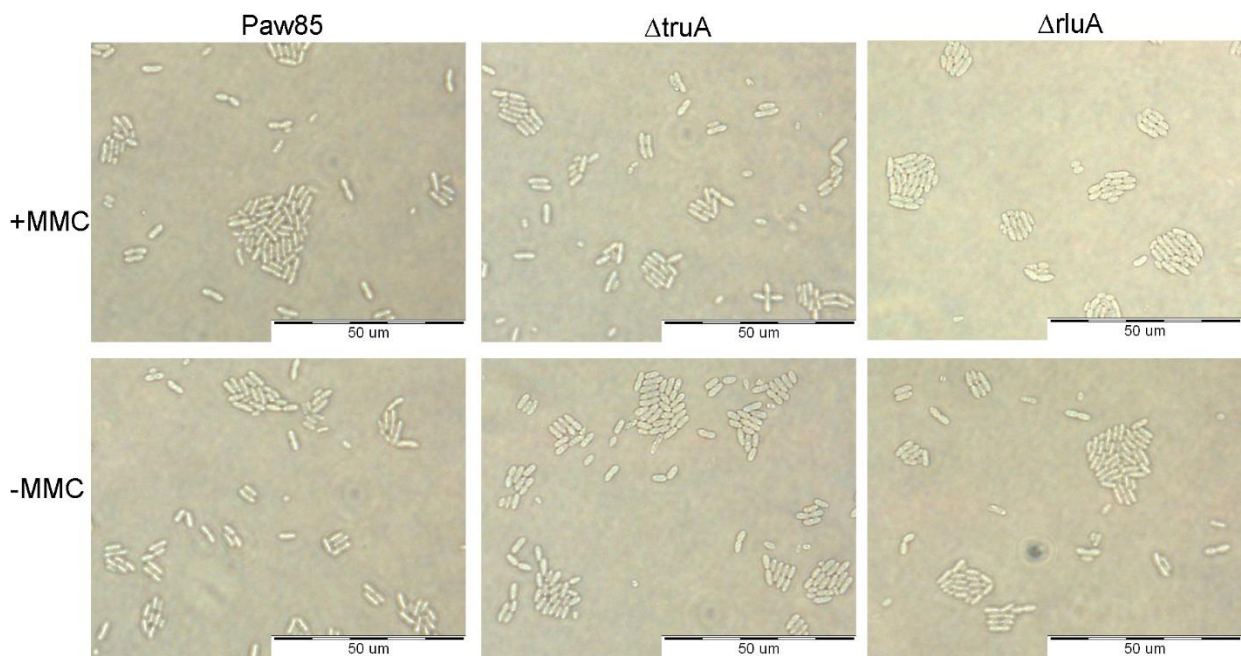


Joonis 10. *PP_3901* promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi aktiivsus *P. putida* tüvedes PaW85 (wt), $\Delta truA$, $\Delta rluA$, kasvatatud LB vedelsöötmes. y-teljel on esitatud β -galaktosidaasi suhteline aktiivsus Milleri ühikutes (vt meetodika peatükk 2.2.7). Kolmest bioloogiliselt sõltumatust katsest on esitatud ühe katse keskmised tulemused koos standardhälbega. Positiivse kontrollina indutseerisin SOS-vastus MMC-ga (kontsentratsioon 5 $\mu\text{g/ml}$).

