

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Lauri Koorits

**ImuB ja DnaE2 osalus *Pseudomonas putida* rakkudes
toimuvates mutatsiooniprotsessides**

Magistritöö

**Juhendajad: Andres Tover
Maia Kivisaar**

2007

Sisukord

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1 PROKARÜOOTSED REPLIKATIIVSED POLÜMERAASID	6
2 PROKARÜOOTSED SPETSIALISEERITUD DNA POLÜMERAASID	9
1.2.1 <i>Y- perekonna DNA polümeraasid</i>	9
3. DNA POLÜMERAASIDE REGULATSIOON BAKTERIRAKUS	14
4. LEXA2 REGULEERITUD, DNA KAHJUSTUSE INDUTSEERITUD GEENIDE KASSETT PROTEOBAKTERITES	16
5. EUKARÜOOTSED DNA POLÜMERAASID	17
5.1 <i>Replikatiivsed DNA polümeraasid</i>	17
5.2 <i>Eukariüotsed spetsialiseeritud DNA polümeraasid</i>	18
MATERJAL JA METOODIKA	22
1. SÖÖTMED JA BAKTERITÜVED	22
2. PCR	22
3. E. COLI TRANSFORMATSIOON	24
4. BAKTERITE ELEKTROPORATSIOON	25
5. BAKTERITE KONJUGATSIOON	25
6. PLASMIIDSE DNA ERALDAMINE JA RESTRIKTSIOONANALÜÜS	26
7. P. PUTIDA IMuB JA DnaE2 SUHTES DEFEKTSETE TÜVEDE KONSTRUEERIMINE	27
7.1. <i>DnaE2 defektse P. putida tüve PawDnaE2 konstrueerimine</i>	27
7.2. <i>ImuB defektse P. putida tüve PawImuB konstrueerimine</i>	28
7.3. <i>ImuB ja DnaE2 topelt-defektse P. putida tüve PawImuBDnaE2 konstrueerimine</i> ...	29
8. UV-KIIRITATUD RAKKUDE ELUMUSE MÄÄRAMINE	29
9. PHE ⁺ MUTANTIDE ISOLEERIMINE	30
10. UV-KIIRGUSE POOLT INDUTSEERITUD MUTAGENEES	31
TULEMUSED	33
1. P. PUTIDA DNA POLÜMERAASIDE III JA IV HOMOLOOGE KODEERIVATE GEENIDE DnaE2 JA IMuB IDENTIFITSEERIMINE	33
2. DnaE2 JA IMuB OSALUS P. PUTIDA RAKKUNES TOIMUVATES MUTATSIOONIPROTSSESSIDES	34
3. MUTATSIOONIPROTSSESSID IMuB JA DnaE2 NING IMuB JA DinB SUHTES TOPELTDEFEKTSETES P. PUTIDA TÜVEDES	35

4. IMUB JA DNAE2 OSALUS UV MUTAGENEESIS	37
ARUTELU	38
KOKKUVÕTE	42
SUMMARY.....	43
KIRJANDUSE LOETELU.....	44

Töös kasutatud lühendid

PCNA (proliferating cell nuclear antigene)

RFC (replication factor C)

γ HOPdG (γ -Hydroxy-1, N²-propano-2' deoxyguanosine)

AP sait (apurinic, apyrimidinic site)

TT cis-syn fotodimeer

TT (6-4) fotoprodukt

BaP DE [benzo (a) pyrene diol epoxide]

AAF (N-2-acetylaminoflourene)

Tg (Thymine glycol)

CPD (cyclobutane pyrimidine dimer)

UV (ultra violet)

MMC (mitomycin C)

ssDNA (single stranded DNA)

dsDNA (double stranded DNA)

SSB (single strand binding protein)

Glc

Km

Cb

Ap

Tet

Rif

Phe

Pol

ah

WT (*Wild Type*)

β klambri eukarüootne homoloog

bakteriaalse γ kompleksi

eukarüootne homoloog

DNA kahjustus

lämmastikaluseta nukleotiidi asukoht

kahe tüümiini nukleotiidi *cis-syn*

fotodimeer

kahe tüümiini nukleotiidi (6-4)

fotoprodukt

DNA kahjustus

G nukleotiidi modifikatsioon

DNA kahjustus

tsüklobutaan pürimidiin dimeeri

ultraviolet kiirgus

mitomütsiin C

üheaheelaline DNA

kaheaheelaline DNA

üheaheelalist DNA-d siduv valk

glükoos

kanamütsiin

karbenitsilliin

ampitsilliin

tetratsükliin

rifampitsiin

fenool

polümeraas

aminohape

algne tüvi

Sissejuhatus

Bakterirakus tekib pidevalt elutegevuse käigus ja erinevate eksogeensete tegurite mõjul DNA kahjustusi. Üheks DNA kahjustustega toimetulekumehhanismiks bakterirakkudes on erinevate spetsialiseeritud DNA polümeraaside ekspressiooni indutseerimine. *E. coli* rakkudes on spetsialiseeritud DNA polümeraasid PolII, PolIV ja PolV SOS vastuse poolt indutseeritavad (Napolitano jt., 2000). *P. putida* rakkudes toimub nende geenide ekspressioon konstitutiivsel tasemel. Hiljuti leiti *P. putida* kromosoomist nn. „mutageensuse operon” *lexA2-imuA-imuB-dnaE2*, mille ekspressioon on DNA kahjustuste poolt indutseeritav ning kontrollitud operoni esimese geeni *lexA2* poolt kodeeritud repressorvalgu LexA2 abil. Selle operoni *imuA* geen kodeerib rakujagunemise inhibiitorvalgu SulA homoloogi. *imuB* ja *dnaE2* geenid kodeerivad vastavalt PolIV homoloogi ja PolIII katalüütilise subühiku homoloogi. Praeguseks on teada, et sarnane geeniklaster on Proteobakterite hulgas laialt levinud (Abella jt., 2004).

Kirjanduses on näidatud, et *Mycobacterium tuberculosis* rakkudes vahendab DnaE2 SOS mutageneesi ja aitab kaasa antibiootikumiresistentsuse tekkimisele (Boshoff jt., 2003). Samuti on selle operoni poolt kodeeritavad DNA polümeraasid vastutavad enamuse kahjustuse poolt indutseeritud mutatsioonide tekke eest *Caulobacter crescentus* rakkudes (Galhardo jt., 2005).

Minu töö eesmärgiks oli uurida DnaE2 ja ImuB valkude osalust *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides.

Minu magistritöö valmimisele kaasaaitamise eest olen tänulik Andres Toverile ning samuti suur tänu Radi Tegovale konstruktiivsete kommentaaride eest.

Kirjanduse ülevaade

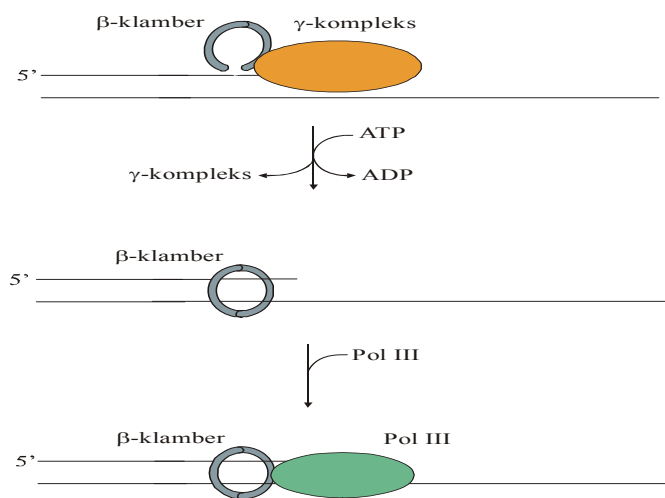
DNA polümeraasid on jagatud fülogeneesi alusel kuude perekonda - A, B, C, D, X ja Y. A-perekond on tüpifitseeritud *Escherichia coli* DNA polümeraas I-e (PolI) järgi; B- perekond *E. coli* DNA polümeraas II-e (PolII) järgi; C- perekond *E. coli* DNA polümeraas III-e (PolIII) katalüütilise α subühiku järgi. D- perekonda kuuluvad arheobakterite polümeraasid, X-perekonna tüüpesindajaks on eukarüootne Pol β . Y- perekonna moodustavad erinevad spetsialiseeritud DNA polümeraasid, mis jagatakse viide alam perekonda (UmuC, DinB, Rev1, Pol η ja Pol ι). Funktsiooni alusel võib DNA polümeraasid jagada kahte suurde rühma: replikatiivseteks ja spetsialiseeritud DNA polümeraasideks.

1 Prokarüootsed replikatiivsed polümeraasid

Põhiline replikatiivne DNA polümeraas bakterirakus on PolIII, mis viib läbi kromosoomi replikatsiooni ning mille apoensüüm koosneb α , ϵ ja θ subühikutest. *E. coli* PolIII on C-perekonda kuuluv suure täpsusega DNA polümeraas, mis teeb ühe vea $\sim 10^5$ aluspaari kohta. *dnaE* geeni poolt kodeeritud PolIII katalüütiline α subühik lisab sünteesitavale ahelale nukleotiide 5'-3' suunas. DNA PolIII ϵ subühik, mis on kodeeritud *dnaQ* geeni poolt omab 3'-5' eksonukleaaset *proofreading* aktiivsust, mis aitab ära tunda ja eemaldada valesti paardunud nukleotiide ning langetab seeläbi DNA replikatsioonil tehtavate vigade sageduse ligikaudu 10^{-10} -ni (Schaaper jt., 1993). Apoensüümi kolmas subühik θ , mis on kodeeritud *holE* geeni poolt, ainuke teadaolev funktsioon on ϵ subühiku stimuleerimine (Slater jt., 1994).

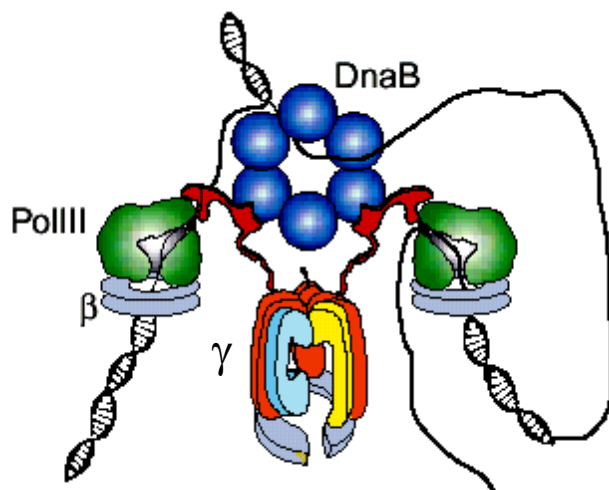
PolIII apoensüümi DNA sünteesi kiirus on madal, inkorporeerides 20 nt/s ja lisaks on see ensüüm madala protsessiivsusega, lisades ahelasse 1-10 nukleotiidi ühe seondumissündmuse kohta. PolIII efektiivsust suurendab seondumine β klambriga. Apoensüüm, mis on seondunud β klambriga muutub kiiremaks, sünteesides 750 nt/s, ja protsessiivsemaks suutes sünteesida ühe ahelale seondumise kohta >50 kb. β klamber funktsioneerib homodimeerina moodustades ringikujulise struktuuri, mis ümbritseb dsDNA-d (Joonis 1) (Lopez ja O'Donnell, 2001; Dalrymple jt., 2001). DNA polümeraasi apoensüüm seondub otseselt β klambriga ja edasi liikudes DNA ahelal tõmbab seda endaga kaasa. DNA PolIII holoensüümi kuulub ka γ kompleks, mille ülesandeks on PolIII apoensüümi kompleksi asetamine replikatsioonikahvlisse ning selle kompleksi kooshoidmine replikatsiooni vältel. γ kompleks, mis koosneb seitsmest subühikust ühendab replikaasis olevat kahte apoensüümi omavahel ja

sellega interakteeruvat replikatiivset helikaasi DnaB. PolIII holoensüümile sünteesib RNA praimerid primaas, mis on kodeeritud *dnaG* geeni poolt. Vajalik on veel SSB olemasolu, mis on kodeeritud *ssb* geeni poolt ja on vajalik üheaahelalise DNA sekundaarstruktuuride lahtiharutamiseks ja kaitsmiseks. Bakterirakus on kromosoomi replikatsioonil vajalik ka PolI, mis kuulub DNA polümeraaside A- perekonda. PolI osaleb bakterirakus Okazaki fragmentide sünteesil vajalike praimerite degradatsioonil ja praimerite kohale tekkinud tühikute täissünteesil (Kornberg jt., 1992). Kõik eelpool nimetatud valgud moodustavad DNA replikatsiooni läbiviimiseks DNA replisoomi kompleksi (Joonis 2) (O'Donnell jt., 2001).

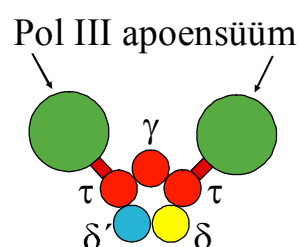


Joonis 1. γ kompleks asetab β -klambri praimerit omavale üheaahelalisele DNA-le. β -klamber hoiab DNA polümeraasi replikatsiooni käigus DNA ahelal. Joonisel on β klamber tähistatud sinise, γ kompleks oranži ja DNA polümeraas III apoensüüm roheline värviga.

A



B



Joonis 2.

a) Replikatsioonikahvlis asetsev DNA polümeraas III holoensüüm. Nii juhtivat kui ka mahajäävat ahelat sünteesiv DNA polümeraas III apoensüüm (joonisel kujutatud rohelisena) on seondunud DNA-d ümbritseva β -klambriga (joonisel kujutatud sinise rõngana). DNA polümeraas III apoensüüme omavahel ja holoensüümi helikaasiga (joonisel kujutatud tumesinisena) ühendab gamma kompleks (tähistatud γ).

b) Skeem γ kompleksi subühikute asetumisest üksteise suhtes DNA polümeraas III koosseisus. γ kompleksi vastavad subühikud on tähistatud neile vastavate kreeka sümbolitega. Jooniselt on näha, et τ subühik seondub DNA polümeraas III apoensüümi (joonisel kujutatud rohelisena) C-terminaalse domääni abil (joonisel tähistatud punasega).

Tabel 1. Replikatiivsed DNA polümeraasid

BAKTERIS	INIMES	GEEN	POLÜMERAASI PEREKOND
PolI		<i>polA</i>	A
PolIII		<i>dnaE</i>	C
	Pol α	POLA	B
	Pol δ	POLD1	B
	Pol ϵ	POLE1	B

2 Prokarüootsed spetsialiseeritud DNA polümeraasid

1.2.1 Y- perekonna DNA polümeraasid

Y- perekonna polümeraasid erinevad teistest polümeraasidest madala sünteesitäpsuse poolest kahjustamata DNA-l ja oma võime poolest ületada DNA kahjustusi, mis replikatiivsetel polümeraasidel blokeeriksid replikatsiooni. Vaatamata sellele, et Y- perekonna polümeraasidel on 5 sarnast konserveerunud järjestusega domääni ja ühine struktuurne ülesehitus, on need polümeraasid üksteisest märkimisväärselt erinevad oma funktsionaalsuselt (Jarosz jt., 2006).

