

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1. Mutaatorfenotüübid	6
1.1.1. SOS vastus	6
1.1.2. Reparatsiooniradadega seotud antimutaatorid	7
1.1.3. Oksüdatiivsete kahjustuste ennetamine ja parandamine	8
1.1.4. Antibiootikumistressist stimuleeritud mutatsioonid	10
1.1.5. Mutaator-tRNA-d.....	10
1.1.6. Muud mutaatorid.....	11
1.1.7. Kompenseeriva funktsiooniga DNA reparatsiooniradade geenid.....	12
1.1.8. Mutatsioonisagedust mõjutavad geenid ja mutaatorfenotüüp pseudomonaadides.....	12
1.2. Lämmastiku metabolism	14
1.2.1. Lämmastiku assimilatsioonirajad bakterites	14
1.2.2. Glutamiini süntetaasid bakterites	15
1.2.3. Teised lämmastiku assimilatsioonil osalevad ensüümid.....	16
1.2.4. Lämmastiku metabolismi regulatsioon	17
1.2.5. Nac (<i>nitrogen assimilation control</i>) regulaatorvalk.....	20
2. Eksperimentaalosa	21
2.1. Töö eesmärgid.....	21
2.2. Materjal ja meetodika	22
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid	22
2.2.2. Polümeraasiahelreaktsioon (PCR)	23
2.2.3. Gelelektroforees	25
2.2.4. Bakterirakkude elektroporatsioon	25
2.2.5. Plasmidi eraldamine ja restriksioonanalüüs.....	26
2.2.6. Kloonimine.....	26
2.2.7. Bakterite konjugatsioon	27

2.2.8. DNA sekveneerimine	27
2.2.9. Deletsioonitüvede konstrueerimine I-SceI süsteemiga	28
2.2.10. Mutatsioonisagedust mõjutavate geenide isoleerimine lac-lsc testsüsteemiga	30
2.2.11. <i>P. putida</i> tüvede kasvukõverate mõõtmine	30
2.2.12. <i>P. putida</i> Rif resistentsete (Rif ^R) mutantide tekkesageduse määramine	31
2.2.13. <i>P. putida</i> Phe ⁺ mutantide tekkesageduse määramine plasmiidse TAG testsüsteemiga	31
2.2.14. DNA-d kahjustavate kemikaalide tundlikkuse test.....	32
2.2.15. <i>P. putida</i> glutamiini süntetaaside joondamine ja virtuaalne analüüs	32
2.3. Tulemused ja arutelu.....	33
2.3.1. lac-lsc testsüsteemiga isoleeritud mutatsioonisagedust mõjutavate geenide mutageensuse kontrollimine	33
2.3.2. <i>PP5299</i> geeni ja operoni osalus spontaansete mutatsioonide tekkimisel	35
2.3.3. Geeni <i>PP5299</i> ja kogu operoni deletsiooni mõju statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedusele.....	36
2.3.4. <i>PP5299</i> geeni ja kogu operoni puudumise mõju DNA-d kahjustavate kemikaalide taluvusele	37
2.3.5. <i>P. putida</i> tüvede kasvukõverate mõõtmine	38
2.3.6. <i>P. putida</i> glutamiini süntetaaside joondamine ja virtuaalne analüüs	39
Kokkuvõte.....	44
Involvement of glutamine synthetases in mutational processes in <i>Pseudomonas putida</i>	46
Tänuõnad.....	48
Kasutatud kirjandus	49
Kasutatud veebilehed.....	56
Lisamaterjalid	57

Kasutatud lühendid

2OG – 2-ketoglutaraat

5-OH-dC – 5-hüdroksü-2'-deoksütsütidin

Amp – ampitsilliin

AP sait – lämmastikaluseta nukleotiid DNA-s (ingl k *apurinic/aprimidinic site*)

ATaas – adenülültransferaas

bp – aluspaar (ingl k *basepair*)

Bp – bensüülpenitsilliin

CAA – aminohapete hüdrolüsaati (ingl k *casamino acids*)

CFU – kolooniaid moodustavad rakud (ingl k *Colony Forming Units*)

Glc – glükoos

Gln – glutamiin

Glu – glutamaat

GO ehk 8-oxodG – 7,8-dihüdro-8-okso-2'-deoksüguanosiin

GOGAT – glutamiin-amiid-2-oksoglutaraadi aminotransferaas ehk glutamaadi süntaas

GS – glutamiini süntetaas

Km – kanamütsiin

LB – lüsoenne puljong/sööde (ingl k *lysogenic broth*)

MMC – mitomütsiin C

NQO – 4-nitrokinoliin-N-oksiid

OD – optiline tihedus (ingl k *optical density*)

Phe – fenool

Pol – polümeraas

Rif – rifampitsiin

TLS – kahjustuste ülesüntees (ingl k *translesion synthesis*)

UMP – uridiinmonofosfaat

UTaas/UR - uridülültransferaas/uridülül-eemaldaja ensüüm

Sissejuhatus

Looduslikud bakteripopulatsioonid peavad pidevalt muutuva keskkonna ja stressiolukordadega toime tulema. Bakterites on leitud süsteeme, mis soodustavad stressiolukorras mutatsioonide teket. Muutused geneetilises materjalis tagavad rakkude mitmekesisuse populatsioonis. Mutatsioonid, millel on rakule positiivne valikuväärtus, kinnistuvad ning on olulised bakterite evolutsioneerumisel.

DNA reparatsiooniradade ensüümid on tuntud antimutaatorid, mille puudumisel mutatsioonisagedus rakkudes tõuseb mitu suurusjärku. Ühe suurima mutaatorfenotüübiga on *mutD*-defektsed tüved, millel puudub DNA polümeraasi III replikatsioonivigu korrigeeriv aktiivsus. Seoseid mutatsioonisageduse ja reparatsiooniradade vahel on põhjalikult uuritud, aga on alust arvata, et kõik mutatsioonisagedust mõjutavad geenid ei ole otseselt seotud reparatsiooniradadega. Selliseid kaudsemaid seoseid on raskem uurida. Meie laboris on konstrueeritud testsüsteem *lac-lsc*, mis võimaldab leida transposoonmutageneesi teel mutatsioonisagedust mõjutavaid geene, mis ei ole ainult reparatsiooniradadega seotud. Teiste hulgas sisenes minitransposoon ka mitmetesse metabolismiraja geenidesse. Selle alusel võib arvata, et ka metaboolsete radade aktiivsus võib mõjutada mutatsioonisagedust.

Viimastel aastatel on selgunud, et pikka aega bakterite mudelorganismina kasutuses olnud *Escherichia coli* on pigem erandlik ja tema põhjal ei saa teha üldistusi teistele bakteriliikidele. *Pseudomonas*'e perekond on lai ja mitmekesine ning sarnasem teiste liikidega kui enterobakterid. Seetõttu on ka meie labor keskendunud mutatsioonide uurimisele bakteris *Pseudomonas putida*. Käesolevas töös on uuritud võimalikke seoseid mutatsioonisageduse ja metabolismiradade vahel *P. putida*'s kontsentreerudes *lac-lsc* testsüsteemiga isoleeritud lämmastiku metabolismis osaleva glutamiini süntetaasi geenile *PP5299* ja sellele külgnevatele geenidele.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Mutaatorfenotüübid

Looduses on harva sellised tingimused, mis võimaldavad bakteritel piiramatult kasvada. Seetõttu on enamus baktereid aeglase kasvuga või on nende kasv peatunud, teisisõnu nad on statsionaarses faasis (Poulsen jt, 1995). Geeniregulatsiooni mehhanisme statsionaarse faasi rakkudes on valdavalt uuritud bakteris *E. coli*. Statsionaarses faasis olevad rakud on stressis. Stressi võivad põhjustada erinevad tegurid, näiteks toitainetenälg, temperatuurišokk, ebasobiv pH, antibiootikumid ja kemikaalid, UV-kiirgus, hüperosmolaarsus ja kõrge rõhk. Selleks, et ületada neid raskusi ja stressiolukorras toime tulla, on bakteritel erinevaid kohanemismehhanisme. Näiteks toimuvad stressis olevates rakkudes mutatsioonid, mis võimaldavad bakterite paremat kohastumist (Foster, 2007).

1.1.1. SOS vastus

Geneetilisi muutusi otseselt põhjustav stress tekib bakterites kokkupuutel DNA-d kahjustavate teguritega. SOS vastus on sagedaseim DNA kahjustuse indutseeritud stressivastus bakterites. SOS vastuse peamine ülesanne on minimaliseerida DNA kahjustajate mõju ja tagada rakkude ellujäämine (Foster, 2007).

Kui raku DNA on kahjustatud, siis replikatsioon peatub ning rakus tekib üheaheelaline DNA (ssDNA - *single strand* DNA). ssDNA tunneb ära bakteriaalne rekombinaas RecA, mis seondub ssDNA-le ja moodustab nukleoproteiinfilamendi. Sellised filamendid vahendavad SOS reguloni repressori LexA autoproteolüüsi (Foster, 2007). SOS geenide pidev transkriptsioon on rakule kahjulik ja seepärast on LexA seondunud DNA palindroomse motiiviga, mida nimetatakse SOS *boxiks*, takistades RNA polümeraasi seondumist ning represserides sellega nende geenide ekspresseerumist (Janion, 2008). Kui LexA dimeerid on lagunened, ei seondu LexA enam DNA-ga ja SOS geenide transkriptsioon saab alata (Foster, 2007).

SOS reguloni kuulub *E. coli*'s üle 40 geeni (Courcelle jt, 2001; Fernandez De Henestrosa jt, 2000). Enamik neist kodeerib vigadevabalt toimuva DNA reparatsiooni valke, hõlmates aluse väljalõike reparatsiooni (BER - *base excision repair*), nukleotiidi väljalõike reparatsiooni (NER - *nucleotide excision repair*) ja DNA rekombinatsioonilise reparatsiooni ensüüme (Patel jt, 2010). Samuti ekspresseeritakse Sula valku, mis inhibeerib rakujagunemist (Trusca jt, 1998). Kui bakter ei suuda vigadevabade mehhanismidega DNA kahjustusi parandada ja replikatsiooni taaskäivitada, lülitatakse sisse mutageenne faas. See tähendab, et aktiveeritakse spetsialiseeritud DNA polümeraasid (*E. coli*'s Pol II, Pol IV ja Pol V), mis on

suutelised kahjustustest üle sünteesima, kuid teevad seda sageli vigaderohkelt. Kuna kahjustuste ülesüntees on vigaderohke, siis põhjustavad spetsialiseeritud DNA polümeraasid selle kaudu mutatsioonide teket (Patel jt, 2010).

1.1.2. Reparatsiooniradadega seotud antimutaatorid

DNA polümeraasid, millel on 3'-5' eksonukleaaalne aktiivsus, kõrvaldavad DNA ahelast sinna sünteesi käigus valesti lisatud nukleotiide. Selline vigu korrigeeriv aktiivsus on DNA replikatiivsel polümeraasil Pol III ning samuti ka polümeraasidel Pol I ja Pol II. *E. coli* DNA Pol III puhul tagab 3'-5' eksonukleaaalse aktiivsuse epsilon subühik, mida kodeerib *dnaQ* (algsest *mutD*) geen (Hastings jt, 2010; Scheuermann ja Echols, 1984). Mutatsioonid *mutD* geenis põhjustavad väga tugevat mutaatorfenotüüpi, kus mutatsioonisagedus suureneb kuni neli suurusjärku, ja aeglustavad rakkude kasvu. (Oliver ja Mena, 2010).

mutD mutatsioonidega tüvedes jääb replikatsioonijärgselt alles nii palju vigu, et DNA-s valepaardumisi kõrvaldava reparatsiooni süsteemist MMR (*mismatch repair*) ei piisa kõigi vigade kõrvaldamiseks, kuna kõik olemasolevad MMR-i valgud on juba seotud reparatsiooniga. Väljenduv mutaatorfenotüüp on veelgi suurem seetõttu, kuna sel juhul puudub rakkudel lisaks replikatiivse DNA polümeraasi vigu korrigeerivale aktiivsusele ka efektiivne MMR (Miller, 1996).

Selleks, et parandada replikatsioonivigu, peab MMR süsteem DNA-s lämmastikaluste valepaardumise ära tundma, tegema vahet vanal ja uuel DNA ahelal, eemaldama valesti paardunud aluse vastsünteesitud DNA ahelast ja sünteesima asemele korrektse aluse (Modrich, 1991). Vahetult pärast DNA replikatsiooni jääb uus DNA ahel mõneks ajaks metüleerimata – DNA ahel on hemimetüleeritud olekus (Friedberg jt, 2006). Bakteris *E. coli* eristatakse DNA ahelaid tänu järjestuse GATC hemimetülatsioonile kaheaheelalises DNA-s. Metüleeritud on adeniin 6. positsioonis. Defektse adeniini metülaasi ensüümiga (*dam*⁻) mutandid on samuti tugevad mutaatorid (Glickman, 1979).

MMR süsteemi toimimiseks on vaja funktsionaalseid ensüüme: endonukleaasi MutH, MutL-i, MutS-i, DNA helikaasi II (*uvrD*), SSB-d (*single strand binding protein*), DNA polümeraas III holoensüümi, eksonukleaaase I, VII, RecJ ning DNA ligaasi. MutS valk tunneb valesti paardunud koha ära ja seondub sellega, koos MutL valguga aktiveeritakse endonukleaaas MutH, mis ATP (adenosiinrifosfaadi) energiat kasutades teeb katke metüleerimata DNA ahelasse GATC järjestuse kohalt. Järgneb katke kohast nukleotiidide eemaldamine eksonukleaaaside abil, uute nukleotiidide süntees, kasutades metüleeritud ahelat matriitsina ja DNA ahelate otste ligeerimine DNA ligaasi abil (Modrich, 1991). Mutandid, millel puudub mõne MMR valgu geen (*mutH*, *mutL*, *mutS*, *uvrD*), on tugevad mutaatorid, kus

esinevad kõrge sagedusega transitsioonid G:C→A:T ja A:T→G:C ning raaminihkemutatsioonid korduvaid nukleotiide sisaldavates alades (Oliver ja Mena, 2010).

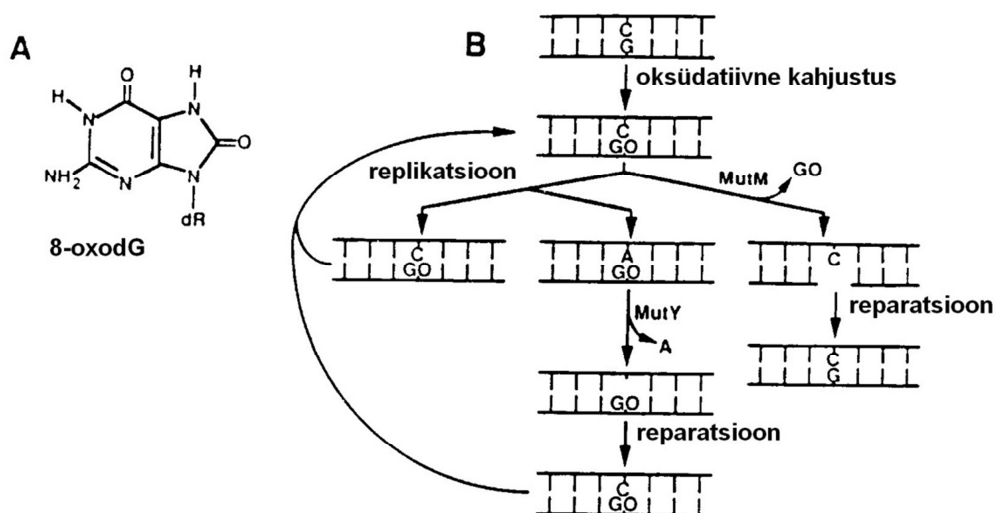
1.1.3. Oksüdatiivsete kahjustuste ennetamine ja parandamine

Vabad hapniku radikaalid tekivad nii raku normaalse metabolismi käigus, kui ka välistegurite, näiteks ioniseeriva kiirguse, mõjul. DNA-d kahjustavate reaktiivsete hapnikühendite (ROS) hulka kuuluvad hüdroksüülradikaal (OH) ning superoksiidi radikaal (O₂⁻). DNA oksüdatiivseid kahjustusi on erinevaid: lisaks DNA ahelate katketele, deamineerimisele, depurineerimisele, avatud tsükliga puriinidele ning tümiini ja tsütosiini glükoolidele tekib kergesti guaniini kahjustus 8-oxodG, mis on mutageenne (Miller, 1996). Tsütosiini oksüdatsiooni produkt 5-OH-dC on samuti väga mutageenne, põhjustades C→T transitsioone (Feig jt, 1994). Lisaks DNA-le kahjustavad hapnikuradikaalid ka valke (Berlett ja Stadtman, 1997) ning rakumembraanis olevaid lipiide (Mylonas ja Kouretas, 1999).

Bakteritel, näiteks *E. coli*'l ja *S. typhimurium*'il, on leitud indutseeritavate ensüümide süsteemid, mis suudavad ROS-e neutraliseerida enne, kui need kahjustavad DNA-d. Indutseeritavate ensüümide hulka kuuluvad kaks superoksiidi dismutaasi (SOD), mis konverteerivad superoksiide vesinikperoksiidiks ja kaks katalaasi, mis konverteerivad vesinikperoksiidi veeks (Miller, 1996). Nende funktsioonide reguleerimine hõlmab vähemalt kolme globaalset reguloni: *oxyR*, *soxR* ja *katF* süsteeme (Demple, 1991). OxyR on positiivne transkriptsiooni regulaator paljudele ensüümidele, kaasa arvatud katalaasile HPI ja NADPH-sõltuvale alküülvesinikperoksiidi reduktaasile. OxyR-defektsed bakterid on tundlikumad oksüdeerivatele ühenditele ja neis on suurenenud mutatsioonisagedus (Storz jt, 1987). Mutatsioonid *sodA* lookuses, mis kodeerib mangaani superoksiidi dismutaasi (MnSOD), põhjustavad rakkudele samuti mutaatorfenotüübi. Kuigi mutatsioonid raua-seoselise superoksiidi dismutaasi (FeSOD) lookuses *sodB* ei põhjusta mutaatorfenotüüpi, siis *sodA* *sodB* topeltmutandi mutatsioonisagedus on viis korda kõrgem kui *sodA* mutandil üksi (Farr jt, 1986). Seega on enamasti aktiivne MnSOD, aga kui see puudub, siis FeSOD kompenseerib osaliselt selle funktsiooni.

DNA oksüdatiivsete kahjustuste puhul on kõige levinum oksüdeeritud guaniini 8-oxodG ehk GO teke (joonis 1A) Oksüdeeritud guaniin GO paardub adeniiniga (Kouchakdjian jt, 1991). GO valepaardumisest põhjustatud asendusmutatsioonide vältimiseks on *E. coli*'s olemas kolm valku: DNA glükosülaasid MutM, MutY ja 8-oxodGTP hüdrolaas MutT, mis moodustavad GO reparatsiooni süsteemi (joonis 1B). Geenide *mutY* ja *mutM* defektsus stimuleerib G:C→T:A transversioone (Michaels jt, 1992). *mutM* kodeerib DNA formamidopürimidiini (Fapy) glükosülaasi (Michaels jt, 1991; Boiteux jt, 1987). MutM valk

eemaldab kaheaahelalisest DNA-st avatud tsükliga puriine (Michaels jt, 1991) ning tsütosiini vastas olevat GO-d (Chung jt, 1991), jättes DNA ahelasse lämmastikaluseta nukleotiidi, nii et tekib AP (*apurinic*) sait, mille taastamisele korrektse G:C paarina eelneb lämmastikaluseta nukleotiidi (ja sellega külgnevate nukleotiidide) kõrvaldamine ning DNA süntees (Michaels jt, 1992). Juhul kui DNA Pol III replitseerib DNA ahelat, millest on jäänud eemaldamata GO, võib replikatsiooni käigus moodustada GO:A paar, sest replikatiivsed polümeraasid sünteesivad TLS-i (ingl k *translesion synthesis*) käigus GO vastu adeniini sagedamini kui tsütosiini. *mutY* geen kodeerib teist tüüpi glükosülaasi MutY, mis eemaldab adeniini valesti moodustunud G:A paarist ja GO:A paarist. Järgneb AP saidi kõrvaldamine ning DNA Pol I sünteesib asemele tsütosiini, sest DNA reparatsioonil osalevad polümeraasid eelistavad sünteesida tsütosiini GO vastu. Tekib GO:C paar, mis on substraadiks MutM valgule. GO kahjustuste eemaldamise ebaõnnestumine tõstab G:C→T:A transversioonide sagedust, mida on ka kirjeldatud MutM- või MutY-defektsetes tüvedes. MutM-defektsed tüved on nõrgad mutaatorid ning MutY-defektsed tüved on mõõdukad mutaatorid, samas kui topeltmutandid on erakordselt kõrge mutatsioonisagedusega ning selles osas võrreldavad MutD-defektsete tüvedega (Michaels jt, 1992).