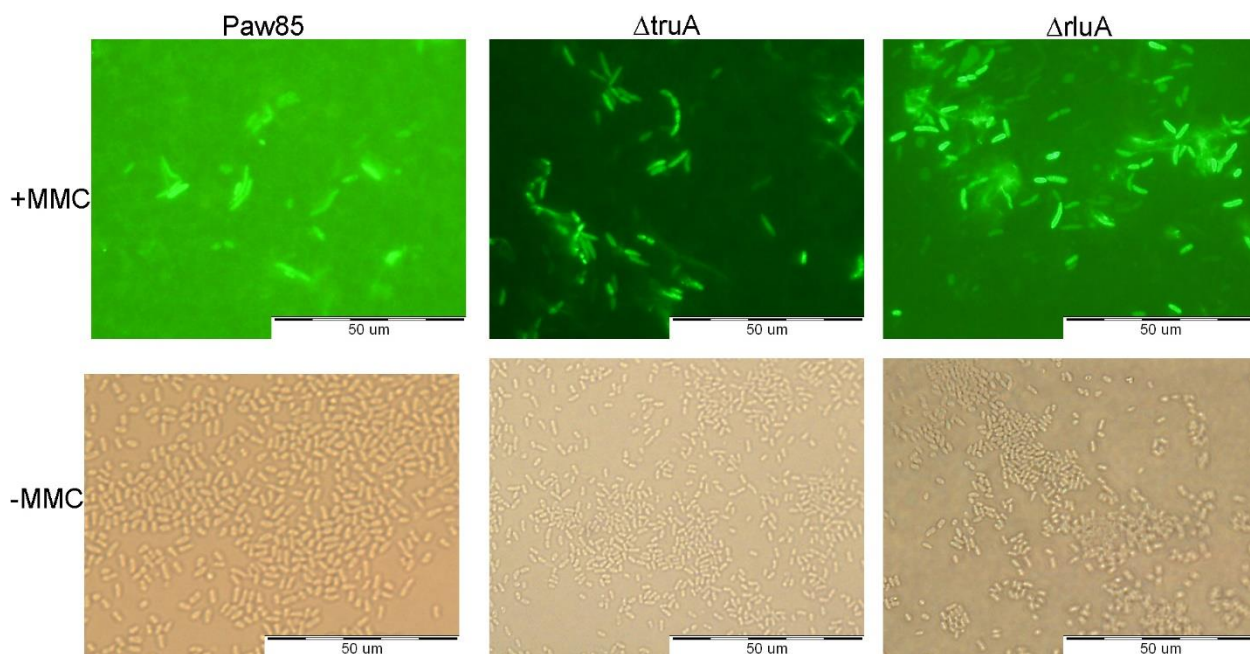
Teostasin kolm bioloogiliselt sõltumatut katset, kuid töös esitamiseks valisin ühe katse, kuna erinevate sõltumatute katsete tulemuste arvulised väärtused olid omavahel üsna varieeruvad. Saadud tulemused joonisel 10 näitavad, et promootoralata pKTlacZ plasmidi sisaldavatel rakkudel β -galaktosidaasi aktiivsus praktiliselt puudub, *PP_3901* promootorilt lähtuv β -galaktosidaasi aktiivsus $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedes on võrreldav metsiktüübi omaga. Kui indutseerida SOS-vastus MMC-ga, tõusis promootori aktiivsus nii metsiktüübis kui ka $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedes üle kümne korra (erinevus statistiliselt oluline). Seda tendentsi, et SOS-vastuse indutseerimisel MMC-ga *truA* ja *rluA* deletsioonitüvedes ei aktiveeru promootor samaväärselt kui metsiktüübis, mida nägin *dinB* promootori korral, *PP_3901* promootori puhul üleöö (umbkaudu 18 tundi kasvanud) MMC-ga indutseerimisel ei esine. See viitab, et MMC vajab TruA või RluA puudumisel rohkem aega, et SOS-vastust aktiveerida, kuid kirjandusest selle hüpoteesi tõestuseks materjali leida ei õnnestunud. Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et *truA* või *rluA* geeni puudumisel ei ole rakkudes aktiveeritud SOS vastus, kuna LexA1 ja LexA2 kontrollitav *PP_3901* promootori aktiivsus polnud metsiktüübiga võrreldes muutunud.

2.3.4 *P. putida* pseudouridiini süntaaside $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ mutantsete rakkude morfoloogia

SOS-vastuse tulemusena muutub ka rakkude kuju, kuna rakkude jagunemine on DNA-s olevate vigade tõttu häiritud. *E. coli* rakkudes toimub SOS-vastuse käigus näiteks *minCDE* operoni sünteesi blokeerimine, mis vastutab bakterites pooldumiseks olulise septumi moodustamise eest. Selle tulemusena tekivad pikad filamentsed rakud. Samuti toimub rakkude jagunemist inhibeerivate geenide aktivatsioon, näiteks *sfiA* (Courcelle jt., 2001). Selleks, et võrrelda *P. putida* *truA* ja *rluA* mutantsete rakkude morfoloogiat metsiktüübi omaga, kasvasin rakke nii MMC juuresolekul (SOS-vastuse olukorras) kui ka MMC puudumisel. Vaatlesin nii üleöö kasvanud statsionaarse faasi rakke, kui ka eksponentsiaalse kasvufaasi rakke. Rakke värvisin SYTO9 värviga ning vaatlesin 100x10 kordse suurendusega nii tavalises valguses kui ka filtriga, mis võimaldas tuvastada rohelistelt värvunud rakke. Kokku pildistasin iga tüve kohta viis vaatevälja. Erinevatest vaateväljadest valisin esitamiseks välja ühe.