Y- perekonna DNA polümeraasid jagunevad viide alam perekonda. 1) UmuC on tüpifitseeritud *E. coli* PolV järgi ning esineb vaid prokarüootides. 2) DinB on olemas nii prokarüootides, eukarüootides ja arhede ning on tüpifitseeritud *E. coli* PolIV, inimese Pol κ ja arhede ensüümide Dpo4 ja Dbh järgi. Ülejäänud kolme alam perekonda kuuluvad ainult eukarüootides leiduvad polümeraasid: 3) Rev1, 4) Pol η ja 5) Pol ι (Prakash jt., 2005).

Erinevate eksogeensete või endogeensete mõjurite toimel tekivad rakus mitmesugused DNA kahjustused, mille olemasolu võib olla letaalne. Selliseid kahjustusi võidakse eemaldada mitmete DNA reparatsioonisüsteemide abil. Olukorras, kus lühikese aja jooksul tekib palju DNA kahjustusi on tõenäosus, et kõiki neid ei suudeta ahelast eemaldada DNA reparatsioonisüsteemide abil. Selleks, et kahjustusi ületada on rakus olemas spetsialiseeritud DNA polümeraasid. Y- perekonna polümeraasid ja DNA polümeraaside B- perekonda kuuluv ja ainult eukarüootsetes organismides leiduv Pol ζ on vastutavad rakus toimuva üle DNA kahjustuse replikatsiooni eest, tehes seda kas vigadevabalt või vigaderohkelt, olenevalt DNA kahjustuse tüübist ja erinevate polümeraaside konkurentsist/juurdepääsust kahjustusele. Eelkõige toimub DNA polümeraaside konkurents seondumise pärast β klambriga, mis

võimaldab juurdepääsu DNA ahelale, et asendada replikatiivset polümeraasi, kui see on dissotsieerunud DNA ahelalt kahjustuse tõttu, mida ei suudeta ületada (Goodman, 2002).

Üldise mudeli järgi DNA ahelas oleva kahjustuseni jõudes replikatiivne polümeraas peatub ja replikatsiooni jätkab ajutiselt mõni spetsialiseeritud polümeraas. See, milline spetsialiseeritud polümeraasidest jätkab DNA sünteesi sõltub DNA kahjustuse tüübist ja konkreetse polümeraasi kättesaadavusest rakus. Erinevalt replikatiivsetest polümeraasidest puudub spetsialiseeritud polümeraasidel *proofreading* 3'-5' eksonukleasne aktiivsus, mistõttu on nende polümeraaside poolt tehtav DNA süntees vigaderohke. Spetsialiseeritud DNA polümeraasid töötavad sageli kooperatiivselt. Tavaliselt üks spetsialiseeritud polümeraas lisab nukleotiidi/nukleotiidid kahjustuse vastu ning teine spetsialiseeritud polümeraas pikendab ahelat kuni kahjustatud DNA järjestus on replikatiivse polümeraasi *proofreading* aktiivsuse mõjualast väljas (Goodman, 2002).

Y- perekonna polümeraaside aktiivtsenter erineb tunduvalt replikatiivsete DNA polümeraaside omast kuna see on palju "avatuma" struktuuriga, võimaldades aktiivtsentrisse siseneda ka modifitseeritud nukleotiididel ja samuti on steeriliselt palju vähem vastsünteesitud aluspaari ümber. Need on tähtsaimad omadused, mis lubavad Y-perekonna polümeraasidel moodustada Watson-Crick aluspaaridest erinevaid aluspaare. Järgnevalt annan ülevaate kõigist prokarüootsest spetsialiseeritud polümeraasidest eraldi (Ling jt., 2001).

DNA polümeraas IV. *E. coli* rakkudes on kaks Y- perekonna polümeraasi, PolV (UmuD'C) ja PolIV (DinB). DNA polümeraas IV-ja (PolIV) kodeeriv *dinB* geen identifitseeriti esmalt kui üks kromosoomi *din* (*damage- inducible*) geenidest (Kenyon ja Walker, 1980). *In vitro* katsetega on näidatud, et põhiliselt osaleb see polümeraas -1 raaminihkemutatsioonide ning asendusmutatsioonide tekkes, millest kõige sagedasemad on T→G ja T→C transitsioonid (Kobayashi jt., 2002).

Lisaks sellele on PolIV oluline normaalse DNA replikatsiooni tagamisel *E. coli* rakkudes, kus PolIV "päästab" peatunud replikatsioonikahvleid, pikendades valesti paardunud praimereid ja tekitades selle tulemusena võimaluse DNA PolIII-el replikatsiooni jätkata (Kim jt., 1997). See PolIV funktsioon on olulise tähtsusega nii prokarüootide kui ka eukarüootide jaoks ning arvatavasti sellepärast on leitud PolIV-ja homolooge kõigist seni uuritud organismidest (Ohmori jt., 2001).

PolIV-l puudub *proofreading* aktiivsus. Vale nukleotiidi DNA ahelasse sisestamise sagedus on $\sim 10^{-3}$ - 10^{-5} . β klambri ja γ -kompleksiga seondudes muutub PolIV potsessiivsemaks, kuid see ei avalda mõju DNA sünteesi täpsusele (Kobayashi jt., 2002). PolIV ei oma tähtsust üle UV kahjustuste sünteesis (Friedberg jt., 1995) kuid osaleb DNA kahjustuse BaP DE [benzo (a) pyrene diol epoxide] ületamisel, põhjustades sellega ühenukleotiidiliste deletsioonide teket (Napolitano jt., 2000). Siiski peetakse PolIV-ja peamiseks ülesandeks adaptatiivsete mutatsioonide tekitamist bakterile ebasobivates kasvutingimustes, võimaldades selle abil kohaneda uue keskkonnaga (Rosenberg, 2001).

Arhedest pärit DinB homoloogid. Arhedest leitud DNA PolIV-ja homoloogide Dbh ja Dpo4 kristallstruktuurid on olnud olulise tähtsusega Y- perekonna polümeraaside funktsiooni mõistmiseks (Ling jt., 2001). Dbh ja Dpo4 on väga sarnased oma prokarüootsete ja eukarüootsete DinB homoloogidega. *S. solfataricus* P2 Dpo4 vale nukleotiidi sünteesisagedus ulatub 10^{-3} kuni 10^{-4} , mis on omane Y- perekonna polümeraasidele. Erinevalt *E. coli* DinB-st ja inimese Polk-st suudab Dpo4 ületada *cis-syn* tsüklobutaan tümidiini dimeere (Boudsocq jt., 2001). Oma kahjustuse ületamise ensümaatilistelt omadustelt on Dpo4 sarnane eukarüootse polümeraasiga η (Ishikawa jt., 2001). Dpo4 seondub replitseeruva aluspaariga ebaspetsiifiliselt, lõdvendades sellega aluse valikut, mida võimaldab Dpo4 omadus mahutada aktiivtsentrisse korraga kaks matriitsi alust.

DNA polümeraas V. DNA polümeraas V (PolV) on Y- perekonna polümeraas, mille homolooge on leitud ainult prokarüootsetest organismidest. *E. coli*'s on PolV kodeeritud *umuC* ja *umuD* geenide poolt. UmuC on PolV-e katalüütiline subühik. Enne funktsionaalse polümeraasi moodustumist peab toimuma UmuD autokatalüütiline protsessimine RecA- üheahelalise DNA nukleoproteiinfilamendi vahendusel. UmuD protsessitakse oma aminoterminaalse otsa aminohapete jääkide 24 ja 25 vahelt, mille tulemusel moodustuvat valku nimetatakse UmuD'. Kaks UmuD' molekuli koos ühe UmuC molekuliga moodustavad funktsionaalse PolV-e (UmuD'₂C), (Bruck jt., 1996; Tang jt., 1998).

PolV viib läbi vigaderohket üle kahjustuse DNA sünteesi ning sarnaselt teiste Y- perekonna polümeraasidega puudub ka sellel polümeraasil *proofreading* aktiivsus (Tang jt., 1999). PolV aitab replikatiivsetel polümeraasidel ületada UV kiirguse poolt põhjustatud TT *cis-syn* fotodimeere ja TT (6-4) fotoprodukte (Tang jt., 2000). Prefiks umu tähendab UV mutagenesis.

UV poolt indutseeritavaid mutatsioone ei teki kui rakkudes on puudu kas *umuC* või *umuD'* valk (Sommer jt., 1993).

PolV homolooge kodeerivad geenid on sageli plasmiidset päritolu (Kim ja Sundin, 2000; Tark jt., 2005; Sundin jt., 1996; Zhang ja Sundin, 2004). Taimepatogeen *Pseudomonas syringae* puhul on näidatud, et plasmiidis pPSR1 asuvad DNA polümeraas V-e homolooge kodeerivad *rulAB* geenid. Nende geenide ekspressioon tõstab bakteri virulentsust suurema UV tolerantse kaudu, võimaldades bakteritel jääda ellu lehepindadel, mis on eksponeeritud DNA-d kahjustavale UV kiirgusele (Sundin jt., 1999). *Pseudomonas putida*'s kirjeldatud *rulAB* geenid on samuti plasmiidset kodeeritavad (TOL pWW0). Nende geenide ekspressioon tõstab rakkude UV kiiritamise järgset elumust. Samuti on näidatud, et *rulAB* geenide olemasolul kultuuris ilmneb GASP fenotüüp ehk statsionaarse faasi kasvueelil neid gene mitte sisaldava kultuuri suhtes (Tark jt., 2005).

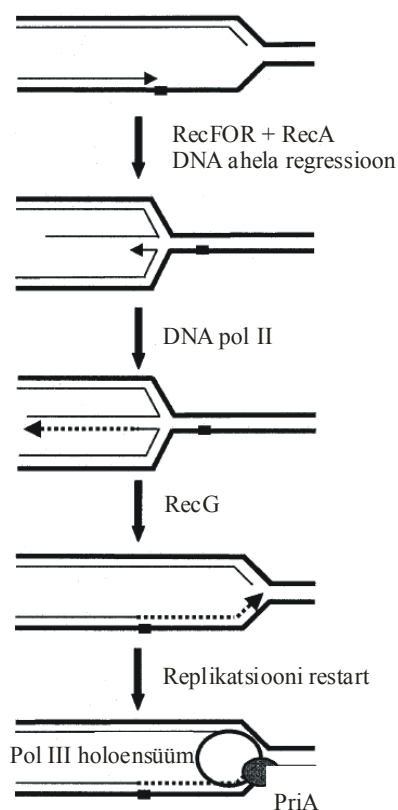
Konstitutiivselt on *E. coli* rakus ≤ 15 PolV-e molekuli, see arv tõuseb SOS induktsiooni järgselt ligikaudu 200-ni. PolV ekspressioon indutseeritakse viimaste SOS reguloni geenide seas, umbes kolmveerand tundi peale DNA kahjustuse tekkimist. See lisaaeg enne PolV-e taseme tõusu rakkudes on vajalik selleks, et anda võimalus erinevate DNA reparatsioonisüsteemide ja vigadevabade polümeraaside abil kõrvaldada kahjustused DNA ahelas, enne kui asub tööle vigaderohke PolV, mis viib läbi üle kahjustuse DNA sünteesi.

DNA polümeraas II. DNA polümeraas II (PolII) on B-perekonna polümeraas, mille ekspressioon *E. coli* rakkudes on SOS indutseeritav ning mille molekulide arv tõuseb SOS induktsiooni korral umbes 7 korda, ulatudes 350 molekulini raku kohta (Reuven jt., 1998). PolII kodeeriv geen *polB* on üks esimesi gene, mille ekspressioon indutseeritakse DNA kahjustuse korral (vähem kui ühe minuti jooksul peale UV-ga kiiritamist) (Sommer jt., 1998).

Vaatamata sellele, et PolII sünteesib DNA-d täpselt ja omab *proofreading* aktiivsust on see polümeraas vastutav guaniini AAF (N-2-acetylaminoflourene) kahjustuste korral -2 raaminihkemutatsioonide genereerimise eest. Kusjuures sama kahjustuse vigadevaba ületamist võimaldab PolV. Mõlemad polümeraasid konkureerivad seega samale replikatsiooni intermediaadile (Goodman, 2002).

PolII-e tähtsaim roll arvatakse olevat osalemine UV kiiritamise järgsel replikatsiooni *restardil*. Replikatsioonikahvel peatub jõudes DNA ahelas oleva kahjustuseni, mis peatab

DNA sünteesi. Juhtiva ahela blokeerumine viib RecA nukleoproteiini tekkimiseni, mille tulemusel ekspresseeritakse rakkudes SOS reguloni geene, sh. PolIII. RecA nukleoproteiini tekkimist vahendavad RecOR valgud ja stabiliseerivad RecFR valgud. Järgnevalt toimub RecA nukleoproteiini vahendatud replikatsioonikahvli tagasi liikumine, mille tulemusel moodustub nn. kanajala struktuur, kus paardumata vastsünteesitud mahajääv ahel on matriitsiks PolIII-le. Peale PolIII-e poolt läbiviidavat DNA sünteesi toimub RecG sõltuv replikatsioonikahvli regressioon teistpidises suunas. PriA primosoomi kompleksi abil taastatakse tavapärane replikatsioon PolIII holoensüümi laadimisega replikatsioonikahvlisse (Goodman, 2002).



Joonis 3.

Replikatsiooni *restarti* mudel.

DNA kahjustuste tulemusena tekib rakkus üheaahelalist DNA-d, millega seondub RecFOR valkude abiga RecA. Peatunud replikatsioonikahvel liigub tagasi nii, et paardumata mahajääv ahel muutub matriitsiks pol II-e poolt läbiviidavale DNA sünteesile. Peale seda kui pol II dissotsieerub matriitsilt, vahendab RecG kahvli liikumist vastupidises suunas RecA/RecFOR-ile ja seeläbi võimaldab kahjustuse ületamist ilma vigaderohke üle kahjustuse DNA sünteesita. PriA tunneb ära selle struktuuri ja vahendab pol III holoensüümi laadimist vastsünteesitud DNA-le, selleks et taastada protsessiivne replikatsioonikahvel, mis on võimeline läbi viima genoomi duplikatsiooni.

Tabel 2. Spetsialiseeritud DNA polümeraasid

BAKTERIS	INIMESSES	GEEN	POLÜMERAASI PEREKOND
PolII		<i>polB</i>	B
PolIV		<i>dinB</i>	Y
PolV		<i>umuDC</i>	Y
DnaE2		<i>danE2</i>	C
ImuB		<i>imuB</i>	Y
	Rev1	REV1L	Y
	Polζ	REV3L	B
	Polη	POLH	Y
	Polκ	POLK	Y
	Polι	POLI	Y
	Polλ	POLL	X
	Polμ	POLM	X
	Polβ	POLB	X
	Polθ	POLQ	A
	Poly	POLG	A

3. DNA polümeraaside regulatsioon bakterirakus

DNA polümeraaside ekspressioon bakterirakus on reguleeritud nii transkriptsiooni kui ka posttranslatsioonilisel tasemel.