Joonis 1. A) Oksüdeeritud guaniini 8-oxodG ehk GO struktuur. B) GO kahjustusi parandavad DNA glükosülaasid MutM ja MutY, mis kõrvaldavad DNA ahelast vastavalt kas GO või GO-ga paadunud adeniini. Joonis on kohandatud artiklist Michaels jt, 1992.

GO kahjustus võib tekkida DNA-sse ka juhul, kui dGTP nukleotiid on oksüdeeritud. Kui 8-oxodGTP lülitatakse DNA sünteesil adeniini vastu, siis tekivad A:T→C:G transversioonid. MutY on võimeline GO:A paarist eemaldama adeniini, parandades efektiivselt seda tüüpi mutatsioone. Lisaks on rakkudes veel MutT valg, mis hüdrolyüsib 8-oxodGTP 8-oxodGMP-ks, vältides sellega GO lülitamist DNA ahelasse. Rakud, milles

puudub funktsionaalne MutT, valk on tugevad mutaatorid, kuna neis toimub kõrge sagedusega 8-oxodGTP lülitamine tsütosiini vastu ja juhul kui seda DNA-st ei kõrvaldata, paardub see adeniiniga, genereerides G:C→T:A transversioone (Michaels jt, 1992).

1.1.4. Antibiootikumistressist stimuleeritud mutatsioonid

Kvinoloonide klassi kuuluvate antibiootikumide, nagu ciprofloksatsiin, sihtmärgiks on ensüümid, mis muudavad DNA heeliksi superspiralisatsiooni, näiteks DNA güraas. Selliste antibiootikumide toime käigus tekib DNA kaheahelaline katkestus, mis indutseerib SOS vastust (Drlica ja Zhao, 1997). Mutatsioonid DNA güraasi geenides tagavad resistentsuse kvinoloonidele (Cirz jt, 2005).

β -laktaamsed antibiootikumid nagu penitsilliin indutseerivad samuti SOS vastust (Miller jt, 2004). Need antibiootikumid seovad PBP (ingl k *penicillin binding proteins*) valke ja häirivad rakuseina sünteesi. PBP-de inaktiveerimine indutseerib efektori DpiA seondumist kromosoomi replikatsiooni alguskohta. Sellega inhibeeritakse replikatsioon, mis omakorda käivitab SOS vastuse (Miller jt, 2003). Seega rakud, mis ei jagune aktiivselt, on ajutiselt kaitstud β -laktaamsete antibiootikumide tapva mõju eest (Miller jt, 2004).

Pseudomonaadides aktiveeritakse SOS vastusena spetsialiseeritud DNA Pol-id, mis soodustavad mutatsioonide tekitamisega antibiootikumi resistentsuse saavutamist (Couce ja Blazquez, 2009), näiteks tseftasidiim, mis on PBP3 inhibiitor, indutseerib DNA Pol IV (Blazquez jt, 2006). *P. putida*'s on DNA Pol IV seotud raaminihkemutatsioonide genereerimisega süsinikunäljas (Tegova jt, 2004).

Antibiootikumid võivad põhjustada ka ajutist mutaatorfenotüüpi, mis ei ole seotud SOS vastusega ega mutageensete DNA polümeraaside induktsiooniga (Balashov ja Humayun, 2002). Amino-glükosiidsed antibiootikumid, näiteks streptomütsiin ja kanamütsiin, sekkuvad ribosoomi töösse ja takistavad translatsiooni. Kokkupuude streptomütsiini mittesurmava doosiga põhjustab DNA reparatsioonivalkude translatsioonil vigu, tekitades sel viisil lühiajalise mutaatorseisundi (Balashov ja Humayun, 2003; Ninio, 1991).

1.1.5. Mutaator-tRNA-d

mutA ja *mutC* geenide defektsus suurendab bakterites samuti mutatsioonisagedust, kus võimenduvad G:C→T:A ja A:T→T:A transversioonid. Mutaatorefekt väljendub, kui mutatsioon on tekkinud ühes neljast glütsiini tRNA geenist, mis loevad GGU ja GGC koodoneid. *mutA* ja *mutC* defektsetes mutaatortüvedes on glütsiini antikoodonid muudetud asparagiinhappe antikoodoniteks GAU ja GAC. *mutA* mutaatori puhul on mutatsioon ühes

kolmest identsest *glyV* geenist ja *mutC* mutaatori korral on muutus ainsas *glyW* geenis (Slupska jt, 1996).

Kuidas saavad muutused tRNA antikoodonis põhjustada mutatsioonisageduse suurenemist? Arvatakse, et antikoodoni mutatsioonidest põhjustatud translatsioonivigu esineb sagedusega 1% või vähem. Kuigi normaalseid valke on 90-99%, põhjustab ka väga väike vigaste valkude fraktsioon rakus mutatsioonisageduse suurenemist. Kõige loogilisem seletus sellele fenomenile oleks et translatsioonivigade tõttu sünteesitakse defektsed DNA replikatsioonivalgud, näiteks DNA Pol III epsilon subühik (Slupska jt, 1996). Nagu juba eelpool mainitud, põhjustab epsilon (*mutD* geeni produkt) defektsus tugeva mutaatorfenotüübi (Oliver ja Mena, 2010). Paljud *mutD* geeni mutatsioonid on dominantseid (Cox ja Horner, 1983). Dominantsus väljendub selles, et epsilon subühikud, millel puudub DNA sünteesi viga korrigeeriv (ingl k *proofreading*) aktiivsus, suudavad ikka polümeraasiga seonduda. Üks epsilon subühik seondub DNA polümeraasi kompleksiga iga replikatsioonitsükli alguses ja jääb seotuks kogu tsükli vältel. Kui 1% epsilon subühikutest on defektiga ja dominantseid, siis 1% replikatsiooni tsükleid toimub ilma vigade korrigeerimiseta nagu *mutD* mutaatori puhulgi (Slupska jt, 1996).

1.1.6. Muud mutaatorid

Rakkudes, millel puudub uratsiili DNA glükosülaasi Ung (*ung* geeni produkt) aktiivsus, suureneb G:C→A:T transitsioonide hulk, sest need rakud ei suuda tsütosiini demineerimise tagajärjel tekkinud uratsiili DNA-st eemaldada. Uratsiil paardub järgmise replikatsiooni tsükli käigus adeniiniga (Duncan ja Weiss, 1982).

Rakkudes toimub sageli tsütosiini metüleerimine C5-st positsioonist. 5-metüültsütosiini (5meC) demineerimisel moodustub tümiin ja nii asendub DNA-s G:C paar G:T paariga. Seega muutuvad 5-meC jäägid mutatsioonide tekkel „kuumadeks punktideks“ (ingl k *hotspots*) (Lieb, 1991; Coulondre jt, 1978). 5meC-st põhjustatud mutatsioonide ärahoidmiseks on bakteris *E. coli* kirjeldatud VSP (ingl k *very short patch*) reparatsioonirada, kus Vsr nukleas teeb DNA ahelasse katke G:T paaride puhul T nukleotiidist 5'-suunas. Seejärel kõrvaldab DNA Pol I katkestatud DNA ahelast 5'-3'eksonukleaase aktiivsusega T nukleotiidi ja lisaks sellele veel kuni 10 nukleotiidi ning sünteesib asemele korrektse DNA (Bhagwat ja Lieb, 2002). Rakud, millel puudub VSP reparatsioon, on samuti mutaatorid, neil tekib 5meC saitides rohkesti G:C→A:T transitsioone (Lieb, 1991).

1.1.7. Kompenseeriva funktsiooniga DNA reparatsiooniradade geenid

Mõnel juhul ilmneb mutaatorfenotüüp ainult siis, kui inaktiveeritakse rohkem kui ühe geeni produktid, sest geenid kodeerivad üksteist kompenseerivaid funktsioone (Miller, 1996). Näiteks *ogt* ja *ada* geenid kodeerivad DNA metüültransferaase, mis eemaldavad metüülrühmi. *E. coli* mutantidel, millel on defektne kumbki metüültransferaasi ensüüm üksinda, ei ole mutatsioonisagedus suurem algsest tüvest, aga *ogt ada* topeltmutant on mutaator (Mackay jt, 1994; Rebeck ja Samson, 1991). Sarnaselt on olemas mitmeid endonukleaase, mis eemaldavad AP saite ja teisi kahjustusi. *xth* geen kodeerib endonukleaasi III ja *nfo* geen kodeerib spetsiifilist endonukleaasi IV. Kummagi geeni üksikmutandid ei ole mutaatorid, topeltmutant aga küll (Kunz jt, 1994). Selliste fenomenide olemasolu viitab võimalusele, et on veel avastamata multikomponentseid reparatsiooniradu, milles ühe komponendi välja lülitamine ei anna kergesti märgatavat mutaatorrefekti, sest teised geenid kompenseerivad tema funktsiooni (Miller, 1996).

1.1.8. Mutatsioonisagedust mõjutavad geenid ja mutaatorfenotüüp pseudomonaadides

Bakter *E. coli* on olnud põhiliseks mudelorganismiks mikrobioloogilistes uuringutes, kaasa arvatud mutageneesi ja evolutsiooni mehhanismide väljaselgitamisel. Praeguseks on selgunud, et *E. coli* on pigem erandlik. Näiteks esineb teistes bakterites harva kromosomaalseid DNA Pol V gene ja enamasti ei sõltu MMR DNA metüülatsioonist. *Pseudomonas*'e perekond on väga suur ja mitmekesine ning sobib hästi mudeliks, mille alusel teha üldistusi ka teiste bakteriliikide kohta (Kivisaar, 2010).

Pseudomonaadide spetsialiseeritud DNA Pol II geeni *polB* transkriptsioon ei indutseeri DNA kahjustused nagu *E. coli*'s. Ka SOS vastuse indutseeriv mõju on pseudomonaadides väiksem ning neil on kujunenud regulatsioonisüsteem, mille tõttu on nende rakkudes ka ilma DNA kahjustuseta üsna kõrges kontsentratsioonis SOS reguloni kuuluvaid valke (Kivisaar, 2010). Nagu varem mainitud, puuduvad pseudomonaadidel DNA Pol V geenid *umuD* ja *umuC*, kuid selle asemel on neil geenikassett, mis kodeerib teist DNA Pol III α -subühikut ning Y-perekonna DNA polümeraasi DnaE2 ja spekulatsiooniga valku ImuB (Abella jt, 2004), mille ekspressiooni indutseerivad DNA kahjustused nagu ka DNA Pol V puhul. *P. putida*'l on kaks LexA-d ning seda geeniklastrit reguleerib *P. putida*'l repressor LexA2, mille järjestus on väga erinev *E. coli* LexA-st. *P. aeruginosa*'l on aga üks LexA, *E. coli* LexA homoloog, mis kontrollib ka seda geeniklastrit (Abella jt, 2004). Sarnane geeniklaster on kirjeldatud ka teistes proteobakterites (Erill jt, 2006). *P. aeruginosa* DnaE2 peetakse vigaderohkeks DNA Pol-iks nagu DNA Pol V-ki

(Sanders jt, 2006). *dnaE2*-geeniklastrit on nimetatud ka „mutageneesi kassetiks“. Kuna „mutageneesi kasseti“ olemasolu on kirjeldatud ainult neil bakteritel, kellel puuduvad *umuDC* geenid, siis arvatakse, et „mutageneesi kasset“ asendab DNA Pol V funktsiooni, osaledes samuti TLS-is (Abella jt, 2004).

P. aeruginosa puhul on kirjeldatud ka looduslikke mutaatoreid. Nii on suurenenud mutatsioonisagedusega *P. aeruginosa* tüvesid isoleeritud tsüstilise fibroosi haigete kopsust. Enamus mutaatoritest on defektsed kas MMR või GO reparatsiooniraja ensüümide osas (Oliver ja Mena, 2010). Mutaatoriks on ka defektse *mexZ* geeniga isolaadid. *mexZ* on MexXY väljavoolupumpade negatiivne regulaator. Muutunud *mexZ* geeniga *P. aeruginosa* tüved on multiresistentsed antibiootikumide suhtes (Jahandideh, 2013). Multiresistentsete *P. aeruginosa* tüvede teke on meditsiinis suur probleem, mistõttu tsüstilise fibroosi haigetel praktiliselt polegi võimalik *P. aeruginosa*'st antibiootikumide abil lahti saada (Oliver ja Mena, 2010). Defektse LasR transkriptsiooni regulaatoriga tüvede mutatsioonisagedus oli samuti tõusnud. LasR on oluline hulga tunnetuse (ingl k *quorum sensing*) reguleerimisel ning seotud virulentsusega. LasR-defektsetel tüvedel on nähtud statsionaarses faasis eelist: nad on elujõulisemad teistest rakkudest. LasR-defektseid rakke on isoleeritud ka epideemilistest tüvedest, mis näitab, et LasR-defektsus muudab rakud patogeensemaks. Meditsiiniliselt tähendab see seda, et infektsiooni alguses, kui bakterirakkude populatsioon on väike, siis LasR inhibeerib hulga tunnetuse geenide, mille hulka kuuluvad ka osad virulentsusfaktorid, ekspressiooni. Defektse LasR-iga rakkudes sünteesitakse aktiivselt virulentsusfaktoreid ja need rakud on edukamad inimese kopsu koloniseerijad (Lujan jt, 2007). *P. aeruginosa*'s identifitseeriti antimutaatorgeen *pfpI*, mis kuulub DJ-1/ThiJ/PfpI superperekonda, mis koondab endas erinevaid chaperone ja peptidaase. *pfpI* on üldine stressivastane geen, mis aitab taluda soola (2 M NaCl), UV-kiirguse, kuumuse ja ROS-ide tekitatud kahjustusi. Samuti mõjutab PfpI biokile moodustamist (Rodriguez-Rojas ja Blazquez, 2009). MutY/MutM defektses tüves on näidatud *pfpI* ekspressiootaseme suurenemist, mis viitab sellele, et ta osaliselt kompenseerib MutY ja MutM funktsioone ning kaitseb rakku oksüdatiivse stressi põhjustatud DNA kahjustuste eest (Mandsberg jt, 2011). PfpI-defektses tüves suureneb mutatsioonisagedus oluliselt ka stressivabades tingimustes (Rodriguez-Rojas ja Blazquez, 2009).

Wiegand jt, 2008 täheldasid *P. aeruginosa radA* mutandi puhul mutatsioonisageduse tõusu. RadA valk mängib rolli kollapteerunud replikatsioonikahvli rekombinatsioonilisel taastamisel. *radA* deletsioon bakteris *E. coli* annab mutaatorefekti aga ainult siis, kui lisaks on inaktiveeritud *recG* või *ruvABC* geenid (Lovett, 2006). *P. aeruginosa* PA14 tüves tõusis mutatsioonisagedus juba ainult *radA*-defektsuse puhul, mis tähendab, et rekombinatsioonilise

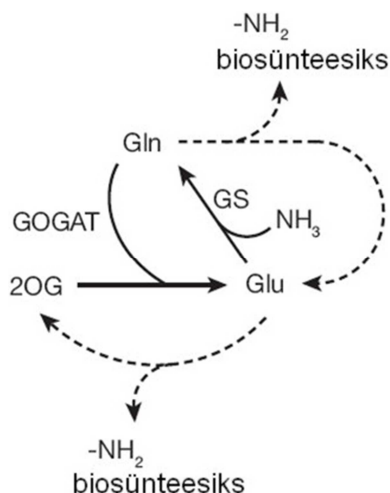
reparatsiooni mehhanismid pseudomonaadides võivad olla hoopis teisiti reguleeritud, kui seni *E. coli* põhjal teada on (Wiegand jt, 2008).

1.2. Lämmastiku metabolism

Lämmastik on üks kõige olulisemaid elemente rakkude elutegevuseks. Bakteritel on välja kujunenud süsteemid, mis võimaldavad lämmastikku kätte saada ka alternatiivsetest allikatest, kui eelistatud allikaid napib (Hervas jt, 2008).

1.2.1. Lämmastiku assimilatsioonirajad bakterites

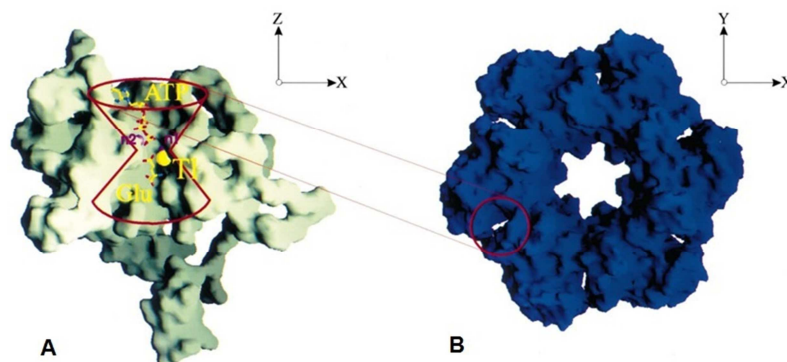
Lämmastiku metabolismi assimilatoorseid radu võib jagada kahte klassi: rajad, mis võimaldavad lämmastikku utiliseerida ekstratsellulaarsest keskkonnast ja biosünteesilised rajad lämmastikku sisaldavate ühendite intratsellulaarseks tootmiseks. Lämmastiku biosünteesiliste reaktsioonide võtmedoonorid on glutamiin (Gln) ja glutamaat (Glu). Rakkudes on rajad, mis aitavad lülitada lämmastikku glutamiini ja glutamaadi koosseisu. Kõige tähtsam ja bakterites üldlevinud rada on glutamiini süntetaasi (GS) ja glutamaadi süntetaasi (GOGAT) rada (joonis 2). GS muudab ammooniumi ja glutamaadi glutamiiniks, kasutades selleks ATP energiat. Reaktsiooni toimumiseks on oluline ka kahevalentse metalliiooni (eelistatult Mg^{2+}) juuresolek. GOGAT kannab glutamiini amiid-rühma 2-ketoglutaraadile (2OG) ja moodustub kaks glutamaadi molekuli. Reaktsioon on NADPH-(nikotiinamiid-adeniin-dinukleotiidfosfaat-) sõltuv (Merrick ja Edwards, 1995).



Joonis 2. Lämmastiku assimilatsioonirajad. GS katalüüsiv reaktsioon: Glutamaat (Glu) + ATP + NH_3 → Glutamiin (Gln) + ADP + fosfaat. GOGAT katalüüsiv reaktsioon: Glutamiin + 2-ketoglutaraat (2OG) + NADPH → 2Glu + NADP⁺. Joonis on kohandatud artiklist Leigh ja Dodsworth, 2007.

1.2.2. Glutamiini süntetaasid bakterites

Bakterites esineb nelja erinevat tüüpi GS-e. Kõige levinum neist on GSI (Merrick ja Edwards, 1995), mida on ka kõige rohkem uuritud. Tegemist on dodekameerse ensüümiga, mis koosneb 12 identsest subühikust, mis omakorda moodustavad kaks kuusnurkset struktuuri, ja 12 topeltlehtri-kujulisest aktiivsaidist, kuhu seonduvad vastamisi ATP ja Glu (Eisenberg jt, 2000) (joonis 3). Subühikuid hoiavad koos hüdrofoobsed interaktsioonid ja vesiniksidemed (Yamashita jt, 1989). Ensüümi kodeerib *glnA* geen. GSI katalüütiline aktiivsus on kontrollitud adenüleerimisega: adenülültransferaas (ATAas) seob iga subühiku türosiinijäägile kovalentselt AMP-rühma (adenosiinmonofosfaatrühma) ja inaktiveerib ensüümi (joonis 4). Ühe subühiku adenüleerimine inaktiveerib ainult selle subühiku, st ensüüm ei inaktiveeru täielikult: adenüleerimata aktiivtsentrid töötavad edasi. Ensüümi totaalseks väljalülitamiseks peavad kõik subühikud olema adenüleeritud. GSI aminohappeline järjestus on prokariootides kõrgelt konserveerunud. Mõned bakterid sünteesivad peale GSI ka teistsugust tüüpi GS-e (Merrick ja Edwards, 1995).