Joonis 11. *P. putida* tüvede PaW85 (wt), $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ eksponentsiaalse faasi rakud faaskontrastiga vaadelduna. Esitatud on mitmest vaateväljast üks. Positiivse kontrollina indutseerisin SOS-vastus MMC-ga (kontsentratsioon 12 $\mu\text{g/ml}$). Rakke vaatasin 100x10 kordse suurendusega.



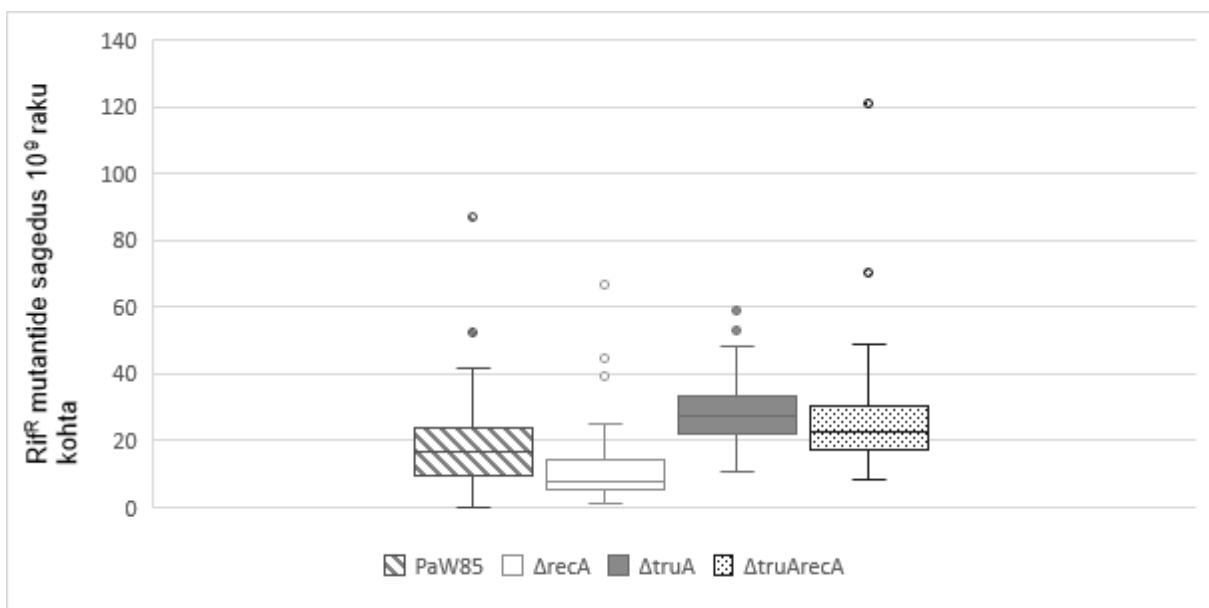
Joonis 12. *P. putida* tüvede PaW85 (wt), $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ statsionaarse faasi rakkude fluoretsents (+MMC) ja faaskontrasti (-MMC) mikroskoobipildid. Esitatud on mitmest vaateväljast üks. Positiivse kontrollina indutseerisin SOS-vastus MMC-ga (kontsentratsioon 5 $\mu\text{g/ml}$). Rakke vaatasin 100x10 kordse suurendusega.

P. putida eksponentsiaalse faasi rakud (joonis 11) on pulkjad ning MMC juuresolek rakkude kasvukeskkonnas (12 $\mu\text{g/ml}$) ühe tunni jooksul rakkude kuju muutust ei põhjustanud. Jooniselt 12 on näha, et üleöö ilma MMC-ta kasvanud *P. putida* statsionaarse faasi rakud on väiksemad ja ümaramad kui eksponentsiaalse faasi rakud. MMC juuresolek (5 $\mu\text{g/ml}$) 12 tunni vältel on enamikul *P. putida* rakkudest SOS vastuse indutseerinud (pikemad rakud). Metsiktüübi, $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvede vahel morfoloogilisi erinevusi näha ei olnud. Erinevuse puudumine eksponentsiaalses kasvufaasis võib tuleneda sellest, et bakterite *P. putida* morfoloogia muutumiseks on vaja pikemat aega kui 60 minutit, kuigi kirjanduses on näidatud, et *E. coli*-l kestab SOS-vastuse aktivatsioon 45-60 minutit pärast aktiveerimist UV kiirgusega või DNA-ga seonduvate kemikaalidega, mille jooksul parandatakse enamik DNA-s olevaid vigu (Janion, 2008). Pseudomonaadidest on kirjandusest teada, et *P. aeruginosa*-l aktiveeruvad SOS-vastuse geenid kahe tunni möödudes pärast SOS-vastuse indutseerimist tsiprofloksatsiiniga (Cirz jt., 2006).