DNA polümeraaside ekspressiooni regulatsioon SOS vastuse kaudu on vahendatud repressorvalgu LexA poolt, mida esmalt kirjeldati ja põhjalikult uuriti *E. coli* rakkudes (Witkin jt., 1976; Walker, 1985). SOS vastus on vajalik raku ellujäämiseks olukorras, kus DNA-s on kahjustusi, mis ei võimalda normaalset DNA replikatsiooni. DNA kahjustuste puudumisel rakus seondub *E. coli* repressorvalk LexA konsensusjärjestusega CTGTN₈ACAG DNA motiivile, mida nimetatakse SOS *box*'iks, blokeerides sellega SOS geenide transkriptsiooni (Walker jt., 1984). LexA valk, v.a. mõned erandid on konserveerunud üle kogu bakterite domeeni. DNA kahjustuse poolt indutseeritavate geenide promootoralas on paljudel γ Proteobakterite perekondadel (*Pseudomonaceae*, *Aeromonadaceae* jne.) ja mõnedel β Proteobakteritel (n. *Bordetella parapertussis*) *E. coli* sarnane SOS *box*. LexA valgu seondumisjärjestus CTGTN₈ACAG ei ole aga konserveerunud kõikides bakteriaalsetes gruppides, kus toimub DNA kahjustuse poolt indutseeritud regulatsioon. Näiteks α Proteobakteritel on kirjeldatud teistsugust LexA seondumismotiivi konsensusjärjestusega GTTCN₇GTTC (Henestrosa jt., 1998; Tapias ja Barbe, 1999).

Kõigil siiaamaani uuritud graam-positiivsetel bakteritel on samuti kirjeldatud konserveerunud konsensusjärjestusest erinevat LexA seondumisejärjestust CGAACRNRYGTTYC, mis erineb *E. coli* SOS *box*'i järjestusest. Sarnast järjestust esinedes ka mõnedel graam-negatiivsetel bakteritel (nt. rohelised mitte-väävli bakterid), (Henestrosa jt., 2000).

E. coli rakkudes on SOS regulatsiooni kontrolli all peale PolIV, PolII ja PolV geenide veel üle neljakümne geeni transkriptsioonitase (Courcelle ja Khodursky, 2001). *E. coli* SOS induktsioonimudeli kohaselt kahjustuste tekkimisel DNA ahelas, näiteks UV kiirguse toimel replikatiivne polümeraas peatub kuid helikaas jätkab edasiliikumist, mille tõttu tekib rakus üheahelaline DNA (ssDNA). ssDNA tekkega indutseeritakse vähem kui ühe minuti jooksul RecA valgu ekspressioon, mida kodeeriv geen *recA* on samuti repressorvalgu LexA kontrolli all. RecA seondub ssDNA-ga, mille tulemusena moodustub RecA-nukleoproteiinfilament e. RecA aktiivne vorm (RecA*). Aktiveeritud RecA* käitub koproteaasina repressorvalgu LexA autoproteolüüsil võimaldades transkriptsiooni SOS reguloni geenidelt. Selle tulemusel tõuseb SOS geenide ekspressioonitase. Iga LexA poolt reguleeritud geeni ekspressioonitase ja ekspressioonikestvus sõltub SOS *box*'i asukohast ja LexA seondumisaafiinsusest sellega ning konkreetse promootori tugevusest. Osad geenid reguleeritakse üles juba väikese DNA kahjustuse taseme juures. Üks varasemaid indutseeritud geene on PolIII (vähem kui ühe minuti jooksul peale SOS induktsiooni). *umuC* ja *umuD* geenid, mis kodeerivad PolV-t reguleeritakse üles viimaste seas (umbes 45 minutit peale SOS induktsiooni), (Tippin jt., 2004).

DNA kahjustuste eemaldamise järgselt on vaja SOS geenide ekspressioon maha reguleerida. Kuna DNA kahjustuste eemaldamisel jääb üheahelalisi DNA lõike rakus järjest vähemaks, millega RecA võiks seonduda, siis väheneb rakus RecA* hulk, mis omakorda viib LexA proteolüüsi vähenemiseni. Rakkudes leiduv LexA seondub SOS *box*'le, repressseerides ekspressiooni SOS geenidelt.

PolIV omab normaalsetes tingimustes kasvavates rakkudes väikest efekti mutatsioonisagedusele kuid nälgivates rakkudes selle polümeraasi-sõltuv mutagenees suureneb. On näidatud, et transkriptsioon vajab *dinB* geeni promootorilt alternatiivse σ faktori RpoS olemasolu. RpoS defektses *P. putida* tüves langeb PolIV tase langeb ja raaminihkemutatsioonide tekkesagedus (Layton ja Foster, 2003).

Näidatud on ka, et UmuC ja UmuD valgud degradeeritakse *E. coli* rakkudes väga kiiresti. Olemasolevaid UmuD ja UmuC valke eemaldatakse rakust erinevate proteaaside abil. ATP sõltuv seriin proteaas Lon on vastutav UmuC ja UmuD valkude degradeerimise eest rakus. UmuD valgu polümeraaselt aktiivse vormi UmuD' degradeerimine Lon proteaasi vahendusel on väga aeglane protsess. Enamus valku UmuD' degradeeritakse rakus kiiresti teise ATP sõltuva proteaasi ClpXP vahendusel kuid seda juhul, kui UmuD' on moodustanud heterodimeeri UmuD valguga. Selline mehhanism, kus UmuD' olemasolul rakus moodustunud UmuD/UmuD' dimeer suunab UmuD' valgu proteolüüsi võimaldab rakkudel vähendada mutageenselt aktiivsete Umu valkude taset ja peale vigaderohke DNA sünteesi toimumist taastatakse normaalne olukord rakkudes (Frank jt., 1996).

4. LexA2 reguleeritud, DNA kahjustuse indutseeritud geenide kassett Proteobakterites

Paljudes erinevates bakterites, sealhulgas *Caulobacter crescentus* ja *Pseudomonas aeruginosa* on kirjeldatud nn. „mutageensuse operoni”. Sellesse operoni kuuluvad geenid kodeerivad rakujagunemise inhibiitorvalku ja kahte DNA polümeraasi (Abella jt., 2004). *P. putida*, *X. campestris* ja ka teiste bakterite kogu genoomi sekveneerimisega leiti LexA repressorvalgu homoloogi kodeeriv geen *lexA2*. LexA2, erinevalt LexA valgust, mille äratundmisjärjestus on CTGTN₈ACAG, seondub DNA järjestusele AGTACAAATGTGCTCC ning kuulub samuti „mutageensuse operoni” koosseisu ja asub nendest geenidest ülesvoolu. LexA represseerib „mutageensuse operoni” transkriptsiooni initsiatsiooni (Weinel jt., 2002).

„Mutageensuse operoni” kuuluvaid geene on kirjanduses nimetatud erinevate nimedega. Rakujagunemise inhibiitorvalku kodeerivat geeni selles operonis on kirjanduses nimetatud nii *sulA*, *sulA2* kui ka *imuA*. Esimest sellesse operoni kuuluvat DNA polümeraasi on nimetatud, kas *dinP* või *imuB* ning teist *dnaE*, *polC* või *dnaE2* (Boshoff jt., 2003; Rodrigo jt., 2005; Abella jt., 2004)). Proteobakterite hulgas on „mutageensuse operon” ja selle operoni derivaadid laialt levinud. Mõnel juhul (nt. *P. putida* ja *P. fluorescens*) on selle operoni esimeseks geeniks repressorvalku LexA2 kodeeriv geen, millest allavoolu asuvad rakujagunemise inhibiitorit ja kahte DNA polümeraasi kodeerivad geenid, kuid enamustel juhtudel on aga sellest operonist puudu *lexA2* (nt. *A. tumefaciens* ja *P. aeruginosa*) (Sanders jt., 2006; Abella jt., 2004). Paljudel juhtudel selle operoni nimetustes kasutatud prefiks imu tähendab *inducible mutagenesis*, kuna esmalt identifitseeriti need geenid kui DNA kahjustuse

poolt indutseeritavad geenid *imuA* ja *imuB* (Galhardo jt., 2005), mis kodeerivad *P. putida*'s vastavalt rakutsükli inhibiitorvalgu SulA ja Y- perekonna polümeraasi IV homolooge ning *dnaE2* kodeerib replikatiivse polümeraasi III katalüütilise subühiku homoloogi (Abella jt., 2004).

Mitmetes bakterites on näidatud, et selle operoni geenide ekspressioon on DNA kahjustuse poolt indutseeritav. UV kiiritamise järgselt tõuseb *C. crescentus* rakkudes nende geenide olemasolul G:C→ C:G transversioonide tekkesagedus. Samuti on näidatud, et *imuA-imuB-dnaE2* operoni geenide puudumisel langeb bakterikultuuri elumus peale UV-ga kiiritamist (Galhardo jt., 2005). *M. tuberculosis*'es on näidatud, et DnaE2 puudumine vähendab selle bakteri UV kiiritamise järgset elumust ja virulentsust hiires. DnaE2-te peetakse selles organismis põhiliseks vigutegevaks DNA polümeraasiks, mille olemasolu on vajalik näiteks ravimiresistentsuse tekkimisel (Boshoff jt., 2003).

5. Eukarüootsed DNA polümeraasid

5.1 Replikatiivsed DNA polümeraasid

DNA polümeraasid eukarüootides jaotatakse sarnaselt prokarüootidele replikatiivseteks ja spetsialiseeritud DNA polümeraasideks. Erinevalt prokarüootidest on eukarüootides replikatiivseid DNA polümeraase kolm - DNA polümeraasid α , δ ja ϵ , mis arvatakse funktsioneerivat koos replikatsioonikahvlis. DNA polümeraasid α , δ , ϵ on kõik B- perekonna polümeraasid. Järgnevalt annan ülevaate igast eukarüootsest replikatiivsest polümeraasist eraldi.

DNA polümeraas α . DNA polümeraas α (Pol α) omab unikaalset omadust initsieerida DNA sünteesi enda poolt sünteesitud ligikaudu 12 nukleotiidi pikkuse RNA praimeril abil, mida see polümeraas järgnevalt pikendab umbes 20 DNA aluse võrra. Enne polümeraas δ avastamist peeti Pol α -t peamiseks replikatiivseks polümeraasiks eukarüootides. Praegu arvatakse Pol α rolliks hübriidse RNA/DNA praimeril sünteesimist. Peale seda kui Pol α on sünteesinud valmis RNA/DNA hübriidpraimeril, toimub RFC vahendatud polümeraaside vahetus, kus ahela elongatsiooni võtab üle replikaas Pol δ ja Pol ϵ .

Pol α koosneb neljast subühikust. Kõige suurem subühik on DNA polümeraasi aktiivsusega ja kõige väiksem subühik primaasi aktiivsusega. Vahepealsete subühikute täpsed funktsioonid

on teadmata kuid kõik isoleeritud Pol α holoensüüm, nii pärmis, inimeses, *Xenopus*'es ja *Drosophila*'as sisaldavad kõiki nelja subühikut.

DNA polümeraas δ . Põhiline eukarüootne replikatiivne DNA polümeraas δ (Pol δ) koosneb tavaliselt neljast subühikust. Erandiks on *S. cerevisiae*, kus Pol δ koosneb kolmest subühikust. Samuti on näidatud, et *S. cerevisiae* Pol δ on võimeline funktsioneerima ka vaid A ja B subühikute olemasolul kuigi see aeglustab raku kasvu. Pol δ suur A subühik omab nii polümeraas kui ka 3'-5' eksonukleaas aktiivsust, mis muudab Pol δ poolt läbiviidava replikatsiooni täpseks.

Pol δ interakteerub PCNA-ga vähemalt kahe subühiku abil. Tugevaim interaktsioon on PCNA ja Pol δ C subühiku vahel. See interaktsioon PCNA-ga stabiliseerib Pol δ ja suurendab selle polümeraasi protsessiivsust. Pol δ stimuleerimiseks piisab üksnes ka A/B heterodimeeri seondumisest PCNA-ga.

DNA polümeraas ϵ . DNA polümeraas ϵ (Pol ϵ) funktsioneerib heterotetrameerina ning sellisel kujul leidub seda arvatavasti kõikides eukarüootsetes organismides. Pol ϵ polümeraasne ja 3'-5' eksonukleaasne aktiivsus paiknevad selle polümeraasi suures subühikus. Pol ϵ poolt läbiviidav DNA replikatsioon on suurema täpsusega võrreldes Pol δ -ga. Erinevalt Pol δ -st ei ole Pol ϵ protsessiivsuseks PCNA olemasolu vaja.

Viimasel ajal on oletatud, et Pol δ ja Pol ϵ töötavad koos replitseerides vastavalt juhtivat ja mahajäävat ahelat.

5.2 Eukarüootsed spetsialiseeritud DNA polümeraasid

Eukarüootsed spetsialiseeritud polümeraasid kuuluvad valdavalt DNA polümeraaside Y-perekonda. Ühe erandina võib tuua DNA polümeraas ζ , mis kuulub B-perekonda. Polümeraas κ kuulub Y-perekonna polümeraaside DinB alampererkonda, ülejäänud kolm spetsialiseeritud polümeraasi eukarüootides Rev1, η ja ι kuuluvad kõik eraldi alampererkondadesse ja on esindatud ainult eukarüootsetes organismides. Samuti on ka polümeraas ζ homoloogid esindatud ainult eukarüootides.

DNA polümeraas η . DNA polümeraas η (Pol η) homolooge on leitud kõigis seni uuritud eukarüootides sh. hiires, inimeses, pärmis ja *Drosophila*'s. Inimese ja pärmi puhul on

näidatud, et Pol η on väga väikese täpsusega polümeraas, millel puudub ka eksonukleasne aktiivsus ning vale nukleotiidi sisestamise sagedus kahjustamata DNA ahela sünteesil on ligikaudu 10^{-2} - 10^{-3} . Esmalt identifitseeriti Pol η pärmis, kus see polümeraas on kodeeritud geeni Rad30 poolt. Inimeses on Pol η kodeeritud XPV geeni poolt, mille defektsus võib põhjustada *xeroderma pigmentosum* vormi XP-V. XP-V patsiendid on tundlikud UV suhtes ja neil on suurenenud nahavähi tekkevõimalus kuna rakkudes puudub Pol η poolt läbiviidava vigadevaba üle UV kahjustuse süntees.