Joonis 3. GSI ehitus. A. Joonisel on kujutatud GSI aktiivtsentrit, kollasega on näidatud ATP ja Glu seondumiskohad. B. Kujutatud on GSI kuusnurkne struktuur. Joonis on kohandatud artiklist Eisenberg jt, 2000.

glnII geen kodeerib GSII, mis on identsete subühikutega oktameer. GSII esineb enamasti tainesümbiontides. Erinevalt GSI-st on GSII kuumatundlik ensüüm. Aminohappeliselt järjestuselt sarnaneb GSII pigem eukariootse GS ensüümiga kui GSI-ga (Merrick ja Edwards, 1995).

GSIII tüüpi GS puhul on tegemist heksameerse ensüümiga, mis esmakordselt kirjeldati bakteris *Bacteroides fragilis* (Hill jt, 1989). GSIII talub kõrget temperatuuri. Aminohappeliselt järjestuselt erineb ta GSI ja GSII-st, kuid mõned aktiivsaidid on konserveerunud kõigil (Merrick ja Edwards, 1995). GSIII on vähe iseloomustatud.

Neljandat tüüpi GS-i kodeerib *glnT* geen. GlnT tüüpi GS on nimetatud varasemastes artiklites ka GSIII-ks, mis tekitab palju segadust, kuna tegemist on erinevat tüüpi GS-ga. GlnT on oktameerne ensüüm, mis koosneb kaheksast identsest subühikust nagu ka GSII, kuid

GlnT ei ole kuumatundlik (Merrick ja Edwards, 1995). GlnT-l on palju kõrgem substraadi K_m kui teistel GS tüüpidel ning madal biosünteesi aktiivsus (Espin jt, 1990). Need asjaolud muudavad küsitavaks, kas GlnT põhifunktsioon on Gln sünteesimine, kuid teisi funktsioone pole GlnT-le leitud ja tema aminohappeline järjestus on sarnasem GS-ile kui teistele glutamiiniga seotud ensüümidele, nagu näiteks glutaminaasidele ja amidotransferaasidele (Shatters jt, 1993). GlnT aktiivsus on reguleeritud posttranslatsioonilise modifitseerimisega ADP-ribosülatsiooni abil. Modifitseeritakse arginiinijääki ning see inhibeerib GlnT aktiivsust (Liu ja Kahn, 1995). GlnT on represseritud, kui teised GS-d on aktiivsed. *glnA glnII* mutant suudab sünteesida glutamiini, kui söötmesse on lisatud glutamaati ja ammooniumi. Seega on GlnT füsioloogiliselt oluline, sest võimaldab glutamiini sünteesi ja tagab bakterite kasvu, olukorras, kus teised GS-d on oma funktsionaalsuse kaotanud. GlnT valku on leitud taimesümbiontide moodustatud juurenoodulitest, mis viitab sellele, et GlnT võiks soodustada sümbioosi efektiivsust. GlnT katalüüsitud reaktsioon on sarnane GS reaktsiooniga, sest vajab ATP ja kahevalentse katiooni (eelistatult Mg^{2+}) juuresolekut ning kasutab samu substraate ja kofaktoreid nagu GSI ja GSII (Shatters jt, 1993).

Mõnedes bakterites, enamasti taimesümbiontides, kes fikseerivad õhulämmastikku, näiteks *Rhizobium*'id, esinevad korraga nii GSI, GSII kui GlnT tüüpi GS-id (Shatters jt, 1993).

1.2.3. Teised lämmastiku assimilatsioonil osalevad ensüümid

Glutamaadi süntaas (GOGAT) koosneb kahest mitteidentsest subühikust, mida kodeerivad geenid *gltB* ja *gltC*, mis asuvad ühes operonis (Oliver jt, 1987). *gltBD* operon kuulub Lrp (ingl k *leucine-responsive regulatory protein*) reguloni, mida Lrp represserib, kui lämmastikku aminohapete, nukleiinhapete või ammooniumi kujul on piisavalt (Ernsting jt, 1993). *glt* lookus on kirjeldatud näiteks bakterites *E. coli* (Oliver jt, 1987), *Pseudomonas aeruginosa* (Janssen jt, 1980), *Azorhizobium sesbaniae* (Donald jt, 1988), *Rhizobium meliloti* (Lewis jt, 1990), *Azospirillum brasilense* (Mandal ja Ghosh, 1993) ja *Bacillus subtilis* (Bohannon jt, 1985).

Mõnedes bakterites on GS/GOGAT ainus rada lämmastiku utiliseerimiseks. Teistes, näiteks enterobakterites, esineb alternatiivne glutamaadi dehüdrogenaasi (GDH) rada. *E. coli* glutamaadi dehüdrogenaas on identsete subühikutega heksameer ja seda kodeerib *gdhA* geen. GDH katalüüsib NADPH juuresolekul reaktsiooni, kus ammooniumist ja 2-ketoglutaraadist moodustub glutamaat. Ensüümi K_m on üsna kõrge (ligikaudu 1 mM), mistõttu on ammooniumi-limitatsioonil GDH kaudu lämmastiku assimileerimine ebaefektiivne (Merrick ja Edwards, 1995).

1.2.4. Lämmastiku metabolismi regulatsioon

Kõige põhjalikumalt on lämmastiku regulatsiooni iseloomustatud enterobakterites, kuid süsteemi komponente on kirjeldatud ka teistes bakterites (Merrick ja Edwards, 1995).

Ammoonium on eelistatuid lämmastikuallikas bakterites, sest tagab kõige parema kasvu (Merrick ja Edwards, 1995). Lihtsaim moodus ammooniumi transpordiks on selle passiivne difusioon läbi membraani, kuid ammooniumi madala kontsentratsiooni puhul kasutatakse ka aktiivset ammooniumi transpordi (Amt) süsteemi (Barnes, 1993). Amt süsteemi ekspressiooni kontrollib ntr (ingl k *nitrogen regulation*) süsteem. Enamasti on kõrgete ekstratsellulaarsete ammooniumi kontsentratsioonide korral Amt aktiivsus represseritud (Jayakumar jt, 1986; Servin-Gonzalez ja Bastarrachea, 1984).

1.2.4.1. Ntr süsteem

Globaalne lämmastiku reguleerimissüsteem (ntr) koosneb neljast ensüümist: uridülültransferaas/uridülül-eemaldaja ensüümist (UTaas/UR), P_{II} valgust, histidiini proteiinkinaasist NtrB ja vastuse regulaatorist NtrC (joonis 4). NtrB ja NtrC moodustavad kahekomponentse regulaatorsüsteemi. Ntr süsteem reguleerib paljude lämmastiku assimilatsiooni ja transpordiga seotud geenide transkriptsiooni (Merrick ja Edwards, 1995).

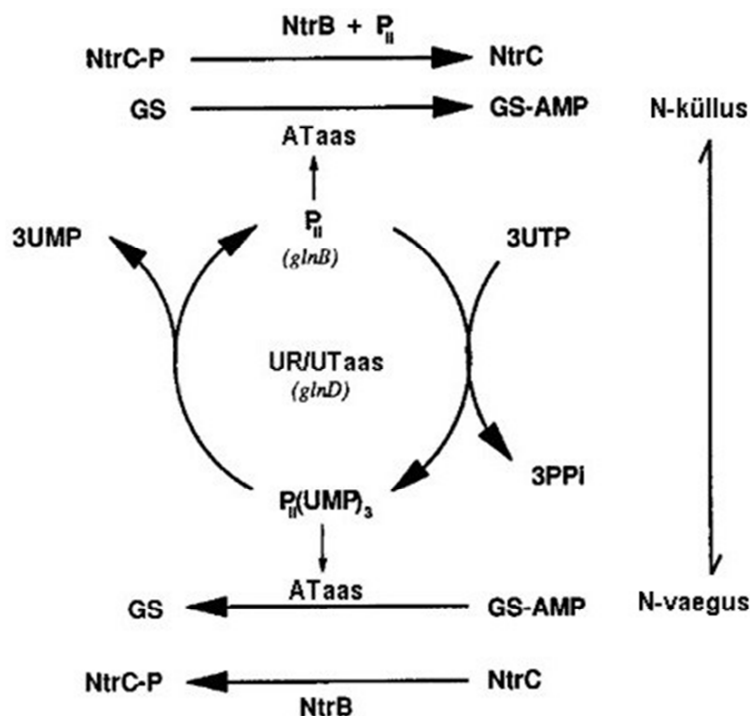
1.2.4.2. P_{II} valk ja selle aktiivsuse kontroll

P_{II} on väike trimeerne regulaatorvalk (Merrick ja Edwards, 1995). Mõnedes bakterites, nagu näiteks *P. putida*, kodeerib P_{II} valku *glnB* geen, kuid enterobakteritel on kaks paralooget P_{II} kodeerivat geeni *glnB* ja *glnK* (Hervas jt, 2008). P_{II} on võimeline siduma ATP-d, 2-OG-d ja Glu-d (Liu ja Magasanik, 1995; Kamberov jt, 1995). Selleks, et P_{II} seonduks NtrB-ga ja stimuleeriks selle fosfataasist aktiivsust, peab P_{II} olema eelnevalt seotud ATP ning kas 2-OG või Glu-ga. Lämmastikulimitatsiooni korral 2-OG indutseerib P_{II} valgu konformatsiooni muutust uridülatsiooni jaoks optimaalseks. Lämmastikuküllal korral UTaas seob Gln-i, mis inhibeerib uridülatsiooni ja viib P_{II} valgu konformatsiooni, milles toimub eelistatult P_{II} deuridüleerimine. P_{II} uridüleerimine takistab tema seondumist NtrB-ga (Kamberov jt, 1995).

UTaas/UR on *glnD* geeni produkt. Ensüümi UTaasi aktiivsus lisab P_{II} valgu iga subühiku türosiinijäägi külge UMP-rühma (uridülülmonofosfaatühma) ning UR aktiivsus eemaldab UMP-rühma P_{II} valgult (joonis 4) (Merrick ja Edwards, 1995). Fikseeritud lämmastiku kättesaadavus peegeldub rakusiseses glutamiini ja 2-ketoglutaraadi suhtes (Gln/2-OG). Kui suhte väärtus on kõrge, siis on lämmastikku piisavalt, väiksem suhe näitab lämmastikupuudust. UTaasi aktiivsust stimuleerivad 2-OG ja ATP ning Gln-i seondumine

UTAasiga inhibeerib selle aktiivsust. Seega Gln/2-OG suhte järgi saab määrata P_{II} valgu uridüleeritust (Engleman ja Francis, 1978).

UTAas/UR ja P_{II} reguleerivad ka adenüültransferaasi (ATAas) aktiivsust: kui rakud on lämmastikunäljas, siis UTAas uridüleerib P_{II} ning uridüülitud P_{II} indutseerib ATAasi deadenüeerima GS-i (joonis 4) (Merrick ja Edwards, 1995).



Joonis 4. Skemaatiline mudel kirjeldamaks GS ja NtrC aktiivsust vastavalt lämmastiku staatusele. Kui lämmastikku on vähe, siis UTAas lisab UMP-rühma P_{II} valgule, uridüülitud P_{II} indutseerib ATAasi deadenüeerima inaktiivses olekus adenüüleeritud GS-i. Samal ajal on uridüüleeritud P_{II} signaaliks NtrB-le, mis katalüüsib NtrC fosforüleerimist ja aktiveerimist. Kui lämmastikku on piisavalt, siis UR eemaldab P_{II} valgult UMP-rühma, see on signaaliks ATAasile, mis adenüüleerib GS aktiivsaidid. Modifitseerimata P_{II} valk on signaaliks NtrB-le, mis defosforüleerib NtrC. Joonis on kohandatud artiklist Merrick ja Edwards, 1995.

1.2.4.3. NtrB ja NtrC regulaatorid

Histidiini proteiinkinaas NtrB on tsütoplasma valk ning koosneb kahest domäänist: N-terminaalsest sensor-domäänist ning C-terminaalsest kinaasi domäänist (Merrick ja Edwards, 1995). Kinaasi domäänis paiknev histidiinijääk on autofosforüleerimissaidiks (Stock jt, 1989). UTAas/UR ja P_{II} valk koos moodustavad mehhanismi, mis tajub intratsellulaarset lämmastiku taset (Arcondeguy jt, 2001). Tsütoplasmaatiliseks signaaliks NtrB ensüümile on P_{II} valk, mis P_{II}-UMP vormis annab teada lämmastikulimitatsioonist ning modifitseerimata kujul lämmastiku küllast (Merrick ja Edwards, 1995). Lämmastikupuuduse korral katalüüsib NtrB vastuse regulaatorvalgu NtrC fosforüleerimist ja sellele järgnevat NtrC aktiveerimist (Keener ja Kustu, 1988). Eelnevalt on NtrB histidiinijäägi kohalt autofosforüleeritud ATP-sõltuva

reaktsiooni käigus (Ninfa ja Bennett, 1991). Reaktsioon toimub mehhaanilise abil, kus üks subühik seob ATP ja fosforüleerib teise subühiku (Ninfa jt, 1993). Lämmastikukülla korral mitteüridüleeritud P_{II} interakteerub NtrB-ga nii, et see katalüüsib NtrC defosforüleerimist ja inaktiveerimist (joonis 4) (Merrick ja Edwards, 1995). Hüpotees on, et N-domään reguleerib C-terminaalse domääni kinaaset aktiivsust ja käitub P_{II} valgu retseptorina (Kamberov jt, 1994).

Lämmastiku metabolismi regulatsiooni tähtsaim regulaator NtrC on dimeerne valk (Merrick ja Edwards, 1995). NtrC on σ^{54} -sõltuv transkriptsiooni aktivaatorvalk (Morett ja Segovia, 1993), millel on kolm domääni (Drummond jt, 1986). NtrC dimeer seondub DNA-ga C-terminaalse domääni kaudu (Contreras ja Drummond, 1988). C-domääni heeliks-pööreheeliks motiiv (Contreras ja Drummond, 1988) võimaldab ära tunda aktivaator- või *enhancer*-järjestused, mis asuvad 100 bp eespool promotori järjestusest, kuhu seondub σ^{54} sisaldav RNA polümeraas ($E\sigma^{54}$). *Enhancer*'i funktsioon on soodustada NtrC oligomerisatsiooni, et moodustuks vähemalt kahest dimeerist koosnev kompleks, mis on vajalik transkriptsiooni aktivatsiooniks ning NtrC kontsentratsiooni tõstmiseks promotori lähedal, mis suurendaks $E\sigma^{54}$ kontakteerumise sagedust (Ninfa jt, 1987; Porter jt, 1993). NtrC valgu N-terminaalne domään moodustab vastuvõtja-domääni, millega sensor-valk interakteerub, et fosforüleerida NtrC aspartaadijääki. Fosforüleeritud NtrC aktiveerib alternatiivsete lämmastikuallikate assimileerimise teid, aktiveerides vastavate geenide transkriptsiooni (Keener ja Kustu, 1988) ning represserib süsinikumetabolismi geenide transkriptsiooni, et takistada lämmastikupuudusel liigset süsiniku ja energia kulutamist (Hervas jt, 2008). Fosforüleerimine stimuleerib NtrC seondumist DNA-ga (Weiss jt, 1992), kuid ei ole selleks otseselt vajalik; pigem on fosforüleerimine vajalik NtrC dimeeride oligomeriseerumise indutseerimiseks aktivaatorjärjestustel. Aktivaatorjärjestused koosnevad vähemalt kahest NtrC seondumissaidist (Mettke jt, 1995). NtrC keskmine domään koosneb konserveerunud ATP sidumissaidist ning interakteerub $E\sigma^{54}$ -ga, et aktiveerida selle kaudu sihtmärk geeni transkriptsioon. NtrC-I on ATPaasne aktiivsus, mis on vajalik $E\sigma^{54}$ avatud kompleksi tekkeks. NtrC ATPaasne aktiivsus on stimuleeritud DNA-ga seondumise ning aspartaadijäägi fosforüleerimisega (Austin ja Dixon, 1992). Keskmise domääni interaktsioonid inhibeervad fosforüleerimata NtrC valgu N-domääni võimet dimeriseeruda. Fosforüleerimisel need interaktsioonid katkevad ning NtrC aktiveerub dimeriseerudes (Fiedler ja Weiss, 1995).

Tänu võimele siduda DNA-d, saab NtrC käituda ka transkriptsiooni repressorina (Reitzer ja Magasanik, 1985).

1.2.5. Nac (*nitrogen assimilation control*) regulaatorvalk

Paljud lämmastiku metabolismiga seotud ensüümide geenid, nagu GDH geen *gdh*, GOGAT-i geenid *gltBD*, histidaasi geen *hut*, ureaasi geen *ure* ja proliini oksidaasi geen *put*, on *nac* geeni produkti kontrolli all (Macaluso jt, 1990). Nac on dimeerne valk, mis kuulub LysR regulaatorvalkude perekonda (Schwacha ja Bender, 1993). Nac ei vaja koefektorit ja ei vasta otseselt lämmastikuhulgale. *nac* geeni ekspressioon on σ^{54} -sõltuv ja seda reguleerib NtrBC (Macaluso jt, 1990). Nac valku sünteesitakse ainult lämmastikupuudusel ning selle ekspressioon kas aktiveerib *hut*, *put* ja *ure* geenide või represserib GDH ja GOGAT-i geenide *gdh* ja *gltBD* transkriptsiooni (Merrick ja Edwards, 1995). Nac on seotud ka tsütosiini utiliseerimise ja asparagiini sünteesi geenide regulatsiooniga (Goss ja Bender, 1995). Bakteris *E. coli* ei ole Nac valgu regulatsioon eriti oluline, see ei mõjuta *gdh* geeni ning ainult natuke mõjutab *put* geeni transkriptsiooni regulatsiooni (van Heeswijk jt, 2013). Nac regulatsioonisüsteem ühendab σ^{70} -sõltuvate geenide ekspressiooni σ^{54} -sõltuva ntr süsteemiga (Bender, 1991). Nac süsteem on kirjeldatud ainult enterobakteritel (Merrick ja Edwards, 1995; Hervas jt, 2008).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

Mutaatoriks nimetatakse rakku, millel on kõrgem mutatsioonisagedus kui metsiktüüpi rakul. Mutaatortüvede detekteerimiseks kasutatakse tihti papillatsiooni meetodit. Papillatsiooni põhimõte Milleri katsetes on järgmine. Bakterikolooniad kasvavad teatud suuruseni ja kasutavad selleks ära neile kättesaadavad toitained. Kui vähese toitaainesaldusega söötmesesse on lisatud C-allikat, mida suudavad ainult mutantsed rakud koloonias utiliseerida (näiteks laktoos) ja kasvada edasi, moodustavad need põhikoloonia peale mikrokolooniaid ehk papille. Selle meetodiga on võimalik tuvastada ka nõrku mutaatortüvesid (Miller, 1996).

Papillatsiooniga on seotud ka meie laboris Heili Ilvese loodud lac-lsc testsüsteem isoleerimaks mutatsioonisagedust mõjutavaid geene. Testsüsteem põhineb levaansukraasi ja β -galaktosidaasi geenide transkriptsiooni aktivatsioonil testtüves PaWlacIsc mutatsioonide tagajärjel, mis inaktiveerivad kas LacI repressori geeni või LacI repressori seondumisala testgeenide promootoralas. LacI repressorit inaktiveerivad mutatsioonid võimaldavad testgeenidel avalduda ning selle tagajärjel moodustavad rakud X-gal-i sisaldaval söötmel põhikoloonia peale siniseid levaani tootvaid papille. PaWlacIsc testtüvega viidi läbi transposoonmutagenees. Minitransposooni insentseerumine geeni rikub enamasti selle geeni funktsiooni. Kui minitransposooni sisenemine mingisse geeni suurendab papillide hulka koloonial, siis on antud geen potentsiaalselt seotud spontaansete mutatsioonide sageduse suurenemisega rakus (Tagel, 2014).