2.3.5 Rif^R mutantide sagedus *P. putida* $\Delta truA$ tüves SOS-vastuse aktiveerumiseks olulise valgu RecA puudumisel

RecA valk on oluline SOS-vastuse aktiveerimisel. SOS-vastuse käigus aktiveeritakse ka spetsialiseeritud Y perekonna DNA polümeraasid, mis võimaldavad ületada DNA kahjustusi, kuid ei ole võimelised DNA sünteesi käigus tehtud vigu ise parandama. Kui rakkudes puudub RecA, ei aktiveerita SOS-vastust ja „vigaderohkeid“ DNA polümeraase. Seega, kui RecA valgu puudumisel *P. putida* $\Delta truA$ tüves väheneb Rif^R mutantide teke, siis võib järeldada, et suurenenud Rif^R mutantide tekkesagedus *P. putida* $\Delta truA$ rakkudes on tingitud SOS-vastuse aktivatsioonist.

Selleks võrdlesin Rif^R mutantide teket nii *P. putida* PaW85, $\Delta truA$, $\Delta recA$ kui ka $\Delta truA \Delta recA$ tüvedes. Kasutasin Rif^R/*rpoB* testsüsteemi, mis võimaldab määrata spontaansete Rif^R mutantide tekkesageduse eksponentsiaalse faasi rakkudes. Rifampitsiin (Rif) on antibiootikum, mis seondub bakteriaalse RNA polümeraasi β subühikuga ja blokeerib transkriptsiooni. Mutatsioonid RNA polümeraasi β subühikut kodeerivas *rpoB* geenis muudavad subühiku konformatsiooni nii, et Rif ei seondu enam RNA polümeraasiga ja tekib resistentsus rifampitsiinile. Kui rakkudes on üldine mutatsioonisagedus on tõusnud, suureneb ka Rif^R mutantide arv (Jatsenko jt., 2010).



Joonis 13. Spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedus *P. putida* PaW85 algtüve, $\Delta recA$, $\Delta truA$ ja $\Delta truA \Delta recA$ deletsioontüvede eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes. Joonisel on esitatud kolme bioloogiliselt sõltumatu katse tulemused koos mediaaniga (horisontaalne kriips). 50% tulemustest mahub värvitud kastide sisse, vurrud näitavad tulemuste väärtuste ülemist ja alumist piiri. Võõrväärtused (ehk väljalöögid) on tähistatud punktidega.

Joonisel 13 esitatud tulemustest on näha, et *P. putida* $\Delta truA$ tüves on Rif^R mutantide sagedus suurem kui metsiktüübil ja $\Delta recA$ tüvel. Rif^R mutantide sagedus on suurem ka siis, kui *P. putida* $\Delta truA$ tüves on deleteeritud *recA* geen. Seega võib järeldada, *P. putida* $\Delta truA$ tüves pole Rif^R mutantide sageduse tõus tingitud RecA aktiveeritud SOS-mutageneesist. Järelikult ei ole mutatsioonisageduse tõus *P. putida* $\Delta truA$ rakkudes põhjustatud SOS vastuse käigus aktiveeruvatest „vigu tegevatest“ DNA polümeraasidest.

Kui vaadata käesoleva töö raames sooritatud katsete tulemusi, siis on näha, et kumbki kahest SOS-reguloni kuuluvast geenist (*dinB* ja *PP_3901*) ei ole TruA-ta ja RluA-ta rakkudes aktiveeritud. Samuti ei ole suurenenud UV-taluvus, muutunud rakkude morfoloogia ning mutatsioonisagedus ei alane, kui lisaks *truA* geenile deleteerida ka SOS-vastuse käivitamiseks oluline geen *recA*. Seega võib järeldada, et TruA või RluA puudumisel ei ole *P. putida* rakkudes aktiveerunud SOS-vastus ning mutatsioonisageduse tõus $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ deletsioontüvedes pole põhjustatud SOS-vastusest.