Pol η omadus replitseerida üle CPD-de (cyclobutane pyrimidine dimer) tuleneb selle polümeraasi unikaalsest struktuuralsest omadusest mahutada mõlemad kahjustatud templeidi nukleotiidid oma aktiivtsentrisse. Esmalt näidati pärmis, et Pol η suudab replitseerida üle *cis-syn* TT dimeeri, lülitades kaks A nukleotiidi kahe T-e vastu. Erinevalt *cis-syn* TT dimeerist, mis ei mõjuta oluliselt DNA struktuuri, põhjustab (6-4) TT fotoprodukt olulist muutust DNA-s. (6-4) TT kahjustuse vastu võib Pol η inkorporeerida G nukleotiidi. Kuna aga tavaliselt (6-4) fotoproduktid moodustuvad sagedamini TC ja CC nukleotiidide vahel kui TT nukleotiidide vahel siis Pol η võime inserteerida G nukleotiidi 3'T vastu (6-4) fotoproduktis viitab samuti sellele, et Pol η võib ületada vigadevabalt (6-4) kahjustuse fotoprodukte, lülitades G nukleotiidi TC või CC fotoprodukti 3'C vastu. Peale kahjustuse ületamist võtab DNA ahela elongatsiooni üle Pol ζ .

Pol η aitab ületada ka teistsuguseid DNA kahjustusi ja seda suhteliselt suure täpsusega. Näiteks 8-oxydeoxyguanosine ja atsetüülaminoflureen d-G on kahjustused, mida Pol η ületab suure täpsusega. Peale kahjustuse ületamist Pol η tavaliselt dissotsieerub DNA-lt.

DNA polümeraas ι . DNA polümeraas ι (Pol ι) homolooge on leitud peale inimese veel hiire ja *Drosophila* rakkudes. Enamuste DNA polümeraaside, isegi väga vigaderohkete polümeraaside üks ühiseid jooni on see, et DNA sünteesil on eelistatud Watson-Crick aluspaaride moodustumine. See aga ei kehti Pol ι kohta. Pol ι sünteesib T nukleotiidi G nukleotiidi vastu võrreldes näiteks A nukleotiidi sünteesimisega T nukleotiidi vastu 3-10 korda sagedamini. Samuti sünteesib Pol ι T-T valepaare peaaegu sama sagedusega kui A-T paare. Pol ι võib DNA aheat pikendada kõigist võimalikest kaheteistkümnest valesti paardumistest kuid teeb seda vähem efektiivselt kui polümeraas ζ . Erinevalt Pol η -st ei suuda Pol ι ületada *cis-syn* TT dimeere, kuid on võimeline TT (6-4) fotoprodukti 3'T vastu inkorporeerima A nukleotiidi ja samuti lisama nukleotiide AP saidi (apurinic apyrimidinic

sait) vastu kuid mõlemal juhul ei ole Polt võimeline DNA ahelat pikendama ja dissotsieerub peale üle kahjustuse sünteesimist ahelalt.

Pol ι spetsiifiline roll on ilmnenu võimes inkorporeerida nukleotiide γ HOPdG (γ -Hydrxy-1, N²-propano-2' deoxyguanosine) vastu. Kuna γ HOPdG normaalseid aluspaare ei moodusta C-ga siis on selle ühendi teke DNA-s takistuseks enamikele DNA polümeraasidele. Pol ι sisestab C või T nukleotiidi γ HOPdG vastu sama efektiivselt kui kahjustamata G vastu. Juhul kui γ HOPdG vastu on lisatud C, aga mitte T nukleotiid Polk jätkab DNA sünteesi. γ HOPdG efektiivne ja täpne ületamine DNA ahelas võib olla Pol ι ja Polk koostöö tagajärg.

DNA polümeraas κ . DNA polümeraas κ (Polk) kuulub DNA polümeraaside Y- perekonna DinB alam perekonda, kuhu kuuluvad ka *E. coli* DinB (PolIV) ja arhede pärinevad DNA polümeraasid Dbh ja Dpo4. Pol κ vale nukleotiidi sisestamise sagedus kõigi nelja nukleotiidi vastu on 10^{-3} - 10^{-4} . Teistest DinB alam perekonna liikmetest erineb Pol κ võime poolest pikendada DNA ahelat, millesse on sünteesitud valepaar, sagedusega ligikaudu 10^{-1} - 10^{-2} . Teised DinB alam perekonna liikmed pikendavad valesti paardunud praimeri terminust umbes sama sagedusega kui lülitavad DNA ahelasse vale nukleotiidi. *E. coli* puhul on mõlemad sagedused ligikaudu 10^{-3} - 10^{-5} .

Enamike DNA kahjustuste vastu ei suuda Polk lülitada nukleotiide, aga see-eest võib Polk osade DNA kahjustuste juurest ahelat pikendada kui mõni teine polümeraas on kahjustuse vastu eelnevalt sünteesinud. Sarnaselt teistele DinB alam perekonna liikmetele on Polk tendents teha raaminihkemutatsioone.

DNA polümeraas ζ . DNA polümeraas ζ (Pol ζ) koosneb valkudest Rev3 ja Rev7. Pol ζ katalüütiline subühik Rev3 kuulub DNA polümeraaside B- perekonda, kuhu kuuluvad ka replikatiivsed polümeraasid α , δ , ϵ . Erinevalt Pol δ -st ja Pol ϵ -ist puudub Pol ζ -l *proofreading* eksonukleasne aktiivsus ja samuti ei mõjuta Rev3-e puudumine raku elumust ja pärmi rakkude kasvu.

Võrreldes Y- perekonna polümeraasidega on Pol ζ suhteliselt suure täpsusega ensüüm, sisestades vale nukleotiidi kõigi nelja aluse vastu sagedusega ligikaudu 10^{-4} . Replikatiivsetset polümeraasidest erineb Pol ζ oma võime poolest pikendada valesti paardunud praimeri terminust sagedusega ligikaudu 10^{-1} - 10^{-2} . Praktiliselt ei ole olemas DNA kahjustust, kust see polümeraas ei oleks võimeline ahelat pikendama. Paljude omaduste poolest on Pol ζ sarnane

Polk-ga, siiski kokkuvõttes arvestades erinevaid järjestuse kontekste on Pol ζ poolt läbiviidav süntees suurema täpsusega ja protsessiivsem.

Rev1 ja Pol ζ viivad koos läbi vigadevaba sünteesi üle (6-4) TT fotoproduktide. Pol ζ –t eristab teistest polümeraasidest võime pikendada DNA ahelat nukleotiididest, mis on pandud (6-4) fotoprodukti, AP saidi või Tg (Thymine glycol) vastu ja seda väga kõrge efektiivsusega.

REV1. Rev1 valk identifitseeriti esmalt kui deoksütsütidüül transferaas, mis on võimeline sünteesima nii pärmi kui ka inimese DNA-s AP saidi vastu C nukleotiidi. Rev1-e DNA sünteesi protsessiivsus on madal. Polü (dG) matriitsi kasutades on näidatud, et Rev1 lisab vaid kaks C nukleotiidi ühe DNA-ga seondumise sündmuse kohta. Samuti võib Rev1 inkorporeerida C nukleotiidi T, A ja C nukleotiidide vastu sagedusega $\sim 10^{-2}$ - 10^{-3} .

Kindlad andmed Rev1 rollist DNA sünteesil on tulnud biokeemilistest uuringutest, mis näitavad, et Rev1 inkorporeerib C nukleotiidi γ HOPdG vastu ja millele järgneb Pol ζ poolne ahela pikendamine. Inimese rakkudes on võimalik vigadevabalt ületada γ HOPdG-d kahe alternatiivse raja poolt, lisaks praegu mainitule ka Pol ι ja Polk vahendusel.

Näidatud on, et Rev1 ei suuda *cis-syn* TT dimeeride ja (6-4) TT fotoproduktide vastu sünteesida. Samuti näitavad geneetilised katsed AAF kahjustust sisaldava matriitsiga, et selle kahjustuse ületamiseks on vajalik küll Rev1 olemasolu rakus, kuid mitte DNA polümeraasne aktiivsus. Kuna Pol ζ on paljudel juhtudel vajalik üle kahjustuse DNA sünteesiks just ahela ekstensiooni etapis siis, Rev1 võib olla oluline Pol ζ assambleerimisel replikatsioonikahvlisse.

Viimasel ajal on leitud, et Rev1 osaleb lisaks Pol ζ assambleerimisele replikatsioonikahvlisse ka Pol η , Pol ι ja Polk polümeraasse aktiivsuse vahendamisel. Kaksikhübriidanalüüsides ja koimmuunopretsipitatsiooni katsetega on näidatud, et hiire ja inimese Pol ι , Pol η ja Polk seonduvad Rev1 samale ~ 100 aminohappe pikkusele C terminaalsete lõigule. Nende erinevate polümeraaside sama seondumisait Rev1-l võib olla oluline selleks, et kindlustada korraga ainult ühe polümeraasi juurdepääs Pol ζ sõltuvale üle kahjustuse sünteesi masinavärgile.

Eukarüootsete polümeraaside kirjanduse osa on kirjutatud, kasutades ülevaateartikleid: (Johnson ja O'Donnell, 2005; Prakash jt., 2005; Goodman, 2002).

Materjal ja Metoodika

1. Söötmed ja bakteritüved

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

Plasmiidide ja bakteritüvede selektsiooniks kasutasime antibiootikume: kanamütsiini (Km) 50 µg/ml, ampitsilliini (Ap) 100 µg/ml ja karbenitsilliini (Cb) 200 µg/ml.

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

2. PCR

PCR-i (polümeraasi ahelreaktsioon) kasutasime *P. putida* *dnaE2* ja *imuB* geenijärjestuste amplifitseerimiseks genoomist ja meie poolt tehtud konstruktide kontrollimiseks.

Reaktsiooni maht oli 20 µl. Reaktsioon toimus PCR-i puhvris, mis sisaldas: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Triton X 100, 0,5% Ficoll 40, 1mM tartrasiini, millele lisasime veel 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 u firma “Fermentas” Taq polümeraasi, 15 pmol praimereid (tabel) ja ligikaudu 10 ng isoleeritud DNA-d või bakterirakke.

PCR teostasime firmade “Biometra”, või “Techne” PCR-i masinatega tingimustel: denaturatsioon 96 °C 30 sekundit kuni minut, praimeri seondumine 50 kuni 54 °C 30 sekundit kuni minut, DNA süntees 72 °C juures minut kuni 3 minutit (Saiki jt., 1986). Kokku toimus reaktsioon 25 tsükli juures.

Tabel 3. Töös kasutatud tüved ja plasmiidid

Tüvi või plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
Tüved		
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) recA1 endA1</i> <i>hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
CC118 λpir	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1</i> <i>rpsE rpoB argE</i> (Am)	Herrero., 1990
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3</i> (TB-mB-) <i>recA13proΔ2 lacY1</i>	Boyer and Roulland-Dussoix., 1969
<i>P. putida</i>		
PaW85	Wild type	Beyley., 1977
PaWdinB	<i>dinB::tet</i> , eelnevalt nimetatud kui PaW <i>dinB::tet</i>	Tegova., 2004
PaWImuB	<i>imuB::tet</i>	Käesolev töö
PaWDnaE2	<i>dnaE2::km</i>	Käesolev töö
PaWImuBDnaE2	Δ <i>imuB::tet dnaE2::km</i>	Käesolev töö
PaWDinBImuB	Δ <i>dinB::tet imuB::km</i>	Käesolev töö
Plasmiidid		
pBluescript KS(+)	Kloneerimisvektor (Ap ^r)	Stratagene
pBR322	Kloneerimisvektor (Ap ^r Tet ^r)	Bolivar., 1977
pKTpheA22TAG	Testsüsteem asendusmutatsioonide detekteerimiseks Phe ⁺ revertantide tekke alusel	Käesolev töö
pKTpheA56+A	Testsüsteem ühe nukleotiidiliste deletsioonide detekteerimiseks Phe ⁺ revertantide tekke alusel	Tegova., 2004
pGP704 <i>dinB::tet</i>	Plasmiid pGP704, mis sisaldab <i>Tet^r</i> geeniga katkestatud <i>dinB</i> geeni	Tegova., 2004
pGP704 L	Homoloogiliseks rekombinatsiooniks kasutatav plasmiid (<i>Ap^r</i>)	Pavel., 1994
pRK2013	Abiplasmiid pGP704L konjugatsioonil	Figurski., 1979
pKSkM	<i>Km^r</i> geen kloneerituna vektorisse Bluescript KS (+)	Tark., 2004
pGEM-T Easy	Kloneerimisvektor (Ap ^r)	Promega
pGEMimuB	Plasmiid pGEM, mis sisaldab PCR-ga amplifitseeritud <i>P. putida</i> <i>imuB</i> geeni kloneerituna EcoRI-ga avatud vektorisse	Käesolev töö
pGEMimuB::tet	<i>Tet^r</i> geen plasmiidist pBR322, mis on inserteeritud MscI-ga avatud <i>imuB</i> geeni keskele plasmiidis pGEMimuB	Käesolev töö
pGP704 <i>ΔimuB::tet</i>	Plasmiid pGP704L, kuhu on kloneeritud EcoRI-e fragmendina Δ <i>imuB::tet</i> järjestus plasmiidist pGEMimuB::tet	Käesolev töö
pGEMimuB::km	<i>Km^r</i> geen plasmiidist pKSkM inserteeritud MscI-ga avatud <i>imuB</i> geeni keskele plasmiidis pGEMimuB	Käesolev töö
pGP704 <i>ΔimuB::km</i>	Plasmiid pGP704L, kuhu on kloneeritud EcoRI-e fragmendina Δ <i>imuB::km</i> järjestus plasmiidist pGEMimuB::km	Käesolev töö
pKSdnaE2N	pBluescript KS (+), mis sisaldab <i>dnaE2</i> geeni PCR-ga amplifitseeritud 5' järjestust, kasutades primereid, mis on komplementaarsed <i>dnaE2</i> geeni järjestustega vastavalt 419- 396 ülesvoolu ja 121- 144 nukleotiidi allavoolu ATG initsiaatorkoodonist	Käesolev töö
pKSdnaE2C	pBluescript KS (+), mis sisaldab <i>dnaE2</i> geeni PCR-ga amplifitseeritud 3' järjestust, kasutades primereid, mis on komplementaarsed <i>dnaE2</i> geeni järjestustega vastavalt 467- 444 ülesvoolu ja 67- 90 nukleotiidi allavoolu TGA stoppkoodonist	Käesolev töö
pKSdnaE2NC	Restriktaasidega EcoRI ja Eco147I genereeritud <i>dnaE2</i> järjestus, mis sisaldab DNA fragmenti plasmiidist pKSdnaE2C kloneerituna EcoRI ja Eco147I-ga avatud plasmiidist pKSdnaE2N	Käesolev töö
pKSdnaE2NkmC	<i>Km^r</i> geen plasmiidist pKSkM inserteeritud Eco147-ga avatud <i>dnaE2</i> geeni keskele plasmiidis pKSdnaE2NC	Käesolev töö
pGP704 <i>ΔdnaE2::km</i>	Plasmiid pGP704, kuhu on kloneeritud Acc65I ja XbaI fragmendina Δ <i>dnaE2::km</i> järjestus plasmiidist pKSdnaE2NkmC	Käesolev töö