Transposoonmutageneesi katsete läbiviimisel oli suurenenud mutatsioonisagedusega kolooniate puhul minitransposoon inserteerunud DNA reparatsiooni geenidesse, membraanivalkude geenidesse, regulaatorite ja metabolismiga seotud geenidesse.

Minu ülesandeks oli selgitada, kas isoleeritud oletatava glutamiini süntetaasi geeni *PP5229* ja temaga külgnevate geenide inaktivatsioon on seotud mutatsioonisageduse suurenemisega. Selle kontrollimiseks oli minu eesmärgiks konstrueerida *PP5299* geeni ja operoni deletsioonitüved ning võrrelda konstrueeritud tüvede mutatsioonisagedust algse *P. putida* tüve omaga nii kasvavates kui ka statsionaarse faasi rakkudes. Teine eesmärk oli selgitada nende geenide roll seoses lämmastiku metabolismiga bakteris *P. putida*.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Minimaalsöötmena kasutati M9 baasil (Adams, 1959) valmistatud söödet, mis sisaldas lisaks M9-le 2,5 ml/l mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960) ning süsinikuallikana glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM või fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. Kasvukõvera tegemisel lämmastikunäljas kasutati minimaalsöötme valmistamiseks lämmastikuvaba M9-t, millele lisati NH₄Cl lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Täissöötmetena kasutati LB-söödet (Miller, 1972) ja defineeritud Glc-CAA söödet, kus M9 minimaalsöötmele on lisatud aminohapete hüdroolüsaati CAA lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Rif söötme valmistamiseks lisati LB-söötmele rifampitsiini (100 µg/ml). Tardsöötme saamiseks lisati vedelsöötmele agarit 15 g/l.

Plasmidi selektsiooniks kasutati antibiootikume: kanamütsiini (Km; 50 µg/ml), bensüülpenitsilliini (Bp; 1,5-3 mg/ml), ampitsilliini (Amp; 100 µg/ml). Kolooniade sini-valge testi läbi viimiseks (*lacZ* geeni ekspressiooni tuvastamiseks) lisati LB-söötmele 0,5 mM IPTG-d ja X-gal-i (100 µg/ml).

E. coli rakke kasvatati temperatuuril 37°C ja *P. putida* rakke 30°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil (180 pööret/min).

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Antud töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan ja Meselson, 1983
<i>E. coli</i> CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 λpir</i>	Herrero jt, 1990
<i>E. coli</i> HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3(rB- mB-) recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1-1</i>	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
<i>P. putida</i> PaW85	algne tüvi, identne täielikult sekveneeritud tüvega KT2440	Bayley jt, 1977
<i>P. putida</i> PaWΔPP5299	deleteeritud glutamiini süntetaasi geen <i>PP5299</i>	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaWΔoperon	deleteeritud operon, kuhu kuulub glutamiini süntetaas <i>PP5299</i>	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaWlacIIsc PP5298::Km	peptidaasi C26 geeni <i>PP5298</i> transposooni mini-Tn5 katkestusmutant, Km ^R	Tagel, 2014

<i>P. putida</i> PaWlacIIsc PP5300::Km	LysR perekonna transkriptsiooni regulaatori geeni <i>PP5300</i> transposooni mini-Tn5 katkestusmutant, Km ^R	Tagel, 2014
<i>P. putida</i> PaWlacIIsc PP5299::Km	Glutamiini süntetaasi geeni <i>PP5299</i> transposooni mini-Tn5 katkestusmutant, Km ^R	Tagel, 2014
Plasmiid		
pBluescript KS	<i>E. coli</i> kloonimisvektor, Amp ^R	Stratagene
KS/Δ5299	pBluescript KS plasmiid, kuhu on kloonitud geeni <i>PP5299</i> eelse ja järgse ala liitfragment TS1TS2	Käesolev töö
KS/Δoperon	pBluescript KS plasmiid, kuhu on kloonitud geeni <i>PP5299</i> operoni eelse ja järgse ala liitfragment TS1TS2	Käesolev töö
pRK2013	konjugatiivset ülekannet abistav plasmiid	Figurski ja Helinski, 1979
pBAM1	minitransposooni mini-Tn5 kandev plasmiid, Km ^R (Amp ^R , Km ^R)	Martinez-Garcia jt, 2011
pKTpheA22TAG	aluste asendusmutatsioone detekteeriv plasmiidne testsüsteem, kus plasmiidis pKT240 sisalduva <i>pheA</i> geeni 22. koodon (Leu) on asendatud stoppkoodoniga TAG, Bp ^R	Tegova jt, 2004
pEMG ehk pJP5603-I-SceI _{v2}	I-SceI restriktioonsaite ja multikloonimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid, Km ^R	Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011
pEMG/Δ5299	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on kloonitud EcoRI ja XhoI fragmendina geeni <i>PP5299</i> eelse ja järgse ala liitfragment TS1TS2, Km ^R	Käesolev töö
pEMG/Δoperon	pJP5603-I-SceI _{v2} plasmiid, kuhu on kloonitud EcoRI ja XhoI fragmendina geeni <i>PP5299</i> operoni eelse ja järgse ala liitfragment TS1TS2, Km ^R	Käesolev töö
pSW(I-SceI)	I-SceI nukleasi ekspresseeriv plasmiid Amp ^R , Cb ^R , Bp ^R	Wong ja Mekalanos 2000

2.2.2. Polümeraasiahelreaktsioon (PCR)

PCR-i kasutati konstruktide õigsuse kontrollimiseks. Reaktsioonisegu maht oli 20 µl, mis sisaldas ühekordset firma *Thermo Scientific* PCR-i puhvrit, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM

nukleotiide (dNTP), 0,5 ühikut Taq DNA polümeraasi, 10 pmol praimereid ja matriits DNA-d. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 2.

PCR-i teostamiseks kasutati firma *Biometra* PCR-i masinat.

PCR-i viidi läbi 25 tsüklit järgmistel tingimustel:

1. denaturatsioon 96°C 2 minutit,
2. praimeri seondumine 55 kuni 56°C (sõltuvalt praimerist) 30 sekundit,
3. DNA süntees temperatuuril 72°C 30 sekundit kuni 2,5 minutit (sõltuvalt amplifitseeritava DNA lõigu pikkusest: 1 minut 1000 bp kohta).

Tsüklitele eelnes kaheminutiline kuumutamine temperatuuril 96°C ja järgnes paariminutine süntees temperatuuril 72 °C, mille käigus sünteesiti lõpuni pooleliolevad fragmendid.

Tabel 2. Antud töös kasutatud praimerid.

Praimeri nimi	Järjestus	Seondumiskoht
EcoRI-gln-synt-ees	5'-CTGAATTCGCCACTGGTCATGGCAATG-3'	sisaldab EcoRI lõikesaiti, komplementaarne <i>PP5299</i> geenieelse alaga positsioonides -473 kuni -454 suunaga geeni poole
Gln-synt-del	5'- GACACCGATCAAAGGGACTCCTTTGATGTG CTGCGGCG-3'	komplementaarne <i>PP5299</i> geeni eelse alaga positsioonides -28 kuni -9, 5' ots on komplementaarne praimeriga PP5298-start
PP5298-start	5'-CGGTCCCTTTGATCGGGTGC-3'	komplementaarne <i>PP5299</i> geeni järgse alaga positsioonides 18-37 nukleotiidi
XhoI-PP5298	5'-GGCTCGAGATGCTGACCGAGTGGCGAG-3'	sisaldab XhoI lõikesaiti, komplementaarne <i>PP5299</i> geeni järgse alaga positsioonides 428-447 nukleotiidi
Gln-opr-del	5'- GCTGAAGATCGATGGGGCTCCTTTGATGTG CTGCGGCG-3'	komplementaarne <i>PP5299</i> geeni eelse alaga positsioonides -28 kuni -9, 5' ots on komplementaarne praimeriga PP5297-välja
PP5297-välja	5'-CAGCCCCATCGATCTTCAGC-3'	komplementaarne <i>PP5297</i> geeni järgse alaga positsioonides 19-38 nukleotiidi
XhoI-gln-opr-del	5'-ATCTCGAGCAAGGTGACTTTCTGGAGC-3'	sisaldab XhoI lõikesaiti, komplementaarne <i>PP5297</i> geeni järgse alaga positsioonides 435-454

		nukleotiidi
PheAtsII	5'-GTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni alaga positsioonides 295-313 nukleotiidi allavoolu translatsiooni startkoodonist ATG
PheABamEI	5'-AAGGCGGCTCCCGTAAGACA-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni -40 initsiaatorkoodonist ATG, suunaga geeni poole
Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	pBluescript'i universaalpraimer, seondub pEMG plasmiidile, suunaga multikloonimisjärjestuse poole
Reverse	5'-AACAGCTATGACCATG -3'	pBluescript'i universaalpraimer, seondub pEMG plasmiidile, suunaga multikloonimisjärjestuse poole
pSW-F	5'-GGACGCTTCGCTGAAAATA-3'	komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
pSW-R	5'-AACGTCGTGACTGGGAAA-3'	komplementaarne plasmiidis pSW(I-SceI) oleva järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole

2.2.3. Geelelektroforees

PCR produktide analüüsimiseks kasutati geelelektroforeesi. 20 µl PCR proovile lisati 2 µl foreesivärvi (0,04% broomfenooli lahus 50% glütseroolis). Proovid kanti 1% agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldas etiidumbromiidi 0,33 µg/ml. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati firma *Thermo Scientific* DNA molekulmassi markerit. Elektroforees viidi läbi toatemperatuuril, pingel 120 V. Geeli pildistati UV-valguses DNA visualiseerimiseks.

2.2.4. Bakterirakkude elektroporatsioon

Elektroporatsiooni kasutati plasmiidse DNA sisestamiseks rakkudesse. Elektroporatsiooniks kompetentsete *E. coli* rakkude saamiseks lahjendati LB-vedelsöötmes üleöö kasvanud kultuure optilise tiheduseni $A_{580}=0,1$ ja kasvatati loksutil 1,5-2 h (tiheduseni $A_{580}=0,9-1,5$). Söötmes olevad rakud tsentrifugeeriti (13400 pöört/min) kokku ning sööde eemaldati. Rakke jahutati jääl ja pesti kaks korda 800 µl külma veega ning kolmas kord 800 µl 10% glütseroolilahusega, rakud suspendeeriti 70 µl glütseroolilahuses. Kompetentsete *P. putida* rakkude saamiseks võeti 250 µl üleööökultuuri, rakud tsentrifugeeriti (13400 pöört/min)

kokku ning pesti kolm korda 300 mM sahharoosilahusega ja suspendeeriti 70 µl sahharoosilahuses.

Kompetentsetele rakkudele lisati 10 µl vees lahustatud DNA-d. Rakud pipeteeriti elektroporatsiooni küveti ja elektroporeeriti *BioRad* elektroporaatoriga 2500 V suurusel pingel. Rakkudele lisati 800 µl LB söödet ja pesti sellega küvetist välja. Seejärel kasvatati rakke tund aega loksutil (*E. coli* rakke temperatuuril 37 °C, *P. putida* rakke temperatuuril 30 °C) ning peale seda plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.5. Plasmidi eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmidse DNA eraldamiseks kasutati firma *Favorgen Biotech Corp* plasmidi eraldamise komplekti *FavorPrep™ Plasmid Extraction Kit* ja järgiti tootja ette antud protokollid.

Eraldatud DNA kontrolliti restriksioonanalüüsiga. Plasmidse DNA restriksiooniks kasutati firma *Fermentas* restriksionaasi ja reaktsioonid viidi läbi vastavalt tootja ensüümide kataloogis ettenähtud tingimustele. Restriksiooni reaktsiooni tulemused visualiseeriti geelelektroforeesiga.

2.2.6. Kloonimine

Kloonimist kasutati deletsioonitüvede konstrueerimisel soovitava fragmendi sisestamiseks vektorplasmidi. Kõigepealt valmistati restriksiooni reaktsiooni segud, kus vektorit ning sellesse kloonitavat produkti lõigati samade restriksionaasidega. Kloonimisvektorit töödeldi peale lõikust aluselise fosfataasiga *FastAP (Thermo Scientific)*, et vältida hiljem vektori iseendaga kokku lüüesumist. Selleks lisati vektori restriksioonisegule 1 ühik *FastAP*-d ning inkubeeriti temperatuuril 37 °C 15 minutit. Restriksionaaside ning *FastAP* inaktiveerimiseks reaktsioonisegus kasutati termotöötlust, kus restriksioonisegusid hoiti 10 minutit temperatuuril 80 °C. Seejärel restriksioonisegud sadestati 2,5-kordses mahus 96% etanooli ja 0,1-kordses mahus 5M NaCl lahusega temperatuuril -20 °C 10 minutit. Sadet tsentrifuugiti põhja (13400 pööret/min) 10 minutit temperatuuril 4 °C ning pesti 75% etanooliga. Saadud sade kuivatati temperatuuril 37 °C. Restriksioonifragmentide kokkulüüesumiseks lahustati sadestatud DNA vees ja segati kokku lüüesumise reaktsiooni segu mahus 20 µl. Lüüesumise segu sisaldas ühekordset lüüesumise puhvrit firmalt *Thermo Scientific* 1mM ATP-d ja 0,5 ühikut T4 lüüesumise (*Thermo Scientific*). Reaktsioon toimus üleöö temperatuuril 16-20 °C. Seejärel sadestati lüüesumise sarnaselt restriksioonisegudele ja lahustati 20 µl vees. Edasi elektroporeeriti 10 µl lüüesumise *E. coli* DH5α või CC118λpir tüve rakkudesse või *P. putida* PaW85 rakkudesse.

pBluescript KS vektori puhul kontrolliti kloonimise õnnestumist sini-valge testi abil. Test põhineb vektoris oleva β -galaktosidaasi geeni *lacZ* lugemisraami rikkumisel soovitava fragmendi insertiooniga. Testi läbiviimiseks plaaditi KS vektoriga tüved IPTG-d, X-gal-i ja Amp (vt peatükk 2.2.1) sisaldavale LB-tardsöötmele, kus fragmendi insertiooniga plasmidi kandvad tüved moodustavad valged kolooniad ja tühja vektori kolooniad värvuvad siniseks.

2.2.7. Bakterite konjugatsioon

Deletsioonitüvede saamiseks kanti geeni deletsiooniks vajalikke järjestusi sisaldav plasmiid konjugatsiooni teel retsipienttve rakkudesse. Selleks viidi läbi bakterite kolmikristamine. 5 ml LB-vedelsöötmes, millele lisatud plasmidi seleksiooniks vastavat antibiootikumi, kasvatati üleöö eraldi katseklaasides doonortüve *E. coli* CC118 λ pir tüve, milles oli TS1TS2 (vt peatükki 2.2.9) fragmenti sisaldav pEMG plasmiid, retsipienttve *P. putida* PaW85 ja konjugatiivset ülekannet abistavat plasmidi pRK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101. Üleöö kasvanud kultuurid lahjendati tiheduseni $A_{580}=0,1$ ilma antibiootikumita LB-vedelsöötmesse ja kasvatati eksponentsiaalsesse kasvufaasi tiheduseni $A_{580}=0,6-0,8$. Seejärel segati tüved kokku vahekorras 1:1:2 ehk 100 μ l doonor- ja helpertüve ja 200 μ l retsipienttve ning kanti LB-tardsöötmele. Konjugatsioon toimus üleöö temperatuuril 30° C. Seejärel kraabiti 1/3 rakukultuuri segu LB-tardsöötmele üles ja suspendeeriti 1 ml ühekordse M9-s, 100 μ l segust plaaditi minimaalselektiivsöötmele, mis võimaldas ainult transkonjugantide kasvu.

2.2.8. DNA sekveneerimine

Sekveneeritavate PCR-i produktide reaktsioonisegust eemaldati esmalt kasutamata jäänud praimerid ja nukleotiidid. Selleks töödeldi PCR-i reaktsioone 1 ühiku aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) ja 2,5 ühiku eksonukleaasiga ExoI (*Thermo Scientific*) 30 minutit temperatuuril 37 °C. Reaktsioon peatati termotöötusega temperatuuril 80 °C 15 minuti jooksul. Seejärel valmistati sekveneerimisproovid kasutades firma *Applied Biosystems* *BigDye Terminator v3.1* sekveneerimiskomplekti ning järgides tootjafirma protokollit. Segati kokku reaktsioonisegu mahuga 10 μ l, mis sisaldas 2 μ l 5 x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂); 1,6 pmol praimerit; 0,7 μ l premixi (Big Dye PR-100 mix v3.1); 0,5-1 μ l sekveneeritavat PCR-i produkti, maht viidi 10 μ l-ni veega.

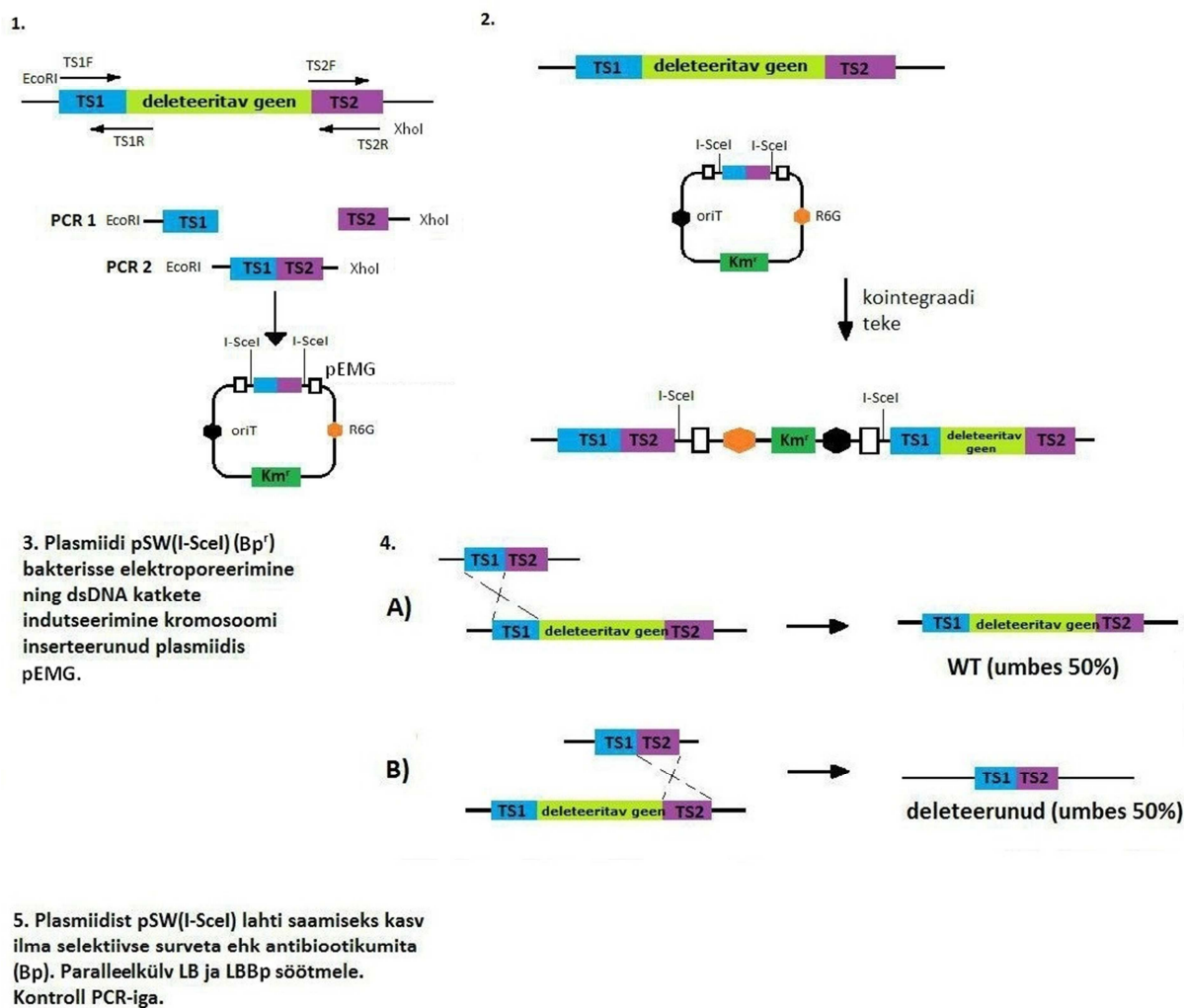
Reaktsioon toimus 30 tsüklit tingimustel:

1. 20 sekundit 95°C
2. 15 sekundit 50°C
3. 60 sekundit 60°C

DNA sekveeriti firma *Applied Biosystems* 3730xl kapillaarsekvenaatoriga, selleks kasutati Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveerimisteenust, ning saadud järjestuste analüüsimiseks kasutati programme BioEdit ja UniProt ClustalO (uniprot.org 16.05.2014).