Kokkuvõte

Kuigi mutatsioonid on enamasti organismile kahjulikud, aitavad need kaasa evolutsioneerumisele. Üheks mutatsioonide tekkevõimaluseks on DNA polümeraasid, mille süntees aktiveeritakse bakterites DNA kahjustuste korral SOS-vastuse käigus ning millel puudub võime parandada DNA sünteesi käigus tehtud vigu. Lisaks DNA kahjustustele võivad bakterites SOS-vastust ja seega ka „vigu tegevaid“ DNA polümeraase aktiveerida valesti transleeritud valgud. Translatsiooni täpsust võivad mõjutada mitmed tegurid. Üheks neist on RNA modifikatsioonid. Levinuim RNA modifikatsioon on pseudouridiini (Ψ), mida sünteesivad ensüüme nimetatakse pseudouridiini süntaasideks.

Meie laboris uuritakse mutatsioonisagedust mõjutavaid tegureid mullabakter *Pseudomonas putida* näitel. Varasemalt on leitud, et pseudouridiini süntaasi *truA* puudumisel suureneb mutatsioonisagedus *P. putida* rakkudes neli korda, *rluA* puudumisel kolm korda. TruA ja RluA on pseudouridiini süntaasid, mis sünteesivad Ψ -d tRNA-s antikoodonlingu lähedusse ja seega võivad mõjutada translatsiooni täpsust (TruA sünteesib Ψ -d tRNA positsioonidesse 38, 39 ja 40 ning RluA tRNA-s positsiooni 32 ja 23S rRNA-s positsioonis 746). Käesoleva töö eesmärgiks oli kindlaks teha, kas mutantide sageduse tõus *P. putida* rakkudes *truA* ja *rluA* puudumisel on põhjustatud SOS-vastuse aktiveerumisest.

Töö tulemused saab kokku võtta järgmiselt:

1. Pseudouridiini süntaaside TruA ja RluA puudumine ei mõjuta *P. putida* rakkude UV-tolerantsust;
2. TruA ja RluA puudumine ei aktiveeri *P. putida* SOS reguloni kuuluva “vigu tegeva“ DNA polümeraasi *dinB* geeni promootorit;
3. TruA ja RluA puudumisel ei ole aktiveerunud LexA1 ja LexA2 kontrollitud SOS reguloni kuuluva *PP_3901* geeni promootor;
4. SOS vastuse tekkimiseks olulise RecA valgu puudumine ei mõjuta *P. putida* *truA* mutandis mutatsioonisagedust
5. TruA ja RluA puudumine ei mõjuta *P. putida* rakkude morfoloogiat.

Kokkuvõtvalt võib järeldada, et TruA ja RluA defektsetes *P. putida* tüvedes nähtud suurem mutatsioonisagedus ei ole põhjustatud aktiveerunud SOS-vastusest.

Involvement of SOS response in the mutant frequency of *Pseudomonas putida truA* and *rluA* defective strains.

Lea Lopp

Summary

Pseudouridine (Ψ) is one of the most common modifications in RNA that makes RNAs more stable by increasing its stacking. In bacteria Ψ are important, for example, for heat shock survival and withstanding oxidative stress. Also, Ψ are important in maintaining the reading frame in translation. Therefore, Ψ can help keeping translation accurate. Enzymes that synthesize Ψ from uridine residues are called pseudouridine synthases. TruA and RluA are proteins synthesizing Ψ in tRNA anticodon loop in *Eserichia coli*.

SOS response is one of the bacterial strategies to cope with harmful environmental conditions. When single-strand DNA is present, the SOS-response is induced. When DNA reparation with other mechanisms fails, error-prone DNA polymerases are synthesized. These enzymes lack proofreading activity and have lower processivity but can replicate damaged DNA. Thereby, replication can continue, at the cost of increased mutation rate. Mostly SOS response is activated by single strand DNA, but also mistranslated proteins can activate SOS response.

It has previously shown that *truA* gene deletion affects mutagenesis, increasing the mutation rate in *Pseudomonas putida* cells four times and removing *rluA* three times. Since both proteins synthesize Ψ in anticodon loop and modifications in RNAs have been shown to influence the accuracy of translation, the deletion of *truA* and *rluA* genes may increase the rate of mistranslation. Mistranslation, in turn, leads to statistical variance of proteins associated with DNA replication and repair and therefore can lead to single-strand DNA and induce SOS-response. Therefore, the increase in mutation rate in cells where *truA* or *rluA* has been deleted may be caused by the activation of the SOS response. The aim of this work was to find out, whether the deletion of *truA* or *rluA* from the genome of *P. putida* induces the SOS response. For that purpose, different methods were exploited: comparison the UV tolerance of the bacterial cultures, the expression studies of genes belonging to the SOS regulon, comparison the morphology of the bacterial cultures and studying the mutation rates in cells lacking RecA, protein important in SOS response. The results of this study are the following:

1. Pseudouridine synthases TruA and RluA do not affect the UV tolerance of *P. putida* cells.

2. Deletion of pseudouridine synthases TruA and RluA do not activate error-prone DNA polymerase *dinB* promoter in *P. putida* cells.
3. Deletion of pseudouridine synthases TruA and RluA do not activate LexA1 and LexA2 controlled SOS gene *PP_3901* promoter in *P. putida* cells.
4. Deletion of *recA* does not influence the mutation rate in *P. putida* Δ *truA* cells.
5. Deletion of *truA* and *rluA* do not affect the morphology of *P. putida* cells.

In conclusion, the increased mutation rate in *P. putida* Δ *truA* or Δ *rluA* cells is not caused by the activation of SOS-response.

Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajat Heilit selle eest, et ta juhendas mind täpselt nii palju, kui vaja, kuid samas piisavalt vähe, et õpiksin iseseisvalt katseid tegema ja tööd kirjutama. Samuti soovin tänada oma laborikaaslast, tänu kellele oli laboris alati rõõmus ja sõbralik õhkkond ning laboris katse tegemine oli mitte päeva tüütum, vaid parim osa. Ning suur tänu kõigile, kes mu tööd läbi lugesid, kirjavigu otsisid ning aitasid kaasa töö valmimisele.

Kirjanduse loetelu

- Abella, M., S. Campoy, I. Erill, F. Rojo & J. Barbe (2007). "Cohabitation of two different *lexA* regulons in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **189**(24): 8855-8862.
- Addepalli, B. & P. A. Limbach (2016). "Pseudouridine in the Anticodon of *Escherichia coli* tRNA^{Tyr}(Q_{psi}A) Is Catalyzed by the Dual Specificity Enzyme RluF." J Biol Chem **291**(42): 22327-22337.
- Arps, P. J., C. C. Marvel, B. C. Rubin, D. A. Tolan, E. E. Penhoet & M. E. Winkler (1985). "Structural features of the *hisT* operon of *Escherichia coli* K-12." Nucleic Acids Res **13**(14): 5297-5315.
- Bacher, J. M. & P. Schimmel (2007). "An editing-defective aminoacyl-tRNA synthetase is mutagenic in aging bacteria via the SOS response." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(6): 1907-1912.
- Baharoglu, Z. & D. Mazel (2014). "SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions." FEMS Microbiol Rev **38**(6): 1126-1145.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy & P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." Mol Gen Genet **154**(2): 203-204.
- Bjork, G. R. & T. G. Hagervall (2014). "Transfer RNA Modification: Presence, Synthesis, and Function." EcoSal Plus **6**(1).
- Boe, L. (1992). "Translational errors as the cause of mutations in *Escherichia coli*." Molecular and General Genetics MGG **231**(3): 469-471.
- Charette, M. & M. W. Gray (2000). "Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why." IUBMB Life **49**(5): 341-351.
- Cirz, R. T., B. M. O'Neill, J. A. Hammond, S. R. Head & F. E. Romesberg (2006). "Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin." J Bacteriol **188**(20): 7101-7110.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown & P. C. Hanawalt (2001). "Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*." Genetics **158**(1): 41-64.
- Cox, M. M. (2007). "Motoring along with the bacterial RecA protein." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 127-138.
- Davidov, Y., R. Rozen, D. R. Smulski, T. K. Van Dyk, A. C. Vollmer, D. A. Elsemore, R. A. LaRossa & S. Belkin (2000). "Improved bacterial SOS promoter∷lux fusions for genotoxicity detection." Mutat Res **466**(1): 97-107.
- Davis, D. R. (1995). "Stabilization of RNA stacking by pseudouridine." Nucleic Acids Res **23**(24): 5020-5026.
- Davis, D. R., C. A. Veltri & L. Nielsen (1998). "An RNA model system for investigation of pseudouridine stabilization of the codon-anticodon interaction in tRNA^{Lys}, tRNA^{His} and tRNA^{Tyr}." J Biomol Struct Dyn **15**(6): 1121-1132.
- De Zoysa, M. D. & Y. T. Yu (2017). "Posttranscriptional RNA Pseudouridylation." Enzymes **41**: 151-167.
- Decatur, W. A. & M. J. Fournier (2002). "rRNA modifications and ribosome function." Trends Biochem Sci **27**(7): 344-351.
- Dixon, D. A. & S. C. Kowalczykowski (1993). "The recombination hotspot *chi* is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *E. coli* RecBCD enzyme." Cell **73**(1): 87-96.