Tabel 4. Töös kasutatud praimerid

nimi	järjestus	Lokalisatsioon ja iseloomustus
dnaE2Eco147Rev	5'-GATTGCCAAGGCCTGGTAGCCCTG-3'	komplementaarne <i>dnaE2</i> geeni järjestusega +121 kuni +144 allavoolu ATG initsiaatorkoodonist
dnaE2Fw	5'-CCTGCGGCTGGTTGCCGAAGACTT-3'	<i>dnaE2</i> geeni järjestusega -419 kuni -396 ülesvoolu ATG initsiaatorkoodonist
dnaE2Eco147Fw	5'-CGCCGATGTGCAGGCCTTGCCTGA-3'	komplementaarne <i>dnaE2</i> geeni järjestusega 467 kuni 444 nukleotiidi ülesvoolu TGA stopp koodonist
dnaE2Rew	5'-GGGCTCGCCCGCAGGGAAACCGT-3'	komplementaarne <i>dnaE2</i> geeni järjestusega 67 kuni 90 nukleotiidi allavoolu stoppkoodonist
dnaE2siseFw	5'-CTTGCTGCTGCACCACCAAAG-3'	komplementaarne <i>dnaE2</i> geeni järjestustega +369 kuni +380 allavoolu ATG initsiaatorkoodonist
dnaE2siseRev	5'-ACGTCGCCACAGGCCACAGC-3'	komplementaarne <i>dnaE2</i> geeni järjestustega +550 kuni +569 allavoolu ATG initsiaatorkoodonist
imuBFw	5'-GGGCGGGGCTGATGCCCATATGCTCTGGGCTGCATC-3'	komplementaarne <i>imuB</i> geeni järjestustega -18 kuni +18 ATG initsiaatorkoodonist
imuBRev	5'-TTATGCGAACCAACCCTGCA-3'	komplementaarne <i>imuB</i> geeni järjestustega, mis algab 17 nukleotiidi ülesvoolu TAA stoppkoodonist
imuBkesk	5'-TCGGGTGGCGTCGACATGCCC-3'	komplementaarne <i>imuB</i> geeni järjestusega 474 kuni 495 nukleotiidi allavoolu ATG initsiaatorkoodonist

3. *E. coli* transformatsioon

Kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvasime *E. coli* tüve DH5 α rakke üleöö 4 ml LB-puljongis 37 °C juures. Seejärel lahjendasime rakukultuuri ligikaudu 20 korda ja kasvasime rakke samadel tingimustel tiheduseni $A_{580} = 0,2-0,5$. Rakud tsentrifuugisime põhja 12100 x g 30 sekundi jooksul firma “Eppendorf” lauatsentrifuugiga “Mini Spin” ja eemaldasime söötme. Kõik tsentrifuugimised teostasime samadel tingimustel. Suspendeerisime rakud 500 μ l transformatsioonilahuses I (10 mM NaOAc, 50 mM MnCl₂, 5 mM NaCl; pH 5,6 - 6) ja

hoidsime rakke 10 min. jääl. Seejärel tsentrifuugisime rakud uuesti põhja ja suspendeerisime 50 µl transformatsioonilahuses II (10 mM NaOAc, 70 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂, 5% glütserool; pH 5,6 - 6) ja hoidsime rakke 30 min. jääl.

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

4. Bakterite elektroporatsioon

P. putida rakkude elektroporatsioonil kasutasime Sharma ja Schimke (1996) meetodit. Retsipienttüve rakke kasvasime YENB-söötmes (0,75% “Bacto yeast extract”; 0,8% “Bacto nutrient broth”) optilise tiheduseni $A_{580} = 1-1,5$. Rakud tsentrifuugisime söötimest välja, pesime kolm korda 10%-se glütserooliga. Rakud tsentrifuugisime põhja 12100 x g 30 sekundi vältel firma “Eppendorf” lauatsentrifuugiga “Mini Spin”, kõik tsentrifuugimised teostasime samadel tingimustel. Seejärel suspendeerisime rakud 50 µl 10%-ses glütseroolis. Rakkudele lisasime ligikaudu 100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d. Seejärel pipeteerisime rakud jääle jahutatud elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooni teostasime firma “BioRad” elektroporaatoriga “*E. coli* Pulser” pingel 2500 V. Peale elektroporatsiooni viisime rakud 1,5 ml LB-söötmesse ja kasvasime ligikaudu tund aega loksutil 30 °C juures. Seejärel tsentrifuugisime rakud söötimest välja ja plaatisime selektiivtassidele.

5. Bakterite konjugatsioon

Homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks algse ja katkestatud geeni vahel *P. putida* rakkudes kasutasime bakterite konjugatsiooni. Selleks kasvasime üleöö *E. coli* tüve CC118λpir, mis sisaldas homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks vajalikku konjugatiivset plasmidi, retsipienttüve ja plasmiidide ülekandeks vajalikku *helper*-plasmidi RK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101. Lahjendasime üleöö LB-vedelsöötmes plasmiidide selektsiooniks vajalike antibiootikumide juuresolekul kasvanud kultuurid tiheduseni $A_{580} = 0,1$ ja kasvasime loksutil ligikaudu 2-3 tundi. Segasime kokku võrdse koguse doonor-, retsipient- ja *helper*-tüve kultuurist ja pipeteerisime 100 µl segu LB-tassile. Rakke

kasvatasime üleöö 30°C juures. Seejärel suspendeerisime rakukultuuri 5 ml 1 x M9 lahuses ja plaatisime sellest 100 µl kogused minimaal-selektiivtassidele.

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

6. Plasmiidse DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

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

Geelelektroforeesiks lisasime DNA proovile 0,04 %-list broomfenoolsinise lahust 50 %-ses glütseroolis, 20 µl proovi kohta 4 µl. Proovid kandsime horisontaalsele 1 %-sele agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-Atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldas etiidiumbromiidi 10 mg/ml. Elektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 100 - 150 volti. Geeli pildistasime ultravioletvalguses.

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

7. *P. putida ImuB ja DnaE2 suhtes defektsete tüvede konstrueerimine*

7.1. DnaE2 defektse *P. putida* tüve PawDnaE2 konstrueerimine

dnaE2 geeni 5' otsa DNA järjestust sisaldav 563 aluspaari pikkune DNA fragment amplifitseeriti PCR meetodil *P. putida* tüvest PaW85, kasutades selleks praimereid dnaE2Fw (5'-CCTGCGGCTGGTTGCCGAAGACTT-3'), mis on komplementaarne *dnaE2* geeni järjestusega -419 kuni -396 ülesvoolu ATG initsiaatorkoodonist ja dnaE2Eco147Rev (5'-GATTGCCAAGGCCTGGTAGCCCTG-3'), mis on komplementaarne selle geeni järjestusega +121 kuni +144 allavoolu ATG initsiaatorkoodonist. Amplifitseeritud DNA fragment kloneeriti plasmidi pBluescript KS (+), mis oli avatud restriктаasiga EcoRV, saades plasmidi pKSdnaE2N. Teine DNA fragment, mis sisaldas *dnaE2* geeni 3' otsa järjestust amplifitseeriti praimeritega dnaE2Eco147Fw (5'-CGCCGATGTGCAGGCCTTGCCTGA-3'), mis on komplementaarne *dnaE2* geeni järjestusega 467 kuni 444 nukleotiidi ülesvoolu TGA stopp koodonist ja dnaE2Rew (5'-GGGCTCGCCCGCAGGGAAACCGT-3'), mis on komplementaarne *dnaE2* geeni järjestusega 67 kuni 90 nukleotiidi allavoolu stoppkoodonist. Amplifitseeritud 557 aluspaari pikkune DNA fragment kloneeriti plasmidi pBluescript KS (+), mis oli avatud restriктаasiga EcoRV, saades plasmidi pKSdnaE2C. Restriктаaside EcoRI ja Eco147I abil genereeritud *dnaE2* järjestust sisaldav DNA fragment plasmidist pKSdnaE2C kloneeriti järgnevalt plasmidi pKSdnaE2N, saades plasmidi pKSdnaE2NC. *Km^r* geen kloneeriti HincII fragmendina plasmidist pKSk_m plasmidi pKSdnaE2NC Eco147 saiti, saades plasmidi pKSdnaE2NkmC. Lõpuks kloneeriti Acc65I ja XbaI restriктаasidega *Km^r* geeni 5' ja 3' *dnaE2* geeni järjestuste vahel sisaldav DNA fragment samade restriктаasidega avatud plasmidi pGP704L. Plasmiid pGP704Δ*dnaE2*::*Km* selekteeriti *E. coli* tüves CC118λpir. Katkestatud *dnaE2* geen, mis sisaldas sisemist 2489 aluspaari pikkust deletsiooni inserteeriti *P. putida* tüve PaW85 genoomi homoloogilise rekombinatsiooni vahendusel. Plasmiid pGP704Δ*dnaE2*::*Km*, mis ei ole võimeline replitseeruma mujal tüves kui CC118λpir viidi konjugatsiooni abil PaW85-de, kasutades *helper*-plasmidi pRK2013. Terve plasmidi üleminek PaW85-de välistati transkonjugantide testimisega karbenitsilliini (Cb) resistentsuse suhtes (ainult need kolooniad, mis ei kasvanud Cb 1500 µg/ml juuresolekul loeti tõelisteks rekombinantideks, mis tekkisid kahe rekombinatsioonisündmuse tulemusena). Paw85 *dnaE2*::*km knockout* tüvi PaWDnaE2 kontrolliti PCR-i abil kasutades praimereid dnaE2siseFw (5'-CTTGCTGCTGCACCACCAAAG-3') ja dnaE2siseRev (5'-

7.2. ImuB defektse *P. putida* tüve PawImuB konstrueerimine

28

ekspressioon oli võrreldav metsiktüüpi tüve omaga. Oodatult oli *dnaE2* geeni suhtes mutantset tüves PaWdnaE2 *imuB* spetsiifiline transkript ja puudus *dnaE2* transkript.

7.3. ImuB ja DnaE2 topelt-defektse *P. putida* tüve PaWImuBDnaE2 konstrueerimine

imuB ja *dnaE2* topelt-defektne tüvi PaWImuBDnaE2 konstrueeriti kasutades retsipient tüvena PaWImuB, asendades *dnaE2* järjestus Δ dnaE2::km järjestusega nagu on eelpool kirjeldatud. *imuB* ja *dinB* topelt-defektne tüvi PaWDinBImuB konstrueeriti, asendades tüve PaWDinB algne *imuB* järjestus Δ imuB::km järjestusega homoloogilise rekombinatsiooni abil, kasutades eespool kirjeldatud protseduuri. Δ imuB::km järjestus konstrueeriti asendades MscI fragment plasmiidis pGEMimuB *Km^r* geeni sisaldava HincII fragmendiga, mis pärines plasmiidist pKSk_{km}, saades plasmidi pGEM Δ imuB::km. Lõpuks Δ imuB::km järjestust sisaldav DNA fragment inserteeriti EcoRI lõigatuna plasmidi pGP704L, saades plasmidi pGP704 Δ imuB::km. Selleks, et kindlaks teha kas algsete geenide järjestused on asendatud modifitseeritud järjestustega kontrollisime konstrueeritud topelt-defektseid tüvesid PCR-ga.

8. UV-kiiritatud rakkude elumuse määramine

Selleks, et iseloomustada *P. putida* tüvede PaWImuB, PaWDnaE2 ja PaWImuBDnaE2 UV kiiritamise järgset elumust kasvasime neid bakteritüvesid üleöö LB-söötmes. Lahjendasime kultuuri tiheduseni $A_{580} = 0,06 - 0,1$ ja kasvasime eksponentsiaalse faasi tiheduseni $A_{580} = 0,6 - 0,8$. Seejärel tegime kultuuridest lahjendused 1x M9 lahusesse, plaatisime LB-tassile. PaWuvrA ja PaWuvrD kultuuridest tegime 10^{-2} lahjenduse ja *P. putida* algse tüve kultuurist 10^{-3} lahjenduse. Kiiritasime plaaditud rakukultuuriga tase lainepikkuse 254 nm juures 50 J/m^2 , kasutades firma “Stratagene” aparati “UV-Stratalinker 1800”. Pärast kiiritamist kasvasime kultuure üleöö 30 °C juures. Elusrakkude määramiseks plaatisime kiiritamata kultuuridest 10^{-6} lahjendused LB-tassidele ja inkubeerisime samuti 30 °C juures. Järgmisel päeval lugesime tekkinud kolooniad ja arvutasime, kui suur osa tassil kiiritatud rakkudest jäi ellu. Tulemused esitasime protsendina elusrakkude suhtes.

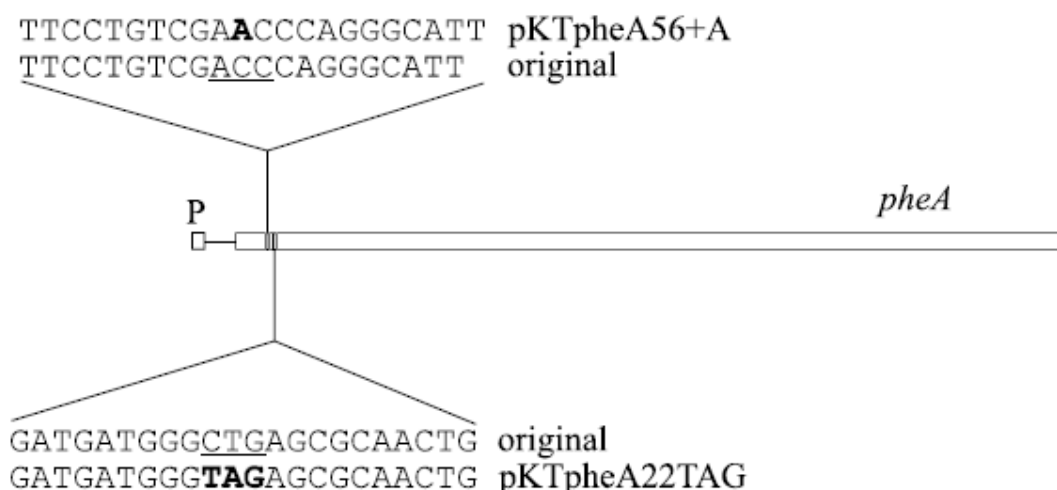
9. Phe⁺ mutantide isoleerimine

ImuB ja DnaE2 osaluse uurimiseks nälgivas bakteripopulatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides kasutasime fenooli monooksügenaasi geenil *pheA* põhinevaid testsüsteeme pKTpheA56+A ja pKTpheA22TAG (Tegova jt., 2004). Need testsüsteemid võimaldavad jälgida vastavalt raaminihke- ja asendusmutatsioonide teket. Plasmiidis pKTpheA22TAG paiknevas *pheA* geenis on 22. koodon CTG asendatud translatsioonistoppkoodoniga TAG (joonis). Ühenukleotiidsete deletsioonide uurimiseks on tekitatud fenooli monooksügenaasi kodeeriva *pheA* geeni 56. positsioonis asuvasse treoniini kodeerivasse koodonisse A nukleotiidi lisamisega +1 raaminihke mutatsioon. Rakud saavad hakata tarvitama süsinikuallikana fenooli plasmidi pKTpheA22TAG puhul kui toimub *pheA* geeni järjestuses stoppkoodonit TAG muutev asendusmutatsioon. Plasmidi pKTpheA56+A puhul kui *pheA* järjestuses -1 raaminihke mutatsiooni tekkimisel taastub algne lugemisraam.