2.2.9. Deletsioonitüvede konstrueerimine I-SceI süsteemiga

PP5299 geeni ja operoni deletsiooniga tüvede saamiseks kasutati Posfai jt (1999) ning Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud meetodit. Meetodi etapid on kujutatud joonisel 5.



Joonis 5. Geeni deleteerimise skeem I-SceI süsteemiga. Joonisel on toodud deletsioonitüve konstrueerimise põhietapid. 1) amplifitseeritavad alad TS1 ja TS2, praimerite seondumiskohad ja TS1TS2 fragmendi inserteerumine pEMG plasmidi; 2) pEMG plasmidi viimine *P. putida* rakkudesse ja kointegraadi moodustumine; 3) plasmidi pSW viimine raku ja dsDNA katkete indutseerimine; 4) homologilise rekombinatsiooni toimumise võimalused ja tõenäosus; 5) pSW plasmiidist vabanemine. Kärt Ukkivi modifitseeritud joonis (Ukkivi, 2013).

ΔPP5299 tüvede saamiseks amplifitseeriti esmalt PCR-iga geeni eelne (TS1-target sequence 1) ja järgne ala (TS2- target sequence 2), mõlemad umbes 500 bp ulatuses. Selleks

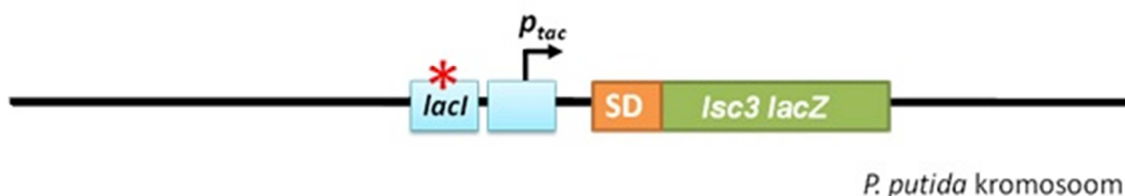
kasutatavad praimeripaarid olid EcoRI-gln-synt-ees ja Gln-synt-del ning PP5300-start ja XhoI-PP5300 (tabel 1). Gln-synt-del praimer sisaldas 5' otsas PP5300-start praimeriga komplementaarset järjestust, et järgnevas etapis oleks võimalik TS1 ja TS2 fragmendid kokku liita. Edasi tehti praimeritega EcoRI-gln-synt-ees ja XhoI-PP5300 „sewing“ PCR-i, mille käigus liideti kokku TS1 ja TS2 fragmendid, saades ligikaudu 1000 bp pikkuse TS1TS2 fragmendi. TS1TS2 fragment klooniti plasmidi pBluescript KS, selleks lõigati plasmidi ja fragmenti firma *Thermo Scientific* restriктаasidega FastDigestEcoRI ja FastDigestXhoI. Plasmiid nimetati KS/Δ5299 ning selekteeriti *E. coli* DH5α tüves sini-valge testiga. KS/Δ5299 plasmiid eraldati DH5α tüvest *Favorgen* kitiga. Seejärel klooniti TS1TS2 fragment plasmidi pEMG, kasutades pEMG vektori avamiseks ja TS1TS2 fragmendi välja lõikamiseks KS plasmiidist firma *Thermo Scientific* restriктаase FastDigestEcoRI ja FastDigestXhoI, ning saadud plasmiid nimetati pEMG/Δ5299. See plasmiid selekteeriti *E. coli* tüves CC118λpir Km sisaldaval söötmel. Järgnevalt amplifitseeriti TS1TS2 fragmenti PCR-iga, kasutades praimereid Forward ja Reverse (tabel 1) ning sekveneeriti kasutades praimerit Forward, et kontrollida ega TS1TS2 fragmenti ei ole PCR-i käigus tekkinud mutatsioone. Seejärel viidi korrektset DNA järjestust sisaldav plasmiid konjugatsiooni teel bakterisse *P. putida* PaW85 (vt. peatükki 2.2.7), kus see plasmiid ei replitseeru ning inserteerub selles sisalduva TS1TS2 järjestuse ja kromosoomi vahel toimuva homoloogilise rekombinatsiooni kaudu bakteri kromosoomi. Moodustunud kointegraadiga rakke selekteeriti Km sisaldaval söötmel. Kointegraadi olemasolu kontrolliti PCR-ga kasutades praimereid EcoRI-gln-synt-ees ja XhoI-PP5300. Järgnevalt viidi elektroporatsiooni abil rakkudesse I-SceI nukleaasi kodeeriv plasmiid pSW(I-SceI), kasutades selektsiooniks Km ja Bp sisaldavat LB-söödet. Selleks, et indutseerida plasmidi pSW(I-SceI) tekitama kaheaheelalisi lõikeid I-SceI restriksioonisaitides kromosoomi integreerunud pEMG/Δ5299 plasmiidis, kasvatati rakke üleöö 30° C loksutil 5 ml LB-vedelsöötmes, millele lisati 7,5 μl meta-toluaati, mis on I-SceI promootori induktor. Katkete tekkimise tagajärjel toimub homoloogiline rekombinatsioon TS1TS2 fragmendi ja kromosoomis olevate *PP5299* geeni eelse TS1 või *PP5299* järgse TS2 ala vahel. Kui homoloogiline rekombinatsioon toimub, siis pole tüved enam võimelised Km kasvama ja nendest tüvedest pooltel juhtudel deleteerub *PP5299* geen koos pEMG plasmiidiga ning rakk ei ole enam võimeline Km sisaldaval söötmel kasvama. Et isoleerida need kloonid, kus kromosoomist on deleteerunud *PP5299* geen, tõmmati 5 μl üleöö kasvanud kultuuri Bp LB-tassil üksikkolooniateks. Geeni deleteerumist kontrolliti kolooniate paralleelkülviga LB-tassidele, mis sisaldasid selektsiooniks Km. Km suhtes tundlikes kolooniates kontrolliti *PP5299* geeni deleteerumist PCR-iga, kasutades praimereid EcoRI-gln-synt-ees ja XhoI-PP5300. Seejärel vabaneti deletsioonitüves pSW(I-SceI) plasmiidist. Deletsioonitüvede

puhtust kontrolliti PCR-ga kasutades primereid pSW-F ja pSW-R (tabel 1), mis annavad produkti plasmidi olemasolul.

Samal meetodil konstrueeriti ka operoni deletsiooniga tüvi (Δ operon), selleks kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 1 ja primerid tabelis 2.

2.2.10. Mutatsioonisagedust mõjutavate geenide isoleerimine lac-lsc testsüsteemiga

Antud töös kasutatud transposoonmutandid PP5298::Km, PP5299::Km ja PP5300::Km on selekteeritud Heili Ilvese koostatud testsüsteemiga, mis põhineb levaansukraasi ja β -galaktosidaasi aktivatsioonil testtüves lacI-lsc. *P. putida* tüve PaW85 kromosoomi on viidud geenikassett, kus on repressor *lacI*, *tac* promootor, Shine-Dalgarno (SD) ribosoomi seondumissait ning geenid *lsc3* ja *lacZ* (joonis 6). LacI on repressor, kui selles geenis on toimunud mutatsioon, siis ei seonu LacI lac operaatorile ja ei represseri promootorit, seega RNA polümeraas saab *tac* promootorilt transkriptsiooni läbi viia ning *lsc3* ja *lacZ* geenid ekspresseeruvad. Antud testtüvega viidi läbi transposoonmutagenees, mille käigus tuvastati suurenenud mutatsioonisagedusega gene, muuhulgas inserteerus transposoon ka antud töös kasutatud PP5298, PP5299 ja PP5300 geenidesse (Tagel, 2014).



Joonis 6. *P. putida* tüve PaW85 kromosoomi viidud geenikassett. Tärn tähistab mutatsiooni *lacI* geenis, mille tagajärjel *tac* promootorit ei represseriita ning *lsc3* ja *lacZ* geenid ekspresseeruvad.

2.2.11. *P. putida* tüvede kasvukõverate mõõtmine

Kasvukõverate saamiseks kasvatati *P. putida* tüvede rakke üleöö Glc-CAA söötmes. Seejärel lahjendati tüvesid optilise tiheduseni $A_{580}=0,02$. Lahjendused tehti Glc-minimaalsöötmesse kasutades tavalist M9 puhvrit, mis sisaldab 190 mM NH_4Cl ning vähese lämmastikuga M9 puhvrit, millesse lisati 10 mM NH_4Cl . Lahjendused kanti mikrotiiterplaadile.

Bakterikultuuride OD automaatseks mõõtmiseks kasutati spektrofotomeetrit POLARstar Omega. Mikrotiiterplaadil olevaid kultuure inkubeeriti temperatuuril 30 °C ja aereeriti pidevalt. Rakukultuuri optilist tihedust mõõdeti lainepikkusel 580 nm iga 7 min järel 20 h jooksul. Saadud andmetest koostati bakterikultuuride kasvukõverad.

2.2.12. *P. putida* Rif resistentsete (Rif^R) mutantide tekkesageduse määramine

P. putida tüvesid kasvatati Glc-CAA söötmes 6-7 h, seejärel tehti 10⁴ kordsed lahjendused Glc-CAA söötmesse ja jagati kultuurid 2,3 ml kaupa katseklaasidesse laiali. Kultuure kasvatati loksutil 18-20 h temperatuuril 30 °C. Seejärel plaaditi 500 µl sõltumatutest kultuuridest Rif-tassidele ja inkubeeriti temperatuuril 30 °C. Tekkinud Rif resistentseid kolooniaid loendati kahe päeva jooksul.

Bakterirakkude elumust määrati katse alguses kolooniaid moodustavate rakkude (CFU) arvukuse alusel üleöö vedelsöötmes kasvanud kultuuridest. Selleks tehti vastavad lahjendused ühekordsesse M9-sse ja kanti LB-tassidele. Lähtudes LB-tassidele tekkinud kolooniate arvust ja tehtud lahjendustest, arvatati elusrakkude arv 1 ml üleöö kasvanud kultuuri kohta ja teisendati 10⁹ raku kohta.

2.2.13. *P. putida* Phe⁺ mutantide tekkesageduse määramine plasmiidse TAG testsüsteemiga

P. putida algsesse tüvesse PaW85 ja sellest konstrueeritud deletsioonitüvedesse viidi elektroporatsiooniga plasmiidne TAG testsüsteem, mis tuvastab asendusmutatsioone. TAG süsteem kujutab endast plasmidi pKT204, millesse on viidud defektne fenooli monooksügenaasi geen *pheA* (stoppkoodon TAG 22. positsioonis). Kui mutatsiooni tagajärjel enneaegne stoppkoodon kaob, siis suudab rakk kasutada fenooli süsinikuallikana.

6-7 tundi Glc-minimaalsöötmes kasvanud testsüsteemiga kultuurid lahjendati optilise tiheduseni A₅₈₀=0,1 ühekordses M9-s ja jaotati 2,3 ml kaupa katseklaasidesse. Katseklaasides olevaid kultuure kasvatati 18-20 h. Seejärel plaaditi 500 µl sõltumatuid kultuure Phe-minimaaltassidele ja inkubeeriti temperatuuril 30 °C. Tassidele tekkinud kolooniaid loendati 10 nälgimispäeva jooksul. Esimesed Phe⁺ kolooniad tekkisid teisel inkubatsiooni päeval.

Bakterirakkude elumust määrati kogu katse jooksul kolooniaid moodustavate rakkude (CFU) arvukuse alusel samadelt fenooli minimaaltassidelt, millel jälgiti Phe⁺ revertantide teket. Steriilset ühemilliliitrist pipetiotsikut kasutades löigati tassidelt agaritükid, vältides Phe⁺ kolooniaid. Arvestati, et agaritüki pindala on 1/100 kogu tassi pindalast. Agariketastel olevad rakud suspendeeriti ühekordses M9 lahuses loksutil 20 min temperatuuril 30° C. Seejärel tehti vastavad lahjendused ühekordses M9-s ja kanti LB-tassidele, mis sisaldasid rakkude selektsiooniks Bp. Lähtudes tassidele tekkinud kolooniate arvust, tehtud lahjendustest ja agariketta pindalast, arvatati elusrakkude arv Phe-minimaaltassidel.

2.2.14. DNA-d kahjustavate kemikaalide tundlikkuse test

P. putida tüvede kemikaalitundlikkuse hindamiseks kasutati erinevaid DNA-d kahjustavaid kemikaale, mida lisati LB-tardsöötmele: mitomütsiin C (MMC; 2 µg/ml), 4-nitrokinoliin-N-oksiidi (NQO; 125 µM), paraquat dikloriid x-hüdraati (paraquat; 5 µg/ml) ja vesinikperoksiidi (H₂O₂; 0,4 mM). Testitavaid tüvesid kasvatati 5 ml LB-vedelsöötmes üleöö. Seejärel tehti lahjendusteread 10⁻²-10⁻⁷ ühekordsesse M9-sse ja 5 µl lahjendustest 10⁻³-10⁻⁷ plaaditi kemikaaliga LB-tassidele. Kontrolliks kanti lahjendused ka ilma kemikaalita LB-tassile. Bakterite kasvu kemikaale sisaldavatel söötmetel hinnati järgmisel päeval.

2.2.15. *P. putida* glutamiini süntetaaside joondamine ja virtuaalne analüüs

P. putida tüves KT2440 (identne meie PaW85-ga) annoteeritud GS-e joondati ja analüüsiti teiste bakterite GS-idega UniProti ClustalO joendusprogrammis (www.uniprot.org 16.05.2014) ning *P. putida* GS-e analüüsiti kasutades PRRN joendusprogrammi UPGMA (http://www.genome.jp/tools-bin/prrntree?tree_upgma+140519193419Z0TwN 16.05.2014), mis kuulub KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome; <http://www.genome.jp/kegg> 16.05.2014) andmebaasi. *P. putida* glutamiini süntetaaside aminohappelised järjestused saadi www.pseudomonas.com andmebaasist (Winsor jt, 2011).

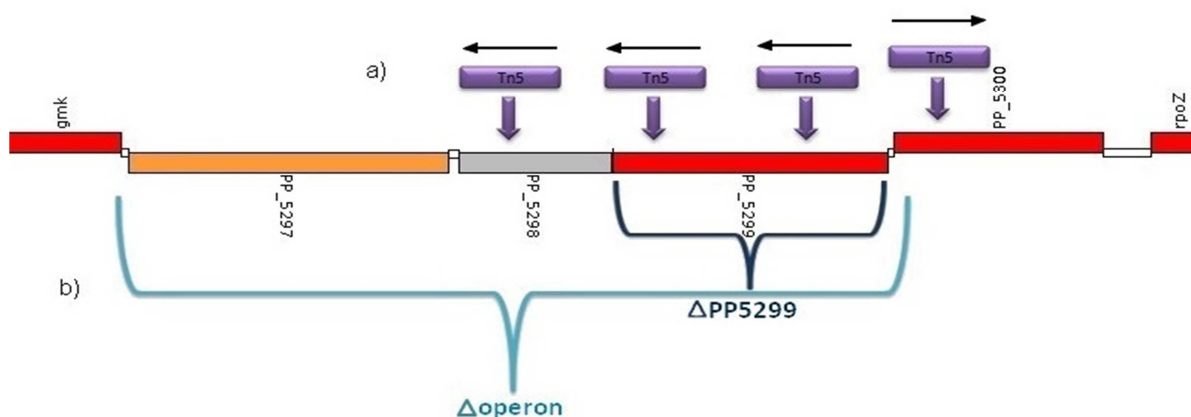
Lisaks *P. putida* GS-ide omavahelisele joondamisele, joondati GS-ide aminohappelisi järjestusi ka *E. coli* GSI (*glnA*), *Rhizobium meliloti* GSII (*glnII*), *Bacteroides fragilis*'e GSIII ja *Rhizobium leguminosarum*'i GlnT valgu aminohappelise järjestusega. *E. coli*, *B. fragilis*'e ja *Rhizobium*'ite GS-ide aminohappelised järjestused saadi UniProti valguandmebaasist UniProtKB (www.uniprot.org 16.05.2014).

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. *lac-lsc* testsüsteemiga isoleeritud mutatsioonisagedust mõjutavate geenide mutageensuse kontrollimine

PaWlacIIsc testtüvega (vt peatükki 2.2.10) viisime läbi transposoonmutageneesi, millega tuvastasime suurenenud mutatsioonisagedusega gene. Testsüsteemiga kindlaks tehtud 181 geeni seas oli näiteks nii transporterite, membraanivalkude, signaali ülekande kui ka metabolismiga seotud gene. Muuhulgas inserteerus transposoon ka DNA reparatsioonisüsteemi geenidesse, mis oli oodatav, sest reparatsiooniradade geenide inaktiveerimine suurendab oluliselt mutatsioonisagedust ja nende välja tulemine võiks kinnitada, et testsüsteem toimib.

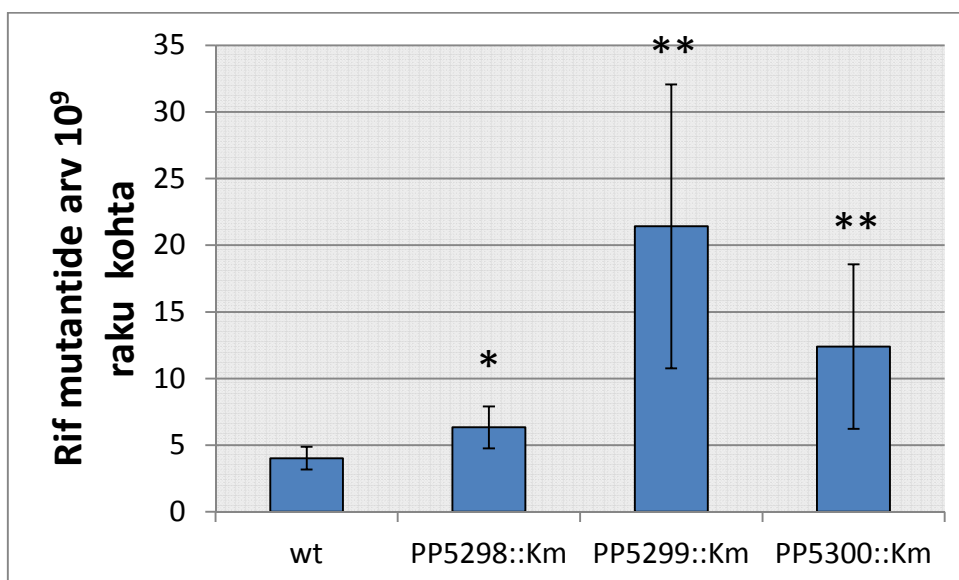
Meile huvipakkuvaks osutus minitransposooni sisenemine glutamiini süntetaasi *PP5299* geeni, kuna transposoon oli sisenenud kahel korral *PP5299* geeni, ühel korral samas operonis asuvasse *PP5298* geeni ja ühel korral kõrval operonis asuvasse *LysR* perekonna transkriptsiooniregulaatorgeeni *PP5300*. *LysR*-tüüpi transkriptsiooniregulaatori puhul on täheldatud, et ta võib reguleerida operoni, mille järel ta asetseb, kuid tema enda geeni transkriptsioon on reguleeritava geeni transkriptsiooniga vastassuunas (Sung ja Fuchs, 1992). Sarnane olukord esineb ka siin, sest *PP5299* operon asub *P. putida* genoomis negatiivsel ahelal ning *PP5300* geen positiivsel, seega on nad vastassuunaliselt transkribeeritavad. Kõik transposoonid sisenesid genoomi *km* geeni transkriptsioon vastava geeni transkriptsiooniga samas suunas (joonis 7 a).