Dorr, T., K. Lewis & M. Vulic (2009). "SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*." *PLoS Genet* **5**(12): e1000760.

Durant, P. C. & D. R. Davis (1999). "Stabilization of the anticodon stem-loop of tRNA^{Lys},3 by an A+-C base-pair and by pseudouridine." *J Mol Biol* **285**(1): 115-131.

Frisch, R. L., Y. Su, P. C. Thornton, J. L. Gibson, S. M. Rosenberg & P. J. Hastings (2010). "Separate DNA Pol II- and Pol IV-dependent pathways of stress-induced mutation during double-strand-break repair in *Escherichia coli* are controlled by RpoS." *J Bacteriol* **192**(18): 4694-4700.

Guerin, E., G. Cambray, N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, I. Erill, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, J. Barbe, M. C. Ploy & D. Mazel (2009). "The SOS response controls integron recombination." *Science* **324**(5930): 1034.

Hoang, C., J. Chen, C. A. Vizthum, J. M. Kandel, C. S. Hamilton, E. G. Mueller & A. R. Ferre-D'Amare (2006). "Crystal structure of pseudouridine synthase RluA: indirect sequence readout through protein-induced RNA structure." *Mol Cell* **24**(4): 535-545.

Horak, R. & M. Kivisaar (1998). "Expression of the transposase gene *tnpA* of Tn4652 is positively affected by integration host factor." *J Bacteriol* **180**(11): 2822-2829.

Humayun, M. Z. (1998). "SOS and Mayday: multiple inducible mutagenic pathways in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **30**(5): 905-910.

Iyer, V. N. & W. Szybalski (1964). "Mitomycins and Porfiromycin: Chemical Mechanism of Activation and Cross-Linking of DNA." *Science* **145**(3627): 55-58.

Janion, C. (2008). "Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*." *Int J Biol Sci* **4**(6): 338-344.

Jatsenko, T., A. Tover, R. Tegova & M. Kivisaar (2010). "Molecular characterization of Rif(r) mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*." *Mutat Res* **683**(1-2): 106-114.

Johnson, L. & D. Soll (1970). "In vitro biosynthesis of pseudouridine at the polynucleotide level by an enzyme extract from *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**(2): 943-950.

Kammen, H. O., C. C. Marvel, L. Hardy & E. E. Penhoet (1988). "Purification, structure, and properties of *Escherichia coli* tRNA pseudouridine synthase I." *J Biol Chem* **263**(5): 2255-2263.

Khil, P. P. & R. D. Camerini-Otero (2002). "Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **44**(1): 89-105.

Kinghorn, S. M., C. P. O'Byrne, I. R. Booth & I. Stansfield (2002). "Physiological analysis of the role of *truB* in *Escherichia coli*: a role for tRNA modification in extreme temperature resistance." *Microbiology* **148**(Pt 11): 3511-3520.

Liang, X. H., Q. Liu & M. J. Fournier (2007). "rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity." *Mol Cell* **28**(6): 965-977.

Lorenz, C., C. E. Lunse & M. Morl (2017). "tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation." *Biomolecules* **7**(2).

McKenzie, G. J., P. L. Lee, M. J. Lombardo, P. J. Hastings & S. M. Rosenberg (2001). "SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification." *Mol Cell* **7**(3): 571-579.

Miller, C., L. E. Thomsen, C. Gaggero, R. Mosseri, H. Ingmer & S. N. Cohen (2004). "SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality." *Science* **305**(5690): 1629-1631.

Miller, J. H. (1972). "Assay of β -galactosidase." *Experiments in molecular genetics*.

Miller, J. H. (1993). "A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria." *Trends in Biochemical Sciences-Library Compendium* **18**: 193.

O'Connor, M., M. Leppik & J. Remme (2018). "Pseudouridine-Free *Escherichia coli* Ribosomes." *J Bacteriol* **200**(4).

Qin, T. T., H. Q. Kang, P. Ma, P. P. Li, L. Y. Huang & B. Gu (2015). "SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance." *Ann Transl Med* **3**(22): 358.

Raychaudhuri, S., L. Niu, J. Conrad, B. G. Lane & J. Ofengand (1999). "Functional effect of deletion and mutation of the Escherichia coli ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA." *J Biol Chem* **274**(27): 18880-18886.