Esmalt viisime *P. putida* algse tüve ja *imuB* ning *dnaE2* geenide suhtes defektsete tüvede rakkudesse vastavalt plasmidi pKTpheA22TAG või pKTpheA56+A. Testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* rakke kasvasime 20-24 tundi minimaalsöötmes 30°C juures. Seejärel plaatisime 2,5-250 µl rakke minimaaltassidele, mis sisaldasid ainsa süsinikuallikana fenooli (2,5 mM) ja plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi (Cb). Phe⁺ revertantide akumul eerumist selektiivtassidele jälgisime plasmidi pKTpheA22TAG puhul kümne päeva jooksul peale rakkude plaatimist, plasmidi pKTpheA56+A puhul viieteistkümne päeva jooksul. Kasvavas kultuuris plaatimise eelselt tekkinud Phe⁺ revertandid ilmusid tassidel nähtavale katse teisel päeval. Hilisematel päevadel tassidele ilmunud Phe⁺ kolooniate puhul olid mutatsioonid tekkinud süsinikunälja tingimustes fenooli minimaaltassidel olevates rakkudes (Kasak jt., 1997). Kõikide uuritavate tüvedega viisime läbi vähemalt 3 sõltumatut katset, igas katses oli 20 paralleeli.

Selleks, et arvutada Phe⁺ revertantide tekkesagedust, määrasime *P. putida* algse tüve PaW85 ja *imuB* ning *dnaE2* geenide suhtes defektsete tüvede elusrakkude arvu kogu katse jooksul. Kasvavas kultuuris olevate elusrakkude määramiseks tegime lahjendused samadest kultuuridest, mida plaatisime Phe-Cb rakkudele ning plaatisime 10⁻⁷ lahjendused LB tassidele. Selleks, et hinnata, kuidas muutus uuritavate tüvede elusrakkude arvukus Phe-Cb tassidel, lõikasime 1 ml pipetiotsikuga akumulatsioonitassist välja agariketta, vältides tassil tekkinud Phe⁺ kolooniaid. Agariketta pindala moodustab 1/100 kogu tassi pindalast. Bakterirakud eemaldasime agarsöötmetükilt, loksutades seda 1 ml-s 1xM9 lahuses. Saadud

rakususpensioonist plaatisime sobiva lahjenduse antibiootikumi (Km või Tet olenevalt uuritava tüve resistentsusest) sisaldavatele LB tassidele. Inkubeerisime tase üleöö 30°C juures ning seejärel lugesime tassidele tekkinud kolooniad kokku ning leidsime elusrakkude arvu Phe-Cb tassidel. Elusrakkude arvu määrasime vähemalt viiest sõltumatust sama tüve nälgivast bakterikultuurist. Phe⁺ revertantide tekkesageduse arvutasime 10⁹ elusraku kohta.



Joonis 4. Asendus- ja raaminihkemutatsioonide uurimiseks vajalik testsüsteem.

P. putida rakkudes toimuvates ühe nukleotiidsete deletsioonide (plasmiid pKTpheA56+A) ja erinevate asendusmutatsioonide (plasmiid pKTpheA22TAG) detekteerimiseks kasutatud testsüsteemid. Joonisel on näidatud fragment fenooli monooksügenaasi kodeeriva *pheA* geeni algsest järjestusest ja selle mutantsetest variantidest erinevates testsüsteemides. P tähistab testsüsteemides *pheA* geeni ees olevat konstitutiivselt transkribeeritavat promootorit.

10. UV-kiirguse poolt indutseeritud mutagenees

Mutatsioonisageduse testimiseks kasvasime *P. putida* tüvesid üleöö LB-söötmes. Lahjendasime kultuuri optilise tiheduseni $A_{580} = 0,1$ ja kasvasime kuni rakutihedus oli jõudnud vahemikku $A_{580} = 0,6-0,8$.

UV- mutageneesi testimiseks määramiseks kiiritasime 10 ml bakterikultuuri Petri tassil lainepikkusel 252 nm 100 J/m². Lahjendasime kiiritatud kultuuri värskesse LB-puljongisse, lisades 100 µl bakterikultuuri 2,5 ml LB-sse, ja kasvasime rakke üleöö. Rakkude kiiritamiseks kasutasime firma “Stratagene” aparaati “UV-stratalinker 1800”.

Mutageeni toime hindamiseks mutatsioonisagedusele plaatisime 500 µl UV-ga kiiritatud ja kiiritamata üleöö kasvanud kultuuri rakkudest rifampitsiini (100 µg/ml) sisaldavatele LB-tassidele ja inkubeerisime üleöö 30°C juures. Elusrakkude määramiseks plaatisime üleöö mutageeni juuresolekul kasvanud ja kahjustamata rakkudest 10^{-7} lahjendused LB-tassidele ja inkubeerisime samuti üleöö. Saadud tulemused on esitatud Rif^r mutantide arvukusena 10^9 elusraku kohta.

Tulemused

Mutatsioonide teke võib olla bakterirakule kas kahjuliku või kasuliku toimega. Rakus peab valitsema tasakaal mutatsioonide genereerimise ja genoomi stabiilsuse vahel. Mutatsioonide teke, milles osalevad erinevad DNA polümeraasid võimaldab bakteripopulatsioonil adapteeruda erinevate keskkonna tingimustega, kuid kohanemine ei tohi tulla liiga suurte genoomi muutuste hinnaga. DNA stabiilsust aitavad hoida erinevad DNA reparatsioonisüsteemid.

Meie töögrupis uuritakse erinevate DNA reparatsioonisüsteemide ja DNA polümeraaside osalust mullabakteris *P. putida* toimuvates mutatsiooniprotsessides. Selle töö eesmärgiks oli välja selgitada geenide *imuB* ja *dnaE2* poolt kodeeritud DNA polümeraaside homoloogide osalus *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides. Tulemused, mis on käesolevas magistritöös esitatud, on avaldatud artiklis Lauri Koorits, Radi Tegova, Mariliis Tark, Kairi Tarassova, Andres Tover, Maia Kivisaar: Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. DNA repair 6 (2007) 863-868.

1. *P. putida* DNA polümeraaside III ja IV homolooge kodeerivate geenide *dnaE2* ja *imuB* identifitseerimine

Analüüsides *P. putida* tüve KT2440 (geneetiliselt identne tüvega PaW85) genoomi (www.tigr.org) leidsime geenid PP3119 ja PP3118, mille poolt kodeeritavad valgud on vastavalt 30,8 % ja 22 % ulatuses identsed *P. putida* replikatiivse polümeraasi DnaE ja Y-perekonda kuuluva spetsialiseeritud DNA polümeraasi DinB valkudega. Kirjandusest on teada, et *dnaE* ja *dinB* geenide homoloogid *dnaE2* ja *imuB* kodeerivad vigaderohkeid alternatiivseid DNA polümeraase ning kuuluvad näiteks *C. crescentus* ja *P. aeruginosa* rakkudes nn. „mutageensuse operoni” koosseisu (Galhardo jt., 2005), (Sanders jt., 2006). Selleks, et välja selgitada nende geenide funktsioone *P. putida* rakkudes, konstrueerisime *dnaE2* ja *imuB* geenide suhtes defektsed tüved ning nende geenide suhtes topeltdefektsed tüved. Mutatsiooniprotsesside iseloomustamiseks *P. putida* kultuuris kasutasime testsüsteeme, mis põhinevad bakteri võimel kasutada fenooli ainsa süsinikuallikana juhul, kui rakkudesse on viidud fenooli monooksügenaasi kodeeriv *pheA* geen. Fenool lagundatakse plasmidselt kodeeritud fenooli monooksügenaasi abil katehhooliks, mis on edasi metaboliseeritav *P. putida* rakkudes kromosomaalselt kodeeritud valkude abil. Kasutatavad testsüsteemid

võimaldavad *P. putida* rakkudes vaadelda nii raaminihke- kui ka asendusmutatsioonide teket. Ühenukleotiidsete deletsioonide uurimiseks on tekitatud fenooli monooksügenaasi kodeeriva *pheA* geeni 56. positsioonis asuvasse treoniini kodeerivasse koodonisse A nukleotiidi lisamisega +1 raaminihkemutatsioon. Asendusmutatsioonide uurimiseks mõeldud testsüsteem sisaldab *pheA* geeni kodeerivas järjestuses asendusmutatsiooni, mis muudab fenooli monooksügenaasi 22. positsioonis asuva leutsiini kodeeriva CTG koodoni translatsiooni stoppkoodoniks TAG (Tegova jt., 2004).

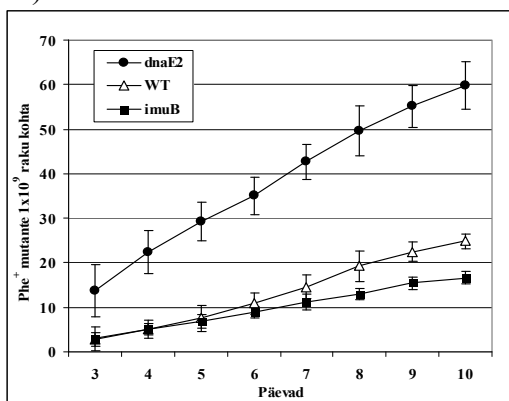
2. *DnaE2* ja *ImuB* osalus *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides

Selleks, et uurida *ImuB* ja *DnaE2* osalust *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides, konstrueerisime *dnaE2* ja *imuB* suhtes defektsed *P. putida* tüved, mille nimetasime vastavalt PaWDnaE2 ja PaWImuB. Kõikide selles töös kasutatud *P. putida* kirjeldatud peatükis „Materjal ja meetodika”. Kuna *imuB* ja *dnaE2* geenid paiknevad ühes operonis, siis, et välistada ühe geeni katkestamise mõju teise geeni ekspressioonile kvantiteerisime nende geenide mRNA hulki RT-PCR meetodil ja leidsime, et negatiivset mõju *imuB* või *dnaE2* transkriptsioonile ei ilmnunud (andmeid ei ole esitatud). Kuna *P. putida* populatsioon viibib enamuse aega tingimustes, kus toitainete kättesaadavus on limiteeritud, siis otsustasime uurida *ImuB* ja *DnaE2* osalust nälgivas bakteripopulatsioonis toimuvates mutatsiooniprotsessides. Selleks plaatisime nii asendus- kui ka raaminihkemutatsioonide uurimiseks vajalikke testsüsteeme, vastavalt pKTpheA22TAG ja pKTpheA56+A sisaldavaid *P. putida* algse tüve PaW85 ning tüvede PaWImuB ja PaWDnaE2 rakke minimaaltassidele, mis sisaldasid ainsa süsinikuallikana fenooli. Phe⁺ mutantide teket fenooli minimaaltassidel jälgisime testsüsteemi pKTpheA56+A puhul 15-ne päeva pikkuse perioodi jooksul ja testsüsteemi pKTpheA22TAG puhul 10-ne päeva jooksul. Tulemustest võib näha, et *dnaE2* defektsuse korral nälgivates *P. putida* rakkudes on asendusmutatsioonide tekkesagedus võrreldes algse tüvega kogu akumulatsiooniperioodi vältel ~ 2,5-3 korda kõrgem (Joonis 5-A). Ühenukleotiidsete deletsioonide tekkesagedus nälgivates *DnaE2* defektsetes *P. putida* rakkudes oli võrreldav algse tüve omaga (Joonis 5-B). Sellest võime järeldada, et *DnaE2* on DNA polümeraas, mille olemasolu vähendab asendusmutatsioonide teket ja kuid ei mõjuta nälgivates *P. putida* rakkudes toimuvaid raaminihkemutatsioone.

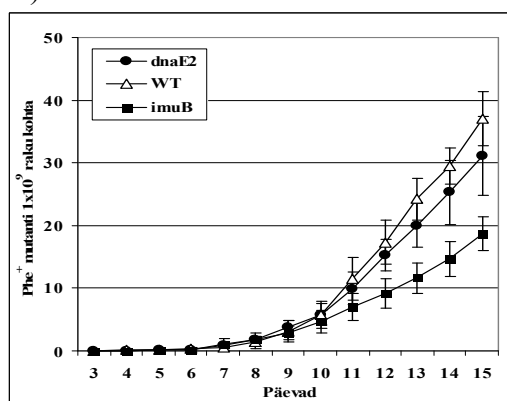
ImuB defektsetes tüves oli nälgimise algperioodil asendusmutatsioonide tekkesagedus võrreldav WT tüve omaga (Joonis 5-A). Hiljem, peale 6.-ndat katsepäeva jäi ImuB defektsetes tüves asendusmutatsioonide teke ~ 1,5 korda madalamaks võrreldes algse tüvega. Samuti võis ImuB defektsetes *P. putida* tüve pikka aega nälginud populatsioonis näha ligikaudu 2 korda madalamat raaminihkemutatsioonide tekkesagedust võrreldes WT tüvega (Joonis 5-B)

Tulemustest võib järeldada, et *P. putida* rakkudes toimival mutageneesil omavad ImuB ja DnaE2 erinevaid efekte: DnaE2 defektsus suurendab asendusmutatsioonide tekkesagedust kuid ei oma efekti raaminihkemutatsioonide tekkesagedusele, samas kui ImuB defektsuse korral väheneb mõlemat tüüpi mutatsioonide tekkesagedust.