Joonis 7. *P. putida* *PP5299* operoni struktuur. Minitransposoonid kannavad *Km* resistentsusgeeni, mille transkriptsioon otsast väljapoole võib mõjutada ka talle külgnevate geenide transkriptsiooni taset. a) Minitransposoonide insertioonikohad ja transkriptsiooni suunad. Transposoon on sisenenud genoomi nii, et *km* geeni transkriptsiooni suund on insertiooni sisaldava geeni transkriptsiooni suunaga samas suunas. b) Deletsioonitüved. Loogiliste sulgudega on tähistatud geenid, mille deleteerisime ning kuidas deletsioonitüved antud töös on nimetatud.

Üldiselt tuli transposoonmutageneesist välja vähe korduvaid geene ja operone, kuid valitud piirkonda inserteerus minitransposoon neljal korral, moodustades valitud piirkonnast selles testsüsteemis nn „kuuma punkti“. Huvipakkuv oli *PP5299* geen ka selle pärast, et varem pole bakteris *P. putida* näidatud seoseid üldiste metabolismi geenide ja mutatsiooniprotsesside vahel. Küll aga on nähtud, et *P. aeruginosa* kroonilise infektsiooni korral tsüstilise fibroosi haigete kopsudes mängivad mutaatorgeenid rolli patogeeni metabolismi kohanemisel vastavalt infektsiooni kulgemisele (Oliver ja Mena, 2010).

Kontrollimaks, kas testsüsteemi abil välja sõelatud transposoonmutandid on mutaatorfenotüübiga, võrdlesime PaWlacIIsc minitransposooni katkestustüvede *PP5298::Km*, *PP5299::Km* ja *PP5300::Km* spontaanset Rif^R tekkesagedust algtüve PaW85 (edaspidi wt) suhtes. Rif on antibiootikum, mis inhibeerib RNA sünteesi, seondudes RNA polümeraasi β -subühikuga RpoB, mida kodeerib *rpoB* geen. Rif sisaldaval söötmel saavad kasvada ainult need rakud, kus on *rpoB* geeni järjestuses toimunud sellised mutatsioonid, mille tagajärjel Rif ei suuda RpoB-ga enam seonduda. Rif resistentsust võimaldavad paljud erinevad mutatsioonid *rpoB* geenis, seetõttu on see testsüsteem mutatsioonisageduse mõõtmiseks suhteliselt tundlik ning Rif^R mutatsioonisagedus peegeldab ka raku üldist mutatsioonisagedust (Jatsenko jt, 2010). Seega kui nendel tüvedel tekib rohkem Rif^R kolooniaid kui wt tüvel, siis on nendes rakkudes mutatsioonisagedus tõusnud ja nende konkreetsete geenide puhul on testsüsteemiga õnnestunud isoleerida geenid, mille inaktivatsioonil on mutatsioonisagedus ka tegelikult tõusnud.



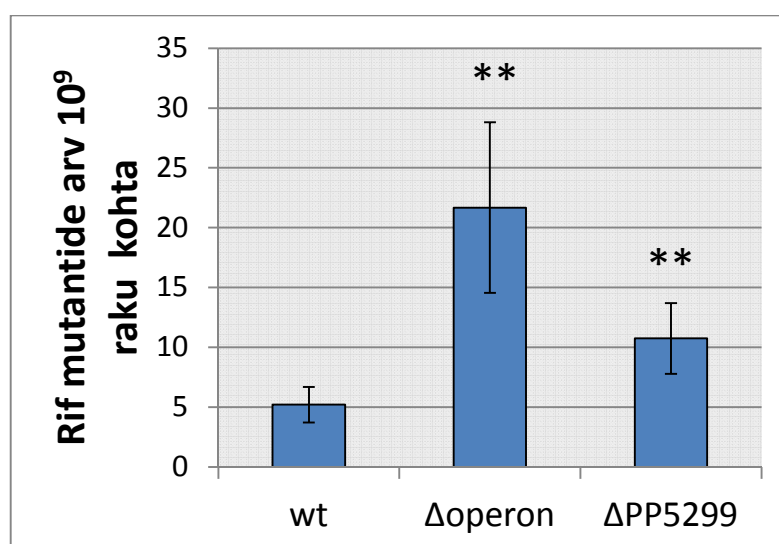
Joonis 8. Spontaanne Rif^R mutantide tekkesagedus *P. putida* algse tüves PaW85 ja tüvedes, mis sisaldasid minitransposooni insertiooni geenides *PP5298*, *PP5299* ja *PP5300*. Joonisel on toodud vähemalt nelja sõltumatu katse Rif resistentsete kolooniate keskmine hulk 10⁹ elusraku kohta ning 95% usalduspiirid. * tähistab p-väärtust <0,05, ** tähistab p-väärtust <0,005. Tulemusi on analüüsitud Student T-testiga. Võrreldud on Rif^R mutantide tekkesagedust algse tüve suhtes.

Katse tulemused viitasid sellele, et tüvede PP5298::Km, PP5299::Km ja PP5300::Km puhul on mutatsioonisagedus võrreldes algse tüvega PaW85 suurenenud (joonis 8). Selleks, et näha, kas mutatsioonisagedused on ka statistiliselt erinevad, arvutasime tekkinud Rif^R mutantidele Student T-testiga p-väärtused: kui p-väärtus oli alla 0,05, lugesime tulemuse statistiliselt oluliseks. Kuna p-väärtused tulid alla 0,05, võime järeldada, et antud tüvedes on mutatsioonisagedus tõusnud ja testsüsteemiga on õnnestunud isoleerida geenid, mis annavad ka tegelikult rakule mutaatorfenotüübi.

2.3.2. PP5299 geeni ja operoni osalus spontaansete mutatsioonide tekkimisel

Minitransposooni sisaldav katkestusmutant ei pruugi ikkagi täpselt kajastada seda olukorda rakus, kus uuritav geen puuduks täielikult. Seega, et hinnata PP5299 geeni ja PP5299 operoni mõju mutatsioonisagedusele konstrueerisime deletsioonitüved PaW Δ PP5299 ja PaW Δ operon (joonis 7 b) ning mõõtsime neis Rif^R mutantide tekkesagedust võrreldes algse tüvega ja transposoonmutantidega.

Selgus, et deletsioonitüvede puhul on mutatsioonisagedus algse tüve suhtes samuti suurenenud (joonis 9). Kuna Student T-testiga jäid p-väärtused alla 0,005 võime öelda, et Δ PP5299 ja Δ operoni tüved on võrreldes algse tüvega mutaatorid ja lac-lsc testsüsteemiga on õnnestunud isoleerida geenid, mille puudumisel on mutatsioonisagedus ka tegelikult tõusnud.



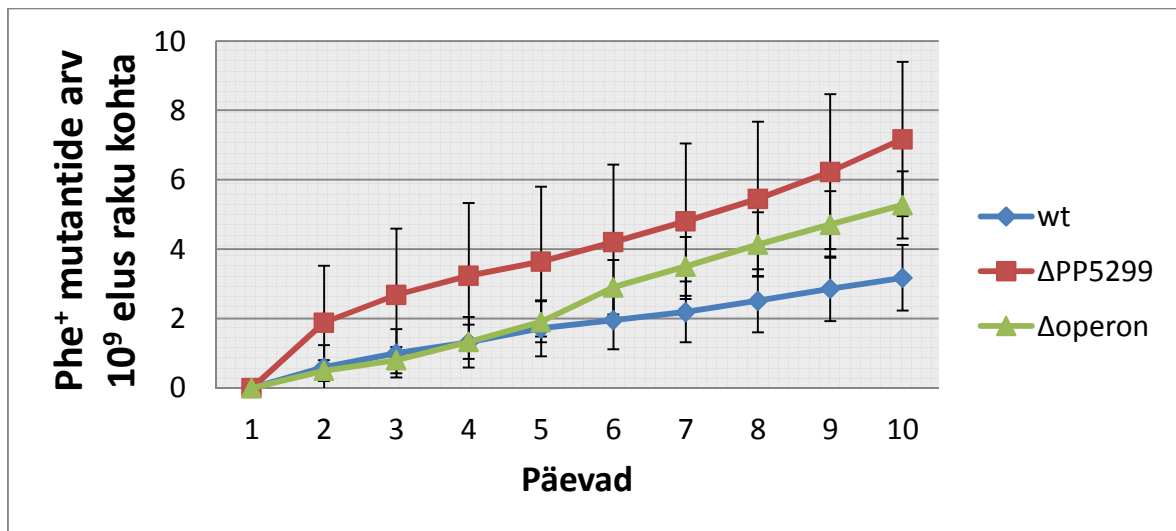
Joonis 9. Spontaanne Rif^R mutantide tekkessagedus *P. putida* algses tüves PaW85 ja tüvedes, kus kromosoomist oli deleteeritud kas ainult PP5299 või kogu operon. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse Rif resistentsete kolooniate keskmine hulk 10⁹ elusraku kohta ning 95% usalduspiirid. ** tähistab, et p-väärtus <0,005 (Student T-test).

Võrreldes transposoonmutantide ja deletsioonitüvede mutatsioonisagedusi, nägime mõningaid erinevusi. $\Delta PP5299$ tüve mutatsioonisagedus on kaks korda väiksem kui $PP5299::Km$ tüvel ning $PP5299::Km$ tüve mutatsioonisagedus on võrreldav Δ operon tüvega. Deletsioonitüvede ja transposoonmutantide mutatsioonisageduste erinevus võib olla tingitud transposooni sisenemisel tekkivast võimalikust polaarsest efektist, mis tähendab, et Km^R geeni transkriptsioon võib võimendada transposooni insertiooniga külgnevate geenide transkriptsiooni ja seeläbi suurendada mutatsioonisagedust. Käesoleva töö raames ei jõudnud me kahjuks geeni *PP5300* veel deleteerida. Seega *PP5300* osalust *PP5299* geeni ja kogu operoni transkriptsiooni regulatsioonil ning spontaansete mutatsioonide tekkel me praegu veel hinnata ei saa.

2.3.3. Geeni *PP5299* ja kogu operoni deletsiooni mõju statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedusele

lac-lsc testsüsteemi sisaldava *P. putida* tüve transposoonmutageneesi puhul toimus esmane suurenenud mutatsioonisagedusega kolooniate seleksioon tingimustes, kus rakud olid statsionaarses faasis. Statsionaarses faasis olevad rakud on stressis. Stressis olevad bakterid on alid muteeruma, et omandada uusi tunnuseid, mis võimaldaks neil antud tingimustes ellu jääda. Piiratud kasvuga rakkudes toimuvaid mutatsioone, mis võimaldavad bakterite paremat kohastumist, nimetatakse adaptiivseteks või statsionaarse faasi mutatsioonideks (Foster, 1999; Rosenberg, 2001). Sellest tulenevalt oli meil hüpotees, et *PP5299* geen või kogu operon võib olla seotud statsionaarses faasis mutageneesiga. Selleks viisime uuritavatesse tüvedesse plasmiidse TAG testsüsteemi (pKTpheA22TAG), kus fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* oli stoppkoodon TAG 22. positsioonis (Tegova jt, 2004) ja jälgisime 10 nälgimispäeva jooksul Phe^+ revertantide teket. Süsinikuallikana ainult fenooli sisaldaval söötmel said kasvada vaid need rakud, kus oli toimunud asendusmutatsioon, mis kaotas ära stoppkoodoni, võimaldades fenooli monooksügenaasi geeni ekspressiooni.

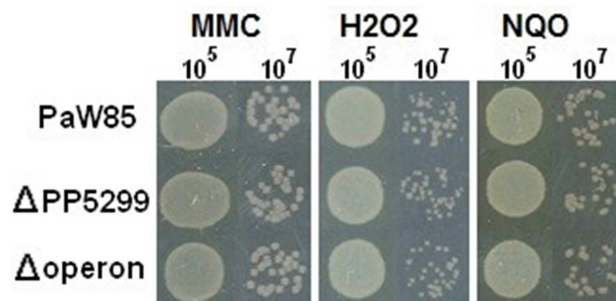
Suurte katsesiseste kõikumiste tõttu nägime statistiliselt olulisi erinevusi Phe^+ revertantide akumulatsioonis võrreldes algse tüvega nii $PaW\Delta PP5299$ kui $PaW\Delta$ operoni tüvel alates 8. päevast ($p < 0,05$); alates 10. päevast erinevused suurenesid ($p < 0,005$) (joonis 10). Antud katse põhjal võime järeldada, et alates 8. nälgimispäevast mõjutab *PP5299* geeni ja operoni puudumine statsionaarse faasi mutatsioonisagedust. Seega *PP5299* geeni ja operoni produktid on potentsiaalselt olulised talumaks stressi ja käivitamaks stressivastust. Kuigi katset on tehtud kolmes sõltumatus korduses, kus igas katses ühe tüve kohta oli 15 paralleelkultuuri, tuleks katseid kindlasti veel korrata.



Joonis 10. Phe⁺ mutantide akumulatsioon nälgivates *P. putida* rakkudes. Võrreldud on statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedust *P. putida* algse tüve ja tüvedes, kus kromosoomist oli deleteeritud kas ainult *PP5299* või kogu operon. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva perioodi jooksul tekkinud kolooniate summale. Phe⁺ kolooniate hulk on arvestatud 1 x 10⁹ testsüsteemi sisaldava raku kohta. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskmised tulemused ning 95% usaldusintervalli piirid.

2.3.4. *PP5299* geeni ja kogu operoni puudumise mõju DNA-d kahjustavate kemikaalide taluvusele

Kuigi metabolismiraja geenidel ei ole otsesest seost reparatsiooniraja geenidega, tahtsime siiski näha, kas *PP5299* geeni ja kogu operoni puudumine võiks mõjutada DNA-d kas otseselt või kaudselt kahjustavate kemikaalide taluvuses. Selleks viisime läbi kemikaalide taluvuse katse, kus lisasime LB-söötmele kemikaale nagu MMC, NQO, vesinikperoksiid ja paraquat. MMC indutseerib DNA ahelate vahelisi ristsidemeid, NQO tekitab kaheaheelalisi DNA katkeid, oksüdatiivseid kahjustusi ja DNA struktuuri muutusi ning vesinikperoksiid ja paraquat tekitavad samuti oksüdatiivseid kahjustusi. Kemikaalide taluvust võrdlesime eksponentsiaalselt kasvanud rakkude puhul.

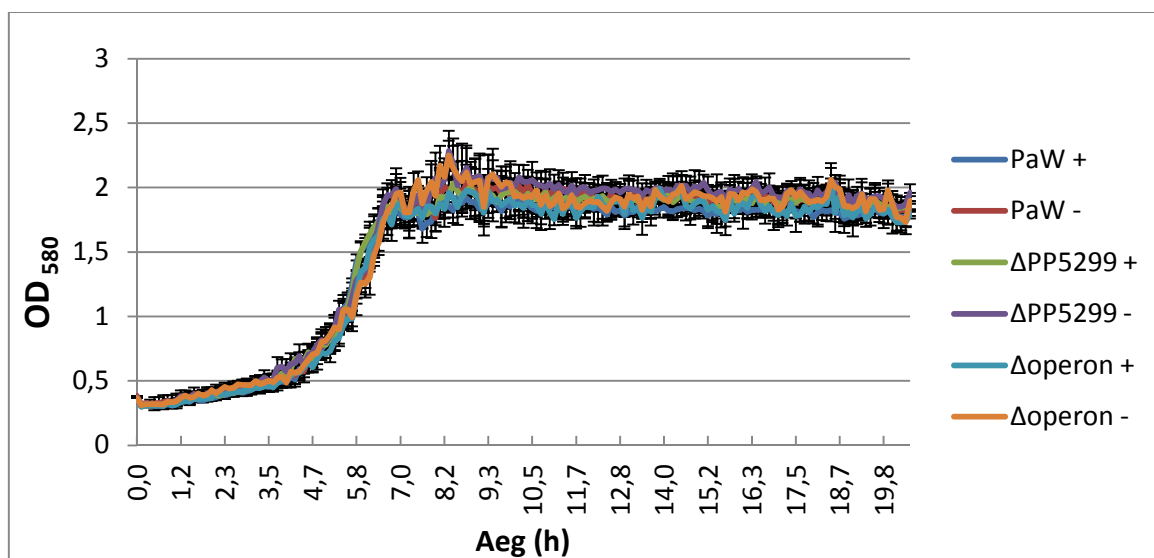


Joonis 11. DNA-d kahjustavate kemikaalide taluvuse test. Deletsioonitüved taluvad mitomütsiini (MMC), vesinikperoksiidi (H2O2) ja nitrokinoliini (NQO) võrreldavalt algse *P. putida* tüvega. 10⁵ ja 10⁷ on lahjendusfaktorid, kus üks koloonia tähistab vastavalt 10⁵ või 10⁷ raku.

Katsest nägime, et MMC, NQO ja vesinikperoksiidi puhul ei olnud deletsioonitüvedel erinevust algsest tüvest (joonis 11), samuti puudus efekt paraquaadiga (andmed ei ole esitatud). Seega *PP5299* geeni ja kogu operoni olemasolu ei mõjuta nende kemikaalide taluvust.

2.3.5. *P. putida* tüvede kasvukõverate mõõtmine

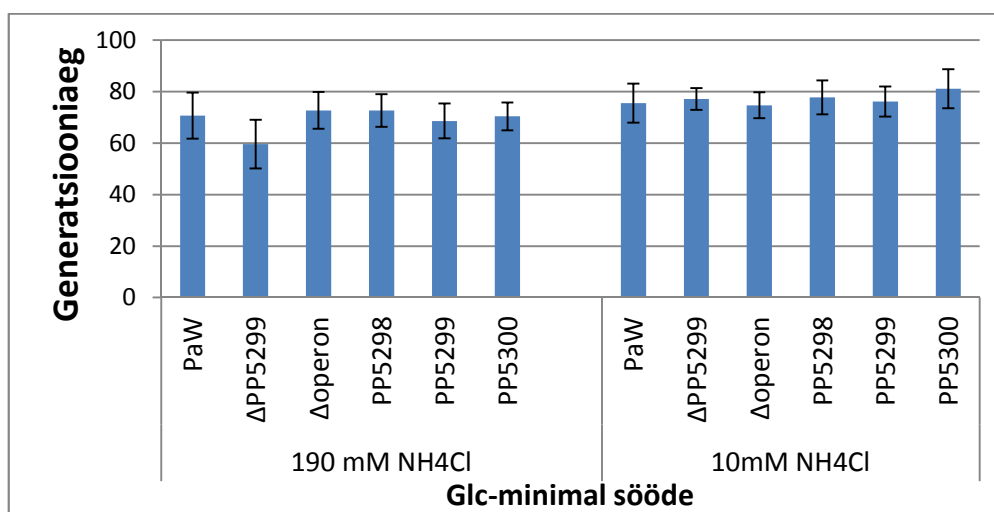
Kuna GS on lämmastiku metabolismi võtmeensüüm, siis püstitasime hüpoteesi, et *PP5299* ja operoni puudumisel on tüvedel lämmastikuvaeguses kasvupeetus. Hüpoteesi testimiseks mõõtsime deletsioonitüvede ja transposoonmutantide kasvu lämmastikukülluse ja lämmastikuvaeguse korral. Selleks kasvatasime deletsioonitüvesid, transposoonmutante ja algset tüve mikrotiiterplaadil POLARstar Omega spektrofotomeetris, kus toimus rakukultuuri pidev aereerimine ning iga 7 minuti järel (20 h vältel) automaatne rakukultuuri tiheduse mõõtmine 580 nm juures. Saadud tulemused on esitatud joonistel 12 ja 13.



Joonis 12. *P. putida* deletsioonitüvede kasvukõverad lämmastikukülluses ja -näljas. Rakukultuuride optilist tihedust mõõtsime Glc-minimaalsöötmes, mis sisaldas 190 mM NH₄Cl (+) ning Glc-minimaalsöötmes, mis sisaldas 10 mM NH₄Cl (-). Joonisel on toodud iga tüve 16 rakukultuuri keskmised optilised tihedused lainepikkusel 580 nm ning 95% usalduspiirid.