Sassanfar, M. & J. W. Roberts (1990). "Nature of the SOS-inducing signal in Escherichia coli. The involvement of DNA replication." *J Mol Biol* **212**(1): 79-96.

Schlacher, K., P. Pham, M. M. Cox & M. F. Goodman (2006). "Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation." *Chem Rev* **106**(2): 406-419.

Spenkuch, F., Y. Motorin & M. Helm (2014). "Pseudouridine: still mysterious, but never a fake (uridine)!" *RNA Biol* **11**(12): 1540-1554.

Tagel, M., K. Tavita, R. Horak, M. Kivisaar & H. Ilves (2016). "A novel papillation assay for the identification of genes affecting mutation rate in Pseudomonas putida and other pseudomonads." *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **790**: 41-55.

Tang, M., P. Pham, X. Shen, J. S. Taylor, M. O'Donnell, R. Woodgate & M. F. Goodman (2000). "Roles of E. coli DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis." *Nature* **404**(6781): 1014-1018.

Tegova, R., A. Tover, K. Tarassova, M. Tark & M. Kivisaar (2004). "Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in Pseudomonas putida." *J Bacteriol* **186**(9): 2735-2744.

Tomasz, M. (1976). "H₂O₂ generation during the redox cycle of mitomycin C and dna-bound mitomycin C." *Chem Biol Interact* **13**(1): 89-97.

Tuorto, F. & F. Lyko (2016). "Genome recoding by tRNA modifications." *Open Biol* **6**(12).

Urbonavicius, J., Q. Qian, J. M. Durand, T. G. Hagervall & G. R. Bjork (2001). "Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications." *EMBO J* **20**(17): 4863-4873.

Urbonavičius, J., Q. Qian, J. M. Durand, T. G. Hagervall & G. R. Björk (2001). "Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications." *EMBO J* **20**(17): 4863-4873.

Wrzesinski, J., K. Nurse, A. Bakin, B. G. Lane & J. Ofengand (1995). "A dual-specificity pseudouridine synthase: an Escherichia coli synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe)." *RNA* **1**(4): 437-448.

Yang, X., J. Wang, Z. Feng, X. Zhang, X. Wang & Q. Wu (2019). "Relation of the pdxB-usb-truA-dedA Operon and the truA Gene to the Intracellular Survival of Salmonella enterica Serovar Typhimurium." *Int J Mol Sci* **20**(2).

Kasutatud veebiaadressid

<http://modomics.genesilico.pl/modifications/> (viimati külastatud 16.05.2018)

Lisad

Lisa 1. p-väärtused. Statistiliselt olulised tulemused tähistatud tärniga

UV taluvus, eksponentsiaalne kasvufaas			
Tüvi 1	Tüvi 2	p-väärtus	
Paw85	Paw Δ truA	0.241	
Paw85	Paw Δ rluA	0.476	
UV taluvus, statsionaarse faasi rakud			
Paw85	Paw Δ truA	0.481	
Paw85	Paw Δ rluA	0.56	
PP_3901 promootori aktiivsus			
PaW85	Δ truA	1	
PaW85	Δ rluA	1	
PaW85	PaW85_MMC	<0.001	*
Δ truA	Δ truA_MMC	<0.001	*
Δ rluA	Δ rluA_MMC	<0.001	*
MMC kontsentratsiooni määramine, rakukultuuri tihedus			
0 μ g/ml	2 μ g/ml	0.999	
0 μ g/ml	4 μ g/ml	0.975	
0 μ g/ml	6 μ g/ml	0.715	
MMC kontsentratsiooni määramine, lutsiferaasi suhteline aktiivsus			
0 μ g/ml	2 μ g/ml	0.8508	
0 μ g/ml	4 μ g/ml	0.9612	
0 μ g/ml	6 μ g/ml	0.0648	
<i>dinB</i> promootori aktiivsus			
Paw85	Paw Δ truA	0.2974	
Paw85	Paw Δ rluA	0.81853	
Paw85	Paw85_MMC	<0.001	*
Paw Δ truA	Paw Δ truA_MMC	0.01234	*
Paw Δ rluA	Paw Δ rluA_MMC	0.00358	*
Paw85_MMC	Paw Δ truA_MMC	<0.001	*
Paw85_MMC	Paw Δ rluA_MMC	0.0078	*

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lea Lopp,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose SOS-vastuse osalus mutantide tekkesageduses *Pseudomonas putida* pseudouridiini süntaaside *truA* ja *rluA* defektsetes tüvedes

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Heili Ilves, PhD

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, 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.

Lea Lopp

27.05.2019