A) asendusmutatsioonid



B) raaminihkemutatsioonid



Joonis 5. Phe⁺ mutantide akumulatsioon fenooli minimaaltassidel *P. putida* algse tüves PaW85 ja selle erinevate DNA polümeraaside homoloogide geenide suhtes defektsetes tüvedes. A) Asendusmutatsioonide akumulatsioon tüvedes PaW85 (WT), PaWImuB (imuB) ja PaWDnaE2 (dnaE2). B) Raaminihkemutatsioonide akumulatsioon tüvedes PaW85 (WT), PaWImuB (imuB) ja PaWDnaE2 (dnaE2). Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvatud 1×10^9 elusraku kohta. Joonistel on esitatud vähemalt viie sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

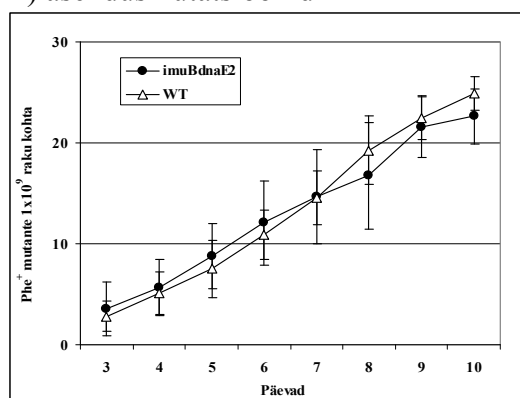
3. Mutatsiooniprotsessid ImuB ja DnaE2 ning ImuB ja DinB suhtes topektdefektsetes *P. putida* tüvedes

Selleks, et mõista paremini ImuB ja DnaE2 rolli *P. putida* nälgiva populatsiooni rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides, konstrueerisime *P. putida* tüved, kus olid samaaegselt defektsetes mitme spetsialiseeritud polümeraasi suhtes ja viisime läbi katsed nii asendus- kui raaminihkemutatsioonide jälgimist võimaldavate testsüsteemidega. Tüves PaWImuBDnaE2

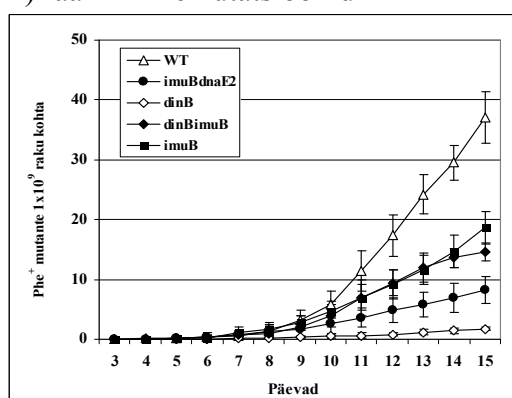
asendusmutatsioonide tekkesagedus on võrreldav algse *P. putida* tüve asendusmutatsioonide tekkesagedusega (Joonis 6-A). Kuna tüves PaWDnaE2 asendusmutatsioonide tekkesagedus võrreldes algse tüvega oli suurenenud, viitab see ImuB ja DnaE2 valkude antagonistlikule mõjule *P. putida* rakkudes. Kuigi ainult DnaE2 valgu puudumine *P. putida* rakkudes ei mõjuta raaminihkemutatsioonide tekkesagedust, langes seda tüüpi mutatsioonide tekkesagedus tüves PaWImuBDnaE2 võrreldes algse tüvega ja tüvega PaWImuB, olles 15-daks nälgimispäevaks vastavalt 4 ja 2 korda madalam (Joonis 6-B). See tulemus viitab teatud tingimustes DnaE2 rollile ka raaminihkemutatsioonide tekkel.

Varem on meie töögrupis näidatud, et valdava enamuse ühenukleotiidsete deletsioonide tekitamise eest *P. putida* rakkudes on vastutav geeni PP1203 poolt kodeeritud DinB e. PolIV (Tegova jt., 2004). Käesolevas töös näitasime, et ka ImuB osaleb hilise nälja tingimustes raaminihkemutatsioonide tekkel. Selleks, et uurida milline osa raaminihkemutatsioonidest tekib *P. putida* rakkudes ImuB olemasolul, konstrueerisime ka ImuB ja DinB valkude suhtes topeltdefektse tüve PaWDinBImuB. Üllatavalt oli raaminihkemutatsiooni tulemusel tekkinud Phe⁺ mutantide tekkesagedus tüves PaWDinBImuB võrreldav tüve PaWImuB omaga, jäädes 15-ne nälgimispäeva lõpuks ligikaudu 10 korda kõrgemaks võrreldes DinB defektse tüvega (Joonis 6-B) Nendest tulemustest võib järeldada, et tegemist võib olla erinevate DNA polümeraaside konkurentsiga replikatsioonikahvlile ja olukorraga, kus ühtede DNA polümeraaside puudumisel võtavad teised ilmselt nende funktsiooni DNA replikatsioonil üle.

A) asendusmutatsioonid



B) raaminihkemutatsioonid

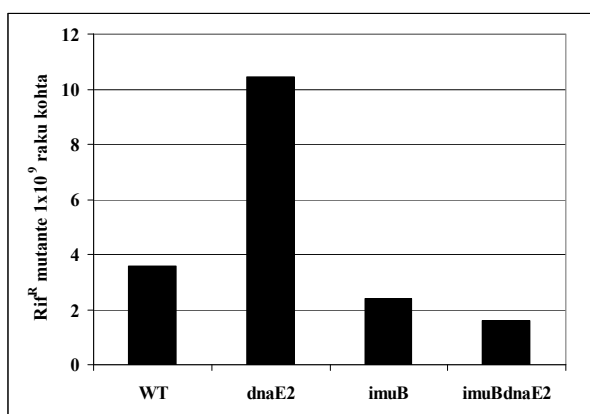


Joonis 6. Phe⁺ mutantide akumulatsioon fenooli minimaaltassidel *P. putida* algses tüves PaW85 ja selle erinevate DNA polümeraaside homoloogide geenide suhtes defektsetes tüvedes. A) Asendusmutatsioonide akumulatsioon tüvedes PaW85 (WT) ja PaWImuBDnaE2 (imuBdnaE2). B) Raaminihkemutatsioonide akumulatsioon tüvedes

PaW85 (WT), PaWImuB (imuB), PaWDinB (dinB), PaWimuBDnaE2 (imuBdnaE2) ja PaWDinBImuB (dinBimuB). Phe⁺ mutantide teke fenooli tassidele on arvatud 1×10^9 elusraku kohta. Joonistel on esitatud vähemalt viie sõltumatu katse tulemused ja standardviga.

4. ImuB ja DnaE2 osalus UV mutageneesis

Kuna ImuB ja DnaE2 kuuluvad *P. putida* rakkudes nn. mutageensuse operoni ja nende geenide transkriptsioon on aktiveeritud DNA kahjustuse poolt, siis otsustasime uurida nende polümeraaside osalust ka DNA kahjustusest sõltuval mutageneesis. Selleks viisime läbi UV mutageneesi katsed algse *P. putida* tüvega ja tüvedega PaWImuB, PaWDnaE2 ja PaWimuBDnaE2 (Joonis 7). UV kiirguse poolt indutseeritud mutageneesi uurimiseks kasutasime rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinevat testsüsteemi. Rifampitsiini sisaldaval söötmel võimaldab bakteril kasvu mutatsioonide teke RNA polümeraasi β subühikut kodeerivas geenis (vaata mutatsioonisageduse uurimiseks kasutatud testsüsteemid „Materjal ja meetoodika” peatükis). Tulemustest võib näha, et Rif^R mutantide tekkesagedus tüves PaWDnaE2 on ligikaudu 2 korda kõrgem võrreldes algse *P. putida* tüvega. Tüves PaWImuB seevastu langes Rif^R mutantide tekkesagedus ligikaudu 2 korda võrreldes algse tüvega. Sellest võib järeldada, et ImuB ja DnaE2 osalevad peale nälgivas populatsioonis toimuvate mutatsiooniprotsesside ka DNA kahjustussõltuval mutageneesis. Tüve PaWimuBDnaE2 Rif^R mutantide tekkesagedus oli võrreldav PaWImuB omaga, mis viitab veelkord ImuB ja DnaE2 antagonistlikele efektidele *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides.



Joonis 7. ImuB ja DnaE2 osalus UV poolt indutseeritud mutageneesis. UV-C kiiritatud tüvedes PaW85 (WT), PaWDnaE2 (dnaE2), PaWImuB (imuB) ja PaWimuBDnaE2 (imuBdnaE2) tekkinud Rif^R mutantide mediaanväärtus 10^9 elusraku kohta.

Arutelu

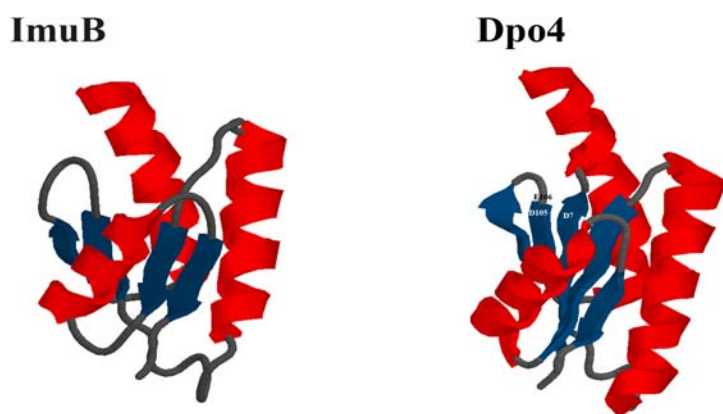
Uurides *imuB* ja *dnaE2* geenide suhtes defektsetes *P. putida* nälgivates populatsioonides toimuvaid mutatsiooniprotsesse leidsime, et need valgud käituvad mutatsioonitekke protsessides antagonistlikult. DnaE2 defektsuse korral nägime asendusmutatsioonide taseme tõusu võrreldes algse tüvega, raaminihkemutatsioonide tekkesagedusele mingit efekti ei ilmnenud. Samas, *imuB* geeni suhtes defektsetes *P. putida* tüves vähenes võrreldes algse tüvega nii asendus- kui raaminihkemutatsioonide teke. Samuti käitusid ImuB ja DnaE2 antagonistlikult *P. putida* rakkudes DNA kahjustussõltuval mutageneesil. Kuna varem on mitmetes organismides näiteks *C. crescentus*'es ja *P. aeruginosa*'s näidatud, et geenid *imuB* ja *dnaE2* kodeerivad vigutegevaid DNA polümeraase (Rodrigo jt., 2005), (Sanders jt., 2006) ja kuuluvad nn. „mutageensuse operoni”, siis oli *P. putida* DnaE2 valgu mutatsioonide teket ära hoidev roll üllatav. Nii *C. crescentus* kui ka *P. aeruginosa* DnaE2 valgu primaarstruktuuri analüüs näitab, et valgu regioon, mis on vajalik interaktsiooniks DNA *proofreading* ϵ subühikuga on sarnaselt replikatiivsetele DNA polümeraasidele DnaE2 valgul olemas. Seega ei ole põhjust arvata, et DnaE2 olemasolul neis organismides suurenenud mutatsioonitekkesagedus võiks olla põhjustatud sellest, et ϵ ei saa interakteeruda DnaE2 valguga ja selle polümeraasi poolt tehtaval sünteesil tekkinud vigu ei parandata. Juhul kui DnaE homoloogid ei interakteeru *proofreading* subühikuga nii hästi võib see muuta selle valgu võimeliseks ületama ka mitte Watson-Crick aluspaare. Seda on näidanud Borden et al., (2002) *E. coli* põhilise replikatiivse DNA polümeraasi III katalüütilise subühiku (kodeeritud *dnaE* geeni poolt) puhul et, ilma *proofreading* subühikuga seondumata võib PolIII läbi viia DNA sünteesi üle UV poolt tekitatud kahjustuse, mida ϵ subühikuga polümeraas ei suuda. Üks võimalik seletus DnaE2 olemasolul vigaderohke DNA sünteesi toimumisele on see, et *P. putida* DnaE2 interakteerub ϵ subühikuga paremini võrreldes *C. crescentus* ja *P. aeruginosa* DnaE2 valkudega ja viib läbi vigadevaba DNA sünteesi. Samas ei ole üheski seni avaldatud töös näidatud otseselt interaktsiooni DnaE2 ja ϵ subühiku vahel ja see hüpotees vajab lisauurimist. DnaE2 võib soodustada vigadevaba DNA sünteesi konkureerides β klambriga seondumise pärast vigutekitavate DNA polümeraasidega. Juhul kui rakkudes on DnaE2 seondunud β klambriga konkureerides replikaasi koosseisust vigutegevad DNAPolümeraasid välja, väheneb DNA sünteesil vigade teke. Lisaks mutatsioonisageduse muutusele *dnaE2* suhtes defektsetes *P. putida* populatsioonis, oleme näinud, et *dnaE2* defektsus mõjutab ka rakkude kasvukiirust. Peale keskkonnatingimuste muutumist kasvavad DnaE2 defektse *P. putida* tüve kolooniad võrreldes algse *P. putida* tüve kolooniatega aeglasemalt, mis viitab

Samuti sellele, et DnaE2 ei mitte replikatiivse polümeraasi DnaE teine koopia vaid võib olla spetsialiseeritud DNA polümeraas, mille olemasolu on vajalik *P. putida* rakkudele nt. kiireks adaptatsiooniks keskkonna muutumisel (andmeid ei ole näidatud).

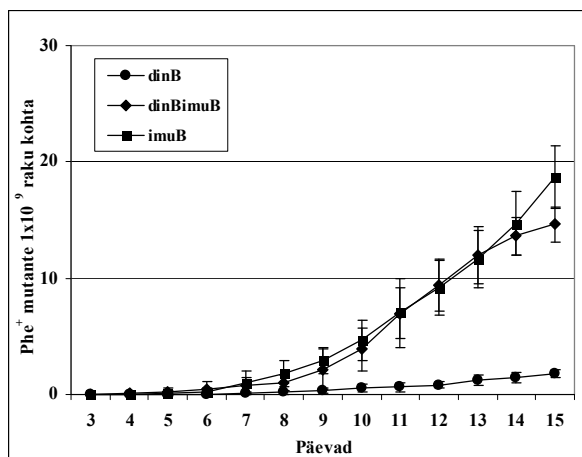
Seda, et DnaE2 võib olla spetsialiseeritud polümeraas näitab ka *imuB* ja *dnaE2* geenide suhtes topeltdefektses tüves raaminihkemutatsioonide tekkesageduse langus. See on ainus tüvi, kus saab detekteerida DnaE2 osalust raaminihkemutatsioonide tekkes. Juhul kui DnaE2 on spetsialiseeritud DNA polümeraas, mis osaleb nt. replikatsiooni *restardil*, siis võib oletada, et DnaE2 olemasolu rakkudes on teatud tingimustes vajalik raaminihkemutatsioonide tekkeprotsessides. Samuti ei saa välistada nende andmete järgi, et DinB ja/või ImuB puudumisel rakus osaleb DnaE2 kui DNA polümeraas ise otseselt raaminihete tekkes.