Jooniselt 12 on näha, et deletsioonitüvede kasvukõverad erineva lämmastikuhulga puhul on võrreldavad algse tüvega. Samuti olid algtüvega võrreldavad transposoonmutantide kasvukõverad (andmed pole esitatud) ning sellest tulenevalt olid ka kõigi võrreldud tüvede generatsiooniajad sarnased. Kuigi lämmastikunäljas (10 mM NH₄Cl-ga sööde) olid bakterite generatsiooniajad natuke pikenenud (joonis 13), olid veapiirid suured, nii et statistiliselt olulisi erinevusi me ei näinud. Seega meie esitatud hüpotees ei kehtinud. Lämmastikunälgi ei pikendanud deletsioonitüvedel ega transposoonmutantidel rakkude generatsiooniaega

võrreldes lämmastikuküllusega. Seega lämmastiku hulk ei mõjuta *PP5299* geeni ja operoni puudumisel rakkude kasvu.



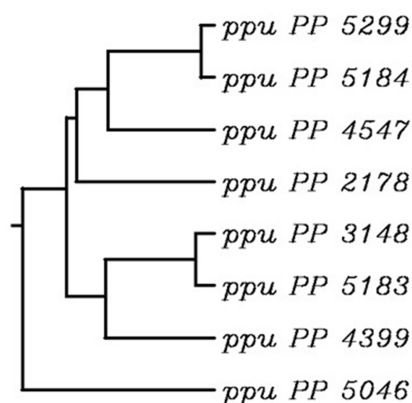
Joonis 13. *P. putida* transposoonmutantide, deletsioonitüvede ja metsiktüve (PaW85) generatsiooniajad lämmastikukülluses ja -vaeguses. PP5298, PP5299 ja PP5300 tähistavad transposoonmutante vastavalt: PP5298::Km, PP5299::Km ja PP5300::Km. Joonisel on toodud iga tüve 16 rakukultuuri keskmised generatsiooniajad ja 95% usalduspiirid.

Enterobakteritel on ainult üks GS, mida kodeerib *glnA* ning *glnA* defektsed mutandid on glutamiini suhtes auksotroofsed (Deleo ja Magasanik, 1975). Kuna *P. putida*'l on www.pseudomonas.com andmebaasis (Winsor jt, 2011) annoteeritud 8 GS-i, siis need kas kompenseerivad üksteist või on *PP5299*-l mingi teine funktsioon rakus ja seetõttu ka lämmastikuvaeguses efekti pole.

2.3.6. *P. putida* glutamiini süntetaaside joondamine ja virtuaalne analüüs

Kuigi *P. putida* KT2440 genoomi annotatsiooni põhjal on sellel bakteril kaheksa GS geeni, on neid väga vähe uuritud. Praeguseks tuntakse bakterites nelja eritüüpi GS-e (vt peatükki 1.2.2), kuid pole teada, mis tüüpi *P. putida* GS-id (sh *PP5299*) olla võiksid. Järgnevalt püüdsimegi välja selgitada GS *PP5299* tüüpi.

Kõigepealt kasutasime KEGG andmebaasi (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ppu+PP_5299 16.05.2014) PRRN joondustööriista, et konstrueerida *P. putida* GS-ide juuritud fülogeneesipuu (UPGMA; http://www.genome.jp/tools-bin/prntree?tree_upgma+140519193419Z0TwN 16.05.2014) ja vaadata põlvnevust. GS-de fülogeneesipuult on näha, et kõige vanem on *PP5046*, millest on lahknenu kõik järgmised GS-id ning *PP5046*-st kõige kaugemal on kõige hiljem lahknenu *PP5299* ning temale kõige lähedasem GS on *PP5184* (joonis 14).



Joonis 14. *P. putida* GS-de juuritud filogeneesipuu. Puu on saadud kasutades KEGG andmebaasi PRRN joondustööriista UPGMA (http://www.genome.jp/tools-bin/prntree?tree_upgma+140519193419Z0TwN 16.05.2014)

PP5299 ja *PP5184* joendamisel selgus, et need valgud on 86,5% ulatuses identsed. Seega ükskõik, mis nende funktsioon ka ei ole, on nad tõenäoliselt võimelised teineteist kompenseerima. *PP5299* ja *PP5184* funktsiooni uurimiseks tuleks edaspidi konstrueerida *PP5299 PP5184* topeltdeletant.

Kuna GS-de aktiivsaite aminosahappped on eriorganismides üsna konserveerunud (Eisenberg jt, 2000), võrdlesime *E. coli* GS-i *glnA* (GSI tüüpi), *P. putida* GS-i *PP5046*, mis on www.pseudomonas.com'i (Winsor jt, 2011) andmetel annoteeritud kui *glnA* (GSI tüüpi) ning *PP5299* valkude aminosahapppelisi järjestusi. Võttes aluseks Eisenberg jt, 2000 koostatud tabeli GS-i konserveerunud aktiivsaite aminosahapetest eriorganismides (lisa 1), otsisime need üles ka oma võrdluses (joonis 15).

Joonisel 15 esitatud joonduse põhjal võime järeldada, et *PP5046* kodeerib bakteris *P. putida* nn „õiget“ GS-i, mis on lämmastiku metabolismis keskne ensüüm, sest tal on olemas kõik aktiivsaite olulised aminosahappped ning kui vaadata selle geeni operoni struktuuri (www.pseudomonas.com 16.05.2014 andmetel), siis see paikneb ühes operonis lämmastiku metabolismi reguleerivate geenidega *ntrB* ja *ntrC* nagu on see enterobakterites (Alvarez-Morales jt, 1984). Saadud tulemuste põhjal võime veel järeldada, et valk, mida *PP5299* kodeerib, ei ole GSI tüüpi. See seletab ka seda, miks *PP5299* deletsioonitüvel ei esinenud lämmastikuvaeguses kasvupeetust, sest selles tüves on alles *PP5046*, mis kodeerib põhilist GS ensüüm. Joendasime *PP5299* põhjal ennustatud aminosahapppelist järjestust ka *Rhizobium meliloti* GSII-ga ja nägime, et need valgud ei joondunud hästi, identsusprotsent oli 15,7%. Sellest järeldasime, et *PP5299* ei kodeeri ka GSII tüüpi valku. Järgmisena joendasime *PP5299* aminosahapppelist järjestust *Bacteroides fragilis*'e GSIII-ga ning juba silmaga oli näha, et *B. fragilis*'e GSIII oli sellest kaks korda pikem. Joendamise tulemuseks saime 14,3% sarnasuse, mis näitab, et *PP5299* ei kodeeri ka GSIII tüüpi ensüümi. Seejärel joendasime

GS-i. Kuna GlnT tüüpi GS on oktameer, GSI aga dodekameer (ehk GSI-l on rohkem aktiivsaite), siis see seletab ka seda, miks *PP5299* puhul mõned aktiivsaidi aminohapped puudusid võrreldes *E. coli glnA*-ga. Lisaks viitavad joondamise tulemused sellele, et *PP5184* kodeerib samuti GlnT tüüpi GS-i, sest omas joondamisel *PP5299*-lt ennustatud aminohappelise järjestusega 86,5% identsust ning ka selle geeni puhul olid esindatud kõik aktiivtsentri aminohapped nagu *PP5299* puhul (joondus pole esitatud). Joondamised teiste *P. putida* GS-dega annavad alust arvata, et need kaks pole sugugi ainsad GlnT aktiivsusega ensüümid *P. putidas*. Joondades *R. leguminosarum*'i GlnT-ga teisi *P. putida* oletatavaid GS-e nägime ka seal sarnasust: *PP4547* 24,4%, *PP2178* 21,9%, *PP3148* 25,4%, *PP5183* 25,8%, *PP4399* 24,9%.

1	MTSVTPCASSSSSEMNDFLQHPDTQYVDLLISDMNGVVRGKRIERASLHKVYEKGINLPA	60	PP5299
1	-----LAAFA-RDKGIKYFMISYTDLFGGQRAKLVPAEAIADMQKDGAGFA-	45	rhiz-glnT
	: * . :*. : :*: * *.* : : : :.* :		
61	SLFALDINGSTVESTGLGLDIGDADRICFPIPGTLSDEPWQKRPTAQLLMTMHELDGQPF	120	PP5299
46	-----GFATWLDLTPAHPDLFALPDASSVIQLPQKKDVA--WVAADCVMDDQPV	92	rhiz-glnT
	:* * * .. ● :.:* . :.: : *:* * : : : : * **.		
121	FADPREVLRQVVSFKFDDLGLTICAAFELEFYLDQDNLNGRPQPPRSPISGKRPQSTQVY	180	PP5299
93	EQAPRVVLRKRLVAEAAKEGLRVKTGVEPEFFLISTDGSVISDQFDT----AEKPCYDQQA	148	rhiz-glnT
	** **:::*. : . ** : :..● ●*:*.* * * : : : * * * ●		
181	LIDDLDEYADCLQDMLEAAKEQGLPADAIVKESAPAQFEVNLHHVADPLKACDYAILLKR	240	PP5299
149	VMRRYDVIAEICDYML----ELGWKPYQNDHEDANGQFEMNWE-YDDALQTADKHSFFKF	203	rhiz-glnT
	:: * * : : ** ● * : :*. * .***:* . * * : : * * : : *		
241	LIKNVAYDHEMDTTFMAKPYPGQAGNGLHVHISLLDKKTGKNIFASDDPLQ--SDTLRHA	298	PP5299
204	MVKSVAEKHGLRATFMPKPKFKGLTGNGCHAHISVWDIDGKVNFAFADKEMPFLSAQKTF	263	rhiz-glnT
	::*. ** . * : :*** ** : * :●** ●.*** : * . * **.. : * :		
299	IGGVLETMPASMAFLCPNINSYRRFGA-----QFYVPNAPSWGLDNRTVAVRVPTDSSE	352	PP5299
264	LGGIMKHASALAAITNPTVNSYKRINAPRTTSGATWAPNTVTVTGNRTHMVRVPGPGR-	322	rhiz-glnT
	::*::: * * * : . :***:● * : : : : : * * * * * * * * *		
353	NVRLEHRVAGADANPYLMLAAILAGVHHGLTNKVEPEAPIEGNSYE-----QLEQSLPNN	407	PP5299
323	---FELRLPDGAVNYPYLLQAIIIAAGLDGIRSQADPGRHYDIDMYAEGYLVKDAPRLPLN	379	rhiz-glnT
	:●● : . ***** : * :*. . * : : : : * : : : * * *		
408	LRDALRALDDSEVLNQYISPDYIDIFVACKESELAEFEVSISDLEYNWYLHTV	460	PP5299
380	LLDALRAYDADEGLKQAI GAEFSAAYLKLKHQEWNAYC SHFTQWERDSTLD--	430	rhiz-glnT
	* ***** * . * * : * * . : : : : * . * : : : : * : * .		

- adenüleerimissait
- aktiivsaidid, mis puudu
- aktiivsaidid, mis olemas

Joonis 16. *PP5299* ja *R. leguminosarum*'i *glnT* geenidelt ennustatud aminohappeliste järjestuste joondus. Punased täpid tähistavad aktiivsaidi aminohappeid, mis on olemas nii *PP5299* valgu kui ka *R. leguminosarum*'i GlnT puhul. Sinine täpp tähistab aktiivsaidi aminohapet, mis on olemas *PP5299* puhul, kuid puudub *R. leguminosarum*'i GlnT puhul. Lilla täpiga on tähistatud adenüleerimissait, mis on olemas mõlemal valgul, kuigi GlnT aktiivsus on reguleeritud arginiini jäägi ADP-ribosüleerimise mitte türosiini jäägi adenüleerimisega (vt peatükki 1.2.2). Joondamiseks on kasutatud UniProti joondamisprogrammi ClustalO (www.uniprot.org 16.05.2014), saadud joondust on modifitseeritud Adobe Photoshop programmiga.

Mullabakteritele nagu *P. putida* on lämmastiku metabolismus väga oluline, see seletab, miks tal on GS-e rohkem kui üks. Aga kuna *P. putida* ei ole taimesümbiont ega fikseeri õhulämmastikku nagu *Rhizobium*'id, siis on üllatav, et tal GS-e lausa kaheksa on. Võib arvata, et mõned neist on tekkinud duplitseerumise käigus, ning on praeguseks oma funktsiooni kaotanud, aga genoomis on veel alles. Selleks, et selgitada ülejäänud *P. putida* 7 GS-i funktsioone (juhul kui *PP5046* on ikka GS1), tuleks konstrueerida deletsioonitüvi, kus on deleteeritud *PP5046* ning tüved, kus on lisaks *PP5046*-le ka mõned teised GS geenid deleteeritud ning testida neid glutamiini aiksotroofsuse suhtes.

Kokkuvõte

Muutuv keskkond ja toitainetenälg viivad bakterirakud stressi. Stressitingimused soodustavad bakteritel mutatsioonide teket. Mutatsioonid võivad olla nii kahjulikud kui kasulikud, kuid suurenenud mutatsioonisagedusega tüvedel on suurem tõenäosus genereerida mutatsioone, mis annavad teiste mikroobide ees eelise, näiteks antibiootikumi resistentsuse tekke. Kasulikud mutatsioonid kinnistuvad läbi loodusliku valiku ning bakterid evolutsioneeruvad.

DNA reparatsiooniradade defektsuse korral ilmneb bakteritel mutaatorfenotüüp. Reparatsiooniradade ensüümide defektsusest põhjustatud mutatsioonisageduse suurenemist on palju näidatud. Käesoleva tööga aga näitasime, et ka metabolismiradade ensüümide defektsus võib mõjutada mutatsiooniprotsesse.

Bakalaureuse töö teoreetilises osas andsin ülevaate bakterites toimuvast mutatsiooniprotsessidest ning mutatsioonisagedust mõjutavatest geenidest. Lisaks kirjeldasin ülevaatlikult lämmastiku metabolismi ja selle regulatsiooni bakterites.

Meie laboris uuritakse mutatsiooniprotsesse bakteris *P. putida* (Kivisaar, 2010). Töö praktilises osas kasutasin mutatsioonisagedust mõjutavate geenide isoleerimiseks Heili Ilvese loodud testsüsteemi lac-lsc. Testtüvega PaWlacIIsc viisime läbi transposoonmutageneesi. Testsüsteem tõi lisaks reparatsiooniraja geenidele välja ka paljusid teisi geene. Näiteks oli minitransposoon inserteerunud transporterite geenidesse, membraanivalkude geenidesse, regulaatorite ja metabolismiga seotud geenidesse. Teiste hulgas sisenes minitransposoon korduvalt lämmastiku metabolismiga seotud *PP5299* geeni ning sellele külgnevatesse geenidesse. *PP5299* geeni ja kogu operoni mõju uurimiseks mutatsioonisagedusele konstrueerisime vastavad deletsioonitüved.

Käesoleva töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Transposooni katkestusega tüvede *PP5298::Km*, *PP5299::Km* ja *PP5300::Km* mutatsioonisagedus eksponentsiaalses faasis on suurem algse PaW85 tüve omast. Deletsioonitüvede $\Delta PP5299$ ja Δ operon mutatsioonisagedus eksponentsiaalses faasis on samuti suurenenud võrreldes *P. putida* PaW85 algtüvega, mis viitab sellele, et nende geenide ekspressioon mõjutab mutatsiooniprotsesse. Samuti kinnitasid need tulemused seda, et lac-lsc testsüsteemi abil on võimalik isoleerida lisaks DNA reparatsiooniga seotud geenidele ka teisi geene, mille puudumisel on mutatsioonisagedus ka tegelikult tõusnud.
2. Transposoonmutantide mutatsioonisagedused olid suuremad võrreldes vastavate geenide deletsioonitüvedega, mis viitab sellele, et transposooni insertioon võib

lisaks geeni inaktivatsioonile mõjutada ka sellele geenile külgnevate geenide ekspressiooni ja selle kaudu mutatsioonisagedust.

3. *PP5299* geeni ja kogu operoni puudumine mõjutab alates 8. nälgimispäevast statsionaarse faasi mutatsioonisagedust. Seega võiksid *PP5299* geeni ja operoni produktid olla potentsiaalselt olulised talumaks stressi ja käivitamaks stressivastust.
4. *PP5299* geeni ja kogu operoni puudumine ei mõjuta DNA-d kahjustavate kemikaalide (MMC, NQO, vesinikperoksiid ja paraquaad) taluvust.
5. Lämmastiku hulk ei mõjuta *PP5299* geeni ja operoni puudumisel rakkude kasvu. Järelikult ei ole *PP5299* lämmastiku metabolismis keskne ensüüm, või vähemalt ei see ole ainus, mis omab sellist aktiivsust.
6. *PP5299* kodeerib GlnT tüüpi GS-i. *PP5299*-lt ennustatud aminohappelise järjestusega 86,5% identsust omav *PP5184* kodeerib samuti GlnT tüüpi GS-i. Antud töö põhjal on alust arvata, et ka ülejäänud *P. putida* oletatavad GS-id kodeerivad GlnT aktiivsusega ensüüme. Samas ei saa me praeguste andmete põhjal veel väita, et kõik *P. putida*'le annoteeritud GS-id omavad üldse funktsiooni seoses lämmastiku metabolismiga.

Involvement of glutamine synthetases in mutational processes in

Pseudomonas putida

Johanna Elmik

Summary

It has been shown that environmental stress can induce genomic changes in bacteria. Mutations are the driving force of evolution providing diversity in bacterial populations. Mutations that generate fitter mutants remain in the genome over generations and therefore are essential for evolution.

It has recently become clear that the model organism *Escherichia coli* is a rather exceptional bacterium and studying only *E. coli* does not provide a broad understanding of bacterial molecular mechanisms. The genus *Pseudomonas* is a large diverse group of ubiquitous bacteria which inhabit soil, water, plants and can even be pathogenic to humans. Studying *Pseudomonas* can provide helpful insight about molecular mechanisms which are not common in *E. coli*. Therefore, in our laboratory we are concentrated on studying mutational processes in *Pseudomonas putida*.

The enzymes of DNA repair are well-known antimutators. Antimutators are genes that induce a high mutation frequency when being deficient. The linkage between mutation frequency and repair enzymes has been thoroughly studied, but there is a reason to believe that not all genes that affect mutation frequency are related to DNA repair. A testsystem, lac-lsc, has been constructed in our laboratory which enables to select transposonmutants with increased mutation frequency. Among others genes picked up with the test system, we detected multiple transposon insertions into *PP5299* gene that belongs to nitrogen metabolic pathway and into its collateral genes. To study the effect of *PP5299* gene and its operon to mutation frequency we constructed strains lacking *PP5299* and its whole operon.

The results of my study can be summarized as follows:

1. The mutation frequency of transposonmutants *PP5298::Km*, *PP5299::Km* and *PP5300::Km* in exponential-growth phase is increased compared to the *P. putida* wild type strain PaW85. The deletion strains *PaWΔPP5299* and *PaWΔoperon* display a similar effect. This confirms that the expression of these genes can affect mutational processes. These results also assured that it is possible to isolate mutation frequency affecting genes with the lac-lsc testsystem.
2. The mutation frequency of the transposonmutants was higher than the mutation frequency of the respective deletion. This refers that the transposon insertion might

affect the expression of collateral genes in addition to inactivation of the disrupted gene and that may play a role in affecting mutation frequency.

3. The absence of *PP5299* and the whole operon affects mutation frequency in stationary-phase from day 8 onwards. Therefore the products of *PP5299* gene and its operon are potentially significant for tolerating stress.

4. The absence of the *PP5299* gene and the whole operon does not affect the tolerance of selected DNA-damaging chemicals (MMC, NQO, hydroperoxide and paraquat).

5. The amount of nitrogen in the medium does not affect the growth of Δ PP5299 or Δ operon strains. Therefore, *PP5299* either does not code for a central enzyme in nitrogen metabolism, or it is not the only one with glutamine synthetase (GS) activity in *P. putida*.

6. *PP5299* encodes a GlnT type GS. The amino acid sequence of PP5299 protein is 86.5% identical to the amino acid sequence of PP5184. Consequently, *PP5184* also encodes a GlnT type GS. According to this study there is a reason to believe that all the other presumable GS-s in *P. putida* encode GlnT-like enzymes. However, based on this data we cannot yet state that all annotated GS-s of *P. putida* have a function related to nitrogen metabolism.