Bakteris *Caulobacter crescentus* on ImuB on nii funktsioonilt kui ka struktuurilt sarnane vigutegevate Y- perekonna DNA polümeraasidega (Rodrigo jt., 2005). Võrdlesime *P. putida* ImuB valgu aktiivtsentri struktuuri vigaderohke arhebakteri *S. solfataricus* DinB homoloogi DNA polümeraasi Dph aktiivtsentri struktuuriga ja leidsime, et kuigi *P. putida* ImuB aktiivtsentri üldine struktuur on sarnane Dbh aktiivtsentriga, puuduvad *P. putida* aktiivtsentris kolm konserveerunud aminohappe jääki, mis asuvad Y-perekonna DNA polümeraaside katalüütilises tsentris ja mille olemasolu on absoluutselt vajalik selleks, et see valk töötaks DNA polümeraasina (Joonis 8). See tõstatas küsimuse, kas meie poolt uuritavas organismis on ImuB valgu puhul üldse tegemist DNA polümeraasiga. Võib-olla suurendab ImuB valk *P. putida* rakkudes mutatsioonitekkesagedust kaudselt, mitte polümeraasest aktiivsust vajaval moel. Eukarüootsetes organismides on näidatud, et DNA polümeraas Rev1, mis omab küll dNTP transferaasest aktiivsust mõjutab mutatsioonide teket kaudselt. Nii hiires kui inimeses on kirjeldatud Rev1 valgul ~ 100 aminohappe pikkust järjestust, kuhu on võimalised seonduma erinevad spetsialiseeritud DNA polümeraasid, nagu Polη, Polι, Polκ. Samuti on näidatud, et Rev1 osaleb spetsialiseeritud polümeraasi Polζ assambleerimisel replikatsioonikahvlisse (Guo jt., 2003; Ohashi jt., 2004; Tissier jt., 2004). UV indutseeritud mutageneesil on vajalik nii Rev1 kui ka Polζ olemasolu kuid mitte Rev1-e DNA sünteesi aktiivsus (Haracska jt., 2002). DNA polümeraaside omavahelise interaktsiooniga on võimalik seletada ka ImuB defektses *P. putida* tüves raaminihkemutatsioonide tekkesageduse langust. Kuna meie töögrupis on varem näidatud (Tegova jt., 2004), et valdava enamuse (≥90%) raaminihkemutatsioonide tekke eest on *P. putida* rakkudes vastutav DinB, siis on võimalik, et ImuB on *P. putida* rakkudes abivalk, mis soodustab DinB sõltuvat replikatsiooni nt. aidates

viimast DNA ahelale. On võimalik, et ImuB defektsuse korral muutub raaminihkmutatsioonide teke DinB sõltumatuks ja mingi teine DNA polümeraas saab eelise replikatsioonikahvlisse konkureerimisel. Seda, et raaminihkmutatsioonide teke võib toimuda DinB sõltumatult näitab ImuBDinB topeltmutandis detekteeritud raaminihkmutatsioonide tekkesagedus, mis on võrreldav raaminihkmutatsioonide tekkesagedusega ImuB defektses tüves ja jääb ligikaudu 10 korda kõrgemaks võrreldes DinB defektses tüves tekkivate raaminihkmutatsioonide hulgaga (Joonis 9). Üks võimalikke kandidaate, mis võib läbi viia DNA sünteesi ImuB defektses *P. putida* tüves on PolI. Seda hüpoteesi toetab *P. aeruginosa* tulemus, kus PolI omab spetsialiseeritud polümeraasiga sarnast rolli ja mille defektsuse korral langeb UV kiiritamise järgne asendusmutatsioonide tekkesagedus (Sanders jt., 2006). Lisaks sellele on *P. putida* rakkudes peale PolI-e PP0123 defineeritud veel ORF PP2273, mille poolt kodeeritud valk on 29,8% ulatuses identne PolI-ga. Nende DNA polümeraaside roll *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides vajab edaspidiseid uuringuid.



Joonis 8. *P. putida* ImuB (ah 78-163) ja *S. solfataricus* DNA polümeraas IV Dpo4 (ah 1-10 ja 78-166) paeldiagramm võrdlus. ImuB modelleeriti *ModBase* andmebaasis, kasutades matriitsina Dpo4 (PDB koodi 1jx4a). β lehed, mis moodustavad peopesa domääni on näidatud sinistena. Konserveerunud jäägid D7, D105 ja E106, mis moodustavad PolIV-ja katalüütilise tsentri on näidatud Dpo4 struktuuril. ImuB ja Dpo4 ah-1 kuni ah- 9 vahel ei ole mingisugust aminohapete identsust, seepärast ImuB mudel konstrueeriti ilma N-terminaalsete jääkideta. Tähtis on tähele panna, et Dpo4 üks konserveerunud jääkidest D7 asub β lehel 1 ja just see osa on ImuB mudelist puudu. ImuB ennustatud aminohappelise järjestuse alusel võime öelda, et selle valgu N-terminuses ei ole ühtegi D jääki. Lisaks sellele ka teised kaks konserveerunud Dpo4 β ahelal 6 asuvat jääki on puudu ImuB järjestusest.



Joonis 9. Tüves PaWDinBimuB (dinBimuB) tekkinud raaminihkmutatsioonide sagedus on võrreldav tüve PaWImuB (imuB) raaminihkmutatsioonide tekkesagedusega, mis on ligikaudu 10 korda kõrgem võrreldes tüvega PaWDinB (dinB). See tulemus viitab võimalusele, et ImuB defektsuse korral muutub raaminihkmutatsioonide teke DinB sõltumatuks ja mingil teine DNA polümeraas võib saada eelise replikatsioonikahvlisse konkureerimisel.

Kokkuvõte

Bakterirakkudes tekib elutegevuse käigus pidevalt DNA kahjustusi ja nukleotiidide modifikatsioone. Üheks oluliseks võimaluseks, kuidas hoolimata DNA kahjustuse olemasolust bakter suudab elutegevust jätkata on spetsialiseeritud DNA polümeraaside poolt läbiviidud replikatsioon. Paljude bakterite sealhulgas *P. putida* genoom sisaldab niinimetatud „mutageensuse operoni”, mis sisaldab Y- perekonna DNA polümeraasi DinB ja replikatiivse polümeraasi DnaE homoloogi. Nende DNA polümeraaside funktsioon näiteks *C. crescentus*’es ja *P. aeruginosa*’s on soodustada vigaderohket DNA sünteesi (Rodrigo jt., 2005; Sanders jt., 2006).

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaates kirjeldasin nii prokarüootide kui ka eukarüootide replikatiivseid ja spetsialiseeritud DNA polümeraase ja nende funktsioone.

Minu magistritöö praktilises osas uurisin geenide *imuB* ja *dnaE2* poolt kodeeritavate DNA polümeraaside DinB ja DnaE homoloogide efekte *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides.

Töö tähtsamad tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. *P. putida* DnaE2 valk võib erinevalt teistest siiaamaani uuritud organismide DnaE2 valkudest olla DNA polümeraas, mille olemasolu soodustab vigadevaba DNA sünteesi
2. On võimalik, et ImuB ei ole *P. putida* rakkudes DNA polümeraas, kuna selle valgu aktiivtsentrist puuduvad DNA polümeraasseks aktiivsuseks vajalikud aminohapped. ImuB võib osaleda mutatsiooniprotsessides kaudselt võimaldades spetsialiseeritud DNA polümeraasidel DNA replikatsiooni läbi viia.

Summary

DNA damages and modifications of nucleotides occurs during the growth of bacterial cells. One possibility how bacteria cope with DNA damages is replication with the aid of specialised DNA polymerases. Genome of many bacteria, including *P. putida* contains so called „mutagenesis cassette” which includes genes encoding Y-family DNA polymerase DinB and replicative polymerase DnaE homologs. The function of these polymerases for example in *C. crescentus* and *P. aeruginosa* is to perform error-prone DNA synthesis (Rodrigo jt., 2005; Sanders jt., 2006).

In the literature overview of this master’s work I described replicative and alternative DNA polymerases and their functions in eu- and prokaryotes.

In the practical part of my master’s work I studied effects of homologs of DNA polymerases DnaE2 and ImuB which are encoded by genes *dnaE2* and *imuB* on mutational processes in *P. putida* cells.

Most important results of this work can be summarised:

1. DnaE2 protein differently from other so far investigated DnaE2 proteins could be DNA polymerase which appearance in bacteria cells facilitates error-free DNA synthesis.
2. It is possible that ImuB in *P. putida* is not a DNA polymerase because essential amino acids, which are crucial for the polymerase activity, are missing from the active site of this protein. ImuB can participate indirectly in mutational processes facilitating specialised DNA polymerases to perform DNA replication.

Kirjanduse loetelu

Abella M, Erill I, Jara M, Mazón G, Campoy S, 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.

Boshoff, M. Reed, C. Barry, V. Mizrahi 2003. DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* Volume 113, Issue 2, Pages 183-193 H.

Boudsocq F, Iwai S, Hanaoka F, Woodgate R 2001. Sulfolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic pol η . *Nucleic Acids Res.* 29(22): 4607–4616.

Bruck I, Woodgate R, McEntee K, 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.* 271:10767-74.

Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown P O, P C Hanawalt 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics.* 158(1): 41–64.

Fernández de Henestrosa A R, Rivera E, Tapias A, Barbé J 1998. Identification of the *Rhodobacter sphaeroides* SOS box. *Mol Microbiol* 28 (5), 991–1003.

Fernández de Henestrosa A R, Ogi T, Aoyag S, Ohmori H, Woodgate R 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35 (6), 1560–1572.

Frank E G, Ennis D G, Gonzalez M, Levine A S, Woodgate R 1996. Regulation of SOS mutagenesis by proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(19): 10291–10296.

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

Galhardo R S, Rocha R P, Marques M V, Menck C F M 2005. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.* 33(8): 2603–2614.

Ishikawa T, Uematsu N, Mizukoshi T, Iwai S, Iwasaki H, Masutani C, Hanaoka F, Ueda R, Ohmori H, Todo T 2001. Mutagenic and nonmutagenic bypass of DNA lesions by *Drosophila* DNA polymerases dpoleta and dpoliota. *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, Issue 18, 15155-15163, 20

Jarosz D F, Beuning P J, Cohen S E, Walker G C 2006. Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*. Volume 15, Issue 2, Pages 70-77.

Johnson A, O'Donnell M 2005. Cellular DNA Replicases: Components and Dynamics at the Replication Fork. *Annu Rev Biochem* 74:283-315.

Kenyon C J, Walker G C 1980. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*.

Kim S-R, Maenhaut-Michel G, M Yamada M, Yamamoto Y, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T, Ohmori H 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 94(25): 13792–13797.

Kim J J, Sundin G W. 2000. Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability in vitro and in planta. *J Bacteriol.* 182(21): 6137–6144.

Kobayashi S, Valentine M R, Pham P, O'Donnell M, Goodman M F 2002. Fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase IV. Preferential generation of small deletion mutations by dNTP-stabilized misalignment. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, Issue 37, 34198-34207.

Layton J C, Foster P L 2003. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli* *Mol Microbiol.* 50(2): 549–561.

Ling H, Boudsocq F, Woodgate R, Yang W 2001. Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication
Cell, Volume 107, Issue 1, Pages 91-102

Lopez de Saro F J, Georgescu R E, Goodman M F, O'Donnell M 2003.
Competitive processivity-clamp usage by DNA polymerases during DNA replication and repair. EMBO J. 22(23):6408-18.

Napolitano R, Janel-Bintz R, Wagner J, and Fuchs R P P 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. EMBO J. 19(22): 6259–6265.

Ohmori, E. Friedberg, R. Fuchs, M. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. Kunkel, C. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi 2001. The Y-Family of DNA Polymerases. Molecular Cell, Volume 8, Issue 1, Pages 7-8 H.

Qiu Z, . Goodman M F 1997. The *Escherichia coli polB* Locus Is Identical to *dinA*, the Structural Gene for DNA Polymerase II. J Biol Chem 272:8611-17.

Reuven N, Tomer G, Livneh Z 1998. The Mutagenesis Proteins UmuD' and UmuC Prevent Lethal Frameshifts While Increasing Base Substitution Mutations. Molecular Cell, Volume 2, Issue 2, Pages 191-199.

Rodrigo S. Galhardo, Raquel P. Rocha, Marilis V. Marques, and Carlos F. M. Menck 2005. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus* Nucleic Acids Res. 33(8): 2603–2614.

Prakash S, Johnson R E, Prakash L 2005. Eucaryotic translesion synthesis DNA polymerases: Specificity of Structure and Function. Annu Rev Biochem Vol. 74: 317-353.

Sanders L H, Rockel A, Lu H, Wozniak D J, Sutton M D 2006. Role of *Pseudomonas aeruginosa dinB*-Encoded DNA Polymerase IV in Mutagenesis. J Bacteriol. 188(24): 8573–8585.

- Schaaper PM 1993.** Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 268(32):23762-5.
- Slater S C, Lifshits M R, O'Donnell M, Maurer R 1994.** *holE*, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a *holE* mutant and comparison with a *dnaQ* (epsilon-subunit) mutant. *J Bacteriol.* 176(3): 815-821
- Sommer S, Bailone A, Devoret R 1993.** The appearance of the UmuD'C protein complex in *Escherichia coli* switches repair from homologous recombination to SOS mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 10:963-71
- Sommer S, Boudsocq F, Devoret R, Bailone A 1998.** Specific RecA amino acid changes affect RecA–UmuD'C interaction. *Molecular Microbiology* 28 (2), 281–291.
- Sundin G W, Kidambi S P, Ullrich M, Bender C L 1996.** Resistance to ultraviolet light in *Pseudomonas syringae*: sequence and functional analysis of the plasmid-encoded *ruAB* genes. *Gene.* 177(1-2):77-81.
- Sundin G W, Murillo J 1999.** Functional analysis of the *Pseudomonas syringae* *ruAB* determinant in tolerance to ultraviolet B (290-320 nm) radiation and distribution of *ruAB* among *P. syringae* pathovars. *Environ. Microbiol.* 1: 75-87.
- Tang M, Bruck I, Eritja R, Turner J, Frank E G, Woodgate R, O'Donnell M, Goodman M F 1998.** Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: Reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD'₂C mutagenic complex and RecA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(17): 9755–9760.
- Tang M, Pham P, Shen X, Taylor J S, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman M F 2000.** Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature* **404**, 1014-1018.
- Tapias A, Barbe J 1999.** Regulation of divergent transcription from the *uvrA*-*ssb* promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet.* 262(1):121-30.

Tark M, Tover A, Tarasova K, Tegova R, Kivi G, Hõrak R, Kivisaar M 2005. 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.

Tippin B, Pham P , Goodman M F 2004. Error-prone replication for better or worse. *Trends in Microbiology* Volume 12, Issue 6, Pages 288-295.

Weinel C, Tümmler B 2002. Global features of *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environmental Microbiology* 4 (12), 809–818.

Walker G C 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 48(1):60-93

Walker G C 1985. Inducible DNA repair systems. *Annu Rev Biochem.* 54:425-57.

Witkin E M 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 40(4):869-907.

Zhang S, Sundin G W 2004. Mutagenic DNA repair potential in *Pseudomonas* spp., and characterization of the *ruABPc* operon from the highly mutable strain *Pseudomonas cichorii* 302959. *Canadian Journal of Microbiology* 50 pp 29-39.

Lisa:

Koorits L, Tegova R, Tark M, Tarassova K, Tover A, Kivisaar M 2007. Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. DNA repair. Pages 863-868.