Tänuõnad

Kõige suurem tänu minu juhendajatele Marile, kes minuga igapäevaselt laboris tegeledes, oli kannatlik ja abivalmis, ning oma magistritöö kirjutamise kõrvalt leidis alati aega anda nõu ja soovitusi ka minule, ning Maiale, kes oli asendamatu abiga minu lõputöö valmimisel. Lisaks tänan kõiki meie labori liikmeid, kes olid sõbralikud ja valmis nõu ja jõuga abiks olema. Tänaksin ka oma perekonda ja kaastudengeid motivatsiooni ja toetuse eest.

Kasutatud kirjandus

- Abella, M., I. Erill, M. Jara, G. Mazon, S. Campoy ja J. Barbe (2004).** "Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the *Proteobacteria* phylum." *Mol Microbiol* 54(1): 212-222.
- Adams, M. H. (1959).** "Bacteriophages". Interscience Publishers Inc., New York.
- Alvarez-Morales, A., R. Dixon ja M. Merrick (1984).** "Positive and negative control of the *glnA ntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*." *EMBO J* 3(3): 501-507.
- Arcondeguy, T., R. Jack ja M. Merrick (2001).** "P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control." *Microbiol Mol Biol Rev* 65(1): 80-105.
- Austin, S. ja R. Dixon (1992).** "The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent." *EMBO J* 11(6): 2219-2228.
- Balashov, S. ja M. Z. Humayun (2002).** "Mistranslation induced by streptomycin provokes a RecABC/RuvABC-dependent mutator phenotype in *Escherichia coli* cells." *J Mol Biol* 315(4): 513-527.
- Balashov, S. ja M. Z. Humayun (2003).** "*Escherichia coli* cells bearing a ribosomal ambiguity mutation in *rpsD* have a mutator phenotype that correlates with increased mistranslation." *J Bacteriol* 185(16): 5015-5018.
- Barnes, E. M., Jr. ja A. Jayakumar (1993).** " NH_4^+ transport systems in *Escherichia coli*". CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Bauchop, T. ja S. R. Elsdén (1960).** "The growth of micro-organisms in relation to their energy supply." *J Gen Microbiol* 23: 457-469.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy ja P. Broda (1977).** "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." *Mol Gen Genet* 154(2): 203-204.
- Bender, R. A. (1991).** "The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*." *Mol Microbiol* 5(11): 2575-2580.
- Berlett, B. S. ja E. R. Stadtman (1997).** "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." *J Biol Chem* 272(33): 20313-20316.
- Bhagwat, A. S. ja M. Lieb (2002).** "Cooperation and competition in mismatch repair: very short-patch repair and methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 44(6): 1421-1428.
- Blazquez, J., J. M. Gomez-Gomez, A. Oliver, C. Juan, V. Kapur ja S. Martin (2006).** "PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* 62(1): 84-99.
- Bohannon, D. E., M. S. Rosenkrantz ja A. L. Sonenshein (1985).** "Regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase genes by the nitrogen source." *J Bacteriol* 163(3): 957-964.
- Boiteux, S., T. R. O'Connor ja J. Laval (1987).** "Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein." *EMBO J* 6(10): 3177-3183.
- Boyer, H. W. ja D. Roulland-Dussoix (1969).** "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 41(3): 459-472.

- Chung, M. H., H. Kasai, D. S. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, E. Ohtsuka ja S. Nishimura (1991).** "An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA." *Mutat Res* 254(1): 1-12.
- Cirz, R. T., J. K. Chin, D. R. Andes, V. de Crecy-Lagard, W. A. Craig ja F. E. Romesberg (2005).** "Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance." *PLoS Biol* 3(6): e176.
- Contreras, A. ja M. Drummond (1988).** "The effect on the function of the transcriptional activator NtrC from *Klebsiella pneumoniae* of mutations in the DNA-recognition helix." *Nucleic Acids Res* 16(9): 4025-4039.
- Couce, A. ja J. Blazquez (2009).** "Side effects of antibiotics on genetic variability." *FEMS Microbiol Rev* 33(3): 531-538.
- Coulondre, C., J. H. Miller, P. J. Farabaugh ja W. Gilbert (1978).** "Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*." *Nature* 274(5673): 775-780.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown ja 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, E. C. ja D. L. Horner (1983).** "Structure and coding properties of a dominant *Escherichia coli* mutator gene, *mutD*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(8): 2295-2299.
- Deleo, A. B. ja B. Magasanik (1975).** "Identification of the structural gene for glutamine synthetase in *Klebsiella aerogenes*." *J Bacteriol* 121(1): 313-319.
- Demple, B. (1991).** "Regulation of bacterial oxidative stress genes." *Annu Rev Genet* 25: 315-337.
- Donald, R. G., J. Lapointe ja R. A. Ludwig (1988).** "Characterization of the *Azorhizobium sesbaniae* ORS571 genomic locus encoding NADPH-glutamate synthase." *J Bacteriol* 170(3): 1197-1204.
- Drlica, K. ja X. Zhao (1997).** "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." *Microbiol Mol Biol Rev* 61(3): 377-392.
- Drummond, M., P. Whitty ja J. Wootton (1986).** "Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins." *EMBO J* 5(2): 441-447.
- Duncan, B. K. ja B. Weiss (1982).** "Specific mutator effects of *ung* (uracil-DNA glycosylase) mutations in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 151(2): 750-755.
- Eisenberg, D., H. S. Gill, G. M. Pfluegl ja S. H. Rotstein (2000).** "Structure-function relationships of glutamine synthetases." *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 122-145.
- Engleman, E. G. ja S. H. Francis (1978).** "Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade." *Arch Biochem Biophys* 191(2): 602-612.
- Erill, I., S. Campoy, G. Mazon ja J. Barbe (2006).** "Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain." *Nucleic Acids Res* 34(1): 66-77.
- Ernsting, B. R., J. W. Denninger, R. M. Blumenthal ja R. G. Matthews (1993).** "Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein?" *J Bacteriol* 175(22): 7160-7169.

- Espin, G., S. Moreno, M. Wild, R. Meza ja M. Iaccarino (1990).** "A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*." *Mol Gen Genet* 223(3): 513-516.
- Farr, S. B., R. D'Ari ja D. Touati (1986).** "Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(21): 8268-8272.
- Feig, D. I., L. C. Sowers ja L. A. Loeb (1994).** "Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14): 6609-6613.
- Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori ja R. Woodgate (2000).** "Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 35(6): 1560-1572.
- Fiedler, U. ja V. Weiss (1995).** "A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules." *EMBO J* 14(15): 3696-3705.
- Foster, P. L. (1999).** "Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation." *Annu Rev Genet* 33: 57-88.
- Foster, P. L. (2007).** "Stress-induced mutagenesis in bacteria." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(5): 373-397.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz ja T. Ellenberger (2006).** "DNA repair and mutagenesis". ASM Press, Washington, DC, USA.
- Glickman, B. W. (1979).** "Spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* strains lacking 6-methyladenine residues in their DNA: an altered mutational spectrum in *dam*⁻ mutants." *Mutat Res* 61(2): 153-162.
- Goss, T. J. ja R. A. Bender (1995).** "The nitrogen assimilation control protein, NAC, is a DNA binding transcription activator in *Klebsiella aerogenes*." *J Bacteriol* 177(12): 3546-3555.
- Hanahan, D. ja M. Meselson (1983).** "Plasmid screening at high colony density." *Methods Enzymol* 100: 333-342.
- Hastings, P. J., M. N. Hersh, P. C. Thornton, N. C. Fonville, A. Slack, R. L. Frisch, M. P. Ray, R. S. Harris, S. M. Leal ja S. M. Rosenberg (2010).** "Competition of *Escherichia coli* DNA polymerases I, II and III with DNA Pol IV in stressed cells." *PLoS One* 5(5): e10862.
- Herrero, M., V. de Lorenzo ja K. N. Timmis (1990).** "Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria." *J Bacteriol* 172(11): 6557-6567.
- Hervas, A. B., I. Canosa ja E. Santero (2008).** "Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability." *J Bacteriol* 190(1): 416-420.
- Hill, R. T., J. R. Parker, H. J. Goodman, D. T. Jones ja D. R. Woods (1989).** "Molecular analysis of a novel glutamine synthetase of the anaerobe *Bacteroides fragilis*." *J Gen Microbiol* 135(12): 3271-3279.
- Jahandideh, S. (2013).** "Diversity in structural consequences of MexZ mutations in *Pseudomonas aeruginosa*." *Chem Biol Drug Des* 81(5): 600-606.
- Janion, C. (2008).** "Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*." *Int J Biol Sci* 4(6): 338-344.

- Janssen, D. B., H. J. op den Camp, P. J. Leenen ja C. van der Drift (1980).** "The enzymes of the ammonia assimilation in *Pseudomonas aeruginosa*." Arch Microbiol 124(2-3): 197-203.
- Jatsenko, T., A. Tover, R. Tegova ja M. Kivisaar (2010).** "Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*." Mutat Res 683(1-2): 106-114.
- Jayakumar, A., I. Schulman, D. MacNeil ja E. M. Barnes, Jr. (1986).** "Role of the *Escherichia coli* *glnALG* operon in regulation of ammonium transport." J Bacteriol 166(1): 281-284.
- Kamberov, E. S., M. R. Atkinson, P. Chandran ja A. J. Ninfa (1994).** "Effect of mutations in *Escherichia coli* *glnL* (*ntrB*), encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation." J Biol Chem 269(45): 28294-28299.
- Kamberov, E. S., M. R. Atkinson ja A. J. Ninfa (1995).** "The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP." J Biol Chem 270(30): 17797-17807.
- Keener, J. ja S. Kustu (1988).** "Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC." Proc Natl Acad Sci U S A 85(14): 4976-4980.
- Kivisaar, M. (2010).** "Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads." FEMS Microbiol Lett 312(1): 1-14.
- Kouchakdjian, M., V. Bodepudi, S. Shibutani, M. Eisenberg, F. Johnson, A. P. Grollman ja D. J. Patel (1991).** "NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn):dA(anti) alignment at lesion site." Biochemistry 30(5): 1403-1412.
- Kunz, B. A., E. S. Henson, H. Roche, D. Ramotar, T. Nunoshiba ja B. Demple (1994).** "Specificity of the mutator caused by deletion of the yeast structural gene (*APN1*) for the major apurinic endonuclease." Proc Natl Acad Sci U S A 91(17): 8165-8169.
- Leigh, J. A. ja J. A. Dodsworth (2007).** "Nitrogen regulation in bacteria and archaea." Annu Rev Microbiol 61: 349-377.
- Lewis, T. A., R. Gonzalez ja J. L. Botsford (1990).** "*Rhizobium meliloti* glutamate synthase: cloning and initial characterization of the *glt* locus." J Bacteriol 172(5): 2413-2420.
- Lieb, M. (1991).** "Spontaneous mutation at a 5-methylcytosine hotspot is prevented by very short patch (VSP) mismatch repair." Genetics 128(1): 23-27.
- Liu, J. ja B. Magasanik (1995).** "Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator I-phosphate of *Escherichia coli*." J Bacteriol 177(4): 926-931.
- Liu, Y. ja M. L. Kahn (1995).** "ADP-ribosylation of *Rhizobium meliloti* glutamine synthetase III *in vivo*." J Biol Chem 270(4): 1624-1628.
- Lovett, S. T. (2006).** "Replication arrest-stimulated recombination: Dependence on the RecA paralog, RadA/Sms and translesion polymerase, DinB." DNA Repair (Amst) 5(12): 1421-1427.

- Lujan, A. M., A. J. Moyano, I. Segura, C. E. Argarana ja A. M. Smania (2007).** "Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa mutS* strain." *Microbiology* 153(Pt 1): 225-237.
- Macaluso, A., E. A. Best ja R. A. Bender (1990).** "Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*." *J Bacteriol* 172(12): 7249-7255.
- Mackay, W. J., S. Han ja L. D. Samson (1994).** "DNA alkylation repair limits spontaneous base substitution mutations in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 176(11): 3224-3230.
- Mandal, A. K. ja S. Ghosh (1993).** "Isolation of a glutamate synthase (GOGAT)-negative, pleiotropically N utilization-defective mutant of *Azospirillum brasilense*: cloning and partial characterization of GOGAT structural gene." *J Bacteriol* 175(24): 8024-8029.
- Mandsberg, L. F., M. D. Macia, K. R. Bergmann, L. E. Christiansen, M. Alhede, N. Kirkby, N. Hoiby, A. Oliver ja O. Ciofu (2011).** "Development of antibiotic resistance and up-regulation of the antimutator gene *pfpI* in mutator *Pseudomonas aeruginosa* due to inactivation of two DNA oxidative repair genes (*mutY*, *mutM*)." *FEMS Microbiol Lett* 324(1): 28-37.
- Martinez-Garcia, E., B. Calles, M. Arevalo-Rodriguez ja V. de Lorenzo (2011).** "pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes." *BMC Microbiol* 11: 38.
- Merrick, M. J. ja R. A. Edwards (1995).** "Nitrogen control in bacteria." *Microbiol Rev* 59(4): 604-622.
- Mettke, I., U. Fiedler ja V. Weiss (1995).** "Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity." *J Bacteriol* 177(17): 5056-5061.
- Michaels, M. L., C. Cruz, A. P. Grollman ja J. H. Miller (1992).** "Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 7022-7025.
- Michaels, M. L., L. Pham, C. Cruz ja J. H. Miller (1991).** "MutM, a protein that prevents G:C->T:A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase." *Nucleic Acids Res* 19(13): 3629-3632.
- Miller, C., H. Ingmer, L. E. Thomsen, K. Skarstad ja S. N. Cohen (2003).** "DpiA binding to the replication origin of *Escherichia coli* plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response." *J Bacteriol* 185(20): 6025-6031.
- Miller, C., L. E. Thomsen, C. Gaggero, R. Mosseri, H. Ingmer ja 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).** "Experiments in Molecular Genetics". Cold Spring Harbor Press, New York.
- Miller, J. H. (1996).** "Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair." *Annu Rev Microbiol* 50: 625-643.
- Modrich, P. (1991).** "Mechanisms and biological effects of mismatch repair." *Annu Rev Genet* 25: 229-253.

- Morett, E. ja L. Segovia (1993).** "The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains." *J Bacteriol* 175(19): 6067-6074.
- Mylonas, C. ja D. Kouretas (1999).** "Lipid peroxidation and tissue damage." *In Vivo* 13(3): 295-309.
- Ninfa, A. J. ja R. L. Bennett (1991).** "Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII." *J Biol Chem* 266(11): 6888-6893.
- Ninfa, A. J., L. J. Reitzer ja B. Magasanik (1987).** "Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers." *Cell* 50(7): 1039-1046.
- Ninfa, E. G., M. R. Atkinson, E. S. Kamberov ja A. J. Ninfa (1993).** "Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): *trans*-phosphorylation between subunits." *J Bacteriol* 175(21): 7024-7032.
- Ninio, J. (1991).** "Transient mutators: a semiquantitative analysis of the influence of translation and transcription errors on mutation rates." *Genetics* 129(3): 957-962.
- Oliver, A. ja A. Mena (2010).** "Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance." *Clin Microbiol Infect* 16(7): 798-808.
- Oliver, G., G. Gosset, R. Sanchez-Pescador, E. Lozoya, L. M. Ku, N. Flores, B. Becerril, F. Valle ja F. Bolivar (1987).** "Determination of the nucleotide sequence for the glutamate synthase structural genes of *Escherichia coli* K-12." *Gene* 60(1): 1-11.
- Patel, M., Q. Jiang, R. Woodgate, M. M. Cox ja M. F. Goodman (2010).** "A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45(3): 171-184.
- Porter, S. C., A. K. North, A. B. Wedel ja S. Kustu (1993).** "Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation." *Genes Dev* 7(11): 2258-2273.
- Poulsen, L. K., T. R. Licht, C. Rang, K. A. Krogh ja S. Molin (1995).** "Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice." *J Bacteriol* 177(20): 5840-5845.
- Rebeck, G. W. ja L. Samson (1991).** "Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the *ogt* O6-methylguanine DNA repair methyltransferase." *J Bacteriol* 173(6): 2068-2076.
- Reitzer, L. J. ja B. Magasanik (1985).** "Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(7): 1979-1983.
- Rodriguez-Rojas, A. ja J. Blazquez (2009).** "The *Pseudomonas aeruginosa pfpI* gene plays an antimutator role and provides general stress protection." *J Bacteriol* 191(3): 844-850.
- Rosenberg, S. M. (2001).** "Evolving responsively: adaptive mutation." *Nat Rev Genet* 2(7): 504-515.
- Sanders, L. H., A. Rockel, H. Lu, D. J. Wozniak ja M. D. Sutton (2006).** "Role of *Pseudomonas aeruginosa dinB*-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis." *J Bacteriol* 188(24): 8573-8585.
- Scheuermann, R. H. ja H. Echols (1984).** "A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(24): 7747-7751.

- Schwacha, A. ja R. A. Bender (1993).** "The product of the *Klebsiella aerogenes nac* (nitrogen assimilation control) gene is sufficient for activation of the hut operons and repression of the *gdh* operon." *J Bacteriol* 175(7): 2116-2124.
- Servin-Gonzalez, L. ja F. Bastarrachea (1984).** "Nitrogen regulation of synthesis of the high affinity methylammonium transport system of *Escherichia coli*." *J Gen Microbiol* 130(12): 3071-3077.
- Shatters, R. G., Y. Liu ja M. L. Kahn (1993).** "Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*." *J Biol Chem* 268(1): 469-475.
- Slupska, M. M., C. Baikalov, R. Lloyd ja J. H. Miller (1996).** "Mutator tRNAs are encoded by the *Escherichia coli* mutator genes *mutA* and *mutC*: a novel pathway for mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 4380-4385.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa ja A. M. Stock (1989).** "Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria." *Microbiol Rev* 53(4): 450-490.
- Storz, G., M. F. Christman, H. Sies ja B. N. Ames (1987).** "Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 8917-8921.
- Sung, Y. C. ja J. A. Fuchs (1992).** "The *Escherichia coli* K-12 *cyn* operon is positively regulated by a member of the *lysR* family." *J Bacteriol* 174(11): 3645-3650.
- Tagel, M. (2014).** "Uute mutatsioonisagedust mõjutavate geenide identifitseerimine bakteris *Pseudomonas putida*". Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Tegova, R., A. Tover, K. Tarassova, M. Tark ja M. Kivisaar (2004).** "Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*." *J Bacteriol* 186(9): 2735-2744.
- Trusca, D., S. Scott, C. Thompson ja D. Bramhill (1998).** "Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein." *J Bacteriol* 180(15): 3946-3953.
- Ukkivi, K. (2013).** "Transkriptsiooni ja transkriptsiooniga seotud DNA reparatsiooni mõju mutatsiooniprotsessidele bakteris *Pseudomonas putida*". Magistritöö, Tartu Ülikool.
- van Heeswijk, W. C., H. V. Westerhoff ja F. C. Boogerd (2013).** "Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective." *Microbiol Mol Biol Rev* 77(4): 628-695.
- Weiss, V., F. Claverie-Martin ja B. Magasanik (1992).** "Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(11): 5088-5092.
- Wiegand, I., A. K. Marr, E. B. Breidenstein, K. N. Schurek, P. Taylor ja R. E. Hancock (2008).** "Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* 52(10): 3810-3813.
- Winsor, G. L., D. K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M. D. Whiteside, N. Y. Yu, R. E. Hancock ja F. S. Brinkman (2011).** "Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes." *Nucleic Acids Res* 39(Database issue): D596-600.

Yamashita, M. M., R. J. Almasy, C. A. Janson, D. Cascio ja D. Eisenberg (1989).
"Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution." J Biol Chem 264(30):
17681-17690.

Kasutatud veebilehed

http://www.genome.jp/tools-bin/prntree?tree_upgma+140519193419Z0TwN

<http://www.genome.jp/kegg>

www.uniprot.org

www.pseudomonas.com

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johanna Elmik
(sünnikuupäev: 14.09.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
***Pseudomonas putida* glutamiini süntetaaside osalus mutatsiooniprotsessides,**

mille juhendajad on Maia Kivisaar ja Mari Tagel,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 23.05.2014